

**Autökologische und molekularbiologische
Untersuchungen zur Charakterisierung
der Kleidermotte *Tineola bisselliella* (Lepidoptera)
als Referenzorganismus**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Bianca Herrmann

geboren in Berlin

Berlin, Mai 2016

Angefertigt im Zeitraum von Februar 2010 bis Mai 2016 unter der Leitung von Herrn Dr. Rüdiger Plarre an der Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung, im Fachbereich 4.1

1. Gutachter: Dr. Rüdiger Plarre
2. Gutachter: Prof. Dr. Rupert Mutzel

Disputation am 26.10.2016

Inhaltsverzeichnis	2
1 Einleitung	4
1.1 Die Kleidermotte <i>Tineola bisselliella</i> (Hummel)	4
1.1.1 Der Lebenszyklus von <i>Tineola bisselliella</i>	5
1.1.2 Physiologie und Verhalten von <i>Tineola bisselliella</i>	6
1.1.3 Die Systematik zu <i>Tineola bisselliella</i>	7
1.1.4 Ursprung und Vorkommen von <i>Tineola bisselliella</i>	7
1.2 Vorrats- und Materialschutz	9
1.3 Das Artkonzept	9
1.3.1 Genetik und Speziation	10
1.3.2 Methoden der DNA-Taxonomie	11
2 Ziele der Arbeit	15
2.1 Die ökologischen Potenz und Konkurrenzfähigkeit der Kleidermotte <i>Tineola bisselliella</i>	15
2.2 Das Vorkommen der Kleidermotte <i>Tineola bisselliella</i> in natürlichen Habitaten	16
2.3 Molekularbiologische Untersuchung auf der Ebene der Spezies und Subspezies	16
3 Material und Methoden	18
3.1 Zucht- und Freilandorganismen	18
3.1.1 BAM-Zuchten	18
3.1.2 <i>Tineola bisselliella</i> und <i>Niditinea fuscipunctella</i> aus dem Freiland	20
3.1.3 <i>Ephestia kuehniella</i>	21
3.2 Versuchsplanung	21
3.2.1 Aspekte der Stichprobenwahl	22
3.2.2 Aspekte der Variabilität	22
3.2.3 Aspekte der Konstanz der Faktoren	23
3.3 Untersuchungen zur ökologischen Potenz und Konkurrenzstärke von <i>Tineola bisselliella</i>	24
3.3.1 Untersuchungen zum Falterschlupf von <i>Tineola bisselliella</i> bei einer unterschiedlichen Anzahl eingesetzter Eier	24
3.3.2 Untersuchungen zur ökologischen Potenz und Konkurrenzstärke der Kleidermotte <i>Tineola bisselliella</i> gegenüber dem Polsterwarenkäfer <i>Anthrenus flavipes</i>	25
3.4 Faunistische Untersuchungen	26
3.4.1 Fallentypen und Beprobungsrhythmus	27
3.4.2 Fallenstandorte	30
3.5 Molekularbiologische Methoden	33
3.5.1 DNA-Isolierung	33
3.5.2 DNA-Amplifikation – Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	36
3.5.3 Elektrophoresetechniken	47
3.5.4 DNA-Aufreinigung	49
3.5.5 Überprüfung der BOX-PCR-Muster auf mitochondrialen Ursprung	50
3.5.6 Sequenzierung	54

3.6	Biostatistik	55
3.6.1	Deskriptive Statistik	55
3.6.2	Induktive Statistik	57
3.6.3	Analytische Statistik	58
3.7	Material	62
3.7.1	Arbeitsgeräte	62
3.7.2	Verbrauchsmaterial	64
3.7.3	Chemikalien, Enzyme und Kits	65
3.7.4	Puffer und Lösungen	66
3.7.5	Sterilisierung von Puffern, Medien und Gebrauchsmaterial	68
3.7.6	Oligonukleotide und Vektoren	68
3.7.7	Software/Programme/Webschnittstellen	69
3.7.8	Bakterienstamm	70
3.7.9	Kulturmedien	70
4	Ergebnisse	72
4.1	Charakterisierung der Kleidermotte <i>Tineola bisselliella</i> als Ökospezies	72
4.1.1	Untersuchungen zum Falterschlupf von <i>Tineola bisselliella</i> bei unterschiedlicher Anzahl eingesetzter Eier	72
4.1.2	Versuche zur ökologischen Potenz und Konkurrenzstärke	73
4.1.3	Faunistische Untersuchungen	83
4.2	Charakterisierung der Kleidermotte <i>Tineola bisselliella</i> als Genospezies	88
4.2.1	Phylogenie auf der Ebene der Spezies	88
4.2.2	Phylogenie auf der Ebene der Subspezies	93
4.2.3	BOX-PCR-Bandenmuster und genetische Distanzen	96
5	Diskussion	119
5.1	Die ökologische Potenz der Kleidermotte <i>Tineola bisselliella</i>	119
5.2	Vorkommen und Verbreitung der Kleidermotte <i>T. bisselliella</i> in Berlin und Umgebung	120
5.3	<i>Tineola bisselliella</i>, eine Spezialisierung der Gattung <i>Tinea</i>?	121
5.4	Genetische Distanzen und die Herausbildung von Populationen	122
5.5	Schlussfolgerungen für die Prävention eines Kleidermottenbefall	123
5.6	Die BOX-PCR, ein Fingerprintsystem für Insekten?	124
5.6.1	Qualitative Analyse der BOX-PCR	124
5.6.2	Reproduzierbarkeit der BOX-PCR Bandenmuster	125
5.6.3	Analysen der BOX-PCR Muster auf Agarosegelen mit PyElph	126
6	Tabellenverzeichnis	127
7	Abbildungsverzeichnis	128
8	Abkürzungsverzeichnis	131
9	Anlagen	133
10	Zusammenfassung	136
11	Literaturverzeichnis	137
12	erfolgte Publikationen	150

Schädlinge sind Organismen, die dem Menschen schaden, indem sie seine Lebensmittel oder Gegenstände unbrauchbar machen oder Krankheiten übertragen. Von Schädlingskatastrophen wird schon im Alten Testament der Bibel (10. bis 6. Jahrhundert vor Christus) berichtet (Levinson & Levinson, 2001). Schädlinge sind vor allem im Zusammenhang mit der entstandenen Lebensmittellagerung und der Domestikation, dem engen Zusammenleben von Mensch und Tier, zu einem tragenden Problem geworden.

Die Entstehung von Siedlungen und Kulturlandschaften verändert die Naturlandschaft und schafft neue Lebensräume, die sich durch ein reiches Nahrungsangebot und den Schutz vor Witterungs- und Klimaeinflüssen auszeichnen. Dies machen sich vor allem Insekten zu Nutze, die als Siedlungs- oder Gebäude-/Wohnungssynanthropen neue ökologische Nischen verwirklichen (Weidner, 1958; Frankie & Ehler, 1978; Engelbrecht & Reichmuth, 2005). Günstige mikroklimatische Bedingungen ermöglichen auch Arten aus wärmeren Gebieten sich zu etablieren, so stammen etwa drei Fünftel der nichteinheimischen Arten in Berlin aus eben diesen Gebieten der Erde (Sukopp, 2007).

Das Gebiet der Textilschädlinge gewann während des ersten Weltkrieges an wissenschaftlichem Interesse, da Rohstoffe sowie auch Wolle knapp wurden. Die Farbenfabrik vormals Friedrich Bayer & Co, die 1863 gegründet wurde und den Ursprung der heutigen Bayer AG darstellt, machte sich den Wollschutz zur Aufgabe (Herfs, 1936). Die Kleidermotte *Tineola bisselliella* (Hum.) zählte schon damals zu den wirtschaftlich bedeutsamsten Materialschädlingen weltweit. Ihre Larven richten nicht nur einen finanziellen Schaden durch die Zerstörung keratinhaltiger Produkte wie Haare, Wolle, Federn und Leder in Haushalten und der Industrie an, sondern zerstören auch unwiederbringliche Kulturgüter in Museen (Kemper, 1935; Key & Common, 1959; Becker, 1960; Rajendran & Parveen, 2005; Pinniger, 2010).

1.1 DIE KLEIDERMOTTE *TINEOLA BISSELLIELLA* (HUMMEL)

Tineola bisselliella (Abb. 1-1) ist ein Kleinschmetterling mit einer Flügelspannweite zwischen neun und fünfzehn Millimetern (Robinson & Nielsen, 1993). Die Vorderflügel sind mit glänzenden, gelblich, goldenen Schuppen besetzt, scharf zugespitzt und an den Enden bewimpert. Die Hinterflügel sind weißlich bis grau und ebenfalls mit gelblichen Fransen besetzt. Besonders auffällig sind die kupferfarbenen Kopfhare, die leicht nach vorn gerichtet sind und in ihrer Länge die restlichen Haare an Kopf und Körper übersteigen. Die Augen sind schwarz und eher klein, die Antennen kürzer als die Vorderflügel und dunkler als der Rest des Körpers. Der Saugrüssel ist reduziert, die Maxillarpalpen viersegmentiert und nur ein Viertel so lang wie die Labialpalpen (Griswold, 1944). Die Falter sind zwischen vier und neun Millimetern lang, die Männchen in der Regel kleiner als die Weibchen.

Die Larve von *T. bisselliella* hat einen weißen, leicht durchscheinenden Körper und wird in der Regel zwischen sieben und neun Millimeter groß. Sie besitzt drei Paar mit Gelenken versehene Coxae und fünf Paar Pseudopodien. Der Kopf sticht durch seine braun, an den Rändern meist dunkelbraun gefärbte Kapsel hervor, Augen fehlen. Frisch geschlüpfte Larven sind nicht größer als 1 mm und ihre Kopfkapsel ist noch hellbraun. Das Ei der Kleidermotte hat eine elliptische Form, ist im Durchschnitt etwa 0,5 mm lang und hat eine leicht perlmuttfarbene, schimmernde Oberfläche. Die leichten Ausbuchtungen des Chorion überziehen das Ei in Form von unregelmäßigen Leisten (Lüscher, 1944).



Abb. 1-1: Imago auf dem Leim einer Falle klebend (links) und Larve im Zuchtsubstrat (rechts) der Kleidermotte *Tineola bisselliella*. (Fotos: Thomas Sommerfeld (BAM 4.1), Bianca Herrmann)

1.1.1 DER LEBENSZYKLUS VON *TINEOLA BISSELLIELLA*

Das Leben eines Falters der Kleidermotte dauert als Weibchen gerade mal etwa drei Wochen, als Männchen ungefähr sechs Wochen (Griswold, 1931). Vorab erfolgt jedoch eine Entwicklung über mehrere Wochen vom Ei über die Larve zur Puppe bis schließlich der Falter schlüpft. Unter Zuchtbedingungen, einer Temperatur von 27° C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70 %, erfolgt die gesamte Entwicklung innerhalb von fünf bis sechs Wochen. Nach bereits fünf Tagen schlüpfen die ersten Larven aus den Eiern und begeben sich auf Nahrungssuche. Sie sind das einzige Stadium, das Nahrung aufnimmt. Bis zu 900 Tage können sie trotz ungeeigneter Nahrung überleben (Weidner, 1970). Dennoch zeigen sich bei einer Verschlechterung der Ernährungsbedingungen eine eindeutig größere Sterblichkeit, kleinere Imagines und deutlich längere Entwicklungsdauern (Titschak, 1926). Die Larven beginnen unmittelbar nach ihrem Schlupf mit dem Spinnen des Seidenfadens, der sie in ihrer Fortbewegung unterstützt. Sobald sie ein geeignetes Nährsubstrat gefunden haben, legen sie in diesem einen aus ihrem Seidenfaden und dem umliegenden Material gesponnenen Köcher an. Neben der Nahrung, die nahezu jedes trockene Material tierischen Ursprungs sein kann und von Fellen über Federn, Wolle, Fischmehl bis hin zu Tierkadavern und menschlichen Skeletten reicht (Griswold, 1944; Becker, 1980; Bucheli, et al., 2010), haben vor allem Temperatur und Luftfeuchtigkeit einen entscheidenden Einfluss auf jedes einzelne Entwicklungsstadium von *T. bisselliella*. In jedem Stadium

zeigt sich mit zunehmender Temperatur eine verkürzte Entwicklungszeit, das Wachstum erfolgt schneller und dauert daher kürzer an (Titschak, 1925; Patel, 1958). Ein ähnlicher Einfluss zeigt sich bei ansteigender relativen Raumfeuchte. Auch hier beschleunigt sich die Entwicklung. Doch selbst bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 20 % erfolgt, wenn auch stark verzögert, noch eine vollständige Entwicklung der Kleidermotte (Griswold & Crowell, 1936; Fraenkel & Blewett, 1946). Insgesamt zeigen diese Ergebnisse ein breites Toleranzspektrum der Kleidermotte, deren Larven auch noch bei 35° C schlüpfen (Rawle, 1951). Das robusteste Stadium stellen die Eier dar, sie überleben -15° C für zwei Tage, 0° C für einundzwanzig Tage (Brokerhof, et al., 1992). Die optimalen Bedingungen liegen bei einer relativen Raumfeuchte von 75 % und 25° C, wobei die untere Grenze für eine vollständige Entwicklung bei 15° C und die obere bei 30° C erreicht ist (Weidner, 1970).

1.1.2 PHYSIOLOGIE UND VERHALTEN VON *TINEOLA BISSELLIELLA*

T. bisselliella gehört zu der Gilde der keratinophagen Insekten und besitzt aufgrund von speziellen Enzymen und einem stark reduzierendem Darmmilieu die Fähigkeit, Keratin zu verdauen. Für den Vorderdarm und Mitteldarm von *T. bisselliella* ist ein hoher pH-Wert von 8,0 bis 9,0 bzw. 9,8 bis 10,0 bekannt (Waterhouse, 1952) und es konnten mehrere Enzyme nachgewiesen werden, die an der Verdauung beteiligt sind (Day, 1951a; Powing, et al., 1951; Day, 1951b; Yoshimura, et al., 1988; Robinson, et al., 1993; Hughes & Vogler, 2006). Dennoch bleibt weiterhin ungeklärt, ob nicht doch auch Bakterien im Darm an der Verdauung des Keratins beteiligt sind. Für das larvale Stadium der Kleidermotte konnte zumindest eine Darmflora aus verschiedenen Bakterien über das 16S rRNA-Gen nachgewiesen werden (Dietz, 2014), doch ist eine keratinolytische Aktivität dieser Bakterien nicht bekannt.

Potentielle Nahrungssubstrate für die Nachkommen werden von der Kleidermotte, den Männchen und den Weibchen, sowohl taktil als auch olfaktorisch erkannt, wobei der Duft von Hefe sowie getrocknetem Tiergewebe anziehend wirken (Wilson, 1940; Kan & Waku, 1985; Traynier, et al., 1994; Takács, et al., 2001a; Traynier, et al., 1995). Diese Signale des Habitats sind so mächtig, dass sie von der Kleidermotte leichter wahrgenommen werden als die eigenen Pheromone (Takács, et al., 2002). Die Charakterisierung potentieller Habitate erfolgt möglicherweise aufgrund der Oxidationsstufe der chemischen Duftstoffe eines Substrates, so dass vor allem die Weibchen der Kleidermotte anhand des relativen Gehalts von Alkoholen und Aldehyden dessen Qualität ermitteln. Dennoch machen die Männchen das larvale Habitat früher als die Weibchen aus und erhöhen auf diese Weise ihre Paarungschancen. (Takács, et al., 2001b). Darüber hinaus produzieren die Männchen Aggregationspheromone (Takács, et al., 2001c) und akustische Signale, die die Weibchen anlocken (Takács & Gries, 2003). Das Weibchen produziert keine akustischen Signale, aber Sexualpheromone. Zwei Pheromonkomponenten der Kleidermotte wurden 1985 erstmalig aus einem groben Extrakt des weiblichen Falters von *T. bisselliella* mittels präparativer Gaschromatographie aufgereinigt und isoliert (Yamaoka, et al., 1985). Sie dienen heute als typische Lockstoffe in den Pheromonfallen.

Die Fortbewegung der Kleidermotte ist nur wenig untersucht. Beschreibungen zur Aktivität und dem Flugvermögen erfolgen in den meisten Veröffentlichungen eher beiläufig und beruhen auf einfachen

Beobachtungen ohne belegbare Daten. Während die Männchen als lebhaft und flatternd beschrieben werden, wird den Weibchen eine nur geringe Aktivität zugeschrieben. Sie bewegen sich hauptsächlich laufend fort und verbleiben nahe ihres Schlupforts (Key & Common, 1959; Parker, 1990). Für die Männchen wird eine Fluggeschwindigkeit von 50 bis 80 cm/sec angegeben, für die Weibchen maximal 50 cm/sec und das auch nur auf kurzen Distanzen (Weidner, 1970). Die Falter sind negativ phototaktisch und suchen bei Licht möglichst dunkle Verstecke auf (Griswold, 1944).

1.1.3 DIE SYSTEMATIK ZU *TINEOLA BISSELLIELLA*

Die Kleidermotte ist ein Kleinschmetterling der Familie der Tineidae und gehört somit einer stark heterogenen phylogenetischen Einheit an. Äußerliche Gemeinsamkeiten der Tineiden sind ein dicht beschuppter Kopf, ein oft gelber oder weißer Schopf zwischen den Antennen, die Rückbildung des Saugrüssels und das Fehlen von Ocellen (Hannemann, 1977). Die Monophylie der Tineidae ist jedoch durch keine Autapomorphie belegt, obwohl sich ihre Vertreter eindeutig von den verbleibenden Ditrysia unterscheiden. Das differenzierende Merkmal, die Beibehaltung eines fünfteiligen Maxillarpalpus, stellt lediglich eine Homoplasie dar, so dass die Tineiden den Grundbauplan der Ditrysia widerspiegeln und als Schwestergruppe der anderen Dytrisia gesetzt werden (Robinson, 1988). Auch ein molekularbiologischer Ansatz zur Phylogenie der Lepidopteren zeigt keine eindeutigen Ergebnisse bezüglich der Monophylie der Tineidae (Mutanen, et al., 2010; Regier, et al., 2013). Innerhalb der Tineiden lässt sich die Kleidermotte durch das Fehlen der Nebenpalpen und der fast fehlenden Zunge morphologisch eindeutig von der Gattung *Tinea* unterscheiden und der Gattung *Tineola* zuordnen (Herrich-Schäfer, 1853). Ein Schwestergruppenverhältnis beider Gattungen ist jedoch nicht belegt und sowohl morphologische Untersuchungen der Genitalien (Petersen, 1957) als auch die Betrachtung von Fettsäureprofilen (Cook, et al., 1997) innerhalb der Tineidae lassen vermuten, dass es sich bei der Kleidermotte um eine Spezialisierung innerhalb der *Tinea* Gattung handelt. Der Artname ***Tineola bisselliella*** geht auf die erste Beschreibung der Kleidermotte durch Hummel 1823 zurück, der ihr jedoch den wissenschaftlichen Namen *Tinea bisselliella* gab (Herrick & Griswold, 1933).

1.1.4 URSPRUNG UND VORKOMMEN VON *TINEOLA BISSELLIELLA*

Der geographische Ursprung der Kleidermotte wird in Südafrika vermutet (Meyrick, 1927), von wo aus sie durch den Handel mit verschiedensten Gütern in der Moderne verbreitet wurde. Diese Form des Eintrags gebietsfremder Arten ist mehrfach beschrieben (Buckland, 1981) und wird mit den Begriffen „Neozoen“ und „alien species“ beschrieben. Beginnend von etwa 1800 an stieg die Anzahl invasiver Taxa pro Jahr in Europa rapide an (Hulme, 2009). Die Einfachheit dieses Prozesses verdeutlicht ein Beispiel am Hamburger Hafen, das von der Entdeckung eines starken Befalls von Entenfedern aus Shanghai durch *Tinea columbariella* berichtet (Strümpel, 1968). Die Auswirkungen einer Etablierung von Neozoen sind vielseitig und können zum einen eine Möglichkeit der Untersuchung unbeabsichtigter Freilandexperimente im Hinblick der Populationsdynamik, Ökologie und Zoogeographie darstellen. Auf der anderen Seite ist jedoch das Schädspotential sowohl auf

ökonomischer Seite durch die Etablierung von Forst-, Landwirtschafts- und Vorratsschädlingen sowie auf gesundheitlicher Seite durch die Verbreitung von Krankheitserregern nicht zu unterschätzen (Geitner, et al., 2002).

1.1.4.1 *TINEOLA BISSELLIELLA*, EIN NEOZOON MIT GROßEM SCHADPOTENTIAL

Tineola bisselliella wurde in Europa ausführlich erstmals Mitte des 19. Jahrhunderts erwähnt (Zeller, 1852) und zählt auch heute noch zu den weltweit bedeutsamsten Materialschädlingen. Zahlreiche Befallsbeschreibungen in Lagern und Museen sowie speziell im Dämmmaterial von Häusern oder der Polsterung von Möbeln spiegeln die Bedeutsamkeit dieses Schädlings in der Zerstörung von wirtschaftlichen und kulturellen Gütern wieder (Back, 1931; Key & Common, 1959; Laibach, 1970; Querner, 2014). Mögliche natürliche Habitate der Kleidermotte könnten Vogelneester, Nester von Hymenopteren, Erdnester von Säugetieren, Taubenschläge, Hühnerställe oder Gewölle von Eulen und Raubvögeln sein und damit den typischen natürlichen Habitaten der keratinophagen Tineidae entsprechen (Petersen, 1969). Beschreibungen des Vorkommens der Kleidermotte in natürlichen Habitaten gehen jedoch nur auf wenige Funde in Vogelnestern zurück, die eher als eine Ausnahme als die Regel zu betrachten sind (Plarre & Krüger-Carstensen, 2011). Auch wenn Insekten allgemein regelmäßig in Vogelnestern zu finden sind, so sind unter den Tineidae vor allem *Tinea trinotella*, *Tinea pellionella* und *Niditinea fuscipunctella* typische Vertreter der Nidikolen (Löw, 1861; Kemper, 1935; Tryjanowski, et al., 2001).



Abb. 1-2: Befallsspuren von *Tineola bisselliella* an einer Wollmütze (obere Bilder) und einem Lederschuh samt Einlegesohle aus Lammfell (untere Bilder). (Fotos: Bianca Herrmann)

1.2 VORRATS- UND MATERIALSCHUTZ

Der Vorrats- und Materialschutz sorgt sich sowohl um die Prävention als auch die Bekämpfung von Vorrats- und Materialschädlingen. Das Integrated Pest Management (IPM) ist vor allem im Zusammenhang der Entwicklung von nicht invasiven Methoden zur Schädlingskontrolle bei Früchten und Getreidesamen entstanden. Das Ziel ist dabei, den Befall ohne den systematischen Einsatz von Pestiziden zu verhindern oder das Befallsrisiko zumindest zu minimieren. Während früher Schädlinge in Museen, historischen Häusern und Archiven mit toxischen Chemikalien, wie DDT, Arsen und Quecksilber-Chloriden bekämpft wurden, wird nun auch im Museumsschutz das IPM angewandt (Pinniger, 2011). Es umfasst verschiedene Strategien zur Prävention, Identifikation, Bewertung und Lösung von Befall sowie eine regelmäßige Anpassung der jeweiligen Strategien an die aktuelle Befallssituation (Pinniger & Winsor, 2004). Das Monitoring, eine regelmäßige Kontrolle auf Befall, stellt die Basis der Detektion und Lokalisation eines Befalls im IPM dar. Hierzu werden Insektenfallen mit verschiedenen Köderstrategien, vor allem aber Klebefallen mit oder ohne Pheromonköder eingesetzt (Cox, et al., 1996; Xavier-Rowe & Pinniger, 2001; Querner, 2013). Zur Bekämpfung kommen zunächst einmal verschiedene physikalische Behandlungen in Frage, die jedoch in Abhängigkeit des befallenen Objektes sorgfältig ausgewählt werden müssen. Viele Schädlinge, und so auch die Kleidermotte, sind sehr niedrigen Temperaturen gegenüber empfindlich und sterben je nach Lebensstadium bei einer genügend langen Exposition ab (Brokerhof, et al., 1993; Bergh, et al., 2006). Eine weitere Maßnahme stellt die Anoxia-Behandlung dar, bei der unter Verwendung von Nitrogen, Argon oder Radikalfängern des Sauerstoffs eine sauerstoffarme Atmosphäre erzeugt wird (Gunn, et al., 2007; Querner, 2015). Eine biologische Bekämpfungsmaßnahme von verschiedenen Vertretern der Lepidoptera und Coleoptera stellen parasitoid Hymenopteren dar, die in mehreren aufeinander folgenden Behandlungen am Befallsort entlassen werden und je nach Art das Ei- oder Larvenstadium der Schädlinge befallen (Schöller & Prozell, 2011; Querner & Biebl, 2011). Ein typischer, das larvale Stadium von *T. bisselliella* befallende Parasitoid ist *Apanteles carpatus* (Hymenoptera) (Plarre, et al., 1999).

1.3 DAS ARTKONZEPT

Die Systematik dient der Identifikation und Klassifikation von Individuen und erforscht den Ursprung und die Natur ihrer Einheiten. Sie besteht somit zum Teil aus einer analytischen Phase, der Identifizierung von Gruppen in einer unendlichen und verworrenen Diversität von Individuen und der Darstellung von Gemeinsamkeiten und Unterschieden zwischen ihnen mit dem Ziel der akkuraten Beschreibung einer Spezies. Zum anderen muss eine synthetische Phase folgen, in der die Spezies systematisch geordnet, höhere Kategorien gebildet und somit eine Klassifikation konstruiert wird. Carl von Linné erarbeitete eine klare Terminologie, die die systematische Klassifizierung in Form von Hierarchien widerspiegelt. Die Spezies stellte er an die Basis der Systematik, obwohl auch er schon intraspezifische Variabilität erkannte. Um ein Individuum klar identifizieren und ihm einen Platz im System geben zu können, werden Anhaltspunkte benötigt, die seinen taxonomischen Charakter beschreiben. Zu Beginn der Taxonomie war es vor allem der morphologische Charakter, der zur

Beschreibung einer Spezies herangezogen wurde, er war praktikabel leicht nachvollziehbar und selbst an einem toten Organismus gut erhalten. In der modernen Taxonomie werden zunehmend neben der Morphologie weitere physiologische und ökologische Charaktere, wie ökologische Anforderungen, Paarungsverhalten, saisonale Abundanz und vertikale Verbreitung, genutzt, um die beobachtete Variation besser abbilden zu können. Darüber hinaus gibt es noch den genetischen Charakter, der mit zunehmender Sequenzierleistung immer mehr an Bedeutung gewonnen hat (Mayr, 1942).

Grundlegend lassen sich fünf Artkonzepte differenzieren, die entweder einen ökologischen, evolutionsbiologischen oder genetischen Ansatz verfolgen. Nach dem biologischen Artkonzept, gehören alle Individuen, die sich untereinander fortpflanzen können und wiederum fortpflanzungsfähige Nachkommen zeugen, zu einer Art, der so genannten Biospezies. Sie grenzen sich reproduktiv von den anderen Arten ab. Die Chronospezies hingegen besagt, dass eine Art mit der Aufspaltung einer anderen Art, eines Vorfahrens, beginnt und mit der eigenen Aufspaltung oder Auslöschung wieder endet. Dieses Konzept betrachtet den zeitlichen Aspekt einer Art und spiegelt eine natürliche Dynamik wider. Die Morphospezies umfasst alle Individuen, die in ihren wesentlichen Merkmalen untereinander und mit ihren Nachkommen übereinstimmen. Sie besitzt eine hohe Spezifität. Betrachtet man die ökologischen Merkmale von Individuen, so fasst man diejenigen zu einer Ökospezies zusammen, die eine ökologische Nische realisieren. Es stellt ein eher komplexes Konzept dar, dass sich mit den Wechselwirkungen der Individuen mit ihrer abiotischen und biotischen Umwelt befasst. Die Bildung einer Genospezies basiert auf den Gemeinsamkeiten auf genomischer Ebene. Die erste Definition zur Genospezies fasste fälschlicherweise alle genetisch identischen Individuen zusammen. Heute basiert das Konzept der Genospezies jedoch auf der Bildung von Ähnlichkeitsmatrizen und genetischen Distanzen.

Jedes Artkonzept hat seine Stärken und seine Schwächen, so dass eine biologische Art am besten über mehrere Eigenschaften charakterisiert wird, die sowohl morphologische als auch ökologische, historische und genetische Merkmale berücksichtigen. Eine Art ist schließlich eine im Kontext der Umwelt stehende Einheit, die ebenfalls wie die Umwelt selbst kein starres Gebilde repräsentieren kann.

1.3.1 GENETIK UND SPEZIATION

Die Speziation, Artbildung, stellt einen kontinuierlichen Prozess dar. Ausgehend von einer uniformen Spezies kann sowohl innerhalb der Zeit als auch innerhalb des Raums eine Variation entstehen. Ernst Mayr differenzierte die allopatrische Speziation von der sympatrischen, wobei die erste den vorherrschenden Artbildungsmodus darstellt und auf eine geographische Separation einer Teilpopulation zurückzuführen ist. Die Entstehung der isolierten Teilpopulation kann auch am Rande des Verbreitungsgebiets der Ursprungspopulation liegen, was eine peripatrische Artbildung charakterisiert. Entscheidend ist die Herausbildung von Isolationsmechanismen, die einen Genaustausch beider Populationen verhindern. Bilden sich diese Isolationsmechanismen innerhalb einer Population, ohne vorangehende geographische Separation, so spricht man von der sympatrischen Artbildung. Eine Evolution innerhalb der Spezies wird auch als Mikroevolution

bezeichnet und stellt die Grundlage der heutigen Populationsforschung dar. Populationen weisen eine mehr oder weniger erhebliche Variation der Merkmale ihrer Individuen auf, derer sich die Genetik auf der Basis von Sequenzanalysen zur Beschreibung von Sub- und Metapopulationen bedient. Die Metapopulation ist ein von Richard Levins geprägter Term, der die Population einer Population verkörpert (Hanski & Gilpin, 1991) und einen Verbund lokaler Populationen repräsentiert, die durch gelegentliche Migration miteinander verbunden sind. Bei hoher Migrationsfrequenz der einzelnen lokalen Populationen verschwimmen ihre Grenzen zueinander, Reproduktions- und Genflussbarrieren sind aufgehoben und der Begriff der Metapopulation wird hinfällig. Entgegengesetzt ist eine lokale Population als geschlossen zu betrachten, sofern ihre Anzahl an Individuen lediglich durch die Geburten- und Sterberate bestimmt wird und eine Migration nahezu ausgeschlossen ist (Hanski, 1994). Diese geschlossenen, im Grunde isolierten Populationen zeigen einen Trend in Richtung genetischer Homogenität, bzw. einer reduzierten Variabilität (Mayr, 1942). Der Genfluss erfolgt nur noch innerhalb dieser lokalen Population und ist gegenüber anderen Populationen isoliert.

1.3.2 METHODEN DER DNA-TAXONOMIE

Die DNA (Desoxyribonukleinsäure)-Taxonomie ist ein 2002 von Diethard Tautz und Kollegen vorgestelltes Konzept, indem die DNA der Organismen als ein neues Gerüst der Taxonomie zur Beschreibung und Identifizierung der Spezies dient (Tautz, et al., 2002). Die Vorgehensweise ist dabei genau beschrieben und umfasst die Gewebeentnahme, DNA-Extraktion, Amplifikation eines oder mehrerer Genorte mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Sequenzierung, Verfügbarmachung der Sequenz und Speicherung der DNA-Probe als ein Standard für zukünftige Analysen (Tautz, et al., 2003). Die DNA, genauer gesagt die erhaltene Sequenz, wird auf diese Weise zum Identifikationsmerkmal, einem molekularen Marker, und kann für phylogenetische Betrachtungen herangezogen werden. Die digitale Verfügbarkeit dieser Information ermöglicht eine weltweite Kommunikation und somit einen einfachen Austausch innerhalb der Forschung. Die DNA allein ist dabei zur Charakterisierung einer Spezies nicht ausreichend, kann aber einen entscheidenden Beitrag zur Stammesgeschichte des Lebens leisten. Molekulare Marker lassen sich in drei grundlegende Klassen unterteilen; die DNA Sequenzpolymorphismen, DNA Repeat-Variationen und Protein-Variationen (Allozyme) (Schlötterer, 2004).

DNA-Sequenzpolymorphismen können über eine Reihe verschiedener Methoden untersucht werden. Ihnen allen gemein ist, dass sie auf der Nukleotidvariation der DNA beruhen, die durch Basensubstitutionen, Deletionen und Insertionen entstehen können. Zum einen kann dies über einen direkten Vergleich von DNA-Sequenzabschnitten, dem so genannten Alignment erfolgen. Hier wird jeder einzelne Unterschied detektiert und die genetische Distanz der Sequenzen bestimmt. Zum anderen kann über verschiedene DNA-Fingerprints eine Schätzung der Variation erfolgen, bei der ein Teil der Gesamtinformation zwar verloren geht, die entsprechenden Methoden jedoch meist günstiger und/oder schneller sind. Bei der Analyse von z. B. RFLPs (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus) vergleicht man die DNA-Banden-Muster, die aufgrund des Verdauens mit meist einer Kombination aus verschiedenen Restriktionsenzymen entstanden sind. Hier erfolgt die Annäherung an

die genetische Distanz zunächst über eine Ähnlichkeitsmatrix der elektrophoretisch aufgetrennten DNA-Fragmente. Eine weitere Möglichkeit stellt die RAPD-PCR (random amplified polymorphic DNA) dar, die mithilfe zufällig erzeugter Primer mit einer Länge von 8-10 bp eine unterschiedliche Anzahl an verschieden großen DNA-Fragmenten erzeugt. Eine spezielle Art der RAPD-PCR stellt die bei Bakterien weit verbreitete rep-PCR dar, wobei rep für repetitiv steht. Die im bakteriellen Genom gefundenen repetitiven Elemente REP (Repetitive Extragenic Palindromic) (Gilson, et al., 1984), ERIC (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) (Hulton, et al., 1991) und BOX (Martin, et al., 1992) dienen dabei als Primerbindungsstellen (Versalovic, et al., 1991; Versalovic, et al., 1994).

Unter DNA-Repeat-Variationen versteht man die Variation in der Anzahl der Wiederholungen kurzer DNA-Abschnitte innerhalb eines Gens. Diese Anzahl an Wiederholungen kann von Individuum zu Individuum stark variieren, da sie eine hohe Mutationsrate besitzen (Myers, 2007).

Allozyme steht für ‚allelic variants of enzymes‘, Protein-Varianten eines Enzyms, die in einer nativen Gelelektrophorese nach Größe und Ladung aufgetrennt werden. Differenzen in Größe und Lage kommen dabei durch Aminosäuresubstitutionen zustande. Dieser eher frühe molekulare Marker ist jedoch aufgrund seines eher geringen Informationsgehalts für Identifikations- und Assoziationsstudien eher ungeeignet (Beebee & Rowe, 2004).

Die Wahl eines geeigneten Markers stellt einen entscheidenden Schritt einer molekularen, phylogenetischen Studie dar, da differenzierte Genabschnitte unterschiedlich schnell evolvieren. Je nach phylogenetischem Niveau, auf dem eine Analyse erfolgen soll, muss ein entsprechend variierender Marker gefunden werden.

1.3.2.1 DNA-MARKER-SYSTEME FÜR INSEKTEN

Zur Konstruktion von Stammbäumen, die auf molekularen Markern basieren, werden in der Regel Sequenzdaten kurzer standardisierter DNA-Abschnitte verwendet. Neben proteincodierenden Regionen kommen auch die Sequenzabschnitte der rRNA (ribosomale Ribonukleinsäure), tRNA (transfer Ribonukleinsäure), sowie intergenetische Abschnitte in Frage. Sie werden unter dem Begriff Barcode zusammengefasst (Savolainen, et al., 2005). Die benötigte Länge eines universellen Barcodes lässt sich nicht bestimmen, da die molekulare Evolutionsrate sowohl zwischen verschiedenen Abschnitten des Genoms als auch zwischen den einzelnen Taxa variiert (Hebert, et al., 2003). Somit ist die Wahl des Barcodes und seiner Länge nicht nur vom phylogenetischen Niveau sondern auch von den zu betrachtenden Taxa abhängig. Allgemein lässt sich sagen, dass für die Analyse nah verwandter Spezies schnell evolvierende Regionen genutzt werden sollten, während in den höheren taxonomischen Bereichen weniger variable Sequenzabschnitte der proteincodierenden Regionen die besten Aussagen liefern können. Insgesamt hat sich gezeigt, dass die mitochondriale DNA (mtDNA) ein besseres Ziel in der molekularen Phylogenie ist als die nukleäre DNA (Hebert, et al., 2003).

Das mitochondriale Genom hat nicht nur den Vorteil der geringeren Größe, es besitzt auch keine Introns, wird haploid vererbt und liegt in vielen Kopien pro Zelle vor. Darüber hinaus können bei Insekten viele Bereiche der mtDNA mit universellen Primern aus hoch konservierten Genabschnitten

amplifiziert werden (Behura, 2006). Besonders populär ist das Gen der Cytochromoxidase I (COI) auf dem mtGenom, es wird in zahlreichen Studien sowohl zur Charakterisierung nah verwandter Spezies als auch zur Differenzierung von phylogenetischen Gruppen innerhalb einer Spezies angewandt (Lunt, et al., 1996; Hebert, et al., 2003; Silva-Brandao, et al., 2009; Hebert, et al., 2009). Dennoch gibt es eine Reihe von Gegenstimmen, die den Einsatz von mtDNA zu phylogenetischen Studien aufgrund der maternalen Vererbung, dem Vorkommen von nukleären Kopien mitochondrialer Gene (Numpts) und der möglichen Infektion durch Endosymbionten kritisch gegenüber stehen (Behura, 2006; Dasmahapatra & Mellet, 2006; Wolff, et al., 2012).

In der Populationsgenetik sind Bereiche mit hoher molekularer Variabilität und somit häufige Mutationen innerhalb einer Art von Interesse. Diese lassen sich eher in nicht codierenden Bereichen des Genoms finden. Gerade hier zeichnet sich der schnell evolvierende Charakter des mtGenoms aufgrund von fehlenden Reparaturmechanismen besonders aus (Wilson, et al., 1985). Vor allem eignet sich die Kontrollregion für eine populationsgenetische Betrachtung (Vila & Björklund, 2004). In Insekten wird sie als die AT-reiche Region bezeichnet. Diese Region umfasst den Replikationsursprung und zeigt ähnlich wie die nicht codierenden Bereiche des nukleären Genoms eine Hypervariabilität (Simon, et al., 1994). Strukturelle Untersuchungen der Kontrollregion innerhalb der Lepidoptera offenbarten kurze Abschnitte aus Thymin-Adenin-Wiederholungen ((TA)_n), Poly-Thymin-(poly(T))-Sequenzen und G(A)₂₋₅T-Motive (Guanin-Adenin-Thymin-Motive) (Taylor, et al., 1993; Snäll, et al., 2002; Wan, et al., 2013).

1.3.2.2 DNA-MARKER IN DER ÖKOLOGIE UND IM MATERIALSCHUTZ

Die Molekulare Ökologie verbindet die Aspekte verschiedener biologischer Disziplinen miteinander. Sie schafft eine Verknüpfung zwischen der Genetik, Verhaltensbiologie, Evolution, Molekularbiologie und der Ökologie selbst. Molekulare Marker bieten der Ökologie nicht nur Unterstützung in der Identifizierung einzelner Spezies sondern auch in der Bestimmung der Arten einer Umweltprobe und damit in der Beschreibung der Biodiversität (Valentini, et al., 2008; Janzen, et al., 2009). Darüber hinaus können sie helfen, interspezifische Interaktionen aufzudecken, wie zum Beispiel Nahrungsbeziehungen (Joo & Park, 2012). Hinterlassene Tierproben (Haare, Urin, Kot) oder nur teilweise erhaltene Organismen können trotz fehlender morphologischer Daten noch analysiert und zugeordnet werden. Die geographische Struktur einer Population stellt einen wichtigen Faktor in der Ökologie und Evolution dar. Sie beschreibt die Verbreitung und Abundanz von Genotypen zwischen und innerhalb von Populationen (Roderick, 1996). Die sich daraus ableitende Phylogeographie betrachtet die räumliche Verteilung genetischer Linien und stellt einen Bezug zur Populationsdemographie und Populationsgeschichte her. Die Analyse von molekularen Markern in Form von mitochondrialen DNA Variationen in der Kontrollregion sowie Allozymmustern deckte so am Beispiel des Australischen Riesenseebarsches (*Lates calcarifer*) eine Unterbrechung des Genflusses zwischen zwei geographisch getrennten Populationen auf (Chenoweth, et al., 1998).

In der Schädlingsbekämpfung ist der erste und wichtigste Schritt die Identifikation der Art. Schädlinge, die in ihren frühen Stadien nur schwer zu unterscheiden sind, sind durch den Einsatz von molekularen

Markern schnell und einfach zu identifizieren. Der Rote Baumwollkapselwurm und die Amerikanische Tabakeule zeigen sowohl im Ei- als auch frühem Larvalstadium keinerlei morphologische Unterschiede. Eine frühe Identifizierung über RFLP-Muster kann hier ein rechtzeitig angepasstes Kontroll- und Bekämpfungsszenario ermöglichen (Roehrdanz, 1997). Auch bei Termiten kann die Bestimmung der Art unter Umständen recht schwierig sein und ihr Ursprung nicht geklärt. Doch gerade die Erkennung einer eingeschleppten Art und die Bestimmung ihres geographischen Ursprungs sind entscheidende Hinweise für den Materialschutz (Vargo, 2011). So wurde zum Beispiel eine in Frankreich, Hamburg und Chile vorkommende Termitenart fälschlicher Weise als *Reticulitermes santonensis* bestimmt und für ursprünglich aus Frankreich stammen gehalten, bis sich anhand von mtDNA Sequenzvergleichen herausstellte, dass es sich um *Reticulitermes flavipes* aus den Vereinigte Staaten handelt (Clément, et al., 2001).

Die Beobachtung und Untersuchung der Verbreitung und Migration von Insekten gibt uns Aufschluss über die Dynamik der Population und ermöglicht im Bereich der Schädlingsbekämpfung und Prävention, Befallsszenarien aufzudecken (Rees, 2003). Jedoch ist die Ausbreitung von Insekten aufgrund ihrer oft großen Anzahl sowie der Fähigkeit zum Flug und damit der Möglichkeit größere Distanzen in kurzer Zeit zu überwinden, nicht einfach zu verfolgen oder nachzuvollziehen. Grundsätzlich lassen sich Ereignisse der Migration von Ereignissen der Verbreitung unterscheiden. Unter Migration versteht man die Fortbewegung des Individuums unter Ausnutzung der eigenen motorischen Fähigkeiten oder der Nutzung eines Transportmittels, wie zum Beispiel den Wind oder das Wasser. In jedem Fall wird Migration aktiv vom Individuum eingeleitet (Kennedy, 1985). Die Funktion der Fortbewegung kann dabei lokal begrenzt sein, der täglich üblichen Fortbewegung des Individuums entsprechen und dem Fortbestand der Population vor Ort dienen. Dieses Verhalten wird auch als „station keeping“ bezeichnet und umfasst unter anderem die Futter- und Partnersucher. Migration kann aber auch zur Verbreitung beitragen, indem es zum Beispiel unter ungünstigen Nahrungsbedingungen zum Aufbruch einer ganzen Population kommt. Diese stellt eine Adaptation an die sich verändernde Umwelt dar und wird als „ranging“ bezeichnet (Dingle, 1996). Verbreitung bedeutet für den jeweiligen Organismus ein Test seiner ökologischen Potenz und stellt ihn vor die Herausforderung, sich in einem fremden Gebiet zu etablieren. Während die Verbreitung aufgrund von Migration eine aktive Handlung des Individuums darstellt, trägt es zur passiven Verbreitung nicht bei. Vor allem kleinere Insekten, zu denen auch die Kleidermotte zählt, können leicht passiv verbreitet werden. Die Kombination aus aktiver und passiver Verbreitung ermöglicht es Insekten wie *T. bisselliella* sehr große Distanzen im Vergleich zu ihrer Körpergröße zu überwinden und viele Habitate zu besiedeln, die ihren Anforderungen genügen (Bullock, et al., 2001). Der Vergleich der intraspezifischen genetischen Variabilität verschiedener Befallspopulationen kann, wie beim Kundekäfer *Callosobruchus chinensis* einer japanischen Studie, Aufschluss über den Ursprung des Befalls sowie den Prozess der Entstehung geben (Tuda, et al., 2004). Am Beispiel des Gras fressenden Käfers *Listronotus bonariensis*, einem bedeutenden Schadorganismus in Neuseeland, wurde mithilfe der RAPD-PCR der geographische Ursprung der neuseeländischen Populationen in Südamerika ermittelt (Williams, et al., 1994).

Die Voraussetzung für einen wirksamen Schutz vor und eine effiziente Bekämpfung der Kleidermotte *Tineola bisselliella* bildet eine gründliche Kenntnis ihrer selbst. Die Charakterisierung von *T. bisselliella* als Modellorganismus und damit als Referenzorganismus für die Wirksamkeitsprüfung und die Entwicklung geeigneter Schutz- und Bekämpfungsmaßnahmen, ist für die Zulassung von Bioziden im gesetzesnahen Umfeld von großer Bedeutung. Bei den Prüfmethode handelt es sich um biologische Versuche, die nur dann als geeignet betrachtet werden können, wenn sowohl innerhalb eines Labors als auch zwischen verschiedenen Laboren reproduzierbare Ergebnisse geliefert werden (Wälchli, 1976). Neben standardisierten Arbeitsvorgängen ist somit auch eine umfassende Kenntnis der Ökologie, Physiologie, Genetik und des Verhaltens der Kleidermotte eine Voraussetzung für die Vergleichbarkeit dieser Prüfungen und Maßnahmen. Die Festlegung von adäquaten Methoden zur Prävention im IPM ist entscheidend mit der Kenntnis des Ursprungs eines Befalls verbunden. Informationen über wahrscheinliche Befallsszenarien und Optionen der Verbreitung von *T. bisselliella* ermöglichen die Gefahr eines Neubefalls sowie die Ausdehnung eines bestehenden Befalls zu minimieren oder gar zu verhindern.

Zusammenfassend lassen sich für die eindeutige Charakterisierung von *Tineola bisselliella* und die Klärung ihrer Verbreitung sowie möglicher Befallsszenarien folgende Ziele für diese Arbeit bilden:

1. Beschreibung der ökologischen Potenz und Konkurrenzfähigkeit der Kleidermotte *Tineola bisselliella* sowie ihr damit einhergehendes Potential, sich als gebietsfremde Art erfolgreich als Materialschädling zu etablieren.
2. Erfassung des Vorkommens von *Tineola bisselliella* in natürlichen Habitaten in Berlin und Brandenburg und Klärung ihres Status als synanthrope Art.
3. Überprüfung der systematischen Integration von *Tineola bisselliella* in die Gattung *Tinea* anhand von Sequenzvergleichen der mitochondrialen Cytochromoxidase I (COI) und der Kontrollregion (CR).
4. Betrachtung des Genflusses zwischen verschiedenen Kleidermottenpopulationen zur Erkennung möglicher Verbreitungsformen unter Verwendung von drei verschiedenen molekularen Markern.
5. Folgerung wahrscheinlicher Befallsszenarien in Museen, Lagern und Haushalten und verfassen entsprechender Maßnahmen zur Prävention.
6. Bewertung der BOX-PCR als ein mögliches Fingerprintsystem für Insekten.

2.1 DIE ÖKOLOGISCHEN POTENZ UND KONKURRENZFÄHIGKEIT DER KLEIDERMOTTE *TINEOLA BISSELLIELLA*

Zahlreiche Arbeiten auf den Gebieten der Morphologie, Ökologie und Physiologie von Titschack (1925, 1926), Griswold (1931, 1936, 1944), Kemper (1935), Day (1951a, 1951b) und Brokerhof (1992, 1993) haben sich mit der Charakterisierung der Kleidermotte *Tineola bisselliella* auseinandergesetzt. Sie beschreiben eine breite Toleranz gegenüber physikalischen Faktoren der Umwelt wie der

Temperatur und der Luftfeuchtigkeit und erfassen eine hohe reproduktive Rate bei optimalen Umweltbedingungen wie ausreichender Nahrungszufuhr, einer Temperatur um die 25° bis 27° C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von etwa 65 bis 70 %. Dennoch existieren keine quantitativen Daten über den Falterschlupf von *T. bisselliella*. Eine Aussage über den quantitativen Schlupf aus einer bestimmten Anzahl an Eiern ist für die Entstehung eines Befalls und die erfolgreiche Etablierung einer Population jedoch entscheidend. Die quantitative Analyse der Entwicklung von *T. bisselliella* unter verschiedenen Temperatur- und Luftfeuchtigkeitsbedingungen soll in dieser Arbeit erfolgen. Darüber hinaus wird unter den gleichen Bedingungen die Konkurrenzfähigkeit von *T. bisselliella* gegenüber dem Nahrungskonkurrenten *Anthrenus flavipes* untersucht.

2.2 DAS VORKOMMEN DER KLEIDERMOTTE *TINEOLA BISSELLIELLA* IN NATÜRLICHEN HABITATEN

Untersuchungen durch Freilandfänge von *T. bisselliella* im Raum von Berlin und Umgebung sollen das Vorkommen der Kleidermotte in natürlichen Habitaten genauer betrachten. Die hierbei im Freiland einzusetzenden Köderstrategien sind für das Monitoring von Insekten typische Verfahren und dienen dem Nachweis und der Beurteilung der Stärke eines Befalls. Darüber hinaus werden sie im Zusammenhang mit der Verwirrtechnik und dem Massenfang zur Reduktion eines Befalls eingesetzt (Trematerra, 1997; Wilson, 1940). Der Nutzen von Pheromonfallen im Freiland wurde bereits 1987 bei den Untersuchungen zum Vorkommen der Gattungen *Ephestia* und *Plodia* außerhalb von Lägern und Betrieben beispielhaft gezeigt (Wohlgemuth, et al., 1987). Diese Freilandhebungen zum Vorkommen von vorratsschädlichen Insekten gab den Anstoß zur Entwicklung eines Modells für die Betrachtung des Vorkommens der Kleidermotte *T. bisselliella* im Freiland. Neben einer Pheromonfalle, die lediglich die Männchen der Kleidermotte anzulocken vermag, kamen zwei weitere Fallentypen (Becher- und Nesterfalle) zur Berücksichtigung des Vorkommens der Weibchen von *T. bisselliella* zum Einsatz.

2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE UNTERSUCHUNG AUF DER EBENE DER SPEZIES UND SUBSPEZIES

Die molekularbiologischen Untersuchungen sollen sowohl auf der Ebene der Spezies als auch Subspezies mithilfe von drei verschiedenen DNA-Markern erfolgen. Aufgrund der phylogenetisch niedrigen Ebene wird die schneller evolvierende mitochondriale DNA (mtDNA) der nukleären DNA gegenüber zur Auswahl geeigneter Marker vorgezogen. Den bereits in der Einleitung angesprochenen Problematiken in Form von Numts und bakteriellen Endosymbionten wird durch die Ausarbeitung eines geeigneten Extraktionsprotokolls und ein Test auf bakterielle Kontamination der mtDNA-Proben entgegnet. Für diesen Test auf bakterielle DNA in den mtDNA-Isolaten eignet sich die 16S rRNA-PCR. Sie zählt zu den gängigen Methoden für den Nachweis und die Detektion von Symbionten bei Insekten (O'Neill, et al., 1992; Espino, et al., 2009; Jones, et al., 2013) und wird zur Bestimmung der Diversität von Darmbakterien zum Beispiel bei Termiten eingesetzt (Ohkuma & Kudo, 1996; Hongoh, et al., 2003).

Für die phylogenetische Betrachtung der Spezies wird der mitochondriale Sequenzabschnitt der Cytochromoxidase I (COI) von vier verschiedenen Arten, darunter drei Vertreter der Tineidae (*Tineola bisselliella*, *Tinea pellionella* und *Niditinea fuscipunctella*) und ein Vertreter der Pyralidae (*Ephestia kuehniella*) amplifiziert und ein phylogenetischer Baum errechnet. Vergleichend hierzu wird auf die gleiche Weise mit der Kontrollregion (CR) verfahren. Sollte der Bereich der COI nicht genügend genetische Differenzierungsmerkmale für eine Abgrenzung der Arten untereinander bieten, so müsste die Kontrollregion aufgrund ihrer Hypervariabilität ausreichend Unterscheidungsmerkmale liefern. Die zur Amplifikation einzusetzende Polymerase sollte über eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, das so genannte Proofreading, verfügen. Dieser Mechanismus zum Erhalt der genetischen Information stellt einen Kontrollschritt innerhalb der DNA-Strangsynthese dar, indem zufällig falsch eingesetzte Nukleotide erkannt, entfernt und korrigiert werden (Brutlag & Kornberg, 1972; Kunkel, 1988). Auf diese Weise wird die möglichst akkurate Wiedergabe der Sequenzabschnitte in den einzelnen Amplifikaten abgesichert.

Ein optimales Markersystem für die Analyse auf der Ebene der Subspezies sollte möglichst schnell und einfach durchzuführen sein. Bedenkt man die Einsatzmöglichkeiten in der Diversitätsforschung und vor allem dem Materialschutz, so muss das System möglichst ohne die Kenntnis der molekularen Strukturen des Organismus auskommen. In diesem Fall eignen sich die bereits erwähnten RAPD-PCRs. Ausgehend von der Grundlage der mtDNA kann jedoch auf die meist lange Suche und die zahlreichen Tests möglicher Primerkombinationen verzichtet werden, indem man sich der bei Bakterien weit verbreiteten BOX-PCR bedient. Der Endosymbiontentheorie entsprechend ist das mitochondriale Genom prokaryotischen Ursprungs (Gray, 1989; Gray, et al., 1999; Gray, 2012), so dass Methoden zur Differenzierung von Prokaryoten auch zur Unterscheidung von mitochondrialen Genomen genutzt werden könnten. Bereits erfolgreiche Ergebnisse erzielten die Wissenschaftler bei mitochondrialen Genomen aus Pflanzen, wie dem Braunen Senf (Ashutosh, et al., 2005) und der Färberdistel (Dinesh Kumar & Narasimha, 2013). Da dieses Verfahren zuvor noch nicht bei Insekten angewandt wurde, sollte in dieser Arbeit eine Vielzahl an möglichen Einflussfaktoren untersucht werden. Neben der Betrachtung der Messunsicherheit bei der Bestimmung von Fragmentgröße und Konzentration mittels dem Agilent Bioanalyzer sollte auch die Validität der BOX-PCR beurteilt werden.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 ZUCHT- UND FREILANDORGANISMEN

Neben dem eigentlichen Untersuchungsobjekt, der Kleidermotte *Tineola bisselliella*, kamen weitere Lepidopteren und ein Vertreter der Ordnung Coleoptera zum Einsatz (Tab. 3-1). Einige Arten werden als Zuchten in dem Fachbereich 4.1 der Bundesanstalt für Materialforschung und –prüfung (BAM) geführt, andere konnten über Freilandfangversuche gesammelt werden und eine Art (*Ephestia kuehniella*) wurde vom Julius-Kühn-Institut (JKI) zur Verfügung gestellt.

Tab. 3-1: Organismengruppen und ihre Herkunft

Art	Familie	Ordnung	Herkunft
<i>Tineola bisselliella</i>	Tineidae	Lepidoptera	BAM-Zucht und Freilandfallen
<i>Tinea pellionella</i>	Tineidae	Lepidoptera	BAM-Zucht
<i>Niditinea fuscipunctella</i>	Tineidae	Lepidoptera	Freilandfallen
<i>Ephestia kuehniella</i>	Pyralidae	Lepidoptera	JKI Berlin
<i>Anthrenus flavipes</i>	Dermestidae	Coleoptera	BAM-Zucht

3.1.1 BAM-ZUCHTEN

Die Zuchten von *T. bisselliella*, *Tinea pellionella* und *Anthrenus flavipes* werden in Anlehnung an die Standardarbeitsanweisung StAA-QMH-4.1-1-116 geführt (Herrmann, 2015). Sowohl die Anzucht der Falter (*T. bisselliella* und *T. pellionella*) als auch die der Käfer (*A. flavipes*) erfolgt in der Regel auf mit Hefe getränkten Gänsefedern in klimatisierten Räumen mit einer Temperatur von 27° C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 70 %. Jede Anzuchtpopulation wird in Zuchtgefäßen, Weithalsflaschen aus durchsichtigem Polypropylen gehalten. Diese sind mit einem Schraubdeckel, der eine mit Gaze versehene Ausstanzung (Ø = 60 mm) besitzt, verschlossen.

3.1.1.1 DIE ZUCHT VON *TINEOLA BISSELLIELLA* UND *TINEA PELLIONELLA* IN DER BAM

Die Zucht von *T. bisselliella* startete im Juli 1998 mit Proben aus einem Befall in der Wohnung eines Mitarbeiters der BAM. Die Bestimmung der Art erfolgte durch Herrn Dr. Rüdiger Plarre (BAM, FB 4.1). Seit dieser Zeit wurden keine weiteren Tiere von außerhalb in die Zucht integriert. In der Regel besteht die Zucht aus zehn bis zwanzig Zuchtgefäßen mit je mehreren hundert Faltern. Die ersten Individuen von *T. pellionella* kamen im September 1999 an die BAM und bildeten den Start der heutigen Zucht, die stets zwischen fünf und fünfzehn Zuchtgefäßen mit je mehreren hundert Faltern umfasst. Sie stammten aus einem Befall von Dämmmaterial aus Schafswolle und wurden in ihrer Art von Herrn Erich Bettag, einem von der Deutschen Gesellschaft für allgemeine und angewandte Entomologie (DGaE) ausgewiesenen Spezialisten bestimmt.



Abb. 3-1: Zuchtansätze von *Tineola bisselliella* und *Tinea pellionella* im Zuchtraum.

Um dem Befall und der Ausbreitung von Schädlingen vorzubeugen, werden alle Zuchtgefäße auf umgedrehten Blumenuntersetzern gehalten, die in einer mit Paraffinöl gefüllten Plastikwanne oder Blumenuntersetzer stehen (Abb. 3-1). Um eine regelmäßige Durchmischung der Kleidermottenzucht zu gewährleisten, werden in etwa alle ein bis zwei Wochen 300-500 Falter aus verschiedenen Zuchtansätzen mittels Vakuumpumpe entnommen und gemeinsam in ein neues Gefäß überführt. Anstelle der mit Hefe getränkten Federn werden Filzstücke hinzugegeben. Sie haben sich als guter Eiablageplatz für die Weibchen erwiesen und ermöglichen es aufgrund der weichen Faserstruktur, die abgelegten Eier zum größten Anteil unbeschadet mithilfe eines Borstenpinsels wieder abzulösen. Nach drei bis vier Tagen werden die mit Eiern bestückten Filzreste ohne Falter entnommen. Die in eine Petrischale abgebürsteten Eier können nun auf einen Befall durch Parasiten überprüft werden. Für einen neuen Zuchtansatz werden in der Regel etwa 100 µl Eier in ein neues, mit in Hefe getränkten Federn bestücktes Zuchtgefäß überführt. Der Zeitraum für die Eiablage ist durch den einsetzenden Schlupf von Larven begrenzt, der bereits nach fünf bis sechs Tagen unter Zuchtbedingungen erwartet werden kann. Die Larven der Kleidermotte würden die Filzreste als Nahrung nutzen und vor allem bei dem Versuch, sie vom Filz zu lösen, tödlich verletzt werden. Die regelmäßige Eiablage gewährleistet zusätzlich, dass alle Entwicklungsstadien vom Ei, über die Larve, bis hin zur Motte vorhanden sind.

Die zur Eiablage entnommenen Falter werden im Anschluss durch eine Inkubation für mindestens 48 h in der Regel sogar fünf Tage bei -18° C abgetötet. Ebenso wird mit den verwendeten Filzstücken und Pinseln verfahren, um eventuell haften gebliebene Eier oder auch bereits geschlüpfte Larven

abzutöten und einen Ausbruch der Zucht zu verhindern. Die Arbeitsflächen und metallenen sowie gläsernen Arbeitsgeräte (Pinzetten und Petrischalen) werden mit 70 %igem Ethanol gereinigt.

Bei den Pelzmotten (*T. pellionella*) erfolgt ein Neuansatz durch die Überführung von etwa vierzig Faltern in ein neues Zuchtgefäß mit in Hefe getränkten und getrockneten Federn.

3.1.1.2 DIE ZUCHT VON *ANTHRENUS FLAVIPES* IN DER BAM

Die Zucht des Polsterwarenkäfers (*A. flavipes*) basiert auf einem Zuchtableger aus dem Julius Kühn Institut (ehemals BBA) in Berlin im Juli 1998. Da die Eier des Polsterwarenkäfers eine weitaus weniger robuste Außenhülle besitzen, können sie nicht so leicht von einem Stück Filz abgebürstet werden. Innerhalb des Zuchtalltags werden daher lediglich einige (etwa 2 cm³) Käfer aus möglichst zwei Zuchtgefäßen entnommen und in ein neues, ebenfalls mit in Hefe getränkten Federn gefülltes Zuchtgefäß überführt. Dort legen sie dann ihre Eier an den Federn ab, aus denen zunächst die Larven und später die Käfer schlüpfen.

3.1.1.3 VORBEREITUNG DER GÄNSEFEDERN FÜR DIE ZUCHT

Die Gänsefedern, die in der Zucht von *T. bisselliella*, *T. pellionella* und *A. flavipes* sowohl zur Fütterung als auch Eiablage zum Einsatz kommen, werden nach Erwerb zunächst in Baumwollsäcken möglichst kühl gelagert und bei Bedarf zu kleineren Gebinden in Kunststoffbeutel umgefüllt und bei einer Temperatur von -18° C eingefroren. Bevor sie für die Zuchten eingesetzt werden, sollten sie mindesten 72 h bei -18° C gelagert worden sein, um bei einem eventuellen Befall durch Schädlinge diese abzutöten. Im Anschluss werden die Federn mit einer 5 %igen Wasser-Hefesuspension getränkt. Hierzu benötigt man 3000 ml Hefelösung für etwa 800 g Federn. Nach der gründlichen und möglichst gleichmäßigen Verteilung der Hefelösung auf die Federmasse wird sie auf Blechen verteilt und im Trockenofen für 48 h bei einer Temperatur zwischen 60° C und 65° C (maximal 69° C) getrocknet. Die Aufbewahrung der getränkten und getrockneten Federn erfolgt in Kunststoffbeuteln bei -18° C.

3.1.2 *TINEOLA BISSELLIELLA* UND *NIDITINEA FUSCIPUNCTELLA* AUS DEM FREILAND

Die aus dem Freiland stammenden Falter von *T. bisselliella* wurden in den Jahren 2010 bis 2014 mithilfe drei verschiedener Fallentypen geködert. Die dabei angewandten Köderstrategien zielten auf den Fang der Kleidermotten-Männchen mithilfe von Pheromonfallen und der Weibchen unter Darbietung geeigneter Brutplätze in Form von Becher- und Nesterfallen ab. Die einzelnen Fallentypen sind in den folgenden Abschnitten detailliert beschrieben. Bei den Pheromonfallen kam es neben dem Fang von *T. bisselliella* auch zu einem regelmäßigen Fang einer weiteren Lepidopteren-Art, der Nestermotte (*N. fuscipunctella*). Dieses Phänomen des Beifangs von *N. fuscipunctella* ist bei der Anwendung von Lockstofffallen bereits bekannt und wird auf das Ethanol enthaltende Lösungsmittel im Trägermaterial (Klebstoff) zurückgeführt (Hwang, et al., 1978).

Die einzelnen Falter auf den Klebefallen aus den Jahren 2010 und 2011 wurden mit einer Pinzette vorsichtig wieder gelöst und anfänglich in Ethanol (99,8 %) konserviert. Die Proben wurden anschließend für einen Zeitraum von circa drei Jahren bei Raumtemperatur gelagert. Im Laufe der molekularbiologischen Untersuchungen stellte sich jedoch heraus, dass die in 98,8 % Ethanol aufbewahrten Falter nur eine verminderte DNA-Ausbeute aufwiesen und die Amplifikation der mitochondrialen Regionen trotz genügendem DNA-Einsatz nicht erfolgreich waren. Dies muss nicht unbedingt auf die Konservierungsart zurückzuführen sein, sondern kann auch an dem Alter der Proben gelegen haben. Zum Zeitpunkt der beginnenden mtDNA-Extraktion waren die Proben bereits mindestens drei Jahre alt. Ein Großteil der zu Beginn der Studie gefangenen Falter konnte daher nicht zum molekularbiologischen Vergleich der Fallenstandorte herangezogen werden. Die im molekularbiologischen Teil eingesetzten Falter zur mtDNA-Extraktion stammen aus dem Jahr 2014, in dem im geringeren Umfang ebenfalls Pheromon- und Nesterfallen an ausgewählten Standorten aufgestellt wurden. Eingefangene und aus den unter Zuchtbedingungen inkubierten Nesterfalleninhalten geschlüpfte Falter wurden diesmal in Schnappdeckelgläsern bis zur DNA-Extraktion bei -20° C eingefroren und gelagert.

Über den aktiven Fang von Kleidermotten hinaus wurden die Falter eines Befalls an Eulengewöllen einer Zoologischen Sammlung in Berlin in die molekularbiologischen Betrachtungen miteinbezogen. Sie sind mit der Standortkennung „FLFU“ versehen.

Die als Kleidermotten identifizierten Falter wurden exemplarisch durch Herrn Dr. Rüdiger Plarre (BAM 4.1) bestimmt. Vereinzelt Falter der Nestermotte wurden von Herrn Dr. Wolfram Mey, dem Kustos der Lepidoptera und Trichoptera Sammlung vom Naturkundemuseum Berlin, bestimmt.

3.1.3 *EPHESTIA KUEHNIELLA*

Die Arbeitsgruppe für biologische und physikalische Verfahren im Vorratsschutz am Julius-Kühn-Institut in Berlin führt zur Untersuchung und Beurteilung verschiedener Vorratsschutzverfahren Dauerzuchten vorratsschädigender Insekten und Milben. Unter anderem erfolgt eine kontrollierte Zucht der Mehlmotte (*Ephestia kuehniella*). Für die molekularbiologischen Untersuchungen stellte mir die Arbeitsgruppe einige Individuen aus ihrer *E. kuehniella* Zucht zur Verfügung. Die einige Tage alten Falter wurden in einem Glaskolben kurz nach Entnahme aus der Zucht bei -20° C abgetötet und gelagert.

3.2 VERSUCHSPANUNG

Die Anwendung biostatistischer Methoden ist bereits in der Phase der Versuchsplanung für die spätere sachgerechte Versuchsdurchführung beachtet worden. Wesentliche Punkte waren dabei die Konstanz der Faktoren gegenüber den Einfluss nehmenden Faktoren, die Stichprobengröße und die Anzahl an Wiederholungen.

3.2.1 ASPEKTE DER STICHPROBENWAHL

Die Wahl der Stichprobe stellte einen wichtigen eingehenden Faktor dar, denn nur im statistischen Sinne gebildete Stichproben erlauben einen Rückschluss auf die Gesamtpopulation. Ausgewählte Individuen müssten somit auf einer Zufallsauswahl basieren und alle die gleiche Wahrscheinlichkeit besessen haben, für den Versuch eingesetzt zu werden. Man spricht von einer einfachen Zufallsstichprobe, dem simple random sampling. Die dazu notwendige strenge Vorgehensweise war jedoch in dieser Arbeit nicht umsetzbar.

Die Studien zur Freilandpopulation basierten auf einer pragmatischen Auswahl der Fallenstandorte, dem sogenannten convenience sampling. Ein entscheidender Nachteil des convenience sampling ist die Nichtrepräsentativität der gebildeten Stichprobe und ein meist starker Bias (Hall, et al., 2013). Da jedoch das Ziel der faunistischen Untersuchungen darin lag, mögliche Teilpopulationen der Kleidermotte zu identifizieren, so lag die Gefahr einer nicht repräsentativen Stichprobe lediglich in der Unterschätzung von bestehenden Unterschieden in der Gesamtpopulation. Darüber hinaus ist die Betrachtung des Vorkommens der Kleidermotte in Berlin und Umgebung als Pilotstudie zu verstehen, um erste Basisdaten zu erheben und Trends ausfindig zu machen.

Die Untersuchungen zur ökologischen Potenz und Konkurrenzfähigkeit der Kleidermotte fanden an Zuchtorganismen statt, also einer begrenzten Population, die unter stetigen Bedingungen gehalten wird. Ihre Repräsentativität der natürlichen Kleidermotten-Population gegenüber war nicht bekannt, so dass die erzielten Ergebnisse lediglich als Indizien zu betrachten sind. Das Samplingverfahren aus der Zuchtpopulation kam der Bildung einer einfachen Zufallsstichprobe sehr nahe. Die Wahl der Zuchtgefäße erfolgte unter Berücksichtigung des Falterschlupfs, so dass zum Zeitpunkt einer jeden Wiederholung nicht alle Zuchtgefäße zur Wahl standen. Es kamen nur diejenigen Zuchtansätze in Frage, deren Eiablagedatum mindestens sechs Wochen zurücklag und ein erfolgter Falterschlupf erkennbar war. Die Abnahme der Falter fand dann stets aus mehreren, zufällig ausgewählten Zuchtgefäßen dieser Teilpopulation statt. Aufgrund der zeitlich versetzt stattfindenden Wiederholungen konnte von einer guten Repräsentativität der Zuchtpopulation ausgegangen werden. Gleiches galt für den Polsterwarenkäfer, der jedoch in insgesamt nur einer geringen Anzahl an Zuchtansätzen geführt wurde.

3.2.2 ASPEKTE DER VARIABILITÄT

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Versuchsplanung ist die Analyse der möglichen Ursachen für Variabilität. Die Fehlervarianz, die sowohl durch systematische Abweichungen als auch durch statistische Abweichungen von Messdaten entsteht, wurde mithilfe von möglichst vielen Wiederholungen und einer sorgsam, gleichbleibenden Durchführung der Versuche annähernd klein gehalten. Die Anzahl an Wiederholungen war dennoch durch Aufwand und Zeitfaktor stark begrenzt. Gerade die Versuche zur ökologischen Potenz und Konkurrenzfähigkeit nahmen jeweils einen Zeitraum von zwanzig Wochen in Anspruch.

Vergleichend zur Fehlervarianz und Sekundärvarianz, die durch die Wirkung von Störfaktoren hervorgerufen werden kann, ist die Variabilität innerhalb der betrachteten Populationen reell vorhanden und kann weder durch eine erhöhte Stichprobe noch durch eine bessere Analysetechnik reduziert werden. Die Stichprobengröße sollte jedoch an die Stärke der Variation des zu betrachtenden Merkmals angepasst werden, so dass die untersuchten Individuen die Breite der Merkmalsausprägung widerspiegeln.

3.2.3 ASPEKTE DER KONSTANZ DER FAKTOREN

Sicherlich ist es zur möglichst genauen Abbildung der Realität von Vorteil eine eher multifaktorielle Versuchsplanung zu verfolgen und die einzelnen Faktoren der Umwelt auch im Laborversuch mit einzubeziehen. Der Vorteil dieser Experimente liegt in der Untersuchung von Wechselwirkungen. Bei den Versuchen zur ökologischen Potenz und Konkurrenzfähigkeit der Kleidermotte wurde ein zweifaktorieller Versuch bevorzugt, in dem Temperatur und relative Luftfeuchtigkeit variierten, andere Faktoren bezüglich der Startbedingungen der beiden Arten *A. flavipes* und *T. bisselliella* aber konstant gehalten wurden.

Vorangehende Betrachtungen der einzelnen Stadien sowie deren Entwicklung von Kleidermotte und Polsterwarenkäfer zeigten grundlegende Unterschiede auf, die für die Bildung von Konkurrenzansätzen berücksichtigt werden mussten. Während bei *T. bisselliella* die ersten Larven bereits nach vier bis fünf Tagen schlüpfen, so dauert das Eistadium von *A. flavipes* in der Regel unter Zuchtbedingungen zwei Wochen. Startet ein Versuch zur Konkurrenzbetrachtung mit den Adulttieren, so könnten die Polsterwarenkäfer durch ihren im Vergleich zur Kleidermottenlarve verspäteten Schlupf bereits von Beginn an benachteiligt sein. Darüber hinaus ist das Geschlecht von *A. flavipes* am besten an den Puppen zu bestimmen. Im Adultstadium ist dies nur durch eine Präparation möglich, so dass ein festgelegtes Geschlechterverhältnis zum Versuchsstart nicht so leicht gesichert werden konnte. Die Anzahl abgelegter Eier durch ein Weibchen lagen bei der Kleidermotte um die 70 Eier innerhalb von 4 Tagen, bei einem Polsterwarenkäfer ließ sich aufgrund der erschwerten Geschlechtsbestimmung hierzu keine genaue Aussage treffen. Für einen Versuch zur Bestimmung der Konkurrenzstärke erwies sich das Eistadium als am besten quantifizierbar. Die Eier der Kleidermotte sind relativ robust und ein System zum Absammeln und Quantifizieren war bereits aus dem Zuchtalltag bekannt. Für *A. flavipes* gestaltete sich diese Methode jedoch als etwas schwierig. Die Eihülle ist dünn und hält einem Borstenpinsel nicht stand. Der Versuch, die auf Filz abgelegten Eier ab zu sammeln, führte zu einem hohen Verlust. Der Test verschiedener Materialien, von feinen Federn über Weizenkleie bis hin zu einem feinen Baumwollstoff, führte zur Auswahl des zuletzt genannten. Die seitlich herausstehenden feinen Baumwollfäden wurden von den Weibchen des Polsterwarenkäfers als ein geeigneter Ablageplatz für ihre Eier akzeptiert, so dass stets eine für die Versuchsansätze genügende Anzahl an Polsterwarenkäferiern mit einem feinen Pinsel vorsichtig abgesammelt und durch Auszählung quantifiziert werden konnte.

3.3 UNTERSUCHUNGEN ZUR ÖKOLOGISCHEN POTENZ UND KONKURRENZSTÄRKE VON *TINEOLA BISSELLIELLA*

3.3.1 UNTERSUCHUNGEN ZUM FALTERSCHLUPF VON *TINEOLA BISSELLIELLA* BEI EINER UNTERSCHIEDLICHEN ANZAHL EINGESETZTER EIER

Erste Beobachtungen der Entwicklung der Kleidermotte vom Ei zum Falter zeigten, dass wiederholt Larven starben. Um einen möglichst optimalen und reproduzierbaren Falterschlupf für die Untersuchungen zur ökologischen Potenz und zur Konkurrenzstärke ermitteln zu können, fanden zunächst Untersuchungen zur Entwicklung der Kleidermotte bei unterschiedlicher Eianzahl statt. Es sollte überprüft werden, ob die Anzahl und die Verteilung der Eier auf dem Nährsubstrat einen Einfluss auf die Entwicklung der Kleidermotte hat.

Hierzu wurden fünf Ausgangspopulationen gebildet, bei denen jeweils eine unterschiedliche Anzahl an Motteneiern eingesetzt wurde. Die maximal vier Tage alten Eier wurden zunächst auf einem Wollquadrat (in Hefe getränkte Merinowolle) der Größe 10 x 10 cm in einer Haushaltsbox aus Polypropylen von Fuerstgroup (192 x 192 x 55 mm) verstreut abgelegt. Eine gehäufte Ablage der Eier wurde bewusst vermieden, so dass die frisch geschlüpften Larven nicht sofort in direkter Nahrungskonkurrenz zueinander standen. Der Deckel dieser Haushaltbox war mittig ausgeschnitten, so dass eine 143 x 143 mm große Öffnung entstand, die durch eine von innen mit Heißkleber befestigte Gaze wieder ausbruchssicher verschlossen wurde. Alle Ansätze wurden im Zuchtraum der Kleidermotte unter den üblichen Zuchtbedingungen gelagert. Fünf Wochen nach Ablagebeginn der Eier starteten die Beobachtungen mit einem Abstand von zwei bis drei Tagen zueinander. Der Beobachtungszeitraum ab dem ersten Falterschlupf sollte sich mindestens über vier Wochen erstrecken, um auch die Entwicklung später geschlüpfter Larven noch verfolgen zu können. Um die Ergebnisse nicht durch Nachkommen der F₂-Generation zu verfälschen, wurden die Versuche jedoch sechs Wochen nach dem ersten Falterschlupf gestoppt. Damit ergab sich für jeden Ansatz eine Gesamtlaufzeit von zwölf Wochen. Zu jedem Beobachtungszeitpunkt fand eine Zählung und Entfernung der neu geschlüpften Falter statt. Auf diese Weise wurde zum einen eine weitere Vermehrung minimiert und das Zählen der geschlüpften Falter vereinfacht. Parallel fanden zwei Ansätze mit je 150 Motteneiern statt, die den Einfluss der Nähe der einzelnen Eier zu einander überprüfen sollten. Bei einem der Ansätze befanden sich die abgelegten Eier gehäuft mittig auf dem 10 x 10 cm Wollquadrat auf einer Fläche von maximal 0,5 x 0,5 cm. Der andere Ansatz erhielt die gleiche Anzahl an Eiern auf einem ebenso großen Wollquadrat jedoch wurden die Eier weniger in Form eines Haufens sondern verteilt auf einer Fläche von 1,0 x 1,0 cm abgelegt (Tab. 3-2).

Tab. 3-2: Versuchsansätze zur Untersuchung des Falterschlupfes von *Tineola bisselliella* bei unterschiedlicher Anzahl eingesetzter Eier und deren Verteilung auf dem Nährsubstrat.

Eianzahl	50	150	250	350	450	150	150	
Verteilung	verteilt (10 x 10 cm)					mittig (1,0 x 1,0 cm)		Gehäuft (0,5 x 0,5 cm)

Jeder Ansatz fand als Tripletts zu unterschiedlichen Zeiten statt, so dass am Ende ein gemittelter Falterschlupf für alle fünf unterschiedlich großen Ausgangspopulationen und den beiden Ansätzen zur Dichte der abgelegten Eier gebildet werden konnte. Abschließend wurde der prozentuale Falterschlupf in Abhängigkeit von der Zeit vergleichend betrachtet.

3.3.2 UNTERSUCHUNGEN ZUR ÖKOLOGISCHEN POTENZ UND KONKURRENZSTÄRKE DER KLEIDERMOTTE *TINEOLA BISSELLIELLA* GEGENÜBER DEM POLSTERWARENKÄFER *ANTHRENUS FLAVIPES*

Für die Darstellung einer möglichst realen Konkurrenzsituation der Kleidermotte ist der aus der gleichen Nahrungsgilde stammende Polsterwarenkäfer (*Anthrenus flavipes*) ausgewählt worden. Beide Arten sind in der ISO 3998 (1977) als relevante Arten für die Prüfung der Insektenechtheit von Textilien vorgesehen. Da *A. flavipes* ebenfalls als Zuchtorganismus in der BAM geführt wird, war er leicht zugänglich und konnte ohne Probleme für die Versuche eingesetzt werden.

Um den späteren Schlupf der Larven des Polsterwarenkäfers gegenüber den Larven der Kleidermotte nicht zum zeitlichen Konkurrenznachteil werden zu lassen, erfolgte eine Annäherung des erwarteten Schlupftages beider Arten. Hierzu wurden die Polsterwarenkäfer bereits fünf Tage früher als die Kleidermotten zur Eiablage entnommen. Zu Beginn des Konkurrenzversuches hatten die Eier des Polsterwarenkäfers somit bereits ein Alter von maximal neun Tagen und die der Kleidermotte maximal ein Alter von vier Tagen. Jede Eiablage, sowohl die der Kleidermotte als auch die des Polsterwarenkäfers fand unter Zuchtbedingungen statt. Erst der fertige Konkurrenzansatz, bestehend aus 300 optisch intakten Eiern von *T. bisselliella* und 300 optisch intakten Eiern von *A. flavipes* auf einem 15 x 15 cm großen in Hefe getränktem und getrockneten Wollquadrat (Merinowolle) in einer Haushaltsbox von Fuerstgroup mit einem versehenen Gazeinsatz im Deckel, wurde in die entsprechend zu beobachtende klimatische Situation überführt. Zu jedem Konkurrenzansatz gab es einen Kontrollansatz aus 300 Eiern von *T. bisselliella* und einen aus 300 Eiern von *A. flavipes*. Alle Versuchsansätze fanden in vier- bis sechsfacher Ausführung statt, wobei die einzelnen Wiederholungen zeitlich versetzt zueinander starteten.



Abb. 3-2: Konkurrenzansätze unter Zuchtbedingungen

Die einzelnen klimatischen Bedingungen wurden in insgesamt fünf Klimaräumen und einem Klima-Prüfschrank der Firma RUMED Rubarth Apparate GmbH dargestellt und unterschieden sich sowohl in der Temperatur als auch in der relativen Luftfeuchtigkeit (Tab. 3-3).

Tab. 3-3: Temperaturen und relative Luftfeuchten der sechs klimatisch differenzierten Bedingungen

	Klima-Sollwert	Alarmsignalisierung bei Verlassen unten stehender Bereiche über einen Zeitraum von 45 min	
		Temperatur [°C]	Relative Feuchte [%]
Klimaraum	29° C und 76 % RF	18 < T > 35	RF < 90
Klimaraum	26° C und 76 % RF	18 < T > 35	RF < 90
Klimaraum	27° C und 68 % RF	18 < T > 35	RF < 90
Klimaraum	21° C und 76 % RF	15 < T > 25	RF < 90
Klimaraum	20° C und 65 % RF	15 < T > 35	RF < 90
Klima-Prüfschrank	26° C und 33 % RF	zulässige Abweichung nach DIN	

Die Dauer der Beobachtungszeit ergab sich aus der jeweiligen Entwicklungszeit beider Arten. *T. bisselliella* zeigt unter Zuchtbedingungen einen konstanten sechswöchigen Lebenszyklus während *A. flavipes* einen dreimonatigen aufweist. Um die Entwicklung bis zum Adultstadium auch beim Polsterwarenkäfer beobachten zu können, musste die Versuchsdauer bei mindestens drei Monaten liegen. Betrachtungen des Larvenwachstums unter drei verschiedenen Temperaturen zeigten eine Verlangsamung der larvalen Entwicklung und eine Verlängerung des Lebenszyklus (Daten werden nicht gezeigt), so dass ein Beobachtungszeitraum von einundzwanzig Wochen festgelegt wurde. Die in dieser Zeit schlüpfenden Falter und auch Käfer wurden bei jeder Kontrolle und Zählung entfernt, um die Nachfolgeneration nicht zu groß werden zu lassen, und so die Gefahr einer zu starken Nahrungsdezimierung nicht bestehen konnte. Das Schlupfverhalten der Kleidermotte und des Polsterwarenkäfers wurde zum einen isoliert voneinander anhand der Kontrollansätze und zum anderen unter Konkurrenz dreimal wöchentlich in Form der Anzahl geschlüpfter Falter bzw. Käfer dokumentiert.

3.4 FAUNISTISCHE UNTERSUCHUNGEN

Der Schwerpunkt der faunistischen Untersuchungen lag bei der Kleidermotte *T. bisselliella*. Ihr Vorkommen im Freiland wurde mit verschiedenen, auf ihr Verhalten abgestimmten Köderstrategien in Form von drei Fallentypen dokumentiert. Die Datenerhebung erfolgte im Raum Berlin-Brandenburg in zwei aufeinander folgenden Jahren (2010 und 2011). Die Anzahl der Tiere je Falle wurde bestimmt, wobei das Geschlecht nicht unterschieden wurde.

Das Aufstellen der Fallen übernahmen freiwillige Helfer. Sie wählten an ihrem Wohnort im Garten oder auf dem Balkon einen möglichst wettergeschützten Platz aus und tauschten die Fallen nach einem je Fallentyp variierenden Rhythmus regelmäßig gegen eine neue aus. Im Folgenden sind die unterschiedlichen Fallentypen sowie der entsprechende Beprobungsrhythmus und die verschiedenen Fallenstandorte beschrieben.

3.4.1 FALLENTYPEN UND BEPROBUNGSRHYTHMUS

3.4.1.1 PHEROMONFALLE

Die Pheromonfalle bestand aus einer handelsüblichen Klebefalle und einem Pheromondispenser der Firma Insect Limited Inc. (Indianapolis, USA) als Köder. Dieser enthält in einer Polyethylenkapsel mehrere Glaskeramikkugeln, die mit einem synthetischen Sexuallockstoff benetzt sind. Die von den Kugeln dispersierenden Stoffe sammeln sich zunächst in dieser Kapsel und werden über eine im Aluminiumdeckel eingesetzte Membran kontinuierlich über einen Zeitraum von etwa sechs bis acht Wochen freigelassen (Van Ryckeghem, 2015). Als Lockstoff für die Männchen von *T. bisselliella* werden zwei eng verwandte Pheromonkomponenten (Koiganal I und II) in einem bestimmten Mengenverhältnis zueinander eingesetzt (Swords & Ryckeghem, 2010).

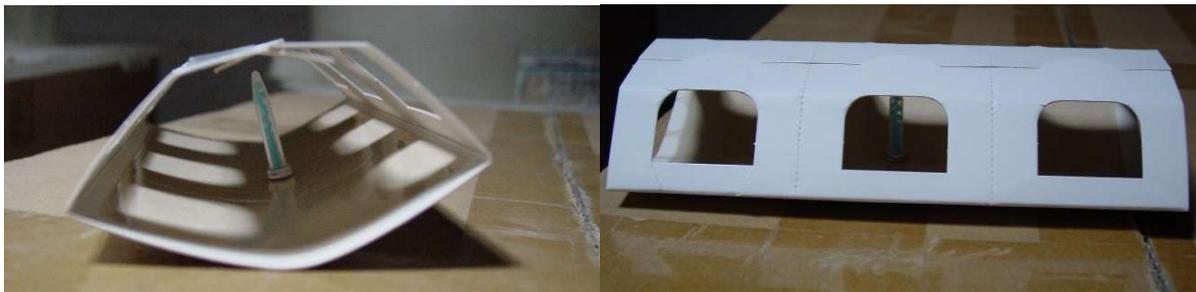


Abb. 3-3: Pheromonfalle mit Klebefläche und Pheromonköder

Der Beprobungszeitraum für die Pheromonfallen lief von März bis November im Jahr 2010 und 2011 an insgesamt zwanzig unterschiedlichen Standorten (Tab. 3-4). Diese befanden sich hauptsächlich in Berlin und Brandenburg mit Ausnahme eines Standortes, der in Schleswig Holstein lag. Nicht alle Standorte standen in beiden Jahren zu Verfügung, so dass lediglich zehn von ihnen für einen Jahresvergleich genutzt werden konnten. Im Jahr 2010 wurde die komplette Falle alle zwei Wochen, 2011 alle vier Wochen eingesammelt und durch eine neue mit einem frischen Köder ersetzt. Im Jahr 2014 fand eine wiederholte Beprobung an den Standorten statt, die sich in den vorangegangenen Beprobungsphasen als besonders fängig erwiesen hatten. Darüber hinaus ergab sich die Möglichkeit dreier neuer Standorte (FL 35, FL 37 und FL 43), von denen sich einer in England (FL 43) und zwei in Berlin (FL 35 und FL 37) befanden.

3.4.1.2 BECHERFALLE

Eine Becherfalle setzte sich aus der typischen Trichterfalle für Schadmotten in Form eines überdachten Bechers und einem mit in Hefe getränkten Gänsefedern gefülltem 1000 ml

Joghurtbecher (Fangbecher) zusammen (Abb. 3-4). Während das Gehäuse mit Hilfe eines synthetischen Stoffbandes hängend am gewählten Standort befestigt werden konnte, diente der Joghurtbecher dem Transport der gefangenen Organismen vom Fallenstandort zum Untersuchungsort. Hierzu wurde er mit einem Deckel verschlossen. Die mit Hefe getränkten Gänsefedern stellten einen optimalen Eiablageplatz mit reichlich Nahrungsangebot dar und dienten als Lockstoff.



Abb. 3-4: Becherfallen aus Trichterfalle und Joghurtbecher für den Freilandfang von *Tineola bisselliella*

Die Fangversuche erfolgten im Jahr 2010 im Vier-Wochenrhythmus an denselben Standorten wie mit den Pheromonfallen (Tab. 3-4). Um den Inhalt auf einen Befall durch Kleidermotten überprüfen zu können, überführte ich den Inhalt aller eingegangenen Fangbecher in Zuchtgefäße und inkubiert sie bei den BAM-üblichen Zuchtbedingungen für einen Zeitraum von mindestens acht Wochen in einem Klimaraum. War es innerhalb des Positionierungszeitraumes im Freiland dazu gekommen, dass ein oder mehrere Weibchen von *T. bisselliella* ihre Eier auf den Federn im Becher abgelegt hatten, so war unter den klimatisierten Zuchtbedingungen mit einem Schlupf von Faltern zu rechnen. Die geschlüpften Falter konnten mit einer Vakuumpumpe entnommen, bei -20° C abgetötet und bis zur mtDNA-Extraktion bei ebenfalls -20° C gelagert werden.

3.4.1.3 NESTERFALLE

Um einem möglichen natürlichen Lebensraum der Kleidermotte nahe zu kommen, kamen in den Jahren 2012-2014 an vereinzelt Standorten hölzerne Fallengehäuse in Vogelhausoptik, so genannte Nesterfallen zum Einsatz. Dieser Fallentyp wurde speziell für den Fang der Kleidermotte im Freiland geplant und vom Tischler der BAM entsprechend der Konstruktionsskizze in Abb. 3-5 hergestellt. Der Einflugspalt wurde in seiner Größe so gewählt, dass Kleintiere, vor allem die Kleidermotte problemlos hereinfliegen konnten, andere Tiere, vor allem Vögel jedoch keine Nutzungschance hatten. Im Innenraum war wie bei der Becherfalle ein Fangbecher mit in Hefe getränkten Gänsefedern als Lockstoff enthalten.

Bevor ein Einsatz im Freiland erfolgte, wurde dieser Fallentyp in einem abgeschotteten Flugraum (2 m x 5 m x 2 m) unter vergleichbaren klimatischen Bedingungen wie bei der Zucht bezüglich des Fangverhaltens getestet. Eine bestimmte Anzahl an Kleidermotten (Geschlecht zunächst unbekannt) wurde der Zucht entnommen und am Boden des Raumes frei gelassen. Die Nesterfalle befand sich in einem Metallschrank mit geöffneten Türen in einer Höhe von etwa 100 cm. Die Anzahl gefangener Kleidermotten sowie das Verhältnis der Geschlechter wurden in Abhängigkeit von unterschiedlichen Populationsgrößen (Anzahl eingesetzte Falter (N_e)) und der Dauer (Zeit (t)) der Fallenaufstellung beobachtet. Da die Testfänge im Flugraum erfolgreich verliefen, kamen die Nesterfallen im Freiland zum Einsatz. Die Beobachtungen in den Jahren 2012 und 2013 sind nicht Bestandteil dieser Arbeit und nur der Vollständigkeit halber aufgeführt, da sie den ersten Einsatz dieses Fallentyps im Freiland demonstrieren. Die Ergebnisse dieser beiden Jahre (Plarre, 2014) führten im Jahr 2014 zur der Auswahl von fünf Standorten in Berlin und dem näheren Umland (Tab. 3-4). Am Ende des Aufstellungszeitraums wurde der Inhalt der Fangbecher in ein Zuchtgefäß überführt und unter Zuchtbedingungen der Kleidermotte für mindestens acht Wochen inkubiert. Der Fangerfolg konnte direkt durch den Schlupf der Larven und Falter von *T. bisselliella* verzeichnet werden.

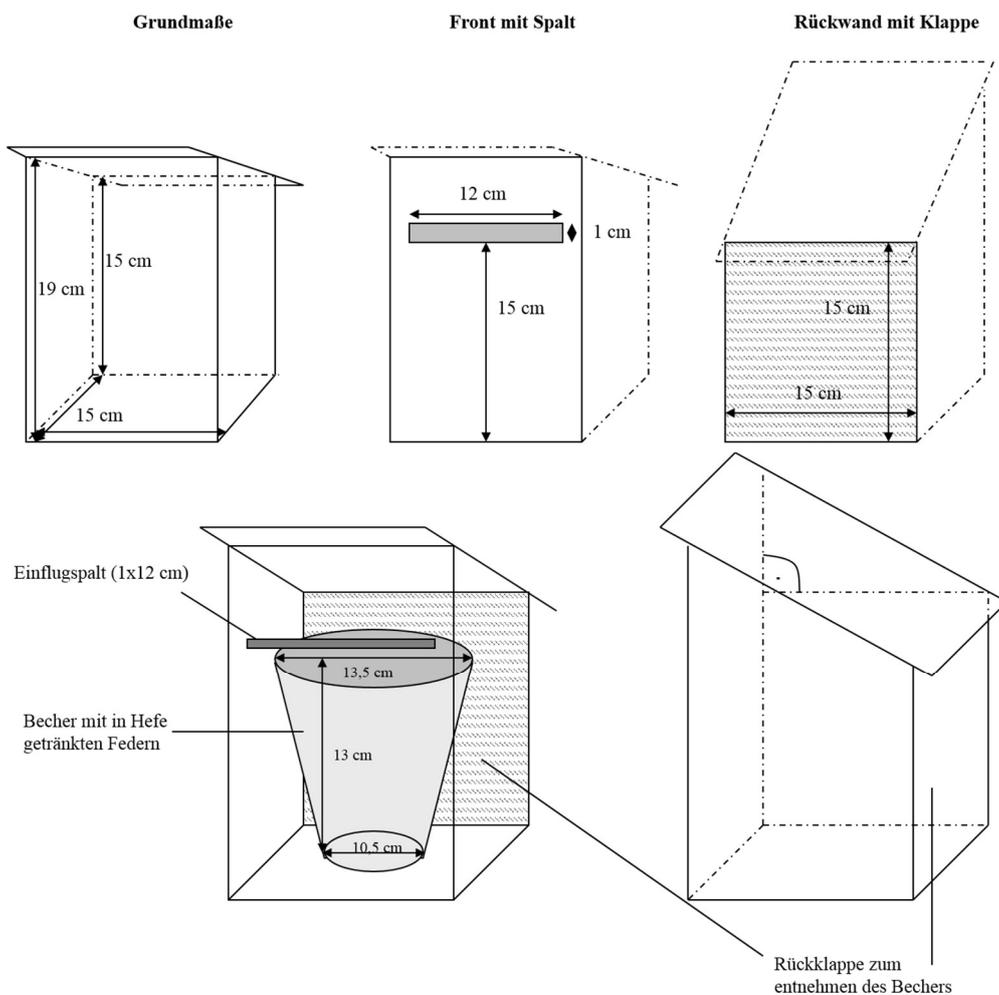


Abb. 3-5: Aufbau der Nesterfalle

3.4.2 FALLENSTANDORTE

Die Fallenstandorte (FL) für die Jahre 2010 und 2011 waren im Raum Berlin-Brandenburg vom Berliner Stadtzentrum aus vor allem in nördliche und südliche Richtung verteilt (Abb. 3-6). Berliner Standorte waren dabei überrepräsentiert und die zwei am weitesten entfernten Brandenburger Standorte (FL26 und FL32) befanden sich im Norden. Sie sind in der Kartenskizze nicht aufgeführt. Darüber hinaus wurde ein weiterer Standort in Schleswig Holstein (FL25) mit gleicher Regelmäßigkeit mit Pheromon- und Becherfallen beprobt. Gemeinsam mit dem nördlichsten Brandenburger Standort (FL26) fand hier über die beiden Beobachtungsjahre hinweg ein Fangversuch sowohl im Wohnraum (FL25i und FL26i) als auch im umliegenden Garten (FL25a und FL26a) statt. Dies ermöglichte an zwei verschiedenen Orten einen direkten Vergleich der Fangfolge von einer Außenfalle mit einer Innenfalle. Alle Fallenstandorte befanden sich in Siedlungsgebieten mit unterschiedlichen Bevölkerungsdichten und Häuserstrukturen. Da diese Kennzahlen jedoch keinen direkten Einfluss auf die Fangergebnisse zeigten, sind sie in dieser Arbeit nicht weiter berücksichtigt.

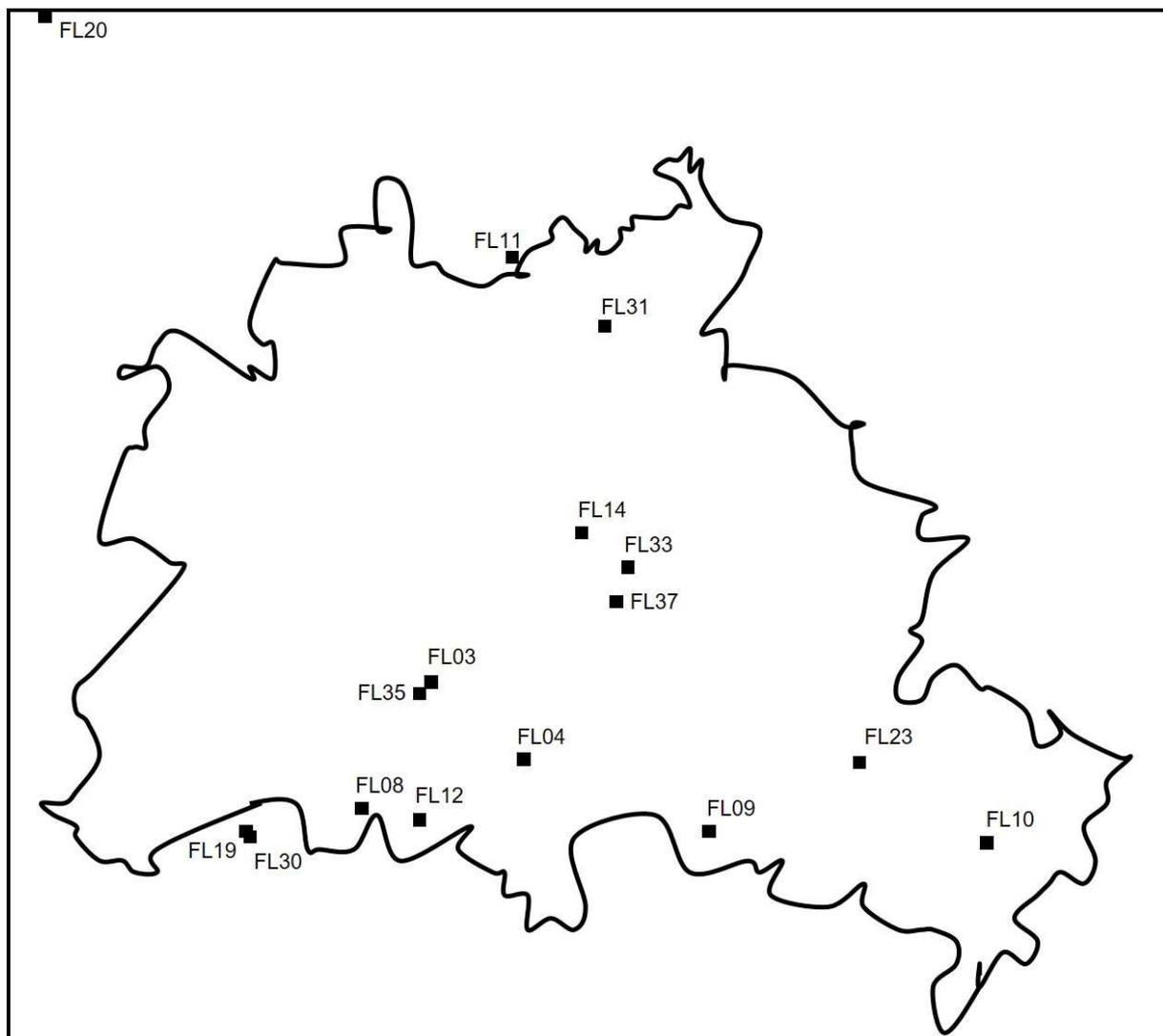


Abb. 3-6: Skizze zu den Fallenstandorten (FL) im Raum Berlin und Umgebung

Im Jahr 2014 fand erneut ein Fangversuch mit Pheromonfallen an zum Teil bereits aus 2010 und 2011 bekannten, aber auch drei neu hinzugekommenen Standorten statt (Tab. 3-4). Die Tabelle zeigt eine Übersicht der verwendeten Fallentypen am Standort sowie das Beprobungsjahr und stellt einzelne Charakteristika der Standorte dar, die für die Auswertung der Fangergebnisse relevant sind. Zum einen wurde am Aufstellungsort die Position der Falle (Fenster, Balkon, Garten) unterschieden und die daraus resultierende Entfernung zum nächstgelegenen Wohnhaus. Zum anderen erfolgte mithilfe eines Entfernungsrechners im Internet (Georg, 2016) für alle Berliner Standorte eine Berechnung der Entfernung zum geographischen Mittelpunkt von Berlin. Dieser befindet sich ausgehend von einer computergestützten Schwerpunktberechnung in der Alexandrinenstr. 11-14 (10969 Berlin) und ist durch eine Granitplatte im Boden markiert (Schultheiss, 2005). Auf diese Weise wurde versucht, grobe Tendenzen der Parameter Bevölkerungsdichte, Nachttemperatur und Grünflächenanteil zu berücksichtigen, die nach den Kartendarstellungen der Senatsverwaltung von Berlin vom Stadtkern aus in Richtung Stadtgrenzen alle eine abnehmende Tendenz zeigen.

In der Auswertung der Fangergebnisse erfolgte eine Gruppierung der Fallenstandorte in die zwei Hauptkategorien „Stadt Berlin“ und „Umland“, wobei mit Umland alle ländlichen Standorte außerhalb von Großstädten umfasst wurden (Brandenburger und Schleswig-Holsteinische Standorte). Die Nebenkategorien bildeten die Position der Fallen ab und wurden dementsprechend mit „Balkon“, „Terrasse“ und „Garten“ bezeichnet. Innerhalb dieser Nebenkategorien fand eine Ordnung der Standorte statt. Alle Balkonfallen wurden nach aufsteigender Entfernung zur geographischen Mitte Berlins sortiert, die Terrassen- und Gartenfallen nach ansteigender Entfernung zum nächsten Wohnhaus. Hiermit konnten die Fallenstandorte, die sich direkt am Wohnhaus auf Balkonen befanden, grob hinsichtlich der Kriterien Bevölkerungsdichte, Nachttemperatur und Grünflächenanteil betrachtet werden. An dieser Stelle sei jedoch darauf hingewiesen, dass die genauen Daten zu diesen Kriterien nicht für die jeweiligen Standorte einzeln genau betrachtet wurden. Diese Anordnung ist daher eher von sekundärer Bedeutung. Terrassen und Gartenfallen erhielten eine Reihenfolge nach zunehmenden Abstand zum nächstgelegenen Wohnhaus.

Tab. 3-4: Fallenstandorte in den Jahren 2010-2014: Lage (Berlin, Brandenburg, S-H=Schleswig-Holstein, E=England), Standortcharakteristika (Entfernung vom geographischen Mittelpunkt von Berlin (nur für Berliner Fallenstandorte), Fallenposition und Entfernung zum Wohnhaus), verwendeten Fallentyp (Phe=Pheromonfalle, Bf=Becherfalle, Nk=Nistkastenfalle)

Standorte					Fallentyp				
	Fallen Nr.	Entfernung vom geographischen Mittelpunkt von Berlin	Position	Entfernung zum Wohnhaus	2010	2011	2012	2013	2014
Berlin	FL14	3,21 km	Balkon	<1 m	Phe/Bf	Phe	Nk	Nk	Phe/Nk
	FL33	4,24 km	Balkon	<1 m	-	Phe	-	-	Phe/Nk
	FL37	3,98 km	Balkon	<1 m	-	-	-	Nk	Phe/Nk
	FL03	5,27 km	Garten	8 m	Phe/Bf	-	-	-	-
	FL04	6,40 km	Balkon	<1 m	Phe/Bf	-	-	-	-
	FL31	6,15 km	Balkon	<1 m	-	Phe	-	-	-
	FL35	7,37 km	Fenster	<1 m	-	-	-	-	Phe
	FL08	12,04 km	Garten	4 m	Phe/Bf	Phe	Nk	Nk	Phe
	FL12	10,47 km	Balkon	<1 m	Phe/Bf	-	-	-	-
	FL09	11,51 km	Terrasse	<1 m	Phe/Bf	Phe	Nk	Nk	Phe/Nk
	FL23	14,24 km	Balkon	<1 m	Phe/Bf	Phe	-	-	Phe
	FL10	20,50 km	Terrasse	<1 m	Phe/Bf	Phe	Nk	Nk	Phe/Nk
Brandenburg	FL19	-	Garten	12 m	Phe/Bf	Phe	-	-	Phe
	FL30	-	Garten	10 m	-	Phe	Nk	Nk	-
	FL11	-	Garten	12 m	Phe/Bf	Phe	-	-	Phe
	FL20	-	Garten	15 m	Phe/Bf	Phe	Nk	Nk	-
	FL32	-	Garten	15 m	-	Phe	-	-	-
	FL26i	-	Zimmer	0 m	Phe/Bf	Phe	-	-	Phe
FL26a	-	Garten	15 m	Phe/Bf	Phe	-	-	-	
S-H	FL25i	-	Zimmer	0 m	Phe/Bf	Phe	-	-	Phe
	FL25a	-	Garten	5 m	Phe/Bf	Phe	-	-	-
E	FL43	-	Zimmer	0 m	-	-	-	-	Phe

3.5 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

3.5.1 DNA-ISOLIERUNG

Die DNA-Isolierung umfasste die Extraktion der mtDNA aus den Faltern des jeweiligen Organismus sowie die Aufreinigung und Fällung. Die Falter wurden bevorzugt direkt nach der Gewinnung bei -20° C als ganzer Organismus gelagert. Eine frühere Lagerung in getrockneter Form oder als Alkoholpräparat erwies sich für die DNA-Extraktion und vor allem für die sich anschließende Polymerase-Kettenreaktion (PCR) als unvorteilhaft.

3.5.1.1 ISOLIERUNG DER MITOCHONDRIALEN DNA (MTDNA)

Die Extraktion der mtDNA erfolgte nach dem Prinzip der differentiellen Zentrifugation auf der Basis von Sucrose-Puffern (Tamura & Aotsuka, 1988; Jones, et al., 1988; Pissios & Scouras, 1992), bei der die mtDNA nach dem Zellaufschluss mittels Zellfraktionierung von der DNA des Zellkerns getrennt wurde. Für den Zellaufschluss sorgte ein 0,3 M Sucrose-Puffer, in dem der gesamte Organismus mit einem Pistill zerkleinert und somit der Zellaufschluss mechanisch unterstützt wurde. Die Fraktionierung der Zellkomponenten nach Größe und Dichte erreichte man durch eine serielle Zentrifugation in einer Eppendorf Zentrifuge mit steigenden Beschleunigung von Schritt zu Schritt. Bei niedriger Beschleunigung (1000 g) sedimentieren zunächst die Zelltrümmer und Zellkerne. Sie verbleiben am Boden des Tubes und der Überstand kann problemlos abgenommen werden. Er enthält neben Proteinen vor allem die gewünschten Mitochondrien. Sie pelletieren bei einer Geschwindigkeit von 15.000 g und setzen im Zuge der Mito-Lyse ihre DNA frei. Dies erfolgte in einem 5% igen Sucrose-Puffer bei 65° C im Heizblock. Kaliumacetat sorgte für die Neutralisierung und den Ausfall der noch vorhandenen Proteine. Abschließend konnte die gewonnene mtDNA über eine Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt und mittels Ethanol gefällt werden (siehe Abschnitte 3.5.1.2 und 3.5.1.3).

Das in der unteren Tabelle (Tab. 3-5) aufgelistete Protokoll stellt die in mehreren Testextraktionen entstandene optimierte Form dar. Im Vordergrund stand neben einer möglichst hohen mtDNA-Ausbeute auch eine gute Qualität der isolierten DNA. Die Steigerung der Ausbeute basierte zum einen auf einer erhöhten Stabilität der Mitochondrien durch die Durchführung der Extraktion auf Eis. Zum andern wurde das zu Beginn erhaltene Zellpellet erneut im Mito-Extraktionspuffer gelöst, um eventuell mit sedimentierte Mitochondrien noch herauszulösen. Schritt 5 des Extraktionsprotokolls diente ebenfalls der Zunahme der Ausbeute, indem er für die Rückgewinnung der DNA im verbliebenen Rest der wässrigen Phase sorgt. Die Schritte zur Sicherung der Qualität der Extraktion sind eng mit denen zur Steigerung der Ausbeute verknüpft. Die Schritte der Resuspension des Zellpellets und zur Erhöhung der Rückgewinnungsrate erlauben eine übervorsichtige und damit unvollständige Abnahme der Überstände. Somit wird eine Kontamination mit den im Pellet oder auch der phenolischen Phase gelösten Bestandteile sowie dem Phenol selbst vermieden. Auf den Einbau eines DNase I-Verdau zur Eliminierung einer möglichen Kontamination mit chromosomaler DNA wird in Abschnitt 3.5.2.3.4 näher eingegangen.

Tab. 3-5: Protokoll zur mtDNA-Isolierung aus Faltern von *T. bisselliella*, *T. pellionella*, *N. fuscella* und *E. kuehniella*

1. Isolierung der Mitochondrien
<ul style="list-style-type: none"> - gefrorenen Falter in ein 1,5 ml Eppendorf Tube (Eppi) überführen und in 200 µl Mito-Extraktionspuffer mit einem Pistill zermahlen - 10 min 1000 g (3000 rpm) und 4° C - Überstand abnehmen und auf Eis stellen - Pellet in 100 µl Mito-Puffer resuspendieren - 10 min 1000 g (3000 rpm) und 4° C - Überstand abnehmen und mit vorherigem vereinen (auf Eis) - Gesamtüberstand 15 min 1000 g (3000 rpm) und 4° C - Überstand abnehmen, Pellet verwerfen - Überstand 20 min 15.000 g (13.000 rpm) und 4° C - Überstand mit Pipette abnehmen
2. Lysis der Mitochondrien
<ul style="list-style-type: none"> - Lösung des Pellets in 150 µl Iso-Puffer und 15 µl SDS (10 %) - Inkubation bei 65° C für 3 h
3. Neutralisierung
<ul style="list-style-type: none"> - Zugabe von 80 µl 2,5 M Kaliumacetat (pH 5), vorsichtig mixen - Inkubation bei -20° C für 15 min - 5 min bei 13.000 g (11.600 rpm) und 4° C zentrifugieren - Überstand in ein neues Eppi überführen
4. Phenol-Chloroform-Extraktion
<ul style="list-style-type: none"> - Plus 1 Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol - Invertieren - RT bei max. rpm für 5 min - Obere wässrige Phase abnehmen und in ein neues Eppi überführen
5. Erhöhung der Rückgewinnungsrate
<ul style="list-style-type: none"> - Plus 1 Volumen TE (pH 8,0) zum Rückstand, gut mischen - RT bei max. rpm für 5 min - Obere wässrige Phase abnehmen und mit der vorher abgenommenen vereinen

6. Ethanolfällung

- Plus 4 Volumen kaltes 95 %-Ethanol (bzw. bis 1,5 ml auffüllen)
- Invertieren
- Präzipitation bei +4° C über Nacht
- 4° C bei max. rpm für 20 min
- Überstand verwerfen bis auf etwa 100-200 µl
- Plus 200 µl kaltes 70 %-Ethanol
- 4° C bei max. rpm (mind. 12000 g) für 20 min
- Überstand verwerfen
- Plus 100 µl kaltes 70 %-Ethanol
- 4° C bei max. rpm (mind. 12000 g) für 20 min
- Überstand verwerfen

7. **Pellet trocknen lassen** (Speed Vac, Drying rate: low = RT, ~10 min) und anschließend in 20 µl RNase freiem Wasser von Roboklon lösen

3.5.1.2 PHENOL-CHLOROFORM-ISOAMYLALKOHOL EXTRAKTION

Die Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Extraktion dient der Reinigung der gewonnenen DNA-Lösung von unerwünschten Verunreinigungen, vor allem von Proteinen. Hierzu gibt man ein Volumen von einem Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisch (25:25:1, v/v) zur Nukleinsäurelösung, zentrifugiert nach mehrmaligen invertieren und überführt anschließend vorsichtig die obere, wässrige Phase in ein neues Tube. Dabei ist darauf zu achten, die Interphase nicht mitzunehmen, da sie die Grenzschicht zur organischen Phase darstellt und sich in ihr die Verunreinigungen ansammeln. In der wässrigen Phase befindet sich die DNA. Diese Methode eignet sich sowohl für größere als auch minimale DNA-Mengen.

3.5.1.3 ETHANOLFÄLLUNG

Die DNA-Fällung dient neben der Konzentrierung einer DNA-Probe vor allem nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion der Reinigung der DNA-Lösung von Phenol- und Chloroformresten. Hierzu wird die DNA-Lösung mit Ethanol versetzt und entweder bei Raumtemperatur oder 4° C inkubiert. Durch Zentrifugation kommt es zur Pelletierung der DNA am Grund des Reaktionsgefäßes. Im Überstand bleiben Salze und andere kleine wasserlösliche Substanzen gelöst.

Die Ethanolfällung diente in dieser Arbeit allein als Reinigungsschritt und erfolgte bei 4° C über Nacht. Am Ende wurde das mtDNA-Pellet in RNase freiem Wasser von Roboklon gelöst und zur weiteren Lagerung bei -20° C eingefroren (Tab. 3-5).

3.5.1.4 DNA-QUANTIFIZIERUNG

Die Konzentrationsbestimmung der aus *Tineola bisselliella* und anderen Mottenarten isolierten mitochondrialen DNA sowie der PCR-Produkte für die Sequenzierung erfolgte mittels Absorptionsspektrometrie und damit über die Messung der optischen Dichte. Dem Beer-Lambert Gesetz entsprechend besteht eine direkte Korrelation zwischen der Absorption monochromatischen Lichts und der Konzentration einer Lösung. Nukleinsäuren absorbieren zwar bei mehreren Wellenlängen, zeigen aber ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm. Der Grad der Absorption einer geeignet verdünnten DNA-Lösung bei dieser Wellenlänge kann somit zur Bestimmung der Konzentration an DNA genutzt werden. Der Absorptionswert $A(\lambda)$ ergibt sich aus dem Logarithmus des Quotienten aus eingesetzter Lichtintensität I_0 und dem nach Durchtritt durch die DNA-Probe gemessenen Wert I_{Probe} . Ein Wert von 1 entspricht einer dsDNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$.

Die Messungen zur Absorptionsspektrometrie erfolgten mithilfe des Spektrophometers NanoDrop® ND-2000c von der Firma Fisher Scientific. Der Vorteil dieses Geräts lag in der geringen Probemenge (1 μl), die zur Messung nötig war, so dass selbst bei den eher geringeren Ausbeuten an mtDNA eine wiederholte Messung keinen großen Probenverlust darstellte und eine Kontamination bei Rückführung gemessener Proben nicht bestehen konnte. Die DNA-Konzentration wurde nach der Messung vom Gerät direkt berechnet. Durch die zusätzliche Messung der Absorptionen bei einer Wellenlängen von $\lambda = 280$ nm und $\lambda = 230$ nm konnte eine Aussage über die Reinheit der DNA-Probe getroffen werden. Während die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm typisch für Proteine ist, absorbieren viele organische Komponenten wie z.B. Phenol und chaotrope Salze bei einer Wellenlänge von $\lambda = 230$ nm. Der Quotient aus den beiden Messwerten $A(260 \text{ nm})$ und $A(280 \text{ nm})$ gibt Auskunft über die mögliche Kontamination mit Proteinen und sollte zwischen 1,8 und 2,1 liegen. Ein niedrigerer Quotient deutet auf eine Proteinkontamination hin. Mithilfe des Quotienten $A(260 \text{ nm})/A(230 \text{ nm})$ lassen sich Rückschlüsse auf eine Kontamination mit organischen Substanzen und somit Phenol ziehen. Er sollte oberhalb von 1,8 liegen, wobei eine saubere Probe einen Wert von 2,0 aufweist.

DNA-Proben, die eine zu geringe Konzentration für die direkte Sequenzierung aufwiesen, wurden mithilfe der SpeedVac Savant DNA 120 von Thermo electron corporation eingedampft und in einem adäquaten Volumen von RNase und Nuklease freiem Wasser von Roboklon wieder gelöst.

3.5.2 DNA-AMPLIFIKATION – DIE POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) stellt eine Methode zur Vervielfältigung von spezifischen DNA-Abschnitten dar und wurde erstmals im Detail 1983 von Kary B. Mullis beschrieben. Es handelt sich dabei um eine einfach umzusetzende Reaktion, die aus einem einzelnen DNA-Molekül 100 Billionen Kopien im Laufe eines Nachmittags generieren kann (Mullis, 1990). Diese Reaktion ist ein Zyklus, der sich grob in die drei Teilschritte Denaturierung, Annealing und Elongation gliedern lässt. Während dem Denaturierungsschritt trennen sich die beiden DNA-Stränge der Ausgangsprobe (Template), indem die Wasserstoffbrückenbindungen der Basenpaare unter der Einwirkung einer Temperatur von 94-95° C

aufbrechen. Eine sich anschließende Abkühlung auf eine Temperatur um die 55° C ermöglicht die Bindung von Oligonukleotiden (Primern) an zu ihnen komplementären Abschnitten der DNA. Diese Primer sind kurze, synthetisch hergestellte DNA-Fragmente und flankieren als Start- und Stoppsignal den zu amplifizierenden DNA-Abschnitt. Die Temperatur des Annealings ergibt sich aus der Basenabfolge der gebildeten Primer und lässt sich mithilfe einer Reihe von frei verfügbaren Programmen leicht errechnen (z.B. Primer3Plus und Amplifx). Sie richten sich dabei nach der Schmelztemperatur des Primers, die angibt, bei welcher Temperatur 50 % des Primers nicht mehr an das Template bindet, seine Bindungskapazität also nur noch halb so stark ist. Die Annealingtemperatur wird daher in etwa fünf bis zehn Grad darunter angesetzt. Der Gebrauch eines Primerpaares führt oft zu unterschiedlichen Schmelztemperaturen beider Primer und auch die Basenabfolge der Template-DNA hat einen Einfluss auf die optimale Annealingtemperatur, so dass der Test eines Temperaturgradientens zu den verlässlichsten Methoden der Bestimmung der passenden Annealingtemperatur zählt. Für die Elongation muss die Temperatur wieder auf das Optimum der verwendeten Polymerase, dem Enzym zur Katalyse der Bindung zwischen den Nukleotiden, angehoben werden. Sie sorgt in Gegenwart von Desoxynucleotidtriphosphaten (dNTPs) für die Verlängerung der Primer zu einer zum Template komplementären Sequenzen. Am Ende liegen somit alle DNA-Moleküle wieder doppelsträngig vor. Dieser temperaturgesteuerte Zyklus läuft im Thermocycler in mehrfacher Wiederholung ab, so dass schließlich die gewünschten, durch die Primer flankierten DNA-Abschnitte in hoher Kopienzahl entstehen.

Für die Amplifikationen des mitochondrialen Genabschnitts sowie der Kontrollregion kam die PCRBioHifi-Polymerase von PCR Biosystems Ltd zum Einsatz. Ihre Fehlerrate pro Nukleotid liegt bei einem Faktor von 10^{-7} während die einer Standard-*Taq*-Polymerase bei einem Faktor von 10^{-5} bis 10^{-6} angesiedelt ist (Eckert & Kunkel, 1990). Darüber hinaus verfügt die PCRBioHifi-Polymerase über eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität, das so genannte Proofreading. Sowohl die geringe Fehlerrate als auch die Eignung für GC- und AT-reiche Templates waren ausschlaggebend für die Wahl dieser Polymerase. Ein Vergleich von Sequenzen zur Betrachtung der genetischen Distanz ist nur bei gut reproduzierbaren Kopien der zu vergleichenden DNA-Abschnitte sinnvoll, da sonst in der PCR falsch eingebaute Nukleotide einen Unterschied hervorrufen, der sich in den Proben gar nicht widerspiegelt. Die BOX-PCR erfolgte unter Verwendung der *Taq*-DNA-Polymerase (nativ) von Thermo Scientific. Sie wird standardmäßig in Zusammenhang mit dem Hausverfahren zur BOX-PCR bei Bakterien eingesetzt.

3.5.2.1 AMPLIFIKATION EINES GENABSCHNITTES DER CYTOCHROMOXIDASE I (COI)

Der Genabschnitt der Cytochromoxidase I (COI) befindet sich auf dem mitochondrialen Genom. Ein Teilabschnitt dieses Gens der Kleidermotte war bereits unter der Akzessionsnummer KF404381 beim National Center for Biotechnology Information (NCBI) veröffentlicht und stammt aus einer DNA-Barcode Studie zu Motten und Schmetterlingen (Hebert, et al., 2013). Ein Vergleich dieser Sequenz mit einer Reihe weiterer veröffentlichter CO I Sequenzen von Tineiden und weiter entfernt verwandten Lepidopteren zeigte Bereiche größerer Sequenzübereinstimmungen sowie Unterschiede auf. Das Allignment erfolgte mithilfe der Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software (siehe

Abschnitt 3.6.3.1). Die Betrachtung der Lage bereits bekannter Primersequenzen aus veröffentlichten Studien (Simon, et al., 1994; Hajibabaei, et al., 2006; Hebert, et al., 2013) führte zur Auswahl von zunächst acht möglichen Primern, davon drei forward- und fünf reverse-Primer. Alle Primer wurden mithilfe des Programms Primer3Plus auf ihren GC-Gehalt, mögliche Sekundärstrukturen und ihre Schmelztemperatur hin genau analysiert, da diese Eigenschaften einen entscheidenden Einfluss auf die Qualität der PCR haben. Die Wahl fiel auf die beiden als COI-fwd_1 und COI-rev_3 benannten Primer (Tab. 3-23), da der GC-Gehalt annehmbar war, die Schmelztemperaturen nahe beieinander lagen und das zu erhaltene Fragment seiner Größe nach (um die 350 bp) gut zu amplifizieren schien. Der Reaktionsansatz (Tab. 3-6) mit einem Gesamtvolumen von 50 µl richtete sich nach den Herstellervorgaben der verwendeten Polymerase, der PCRBio-Hifi-Polymerase von PCR Biosystems Ltd und wurde experimentell angepasst.

Tab. 3-6: Reaktionsansatz zur CO I-PCR

	Eingesetzte Menge	Endkonzentration
5x PCRBio-Hifi Puffer	10,0 µl	1x
COI-fwd_1 Primer (100 pmol/µl)	0,1 µl	10 pmol
COI-rev_3 Primer (100 pmol/µl)	0,1 µl	10 pmol
PCRBio-Hifi-Polymerase (2U/µl)	0,5 µl	0,5u
mtDNA	~20 ng	
Rnase & Nuclease Free Water (Roboklon)	Bis auf 50 µl ergänzt	

Die Ermittlung der optimalen Annealingtemperatur für das gewählte Primerpaar erfolgte mittels Temperaturgradiententest. Der initiale Denaturierungsschritt so wie die Temperaturen für die zyklische Denaturierung und Elongation folgten den Angaben des Herstellers der verwendeten Polymerase. Alle weiteren Zeiten und die Zyklenanzahl wurden experimentell optimiert. Die Amplifikationsreaktion wurde im Eppendorf Thermocycler epgradient S bzw. proS vapo. Protect durchgeführt.

Tab. 3-7: PCR-Programm zur Amplifikation des CO I Sequenzabschnitts

Initiale Denaturierung	95,0° C	60 s	} 33x
Denaturierung	95,0° C	30 s	
Annealing	52,8° C	60 s	
Elongation	72,0° C	60 s	
Finale Elongation	72,0° C	60 s	
Pause	4,0° C		

3.5.2.2 AMPLIFIKATION EINES ABSCHNITTES DER MITOCHONDRIALEN KONTROLLREGION (CR)

Zur Kontrollregion der Kleidermotte gab es keine veröffentlichten Sequenzabschnitte, so dass verfügbare Sequenzen möglichst nah verwandter Lepidopteren zur Synthese von geeigneten Primern herangezogen werden mussten. Die Sequenzen von sechs Vertretern verschiedener Familien wurden mithilfe der MEGA Software auf übereinstimmende Sequenzabschnitte hin untersucht. Die beiden die Kontrollregion von Insekten flankierenden Sequenzabschnitte codieren für die 12S rRNA bzw. die tRNA^{ile} (ile = Isoleucin) und stellen konservierte Regionen auf dem mitochondrialen Genom dar. Sie eignen sich daher besonders gut zur Synthese von Primersequenzen. In Anlehnung an die bekannte Sequenz dieses Bereiches von *Drosophila yakuba* entstanden bereits in einer Studie zur Struktur und Evolution der Kontrollregion im Genus *Jalmenus* die Primer „12S 332+“ und „Met20-“ (Taylor, et al., 1993). Ausgehend von diesem Primerpaar fanden erste Amplifikationsversuche und Optimierungen der Primersequenzen statt. Mithilfe der Webschnittstelle Primer3Plus, einem Primerdesignprogramm (Untergasser, et al., 2007) wurde die Bindung an den bekannten Sequenzabschnitten verwandter Lepidopteren getestet, der GC-Gehalt, die Schmelztemperatur und mögliche Sekundärstrukturen überprüft. Parallel hierzu wurde die Bindungsspezifität an der Gesamtsequenz des mt-Genoms von *Bombyx mandarina* (Lepidoptera) über das Programm Amplifx beurteilt. Schließlich kam es zur Synthese und erfolgreichen Tests der Primer „12S-internal 18“ als forward-Primer und „Met20-rev“ als reverse-Primer (Tab. 3-23).

Der Reaktionsansatz entspricht in seinen jeweiligen Konzentrationen dem der CO I-PCR und hat ebenfalls ein Gesamtvolumen von 50 µl (Tab. 3-8).

Tab. 3-8: Reaktionsansatz zur CR-PCR

	Eingesetzte Menge	Endkonzentration
5x PCRBio-Hifi Puffer	10,0 µl	1x
12S-internal 18 Primer (100 pmol/µl)	0,1 µl	10 pmol
Met20-rev Primer (100 pmol/µl)	0,1 µl	10 pmol
PCRBio-Hifi-Polymerase (2U/µl)	0,5 µl	0,5u
mtDNA	~20 ng	
Rnase & Nuclease Free Water (Roboklon)	Bis auf 50 µl ergänzt	

Für das PCR-Programm (Tab. 3-9) wurde die optimale Annealingtemperatur mithilfe eines zuvor getesteten Temperaturgradienten bestimmt und die Zyklenanzahl im Vergleich zur CO I-PCR auf fünfunddreißig angehoben. Die Amplifikationsreaktion erfolgte ebenfalls im Eppendorf Thermocycler epgradient S bzw. proS vapo. Protect.

Tab. 3-9: PCR-Programm zur Amplifikation der mitochondrialen Kontrollregion

Initiale Denaturierung	95° C	60 s	} 35x
Denaturierung	95° C	30 s	
Annealing	61° C	60 s	
Elongation	72° C	60 s	
Finale Elongation	72° C	60 s	
Pause	4° C		

3.5.2.3 BOX-PCR

Die Durchführung der BOX-PCR war an das gängige Hausprotokoll der BAM für Bakterien angelehnt und erfolgte unter Verwendung der Chemikalien, die im Reaktionsansatz (Tab. 3-10) aufgelistet sind. Besonders bei den Chemikalien ist eine genaue Einhaltung der Angaben bezüglich Konzentration und Hersteller zu beachten, um die Reproduzierbarkeit sicherstellen zu können.

Tab. 3-10: Reaktionsansatz zur BOX-PCR

	Eingesetzte Menge	Endkonzentration
5x Gitschierpuffer	5,00 µl	1x
dNTPs (10 mM)	1,25 µl	0,2 mM
BOX A1R Primer (100 pmol/µl)	1,00 µl	100 pmol
DMSO (100 %)	2,50 µl	10 %
BSA (20 mg/ml)	0,40 µl	0,8 µg
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase, native (5U/µl)	0,60 µl	1,25 u
mtDNA	~40 ng	
Rnase & Nuclease Free Water (Roboklon)	Bis auf 25 µl ergänzt	

Die Reaktionsansätze durchliefen das in Tab. 3-11 dargestellte PCR-Programm im Block 1 des T3 Thermocycles von Biometra® über Nacht.

Tab. 3-11: PCR-Programm zur BOX-PCR

Initiale Denaturierung	95° C	7 min	} 30x
Denaturierung	95° C	30 s	
Annealing	53° C	60 s	
Elongation	65° C	8 min	
Finale Elongation	65° C	16 min	
Pause	4° C	üN	

Um die Wahrscheinlichkeit der Kontamination mit Fremd-DNA so gering wie möglich zu halten, wurde eine Reihe von Vorsichtsmaßnahmen getroffen. Alle Pipettierarbeiten erfolgten unter einer UV/PCR-Werkbank, die zusammen mit den Pipetten und Reaktionsgefäßen vor jeder Nutzung zehn Minuten mit UV-Licht ausgeleuchtet wurde. Auf diese Weise wurde mögliche kontaminierende DNA derart zerstört, dass eine Amplifikation zu keinem Ergebnis mehr geführt hätte (Sarkar & Sommer, 1990). Der BOX-PCR-Primer (BOX A1R (Tab. 3-23)) wurde zu einem Volumen von jeweils 20 µl aliquotiert und bei -20° C gelagert. Für den Ansatz eines PCR-Master-Mix kam stets ein ungeöffnetes Aliquot zum Einsatz. Die Tubes mit der Polymerase, den dNTPs, dem BSA, dem PCR-Wasser und Puffer wurden nur für diesen PCR-Typ verwendet und daher stets unter der UV/PCR-Werkbank geöffnet. Die Ergebnisse wurden mittels Agarose-Gel-Elektrophorese und/oder Kapillargelelektrophorese (Agilent 2100 Bioanalyzer) überprüft und mit Hilfe der entsprechenden Software des verwendeten Gel-Dokumentationssystems oder des Agilent Bioanalyzers ausgewertet. Nähere Informationen zur jeweiligen Vorgehensweise befinden sich in den entsprechenden Abschnitte zu den Elektrophoresetechniken (3.5.3).

3.5.2.3.1 TEST AUF WIEDERHOLBARKEIT

Die Bindung eines Primers an das Template hängt von vielen Faktoren innerhalb einer PCR ab. Der BOX-PCR-Primer stellt bezogen auf das mitochondriale Genom einen eher willkürlichen Primer dar, der im Zuge der PCR sowohl spezifisch als auch unspezifisch binden könnte. Diese gewollten unspezifischen Bindungen hängen stark von der gewählten Annealingtemperatur ab und können bei kleinsten Abweichungen im PCR-Programm oder Kontaminationen im Reaktionsansatz stark beeinflusst werden. Um einen Eindruck von der Variabilität der Primerbindungen zu erhalten, wurden mehrere mtDNA-Extrakte der Kleidermotte jeweils mehrmals und teilweise an zwei verschiedenen Tagen zur BOX-PCR eingesetzt und die entstandenen Bandenmuster aus den PCRs miteinander verglichen. In der nachfolgenden Tabelle ist eine Übersicht der gewählten Proben dargestellt und die jeweiligen Bezeichnungen der entsprechenden BOX-PCR-Ansätze und das Durchführungsdatum sind aufgelistet.

Tab. 3-12: mtDNA-Proben von *T. bisselliella* zum Test der Wiederholbarkeit der generierten Bandenmuster nach der BOX-PCR

Probe	BOX-PCR-Ansatz	Datum der Durchführung der BOX-PCR
mtTbBZ 1408_1	TbBZ1-2708a	27.08.2014
	TbBZ1-2708b	27.08.2014
	TbBZ1-0409a	04.09.2014
	TbBZ1-0409b	04.09.2014
mtTbBZ 1408_2	TbBZ2-2708a	27.08.2014
	TbBZ2-2708b	27.08.2014
	TbBZ2-0409a	04.09.2014
	TbBZ2-0409b	04.09.2014
mtTbBZ 1408_3	TbBZ3-2708a	27.08.2014
	TbBZ3-2708b	27.08.2014
	TbBZ3-0409a	04.09.2014
	TbBZ3-0409b	04.09.2014
mtTbBZ 1408_5	TbBZ5-0409a	04.09.2014
	TbBZ5-0409b	04.09.2014
mtTbBZ 1408_6	TbBZ6-2708a	27.08.2014
	TbBZ6-2708b	27.08.2014

Die erhaltenen BOX-PCR-Ergebnisse zu den einzelnen Proben wurden sowohl über eine Agarose-Gelelektrophorese als auch über den Agilent DNA Chip 12000 im Bioanalyzer visualisiert und mithilfe der Agilent Software zum Bioanalyzer analysiert.

3.5.2.3.2 TEST AUF VARIABILITÄT INNERHALB VON POPULATIONEN

Neben der Variabilität innerhalb der Wiederholungen war ebenfalls mit einer Variabilität unter den einzelnen Individuen aus einer Kleidermottenpopulation zu rechnen. Um das Ausmaß dieser Vielfältigkeit genauer beleuchten zu können, wurden zunächst Agarosegelbilder der BOX-PCR von verschiedenen Individuen aus der Zuchtpopulation sowie der Freilandpopulation des Fallenstandortes Nr. 33 betrachtet. Anschließend erfolgte ein Vergleich von BOX-PCR-Mustern eines größeren Stichprobenumfangs aus der Zuchtpopulation und der Freilandpopulation FL35. Da die Population FL33 nicht mit einer solchen Vielzahl an Individuen vertreten war, wie die Population FL35, wurde sie für diesen Vergleich ausgeschlossen. Die Datenanalyse fand mithilfe des Agilent DNA Chips 12000 und der Software des Bioanalyzers statt.

Der Vergleich von BOX-PCR-Mustern einzelner Falter von *T. bisselliella* aus der Zuchtpopulation der BAM sowie dem Fallenstandort Nr. 35 hatte zum Ziel, eine Konstanz der Bandenmuster innerhalb einer Population zu identifizieren. Davon ableitend sollte unter Einbeziehung der Ergebnisse zur

Variabilität innerhalb der Wiederholungen eine erste Einschätzung zur Verwendung der BOX-PCR in der Differenzierung von Populationen getroffen werden.

3.5.2.3.3 BETRACHTUNG DES EINFLUSSES VON MÖGLICHEN DARMBAKTERIEN

Für die Kleidermotte und andere Keratin verdauende Lepidopteren ist noch nicht genau geklärt, wie sie die Spaltung des Keratins erreichen bzw. ob sie die dafür genutzten Enzyme selbst herstellen oder von Darmbakterien beziehen. Um einen Einfluss der DNA möglicher Darmbakterien betrachten zu können, wurden die mtDNA-Extrakte aus unterschiedlichen Körperteilen der Kleidermottenfalter getrennt voneinander behandelt. Dabei entstanden vier verschiedene Extraktionsansätze in doppelter Ausführung, die sich jeweils in der Anzahl der verwendeten Individuen und der Zusammensetzung der Körperteile unterschieden (Tab. 3-13). Alle Falter stammten aus der BAM-Zucht und wurden vor Versuchsbeginn für mindestens achtundvierzig Stunden bei -20° C gelagert. Anschließend wurden ihnen die Flügel entfernt und die restlichen Körperteile vorsichtig mit einer sterilen Pinzette unter dem Binokular voneinander getrennt und in einzelne sterile Reaktionsgefäße überführt. Bis zur mtDNA-Extraktion, die nach dem in dieser Arbeit beschriebenen Protokoll ablief (Tab. 3-5), wurden die Körperteile in den Reaktionsgefäßen bei -20° C aufbewahrt. Im Anschluss an die mtDNA-Extraktion erfolgte die BOX-PCR nach dem vorgestellten Protokoll (Tab. 3-10 und Tab. 3-11) und die Visualisierung der Bandenmuster mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese sowie der Kapillargelelektrophorese.

Tab. 3-13: mtDNA-Extraktionsansätze aus unterschiedlichen Körperteilen von *T. bisselliella*

Ansatz	Körperteile	Anzahl der Individuen
KB1	Kopf und Beine	10
KB2	Kopf und Beine	5
TA1	Thorax und Abdomen	10
TA2	Thorax und Abdomen	5
KTB1	Kopf, Thorax und Beine	5
KTB2	Kopf, Thorax und Beine	3
A1	Abdomen	5
A2	Abdomen	3

3.5.2.3.4 KONTAMINATION DER MTDNA-PROBEN VON *T. BISSELLIELLA* MIT CHROMOSOMALER DNA

Die Isolierung mitochondrialer DNA mittels differentieller Zentrifugation birgt die Gefahr der Kontamination mit restlicher chromosomaler DNA. Ein DNase I-Verdau nach der Extraktion der Mitochondrien, jedoch vor deren Lyse stellt eine bekannte Methode zur Eliminierung dieser möglichen Verunreinigung dar (Zimmermann, et al., 1988; Gianniny, et al., 2004; Sanyal, et al., 1997). Die DNase I ist eine unspezifische Endonuklease, die Phosphodiester-Bindungen hydrolysiert und Mono- und Oligonukleotide erzeugt. Auf diese Weise wirkt sie abbauend auf doppel- und einzelsträngige

DNA sowie Chromatin. Die Membran der Mitochondrien kann sie jedoch nicht durchdringen, so dass deren DNA geschützt ist. Die DNA zerstörter Organellen ist nicht geschützt, ein DNase I-Verdau kann daher auch gleichzeitig Auskunft über den Zustand der isolierten Mitochondrien geben.

Tab. 3-14: Protokoll zum DNase I-Verdau zur Eliminierung möglicher Verunreinigungen durch chromosomaler DNA bei der mtDNA-Extraktion

Einschub des DNase I-Verdaus in das mtDNA-Extraktionsprotokoll zwischen Schritt 1 und 2	
1.	Resuspension des Mito-Pellets in 100 µl 1x DNase I-Puffer
2.	Zugabe von 0,5 µl DNase I (5U/µl) und für 30 min bei 37° C inkubieren
3.	Zugabe von 100 µl Mito-Puffer und für 10 min bei 1000 g (3000 rpm) und 4° C zentrifugieren
4.	Überstand abnehmen, Pellet verwerfen
5.	Zentrifugation für 20 min bei 15000 g (13000 rpm) und 4° C
6.	Überstand verwerfen
7.	Zugabe von 100 µl Mito-Puffer und für 20 min bei 15000 g (13000 rpm) und 4° C zentrifugieren
8.	Überstand verwerfen und mit dem Pellet entsprechend des mtDNA-Extraktionsprotokoll fortfahren

Um zu überprüfen, ob eine mögliche Kontamination mit chromosomaler DNA einen Einfluss auf die Bildung der BOX-PCR-Muster hat, wurde aus mehreren Faltern der Kleidermotte die mtDNA unter Verwendung eines DNase I-Verdaus isoliert und in der BOX-PCR eingesetzt. Die DNase I-Behandlung (Tab. 3-14) erfolgte unmittelbar nach der Isolierung der Mitochondrien, dem Schritt 1 des mtDNA-Extraktionsprotokolls (Tab. 3-5) und startete mit den pelletierten Mitochondrien. Im Anschluss an den Verdau lagen die Mitochondrien erneut pelletiert vor und konnten durch Zugabe des Iso-Puffers lysiert werden. Alle weiteren Schritte entsprachen dem Standard-Protokoll zur mtDNA-Isolierung (3.5.1.1).

3.5.2.4 16S rRNA-PCR ZUR ÜBERPRÜFUNG MÖGLICHER KONTAMINATIONEN MIT BAKTERIELLER DNA

Eine Kontamination mit bakterieller DNA könnte an zwei Stellen zur Beeinflussung der BOX-PCR-Ergebnisse führen. Zum einen ist im Zusammenhang mit der Verwendung einer Standard-*Taq*-DNA-Polymerase eine bakterielle DNA-Kontamination aus dem Herstellungsprozess der Polymerase her möglich (Böttger, 1990; Borst, et al., 2004; Tyler, et al., 1997). Der Test auf eine mögliche bakterielle DNA-Kontamination der Polymerasen erfolgte an zwei verschiedenen Polymerasen über eine 16S rRNA-PCR mit für Bakterien konservierten Primern (Rand & Houck, 1990). Die Wahl der universellen Primer fiel auf den Forward-Primer „27F“ (Lane, 1991) und den Reverse-Primer „1492R“ (Turner, et al., 1999) (Tab. 3-23). Zum anderen wurde bereits in Abschnitt 3.5.2.3.4 über die Möglichkeit der Kontamination während der mtDNA-Extraktion gesprochen. Mithilfe der 16S rRNA-PCR konnte nun auch die Kontamination der mtDNA-Proben mit der DNA möglicher Darmbakterien

direkt untersucht und vergleichend zu den oben beschriebenen BOX-PCRs mit der mtDNA aus unterschiedlichen Körperabschnitten betrachtet werden.

3.5.2.4.1 KONTAMINATION DER VERWENDETEN *Taq*-POLYMERASEN MIT BAKTERIELLER DNA

LD (low DNA) Polymerasen werden von den Herstellern damit beworben, dass sie aufgrund ihrer speziellen physikalischen, chemischen und/oder enzymatischen Behandlung nahezu frei von bakterieller DNA sind. Zwei ausgewählte Polymerasen sollten hinsichtlich ihrer bakteriellen Kontaminationen vor dem Einsatz für die BOX-PCR überprüft werden. Neben der Standard-*Taq*-DNA-Polymerase (native) von Thermo Scientific untersuchte ich auch die *AmpliTaq*® DNA Polymerase LD (low DNA) von Lifescience, die eine modifizierte Form des *Thermus aquaticus* DNA-Polymerase Gens darstellt und mit einem reduzierten Anteil an bakterieller DNA beworben wird.

Die Reaktionsansätze erfolgten in einem Volumen von 50 µl und als Positivkontrolle wurden 40 ng nukleäre DNA (nDNA) von *Halomonas elongata* eingesetzt (Tab. 3-15 und Tab. 3-16). Der Test der jeweiligen Polymerase erfolgte in der Negativkontrolle, der keine DNA beigegeben wurde.

Tab. 3-15: Reaktionsansatz für die 16S rRNA-PCR mit der *Taq*-DNA-Polymerase (native) von Thermo Scientific

	Eingesetzte Menge	Endkonzentration
10x <i>Taq</i> Puffer (+ $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$)	5,00 µl	1x
dNTPs (10 mM)	1,00 µl	0,2 mM
27F (fwd) Primer (5 µM)	2,00 µl	0,2 µM
1492R (rev) Primer (5 µM)	2,00 µl	0,2 µM
MgCl ₂ (25 mM)	5,00 µl	2,5 mM
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase, native (5U/µl)	0,25 µl	1,25 u
nDNA <i>Halomonas elongata</i> (100 ng/µl)	0,40 µl	40 ng
Rnase & Nuclease Free Water (Roboklon)	Bis auf 50 µl ergänzt	

Tab. 3-16: Reaktionsansatz für die 16S rRNA-PCR mit der AmpliTaq® DNA Polymerase LD (low DNA) von Lifescience

	Eingesetzte Menge	Endkonzentration
10x <i>Ampli Taq</i> Puffer I	5,00 µl	1x
dNTPs (10 mM)	1,00 µl	0,2 mM
27F (fwd) Primer (5 µM)	2,00 µl	0,2 µM
1492R (rev) Primer (5 µM)	2,00 µl	0,2 µM
<i>AmpliTaqa</i> ® DNA Polymerase LD (5U/µl)	0,25 µl	1,25 u
nDNA <i>Halomonas elongata</i> (100 ng/µl)	0,40 µl	40 ng
Rnase & Nuclease Free Water (Roboklon)	Bis auf 50 µl ergänzt	

Das PCR-Programm wurde für beide Polymerasen gleich gesetzt, das jeweils einen kleinen Temperaturgradient mit drei Stufen enthielt (Tab. 3-17).

Tab. 3-17: PCR-Programm zur 16S rRNA-PCR

Initiale Denaturierung	95° C	2 min	} 30x
Denaturierung	95° C	30 s	
Annealing	46-55° C	60 s	
Elongation	72° C	60 s	
Finale Elongation	72° C	7 min	
Pause	4° C		

3.5.2.4.2 KONTAMINATION DER mTDNA-PROBEN VON *T. BISSELLIELLA* MIT BAKTERIELLER DNA

Zur mtDNA-Extraktion wurde jeweils der vollständige Falter eingesetzt, so dass mögliche Darmbakterien und vor allem ihre DNA mitisoliert werden konnte. Da der BOX-PCR-Primer auf einer konservierten, repetitiven DNA-Sequenz bakterieller Genome basiert, könnte seine Spezifität gegenüber bakteriellen DNA-Abschnitten höher sein als mitochondrialen. Um ausschließen zu können, dass die aus den mtDNA-Extrakten erhaltenen BOX-PCR-Muster auf einer bakteriellen Kontamination basieren oder durch sie beeinflusst werden, wurde mithilfe des 16S rRNA-Primers überprüft, ob sich bakterielle DNA aus den mtDNA-Isolaten amplifizieren lässt. Bei einer Kontamination mit bakterieller DNA müsste sich auch bei nur einer geringen Menge, der Genabschnitt der 16S rRNA amplifizieren lassen und zu einer Bande bei ~1500 bp führen.

Die Reaktionsansätze umfassten jeweils ein Volumen von 50 µl und erfolgten nach den unter Abschnitt 3.5.2.4.1 dargestellten Schemen entsprechend der eingesetzten Polymerase (Tab. 3-15 und Tab. 3-16). Neben der nukleären DNA von *Halomonas elongata* kamen verschiedene mtDNA-Proben der Kleidermotte ebenfalls mit ~40 ng mtDNA zum Einsatz. Abgesehen von dem ersten Test zur 16S rRNA-PCR, der einen Temperaturgradienten von 45-55° C umfasste, liefen alle weiteren PCRs nach dem Programm in Tab. 3-17 ab. Die anfängliche Ausdehnung des Temperaturgradienten ermöglichte ein breiteres Spektrum möglicher Annealingtemperaturen zu testen und somit auch bei einer anteiligen Fehlpaarung des Primers dennoch mögliche bakterielle DNA nachweisen zu können. Die DNA von *H. elongata* diente als Positivkontrolle, alle Negativkontrollen erfolgten ohne DNA-Einsatz. Das Ergebnis der PCR wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

3.5.3 ELEKTROPHORESETECHNIKEN

In dieser Arbeit kamen zwei verschiedene Elektrophoresetechniken zur Anwendung. Neben der als Laborstandard geltende Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse der BOX-PCR-Muster auch die Kapillar-Gelelektrophorese unter Verwendung des Agilent Bioanalyzers Systems (2100) genutzt.

3.5.3.1 AGAROSE-GELELEKTROPHORESE

Der Nachweis und die Überprüfung auf Reinheit der mittels PCR amplifizierten DNA-Fragmente der Cytochromoxidase I und der mitochondrialen Kontrollregion erfolgte in einem 2 %igen Agarosegel (0,7 g Agarose auf 35 ml TBE Puffer). Es wurden 5 µl PCR-Produkt mit 1 µl Ladepuffer (6X Orange DNA Loading Dye), der zur Orientierung der Laufgeschwindigkeit die beiden Farbstoffe Orange G (Komigration bei ~50 bp) und Xylene Cyanol FF (Komigration bei ~4000 bp) enthielt, vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Bei einer Spannung von 100 V erfolgte die elektrophoretische Auftrennung in der MupidOne-Kammer über einen Zeitraum von 30 min. Die Trennung der PCR-Fragmente basiert dabei auf unterschiedlichen Geschwindigkeiten in der Bewegung der negativ geladenen und in ihrer Größe diversen DNA-Fragmente im Gleichstrom-Feld. Kleinere Fragmente wandern dabei schneller durch die Gelmatrix als größere. Im Anschluss an den elektrophoretischen Lauf wurden die Gele für 20 min in einer GelRED™ Färbelösung inkubiert (3.7.4).

Die 1,5 %igen Agarosegele (1,125 g Agarose auf 75 ml TBE Puffer) zum Nachweis der BOX-PCR-Produkte wurden einen Tag vor Gebrauch bereits gegossen und über Nacht bei 4° C gekühlt. Auch der TBE-Laufpuffer wurde über Nacht bei 4° C vorgekühlt, so dass die sich bei der Elektrophorese entwickelnde Wärme gepuffert wurde und die Banden trotz einer Laufzeit von 150 min bei 80 V eine klare Struktur aufwiesen. Zusätzlich erfolgte eine fortschreitende Kühlung der Gelelektrophorese-Kammer (Biozym) mit handelsüblichen Kühlakkus. Der Auftrag der PCR-Produkte umfasste ein Fünftel der Gesamtmenge (10 µl) und wurde zuvor mit 2 µl Ladepuffer (6X Orange DNA Loading Dye) vermengt. Die Spannung von 80 V wurde durch den Spannungsgeber PS 305 von Life Technologies kontinuierlich aufrecht erhalten und die Färbung der DNA erfolgte ebenfalls durch eine Inkubation für 20 min in der GelRED™ Lösung.

Bei GelRED™ handelt es sich um einen Fluoreszenzfarbstoff zur Anfärbung von Nukleinsäuren (dsDNA, ssDNA und RNA), der unter UV-Licht zur spontanen Emission von Licht angeregt wird. Auf diese Weise konnten die Gele mithilfe des Geldokumentationssystem Gel Doc™ von BioRad fotografiert und analysiert werden. Als DNA-Standard wurde die 100 bp-Leiter von Roboklon in einem Volumen von 5 µl eingesetzt. Anhand dieses Markers erstellt die Geldokumentationssoftware eine Kalibrierungskurve und bestimmt sowohl die Fragmentgröße als auch die Bandenintensität der einzelnen Fragmente.

3.5.3.2 KAPILLAR-GELELEKTROPHORESE

Bei dem Agilent 2100 Bioanalyser handelt es sich um eine trägergebundene Kapillarelektrophorese, die auf der Mikrofluidtechnik im Lab-on-chip Format (Woolley & Mathies, 1994) basiert und zur Trennung von DNA-Fragmenten als Alternative zur Agarose-Gelelektrophorese genutzt werden kann. Der Vorteil dieses Systems liegt in der geringen Probenmenge von nur einem Mikroliter, die zur elektrophoretischen Auftrennung benötigt wird, und der kurzen Laufzeit. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgt ebenfalls aufgrund der Siebwirkung der eingebrachten Gelmatrix in einem elektrischen Feld.

Agilent bietet zur PCR-Fragment-Analyse verschiedene DNA-Chips an, die sich in ihren Bereichen der Größenbestimmung von DNA-Fragmenten unterscheiden. In dieser Arbeit kam der Agilent DNA 12000 Chip zum Einsatz. Er ermöglicht die Größenbestimmung im Bereich von 100 bp bis zu 12000 bp. Die Hülle des Chips besteht aus einem Kunststoff, der eigentliche Chip selbst jedoch aus Glas. Er umfasst eine Reihe von vernetzten Reservoiren und feinen Mikrokapillaren, in die die Gelmatrix zu Beginn gefüllt wird (Abb. 3-7). Diese Gelmatrix besteht aus einem linearen Polymer und einem interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff. Mit jedem Chip können zwölf Proben aufgetrennt werden, deren DNA-Migration durch die Gelmatrix mithilfe einer Serie aus Elektroden kontrolliert wird. Die Zugabe einer von Agilent mitgelieferten Makermixtur aus einem unteren (bei ~50 bp) und einem oberen Marker (bei ~17000 bp), die die internen Standards darstellen, ermöglicht der Software anhand einer ebenfalls auf den Chip geladenen DNA-Leiter mit bekannten Fragmentgrößen und Konzentrationen die Erstellung einer Standardkurve zur Migrationszeit gegenüber der Fragmentgröße. Anhand dieser Standardkurve werden dann Fragmentgröße und Konzentration der unbekannt PCR-Banden berechnet (Agilent Technologies, Inc., 2003). Nach der Elektrophorese stellt die Software die Daten in verschiedener Form zur Verfügung. Zum einen können die einzelnen Messdaten (Fragmentgröße und Konzentration) tabellarisch betrachtet und auch extrahiert werden. Zum anderen erhält man zu jeder Probe ein Elektropherogramm oder gelähnliches Bild, das diesen Datensatz widerspiegelt.

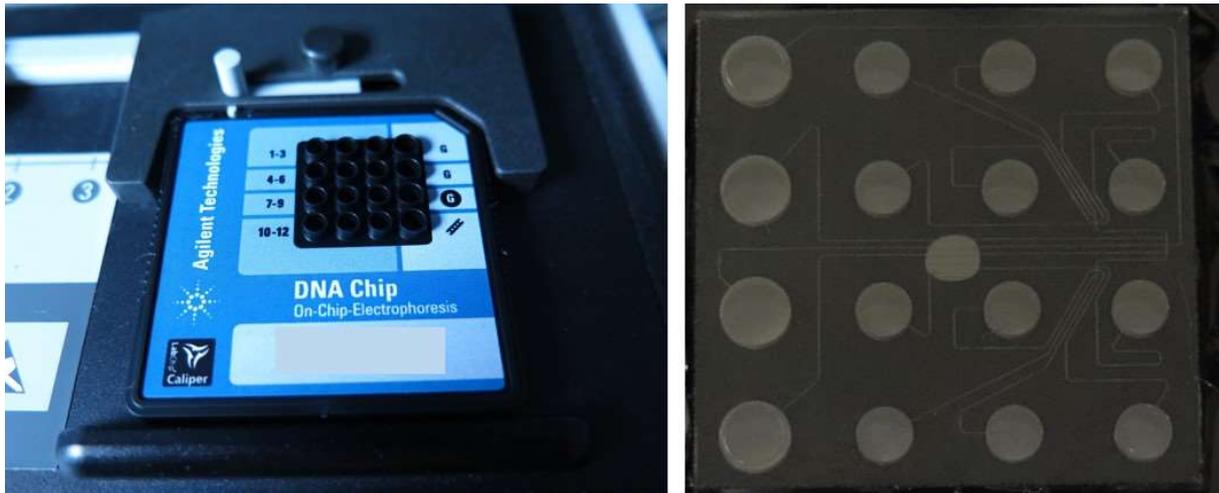


Abb. 3-7: Agilent DNA LabChip für die Bestimmung von Größe [bp] und Konzentration [ng/μl] von PCR-Fragmenten (DNA).

Links: DNA LabChip Gehäuse mit 16 Wells, 12 Proben-Wells (1-12), 3 Wells zur Beladung mit der Gelmatrix und 1 Well (mit dem Bild einer Leiter) zur Beladung mit der Agilent DNA-Leiter.

Rechts: Glaschip mit 16 Wells und den miteinander vernetzten feinen Kapillaren zur elektrophoretischen Auftrennung.

Die Beladung des Chips erfolgte entsprechend der Angaben des Herstellers (Agilent Technologies, Inc., 2013), jedoch wurden die BOX-PCR-Produkte mit dem zuvor in das jeweilige Well pipettierten Markermixtur durch dreifaches auf und ab pipettieren vermengt. Dies sollte zu einer besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse von Well zu Well und Chip zu Chip dienen (Panaro, et al., 2000).

3.5.4 DNA-AUFREINIGUNG

Die DNA-Aufreinigung stellte einen wesentlichen Schritt vor der Sequenzierung der PCR-Produkte aus der COI- und CR-PCR dar. In Anhängigkeit der Qualität der PCR-Produkte wurde entweder nur eine PCR-Produkt-Aufreinigung oder aber eine Agarose-Gelelektion durchgeführt. Beide Aufreinigungsmethoden basierten auf dem NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit von Marcherey-Nagel und folgten lediglich unterschiedlichen Protokollen des Herstellers.

Die Aufreinigung von PCR-Produkten diente der Entfernung von Rückständen aus der PCR, die die anschließende Sequenzierreaktion hätten beeinträchtigen können. Zu diesen Kontaminanten gehören einzelnen Nukleotide, Primer, Enzyme, Salze und Fluoreszenzfarbstoffe. Zur einfachen Aufreinigung wurde das gesamte Volumen des jeweiligen PCR-Produkts direkt in die Aufreinigungsreaktion gegeben und nach dem Protokoll des Herstellers fortgeführt. Zeigte das Kontrollgel zur PCR Verunreinigungen auf, so wurde das gesamte restliche PCR-Produkt über die Agarose-Gelelektrophorese bei einer Spannung von 50 V über einen Zeitraum von 120 min aufgetrennt und die interessierende Bande nach der Färbung des Gels mit GelRED™ Lösung über einem UV-Schirm ausgeschnitten. Das erhaltene Gelstück wurde im NTI-Puffer des Aufreinigungskits bei 50° C gelöst und das DNA-Fragment nach den Herstellerangaben gereinigt. Am Ende erfolgte die Elution bei

beiden Verfahren mit RNase und Nuklease freiem Wasser von Roboklon in drei Schritten mit einem Volumen von je 20 µl. Das Gesamtvolumen betrug am Ende etwa 60 µl.

3.5.5 ÜBERPRÜFUNG DER BOX-PCR-MUSTER AUF MITOCHONDRIALEN URSPRUNG

Eine PCR vermag bereits aus einem DNA-Molekül mehrere Amplifikate zu erzeugen, so dass jede im Reaktionsansatz enthaltene DNA bei Sequenzübereinstimmungen mit den Primern theoretisch amplifiziert werden könnte. Bei der Durchführung einer rep-PCR, in diesem Fall der BOX-PCR kann es neben der Amplifikation von Sequenzabschnitte der willentlich eingesetzten DNA (hier mtDNA) auch zu einer Vermehrung von Abschnitten einer unwissentlichen Fremd-DNA kommen. Die Überprüfung der mtDNA-Extrakte auf eine Kontamination mit bakterieller DNA wurde in Abschnitt 3.5.2.4.2 bereits beschrieben. Auch der Einfluss möglicher Verunreinigungen mit chromosomaler DNA wurden untersucht (3.5.2.3.4). Nun sollte abschließend der Nachweis erbracht werden, dass es sich bei den in der BOX-PCR erzeugten Banden um Sequenzabschnitte der mitochondrialen DNA handelt. Hierzu wurden einzelne Banden verschiedener BOX-PCR-Muster aus einem Agarosegel ausgeschnitten, eluiert, quantifiziert und in einen Vektor mittels TA-Klonierung inseriert. Es folgte die Transformation in den *E. coli* Stamm DH5α™ und eine Überprüfung positiver Transformanden mithilfe einer Colony-PCR. *E. coli* Kolonien, bei denen das Insert im Plasmid nachgewiesen wurde, konnten nach der Anzucht über Nacht zur Plasmidpräparation eingesetzt werden. Die erhaltenen Plasmidlösungen wurden dann mit dem NanoDrop® ND-2000c Spectrophometer quantifiziert und für die Sequenzierung auf eine Konzentration von ~100 ng/µl verdünnt.

3.5.5.1 TA-KLONIERUNG

Das Prinzip der TA-Klonierung basiert auf der Entdeckung eines unspezifischen Überhangs, der durch die *Taq*-Polymerase hervorgerufen wird (Clark, 1988). Die TOPO® TA Klonierung ermöglicht eine direkte Insertion von PCR-Produkten mit einem 3'-Adenin (A)-Überhang in den bereits linearisiert vorliegenden pCR™4-TOPO® Vektor aus dem Klonierungs-Kit. Hierzu besitzt der pCR™4-TOPO® Vektor am 3'-Ende einen Deoxythymidin (T)-Überhang, der mit dem A-Überhang des PCR-Produktes ligiert. An den beiden 3'-Enden des linearisierten Vektors ist das Enzym Topoisomerase I kovalent gebunden und verhindert seine Rezyklisierung. Bei Kontakt mit dem DNA-Fragment, dem Insert, wird das Enzym aktiviert und katalysiert die Bindungen zwischen dem Vektor und dem Insert. Der Einbau des DNA-Fragments verhindert die Expression des LacZ α ccdB Fusionsproteins und damit zum einen die Bildung des Toxins CcdB und des N-terminalen α -Fragments der β -Galactosidase. Das Toxin hat in den verwendeten Zellen des *E. coli* Stamms DH5α™ zur Transformation keine Wirkung, da sie eine Mutation im Gyrase-Gen (*gyrA96*) besitzen, das die Bindung des Toxins an die Gyrase und damit ihre Hemmung unterbindet. Somit ist dieser positive Selektionsmechanismus hier nicht möglich. Eine α -Komplementation durch die Expression des N-terminalen α -Fragments der β -Galactosidase ist jedoch beim verwendeten Bakterienstamm möglich, da er das C-terminale Fragment exprimiert. Unter Zugabe von X-Gal zum Medium ermöglicht dies eine Blau-Weiß-Selektion der Transformanden, von denen die weißen Kolonien das Insert enthalten, die blauen nicht. Da diese

Selektionsvariante bei einer Klonierung von PCR-Fragmenten mit einer Größe unterhalb von 1000 bp nicht sehr zuverlässig ist (Gabant, et al., 1997) erfolgte eine Kontrolle der als positiv identifizierten Kolonien über eine Colony-PCR. Die Zugabe des Antibiotikums Ampicillin zum Medium ermöglichte einen Ausschluss der Zellen ohne Plasmid und sorgte für den Erhalt des Plasmids in den transformierten Zellen.

Drei verschiedene Klonierungsreaktionen mit einem Volumen von je 6 µl wurden in PCR-Tubes angesetzt. Eine erhielt ein PCR-Fragment aus dem BOX-PCR-Muster einer Zuchtkleidermotte, ein anderes eins aus einem BOX-PCR-Muster von *E. kuehniella*. Der verbleibende Reaktionsansatz diente als Negativkontrolle und erhielt nur den Vektor, aber kein Insert (Tab. 3-18). Im Anschluss wurden die Klonierungsreaktionen für 5 min bei RT inkubiert und verblieben nach der Inkubationszeit bis zur Transformation auf Eis.

Tab. 3-18: Ansätze der Klonierungsreaktion (TOPO® TA Klonierung)

Negativkontrolle	Insert 1	Insert 2
	<i>T. bisselliella</i> ~350 bp Fragment 3 µl (~28 ng)	<i>E. kuehniella</i> ~600 bp Fragment 1,5 µl (~27 ng)
1 µl Salzlösung		
RNase und Nuklease freies Wasser (Roboklon) 4 µl	RNase und Nuklease freies Wasser (Roboklon) 1 µl	RNase und Nuklease freies Wasser (Roboklon) 2,5 µl
pCR™4-TOPO® Vektor je 1 µl (10 ng)		

3.5.5.2 TRANSFORMATION CHEMISCH KOMPETENTER ZELLEN

Für die Transformation eines Klonierungsansatzes kamen 50 µl chemisch kompetente Zellen des *E. coli* Stamms DH5α™ zum Einsatz, die vorab für etwa 10 min auf Eis aufgetaut und anschließend mit 1,5 µl eines Klonierungsansatzes vermischt wurden. Zusätzlich wurden 50 µl chemisch kompetente Zellen mit 2,5 µl pUC19 Control DNA (100 pg/µl) als Positivkontrolle vermischt sowie einmal völlig unberührt gelassen. Alle fünf Transformationsansätze (Tab. 3-19) verblieben für 30 min auf Eis, bevor sie im Wasserbad mit einer Temperatur von 42° C für 20 sek einem Hitzeschock ausgesetzt und nach einer Inkubation für 2 min auf Eis mit 950 µl vorgewärmten SOC-Flüssigmedium übergossen wurden. Die transformierten Bakterien wurden dann im Inkubator innova™ 4230 bei 37° C und 225 rpm für 60 min inkubiert. Abschließend wurde jeder Transformationsansatz auf zwei LB/Amp/X-Gal Platten mit dem Drigalskispatel ausplattiert. Eine Ausnahme bildete der Ansatz mit den Zellen, die keine Transformation erfahren haben, sie wurden auf LB-Platten ohne Ampicillin

ausgestrichen. Die beiden Ausplattierungen je Ansatz unterschieden sich im Volumen, das ausgestrichen wurde. Die erste Platte erhielt 100 µl des Transformationsansatzes. Der Rest des Ansatzes wurde dann zunächst bei maximalen rpm in der Zentrifuge 5415 R von Eppendorf für 1 min zentrifugiert, der Überstand abgegossen, das Zellpellet im verbleibenden Flüssigkeitsrest wieder gelöst und schließlich die Zellsuspension vollständig auf der zweiten Platte ausplattiert. Alle Platten wurden über Nacht bei 37° C inkubiert.

Tab. 3-19: Transformationsansätze zur Transformation der chemisch kompetenten *E. coli* DH5α™ Zellen

+0	+V	+1	+2	+CV
je 50 µl chemisch kompetente Zellen des <i>E. coli</i> Stamms DH5α™				
	Klonierungsansatz: Negativkontrolle	Klonierungsansatz: Insert 1	Klonierungsansatz: Insert 2	pUC19 Control DNA
Kontrolle auf intakte Zelle	Kontrolle auf Vektortransformation	Gewünschte Transformation 1	Gewünschte Transformation 2	Kontrolle auf Transformierbarkeit der Zellen

3.5.5.3 COLONY-PCR

Die Colony-PCR diente der Überprüfung der gepickten Kolonien, die aufgrund der Blau-Weiß-Selektion als positive Transformanden (Transformation des Vektors inklusive Insert) identifiziert wurden. Sie erfolgte mit den beiden Primern T3 und T7, die die Klonierungsschnittstelle des Vektors umspannen (Abb. 3-8) und eine Amplifikation eines vorhandenen Insert ermöglichen. Aufgrund der das Insert flankierenden Vektorsequenzen war bei der Colony-PCR mit Fragmentgrößen oberhalb der ursprünglich klonierten Bandengröße zu rechnen. Für das Insert 1 (350 bp Fragment, mtDNA von *T. bisselliella*) war mit einer Größe von ~460 bp und für das Insert 2 (600 bp Fragment, mtDNA von *E. kuehniella*) mit einer Größe von ~710 bp zu rechnen.

Die Reaktionsansätze (Tab. 3-20) wurden in einem Volumen von 50 µl mit dem dem *Taq* PCR Master Mix von Roboklon angefertigt und durchliefen das in Tab. 3-21 dargestellte PCR-Programm im Thermocycler epgradient S von Eppendorf. Der *Taq* PCR Master Mix stellte eine gebrauchsfertige Mischung aus *Taq*-DNA-Polymerase, optimiertem Reaktionspuffer, MgCl₂ und dNTPS dar. Für einen direkten Auftrag der PCR-Produkte auf ein Agarosegel erhielt jeder Ansatz 5 µl Color Load, ein Gemisch aus zwei Farbstoffen und einer Gel-Schwerelösung. Es wurden insgesamt sieben Kolonien der Transformation mit Insert 1 (350 bp Fragment, mtDNA von *T. bisselliella*) und drei Kolonien der Transformation mit Insert 2 (600 bp Fragment, mtDNA von *E. kuehniella*) gepickt und überprüft. Hierzu wurde die Kolonie mit einer sterilen 2,5 µl Pipettenspitze vorsichtig von der LB-Platte abgenommen, am Boden eines PCR-Tubes anteilig abgestrichen und die Pipettenspitze mit der restlichen Kolonie in einen 50 ml Kolben mit 10 ml flüssigem LB/Amp Medium überführt und über Nacht im Inkubator innova™ 4230 bei 37° C und 225 rpm inkubiert.

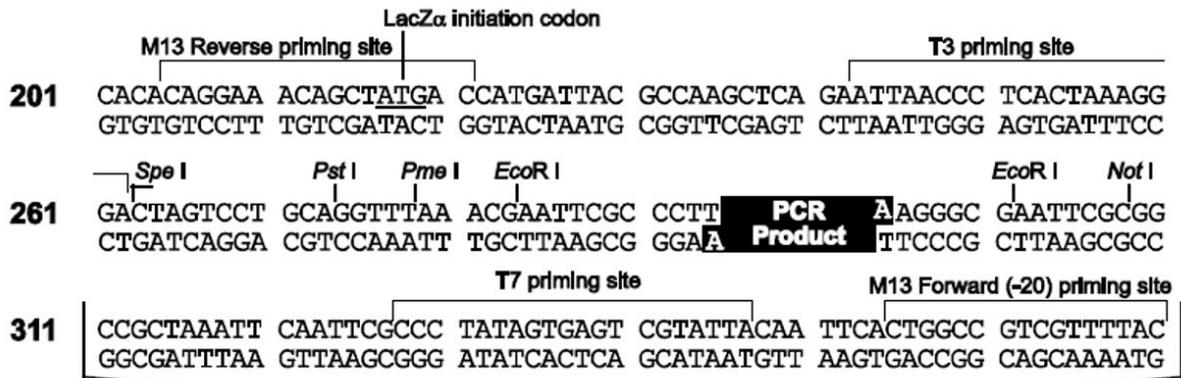


Abb. 3-8: pCR™4-TOPO® Vektor Karte mit dem Sequenzbereich um die TOPO® Klonierungsschnittstelle (Thermo Fischer Scientific Inc., 2014)

Angabe der Restriktionsschnittstellen für die Enzyme Spe I, Pst I, Pme I, EcoR I und Not I sowie der Primerbindungsstellen (T3, T7 und M13)

Tab. 3-20: Reaktionsansatz zur Colony-PCR mit dem Taq Master Mix von Roboklon

	Eingesetzte Menge	Endkonzentration
Taq PCR Master Mix (2x)	25,00 μ l	1x
T3 Primer (0,1 μ g/ μ l)	1,00 μ l	0,1 μ g
T7 Primer (0,1 μ g/ μ l)	1,00 μ l	0,1 μ g
Colour Load (10x)	5,0 μ l	1x
Rnase & Nuclease Free Water (Roboklon)	18,00 μ l	
Gepickte Kolonie	anteilig am Boden des Tubes abgestrichen	

Tab. 3-21: PCR-Programm zur Colony-PCR

Initiale Denaturierung	94° C	10 min	} 25x
Denaturierung	94° C	60 s	
Annealing	50° C	60 s	
Elongation	72° C	60 s	
Finale Elongation	72° C	10 min	
Pause	4° C		

3.5.5.4 PLASMID-PRÄPARATION

Die Plasmidpräparation wurde mithilfe des QIAprep® Spin Miniprep Kit von QUIAGEN® durchgeführt. Dieses System basiert auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen mit anschließender Bindung der Plasmid-DNA an eine Silikamembran unter hohen Salzkonzentrationen. RNA, zelluläre Proteine und Metabolite passieren die Membran und die DNA wird gereinigt. Hierzu wurde viermal nacheinander 1 ml der Übernachtskultur einer jeden gepickten Kolonie für 3 min bei Raumtemperatur und 8800 rpm (~6800x g) zentrifugiert, so dass am Ende ein Bakterienpellet aus insgesamt 4 ml Kultur vorlag. Dieses Zell-Pellet wurde in 250 µl Puffer P1 des Präparations-Kits resuspendiert und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 250 µl Lysispuffer (Puffer P2) und mehrmaligem Invertieren des Reaktionsgefäßes wurden 350 µl Puffer N3 zur Neutralisation ergänzt und der gesamte Ansatz für 10 min bei 13200 rpm (~17900x g) zentrifugiert. Auf diese Weise sammelten sich die Zellreste am Boden des Reaktionsgefäßes, während die DNA im Überstand blieb. Dieser Überstand wurde durch Dekantieren in ein QIAprep spin Säule überführt und die Plasmid-DNA durch eine einminütige Zentrifugation bei 13200 rpm an die Silikamembran der Säule gebunden. Der erste Waschschrift erfolgte mit 500 µl Waschlösung I (Puffer PB) und einer Zentrifugation für 1 min bei 13200 rpm. Dem schloss sich ein zweiter Waschschrift mit 750 µl Waschlösung II (Puffer PE) und ebenfalls einer einminütigen Zentrifugation bei 13200 rpm an. Zur Entfernung des restlichen Puffers wurde der letzte Zentrifugationsschritt wiederholt und abschließend die Plasmid-DNA in 50 µl RNase und Nuklease freiem Wasser von Roboklon eluiert. Nach der Quantifizierung der Plasmid-DNA-Lösungen wurden sie für die Sequenzierung entsprechend verdünnt und vorbereitet.

3.5.6 SEQUENZIERUNG

Zur Ermittlung der DNA-Sequenzen der COI- und CR-Amplifikate sowie der beiden Fragmente aus den BOX-PCR-Mustern wurden die PCR-Produkte bzw. Plasmide jeweils zur Sequenzierung an das Unternehmen LGC Genomics GmbH geschickt. Dort fand die Sequenzierung nach Kettenabbruch-Verfahren statt, das 1977 von Sanger et al. beschrieben wurde.

Die Auswahl der BOX-PCR-Produkte erfolgte anhand der Kontrollgele nach der PCR und der Quantifizierung. Lediglich Produkte mit einer ausreichenden Konzentration für zwei

Sequenzierreaktionen konnten zur Sequenzierung eingesetzt werden. Die PCR-Produkte wurden vor der Sequenzierung in der Regel auf eine Konzentration von 20-35 ng/µl eingestellt und mit dem jeweiligen Primer zur Sequenzierung versetzt. Jede Probe wurde sowohl vom 5'- als auch vom 3'-Ende her sequenziert, so dass jedes PCR-Produkt einmal mit dem Forward-Primer (COI-fwd_1 bzw. 12S-internal 18) und einmal mit dem Reverse-Primer der PCR (COI-rev_3 bzw. Met20-rev) versetzt wurde. Dabei kamen stets 10 µl PCR-Produkt und 4 µl Primer (5 pmol/µl) zum Einsatz.

3.6 BIOSTATISTIK

Die Methoden der Biostatistik, die in der Versuchsauswertung zur Datenanalyse eingesetzt wurden, lassen sich in die drei grundlegenden Teilbereiche der deskriptiven, induktiven und analytischen Statistik unterteilen.

3.6.1 DESKRIPTIVE STATISTIK

Die deskriptive Statistik ermöglichte unter Verwendung verschiedener Methoden die wichtigsten Eigenschaften der erhobenen Daten zu beschreiben, die anhand einer Stichprobe und somit einer Teilmenge einer Population erhoben wurden. Zu den typischen statistischen Kennwerten gehören die Lageparameter, die den Schwerpunkt oder die zentrale Tendenz angeben und die Streuungsparameter, die ein Maß für die Streuung der Messwerte um den jeweiligen Lageparameter sind.

3.6.1.1 LAGEPARAMETER

Der arithmetische Mittelwert (\bar{x}) berücksichtigt alle Informationen der Daten in seiner Berechnung. Er hat den höchsten Informationsgehalt, ist dafür aber auch Messfehlern und Ausreißern gegenüber sehr anfällig. Er errechnet sich aus dem Durchschnitt der erbrachten Messdaten nach folgender Formel:

$$\bar{X} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

\bar{x} : arithmetischer Mittelwert x_i : Messwerte ($i = 1, \dots, n$) n : Anzahl der Messwerte

Der Median ist dadurch charakterisiert, dass er in der Gesamtheit der Messwerte eines Parameters, die der Größe nach sortiert sind, die gleiche Menge an Daten oberhalb und unterhalb besitzt. Bei einer ungeraden Anzahl an Messwerten wird der Median aus dem Mittelwert der beiden mittleren Werte der geordneten Datenreihe gebildet. Er ist eher robust gegenüber Ausreißern innerhalb der Datenreihe, nutzt aber nicht alle Informationen der Daten aus.

Über die Betrachtung der Lage von Median und Mittelwert zueinander lässt sich die Verteilungsform der erhobenen Messdaten ausmachen. Ein symmetrisches Verteilungsmuster ist durch die identische Lage von Median und Mittelwert gekennzeichnet, während eine Verschiebung beider Lageparameter zueinander eine links- bzw. rechtssteilen Verteilung charakterisiert.

3.6.1.2 STREUUNGSPARAMETER

Die Variationsbreite ist ein Streuungsmaß, das in der Regel bei ordinalskalierten Daten angewandt wird. Hier sollte es jedoch zusammen mit dem Median und dem Interquartilabstand zur Veranschaulichung der Streuung der Fragmentgrößen im Bereich der BOX-PCR-Muster mit berücksichtigt werden. Durch den Abstand des kleinsten vom größten Messwert einer Messreihe ergibt sich die Variationsbreite ($V = V_{\max} - V_{\min}$), die stark von Extremwerten beeinflusst wird. Der Interquartilabstand I_{50} hingegen stellt ein robusteres Streuungsmaß dar und beschreibt die Dimension des Wertebereiches, in dem sich die mittleren 50 % der Messwerte befinden. Er wird aus der Differenz des oberen Quartils Q_3 (75 %-Perzentil) und dem unteren Quartil Q_1 (25 %-Perzentil) gebildet ($I_{50} = Q_3 - Q_1$). Das untere Quartil Q_1 ist als derjenige Wert definiert, unter dem sich genau 25 % der Messwerte befinden. Analog dazu bezeichnet man den Punkt als oberes Quartil Q_3 , an dem genau 75 % der Werte unterhalb und 25 % oberhalb liegen.

Bei metrischen Daten eignen sich besonders die Varianz und die Standardabweichung als Streuungsmaße. Die Varianz (s^2) ist ein Maß für die mittlere Abweichung aller Messwerte einer Verteilung vom arithmetischen Mittelwert. Sie berechnet sich nach der folgenden Formel:

$$s^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2$$

s^2 : Varianz \bar{x} : arithmetische Mittelwert

x_i : Messwerte ($i = 1, \dots, n$) n : Anzahl der Messwerte

Auch die Standardabweichung stellt einen Streuungsparameter dar und ergibt sich aus der Quadratwurzel der Varianz:

$$s = \sqrt{s^2}$$

s : Standardabweichung s^2 : Varianz

Ist die untersuchte Variable annähernd normalverteilt, so können der Mittelwert und die Standardabweichung direkt interpretiert werden. Mit der Bildung von Intervallen lassen sich Aussagen zur Wahrscheinlichkeit treffen, mit der ein aus der Population zufällig ausgewähltes Individuum einen Wert aus einem der gebildeten Intervalle widerspiegelt. Betrachtet man den Bereich der einfachen Standardabweichung um den Mittelwert herum, so befinden sich etwa 68 % der Messwerte in diesem Intervall. Dies bedeutet im Umkehrschluss, dass bei 68 % der Individuen der untersuchten Population der Wert des untersuchten Parameters in diesem Bereich erwartet werden kann. Analog hierzu lassen sich die Intervalle mit einer 95 %-igen oder sogar 99 %-igen Wahrscheinlichkeit mit den folgenden Grenzen darstellen:

$$[\bar{x} - 2s; \bar{x} + 2s] \quad 95 \% \text{ Wahrscheinlichkeit}$$

$$[\bar{x} - 3s; \bar{x} + 3s] \quad 99 \% \text{ Wahrscheinlichkeit}$$

Um unterschiedliche Stichproben miteinander vergleichen zu können bedient man sich dem Variationskoeffizienten (cv). Er beschreibt die relativierte Standardabweichung der Daten und ist nicht wie die Standardabweichung an eine Einheit oder Größenordnung gebunden. Die Berechnung erfolgt aus dem Quotienten der Standardabweichung (s) und dem arithmetischen Mittelwert (\bar{x}):

$$cv = \frac{s}{|\bar{x}|}$$

3.6.2 INDUKTIVE STATISTIK

Die induktive Statistik schließt von den Daten einer Stichprobe auf die Eigenschaften der Grundgesamtheit und bedient sich dabei der Wahrscheinlichkeitstheorie. Ihre Aufgabe besteht im Schätzen von Parameter, der Angabe von Konfidenzintervallen und dem Testen von Hypothesen.

Um die Unterschiede in erkennbaren Tendenzen in den Daten zu überprüfen wurde ein Signifikanztest durchgeführt. Neben der Entscheidung der Unabhängigkeit der Messungen war auch die Anzahl der Stichproben entscheidend für die Wahl der Testmethode. Da es sich in den betrachteten Situationen um unabhängige Stichproben handelte und stets nur zwei Stichproben miteinander verglichen werden sollten, fiel die Wahl auf den t-Test.

Unter dem Begriff des t-Tests lässt sich eine Gruppe von Hypothesentests zusammenfassen, die auf mathematischen Grundlagen eine Entscheidungsregel liefern, um einen Unterschied zwischen den Mittelwerten zweier Stichproben näher zu analysieren. Voraussetzungen für die Anwendung dieses Tests sind intervallskalierte Daten, womit er zu der Gruppe der parametrischen Verfahren zählt. Des Weiteren muss das untersuchte Merkmal in der Population normalverteilt sein und die Varianzhomogenität oder –heterogenität bekannt sein, um eine entsprechende Variation des t-Tests anzuwenden. Die Intervallskalierung der Daten wurde angenommen und die Normalverteilung aufgrund der kleinen Stichprobenanzahl lediglich deskriptiv in Bezug auf eine annähernd symmetrische Verteilung der Stichprobenwerte hin betrachtet. Bei kleinen Stichprobenzahlen besitzt der Test auf Normalverteilung nur eine geringe Power und der t-Test reagiert bei einer Verletzung der Normalverteilung eher robust. Die Varianzhomogenität wurde mit Hilfe des Brown & Forsythe Tests (F-Test) überprüft und die t-Test Variante entsprechend ausgewählt. Es kam die Zweistichproben–Variante sowohl für gleiche Varianzen als auch ungleiche Varianzen zur Anwendung.

Unter der Angabe des geforderten Signifikanzniveaus (α) wurde mit dem t-Test entschieden, ob ein gefundener Unterschied in den Mittelwerten rein zufällig entstanden ist, oder ob er statistisch signifikant ist und somit bedeutsame Unterschiede beider betrachteten Situationen oder Gruppen wiedergibt. Die Nullhypothese (H_0) ging von einer zufälligen Entstehung des Unterschieds aus und nahm an, dass kein echter Unterschied besteht und die Differenz der wahren Mittelwerte beider untersuchter Gruppen oder Situationen gleich Null ist. Der unter der Kenntnis der Streuung gebildete t-Wert aus den Mittelwertdifferenzen wurde mit dem kritischen t-Wert, der sich aus der Berücksichtigung

der Freiheitsgrade und des Signifikanzniveaus ergab, verglichen. War der empirisch ermittelte t-Wert größer als der kritische, so wurde die Nullhypothese abgelehnt und die Alternativhypothese, die genau die gegenteilige Aussage der Nullhypothese umfasste, angenommen. Der Unterschied in den betrachteten Gruppen bzw. Situationen wurde als signifikant bezeichnet.

Die Berechnungen der verschiedenen Tests erfolgten mithilfe des Datenanalyse Add-Ons in Excel.

3.6.3 ANALYTISCHE STATISTIK

Innerhalb der analytischen Statistik werden unter Verwendung von deskriptiven und induktiven Methoden Zusammenhänge und Unterschiede in den Daten betrachtet. Sie bewertet die Stärke und Sicherheit der Ergebnisse, sucht nach Regelmäßigkeiten und generiert so zum Teil neue Hypothesen, die durch induktive Testverfahren erst wieder bestätigt werden müssen.

3.6.3.1 SEQUENZANALYSE

Zur weiteren Bearbeitung der Sequenzdaten mussten die individuellen DNA-Sequenzen des jeweils betrachteten Abschnitts des mitochondrialen Genoms aligniert, entsprechend ihrer Sequenzähnlichkeiten zueinander angeordnet werden. Dies erfolgte mithilfe der Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software in der Version 6 (Kumar, et al., 2008; Tamura, et al., 2013) und der Alignment-Methode MUSCLE (MULTiple Sequence Comparison by Log- Expectation). MUSCLE stellt ein Plug-in von MEGA dar und ist im Grunde eine eigene Software für ein Alignment von multiplen Protein- und Nukleinsäuresequenzen. Der Algorithmus setzt sich aus drei Stufen zusammen, in denen ein zunächst eher ungenaues, aber schnelles Alignment („draft progressive“) zu einem binären Baum führt, der unter der Berechnung der Kimura Distanzen (Kimura, 1980) erneut geschätzt („improved progressive“) und im letzten Schritt („refinement“) in seinen Feinheiten überarbeitet wird (Edgar, 2004b; Edgar, 2004a). Alle Alignments wurden manuell überarbeitet, bevor sie für eine weitere phylogenetische Analyse eingesetzt wurden.

3.6.3.1.1 PHYLOGENETISCHE ANALYSE

Die phylogenetische Analyse wurde ebenfalls unter anderem mit der MEGA Software durchgeführt und teilweise durch eine phylogenetische Netzwerkerstellung in der SplitsTree Software (Huson & Bryant, 2006) ergänzt. Da aus molekularen Daten die Richtungen der Merkmalsaustausche nicht unmittelbar abzuleiten sind, wurden für die Distanzberechnungen der Kleidermottenpopulationen Methoden zur Erstellung von unbewurzelteten Stammbäumen bevorzugt. Die Darstellungsform als Phylogramm ermöglichte anhand der Astlängen das Maß der Veränderung abzulesen. Für die Betrachtung der molekularen Daten auf der Ebene der Spezies wurde eine Außengruppe in die Analyse integriert, ein Taxon, das stammesgeschichtlich weiter von den betrachteten Tineidae entfernt ist. Auf diese Weise konnten den Merkmalsaustauschen eine Richtung gegeben werden. Da die eigens erhobenen Sequenzdaten nur drei Arten der Tineidae umfassten, wurden zum Sequenzabschnitt der COI weitere Sequenzdaten aus der Datenbank des National Center for

Biotechnology Information (NCBI) herausgesucht, mit den eigenen alliniert und zur Stammbaumkonstruktion mit berücksichtigt (Tab. 3-22). Für die Kontrollregion waren keine Sequenzen innerhalb der Familie Tineidae zu finden, hier konnte die Erstellung der Stammbäume nur auf der Grundlage der eigenen Sequenzdaten erfolgen.

Tab. 3-22: COI-Sequenz-Quellen von NCBI

Art	Subfamilie	Familie	Akzessionsnummer
<i>Tinea translucens</i>	Tineinae	Tineidae	HQ948711.1
<i>Tinea columbariella</i>	Tineinae	Tineidae	HQ948716.1
<i>Tinea pellionella</i>	Tineinae	Tineidae	KP253577.1
<i>Niditinea fuscipunctella</i> (auch <i>Niditinea fuscula</i>)	Tineinae	Tineidae	HQ948721.1
<i>Tinea trinotella</i>	Tineinae	Tineidae	KM572921.1
<i>Tinea murariella</i>	Tineinae	Tineidae	KF396267.1
<i>Tineola biselliella</i>	Tineinae	Tineidae	KJ508045.1
<i>Monopis laevigella</i>	Tineinae	Tineidae	KM573519.1
<i>Nemapogon tylodes</i>	Nemapogoninae	Tineidae	KR455635.1
<i>Nemapogon granella</i>	Nemapogoninae	Tineidae	KF8089946

Als phylogenetische Methode kam das Maximum Likelihood Verfahren (Felsenstein, 1981) zur Anwendung, das zu den Zwei-Schritt-Verfahren zählt, da es zunächst mehrere vorläufige Bäume erstellt, miteinander vergleicht und schließlich den Baum mit der größten Wahrscheinlichkeit auswählt. Zu Beginn dieses Verfahrens werden zwei Annahmen gemacht. Zum einen geht man davon aus, dass die einzelnen Merkmale unabhängig voneinander evolvieren und zum anderen, dass die Evolution nach der Aufspaltung einer phylogenetischen Linie ebenfalls unabhängig voneinander erfolgt. Aufgrund der ersten Annahme ergibt sich die Gesamt-Likelihood aus dem Produkt der Wahrscheinlichkeiten eines jeden einzelnen Merkmals (Nukleotidstelle). Diese Wahrscheinlichkeit lässt sich wiederum als Summe der Wahrscheinlichkeiten eines jeden möglichen Merkmalszustandes beschreiben. Zur Schätzung der Wahrscheinlichkeit des Merkmalszustandes bedient man sich verschiedenen Substitutionsmodellen. Für die Berechnung der phylogenetischen Bäume auf der Grundlage der COI-Sequenzen kam das Kimura-2-Parameter Verfahren zur Anwendung, da bei dem COI-Abschnitt eine annähernd gleiche Basenhäufigkeit gegeben war. Bei der CR-Sequenz dominierten die Basen Adenin und Thymin, so dass das Tamura-Nei Modell genutzt wurde. Beiden Substitutionsmodellen gemeinsam war, dass sie die unterschiedlichen Wahrscheinlichkeiten für Transitionen und Transversionen berücksichtigten. Zusätzlich wurde in den Berechnungen noch die Ratenheterogenität zwischen den Alignmentpositionen unterschieden, da die Substitutionsrate nicht

an allen Stellen der betrachteten Sequenz gleich ist. Hierzu erfolgte unter der Annäherung an eine so genannte Gamma-Verteilung die Schätzung der Veränderung der einzelnen Positionen in der Sequenz zueinander. Die Kategorien wurden in ihrer Anzahl auf drei beschränkt. Während sich im Alignment der COI-Sequenzen keine Lücken ergaben, kam es im Alignment der CR-Sequenzen an vielen Stellen zur Bildung von Lücken. An dieser Stelle wurden sie aufgrund ihrer phylogenetischen Relevanz in der Stammbaumberechnung berücksichtigt.

Für die Erstellung eines phylogenetischen Netzwerkes wurde die Methode Neighbor-Net (Bryant & Moulton, 2004) angewandt, die auf dem Neighbor Joining Algorithmus basiert, der unter Abschnitt 3.6.3.2.2 im Zusammenhang der Analyse der BOX-PCR-Muster näher erklärt ist. Der Unterschied zwischen Neighbor-Net und Neighbor Joining liegt in der Ergebnisdarstellung der Clusteranalyse. Während Neighbor Joining eine Hierarchie aus den Daten der Clustermatrix erstellt, präsentiert Neighbor-Net ein phylogenetisches Netzwerk aus sich überlappenden Clustern.

Schlussendlich wurden die Knoten der gebildeten Stammbäume und Netzwerke mithilfe des Bootstrap-Verfahrens auf ihre statistische Verlässlichkeit hin überprüft. Es handelt sich dabei im Grunde um eine Variabilitätsmessung auf der Basis des Ziehens mit Zurücklegen, bei der entsprechend der Anzahl gewählter Wiederholungen Merkmalsmatrizen und die daraus resultierenden phylogenetischen Bäume gebildet werden. Der Bootstrap- oder auch Consensus-Baum stellt das Ergebnis dieser Wiederholungen dann in Form von Häufigkeiten an den Knoten dar.

3.6.3.2 BOX-PCR-ANALYSE

Die Analyse der BOX-PCR erfolgte in zwei Schritten, in denen zunächst die Wiederholbarkeit und die Variabilität innerhalb einer Population und am Ende erste Anwendungen getestet wurden. Schließlich sollte eine Einschätzung getroffen werden, ob sich die BOX-PCR auch bei Insekten als Differenzierungsmethode auf der Ebene der Spezies und Subspezies eignet. Hierzu wurden exemplarisch für die Ebene der Spezies drei Vertreter der Lepidopteren (*E. kuehniella*, *T. pellionella* und *T. bisselliella*) und vertretend für die Subspezies mehrere Freilandpopulationen der Kleidermotte betrachtet.

3.6.3.2.1 ANALYSE VON WIEDERHOLBARKEIT UND VARIABILITÄT MIT DEM AGILENT 2100 BIOANALYZERS

Bevor ein Vergleich unter den Arten und unter theoretischen Populationen der Kleidermotte erfolgte, wurde sowohl die Wiederholbarkeit der BOX-PCR als auch die Variabilität der Muster innerhalb einer Population untersucht.

3.6.3.2.1.1 VORBEREITUNG DER DATEN ZU DEN BOX-PCR-MUSTERN

Für die Betrachtung der Variabilität in der BOX-PCR-Reaktion, der wiederholten Messungen und innerhalb einer Population erfolgte die Gegenüberstellungen der einzelnen Daten zur Fragmentgröße und Konzentration der Banden der BOX-PCR-Muster in Excel. Hier wurden zunächst mögliche

übereinstimmende Bandengrößen einander manuell zugeordnet. Anschließend wurden die einzelnen ermittelten Konzentrationen der Fragmentgrößen mit der von Agilent vorgegebenen Detektionsgrenze des Bioanalyzers verglichen und alle Banden mit einer Konzentration unter 0,1 ng/µl entfernt, sofern sie nicht in einer der Proben mit einer höheren Konzentration ebenfalls vertreten waren. Um die Variabilität von BOX-PCR zu BOX-PCR und innerhalb wiederholter Messungen ein und derselben Probe analysieren zu können, wurden sowohl die statistischen Lageparameter (Mittelwert und Median) als auch die Streuungsparameter, oberes und unteres Quartil, die Standardabweichung, die Variationsbreite und der Variationskoeffizient, für jede gemessene Fragmentgröße berechnet.

3.6.3.2.1.2 DER SHANNON-WIENER-INDEX

Um eine Abschätzung zur Diversität sowohl innerhalb der Wiederholungen als auch innerhalb einer Population treffen zu können, wurde das Vorkommen von identifizierten BOX-PCR-Mustern in der Zuchtpopulation der Kleidermotte mithilfe des Shannon-Wiener-Index (H_s) untersucht. Dieser Index wird in der Regel zur Betrachtung der Biodiversität in ökologischen Gemeinschaften angewandt (Whittaker, 1972). In dieser Arbeit nutzte ich die dem Index zugrunde liegende Formel, um ein Maß der Variabilität und damit der Diversität der BOX-PCR-Muster innerhalb der betrachteten Wiederholungen bzw. Subspezies zu erhalten.

$$H_s = - \sum_{i=1}^s p_i \ln p_i \quad \text{mit } p_i = \frac{h_i}{n} \quad \text{und } n = \sum_{i=1}^s h_i$$

H_s : Shannon – Wiener – Index s : Anzahl der Kategorien (BOX – PCR – Muster)

h_i : Häufigkeit in der Kategorie i ($i = 1, \dots, s$)

Dieser Index, als Maßstab der Mannigfaltigkeit an Kategorien (BOX-PCR-Mustern), entspricht im Grunde dem Entropiemaß der Thermodynamik und gibt somit den Grad der Ungewissheit an. Umso größer H_s wird, desto unsicherer ist die Voraussage über die Kategorie (das BOX-PCR-Muster), zu der das Individuum einer Zufallsstichprobe aus der Grundpopulation gehört. Bei einer homogenen Population sind die Ungewissheit und der Shannon-Wiener-Index gleich Null ($H_s = 0$). Entgegengesetzt steigt der Index bei einer unendlich werdenden Anzahl an Kategorien ebenfalls an und erreicht sein Maximum bei gleicher Häufigkeit aller Kategorien ($H_s = H_{max}$). Mathematisch lässt sich dies mit der folgenden Formel berechnen:

$$H_{max} = -\ln(s)$$

H_{max} : Maximum des Shannon – Wiener – Index

s : Anzahl der Kategorien (BOX – PCR – Muster)

Das Verhältnis von H_s zu H_{max} wird als Evenness ϵ bezeichnet und kann Werte zwischen Null und Eins annehmen. Die Evenness quantifiziert die Gleichverteilung der Individuen auf die einzelnen Kategorien, hier die einzelnen BOX-PCR-Muster. Sie nimmt einen Wert nahe der Zahl Null an, wenn

die Individuen auf die Kategorien gleichermaßen verteilt sind. Sind die Anteile der Kategorien an der Grundgesamtheit gleich, ist die Evenness maximal und strebt den Wert Eins an. Somit stellt die Evenness eine sinnvolle Ergänzung des Shannon-Wiener-Index dar, der mit seinem Diversitätswert keine Aussage über das Beitragsmaß der beiden Faktoren Kategorienanzahl und Gleichverteilung der Individuen macht.

3.6.3.2.2 ANALYSE DER GENETISCHEN DISTANZEN ANHAND VON AGAROSEGELBILDERN DER BOX-PCR-MUSTER

Schließlich wurden einzelne BOX-PCR-Muster sowohl auf der Ebene der Spezies als auch Subspezies testweise zur phylogenetischen Differenzierung eingesetzt und hierzu mithilfe der Software PyElph analysiert. PyElph ermöglichte eine automatische Detektion der einzelnen Banden in jeder Gelspur, berechnete das molekulare Gewicht der Banden anhand des eingegebenen Markers und ordnete die Banden nach ihrer Migrationsdistanz einander zu (Pavel & Vasile, 2012). Da diese Detektion stets unvollständig war, wurde manuell sowohl die Anzahl der detektierten Banden als auch die Zuordnung einzelner Banden angepasst. Die so entstandene Clustermatrix bestand aus Spalten, die die Samples (Probe/Individuum) repräsentierten und Zeilen, die das Fragment zeigten. Jedes Cluster wurde dann in einen binären Code überführt, bei dem jede anwesende Bande die Zahl Eins und jede abwesende die Zahl Null erhielt. Unter Verwendung des Dice-Koeffizienten (Dice, 1945) berechnete die Software die Ähnlichkeiten und erstellte daraus eine Distanzmatrix, die am Ende zur Berechnung der phylogenetischen Bäume genutzt wurde. Als Clusteranalysen standen verschiedene Methoden zur Auswahl.

Für die Darstellung der betrachteten Distanzen der BOX-PCR-Muster eignete sich die Neighbor Joining Methode. Dabei handelt es sich um eine Ein-Schritt-Methode der Distanzverfahren, die einen phylogenetischen Baum konstruiert, indem sie nach Paaren von operativen taxonomischen Einheiten (OTUs = neighbors) sucht. Dabei minimiert sie die Astlänge bei jedem Clusterschritt. Beim Neighbor Joining entsteht ein additiver Baum, so dass die Distanzen der PCR-Mustern an der Spitze des Baums gleich der Summe der Astlängen sind, die sie verbindet. Darüber hinaus produziert diese Methode einen ungewurzelten Baum und stellt eine sowohl schnelle als auch zuverlässige Methode dar.

3.7 MATERIAL

3.7.1 ARBEITSGERÄTE

Arbeitsgeräte in der Insektenzucht:

Binokular (391366)

Carls Zeiss Jena

Erlenmeyerkolben (Glas, 2000 ml)

Federstahlpinzette

Feinpinzette

Gefriertruhe, GTS 2623	Liebherr
Haushaltsschere	
Heißklebepistole	
Kunststoffwanne	
Messbecher (Kunststoff, 2000 ml)	
Petrischale (Glas, Ø 14 cm)	
Pinsel verschiedener Stärken (Borsten- und Feinhaarpinsel)	
RU MED Klima-Prüfschrank Typ 4201	Rubarth Apparate GmbH
Spachtel	
Teppichmesser	
Trockenschrank UT6 200	Heraeus
Trockenschrank UFE 600	Memmert
Vakuumpumpe LABOPORT®	KnF
Waage PM 4000	Mettler

Arbeitsgeräte in der Molekularbiologie:

Agilent 2100 Bioanalytiker inkl. Priming Station und IKA Vortex Mixer	Agilent Technologies
Drigalskispatel aus Glas, 200 x 45 mm, 4 mm ø	NeoLab Migge Laborbedarf- Vertriebs GmbH
Elektronische Feinwaage Extend	Sartorius
FastGene Mini Centrifuge	Nippon Genetics
Gel Doc™ System	BioRad
Gelelektrophorese-Kammer EasyPhor inkl. Schlitten und Kämme	Biozym®
Heizplatte (inkl. Magnetrührer) COMBIMAG RET	IKA Labortechnik
Herdplatte Topline	Rommelsbacher
Impfbank MICROFLOW	Nalge-NUNK
Inkubator innova™ 4230 (Refrigerated Incubator Shaker)	New Brunswick Scientific
Kühlakku (handelsüblich)	
Kühl-Gefrier-Kombination 250 Liter	Privileg
Lab Dancer	VWR
Mikropipetten für 1,5 bis 2,0 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
Mupid-One Komplett Gelelektrophorese System	Biozym®
NanoDrop® ND-2000c Spectrophotometer	Thermo Scientific
neoLab Finnpipette F2 (0,2 – 2 µl)	Thermo Scientific
neoLab Finnpipette F2 (1 – 10 µl)	Thermo Scientific
neoLab Finnpipette F2 (10 – 100 µl)	Thermo Scientific
neoLab Finnpipette F2 (100 – 1000 µl)	Thermo Scientific
PCR-Werkbank DNA/RNA UV-Cleaner UVC/T-AR	bioSan
pH-Meter (ph 720) inoLab	WTW
Rührfische	NeoLab Migge Laborbedarf- Vertriebs GmbH

Schnellkochtopf (100 l)	Fissler
Spannungsgeber PS 305	Life Technologies
SpeedVac Savant DNA 120	Thermo electron corporation
T3 Thermocycler	Biometra®
Thermocycler eppgradient S	Eppendorf
Thermocycler proS vapo. Protect	Eppendorf
Thermoblock ThermoStat plus	Eppendorf
Wasserbad eco line 011	LAUDA
Zentrifuge 5415 R	Eppendorf

3.7.2 VERBRAUCHSMATERIAL

Materialien für die Insektenzuchten:

Blumentopf-Untersetzer (PP, Ø 180 mm, 140 mm)	
Echter Filzstoff	
Gänsefedern	Dithmarscher Geflügel Am Fuchsbau 24, 14554 Seddiner See
Gaze mit einer Maschenbreite von 0,32 mm (Meterware)	Willy Kaldenbach KG, Berlin
Haushaltsboxen 7100 aus Polypropylen (192 x 192 x 55 cm) mit Deckel	Fuerstgroup
Hefeextrakt fermipan red	CasteggioLieviti srl, Italy
Heißkleber (handelsüblich)	
Merino Wollstoff (100 %), biozidfrei, naturweiß	Aßmus Naturtextilien OHG, Ingersheim
Parafinöl, flüssig	NeoLab Migge Laborbedarf- Vertriebs GmbH
Zuchtgefäße mit Schraubdeckel (PET-Weithalsflaschen, klar, 2000ml)	NeoLab Migge Laborbedarf- Vertriebs GmbH

Materialien für den Freilandfang von *T. bisselliella*:

Klebefalle	Bip Biologische Beratung bei Insektenproblemen Ltd.
Pheromonköder (BULLET LURE®)	Insects Limited Inc. USA
Rollrandgläser mit Schnappdeckel (40 x 19 mm Ø)	NeoLab Migge Laborbedarf- Vertriebs GmbH
Trichterfalle	Hausbestand
Joghurtbecher (leer, gewaschen) mit Deckel (1000 g)	
Nistkasten aus Holz	BAM

Materialien für molekularbiologische Arbeiten:

Einmalhandschuhe Peha-soft powderfree	Hartmann
PCR SingleCap 8er-SoftStrips 0.2 ml, farblos, optical clear, Flat Cap, High Profil, Cutable	Biozym®
Nitril-Einmalhandschuhe Touch N Tuff 92-600	Ansell
Petrischalen aus Kunststoff (without vents, light version)	Greiner bio-one
Pipettenspitzen Safe seal surphob	Biozym
Reaktionsgefäße 1,5 ml, low binding DNA	Eppendorf
Schott Flaschen (Glas)	Duran

3.7.3 CHEMIKALIEN, ENZYME UND KITS**Chemikalien:**

6X Orange DNA Loading Dye	Thermo Scientific
Agar-Agar Kobe I pulv. Für die Mikrobiologie	Carl Roth GmbH & Co. KG
Agarose NEEQ Ultra Qualität	Carl Roth GmbH & Co. KG
Amoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	MERCK
Ampicillin Natriumsalz für die Molekularbiologie (> 97 %)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Borsäure (H ₃ BO ₃)	MERCK
BSA, 20 mg/ml	Thermo Scientific
Color Load (10x)	Roboklon
DEPC (C ₆ H ₁₀ O ₅) ≥97 %, für die Biochemie und Molekularbiologie	Carl Roth GmbH & Co. KG
DMSO (C ₂ H ₆ OS)	Serva
dNTP Mix, 10 mM each	Thermo Scientific
EDTA (C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈)	Carl Roth GmbH & Co. KG
EDTA III (C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ 2H ₂ O)	Carl Roth GmbH & Co. KG
Essigsäure (C ₂ H ₄ O ₂), Rotipuran 100 %	Carl Roth GmbH & Co. KG
Ethanol, absolute for analysis (C ₂ H ₅ OH)	MERCK
GeIRED™	Gene One
GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder	Fermentas
Hefeextrakt Fluka Analytical	Sigma-Aldrich
Kaliumacetat für die Molekularbiologie (CH ₃ CO ₂ K)	AppliChem
Kaliumchlorid (KCl)	MERCK
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	MERCK
Magnesiumsulfat (MgSO ₄)	MERCK
Natriumchlorid (NaCl)	MERCK
Natriumhydroxid (NaOH)	MERCK
Perfect 100 bp DNA Leiter	Roboklon
Rnase & Nuclease Free Water	Roboklon
Roti®-Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Carl Roth GmbH & Co. KG

2,5 M Kaliumacetat (pH 5,0)	24,54 g CH ₃ CO ₂ K auf 100 ml H ₂ O denim pH-Wert-Einstellung mit C ₂ H ₄ O ₂
95 % Ethanol-Lösung	95 ml EtOH (99,9 %) auf 100 ml H ₂ O denim
70 % Ethanol-Lösung	70 ml EtOH (99,9 %) auf 100 ml H ₂ O denim

Puffer für die BOX-PCR:

Gitschierpuffer

1 M (NH ₄) ₂ SO ₄	16,6 ml
1 M Tris/HCl (pH 8,8)	67,0 ml
1 M MgCl ₂	6,7 ml
5 mM Na-EDTA (pH 8,8)	1,3 ml
H ₂ O denim	108,4 ml
	200,0 ml

Die Lagerung des Gitschierpuffers erfolgte in Form von 1,5 ml Aliquots bei -20° C für den anstehenden Laborgebrauch oder -70° C für die Langzeitlagerung.

Puffer und Lösungen für die Gelelektrophorese:

TBE-Puffer (10x), pH 8,2-8,3

Tris	109,030 g/l
Borsäure	55,620 g/l
EDTA III	9,306 g/l

Die Chemikalien wurden in der aufgelisteten Reihenfolge nacheinander in einem Startvolumen von 600 ml H₂O denim gelöst und die entstandene Lösung mit 1M HCl oder 1M NaOH auf einen pH-Wert von 8,2 bis 8,3 eingestellt. Am Ende füllte man mit H₂O denim auf das Endvolumen von 1000 ml auf.

GelRED™ Färbelösung für Agarosegele

GelRED™	0,15 ml
Aqua dem.	500,00 ml
NaCl	2,92 g

Bei Lagerung in einer dunklen Plastikflasche konnte die Färbelösung für fünfzehn bis zwanzig Färbvorgänge mit einer Länge von etwa 20 min genutzt werden.

3.7.5 STERILISIERUNG VON PUFFERN, MEDIEN UND GEBRAUCHSMATERIAL

Vereinzelte Puffer und das Gebrauchsmaterial für der Molekularbiologie wurden für 20 min in einem Dampfkochtopf sterilisiert.

3.7.6 OLIGONUKLEOTIDE UND VEKTOREN

Alle Oligonukleotide mit Ausnahme von „T3“ und „T7“ wurden durch die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg) synthetisiert. Die beiden Primer „T3“ und „T7“ sowie der Klonierungsvektor pCR™4-TOPO® entstammen dem TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing von Lifescience. Der Vektor pUC19 stellte lediglich eine Kontrolle für die Transformation der *E. coli* DH5α™ kompetenten Zellen dar und wurde mit diesen mitgeliefert.

Tab. 3-23: PCR- und Sequenzierprimer

Name	fwd/ rev	Bindungsstelle	Länge	5' → 3'-Sequenz	GC-Gehalt (%)	Tm (° C)
12S-internal 18	fwd	mt: 12S rRNA	18 nt	ccgcaactgctggcacia	61,1	58,2
Met20-rev	rev	mt: tRNA(Met)	20 nt	tggggatgaacccaaaagc	50,0	57,3
COI-fwd_1	fwd	mt: COI	25 nt	ctaccaatcataaagatattggaac	32,0	49,0
COI-rev_3	rev	mt: COI	21 nt	gtatactgtcatcctgttcc	42,9	50,0
27F	fwd	16S rRNA (Bac)	20 nt	agagttgatcctggctcag		
1492R	rev	16S rRNA (Bac)	19 nt	ggttacctgttacgactt		
BOX A1R			22 nt	ctacggcaaggcgacgctgacg	68,2	67,7
T3	fwd		20 nt	attaaccctcactaaaggga		
T7	rev		20 nt	taatacgactcactataggg		

Tab. 3-24: Vektoren

Vektor	Antibiotikaresistenz	Positivkontrolle	Firma/Kit
pCR™4-TOPO®	Kanamycin, Ampicillin	Blau-Weiß-Selektion	Lifescience Invitrogen™ /TOPO® TA Cloning® Kit
pUC19	Ampicillin	(nicht relevant)	Lifescience Invitrogen™

Tab. 3-25: Verwendete Software, Programme und Webtools

Name	Anwendung	Version	Hersteller/Copyright
Amplifx	Test und Design von Primern	1.7 (16.10.2012) http://amplifx.software.informer.com/1.7/	Slimware Utilities
BLASTN	Sequenz-Datenbanksuche	BLASTN 2.3.1 http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	(Altschul, et al., 1997)
Luftlinie.org	Entfernungsberechnung geographischer Orte	https://www.luftlinie.org/	Stephan Georg c/o Luftlinie.org Wrangelstr. 5 10997 Berlin
MEGA	Sequenzalignement und Berechnung phylogenetischer Distanzen	Version 6 und Version 7 http://www.megasoftware.net/	(Tamura, et al., 2013) (Kumar, et al., 2016)
Primer3Plus	Test und Design von Primers	http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi	Copyright © 2006, 2007 by Andreas Untergasser and Harm Nijveen
PyElph	Analyse von Gelbildern und Erstellen phylogenetischer Bäume	PyElph 1.4 (16.04.2013) https://sourceforge.net/projects/pyelph/	Ana Brândușa Pavel und Cristian Ioan Vasile
SplitsTree	Erstellung von phylogenetischen Netzwerken auf der Basis von Sequenzalignments und Distanzmatrizen	SplitsTree4 V4.13.1 http://www.splitstree.org	D. H. Huson und D. Bryant

3.7.8 BAKTERIENSTAMM

Die Zellen des *E. coli* Stammes DH5 α TM wurden als chemisch kompetente Zellen von der Firma Lifescience InvitrogenTM bezogen. Sie zeichnen sich durch eine Transformationseffizienz von $>1 \times 10^6$ cfu/ μ g Plasmid-DNA (pUC19) aus und werden für routinemäßige Klonierungsverfahren angeboten. Das als Subcloning EfficiencyTM DH5 α TM Competent Cells geführte Produkt wurde zusammen mit einem separaten Kontrollvektor (pUC19) geliefert. Die Zellen weisen den Genotyp F⁻ Φ 80/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17*(*r_K⁻, m_K⁺*) *phoA supE44thi-1 gyrA96 relA1 λ* auf und besitzen somit den für das hier angestrebte Klonierungsverfahren wichtigen genetischen Marker *lacZ* Δ M15 (Invitrogen, 2004-2006). Das LacZ-Gen kodiert für die β -Galactosidase, eine Glycosidase, die den gelben Farbstoff X-Gal in den blauen Farbstoff 5,5'-Dibromo-4,4'-Dichloro-Indigo und Galactose spaltet. Der hier verwendete Bakterienstamm weist jedoch eine Mutation (Deletion) in diesem Gen auf (*lacZ* Δ M15, α -Deletion), so dass die Expression einer funktionsfähigen β -Galactosidase unterdrückt wird. Im Zuge der Transformation kann diese Deletion durch das α -Peptid der Galactosidase, das von einem Sequenzabschnitt (*lacZ'*) auf dem transformierten Plasmid codiert wird, ersetzt werden. Man spricht dann von der α -Komplementation (Ullmann, et al., 1967). Positive Transformanden können somit aufgrund ihrer blau verfärbten Kolonie eindeutig identifiziert werden, ebenfalls bekannt als die so genannte Blau-Weiß-Selektion.

3.7.9 KULTURMEDIEN

Für die Anzucht der transformierten *E. coli* DH5 α -Zellen kamen zwei verschiedene Kulturmedien zum Einsatz. Direkt nach der Transformation wurden die Zellen bei 37° C in dem SOC-Flüssigmedium inkubiert. Es besteht aus dem SOB (Super Optimal Broth)-Medium, dem 20 mM Glucose zugesetzt wurden. Die Ausplattierung erfolgte auf LB (Luria Broth)-Agar-Platten.

SOB-Medium, pH 6,7-7,0

Hefeextrakt	5 g/l
Trypton	20 g/l
NaCl	10 mM
KCl	2,5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM

Die Chemikalien wurden in der aufgelisteten Reihenfolge nacheinander in einem Startvolumen von 600 ml H₂O denim gelöst und die entstandene Lösung mit 1M HCl oder 1M NaOH auf einen pH-Wert von 6,7 bis 7,0 eingestellt. Am Ende füllte man mit H₂O denim auf das Endvolumen von 1000 ml auf und autoklavierte das Flüssigmedium bei 121° C.

LB-Medium

Hefeextrakt	5 g/l
Trypton	10 g/l
NaCl	10 g/l
Agar	15 g/l

Zunächst wurden die ersten drei genannten Bestandteile des LB-Mediums in einem Volumen von 100 ml H₂O denim gelöst und mit NaOH auf pH 7,0 eingestellt. Im Anschluss wurden 3 g Agar hinzugefügt und das Gesamtvolumen auf 200 ml aufgefüllt. Das fertige Medium musste nun autoklaviert werden und konnte bis zum Gießen der Platten bei 60° C gelagert werden.

Fünf Petrischalen wurden unter dem Abzug mit etwa 20 ml des ungeimpften LB-Medium befüllt, für die vierzehn weiteren Platten wurde das LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) angeimpft.

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich entsprechend des eingangs dargelegten Ziels der Charakterisierung der Kleidermotte *Tineola bisselliella* als Referenzorganismus in die beiden Abschnitte Ökospezies und Genospezies unterteilen. Im ersten Abschnitt zur Charakterisierung der Kleidermotte als Ökospezies werden die Ergebnisse zu den Untersuchungen zum Falterschlupf von *T. bisselliella* unter verschiedenen Konkurrenzsituationen und klimatischen Bedingungen vorgestellt. Darüber hinaus werden die Freilandfänge in Anhängigkeit der einzelnen Standorte betrachtet. Der zweite Abschnitt enthält die Ergebnisse zur Charakterisierung der Kleidermotte als Genospezies und umfasst sowohl die Sequenzanalysen der mitochondrialen Kontrollregion und einem Genabschnitt der Cytochromoxidase I als auch die Analysen zur BOX-PCR.

4.1 CHARAKTERISIERUNG DER KLEIDERMOTTE *TINEOLA BISSELLIELLA* ALS ÖKOSPEZIES

4.1.1 UNTERSUCHUNGEN ZUM FALTERSCHLUPF VON *TINEOLA BISSELLIELLA* BEI UNTERSCHIEDLICHER ANZAHL EINGESETZTER EIER

Um die Anzahl an einzusetzenden Eiern für die weiteren Versuche nicht zu gering zu wählen, wurde zu Beginn der Versuchsreihe zur Konkurrenzfähigkeit der Kleidermotte das Schlupfverhalten in Anhängigkeit der Anzahl und Verteilung der Eier auf dem Nährsubstrat untersucht (Abb. 4-1).

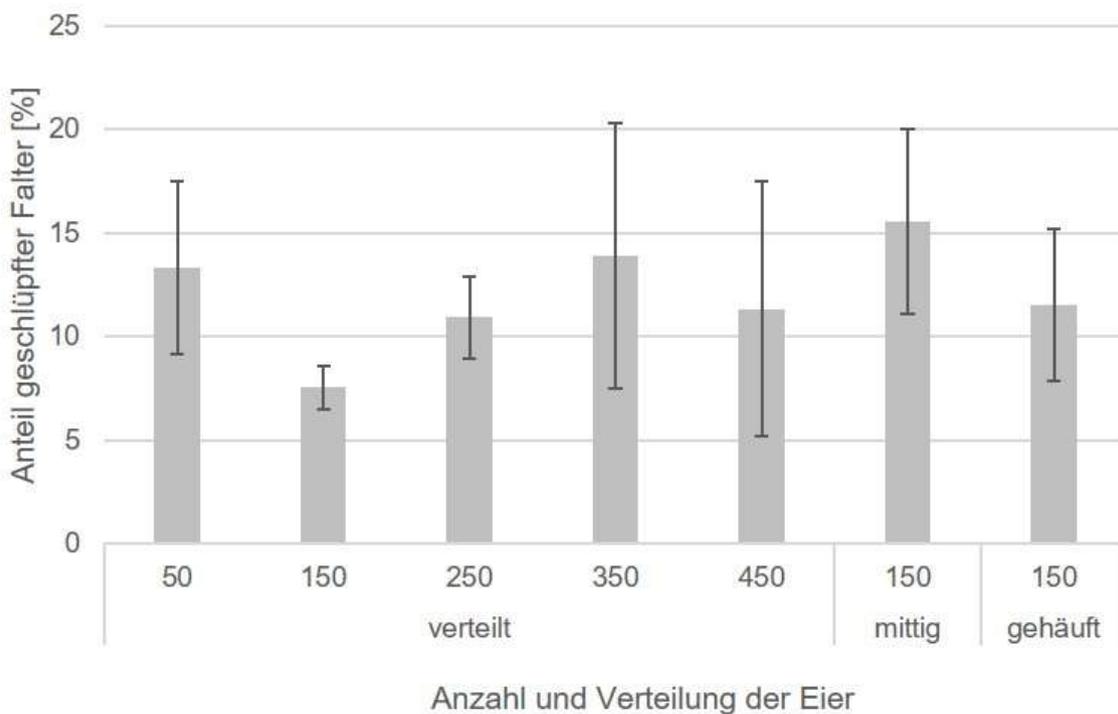


Abb. 4-1: Durchschnittlicher prozentualer Anteil geschlüpfter Falter der Kleidermotte *Tineola bisselliella* (Filialgeneration 1) in Abhängigkeit unterschiedlicher Anzahlen und Verteilungen der Eier auf dem Nährsubstrat. Der Beobachtungszeitraum betrug elf Wochen. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken angegeben.

Die Abb. 4-1 zeigt den stärksten Falterschlupf mit knapp über 15 % bei einem Einsatz von 150 Eiern, die in der Mitte des Nährsubstrats platziert wurden. Aber auch eine Anzahl von 50 oder 350 Eiern weist bereits einen Falterschlupf von etwa 13 % bzw. 14 % auf. Am niedrigsten tritt der Falterschlupf bei einer Anzahl von 150 Eiern auf, wenn sie über das gesamte Substrat verteilt sind. Insgesamt weisen die Daten mit Ausnahme des niedrigsten Falterschlupfes eine hohe Standardabweichung auf. Die einzelnen erkennbaren Unterschiede sind bis auf eine Ausnahme auch nicht signifikant. Eine signifikante ($\alpha=0,5$) Differenz lässt sich zwischen dem Ansatz mit 150 auf dem Substrat verteilten Eiern und mittig gesammelten Eiern feststellen.

4.1.2 VERSUCHE ZUR ÖKOLOGISCHEN POTENZ UND KONKURRENZSTÄRKE

Die im folgenden dargestellten Ergebnisse präsentieren den Schlupf der beiden Arten *T. bisselliella* und *A. flavipes*, zwei Vertreter aus der Nahrungsgilde der Keratin verdauenden Insekten.

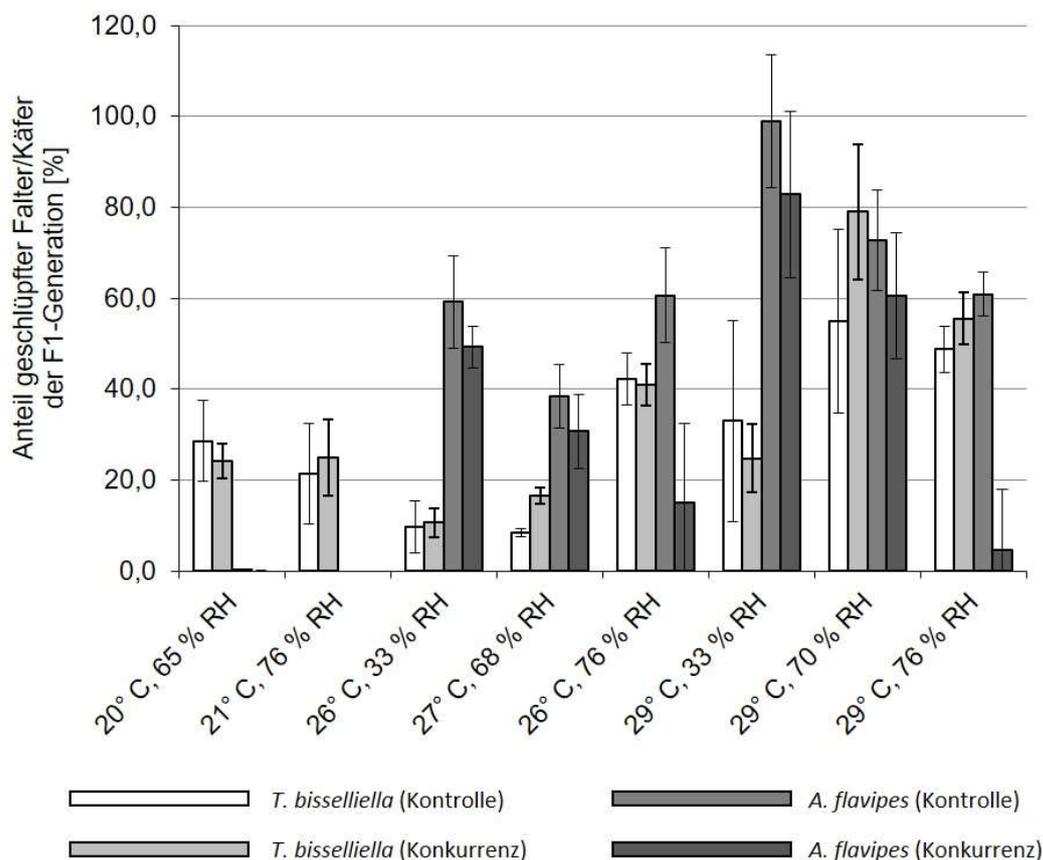


Abb. 4-2: Durchschnittlicher prozentualer Anteil des Falter- und Käferschlupfes innerhalb der Filialgeneration 1 (F1) der beiden Nahrungskonkurrenten *Tineola bisselliella* und *Anthrenus flavipes*.

Beobachtung von Kontrollansätzen mit je einer Art und Konkurrenzansätzen mit beiden Arten bei sechs klimatisch verschiedenen Situationen über einen maximalen Zeitraum von 20 Wochen bei einem Einsatz von 300 Eiern je Art. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

Es wird zum einen der Anteil der geschlüpften Adulttiere in der Filialgeneration (Abb. 4-2) als auch die Anzahl geschlüpfter Falter bzw. Käfer über die gesamte Beobachtungszeit abgebildet (ab Abb. 4-3). Da es bei den Versuchsansätzen unter der klimatischen Situation von 21° C und 33 % RH zu Schwankungen im Klima kam, können diese Ergebnisse nicht als repräsentativ betrachtet werden und sind zumindest in der Abb. 4-2 komplett ausgelassen.

Betrachtet man den Falterschlupf der Kleidermotte zunächst nur innerhalb der Kontrollen der Abb. 4-2, so stellt man die geringsten prozentualen Anteile bei den beiden Wertepaaren 26° C/33 % RH und 27° C/68 % fest. Hier liegt der Anteil geschlüpfter Falter innerhalb der F1-Generation bei knapp unter 10 % mit Ausnahme der Konkurrenzsituation bei 68 % RH. Befindet sich die Temperatur nahezu bei 20/21° C und die relative Raumfeuchte bei 65 % oder auch 76 %, dann ist der Anteil der geschlüpften Falter auf nahezu 30 % bzw. 20 % gestiegen. Den stärksten Falterschlupf weisen die beiden klimatischen Situationen mit der höchsten Temperatur (29° C) und den höchsten relativen Raumfeuchten von 70 % und 76 % auf. Bei einer Temperatur von 29° C und einer relativen Raumfeuchte von 70 % erreicht die Kleidermotte einen Falterschlupf von fast 80 %. Verfolgt man das quantitative Schlupfverhalten von *T. bisselliella* unter allen drei Temperaturen parallel, so zeigt sich, dass die relative Luftfeuchtigkeit nur bei 20/21° C und 26/27° C einen signifikanten Einfluss zeigt. Bei einer Temperatur von 29° C spielt die relative Raumfeuchte keine Rolle mehr, die einzelnen Schlupfverhalten unterscheiden sich nicht signifikant. Eine analoge Beobachtung lässt sich für die relative Luftfeuchtigkeit machen. Bei 33 % RH ist die Erhöhung der Temperatur nicht signifikant relevant. Liegt eine relative Luftfeuchtigkeit von 65/68 % vor, so zeigt jede Temperaturveränderung einen Einfluss auf das Schlupfverhalten. Bei 76 % RH hat zeigt nur die niedrige Temperatur für ein signifikant abweichendes Ergebnis im Vergleich zu den anderen Temperaturen.

Der Schlupf des Polsterwarenkäfers bleibt mit einer Ausnahme bei 33 % RH. bei einer Temperatur von 20-21° C aus, erreicht aber seinen Maximalwert bei 29° C und 33 % RH. Steigt die relative Raumfeuchte bei gleichbleibender Temperatur von 29° C auf 70 % oder sogar 76 % an, so nimmt der Schlupf der Käfer wieder ab. Bei Temperaturen zwischen 26° C und 27° C zeigt *A. flavipes* bei allen betrachteten relativen Raumfeuchten mindestens einen Schlupfanteil von etwa 38 %.

In den einzelnen Konkurrenzsituationen zeigen sich bei der Kleidermotte nur geringe Unterschiede zu den Kontrollen. Die größte Abweichung ist unter der klimatischen Situation von 29° C und 70 % RH zu erkennen, jedoch ist hier auch eine hohe Standardabweichung verzeichnet. Der Polsterwarenkäfer hingegen zeigt unter zwei klimatischen Situationen einen klar erkennbaren und signifikanten Unterschied in der Konkurrenz im Vergleich zur Kontrolle. Sowohl bei 26° C und 76 % RH als auch bei 29° C und 76 % RH ist der Anteil der geschlüpften Polsterwarenkäfer kleiner als in der jeweiligen Kontrolle.

Die folgenden Diagramme zeigen das Schlupfverhalten beider Nahrungskonkurrenten über die Beobachtungszeit des Versuches hinweg. Sie ermöglichen, einen potentiellen Einfluss beider Arten aufeinander besser zu verdeutlichen.

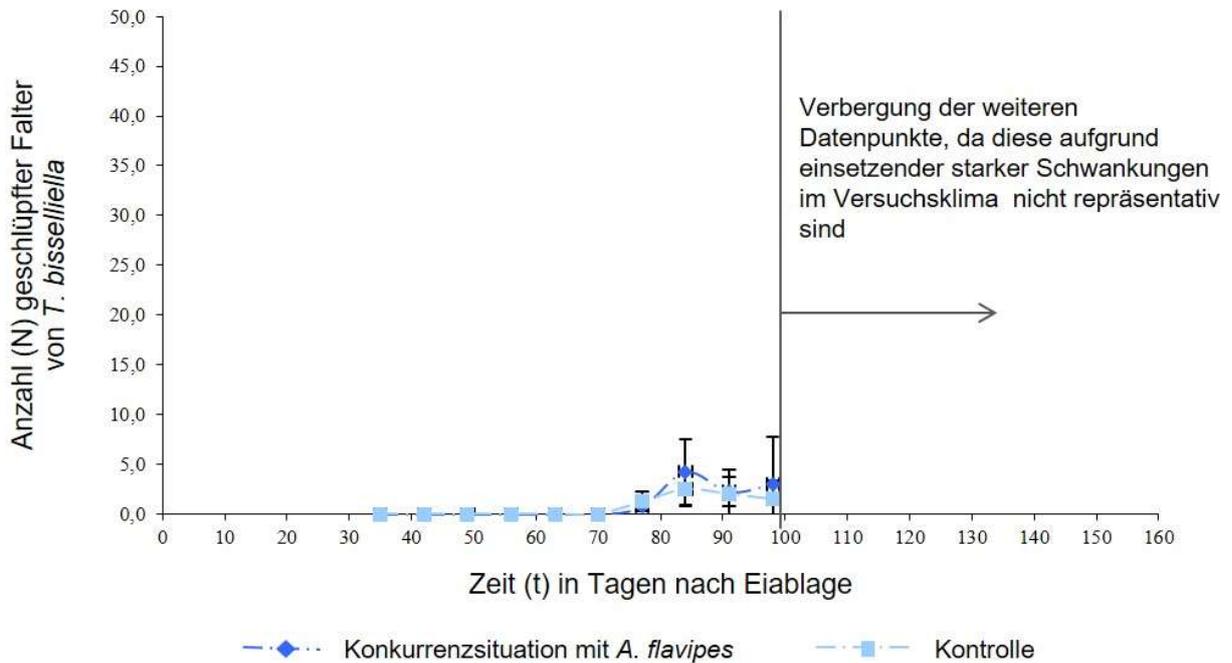


Abb. 4-3: Gemittelter Falterschlupf von *Tineola bisselliella* bei einer Raumtemperatur von 21° C und einer relativen Raumfeuchte von 33 %.

Beobachtung der Anzahl (N) wöchentlich neu geschlüpfter Falter von der vierten bis zu 21. Woche nach Eiablage innerhalb der Konkurrenzsituation mit *Anthrenus flavipes* sowie in der Kontrolle. Einsatz von 300 Eiern je Art. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

Auch wenn der Versuch zum Schlupfverhalten der Kleidermotte unter der Bedingung 21° C/33 % RH abgebrochen werden musste, so erkennt man an den Daten aus der vierten bis zur vierzehnten Woche, dass die Anzahl der geschlüpften Falter sowohl in der Kontrolle als auch in der Konkurrenzsituation sehr niedrig war und der Falterschlupf erst nach siebzig Tagen begann (Abb. 4-3). Unter den anderen beiden klimatischen Bedingungen (Abb. 4-4 und Abb. 4-5), die eine ähnliche bzw. gleiche Temperatur und nur eine stärkere relative Raumfeuchte aufwiesen, startete der Falterschlupf bereits nach fünfzig Tagen. Darüber hinaus lässt sich nach einem abklingen des Schlupfes ein zweiter Anstieg beobachten. Ein Unterschied zwischen der Kontrolle und der Konkurrenzsituation ist in keinem der drei Ansätze erkennbar.

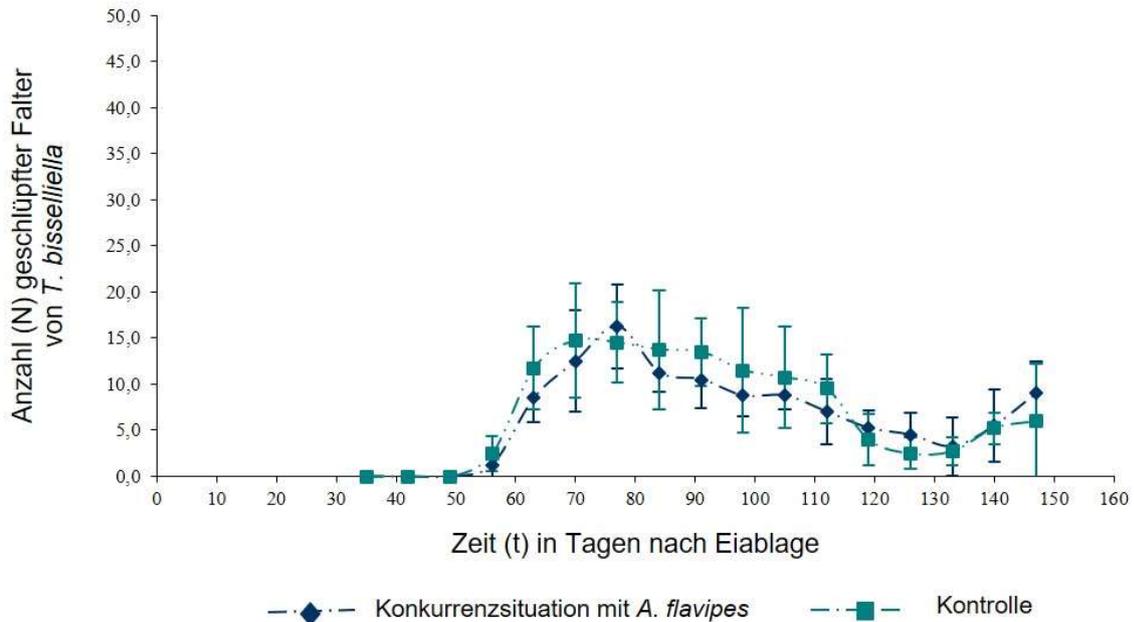


Abb. 4-4: Gemittelter Falterschlupf von *Tineola bisselliella* bei einer Raumtemperatur von 20° C und einer relativen Raumfeuchte von 65 %.

Beobachtung der Anzahl (N) wöchentlich neu geschlüpfter Falter von der vierten bis zu 21. Woche nach Eiablage innerhalb der Konkurrenzsituation mit *Anthrenus flavipes* sowie in der Kontrolle. Einsatz von 300 Eiern je Art. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

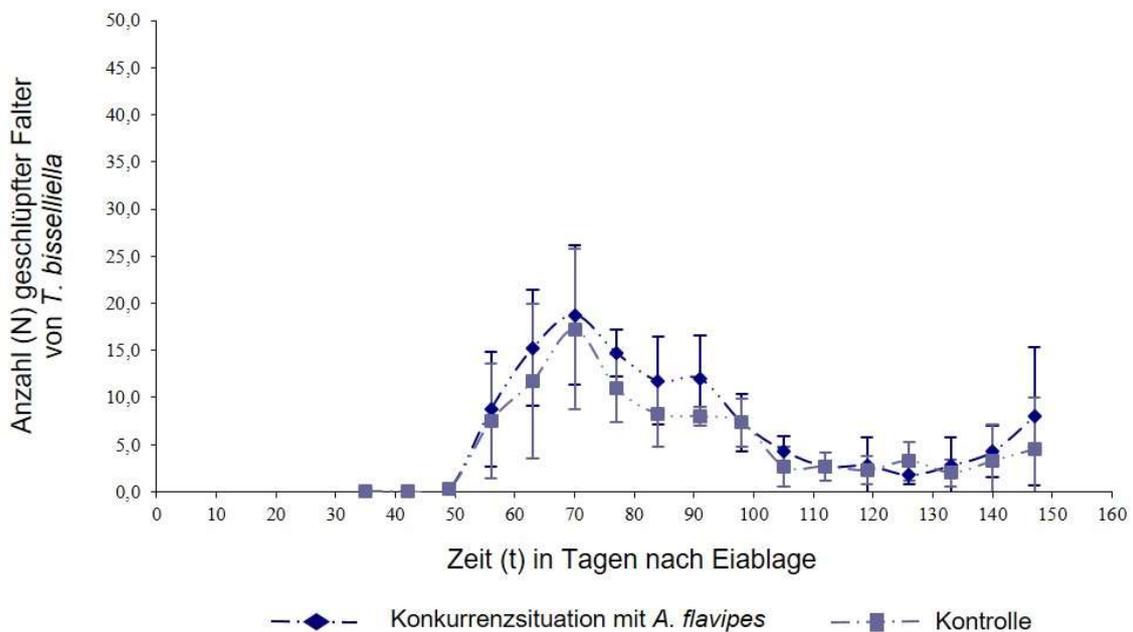


Abb. 4-5: Gemittelter Falterschlupf von *Tineola bisselliella* bei einer Raumtemperatur von 21° C und einer relativen Raumfeuchte von 76 %.

Beobachtung der Anzahl (N) wöchentlich neu geschlüpfter Falter von der vierten bis zu 21. Woche nach Eiablage innerhalb der Konkurrenzsituation mit *Anthrenus flavipes* sowie in der Kontrolle. Einsatz von 300 Eiern je Art. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

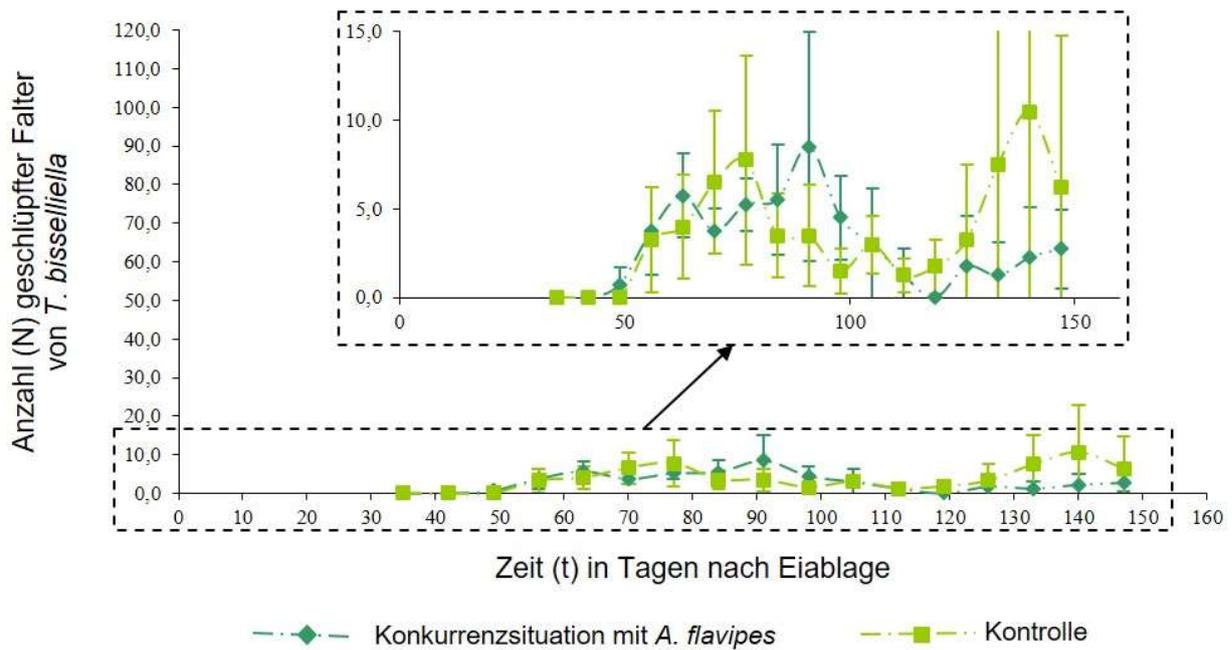


Abb. 4-6: Gemittelter Falterschlupf von *Tineola bisselliella* bei einer Raumtemperatur von 26° C und einer relativen Raumfeuchte von 33 %.

Beobachtung der Anzahl (N) wöchentlich neu geschlüpfter Falter von der vierten bis zu 21. Woche nach Eiablage innerhalb der Konkurrenzsituation mit *Anthrenus flavipes* sowie in der Kontrolle. Einsatz von 300 Eiern je Art. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

Der Falterschlupf von *T. bisselliella* bleibt auch bei einer Temperatur von 26° C gering, sofern die relative Raumfeuchte nur 33 % beträgt (Abb. 4-6). Selbst bei 68 % RH sind nur minimal größere Messwerte erkennbar, die eher in der Konkurrenzsituation vorliegen (Abb. 4-7). Der Falterschlupf beginnt hier jedoch bereits nach dreißig Tagen, während er in der Situation 26° C/33 % RH erst nach fünfzig Tagen startet. Einen verstärkten Schlupf an Kleidermottenfaltern entdeckt man bei einer Temperatur von 26° C und einer relativen Raumfeuchte von 76 % (Abb. 4-8). Des Weiteren lässt sich eine eindeutig zweigipfelige Verteilung der Messwerte ausmachen und der erste Falterschlupf war bereits am 35. Tag zu verzeichnen.

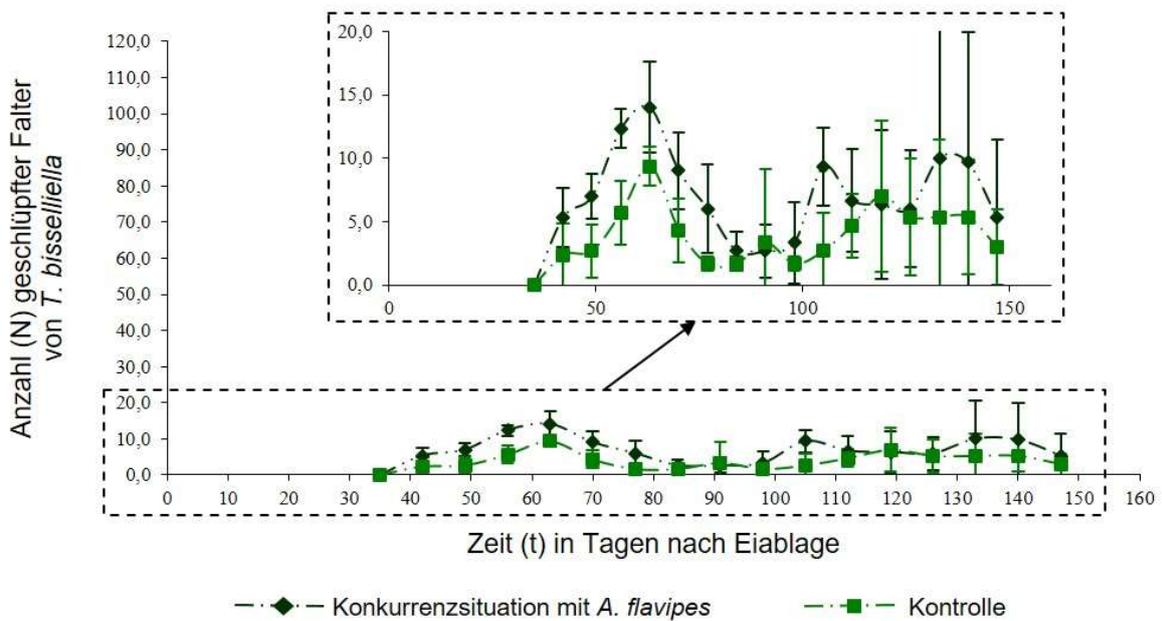


Abb. 4-7: Gemittelter Falterschlupf von *Tineola bisselliella* bei einer Raumtemperatur von 27° C und einer relativen Raumfeuchte von 68 %.

Beobachtung der Anzahl (N) wöchentlich neu geschlüpfter Falter von der vierten bis zu 21. Woche nach Eiablage innerhalb der Konkurrenzsituation mit *Anthrenus flavipes* sowie in der Kontrolle. Einsatz von 300 Eiern je Art. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

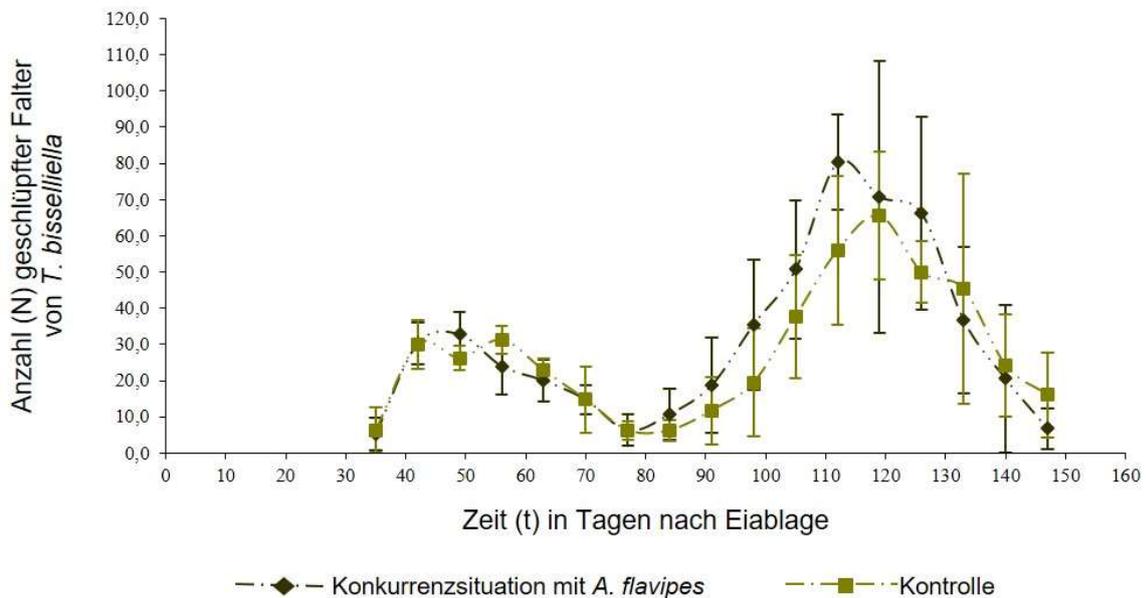


Abb. 4-8: Gemittelter Falterschlupf von *Tineola bisselliella* bei einer Raumtemperatur von 26° C und einer relativen Raumfeuchte von 76 %.

Beobachtung der Anzahl (N) wöchentlich neu geschlüpfter Falter von der vierten bis zu 21. Woche nach Eiablage innerhalb der Konkurrenzsituation mit *Anthrenus flavipes* sowie in der Kontrolle. Einsatz von 300 Eiern je Art. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

Betrachtet man nun den Falterschlupf von *T. bisselliella* unter den drei klimatischen Bedingungen mit der höchsten untersuchten Temperatur, so zeigt sich für die beiden niedrigeren relativen Raumfeuchten ein ähnliches Bild wie bei 26° C bzw. 27° C (Abb. 4-6 und Abb. 4-7). Der Schlupf an Kleidermottenfaltern bleibt im Vergleich zur klimatischen Situation bei 76 % RH trotz identischer Temperatur eher gering (Abb. 4-9 und Abb. 4-10). Man erkennt auch, dass erneut der Startpunkt des Schlupfes bei der der mittleren Luftfeuchtigkeit weiter nach vorne gerutscht ist und bei fünfunddreißig Tagen liegt im Vergleich zu zweiundvierzig Tagen bei 33 % RH. Bei der klimatischen Gegebenheit von 29° C/76 % RH (Abb. 4-11) ist der erste Falter bereits bis zum 35. Tag geschlüpft und die Messdaten zum Falterschlupf liegen weit über denjenigen der anderen beiden untersuchten Bedingungen. Kontrolle und Konkurrenzsituation gegenübergestellt lassen bei den drei klimatischen Konstellationen mit einer Temperatur von 29° C kleine Differenzierungen erkennen. Zum einen ist der beginnende zweite Anstieg des Falterschlupfes in der Konkurrenz bei 33 % RH deutlich und bei 70 % leicht verzögert, zum andern liegen die Messwerte im zweiten Gipfel der Verteilung bei 70 % RH innerhalb des Konkurrenzansatzes höher. Das gegenteilige Bild zeigt sich bei einer Luftfeuchtigkeit von 76 %, denn hier verlaufen die Verteilungen der Messwerte in der Kontrolle und der Konkurrenz nahezu synchron. Der zweite Gipfel setzt sich hier in der Kontrolle mit höheren Messdaten fort als in der Konkurrenz.

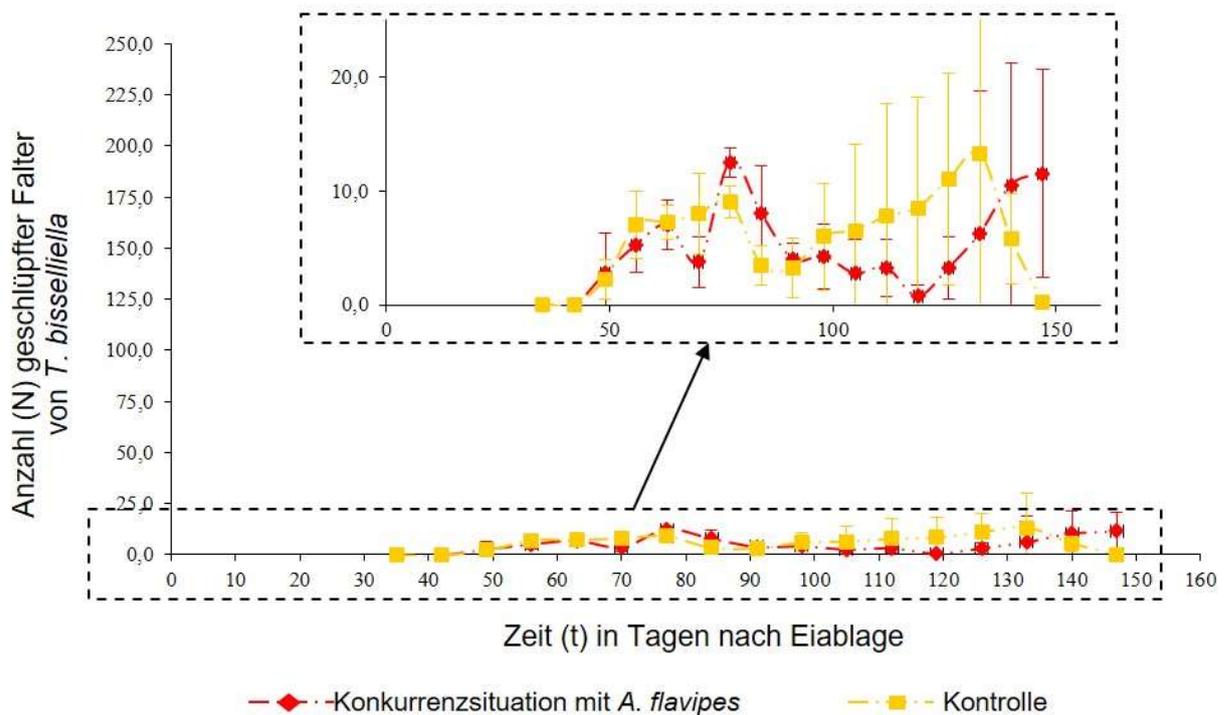


Abb. 4-9: Gemittelter Falterschlupf von *Tineola bisselliella* bei einer Raumtemperatur von 29° C und einer relativen Raumfeuchte von 33 %.

Beobachtung der Anzahl (N) wöchentlich neu geschlüpfter Falter von der vierten bis zu 21. Woche nach Eiablage innerhalb der Konkurrenzsituation mit *Anthrenus flavipes* sowie in der Kontrolle. Einsatz von 300 Eiern je Art. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

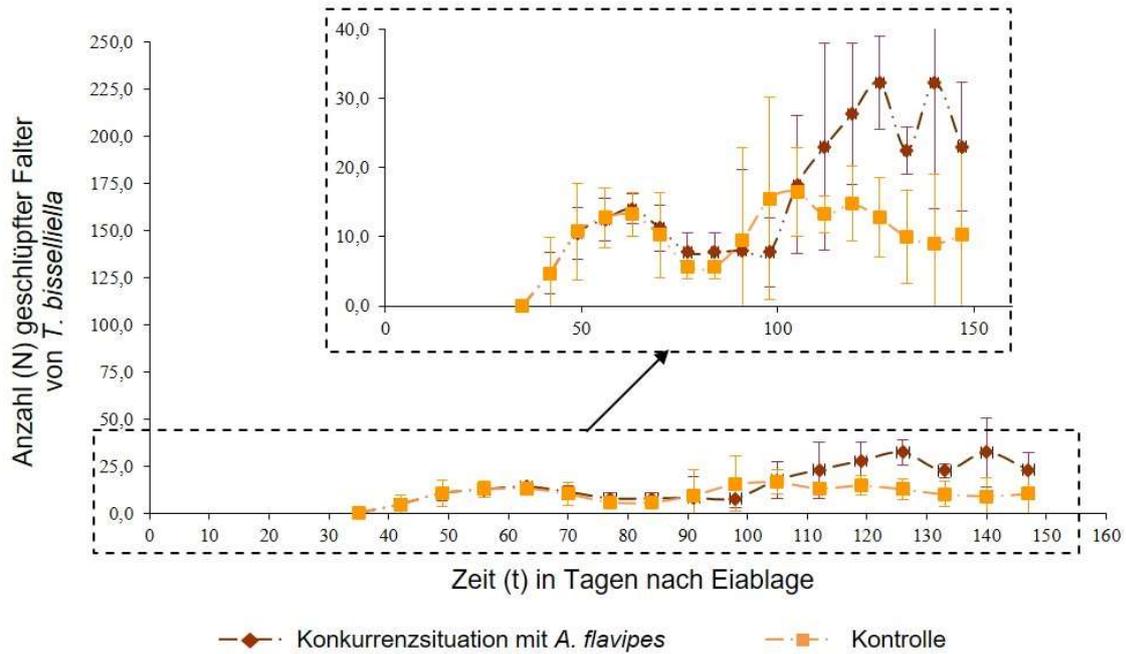


Abb. 4-10: Gemittelter Falterschluß von *Tineola bisselliella* bei einer Raumtemperatur von 29° C und einer relativen Raumfeuchte von 70 %.

Beobachtung der Anzahl (N) wöchentlich neu geschlüpfter Falter von der vierten bis zu 21. Woche nach Eiablage innerhalb der Konkurrenzsituation mit *Anthrenus flavipes* sowie in der Kontrolle. Einsatz von 300 Eiern je Art. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

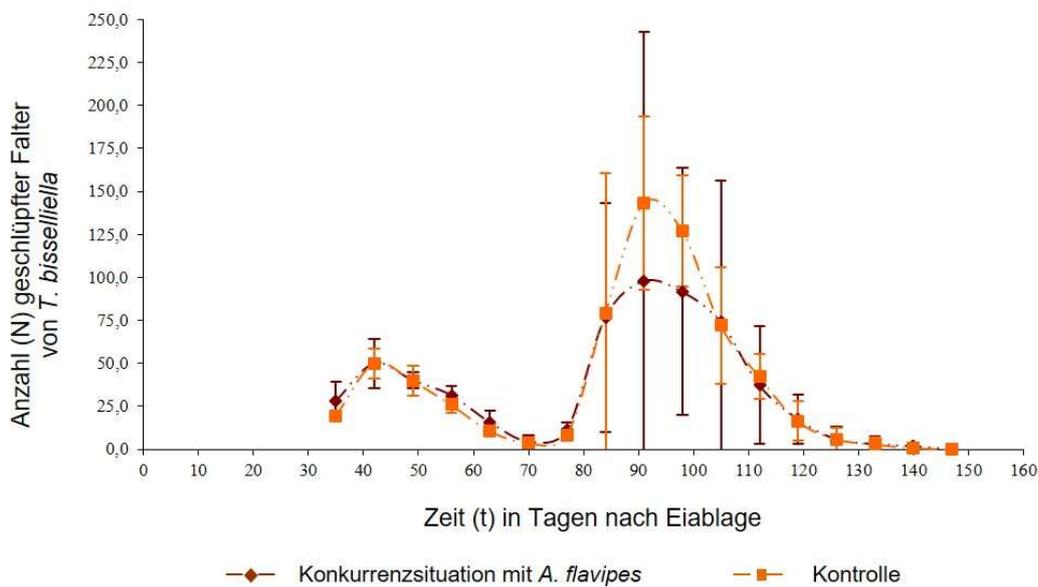


Abb. 4-11: Gemittelter Falterschluß von *Tineola bisselliella* bei einer Raumtemperatur von 29° C und einer relativen Raumfeuchte von 76 %.

Beobachtung der Anzahl (N) wöchentlich neu geschlüpfter Falter von der vierten bis zu 21. Woche nach Eiablage innerhalb der Konkurrenzsituation mit *Anthrenus flavipes* sowie in der Kontrolle. Einsatz von 300 Eiern je Art. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

Für *Anthrenus flavipes* seien an dieser Stelle nur eine kleine Auswahl einzelner klimatischer Untersuchungseinheiten dargestellt und die restlichen im Anhang beigefügt (Anlage 1 bis Anlage 5). Bei einer Temperatur von 26° C beginnt der Käferschlupf bei einer relativen Raumfeuchte von 33 % bereits nach dreiundsechzig Tagen (Abb. 4-12), während er bei einer Luftfeuchtigkeit von 76 % RH erst nach siebenundsiebzig Tagen startet (Abb. 4-13). Des Weiteren ist die Verteilung der Messwerte bei 33 % RH nicht so breit wie bei 76 % RH. Bei einer Temperatur von 29° C beginnt der Schlupf der Käfer bei 33 % RH nach fünfzig Tagen (Abb. 4-14) und bei 76 % RH erst nach siebzig Tagen (Abb. 4-15). Darüber hinaus zeigt sich bei einer relativen Raumfeuchte von 33 % als einziges eine zweigipfelige Verteilung. Sowohl bei einer Temperatur von 26/27° C als auch von 29° C zeigt sich einheitlich bei 76 % RH ein deutlich erkennbarer Unterschied von Kontrolle zu Konkurrenz. Innerhalb des Konkurrenzansatzes liegt der Käferschlupf unter dem der Kontrolle. Dies ist auch im geringeren Maße bei dem klimatischen Umstand von 27° C/68 % RH gegeben.

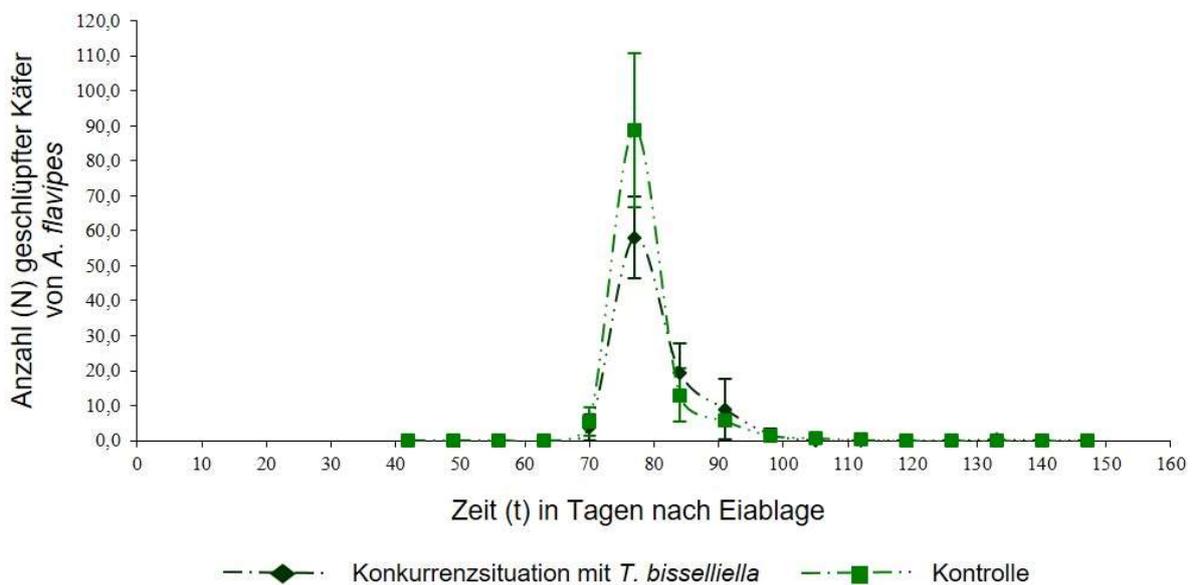


Abb. 4-12: Gemittelter Käferschlupf von *Anthrenus flavipes* bei einer Raumtemperatur von 26° C und einer relativen Raumfeuchte von 33 %.

Beobachtung der Anzahl (N) wöchentlich neu geschlüpfter Käfer von der vierten bis zu 21. Woche nach Eiablage innerhalb der Konkurrenzsituation mit *Tineola bisselliella* sowie in der Kontrolle. Einsatz von 300 Eiern je Art. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

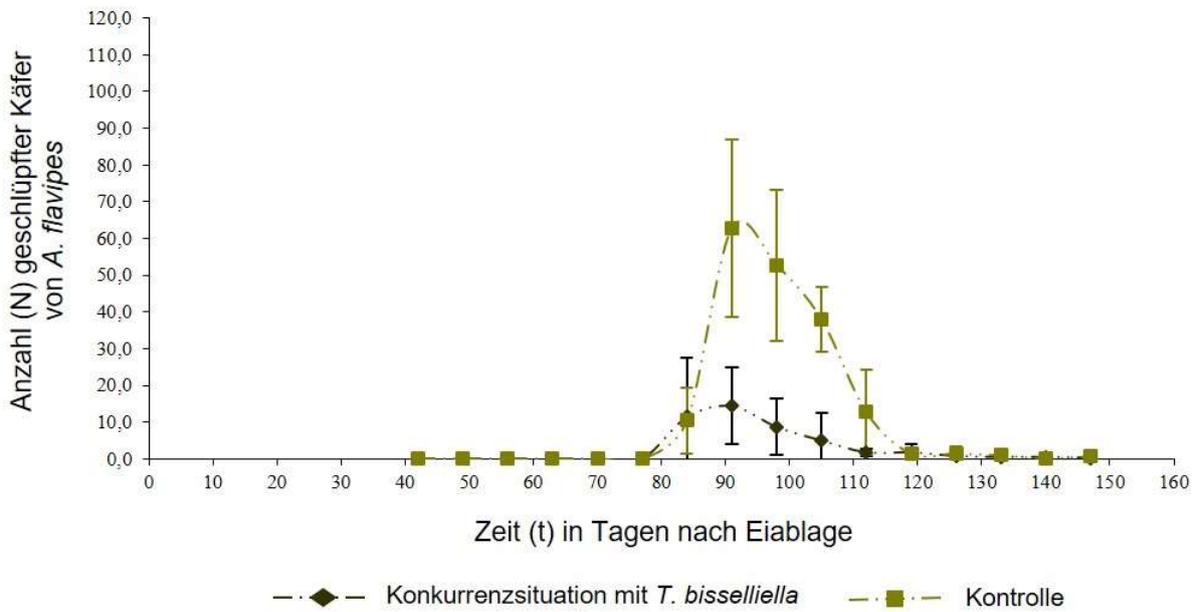


Abb. 4-13: Gemittelter Käferschlupf von *Anthrenus flavipes* bei einer Raumtemperatur von 26° C und einer relativen Raumfeuchte von 76 %.

Beobachtung der Anzahl (N) wöchentlich neu geschlüpfter Käfer von der vierten bis zu 21. Woche nach Eiablage innerhalb der Konkurrenzsituation mit *Tineola bisselliella* sowie in der Kontrolle. Einsatz von 300 Eiern je Art. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

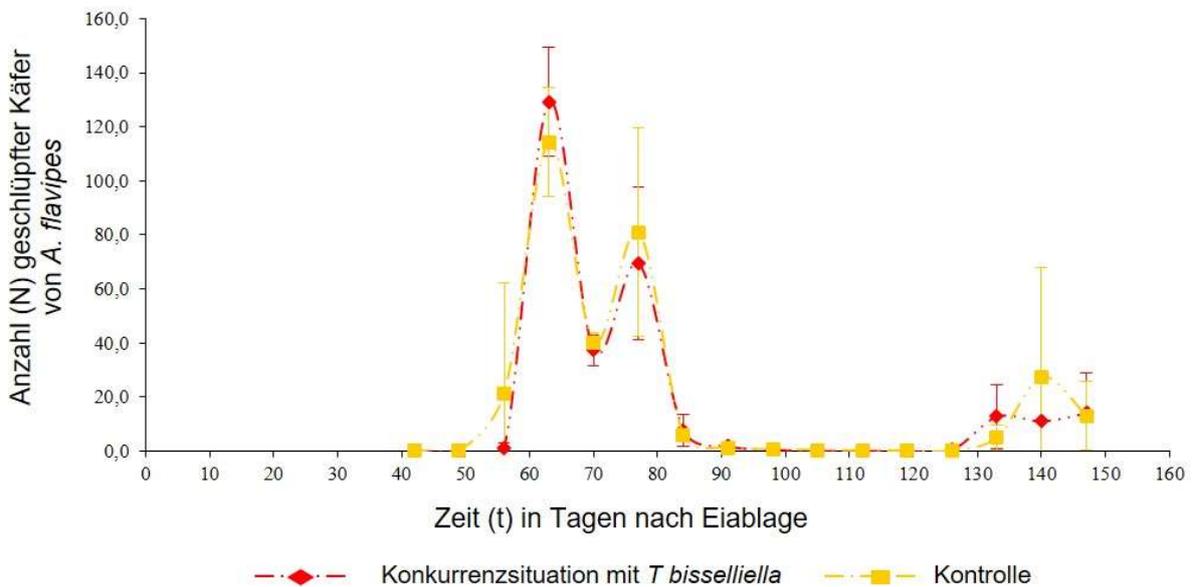


Abb. 4-14: Gemittelter Käferschlupf von *Anthrenus flavipes* bei einer Raumtemperatur von 29° C und einer relativen Raumfeuchte von 33 %.

Beobachtung der Anzahl (N) wöchentlich neu geschlüpfter Käfer von der vierten bis zu 21. Woche nach Eiablage innerhalb der Konkurrenzsituation mit *Tineola bisselliella* sowie in der Kontrolle. Einsatz von 300 Eiern je Art. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

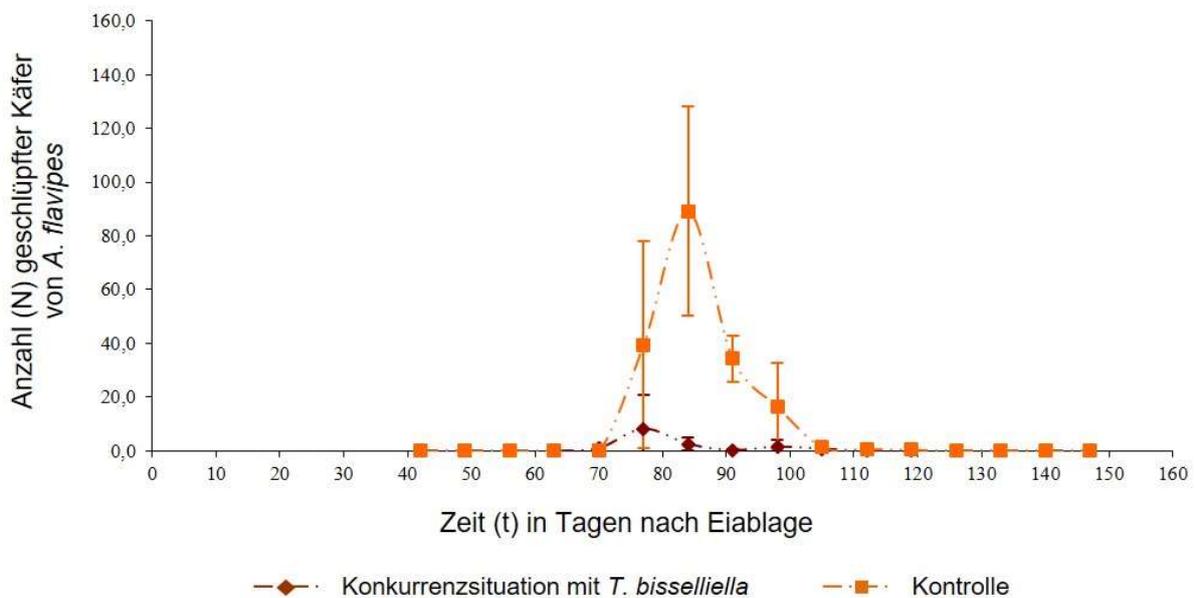


Abb. 4-15: Gemittelter Käferschlupf von *Anthrenus flavipes* bei einer Raumtemperatur von 29° C und einer relativen Raumfeuchte von 76 %.

Beobachtung der Anzahl (N) wöchentlich neu geschlüpfter Käfer von der vierten bis zu 21. Woche nach Eiablage innerhalb der Konkurrenzsituation mit *Tineola bisselliella* sowie in der Kontrolle. Einsatz von 300 Eiern je Art. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

4.1.3 FAUNISTISCHE UNTERSUCHUNGEN

Die faunistischen Untersuchungen basieren auf den mit Pheromonfallen erfolgten Freilandfängen von *T. bisselliella* in Berlin, dem Brandenburger Umland und mit einer Ausnahme auch in Schleswig-Holstein (FL25). Zunächst soll das Vorkommen der Kleidermotte zu den einzelnen Jahreszeiten betrachtet werden. Bei einem Vergleich der Fallenstandorte aus den beiden Jahren 2010 und 2011 lassen sich zehn Standorte ermitteln, die in beiden Jahren kontinuierlich beprobt wurden (FL08, FL09, FL10, FL11, FL14, FL19, FL20, FL23, FL25, FL26). Stellt man die Summe aller an jedem Standort zur gleichen Zeit gefangenen Falter der Gesamtheit im jeweiligen Jahr gegenüber, so erhält man eine prozentuale Verteilung des Falterfangs über das Jahr (Abb. 4-16). Die Fallenaufstellung erfolgte insgesamt von Ende Februar bis in den November des jeweiligen Jahres. Da jedoch sowohl Ende Februar als auch im November kein Fang erfolgte, sind diese Monate in der Ergebnisdarstellung nicht berücksichtigt. Die Falterfänge beider Jahre sind je in drei unterschiedliche Graustufen aufgeteilt. Sie stellen die jeweiligen Jahreszeiten dar, in denen der Fang erfolgte. Auf diese Weise erkennt man, dass der größte Fanganteil der Kleidermottenfalter im Frühjahr und Sommer liegt, während die Fänge im Herbst nur einen sehr geringen Anteil von unter 5 % in beiden Jahren ausmachen. Im Jahr 2010 ist der höchste Prozentsatz an gefangenen Faltern im Sommer zu finden, für das Jahr 2011 zeigt sich im Frühjahr das Maximum. Insgesamt lässt sich ein über das Frühjahr hin ansteigender und über den Sommer bzw. Spätsommer bis in den Herbst hinein abnehmender Falterfang erkennen.

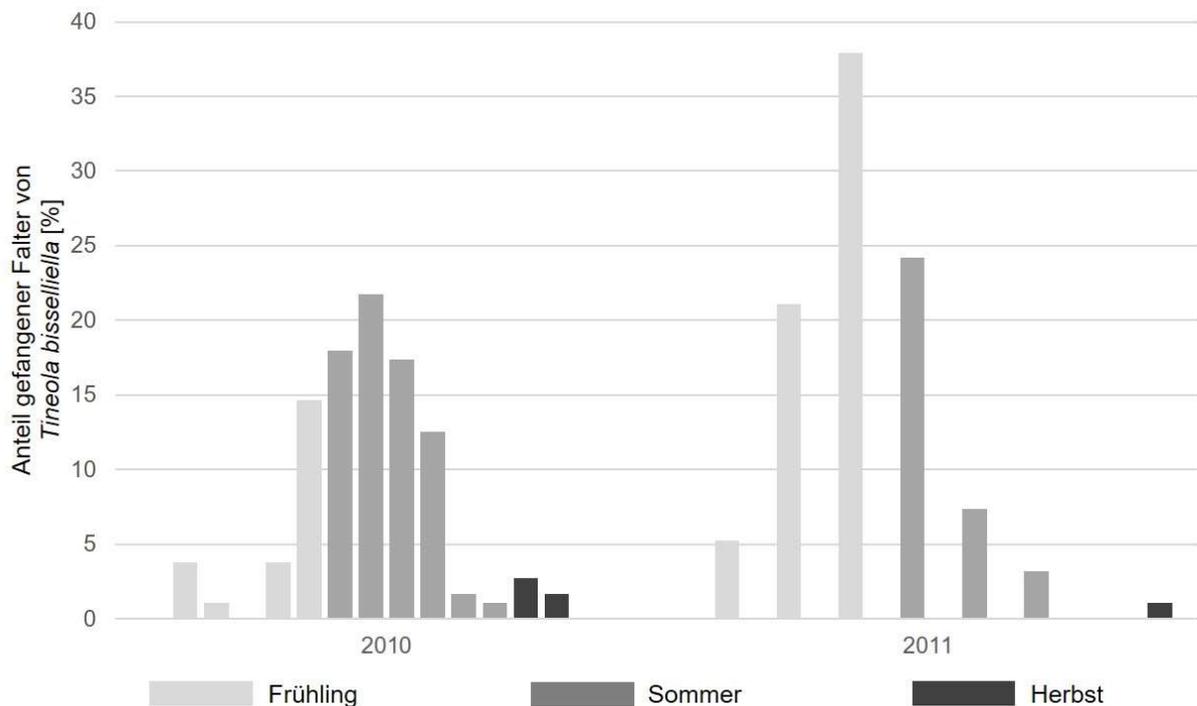


Abb. 4-16: Prozentuale, jahreszeitliche Verteilung der gefangenen Falter von *Tineola bisselliella* über einen Zeitraum von sieben Monaten in den Jahren 2010 und 2011 im Raum von Berlin und Umgebung.

Berücksichtigung von lediglich zehn Fallenstandorten (FL08, FL09, FL10, FL11, FL14, FL19, FL20, FL23, FL25, FL26), die in beiden Jahren kontinuierlich beprobt wurden. 2010 erfolgte die Fallenkontrolle alle zwei Wochen, 2011 alle vier Wochen.

Betrachtet man die Fänge von *T. bisselliella* an allen beprobten Standorten nach den beiden Jahren getrennt, so lässt sich die eben dargestellte Verteilung des Falterfangs über das Jahr vor allem an den Standorten mit den höchsten Fängen eindeutig wiedererkennen (Abb. 4-17 und Abb. 4-18). Auch jeder einzelne Standort für sich zeigt die höchste Anzahl an gefangenen Faltern im Frühling und im Sommer. Vier Standorte im Jahr 2010 (FL14, FL12, FL23, FL08 (Abb. 4-17)) und fünf im Jahr 2011 (FL33, FL31, FL23, FL08 und FL25 (Abb. 4-18)) weisen auch noch im anfänglichen Herbst Fänge von Kleidermotten auf. Im Jahr 2010 fällt besonders der Fallenstandort FL04 auf, da er im späten Frühjahr und frühen Sommer die stärksten Fänge aufzeigt. Darüber hinaus hebt sich der Standort FL10 im Jahr 2010 von allen anderen Fallen ab. Hier ist ein einmaliger Fang von über zwanzig Kleidermotten im Sommer verzeichnet, während die Anzahl der gefangenen Falter vorab viel geringer ausfiel. Nach diesem starken Fangergebnis ist jedoch nicht ein einziger weiterer Fang erfolgt. Im Jahr 2011 ist an demselben Fallenstandort nur ein geringes Fangergebnis zu beobachten (Abb. 4-18). Dafür tritt der Fallenstandort FL33 mit einem maximalen Fangergebnis von über fünfunddreißig Kleidermotten in einer der Frühjahrfallen hervor. Des Weiteren zeigen sich an den Fangstellen FL14, FL31, FL23 und FL08 kontinuierlich kleinere bis mittlere Fanggrößen. Bei beiden Beprobungszeiträumen, sowohl im Jahr 2010 als auch im Jahr 2011, fällt auf, dass die Berliner Standorte einen deutlichen Falterfang präsentieren, während die Brandenburger Standorte nur vereinzelte Fänge aufweisen. Außerdem zeigt sich in beiden Jahren stets ein Fangergebnis für alle Balkon- und Terrassenfallen. Die Fallen, die in den Gärten aufgestellt wurden, offenbaren mit zunehmender Distanz zum Wohnhaus eine starke

Abnahme der Anzahl gefangener Kleidermotten. FL19 ist die letzte Falle in der Reihe der Gartenstandorte, die noch vereinzelte Fangergebnisse besitzt. Sie hatte einen Abstand von ~12 m zum nächsten Wohnhaus. Alle ihr folgenden Fallen (FL26, FL20 aus 2010 und 2011 und FL32 aus 2011) sind mindestens geschätzte 15 m vom nächsten bewohnten Haus entfernt gewesen. Der Fallenstandort FL25 zeichnet sich durch eine Entfernung von 5 m zum Wohnhaus aus und zeigt im Jahr 2010 keinen Fang, im Jahr 2011 einen sehr späten vereinzelten im Herbst.

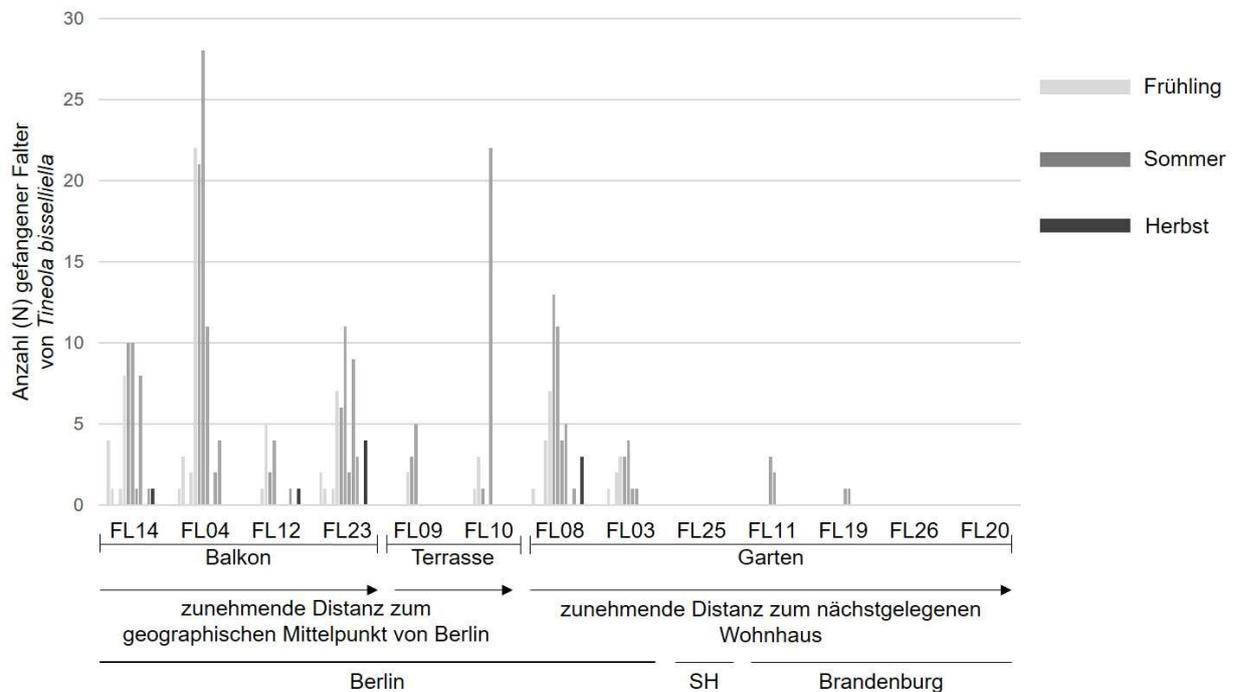


Abb. 4-17: Anzahl (N) gefangener Falter von *Tineola bisselliella* über einen Zeitraum von sieben Monaten (Ende März bis Ende Oktober 2010) im Raum von Berlin und Umgebung.

Berücksichtigung aller dreizehn Fallenstandorte (FL03, FL04, FL08, FL09, FL10, FL11, FL12, FL14, FL19, FL20, FL23, FL25, FL26), die im Jahr 2010 kontinuierlich alle zwei Wochen beprobt wurden. Unterteilung der Fallenstandorte nach der Region (Berlin, SH (Schleswig-Holstein) und Brandenburg), ihrer Position (Balkon, Terrasse und Garten) und entweder ihrer Distanz zum geographischen Mittelpunkt von Berlin (innerhalb der beiden Gruppen der Balkon- und Terrassenfallen) oder ihrer Distanz zum nächstgelegenen Wohnhaus (innerhalb der Gartenfallen).

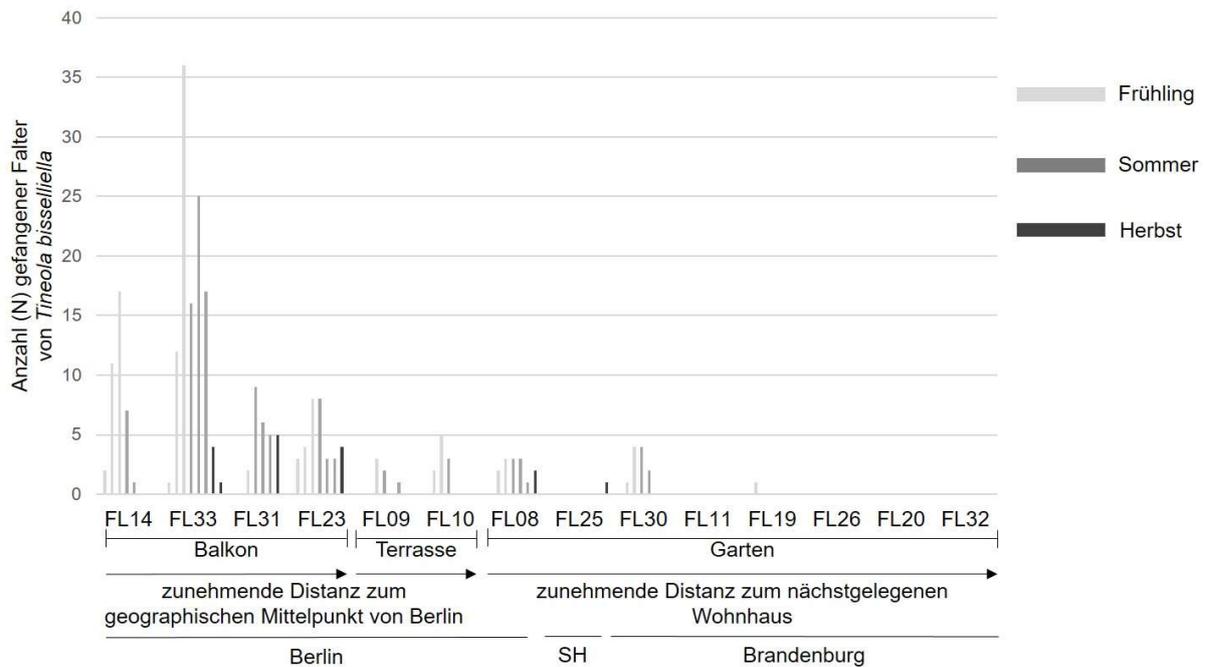


Abb. 4-18: Anzahl (N) gefangener Falter von *Tineola bisselliella* über einen Zeitraum von sieben Monaten (Ende März bis Ende Oktober 2011) im Raum von Berlin und Umgebung.

Berücksichtigung aller vierzehn Fallenstandorte (FL08, FL09, FL10, FL11, FL14, FL19, FL20, FL23, FL25, FL26, FL30, FL31, FL32, FL33), die im Jahr 2011 kontinuierlich alle vier Wochen beprobt wurden. Unterteilung der Fallenstandorte nach der Region (Berlin, SH (Schleswig-Holstein) und Brandenburg), ihrer Position (Balkon, Terrasse und Garten) und entweder ihrer Distanz zum geographischen Mittelpunkt von Berlin (innerhalb der beiden Gruppen der Balkon- und Terrassenfallen) oder ihrer Distanz zum nächstgelegenen Wohnhaus (innerhalb der Gartenfallen).

Fasst man die Fänge aus den Jahren 2010 und 2011 zusammen, so lässt sich für insgesamt zehn Standorte (FL08, FL09, FL10, FL11, FL14, FL19, FL20, FL23, FL25, FL26) der Mittelwert aus den beiden Fangergebnissen der Jahre bilden. Für alle weiteren sieben Fallen steht nur das Ergebnis aus einem Jahr zur Verfügung. Die in Abb. 4-19 dargestellte Reihenfolge der Standorte entspricht dem bereits bekannten Schema aus den Einzelbetrachtungen der Jahre. Hier sind die Ergebnisse nun als Gesamtfang je Standort wiedergeben. Auch in dieser Zusammenfassung ist sowohl der starke Kleidermottenfang bei den Balkon und Terrassenfallen zu sehen, als auch der mit zunehmender Distanz zum Wohnhaus abnehmende Falterfang der Gartenstandorte. Die beiden Fallen FL33 und FL04 weisen das höchste Fangergebnis auf, gefolgt von den Standorten FL14 und FL23.

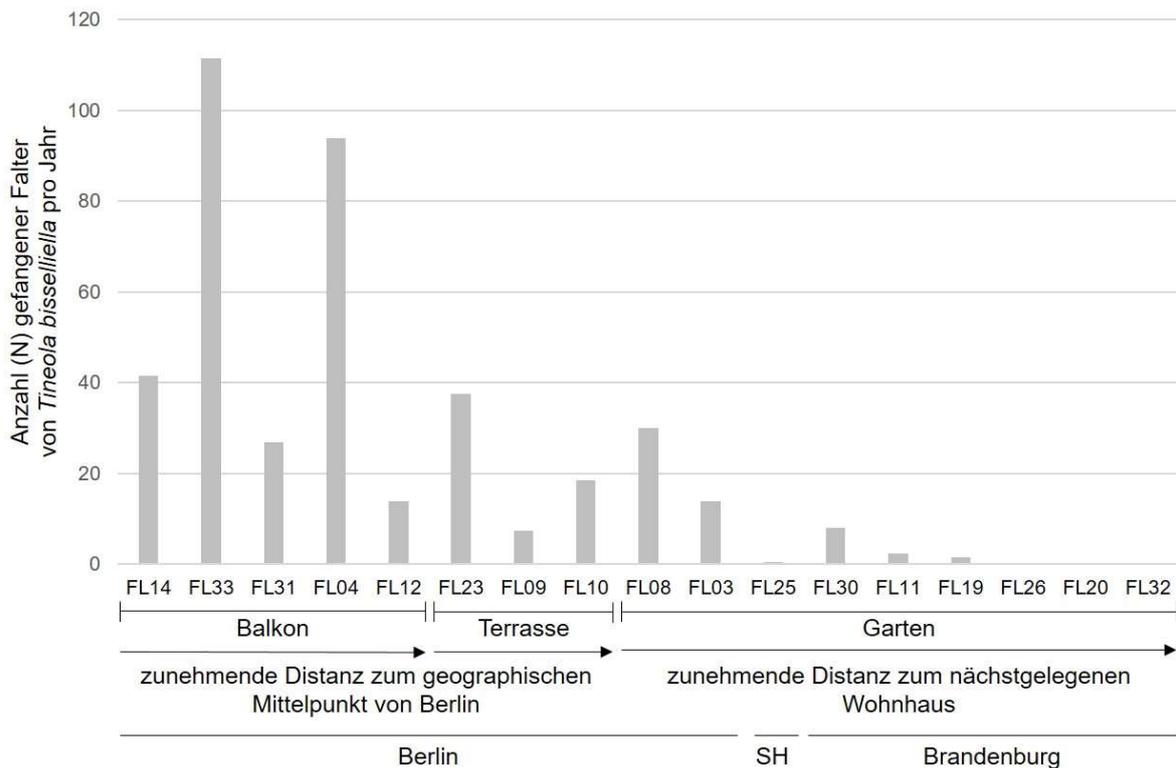


Abb. 4-19: Gemittelte jährliche Anzahl gefangener Falter von *Tineola bisselliella* über einen Zeitraum von sieben Monaten (aus den Jahren 2010 und 2011) im Raum von Berlin und Umgebung.

Berücksichtigung der Fänge an allen vierzehn Fallenstandorte (FL08, FL09, FL10, FL11, FL14, FL19, FL20, FL23, FL25, FL26, FL30, FL31, FL32, FL33), die im Jahr 2010 und/oder 2011 kontinuierlich alle zwei Wochen (2010) bzw. alle vier Wochen (2011) beprobt wurden. Fänge von Standorten, die nur ein Jahr zu Verfügung standen, sind nicht als Mittelwert dargestellt (FL33, FL31, FL04, FL12, FL03, FL30, FL32). Gemittelte Werte sind auf ganze Zahlen gerundet. Unterteilung der Fallenstandorte nach der Region (Berlin, SH (Schleswig-Holstein) und Brandenburg), ihrer Position (Balkon, Terrasse und Garten) und entweder ihrer Distanz zum geographischen Mittelpunkt von Berlin (innerhalb der beiden Gruppen der Balkon- und Terrassenfallen) oder ihrer Distanz zum nächstgelegenen Wohnhaus (innerhalb der Gartenfallen).

Ein direkter Vergleich einer Außenfalle mit einer Wohnungsfalle ist an zwei Standorten möglich, von denen sich einer in einer Kleinstadt in Brandenburg (FL26) und einer in einem Dorf in Schleswig-Holstein befindet (FL25). In der Liste der Fallenstandorte (Tab. 3-4) sind die beiden Wohnungsfallenstandorte mit dem Zusatz „i“ versehen (FL26i und FL25i). Sowohl in der brandenburgischen Kleinstadt als auch im schleswig-holsteinischen Dorf ist für den Innenraum ein Kleidermottenfang erkennbar, während die Gartenfallen bis auf einen einzigen Falter in einer Herbstfalle im Jahr 2011 am Standort FL25 keine Fänge verzeichnen (Abb. 4-20). Die Fänge der Wohnungsfalle am Standort FL25 erreichen im Jahr 2010 ihr Maximum in den ersten Sommerwochen. Daraufhin nimmt die Anzahl gefangener Falter über den Restsommer hinweg wieder ab. Zuvor ist bereits im Frühjahr ein Anstieg der Falteranzahl zu erkennen, der jedoch stark schwankt. Im Jahr 2011 zeigt sich für den gleichen Standort im Wohnraum eine ähnliche Verteilung der Fänge, die jedoch bis in den beginnenden Herbst hineinreichen. Die Fänge der Wohnungsfalle am Standort FL26 präsentieren im Jahr 2010 bis auf das erste Fangergebnis im Frühling eine monotone Anzahl an

Kleidermottenfaltern. Im Jahr 2011 nimmt der Fang von Kleidermottenfalter über das Frühjahr hin zu und bleibt über den Sommer bis in den Herbstfang hinein maximal mit einem kleinen Abfall am Sommerende.

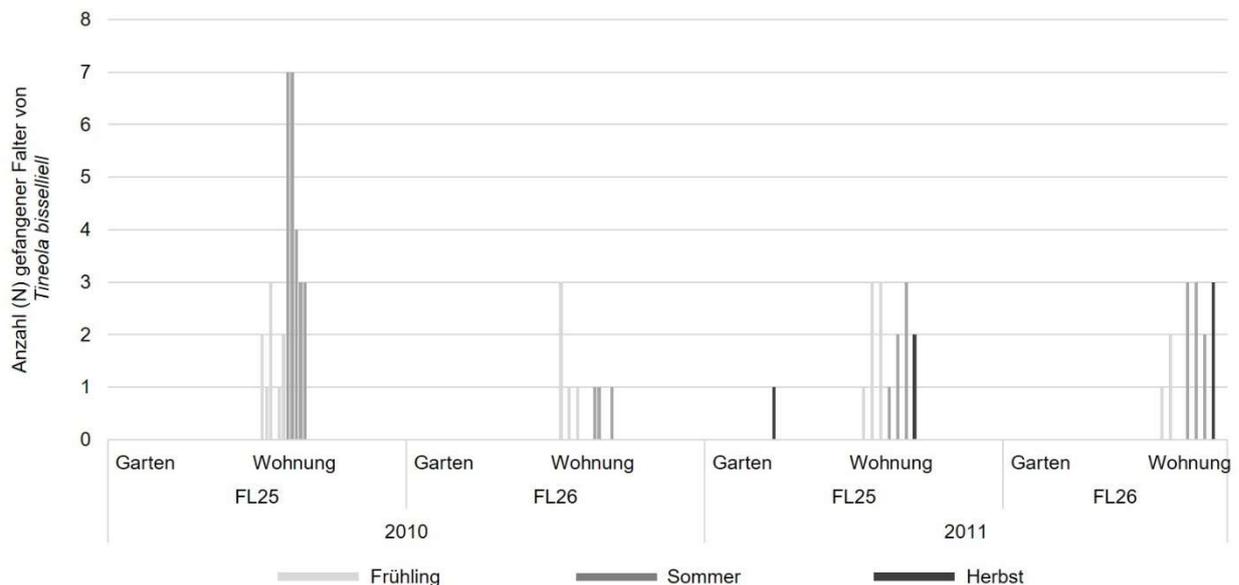


Abb. 4-20: Anzahl (N) gefangener Falter von *Tineola bisselliella* im Frühjahr, Sommer und Herbst der Jahre 2010 und 2011 in einer Kleinstadt von Brandenburg (FL26) und einem Dorf in Schleswig-Holstein (FL25).

Aufstellung der je zwei Pheromonfallen pro Standort (Garten und Wohnraum) für einen Zeitraum von sieben Monaten (Ende März bis Ende Oktober); regelmäßiger Austausch der Fallen alle 2 Wochen im Jahr 2010 und alle 4 Wochen im Jahr 2011.

4.2 CHARAKTERISIERUNG DER KLEIDERMOTTE *TINEOLA BISSELLIELLA* ALS GENOSPEZIES

4.2.1 PHYLOGENIE AUF DER EBENE DER SPEZIES

4.2.1.1 PHYLOGENETISCHE BETRACHTUNGEN DER TINEIDAE ANHAND EINES SEQUENZABSCHNITTES DER CYTOCHROMOXIDASE I (COI)

Der Maximum Likelihood Baum (Abb. 4-21) zeigt eine mit 100 % Bootstrap-Wahrscheinlichkeit versehene Aufspaltung in die Linie der Außengruppe (Outgroup) und die der Tineidae, die durch Sequenzdaten der Gattungen *Tineola*, *Tinea*, *Nemapogon*, *Monopis* und *Niditinea* repräsentiert werden. In lediglich 28 % der Bootstrap-Wiederholungen kam es zu einer weiteren Aufspaltung der Tineidae in die beiden Linien *Niditinea+Tinea trinitella* und *Monopis+Nemapogon+Tinea*. Auch die weiteren Aufspaltungsereignisse sind nur mit einer geringen Bootstrap-Wahrscheinlichkeit belegt. Der Bootstrap-Baum macht dies noch einmal durch die polytome Darstellung deutlich (Abb. 4-22).

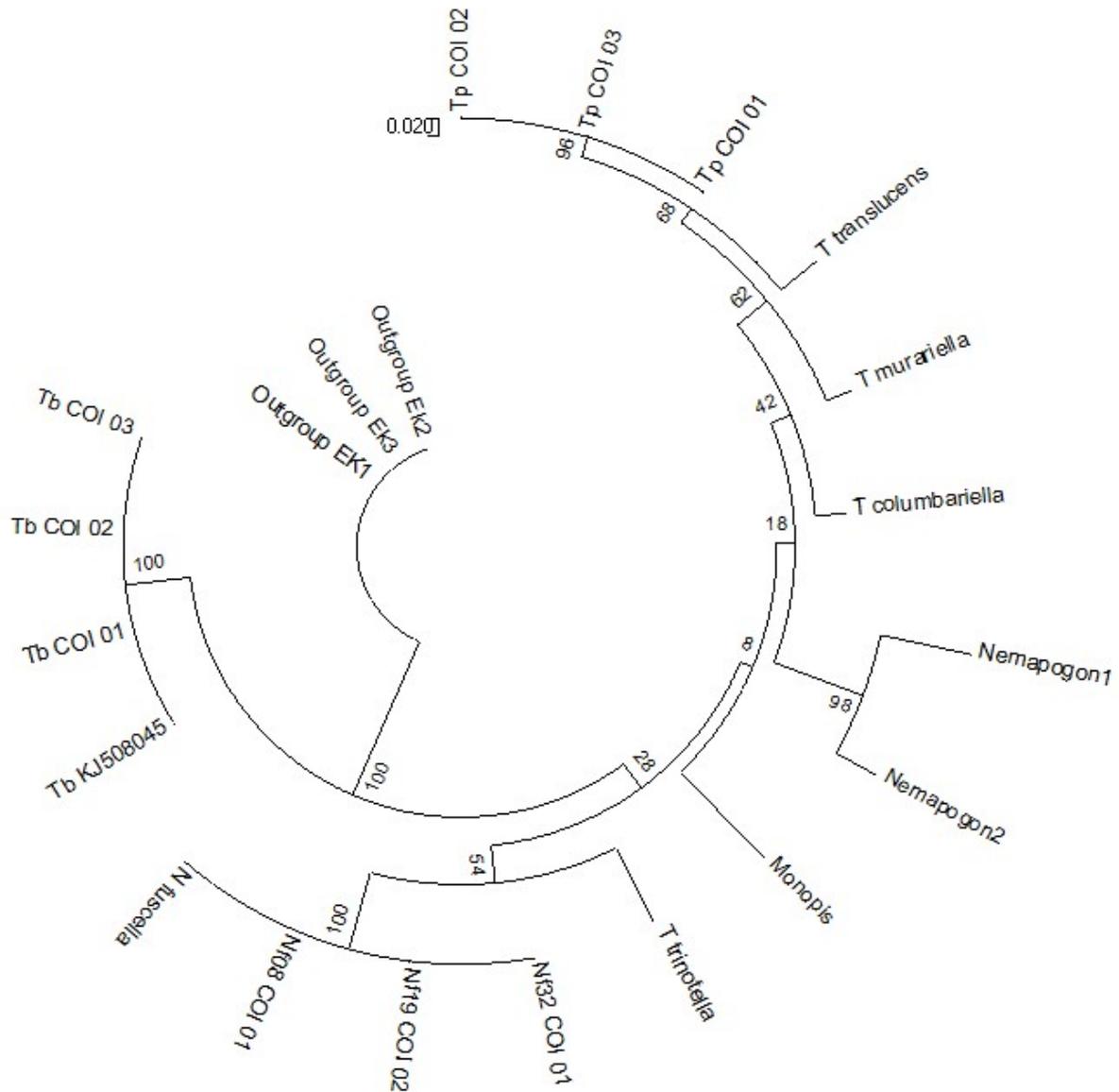


Abb. 4-21: Maximum Likelihood Baum der mt COI Sequenzen einzelner Vertreter der Tineidae, sowie *Ephestia kuehniella* (Pyralidae) als Außengruppe (Outgroup).

Der Baum, basierend auf dem Kimura-2-Parameter Model, mit der höchsten log Likelihood (-1187.1498) ist gezeigt. Die Astlänge spiegelt die Anzahl der Substitutionen pro Nukleotidposition wieder. Es wurden nur die erste und zweite Kodonposition sowie nicht kodierende Positionen berücksichtigt. Die Analyse erfolgte an 21 Sequenzen und 210 Positionen im finalen Datensatz. Erstellung des Baumes mit MEGA 7. (Outgroup EK1 bis EK2 =*Ephestia kuehniella* (JKI), Tb =*Tineola bisselliella* (COI 01 bis 03 =BAM-Zucht, KJ508045 =NCBI-Sequenz), Nf =*Niditinea fuscipunctella* Freilandfang, N fuscella =*Niditinea fuscipunctella* (NCBI-Sequenz), T trinitella =*Tinea trinitella* (NCBI-Sequenz), Monopis =*Monopis laevigella* (NCBI-Sequenz), Nemapogon1 =*Nemapogon tylodes* (NCBI-Sequenz), Nemapogon2 =*Nemapogon granella* (NCBI-Sequenz), T columbariella =*Tinea columbariella* (NCB-Sequenz), T murariella =*Tinea murariella* (NCBI_Sequenz), T translucens =*Tinea translucens* (NCBI-Sequenz), Tp =*Tinea pellionella* (BAM-Zucht))

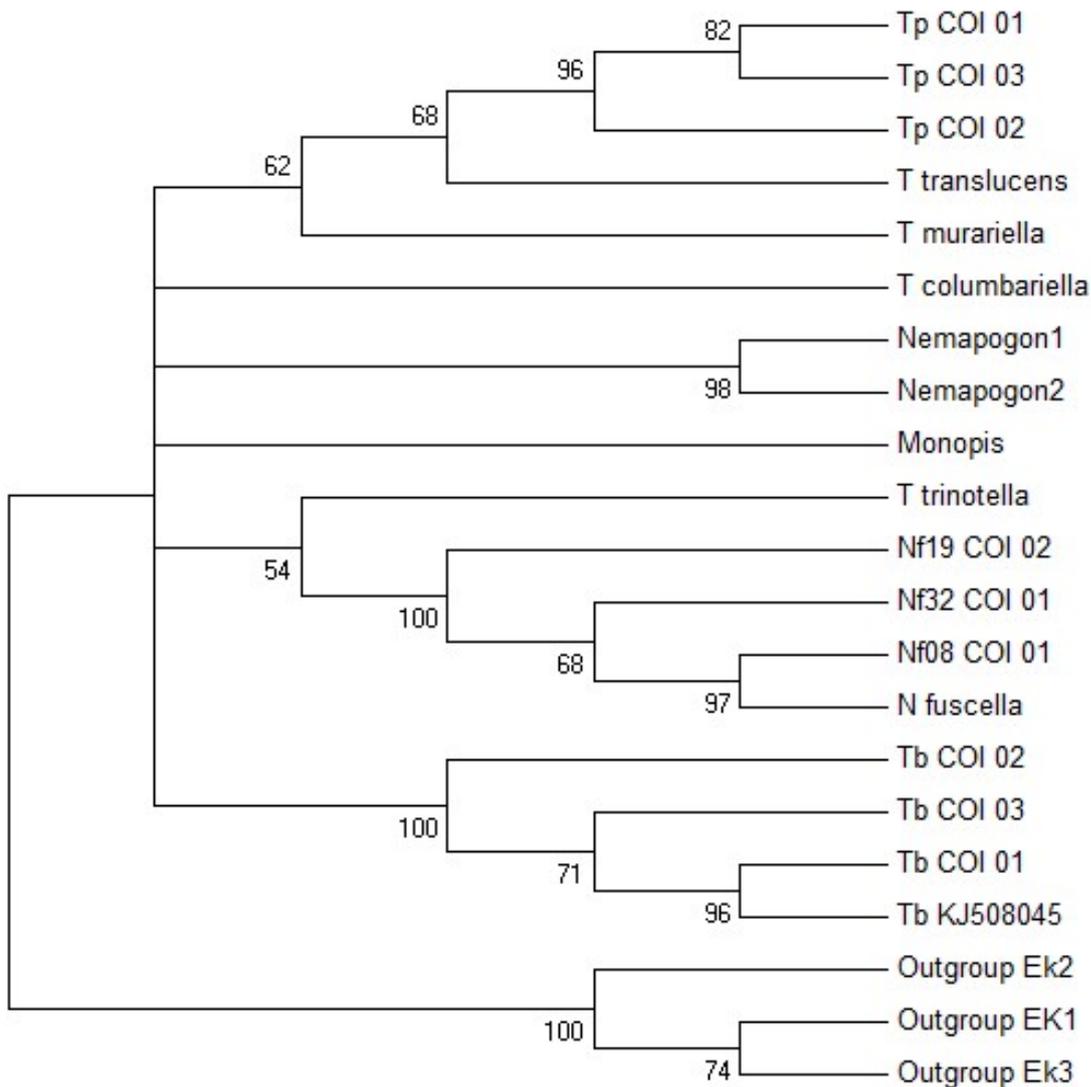


Abb. 4-22: Bootstrap-Konsensus-Baum zur Maximum Likelihood Analyse der COI-Sequenzen der Tineidae mit *Ephestia kuehniella* als Außengruppe.

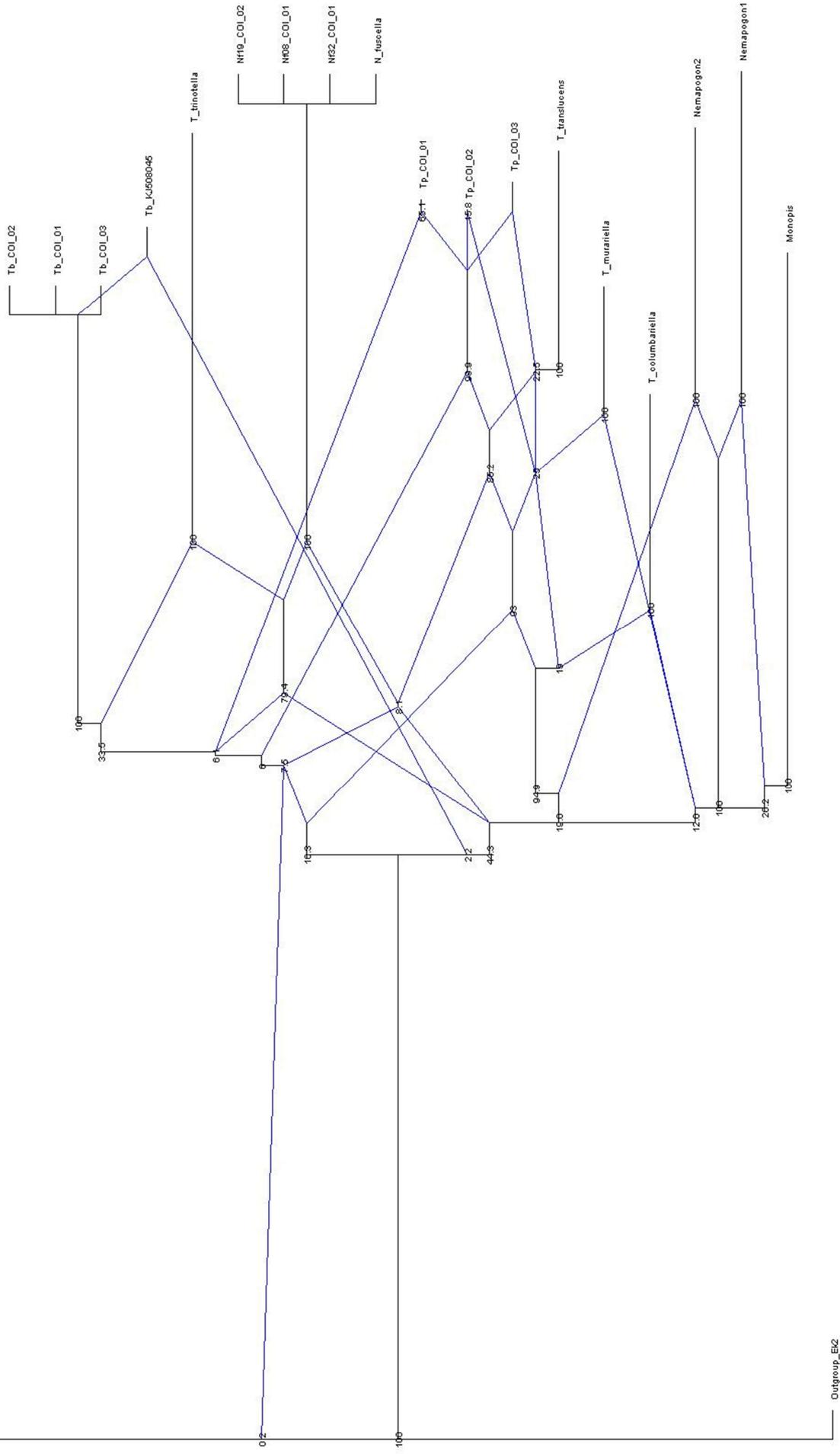
1000 Bootstrap Wiederholungen. Verzweigungen, die in <50 % der Wiederholungen nur stattfanden, sind als gescheitert betrachtet. Berechnungen erfolgten in MEGA 7.

(Outgroup EK1 bis EK2 = *Ephestia kuehniella* (JKI), Tb = *Tineola bisselliella* (COI 01 bis 03 = BAM-Zucht, KJ508045 = NCBI-Sequenz), Nf = *Niditinea fuscipunctella* Freilandfang, N fuscella = *Niditinea fuscipunctella* (NCBI-Sequenz), T trinotella = *Tinea trinotella* (NCBI-Sequenz), Monopis = *Monopis laevigella* (NCBI-Sequenz), Nemapogon1 = *Nemapogon tylodes* (NCBI-Sequenz), Nemapogon2 = *Nemapogon granella* (NCBI-Sequenz), T columbariella = *Tinea columbariella* (NCB-Sequenz), T murariella = *Tinea murariella* (NCBI-Sequenz), T translucens = *Tinea translucens* (NCBI-Sequenz), Tp = *Tinea pellionella* (BAM-Zucht))

Das Distanzverfahren auf der Basis des Neighbor-Net Algorithmus präsentiert die Situation der Polytomie in Form der vielen möglichen Verzweigungen mit jeweils unterschiedlichen Bootstrap-Wahrscheinlichkeiten. Es fällt auf, dass vor allem die Gattung *Tinea* viele mögliche Äste und Verzweigungen im Netzwerk zeigt und *T. pellionella* (Tp_COI 01 bis 03) im Vergleich zu *T. bisselliella* (Tb_COI 01 bis 03) und *N. fuscipunctella* keinen eindeutigen evolutiven Zweig besitzt.

Outgroup_EK1

15.2 Outgroup_EK2



Outgroup_EK2

Abb. 4-23: Phylogenetisches Netzwerk auf der Basis der COI-Sequenzen der Tineidae mit *Ephestia kuehniella* als Außengruppe (Outgroup).

Neighbor-Net Algorithmus, Kimura-2-Parameter Modell, 1000 Bootstrap Wiederholungen (Wahrscheinlichkeiten sind in Prozent an den Knotenpunkten angegeben), Berechnungen erfolgten mit SplitsTree4. (Outgroup EK1 bis EK2 = *Ephestia kuehniella* (JKI), Tb = *Tineola bisselliella* (COI 01 bis 03 = BAM-Zucht, KJ508045 = NCBI-Sequenz), Nf = *Niditinea fuscipunctella* Freilandfang, N fuscilla = *Niditinea fuscipunctella* (NCBI-Sequenz), T trinotella = *Tinea trinotella* (NCBI-Sequenz), Monopis = *Monopis laevigella* (NCBI-Sequenz), Nemapogon1 = *Nemapogon tylodes* (NCBI-Sequenz), Nemapogon2 = *Nemapogon granella* (NCBI-Sequenz), T columbaniella = *Tinea columbaniella* (NCBI-Sequenz), T murariella = *Tinea murariella* (NCBI-Sequenz), T translucens = *Tinea translucens* (NCBI-Sequenz), Tp = *Tinea pellionella* (BAM-Zucht))

Gibt man *Ephestia kuehniella* nicht als Außengruppe vor und lässt aus den Daten das Netzwerk mit einer 95 %igen Wahrscheinlichkeit erstellen, so zeigt sich auch unter dem Neighbor Joining Algorithmus eine polytome aus einem Knoten heraus entstehende phylogenetische Verzweigung. Mit der Ausnahme von *T. trinotella*, die mit *N. fuscipunctella* clustert, sind alle anderen Vertreter der Gattung *Tinea* auf einem Ast zu finden.

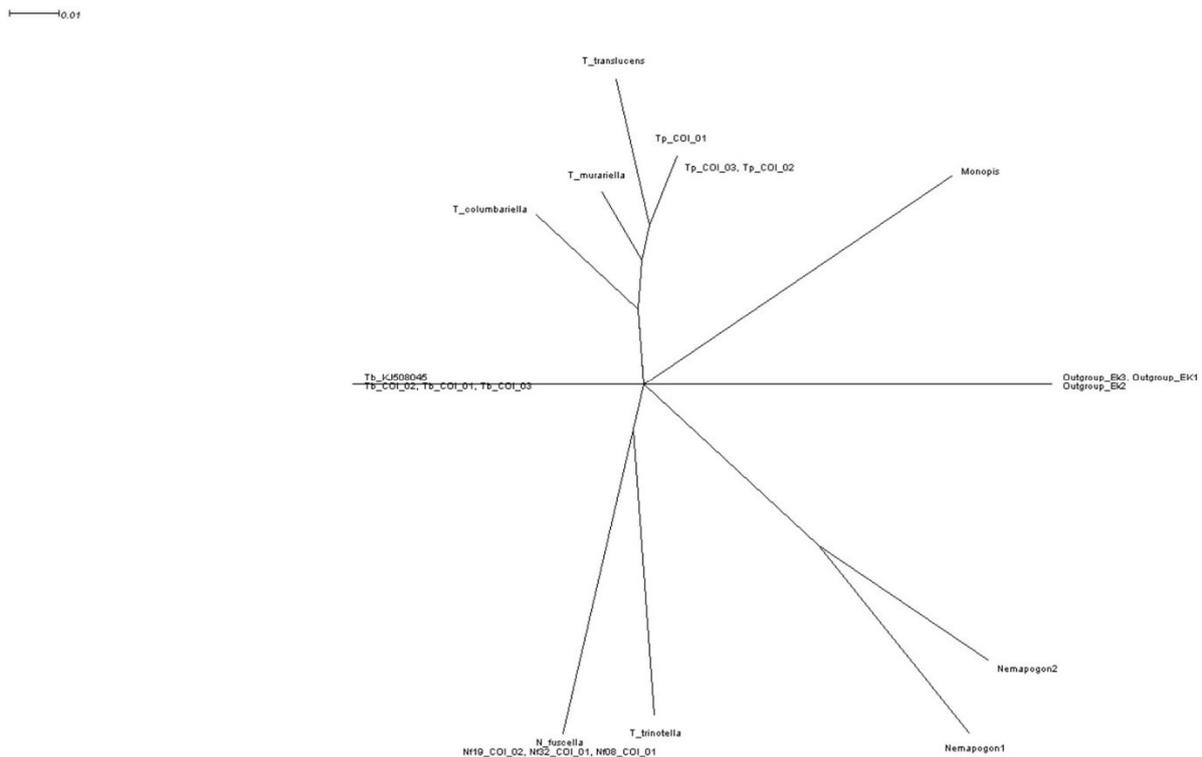


Abb. 4-24: 95 % Wahrscheinlichkeits-Netzwerk der COI-Sequenzen der Tineidae und *Ephestia kuehniella*.

Neighbor-Net Algorithmus, Kimura-2-Parameter Modell (Outgroup EK1 bis EK2 = *Ephestia kuehniella* (JKI), Tb = *Tineola bisselliella* (COI 01 bis 03 = BAM-Zucht, KJ508045 = NCBI-Sequenz), Nf = *Niditinea fuscipunctella* Freilandfang, N fuscilla = *Niditinea fuscipunctella* (NCBI-Sequenz), T trinotella = *Tinea trinotella* (NCBI-Sequenz), Monopis = *Monopis laevigella* (NCBI-Sequenz), Nemapogon1 = *Nemapogon tylodes* (NCBI-Sequenz), Nemapogon2 = *Nemapogon granella* (NCBI-Sequenz), T columbaniella = *Tinea columbaniella* (NCBI-Sequenz), T murariella = *Tinea murariella* (NCBI-Sequenz), T translucens = *Tinea translucens* (NCBI-Sequenz), Tp = *Tinea pellionella* (BAM-Zucht))

4.2.1.2 PHYLOGENETISCHE BETRACHTUNGEN DER TINEIDAE ANHAND DER MITOCHONDRIALEN KONTROLLREGION (CR)

Mithilfe der Sequenzdaten der Kontrollregion zeigt sich im Maximum Likelihood Baum für fast alle betrachteten Arten eine Bootstrap-Wahrscheinlichkeit von 100 %. Für die Art *Tinea pellionella* ist sie mit 99 % nur knapp davon entfernt. Die dargestellte Aufspaltung in die einzelnen Arten ist jedoch nur mit einer Wahrscheinlichkeit von unter 50 % belegt.

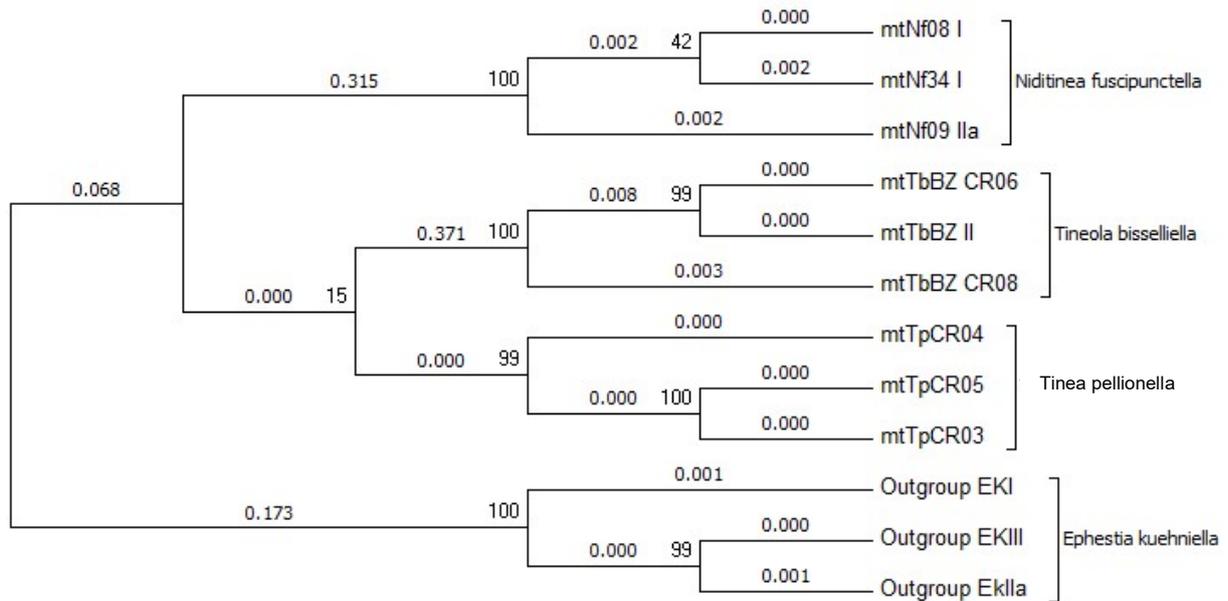


Abb. 4-25: Maximum Likelihood Kladogramm der mt CR Sequenzen einzelner Vertreter der Tineidae, sowie *Ephestia kuehniella* (Pyralidae) als Außengruppe (Outgroup).

Der Maximum Likelihood Baum dieses Kladogramms basiert auf dem Tamura-Nei und zeigt den höchsten log Likelihood (-1267.6578). Die Zahlen über den Ästen spiegeln die Anzahl der Substitutionen pro Nukleotidposition wieder. Die Zahlen an den Knoten entsprechen der prozentualen Bootstrap-Wahrscheinlichkeit anhand von 1000 Wiederholungen. Die Analyse erfolgte an 12 Sequenzen und 592 Positionen im finalen Datensatz. Erstellung des Baumes mit MEGA 7. (Outgroup EK1 bis EK2 = *Ephestia kuehniella* (JKI), TbBZ = *Tineola bisselliella* (BAM-Zucht), Nf = *Niditinea fuscipunctella* Freilandfang, Tp = *Tinea pellionella* (BAM-Zucht))

4.2.2 PHYLOGENIE AUF DER EBENE DER SUBSPEZIES

4.2.2.1 DIE PHYLOGENIE DER *TINEOLA BISSELLIELLA* POPULATIONEN VERSCHIEDENER FALLENSTANDORTE ANHAND DER CYTOCHROMOXIDASE I (COI)

Für die Cytochromoxidas I stand auf der Ebene der Subspezies jeweils nur eine Sequenz der sieben betrachteten Standorte zur Analyse zur Verfügung. Die Sequenzprobe des Fallenstandortes FL35 unterscheidet sich von den anderen COI Sequenzen am stärksten, sie weist die höchste Substitutionsrate auf. Eine Substitutsrate von „Null“ haben die Sequenzen der Standorte Tb14, TbFU

und Tb43 zueinander, sie grenzen sich aber durch eine Rate von 0,01 Substitution pro Nukleotidposition gegenüber den Sequenzen der Standorte TbBZ und Tb08 ab. Insgesamt zeigt sich eine sehr geringe Substitutionsrate unter den einzelnen Sequenzen.

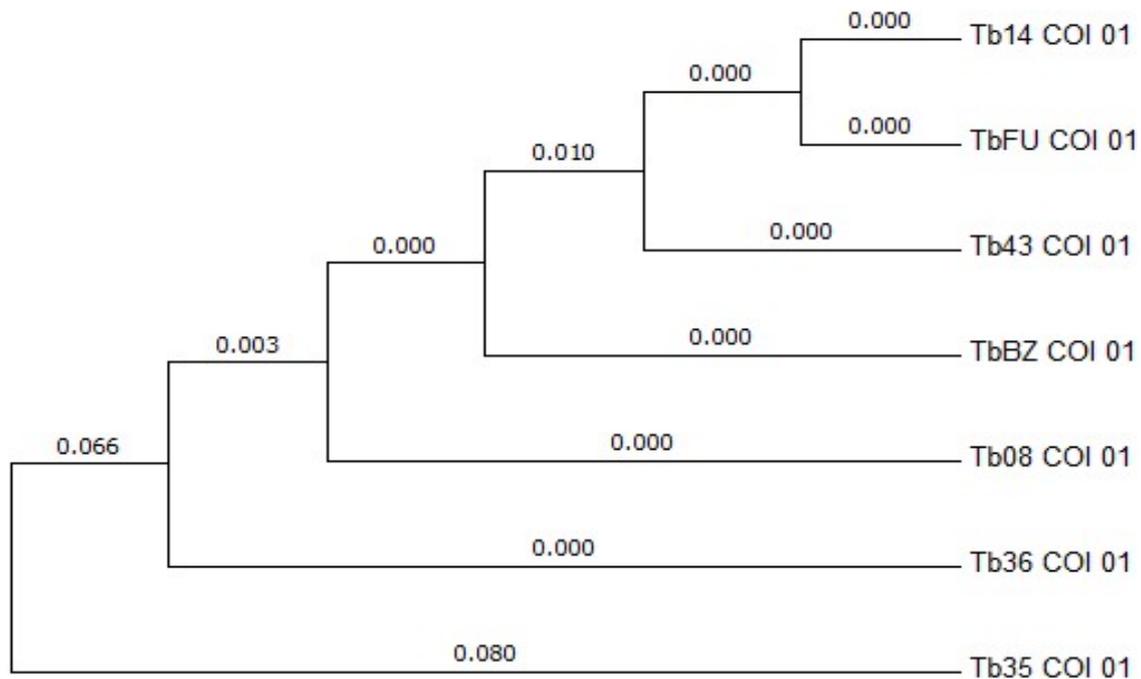


Abb. 4-26: Kladogramm zum Maximum Likelihood Baum der mit COI Sequenzen von *Tineola bisselliella* verschiedener Standorte

Der Baum, basierend auf dem Kimura-2-Parameter Model, mit der höchsten log Likelihood (-580.8317) ist gezeigt. Die Zahlen über den Ästen spiegeln die Anzahl der Substitutionen pro Nukleotidposition wieder. Die Analyse erfolgte mit 7 Sequenzen und 290 Positionen im finalen Datensatz. Die Berechnungen erfolgten mit MEGA 7. (BZ =BAM-Zucht, 35 = FL35, 36 = FL36, 08 = FL08, 43 = FL43, FU =FLFU, 14 = FL04)

4.2.2.2 DIE PHYLOGENIE DER *TINEOLA BISSELLIELLA* POPULATIONEN VERSCHIEDENER FALLENSTANDORTE ANHAND DER KONTROLLREGION (CR)

Die Maximum Likelihood Analyse der CR-Sequenzen der Kleidermotte zeigt eine Spaltung in zwei Gruppen (Abb. 4-27). Es lassen sich drei Einzelfälle identifizieren, in denen je eine Sequenz des Standortes im Vergleich zu den verbleibenden Sequenzen dieses Standortes (FL09, FL44 und FL35) in der gegenüberliegenden Gruppe zu finden ist. Sie sind in der Abbildung oval eingefasst. Für den Standort FL26 ergibt sich als einziges eine Monophylie, die in 82 % der Bootstrap-Wiederholungen wiederzufinden ist. Dieser Bereich ist im Stammbaum mit einer Kastenumrahmung hervorgehoben. Die Berechnung des phylogenetischen Netzwerkes nach dem Neighbor-Net Algorithmus zeigt mit diesem Datensatz kein anderes Bild und liefert keine neuen Informationen, so dass auf die Betrachtung an dieser Stelle verzichtet wird.

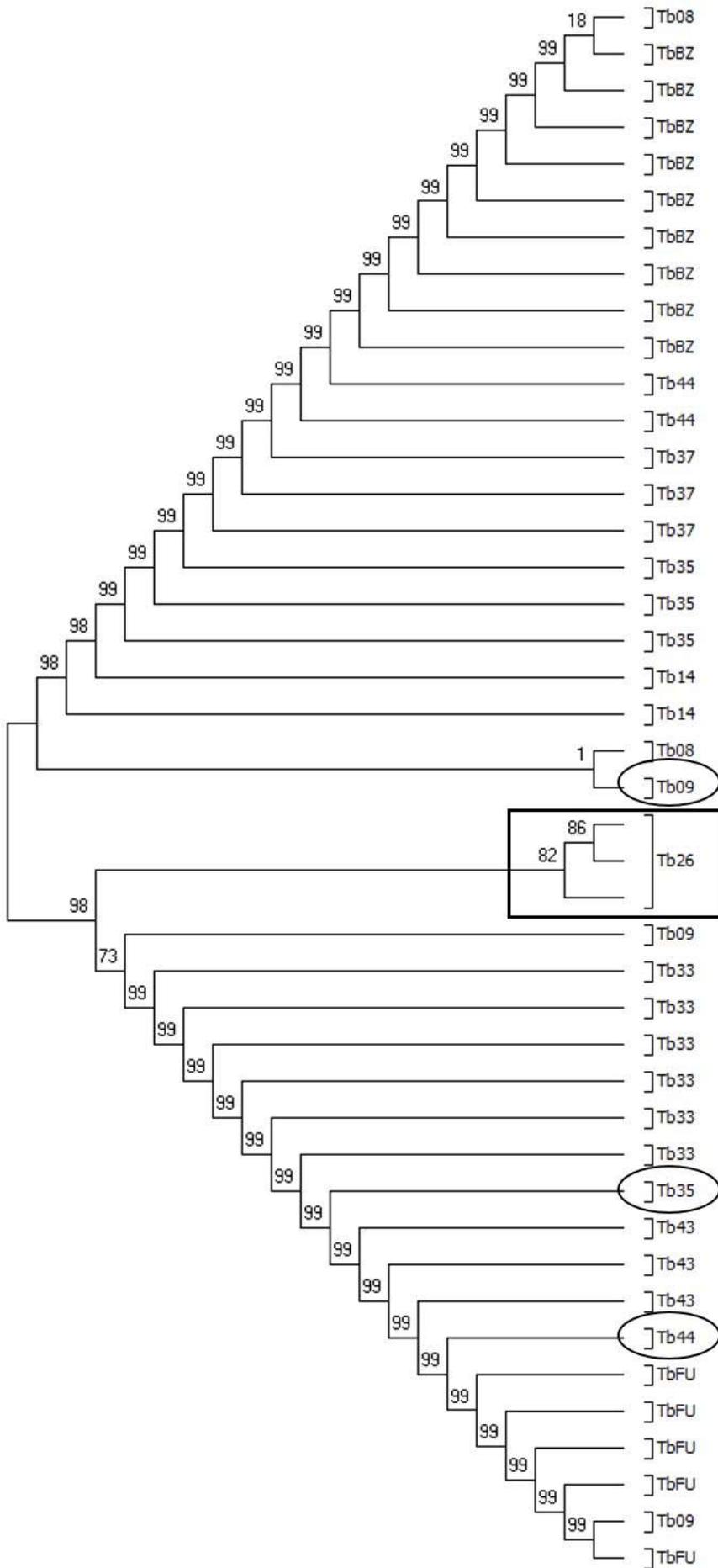


Abb. 4-27: Kladogramm zum Maximum Likelihood Baum der mt CR Sequenzen von *Tineola bisselliella* verschiedener Standorte

Der Maximum Likelihood Baum dieses Kladogramms basiert auf dem Tamura-Nei Model und zeigt den höchsten log Likelihood (-491.8716). Die Zahlen über den Ästen an den einzelnen Knoten entsprechen der prozentualen Bootstrap-Wahrscheinlichkeit in 1000 Wiederholungen. Die Analyse erfolgte an 43 Sequenzen von 11 verschiedenen Standorten und 541 Sequenzpositionen im finalen Datensatz. Die Berechnungen erfolgten mit MEGA 7. Oval umfasste Sequenzproben befinden sich von den anderen Proben ihres Standortes phylogenetisch getrennt. Der schwarze Kasten kennzeichnet die monophyletische Gruppe, in der alle Vertreter eines einzigen Standortes vereint sind. (BZ =BAM-Zucht, 35 = FL35, 08 = FL08, 43 = FL43, FU =FLFU, 14 = FL04, 44 = FL44, 37 = FL37, 09 = FL09, 33 = FL33, 26 = FL26)

4.2.3 BOX-PCR-BANDENMUSTER UND GENETISCHE DISTANZEN

4.2.3.1 TESTLAUF DER BOX-PCR

Ein erster Testlauf der BOX-PCR mit sechs verschiedenen mtDNA-Extrakten führte zu eindeutigen Bandenmustern, die sich in einem Agarose-Gel mit den unter Abschnitt 3.5.3.1 beschriebenen Parametern gut auftrennen ließen (Abb. 4-28).

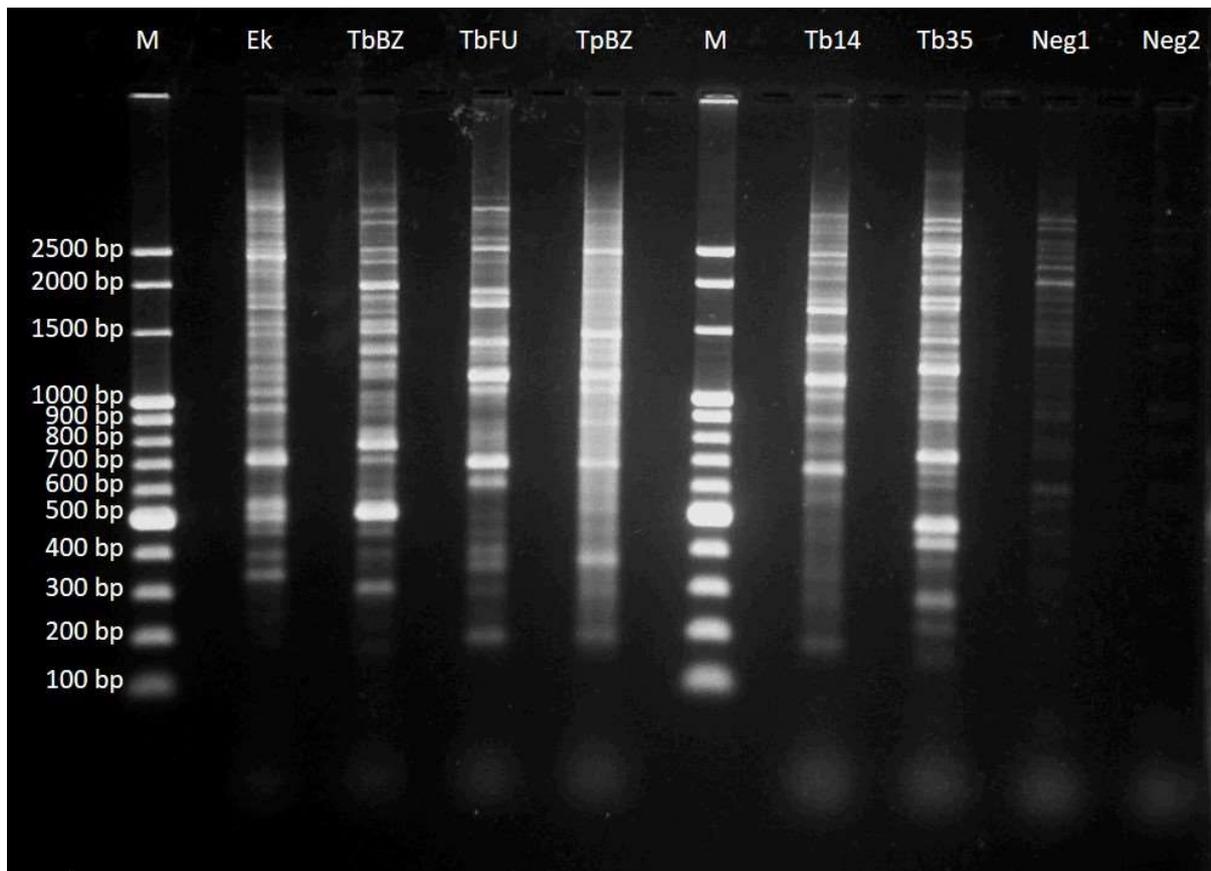


Abb. 4-28: Agarosegelbild zur mtDNA basierten BOX-PCR mit dem Primer BOXA 1R und der Taq DNA Polymerase von Thermo Scientific.

(M = 100 bp Marker von Roboklon, Ek = Probe mtEK0608 (*E. kuehniella*, JKI), TbBZ = Probe mtTbBZ0708x (*T. bisselliella*, BAM-Zucht), TbFU = Probe mtTbFU0708x (*T. bisselliella*, FU-Berlin), TpBZ = Probe mtTpBZ0708x (*T. pellionella*, BAM-Zucht), Tb14 = Probe mtTb14 0708 (*T. bisselliella*, FL14), Tb35 = Probe mtTb35 0708 (*T. bisselliella*, FL35), Neg1 = keine DNA, Neg2 = keine DNA, kein DMSO) bei einer Annealingtemperatur von 53° C, Einsatz von 52-120 ng mtDNA, Auftrag von 10 µl PCR-Ansatz und 10 µl Marker.

Sowohl die einzelnen Arten im Vergleich, *E. kuehniella* (Ek), *T. bisselliella* (Tb) und *T. pellionella* (Tp) als auch die Vertreter verschiedener Standortpopulationen von *T. bisselliella* (TbBZ, TbFU, Tb14 und Tb35) zeigen unterschiedliche Bandenmuster auf. Die BOX-PCR zur Probe TpBZ lässt ein starkes Hintergrundleuchten erkennen und die Negativkontrolle Neg1 ist im Vergleich zu Neg2 nicht sauber.

4.2.3.2 QUALITATIVE ANALYSE DER BOX-PCR

Die qualitative Analyse der BOX-PCR lässt sich in vier Abschnitte gliedern. Zum einen wurde die Möglichkeit der Kontaminationen mit bakterieller DNA sowohl aus der Polymerase (4.2.3.2.1) als auch dem Darm der Falter (4.2.3.2.4) untersucht, zum anderen die Reproduktion der erhaltenen Bandenmuster (4.2.3.2.2) und die individuelle Variabilität innerhalb einer Population (4.2.3.2.3).

4.2.3.2.1 EINFLUSS DER POLYMERASE AUF DIE BANDENMUSTER DER BOX-PCR

Ob die verwendete Polymerase aufgrund einer möglichen Kontamination mit bakterieller DNA die BOX-PCR-Ergebnisse beeinflusst, wurde mithilfe der 16S rRNA-PCR überprüft (3.5.2.4.1).

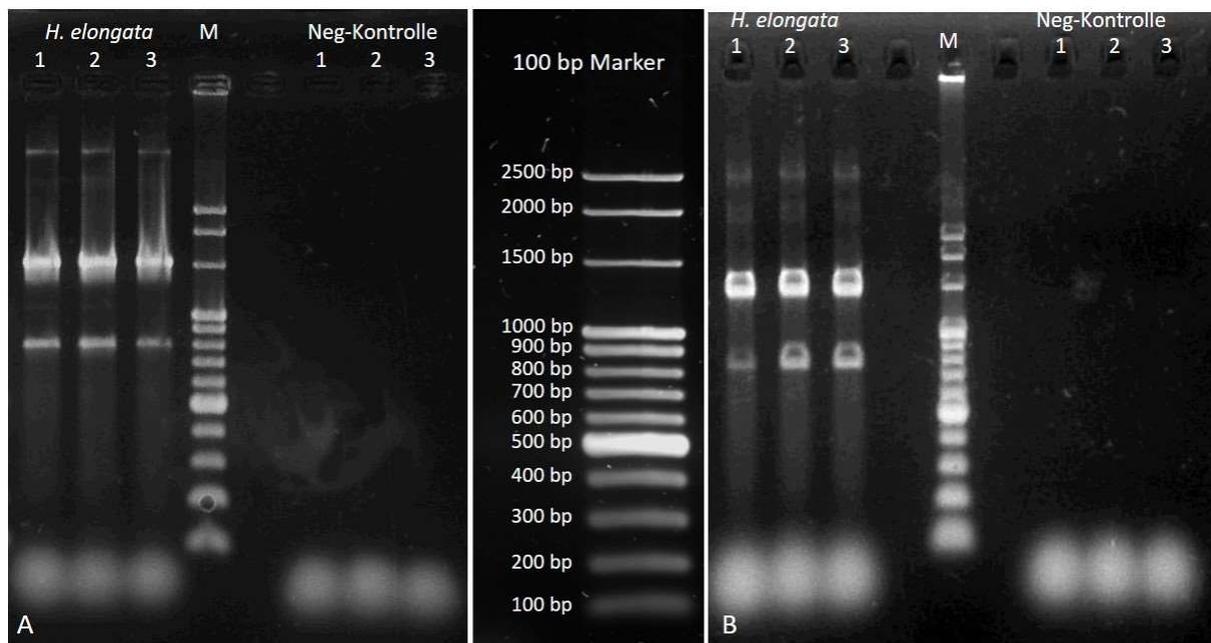


Abb. 4-29: Agarosegelbild zur 16S rRNA-PCR mit der *Taq*-DNA-Polymerase von Thermo Scientific (A) bzw. der *AmpliTaQ* LD von Lifescience (B) und den Primern 27F und 1492R bei drei unterschiedlichen Annealingtemperaturen (1 = 46,3° C, 2 = 49,7° C, 3 = 53,8° C) und 30 Zyklen, M = 100 bp Marker von Roboklon, Einsatz von 40 ng gDNA von *H. elongata* als Positivkontrolle, Neg-Kontrolle erfolgte ohne DNA-Einsatz, Auftrag von 5 µl PCR-Produkt und 5 µl Marker.

Bei allen drei Annealingtemperaturen zeigen die Negativkontrollen keine Banden (Abb. 4-29). Die Positivkontrollen mit genomischer DNA von *H. elongata* enthalten eine besonders starke Bande bei etwa 1500 bp und zwei weitere Banden bei ~800 bp und weit über 2500 bp. Sowie vereinzelt zwei äußerst schwache Banden im Bereich von 1100 bp und etwas über 2500 bp.

4.2.3.2.2 TEST AUF WIEDERHOLBARKEIT

Die Reproduzierbarkeit der aus der BOX-PCR erhaltenen Bandenmuster wurde sowohl bei parallelen Reaktionsansätzen als auch zeitlich zueinander versetzten Ansätzen und somit in PCR-Programmen an verschiedenen Tagen untersucht.

Einen ersten Eindruck lieferten vier mtDNA-Proben der Kleidermotte, die in je zwei parallelen Ansätzen das BOX-PCR-Programm zur gleichen Zeit durchliefen (Abb. 4-30).

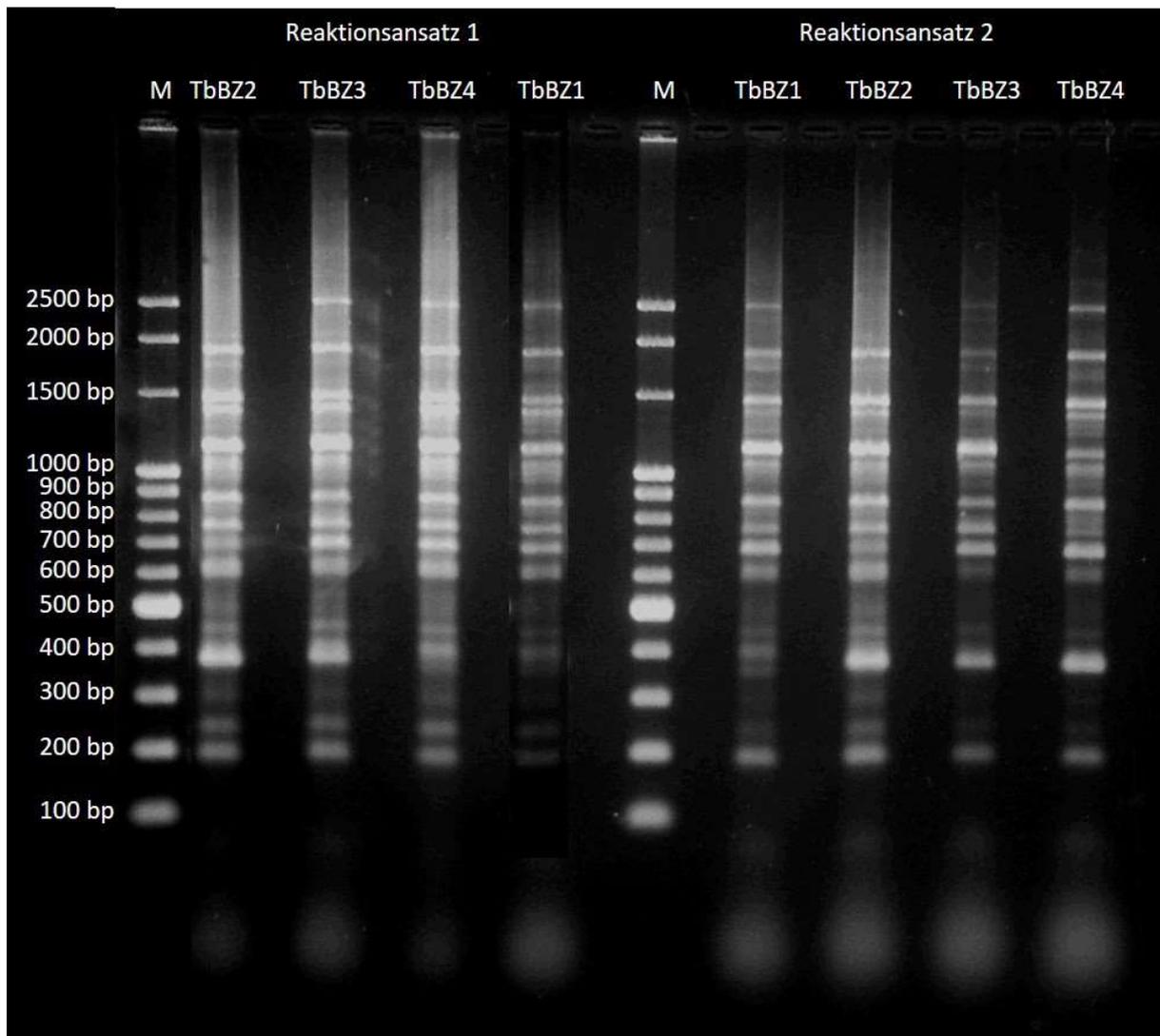


Abb. 4-30: Agarosegelbild zur mtDNA-basierten BOX-PCR mit dem Primer BOX A1R und der *Taq*-DNA-Polymerase von Fermentas (M = 100 bp Marker von Roboklon, TbBZ1 = Probe mtTbBZ1408_1 (*T. bisselliella*, BAM-Zucht), TbBZ2 = Probe mtTbBZ1408_2 (*T. bisselliella*, BAM-Zucht), TbBZ3 = Probe mtTbBZ1408_3 (*T. bisselliella*, BAM-Zucht), TbBZ4 = Probe mtTbBZ1408_6 (*T. bisselliella*, BAM-Zucht), Einsatz von 40 ng mtDNA, Auftrag von 10 µl PCR-Ansatz und 5 µl Marker).

Vergleicht man beide Reaktionsansätze der jeweiligen Proben miteinander, so fällt zunächst allgemein auf, dass der zweite Ansatz (Reaktionsansatz 2) bei allen Proben ein etwas schwächeres Bandenmuster zeigt. Das Bandenmuster selbst schaut für die beiden Reaktionsansätze einer jeden

Probe übereinstimmend aus, jedoch sind die Intensitätsunterschiede einzelner Banden so stark, dass manche nahezu verschwunden sind. Dies wird vor allem an den Banden <400 bp der BOX-PCR-Muster von Probe TbBZ3 und TbBZ4 im Reaktionsansatz 2 deutlich.

Eine Wiederholung der BOX-PCR mit den mtDNA-Proben mtTbBZ1408_1 (TbBZ1), mtTbBZ1408_2 (TbBZ2) und mtTbBZ1408_3 (TbBZ3) in erneut zweifacher Ausführung wurde den vorangegangenen Ergebnissen mithilfe der Kapillargelelektrophorese gegenübergestellt (Abb. 4-31).

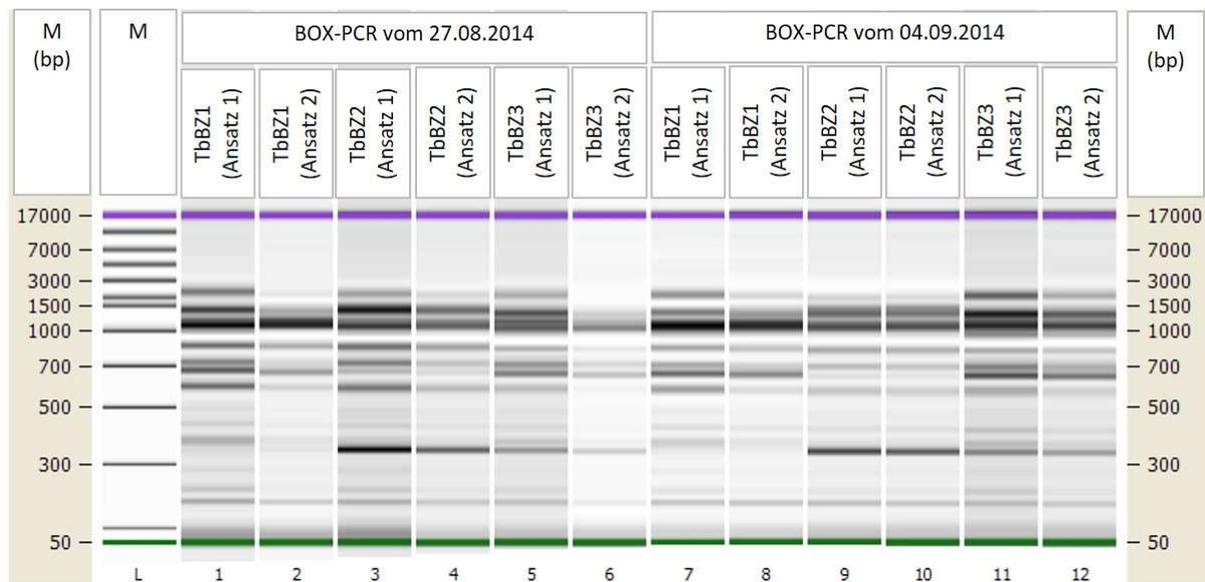


Abb. 4-31: Geldarstellung zum Agilent DNA Chip 12000 mit 12 mtDNA basierten BOX-PCR-Ergebnissen mit dem Primer BOX A1R und der *Taq*-DNA-Polymerase von Thermo Scientific bei einem Einsatz von ~40 ng mtDNA (M = Agilent DNA Leiter (L) mit einem 50 bp Marker (grün) und einem 17.000 bp Marker (violett), TbBZ1 = Probe mtTbBZ1408_1 (*T. bisselliella*, BAM-Zucht), TbBZ2 = Probe mtTbBZ1408_2 (*T. bisselliella*, BAM-Zucht), TbBZ3 = Probe mtTbBZ1408_3 (*T. bisselliella*, BAM-Zucht), TbBZ4 = Probe mtTbBZ1408_6 (*T. bisselliella*, BAM-Zucht)), Auftrag von 1 µl PCR-Produkte.

In dieser Übersicht wird erneut der Intensitätsunterschied deutlich, der sich für ein und dieselbe mtDNA-Probe in den einzelnen BOX-PCRs im Vergleich zeigt. Besonders Probe TbBZ3 weist in allen vier Wiederholungen jeweils eindeutige Unterschiede in den Bandenstärken auf. Schwach erkennbare Banden in der Wiederholung TbBZ3 (Ansatz 1) vom 04.09.2014 fehlen bei der Wiederholung TbBZ3 (Ansatz 2) vom 27.08.2014 teilweise sogar ganz. Die Betrachtung aller dargestellten Proben scheint jedoch ein übereinstimmendes Grundmuster erkennen zu lassen.

Greift man sich einzelne Gegenüberstellungen von BOX-PCR-Mustern heraus, so lassen sich die unterschiedlichen Bandenintensitäten bei gleichbleibenden Muster am besten im Elektropherogramm veranschaulichen (Abb. 4-32 und Abb. 4-33).

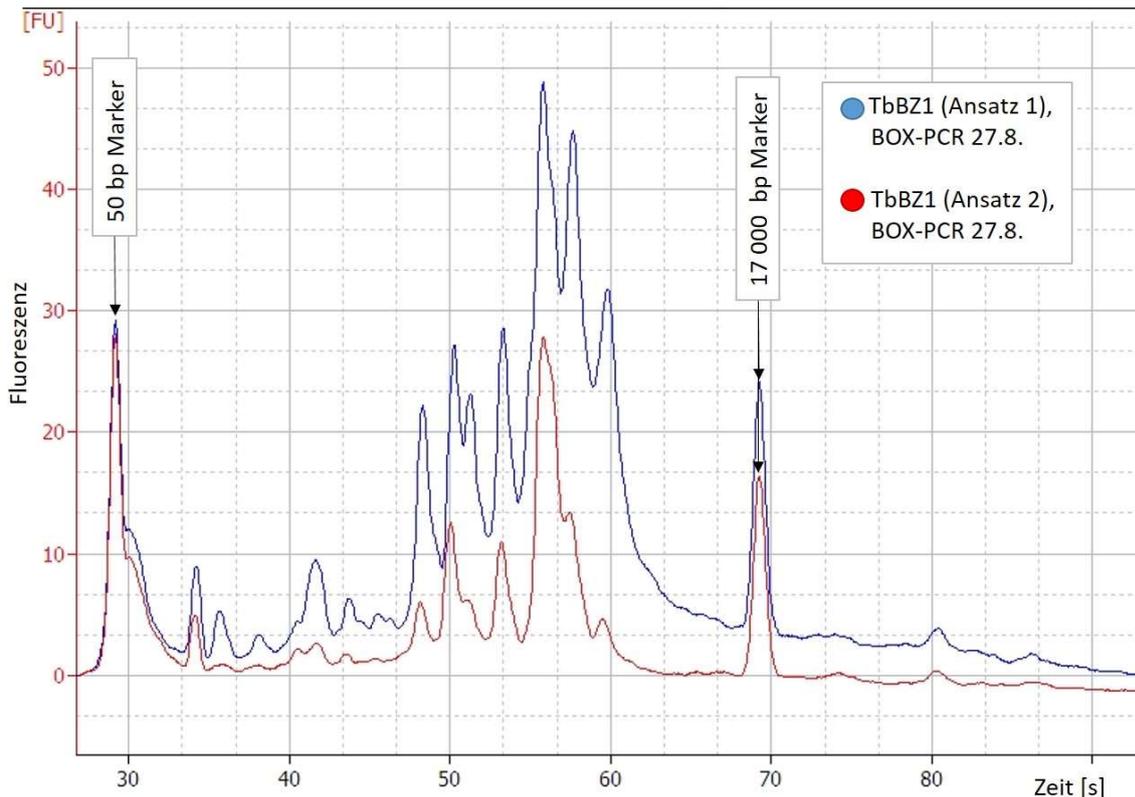


Abb. 4-32: Elektropherogramm-Darstellung der Fluoreszenzwerte über die Zeit zu den Bandenmustern der BOX-PCR-Ergebnisse von TbBZ1 (Ansatz 1) und TbBZ1 (Ansatz 2) vom 27.08.14 mit dem Agilent DNA Chip 12000.

Die parallele Wiederholung der BOX-PCR mit demselben mtDNA-Extrakt (TbBZ1 = mtTbBZ1408_1 (*T. bisselliella*, BAM-Zucht)) zeigt für den Ansatz 1 eine eindeutig höhere Fluoreszenz für alle Peaks an als für den Ansatz 2. Die Lage der Peaks beider Ansätze ist nur in einigen Fällen minimal zueinander verschoben.

Auch im Vergleich der Elektropherogramme der beiden BOX-PCR-Ergebnisse aus versetzt erfolgten Reaktionen offenbart sich klar der Unterschied in den Fluoreszenzstärken. Darüber hinaus sind die Peaks beider BOX-PCRs stärker zueinander verschoben als es im Vergleich der parallel erfolgten PCRs der Probe TbBZ1 zu erkennen war. Die beiden Fluoreszenzmarker (50 bp Marker und 17 000 bp Marker) sind ebenfalls bei beiden Proben im Vergleich mit einer unterschiedlichen Fluoreszenzstärke wiedergegeben. Im Bereich von ~55 bp bildet die Probe TbBZ3 (Ansatz 1) in der BOX-PCR 27.8. (roter Graph) eindeutig zwei Peaks aus, während sie in der BOX-PCR 4.9. nur einen Peak zeigt.

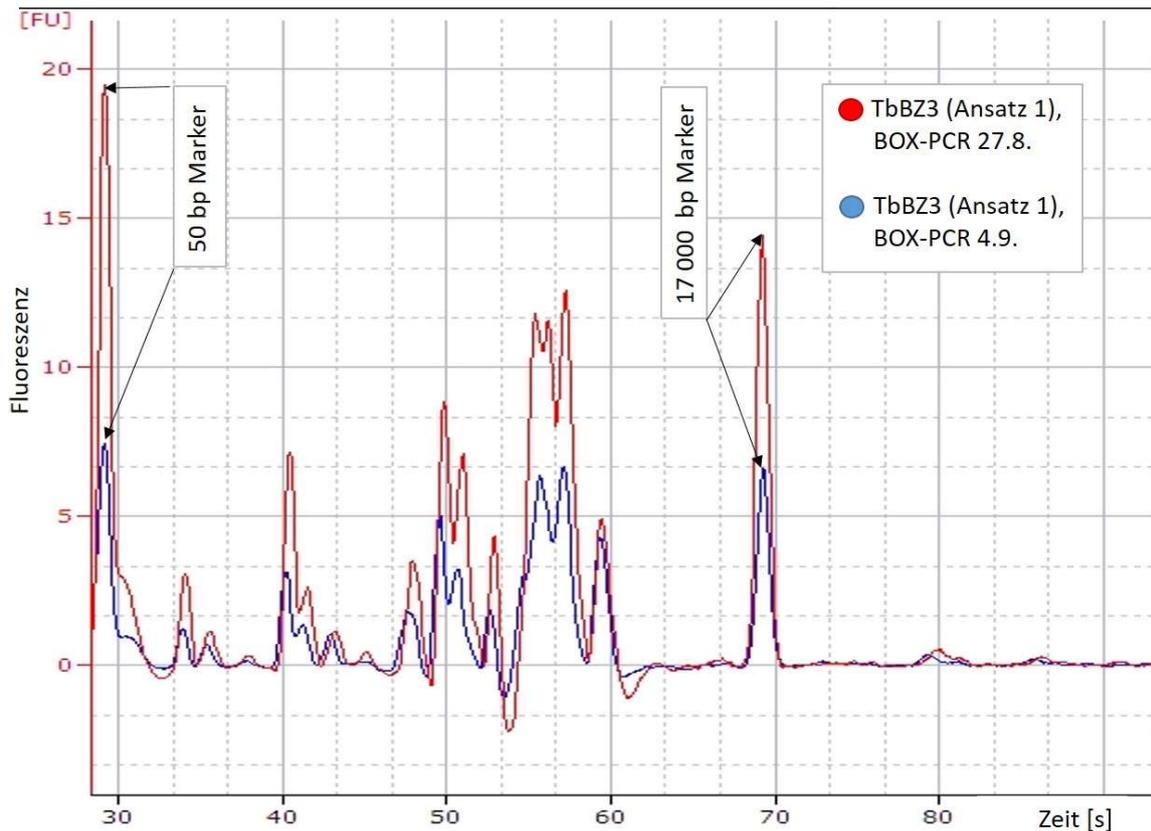


Abb. 4-33: Elektropherogramm-Darstellung der Fluoreszenzwerte über die Zeit zu den Bandenmustern der BOX-PCR-Ergebnisse von TbBZ3 (Ansatz 1) vom 27.8.14 und TbBZ3 (Ansatz 1) vom 04.09.14 mit dem Agilent DNA Chip 12000.

Betrachtet man die einzelnen Messdaten der BOX-PCR-Bandenmuster, so fällt auf, dass einzelne Bandengrößen nicht bei allen PCR-Ergebnissen auftreten und es sich dabei nicht nur um Banden mit einer eher geringen Konzentration handelt (Tab. 4-1). So findet man zum Beispiel gerade in den Proben mit einer geringeren DNA-Gesamtkonzentration (TbBZ1 (Ansatz 2) 27.8 und TbBZ1 (Ansatz 2) 4.9) Banden mit der Größe von 1187 bp bzw. 1140 bp, die eine DNA-Konzentration von 4,27 ng bzw. 3,56 ng aufweisen. In den anderen beiden Proben fehlen diese Fragmentgrößen komplett. Die grau hinterlegten Messdaten repräsentieren die Banden, die in allen vier Wiederholungen eindeutig anzutreffen waren, zwölf von insgesamt neunzehn detektierten. Darüber hinaus existieren zwei weitere Banden (Nr. 9 und 21), die in allen vier Reaktionsansätzen mit nur sehr geringer Konzentration auftreten und in den meisten Ansätzen unterhalb der Detektionsgrenze des Bioanalyzers liegen. Die Fragmentgrößen untereinander lassen sich signifikant unterscheiden.

Tab. 4-1: Größe und Konzentration der einzelnen DNA-Banden der Probe TbBZ1 (mtTbBZ1408_1 (*T. bisselliella*, BAM-Zucht)) in allen vier BOX-PCR-Ergebnissen.

Banden mit einer Konzentration unterhalb der Detektionsgrenze des Bioanalyzers (<0,1 ng/μl) sind in grauer Schrift dargestellt. Bandenbereiche, die in allen Reaktionsansätzen eine Konzentration ≥0,1 ng/μl besitzen sind grau hinterlegt. Leere Felder symbolisieren das Fehlen einer entsprechenden Bandengröße.

Bandennr.	TbBZ1 (Ansatz 1) 27.8.		TbBZ1 (Ansatz 2) 27.8.		TbBZ1 (Ansatz 1) 4.9.		TbBZ1 (Ansatz 2) 4.9.	
	Größe [bp]	Konz. [ng/μl]	Größe [bp]	Konz. [ng/μl]	Größe [bp]	Konz. [ng/μl]	Größe [bp]	Konz. [ng/μl]
1	74	4,22	75	4,25	85	3,11		
2	185	2,03	184	1,37	182	2,39	180	1,38
3	222	1,36	226	0,36	217	1,11	219	0,18
4	285	0,58	278	0,27	278	0,51	273	0,10
5	350	0,51	351	0,64				
6	383	2,44	383	0,82	378	2,90	376	0,86
7	442	0,62	435	0,24	431	0,92	428	0,36
8	464	0,14						
9	493	0,23	487	0,07	482	0,41	477	0,06
10	524	0,06						
11	603	3,59	598	1,05	586	3,56	582	0,64
12	678	3,78	672	2,79	665	4,82	661	2,83
13	739	2,36	722	0,79	714	2,47	696	0,64
14	879	2,65	873	1,96	861	2,36	850	1,10
15	1.125	8,29	1.122	5,06	1.092	13,10	1.088	4,03
16			1.187	4,27			1.140	3,56
17	1.434	4,76	1.401	2,08	1.373	4,02	1.328	2,28
18	2.357	3,04	2.200	0,23	2.149	3,47	2.111	0,53
19							4.604	0,04
20			7.498	0,06				
21	9.298	0,03	9.467	0,07	9.856	0,05	9.649	0,11
Gesamt-DNA-Menge		40,72	26,36		45,20		18,70	

Um die Variation innerhalb der BOX-PCR besser abschätzen zu können, muss jedoch auch die Variation der Messung selbst berücksichtigt werden. Hierbei hilft die Betrachtung einer Mehrfachmessung von ein und derselben Probe. Zwei unterschiedliche Proben wurden in diesem Zusammenhang getestet. Der 100 bp Plus Marker von Fermentas besteht aus vierzehn, über die Chromatographie aufgereinigte Markerbanden. Die zwölfmalige Messung der Fragmentgröße der einzelnen Banden mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer zeigt je nach Bandengröße eine unterschiedlich starke Variation der Messwerte (Abb. 4-34). Der Interquartilsabstand wird ab der Bandengröße von 1200 bp eindeutig erkennbar und die Variationsbreite umfasst nahezu 100 bp.

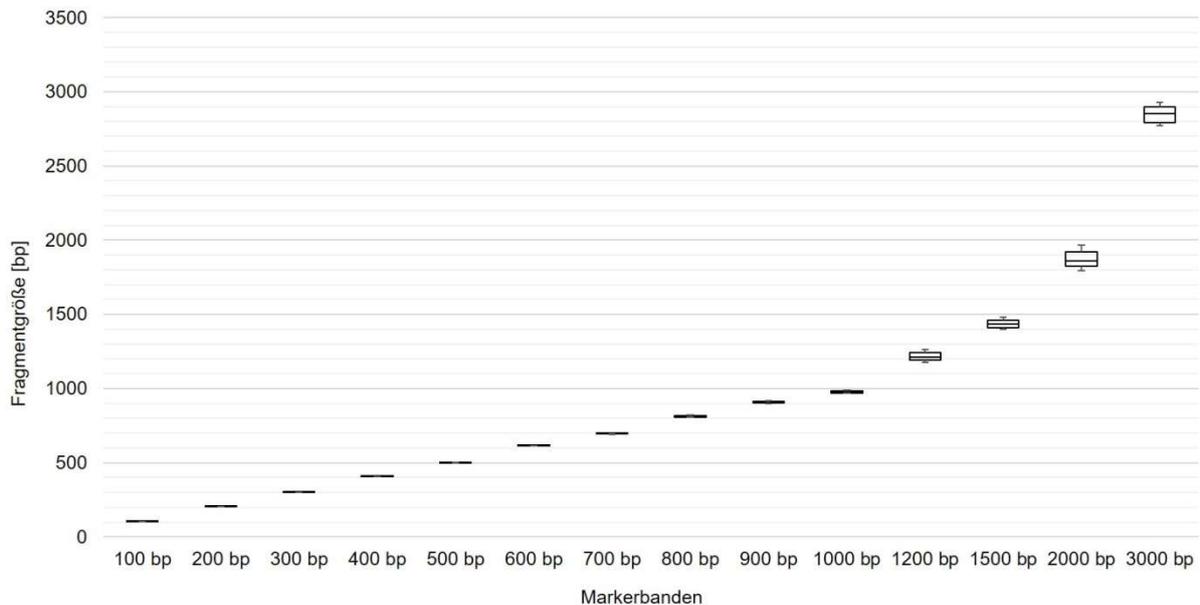


Abb. 4-34: Boxplots der Messreihe zur Fragmentgröße der Banden des 100 bp Plus Markers (Fermentas) mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer.

Auftrag von 1 µl Marker (0,5 µg/µl) je Well des Agilent DNA Chip 12000, Bildung des Medians und dem Interquartilsabstand, die Fehlerbalken stellen das Maximum bzw. Minimum dar und geben somit die Variationsbreite an.

Die Messwiederholungen an einer biologischen Probe, dem BOX-PCR-Muster eines Kleidermotten-individuums aus der Zucht, zeigen ähnlich wie beim 100 bp Plus Marker zu höheren Fragmentgrößen hin einen größer werdenden Interquartilsabstand und eine weitere Variationsbreite (Abb. 4-35). Trotz der teilweise starken Nähe der Banden, vor allem im Bereich der kleineren Fragmentgrößen, sind alle Fragmentgrößen zueinander signifikant unterschiedlich.

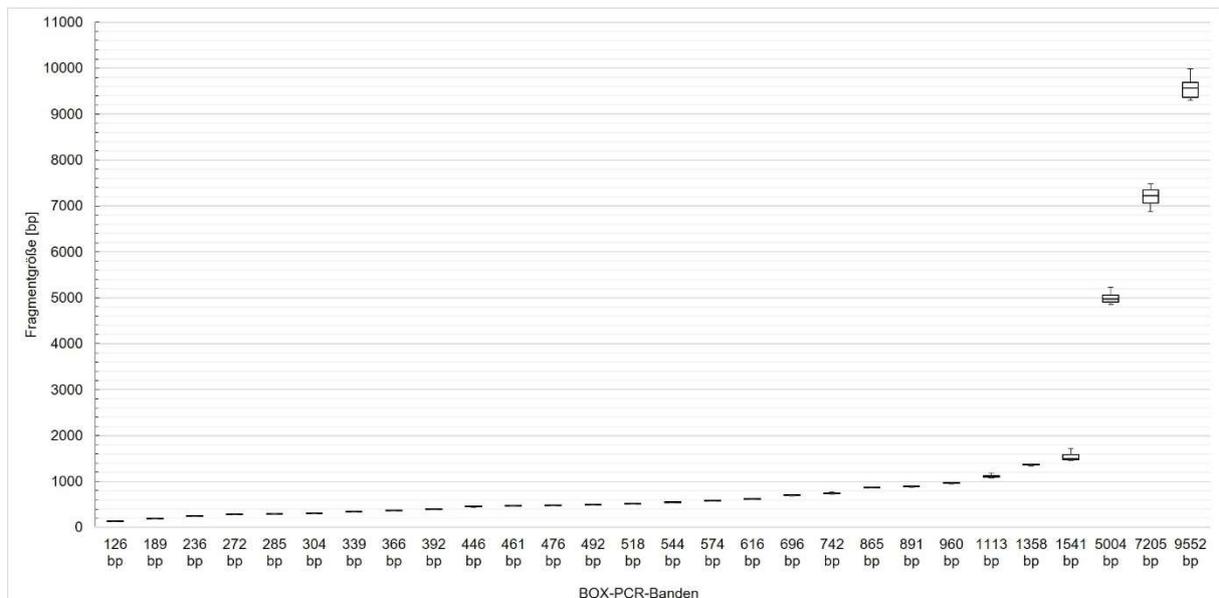


Abb. 4-35: Boxplots der Messreihe zur Fragmentgröße der Banden des BOX-PCR-Musters von *Tineola bisselliella* (BAM-Zucht) mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer.

Auftrag von 1 µl desselben BOX-PCR-Produkts je Well des Agilent DNA Chip 12000, Bildung des Medians und dem Interquartilsabstand, die Fehlerbalken stellen das Maximum bzw. Minimum dar und geben somit die Variationsbreite an.

4.2.3.2.3 TEST AUF VARIABILITÄT INNERHALB VON POPULATIONEN

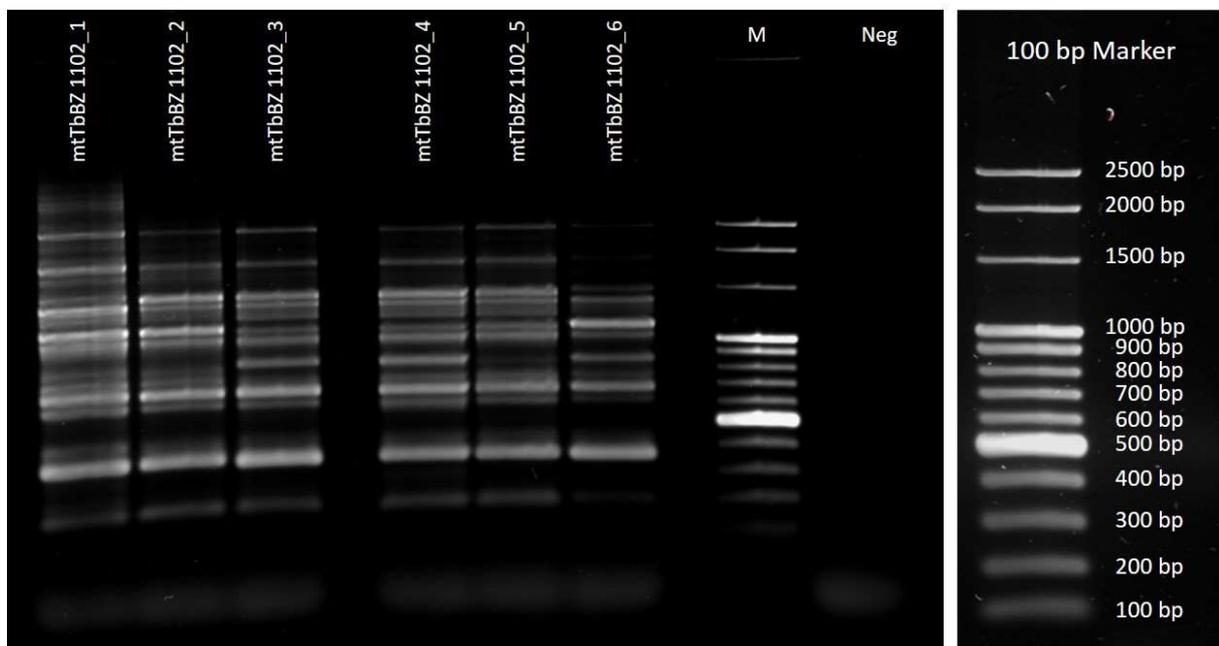


Abb. 4-36: Agarosegelbild zur Variabilität in der BOX-PCR von 6 individuellen mitochondrialen DNA-Extrakten von *T. bisselliella* (mtTb) aus der BAM-Zucht-Population (BZ).

Primer: BOXA 1R, Polymerase: *Taq*-Polymerase (native) von Thermo Scientific, Neg = Negativansatz ohne DNA, Einsatz von ~50 ng mtDNA, Auftrag von 10 µl BOX-PCR-Produkt und 5 µl Marker.

Ein Vergleich der BOX-PCR-Muster unter einzelnen Individuen von *T. bisselliella* aus einer Population erfolgt exemplarisch an der Zuchtpopulation (TbBZ) und an einer Freilandpopulation vom Fallenstandort Nr. 33 (FL33/Tb33). Zunächst werden die Bandenmuster anhand von Agarosegelen durch einfache Sichtung der bildlich wiedergegebenen Banden betrachtet.

Für die einzelnen mtDNA-Extrakte aus der Zuchtpopulation von *T. bisselliella* zeigen sich im Agarosegelbild rein optisch gut übereinstimmende Bandenmuster, die sich in den Intensitäten einzelner Banden jedoch unterscheiden. Dies spiegelt das Ergebnis der betrachteten wiederholten BOX-PCR an einer Probe wider. Insgesamt nimmt die Stärke der Bandenmuster von links nach rechts im Agarosegelbild ab, was auch besonders gut an dem leichten „Schmier“ im Hintergrund der beiden Proben mtTbBZ1102_1 und mtTbBZ1102_2 zu erkennen ist.

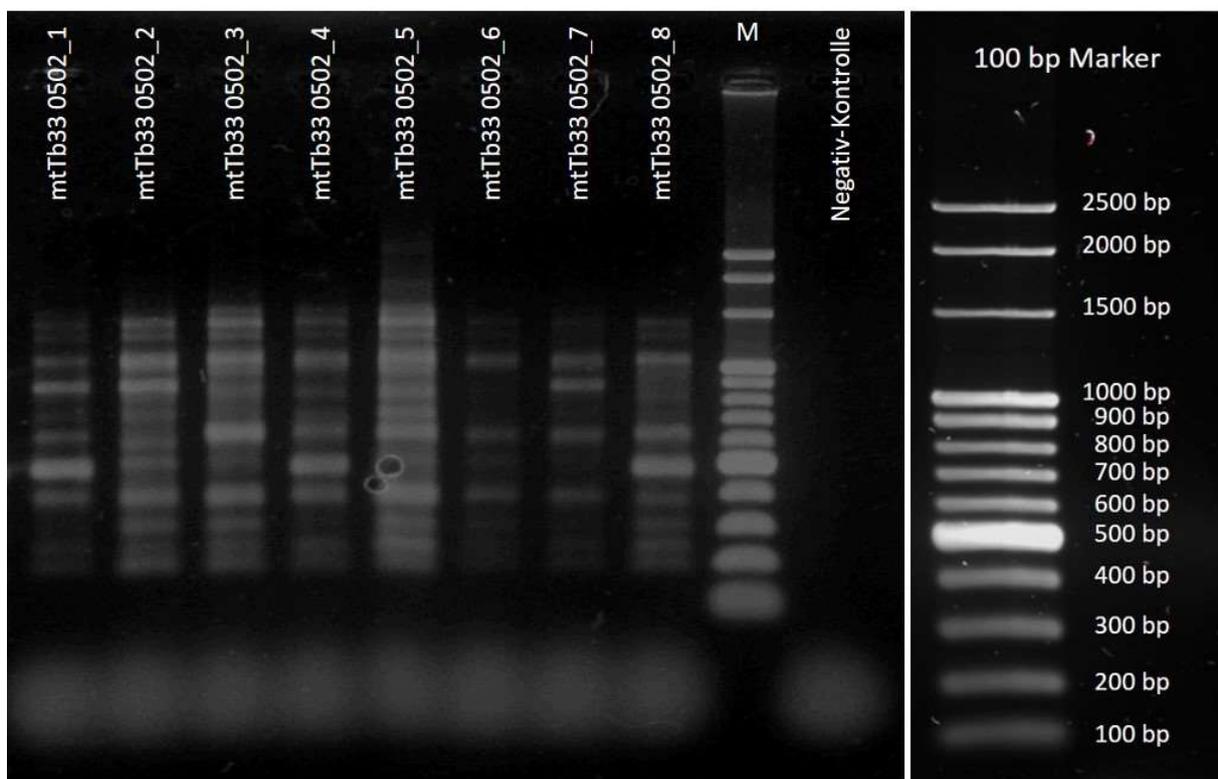


Abb. 4-37: Agarosegelbild zur Variabilität in der BOX-PCR von 8 individuellen mitochondrialen DNA-Extrakten von *T. bisselliella* (mtTb) aus der Freiland-Population Nr. 33 (33).

Primer: BOXA 1R, Polymerase: *Taq*-Polymerase (native) von Thermo Scientific, Neg = Negativansatz ohne DNA, Einsatz von ~40 ng mtDNA, Auftrag von 5 µl BOX-PCR-Produkt und 5 µl Marker.

Innerhalb der Freilandpopulation des Fallenstandortes Nr. 33 wird ein großer Unterschied in der Leuchtstärke der Banden von einem Individuum zum anderen deutlich. Besonders sticht eine Bande auf der Höhe der 500 bp-Markerbande hervor. Sie ist in den Proben mtTb33 0502_1, mtTb33 0502_4 und mtTb33 0502_8 sehr breit, während sie in den anderen Proben nahezu untergeht. Allgemein betrachtet sind die Banden in allen Gelspuren inklusive der Markerspur recht unscharf und verschwimmen mit dem Hintergrund.

Betrachtet man die Darstellung einer im Probenumfang breiter angelegten BOX-PCR-Serie für die Kleidermotten-Populationen aus der BAM-Zucht und einer anderen Freilandpopulation vom Fallenstandort Nr. 35 (FL35) mithilfe des Agilent DNA Chips 12000, so lassen sich die oben genannten Unterschiede bestätigen und im Detail genauer beobachten.

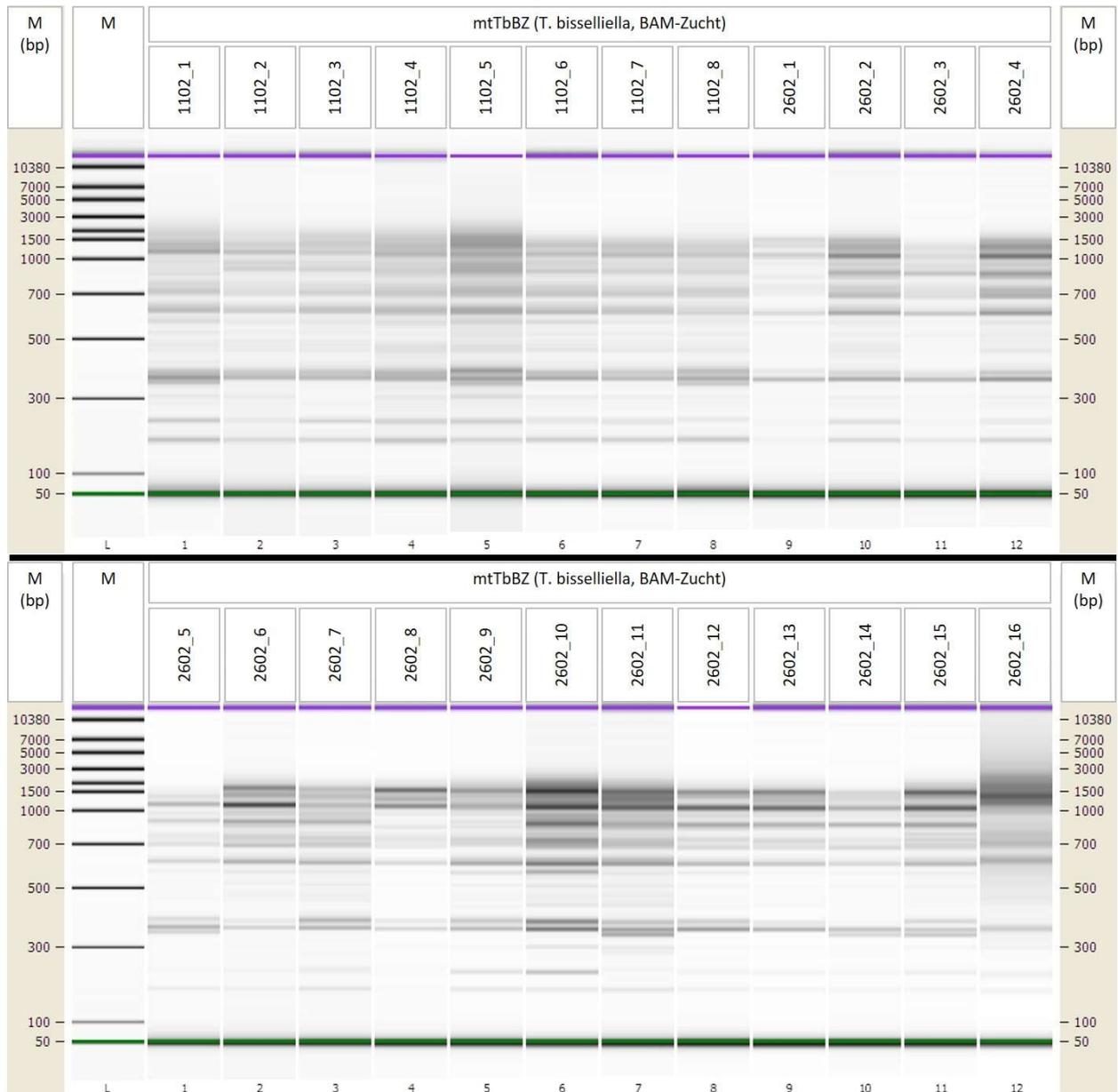


Abb. 4-38: Variabilität in der TbBZ-Population: Geldarstellung zu zwei Agilent DNA Chips 12000 mit je 12 mtDNA basierten BOX-PCR-Mustern von *T. bisselliella* (BAM-Zucht).

Einsatz von ~40 ng mtDNA (M = Agilent DNA Leiter (L) mit einem 50 bp Marker (grün) und einem 17.000 bp Marker (violett), 24 individuelle (1102_1 bis 1102_8 und 2602_1 bis 2602_16) mtTbBZ-Proben (*T. bisselliella*, BAM-Zucht). Primer: BOX A1R, Polymerase: *Taq*-DNA-Polymerase von Thermo Scientific, Auftrag von 1 µl PCR-Produkte.

Beide DNA-Chip-Ergebnisse bilden die bereits in den Agarosegelbildern erkannten Intensitätsunterschiede der einzelnen Banden gut ab. Man erkennt sogar zwischen beiden DNA-Chips

eine Differenz in der Schärfe der Bandenmuster. Während die Banden in der Geldarstellung des oberen Chips leicht verschwommen wirken, sind sie im unteren Bild zum Hintergrund hin besser abgegrenzt. Alle Proben im Vergleich lassen eine Reihe von prominenten Banden bei z.B. ~200 bp, ~370 bp, ~700 bp und ~1000 bp erkennen, dennoch fallen auch immer wieder Abweichungen der einzelnen Muster zueinander auf.

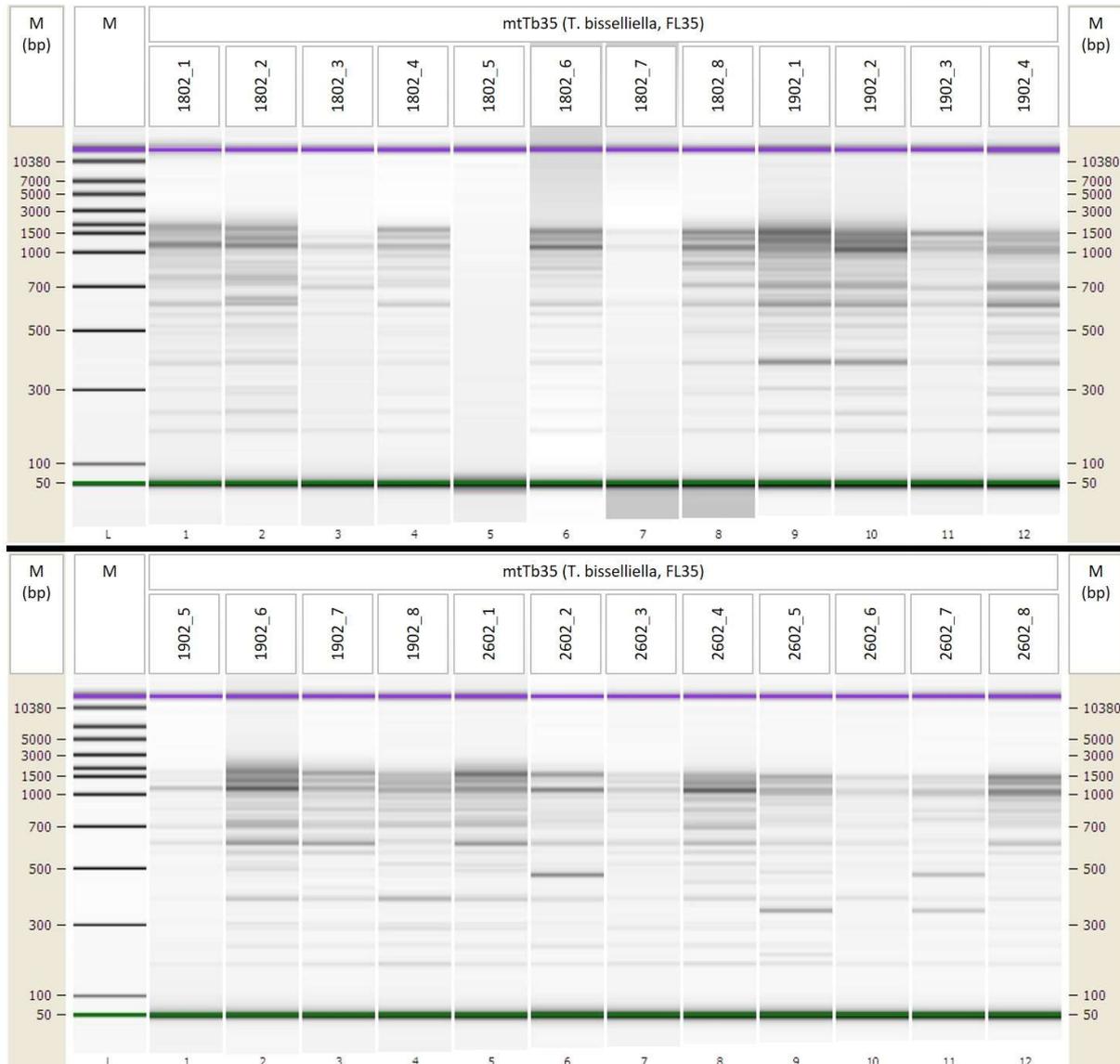


Abb. 4-39: Variabilität in der Tb35-Population: Geldarstellung zu zwei Agilent DNA Chips 12000 mit je 12 mtDNA basierten BOX-PCR-Ergebnissen von *T. bisselliella* (FL35).

Einsatz von ~40 ng mtDNA (M = Agilent DNA Leiter (L) mit einem 50 bp Marker (grün) und einem 17.000 bp Marker (violett), 24 individuelle (1802_1 bis 1802_8, 1902_1 bis 1902_8 und 2602_1 bis 2602_08) mtTb35-Proben (*T. bisselliella*, FL35). Primer: BOX A1R, Polymerase: *Taq*-DNA-Polymerase von Thermo Scientific, Auftrag von 1 µl PCR-Produkte.

Für die Individuen aus der Freilandpopulation des Fallenstandortes Nr. 35 zeigen sich im BOX-PCR-Muster viele, größtenteils eher schwache Banden. Bei vereinzelt Proben sind keine (mtTb33 1802_5) oder nur äußerst schwache (mtTb33 1802_3, 1802_7, 1902_3, 1902_5, 2602_6)

Bandenmuster erkennbar. Insgesamt lassen sich eine Reihe in allen Proben (ausgenommen die mit sehr schwachen Mustern) stets wiederkehrende Banden entdecken. Mit einer Größe von ~200 bp, ~250 bp, ~300 bp und ~400 bp seien nur die repetierten Banden unter 500 bp genannt. Auch diese Population zeigt eine in sich variable Intensität der einzelnen Banden eines auf den ersten Blick dennoch mit markanten Banden geprägten BOX-PCR-Musters.

Wirft man einen Blick auf den direkten Vergleich zweier Bandenmuster innerhalb einer Population, so werden auch die feinen Unterschiede, die in der Geldarstellung untergehen, sehr gut veranschaulicht.

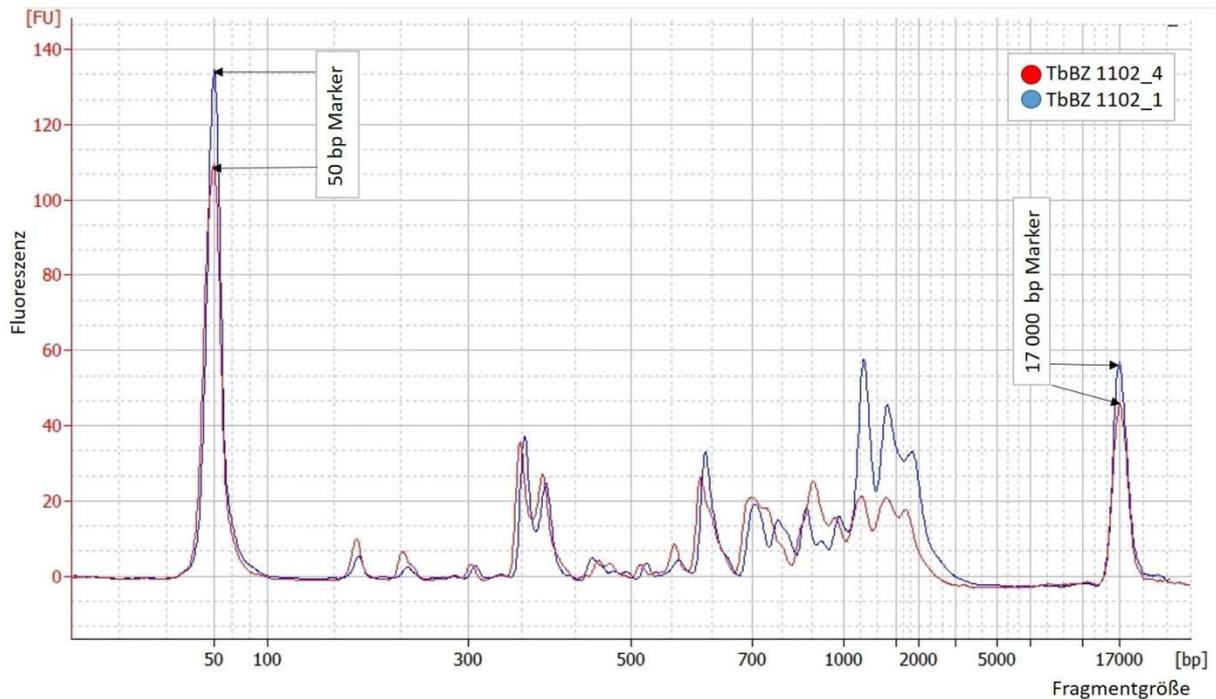


Abb. 4-40: Elektropherogramm-Darstellung der Fluoreszenzwerte über der Fragmentgröße zu den Bandenmustern der BOX-PCR-Ergebnisse von TbBZ 1102_4 und TbBZ 1102_1 mit dem Agilent DNA Chip 12000.

Die beiden in der Abb. 3-11 als Elektropherogramm dargestellten Bandenmuster stammen von zwei Individuen einer Population (BAM-Zucht-Population), aus denen parallel die mtDNA-Extraktion und auch die anschließende BOX-PCR erfolgte. Beide Individuen weisen ein sich stark ähnelndes BOX-PCR-Muster auf, das jedoch feine Unterschiede in den Fragmentgrößen und zu den größeren DNA-Fragmenten hin auch eindeutige Abweichungen in der Fluoreszenz zueinander aufzeigt. Besonders auffällig sind die Differenzen im Bereich von 700-1000 bp. Hier sind die einzelnen Peaks beider Proben stark zueinander verschoben. Im Allgemeinen sitzen die Peaks der Probe mtTbBZ 1102_1 (blaue Linie) bis auf eine Ausnahme bei ~450 bp stets ein kleines Stück weiter zur höheren Fragmentgröße hin verschoben. Die beiden Fluoreszenzmarker bei 50 bp und 17000 bp unterscheiden sich bei beiden Proben lediglich in ihrer Fluoreszenz.

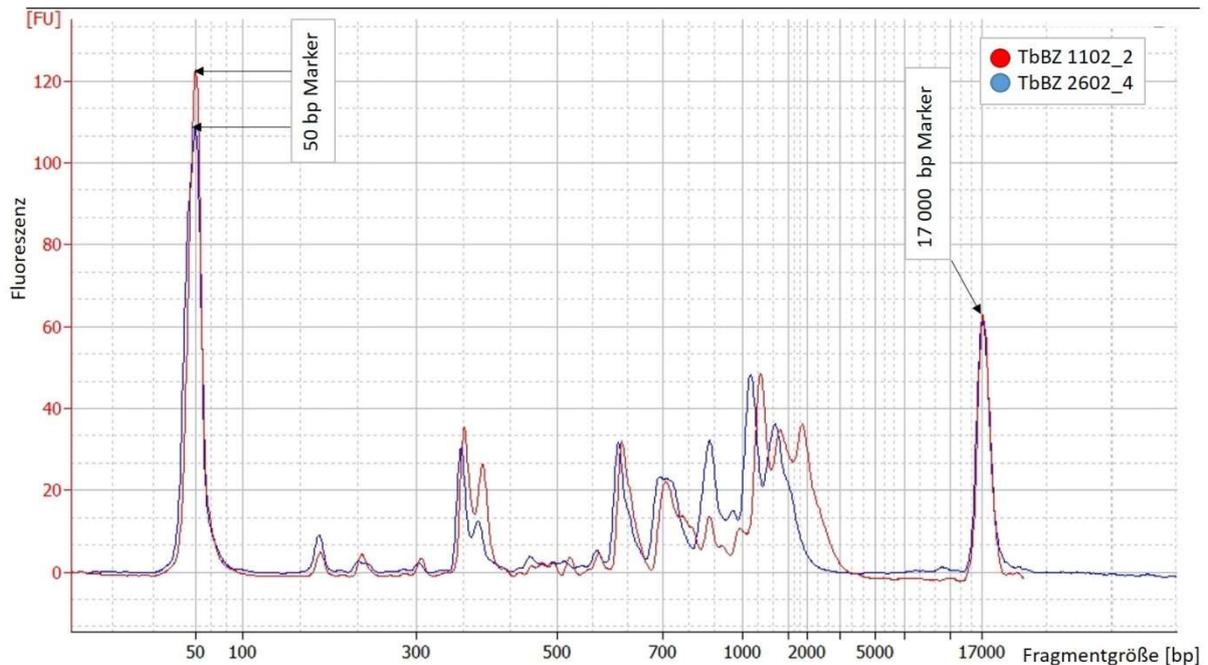


Abb. 4-41: Elektropherogramm-Darstellung der Fluoreszenzwerte über der Fragmentgröße zu den Bandenmustern der BOX-PCR-Ergebnisse von TbBZ 1102_2 und TbBZ 2602_4 mit dem Agilent DNA Chip 12000.

Betrachtet man parallel zum eben dargestellten Vergleich die Elektropherogramme von zwei Individuen aus einer Population, aus denen die mtDNA-Extraktion nicht parallel erfolgte, so zeigt sich ebenfalls ein sich ähnelndes Fragmentmuster, das sowohl Peakverschiebungen als auch Fluoreszenzunterschiede aufweist. Die auffälligsten Abweichungen lassen sich hier im Bereich von 1000-2000 bp erkennen. Die Probe TbBZ 1102_2 besitzt sogar knapp unter 2000 bp einen zusätzlichen Peak, der in der Probe TbBZ 2602_4 fehlt.

Stellt man die Daten zur Fragmentgröße und -konzentration der einzelnen BOX-PCR-Bandenmuster von der Kleidermotten-Zuchtpopulation (TbBZ) aus Abb. 4-38 einander gegenüber, so verbleiben nach dem Ausschluss einzelner Bandenbereiche aufgrund zu geringer Konzentration ($<0,1 \text{ ng}/\mu\text{l}$) achtundvierzig Banden übrig. Innerhalb dieser lassen sich einige markante Banden herausgreifen, die in 75 % aller betrachteten Populationsvertretern vorkommen. Über die Bildung des Mittelwerts erhält man ein Muster aus achtzehn prominenten Banden (Tab. 4-2). Die kleinste Bande hat eine Größe von durchschnittlich 189 bp, die größte einen gemittelten Wert von 1578 bp. Fünf Fragmentgrößen konnten in allen Proben nachgewiesen werden, zwei davon waren in allen Proben mit einer Konzentration über $0,1 \text{ ng}/\mu\text{l}$ vertreten, sie sind in der Tabelle in fett gedruckter Schrift dargestellt. Der Variationskoeffizient liegt je nach Fragmentgröße zwischen 0,5 und 8,1 %, wobei der letzte Wert eher eine Ausnahme darstellt. Insgesamt fällt der Variationskoeffizient vor allem ab einer Bandengröße von $\sim 1000 \text{ bp}$ im Vergleich zu den anderen Bandengrößen hoch aus.

Tab. 4-2: Prominente, gemittelte Fragmentgrößen im BOX-PCR-Muster der Kleidermotten-Zuchtpopulation (TbBZ). Fett gedruckte Zeilen enthalten Bandenbereiche, die bei allen betrachteten Populationsvertretern eindeutig detektiert wurden (Konzentration > 0,1 ng/μl). Angabe des Mittelwertes (\bar{x}), der Standardabweichung (s), des Variationskoeffizienten (cv), des Minimums und Maximums sowie der Variationsbreite

Banden (Fragmentgrößen)							
Nr.	Vorkommen in der Stichprobe [%]	\bar{x} [bp]	s [bp]	cv [%]	Min. [bp]	Max. [bp]	Variationsbreite [bp]
1	100	189	1,6	0,8	185	191	6
2	100	238	3,6	1,5	230	245	15
3	96	285	1,4	0,5	281	287	6
4	96	303	2,2	0,7	300	308	8
5	92	339	5,5	1,6	330	353	23
6	100	365	3,4	0,9	360	371	11
7	92	388	4,0	1,0	382	397	15
8	83	443	3,5	0,8	435	447	12
9	92	460	3,6	0,8	452	466	14
10	88	476	3,3	0,7	472	480	8
11	96	518	6,4	1,2	508	529	21
12	100	574	4,0	0,7	568	583	15
13	100	617	5,7	0,9	609	628	19
14	88	698	9,7	1,4	683	715	32
15	92	961	9,2	0,96	949	979	30
16	96	1119	46,7	4,2	1063	1219	156
17	88	1351	31,6	2,3	1300	1405	105
18	75	1578	128,3	8,1	1446	1850	404

4.2.3.2.4 BETRACHTUNG DES EINFLUSSES MÖGLICHER DARMBAKTERIEN DER KLEIDERMOTTE AUF DAS BOX-PCR-ERGEBNIS

Das mögliche Vorkommen von Darmbakterien ist für *Tineola bisselliella* noch nicht vollständig geklärt, so dass für diese Arbeit vorsichtshalber von einer möglichen Kontamination der DNA-Extrakte ausgegangen wurde. Die folgenden Agarosebilder zeigen die Ergebnisse der 16S rRNA-PCR mit verschiedenen mtDNA Proben von *T. bisselliella* sowie den beiden Polymerasen *AmpliTaQ* LD und *Taq*. Bei der Verwendung der *AmpliTaQ* LD Polymerase zeigen sich mit 35 Zyklen unter drei

verschiedenen Annealingtemperaturen schwache Banden in der Proben-PCR (Abb. 4-42). Keine dieser Banden befindet sich jedoch auf der Höhe der 16S rRNA-Bande (~1500 bp) von *Halomonas*.

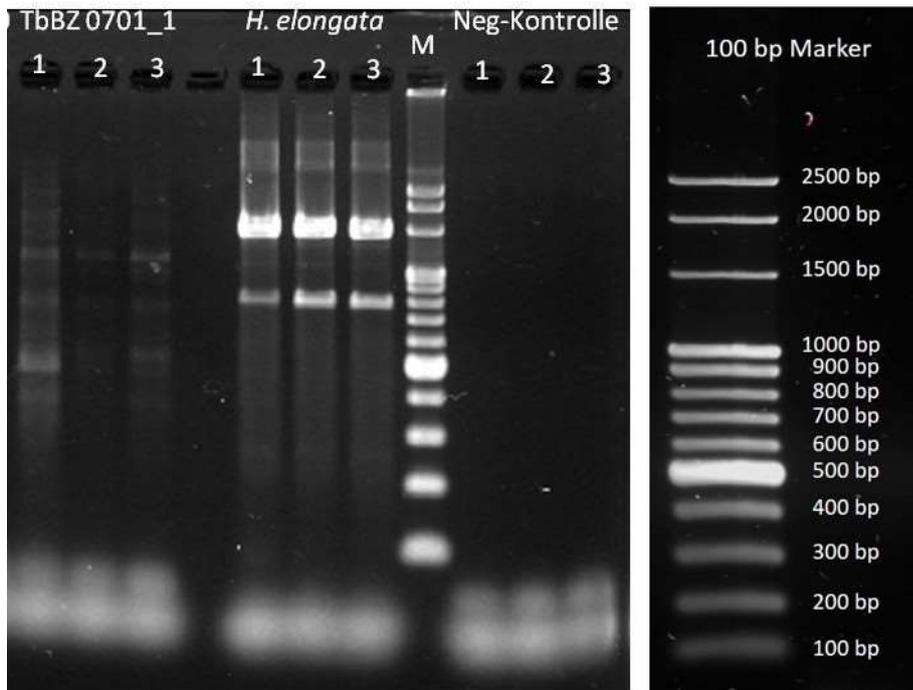


Abb. 4-42: 16S rRNA PCR mit *AmpliTaq* LD und den Primern 27F und 1492R bei drei unterschiedlichen Annealingtemperaturen (1= 46,3° C, 2= 49,7° C, 3= 53,8° C) und 35 Zyklen, Einsatz von ~40 ng mtDNA von *T. bisselliella* aus der Zucht (TbBZ 0701_1) bzw. ~40 ng nDNA *H. elongata* als Positivkontrolle, Neg-Kontrolle ohne DNA-Einsatz, Auftrag von 5 µl PCR-Produkt und 5 µl Marker.

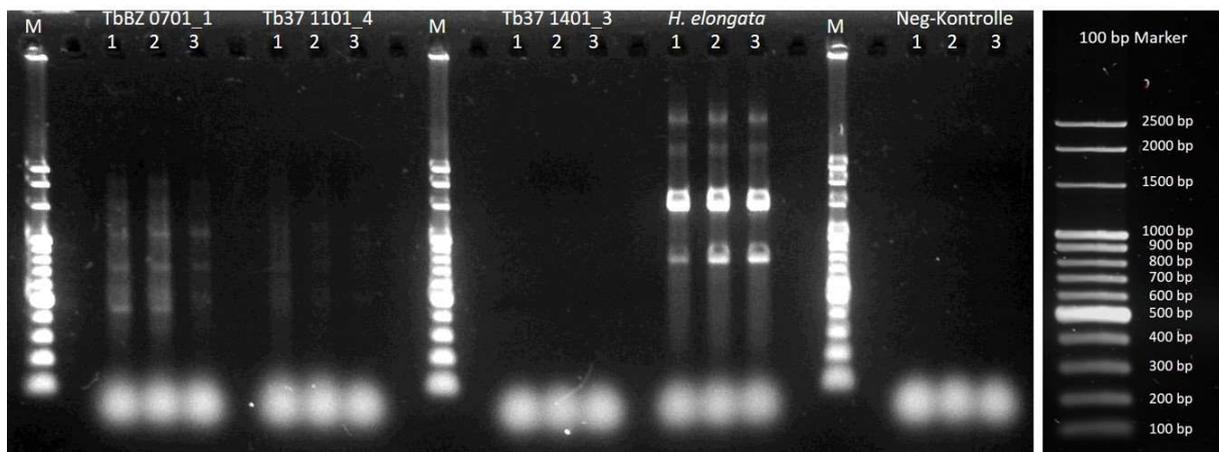


Abb. 4-43: 16S rRNA PCR mit *AmpliTaq* LD und den Primern 27F und 1492R bei drei unterschiedlichen Annealingtemperaturen (1= 46,3° C, 2= 49,7° C, 3= 53,8° C) und 30 Zyklen, Einsatz von ~40 ng mtDNA von *T. bisselliella* verschiedener Populationen (TbBZ, Tb37) mit DnaseI-Verdau (Tb37 1401_3) und ohne (Tb37 1101_4 und TbBZ 0701_1) bzw. gDNA von *H. elongata* als Positivkontrolle, Neg-Kontrolle ohne DNA-Einsatz, Auftrag von 5 µl PCR-Produkt und 5 µl Marker.

Eine Reduktion der Zyklen auf 30 zeigt unter Verwendung der gleichen mtDNA (TbBZ0701_1) keine Veränderung des schwachen Bandenmusters (Abb. 4-43). In den PCR-Produkten mit anderen mtDNA

Proben ist einmal ein ähnliches, aber wesentlich schwaches Bandenmuster zu erkennen, ein anderes mal keine Banden. Die Verwendung der *Taq* Polymerase offenbart für die mtDNA Probe Tb37 1101_4 in der 16S rRNA PCR keine Banden. Die Zyklenanzahl lag ebenfalls bei 30. Auch eine weitere mtDNA Probe (TbBZ A1) zeigt keine bis lediglich eine schwache Bande bei einer Annealingtemperatur von 46,3° C.

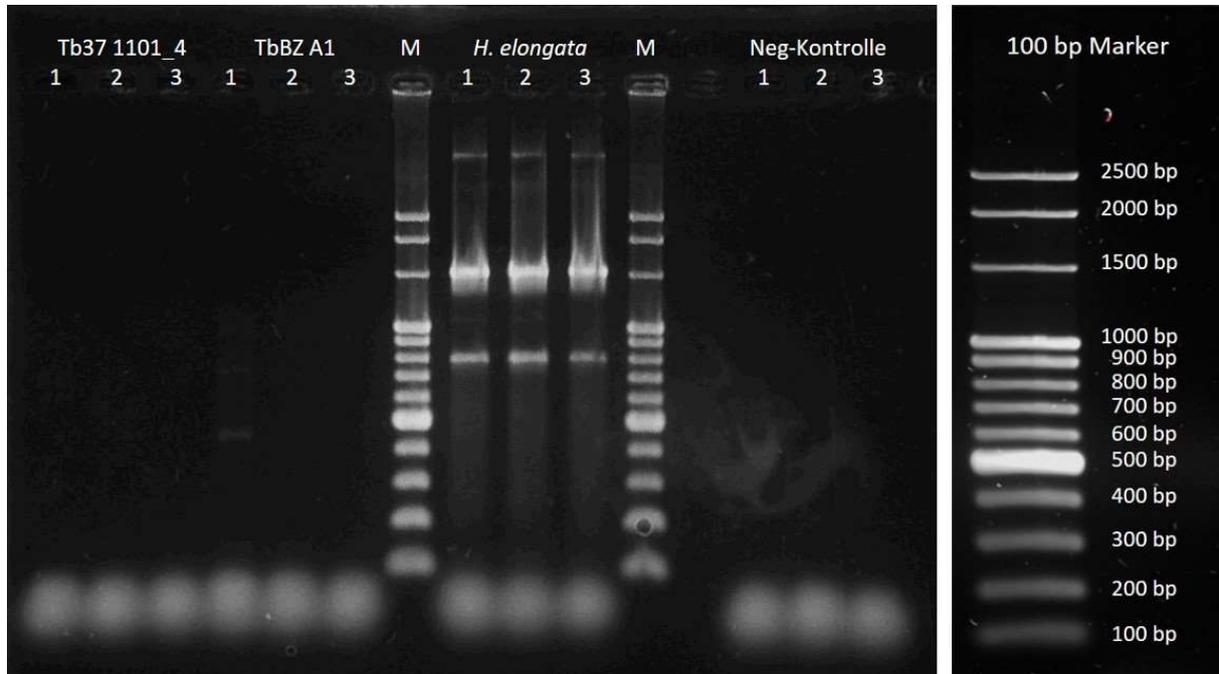


Abb. 4-44: 16S rRNA PCR mit *Taq* Polymerase, native (Fermentas) und den Primern 27F und 1492R bei drei unterschiedlichen Annealingtemperaturen (1= 46,3° C, 2= 49,7° C, 3= 53,8° C) und 30 Zyklen, Einsatz von ~40 ng mtDNA von *T. bisselliella* verschiedener Populationen (Tb37, TbBZ) bzw. gDNA von *H. elongata* als Positivkontrolle, Neg-Kontrolle ohne DNA-Einsatz, Auftrag von 5 µl PCR-Produkt und 5 µl Marker

Neben der 16S rRNA PCR folgte eine weitere Variante, um den Einfluss von Darmbakterien zu untersuchen. Die aus unterschiedlichen Körperabschnitten gewonnene mtDNA wurde in die BOX-PCR eingesetzt und die Banden-Muster über ein Agarosegel aufgetrennt (Abb. 4-45). Vergleichend lässt sich nun feststellen, dass einzelne Bandenmuster zueinander keinerlei auffällige Unterschiede zeigen. Die aus Thorax und Abdomen gemeinsam gewonnene mtDNA führt in der BOX-PCR zu einem schwächeren Bandenmuster als die aus anderen Körperabschnitten. Allgemein lassen sich an diesem Vergleich lediglich erneut die unterschiedlichen Intensitäten von Gelspur zu Gelspur anmerken, die jedoch nur in wenigen Fällen bis zum Verlust einer Bande reichen. Die in ihrer Intensität markantesten Banden liegen bei ~380 bp, ~680 bp und ~1100 bp. Darüber hinaus lassen sich zahlreiche weitere Banden in allen sechs BOX-PCR Produkten wiederfinden.

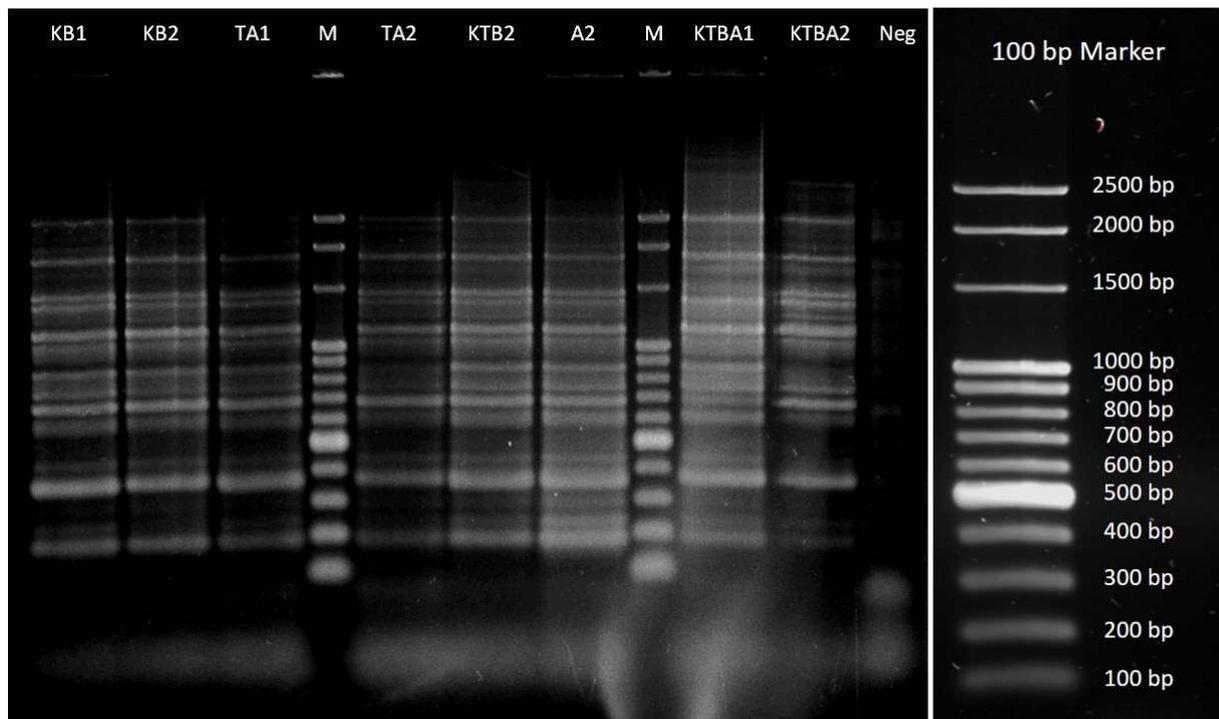


Abb. 4-45: BOX-PCR mit der mtDNA aus verschiedenen Körperabschnitten von *Tineola bisselliella*

Primer: BOXA 1R, Taq DNA Polymerase von Fermentas, Annealingtemperatur von 53° C, Einsatz von ~40 ng mtDNA, Auftrag von 10 µl PCR-Ansatz und 5 µl Marker

M = 100 bp Marker von roboklon, KB1 und KB2 = DNA aus Kopf und Beinen von *T. bisselliella* (gepoolt, BAM-Zucht), TA1 und TA2 = DNA aus Thorax und Abdomen von *T. bisselliella* (gepoolt, BAM-Zucht), KTB2 = DNA aus Kopf, Thorax und Beinen von *T. bisselliella* (gepoolt, BAM-Zucht), A2 = DNA aus dem Abdomen von *T. bisselliella* (gepoolt, BAM-Zucht), KTBA1 und KTBA1 = DNA aus dem Gesamtorganismus *T. bisselliella* (BAM-Zucht), Neg = Negativansatz

4.2.3.3 PHYLOGENETISCHE BETRACHTUNGEN AUF DER BASIS VON BOX-PCR-BANDENMUSTERN VON MITOCHONDRIALEN GENOMEN

Nach der Betrachtung einer Reihe von möglichen Einflussfaktoren der BOX-PCR, ihrer Variabilität und Wiederholbarkeit, sollen nun erste Versuche zur phylogenetischen Analyse anhand von Agarosegelbildern versucht werden. Die abb. 4-46 zeigt das Ergebnis der BOX-PCR mit der mtDNA aus drei verschiedenen Arten. Es ist sowohl der BOX-PCR Fingerprint von *E. kuehniella* (mtEK 0611_14), *T. pellionella* (mtTP 0611_12) als auch *T. bisselliella* (mtTb) abgebildet. Von *T. bisselliella* sind die Fingerprints zwei verschiedener Standorte (FL35 und FL33) sowie der Zuchtpopulation (BZ) vertreten. Der Vergleich der einzelnen Arten untereinander lässt auf den ersten Blick unterschiedliche Muster wahrnehmen. Unter den jeweiligen Standorten erscheint der Vergleich etwas schwieriger, vor allem da die BOX-PCR Produkte der Proben mtTb33 0502_2, _3 und _6 nur sehr schwache und eher verschwommene Bandenabfolgen erkennen lassen.

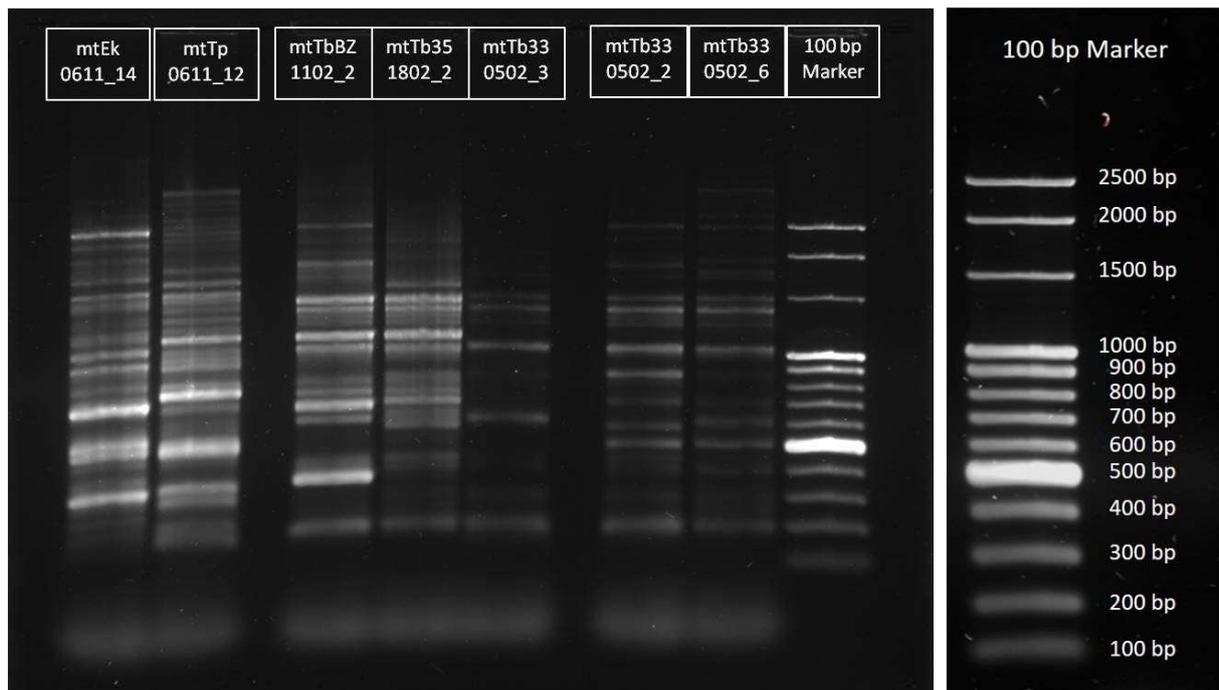


Abb. 4-46: mtDNA basierte BOX-PCR zum Vergleich der Arten *E. kuehniella*, *T. pellionella* und *T. bisselliella*

Primer: BOXA 1R, Taq-Polymerase (native) von Fermentas, Einsatz von 7 individuellen mitochondrialen DNA-Extrakten von *E. kuehniella* (mtEk), *T. pellionella* (mtTp) und *T. bisselliella* (mtTb) aus der BAM-Zucht-Population (BZ) sowie zwei Außenstandorten (35 und 33), Annealingtemperatur von 53° C, Einsatz von ~50 ng mtDNA, Auftrag von 10 µl BOX-PCR-Produkt und 5 µl Marker (100 bp Marker von Roboklon)

Zur Erstellung eines phylogenetischen Baumes mussten die einzelnen Banden in den verschiedenen Mustern miteinander verglichen und manuell die jeweiligen vom Programm vorgenommenen Zuordnungen überprüft werden (Abb. 4-47). Man erkennt sehr gut in Abb. 4-47, dass das Programm nicht immer alle Zuordnungen richtig trifft. In der ersten Gelspur von links ist die dritte Bande von unten als eine Einzelbande markiert. Die Gelspur rechts daneben besitzt jedoch ebenfalls eindeutig eine Bande auf gleicher Höhe. Der aus dem Bandenmuster resultierende Baum nach der Neighbor Joining Methode ist in Abb. 4-48 dargestellt. Es handelt sich um einen unbewurzelten Baum, der aus den zur Verfügung stehenden Daten keine eindeutigen Verhältnisse der drei betrachteten Arten zueinander wiedergibt. Die Angaben der Astlängen zeigen, dass *E. kuehniella* den größten evolutionären Abstand zu allen beiden Arten aufweist.

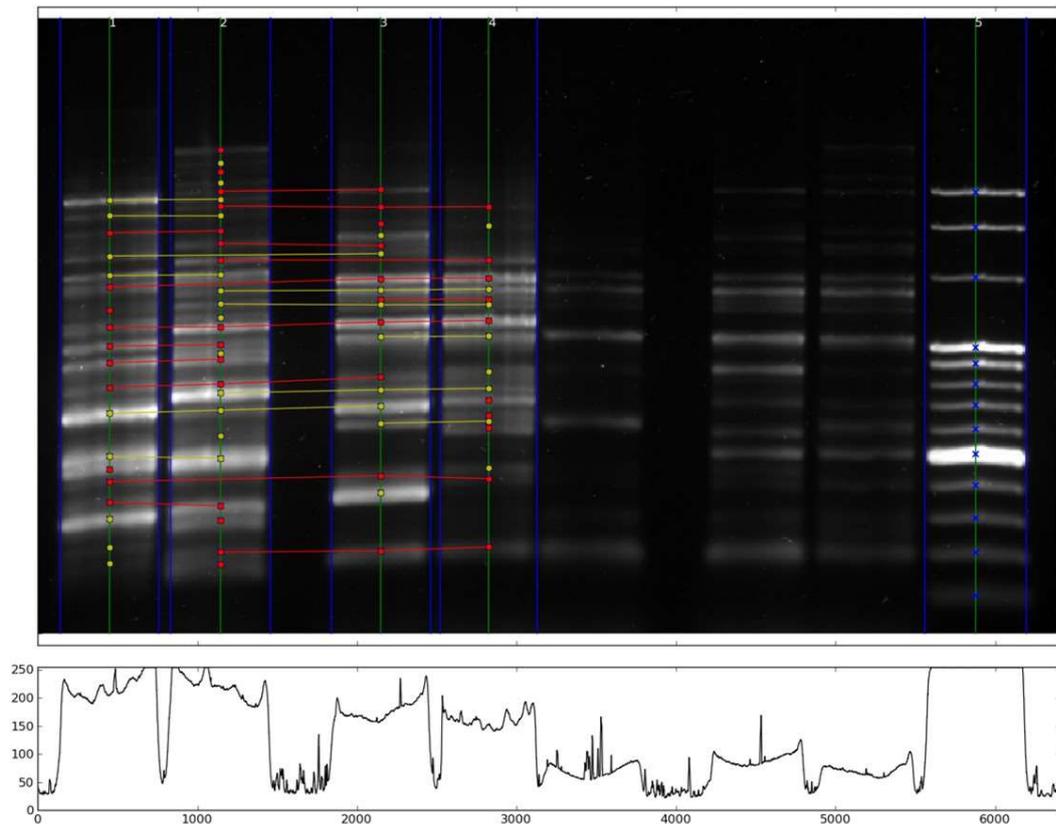


Abb. 4-47: Detektion und Vergleich der Bandenmuster in PyElph

mtDNA basierte BOX-PCR zum Vergleich der Arten *E. kuehniella*, *T. pellionella* und *T. bisselliella* analog zu Abbildung 4-46

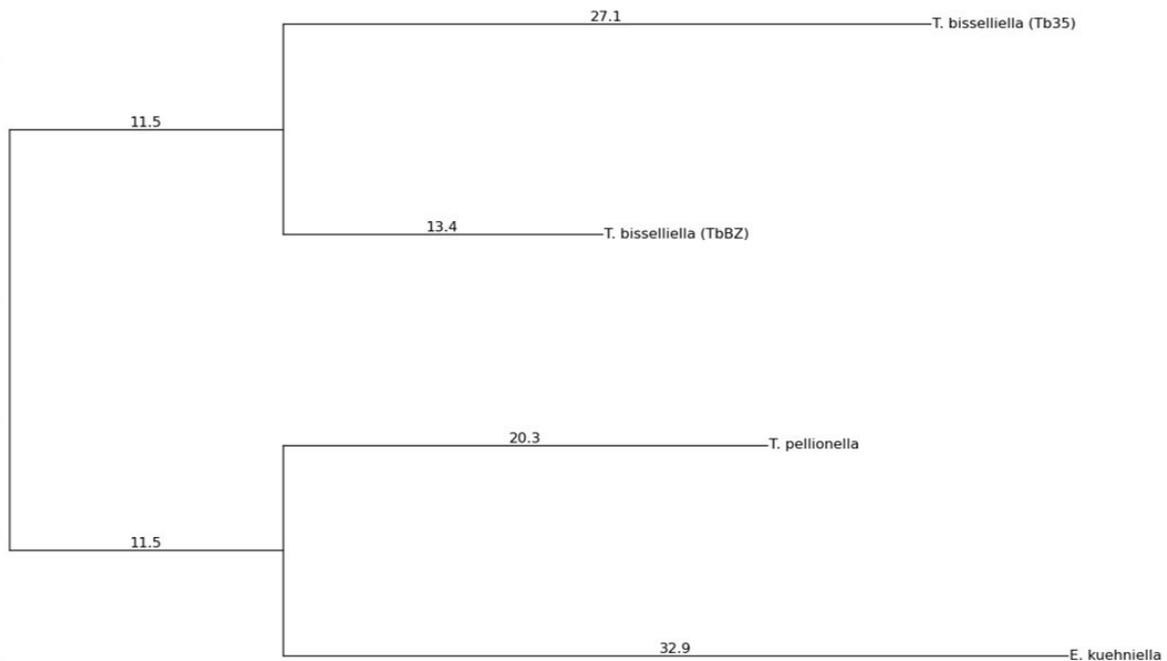


Abb. 4-48: Neighbor Joining Baum zur gelelektrophoretischen Auftrennung der BOX-PCR Muster aus Abbildung 4-46 bzw. 4-47 in PyElph. Die über den Ästen angegebenen Zahlen entsprechenden Astlängen.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der BOX-PCR Produkte zu den Kleidermotten von verschiedenen Fallenstandorten in Berlin, einem Standort in England (FL43) und der Zuchtpopulation ist in der Abb. 4-49 dargestellt. Allen BOX-PCR Produkten gemeinsam ist die kleinste Bande bei ~200 bp. An den drei Gelspuren zu den Proben mtTbFU, mtTb08 und mtTbBZ fällt die gemeinsame markante Bande bei ~380 bp auf. Rein optisch lassen sich sehr unterschiedliche Muster erkennen, aber auch mehrere übereinstimmende Banden finden. Insgesamt fallen die Muster durch eine hohe Anzahl an Banden auf, die teilweise dicht an dicht liegen.

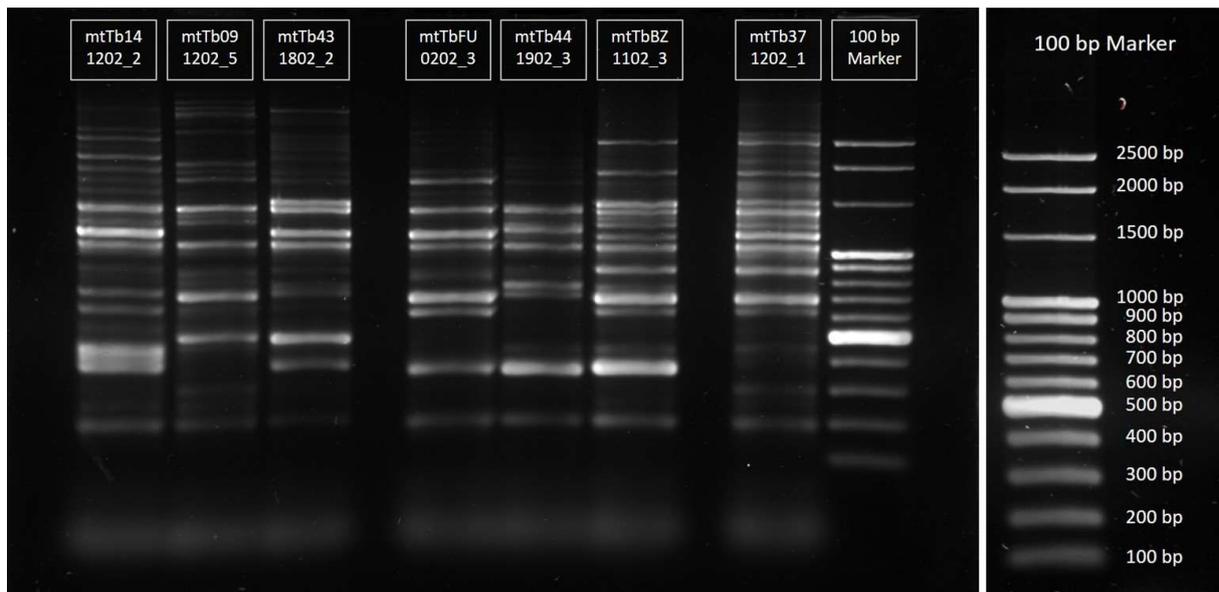


Abb. 4-49: mtDNA basierte BOX-PCR für den Vergleich von Freilandpopulationen von *Tineola bisselliella*
 Primer: BOXA 1R, Taq-Polymerase (native) von Fermentas, Einsatz von sieben individuellen mitochondrialen DNA-Extrakten von *T. bisselliella* (mtTb) aus der BAM-Zucht-Population (BZ), vier Fallenstandorten (14, 09, FU, 37) und zwei Befallsstandorten (43, 44); Annealingtemperatur von 53° C, Einsatz von ~50 ng mtDNA, Auftrag von 10 µl BOX-PCR-Produkt und 5 µl Marker (100 bp Marker von Roboklon)

Die Übertragung und Analyse dieses Agarosegelbildes (Abb. 4-49) in PyEIp führt zu einem unbewurzelten Neighbor Joining Baum, der die einzelnen BOX-PCR Fingerprints einzelner Standorte in Schwestergruppen anordnet (Abb. 4-50). Es ergeben sich insgesamt drei Paarbildungen. Tb09 und Tb14 gehen aus einer phylogenetischen Linie hervor, ebenso wie Tb37 und TbBZ. Auch Tb44 und Tb43 sind in einem Schwestergruppenverhältnis dargestellt. Blickt man zurück zum CR-Stammbaum aus Abschnitt 4.2.2.2 (Abb. 4-27) so findet man dort diese Standorte ebenfalls jeweils in näherer phylogenetischer Beziehung zueinander. Die einzelnen unterschiedlichen Astlängen verdeutlichen die schon optisch im Gel erkennbaren Unterschiede.

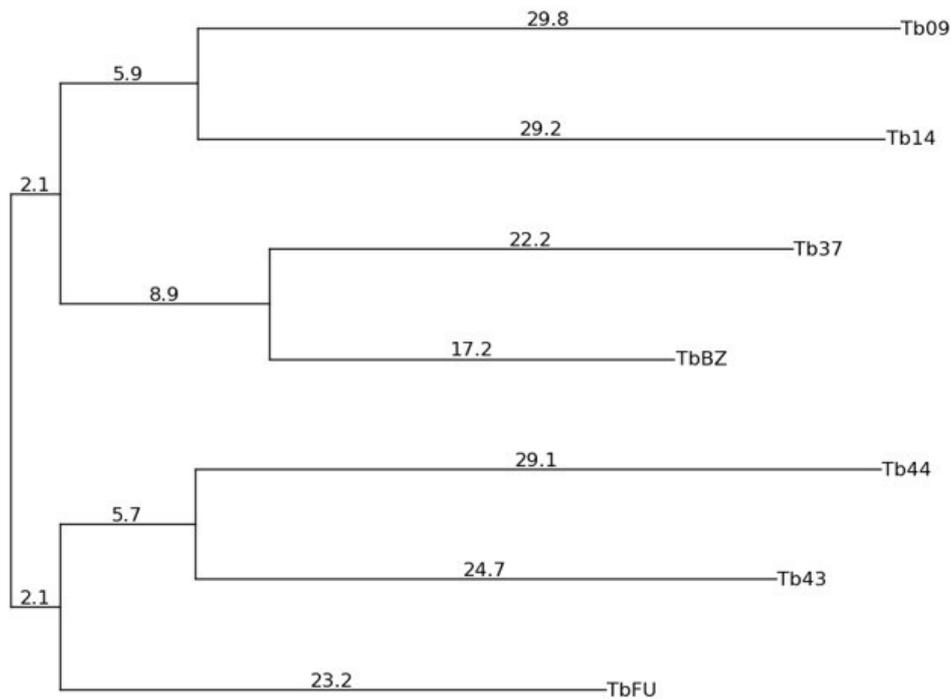


Abb. 4-50: Neighbor Joining Baum zur gelelektrophoretischen Auftrennung der BOX-PCR Muster aus Abbildung 4-49 in PyElph. Die über den Ästen angegebenen Zahlen entsprechenden Astlängen.

4.2.3.4 ÜBERPRÜFUNG DER BOX-PCR PRODUKTE AUF MITOCHONDRIALEN URSPRUNG

Die abschließende Überprüfung der BOX-PCR Produkte auf mitochondrialen Ursprung erfolgt durch die Sequenzierung von einzelnen Banden, die zuvor aus dem Agarosegel ausgeschnitten, aufgereinigt und kloniert wurden. Das Ergebnis der Colony-PCR zeigt in nahezu allen betrachteten Kolonien das jeweils klonierte Fragment (Abb. 4-51). Insert 1 entsprach ursprünglich einer Bandengröße von ~350 bp und war nach der Colony-PCR aufgrund der flankierenden Bereiche im Vektor mit einer Größe von ~460 bp zu erwarten. Insert 2 war ein Fragment, das im ursprünglichen BOX-PCR-Gel eine Größe von ~600 bp besaß und nach der Colony-PCR eine Größe von ~710 bp besitzen sollte. Bis auf in Colony (9) konnte in allen PCR ein Fragment mit entsprechend erwarteter Größe produziert werden.

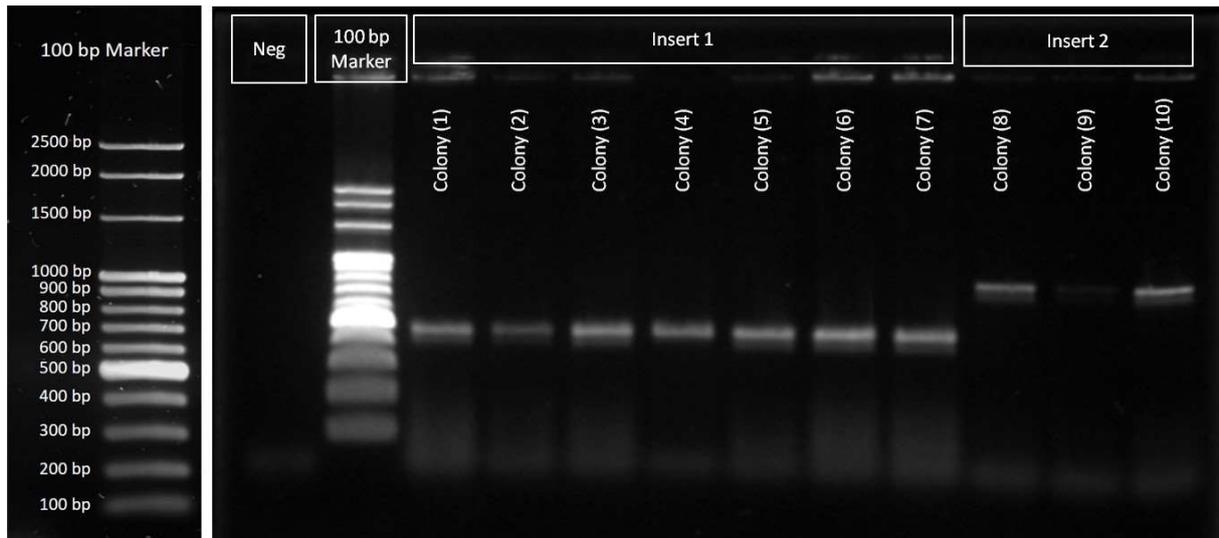


Abb. 4-51: Colony-PCR nach Transformation von *E. coli* DH5 α mit pCR™ 4-TOPO plus Insert 1 (mtTbBZ 1102_2 (*T. bisselliella*), ~350 bp-Bande aus der BOX-PCR 300715_BOX1) bzw. Insert 2 (mtEk 0611_14 (*E. kuehniella*), ~600 bp-Bande aus der BOX-PCR 060815_BOX22) unter Verwendung von Taq PCR Master Mix (2x) von Roboklon und den Primern T7 und T3, Neg = Negativ-Kontrolle ohne *E. coli* Kolonie, Auftrag von 10 μ l PCR-Produkt und 5 μ l Marker

Die sich anschließende Sequenzierung erbrachte für beide Inserts eine Sequenz, die in ihrer Größe dem Fragment aus dem BOX-PCR Produkt entsprach. Der Abgleich der erhaltenen Sequenzen mit dem BLASTN Tool von NCBI erbringt jedoch keine eindeutige Zuordnung. Weder der mitochondriale noch ein chromosomaler oder bakterieller Ursprung ist mit einer kompletten Übereinstimmung zu finden. Das Insert 2 mit einer Länge von ~700 bp kann über eine Länge von ~200 bp dem chromosomalen Gen (LOC106135982) „eyes absent homolog 2“ im Schmetterling *Amyelois transitella* (Pyrilidae) zugeordnet werden. Dieser Sequenzabschnitt zeigt eine 81 % Übereinstimmung. Alle weiteren Sequenzalignments zeigen lediglich eine Überlappung von unter 20 % mit der Insert 2-Sequenz. Nahezu alle diese Übereinstimmungen bestehen mit chromosomalen DNA-Abschnitten. Eine direkte Vorgabe des Alignments mit *E. kuehniella* ergibt eine Übereinstimmung mit der mitochondrialen Genomsequenz. Die Abdeckung der Insert 2-Sequenz beträgt dabei 18 % und die Übereinstimmung in der Sequenz 81 %. Auch für die Insert 2-Sequenz ergibt sich bei Vorgabe des Alignments zu *T. bisselliella* die größte Übereinstimmung mit der mitochondrialen Genomsequenz. Die Sequenzabdeckung beträgt hier 18 % und die Übereinstimmung 90 %.

5.1 DIE ÖKOLOGISCHE POTENZ DER KLEIDERMOTTE *TINEOLA BISSELLIELLA*

Die Kleidermotte *Tineola bisselliella* ist schon in frühen Studien zu ihrer Physiologie und Ökologie als ein Organismus mit einem breiten Toleranzspektrum im Bereich der Temperatur und Luftfeuchtigkeit beschrieben worden (Rawle, 1951; Weidner, 1970; Brokerhof, et al., 1992). Auch in dieser Arbeit konnte dies bestätigt werden. Während die Kleidermotte unter allen betrachteten klimatischen Bedingungen eine F1-Population hervorbringen konnte, gelang es *A. flavipes* nur bei sechs der neun Bedingungen. Der Polsterwarenkäfer zeigte einen deutlichen Anstieg des Käferschlupfes bei der Zunahme der Temperatur, bevorzugte dann aber vor allem die geringere relative Raumfeuchte. *T. bisselliella* hingegen zeigte eine deutliche Zunahme des Falterschlupfes bei ansteigender Temperatur und Luftfeuchtigkeit. Die von Titschak (1925) gemachten Beobachtungen eines beschleunigenden Effekts von hohen Temperaturen und einer hohen Luftfeuchtigkeit auf die Entwicklung der Kleidermotte sind in den einzelnen Versuchsansätzen dieser Arbeit sowohl in den Kontrollen als auch in den Konkurrenzansätzen an einem früheren Falterschlupf wiederzuerkennen. Darüber hinaus zeigt sich, wie Temperatur und Luftfeuchtigkeit in Kombination auf die Entwicklung der Kleidermotte einwirken. In den Extremsituationen einer niedrigen relativen Luftfeuchtigkeit (33 % RH) oder einer hohen Temperatur (29° C) zeigt der zweite physikalische Parameter keinen weiteren Einfluss auf das quantitative Schlupfverhalten. Liegt das entgegengesetzte Extrem der Temperatur (20/21° C) vor, so hat die Luftfeuchtigkeit einen entscheidenden Einfluss auf den Falterschlupf, während die Temperatur bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 76 % nur bei 21° C einen signifikant veränderten Falterschlupf hervorruft. Dies deutet darauf hin, dass vor allem die Luftfeuchtigkeit und nicht wie ursprünglich angenommen (Titschak, 1925; Griswold, 1944) die Temperatur den stärksten Einfluss auf die Entwicklung von *T. bisselliella* hat.

Die minimal erkennbaren Unterschiede des Falterschlupfes in den Kontrollen und Konkurrenzansätzen der Kleidermotte sind nicht signifikant und machen ihre Dominanz gegenüber dem Polsterwarenkäfer deutlich. In zwei Konkurrenzansätzen bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 76 % zeigt sich sowohl bei 26° C als auch bei 29° C die Dominanz der Kleidermotte in einer gegenüber der Kontrolle signifikant verminderten Käferschlupfrate des Polsterwarenkäfers. Seine fehlende Entwicklung bei niedrigeren Temperaturen zeigt ebenfalls die klare Überlegenheit von *T. bisselliella* unter diesen Bedingungen.

Um sich als Textilschädling erfolgreich am zur Verfügung stehenden eher trockenen Material zu entwickeln, bedarf es einer Reihe biologischer Anpassungen. Nicht nur die Fähigkeit der Keratinverdauung (Day, 1951a; Day, 1951b) sondern auch die Toleranz von Trockenheit muss gewährleistet sein. Die Versuche zur ökologischen Potenz und Konkurrenzfähigkeit verdeutlichen, dass die Kleidermotte eben diese Anpassungen mitbringt und genau dies auch ihr Vorteil gegenüber anderen keratinverdauenden Insekten wie dem Polsterwarenkäfer oder aber der Pelzmotte ist, die nach Weidner (1970) ein bedeutend stärkeres Feuchtigkeitsbedürfnis zu haben scheint. Gerade die

Feuchtigkeit ist bei anderen Schädlingen, wie zum Beispiel auch der Dörrobstmotte, ein entscheidender Faktor, da es deren Weibchen für die Eireife benötigen (Chow, et al., 1977). Des Weiteren droht gerade bei geringen Luftfeuchtigkeiten der Verlust von Wasser. Der fehlende Einfluss der Temperaturerhöhung bei 33 % RH in den Versuchen könnte auch an einem drohenden Wasserverlust liegen, der durch höhere Temperaturen eher noch verstärkt werden würde. Die schon recht niedrige Luftfeuchtigkeit begrenzt somit das Entwicklungspotential, das sich normalerweise unter den entsprechenden Temperaturen zeigen würde. Die Kleidermotte scheint also auch hier eine gute Toleranzbreite entwickelt zu haben, in dem sie ihren Wassergehalt in trockenen bis moderaten Luftfeuchten (30 und 60 % RH) konstant hält (Mellanby, 1934), so dass eine konstante Entwicklung erfolgen kann.

Neben den eigentlichen Versuchen zur ökologischen Potenz und Konkurrenzfähigkeit erfolgte eine eher einleitende Beobachtung des Falterschlupfes bei einer unterschiedlichen Anzahl an Eiern auf einem immer gleich großen Nahrungssubstrat. Beobachtungen einer teilweise als hoch empfundenen Sterblichkeit der Larven in kleineren Ansätzen, die vorab aller eigentlich relevanten Versuche lediglich erste Eindrücke zur Entwicklung der Kleidermotte geben sollten, veranlassten zu diesen Versuchsansätzen. Da die Vermutung bestand, dass sowohl die Anzahl der Eiern als aber auch die Nähe ihres Ablageortes zueinander eine Rolle in der Entwicklung der Population spielen könnte, wurden zwei Versuchsansätze bei gleichbleibender Anzahl an Eiern nur in der Nähe der abgelegten Eier zueinander unterschieden. Für die dabei betrachtete Anzahl an Eiern (150) zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Falterschlupfes von der freien Verteilung der Eier hin zur mittigen Anordnung auf einem Areal von nur noch 1 x 1 cm. Dies bedeutet, dass auch die Dichte der Population ein entscheidendes Kriterium für eine erfolgreiche Entwicklung sein könnte. Für *T. bisselliella* als Textilschädling heißt das, dass vor allem mit einem lokalen Vorkommen auf eher kleinem Raum und einem nahezu verschwindenden Druck der aktiven Verbreitung zu rechnen wäre.

5.2 VORKOMMEN UND VERBREITUNG DER KLEIDERMOTTE *T. BISSELLIELLA* IN BERLIN UND UMGEBUNG

Die Freilandfänge von *Tineola bisselliella*, die zum größten Teil in Berlin und dem Brandenburger Umland erfolgten, präsentieren in beiden Beprobungsjahren eine saisonale Abundanz (Abb. 4-16). Dies äußert sich in einem im Frühjahr, Ende März, startenden, bis zum und über den Sommer ansteigenden Falterfang, der etwa ab der Jahresmitte beginnt abzuschwächen und mit vereinzelt Fängen im Herbst abschließt. Während die Zusammenfassung aller Standortdaten des jeweiligen Jahres auf eine Generation pro Jahr hinweist (Abb. 4-16), ist im Jahr 2010 an vereinzelt Standorten (FL14, FL04, FL12, FL23, FL08) ein Einbruch des Falterfangs zum Mitte des Sommers hin zu erkennen (Abb. 4-17). Anschließend steigt die Anzahl gefangener Kleidermotten wieder an. Am deutlichsten tritt dies an den Fallenstandorten FL12 und FL23 ein. Im Jahr 2011 zeigt sich dieses Phänomen lediglich an zwei Standorten (FL23 und FL08) in minimalen Ansätzen, die aufgrund der geringen Falteranzahl an diesen Stellen nicht überzeugend sind. In der Literatur sind jedoch stets zwei bis drei oder sogar mehr Generationen pro Jahr beschrieben. Key & Common (1959) haben zum

Beispiel an einem Befall in einem Wolllager zwei bis drei Generation sowie eine saisonale Abundanz beobachtet. Auch Kemper (1935) spricht von zwei Generationen pro Jahr, die sich einer Sommer- und einer Herbstflugzeit äußern. In Ansätzen kann man dies auch in den Daten der einzelnen Standorte wiedererkennen, jedoch ist die Anzahl an gefangenen Kleidermotten an vielen Standorten eher gering, so dass die beobachtete Schwankung auch unabhängig von einer zweiten Generation entstehen könnte. Andererseits könnte auch gerade die geringe Anzahl die Differenzierung in zwei oder mehrere Generationen verschleiern. Ein engmaschigerer Beprobungsrhythmus an Standorten mit größeren Kleidermottenpopulation könnte hier Aufschluss geben.

Die unterschiedlichen Fangergebnisse der einzelnen Standorte offenbaren eine klare Tendenz zu stärkeren Fängen mit zunehmender Nähe zum Wohnhaus. Die Balkonfallen sind diejenigen mit den höchsten und auch regelmäßigen Fängen. Umso weiter entfernt die Falle im Garten aufgestellt wurde, desto geringer wurde auch der Fang. Betrachten wir allein den Vergleich der Außenfalle mit der Wohnungsfalle an den beiden Standorten FL25 und FL26. Hier wird der mögliche Fang im Innenraum bei ausbleibendem Fang im Freiland mehr als deutlich. Das Vorkommen von *T. bisselliella* im Freiland ist unter der Betrachtung dieser Ergebnisse mehr als unwahrscheinlich. Auch wenn in der früheren Literatur immer wieder von vereinzelt Funden in Vogelnestern berichtet wurde, so zeigte sich bereits, dass dies eher als eine Seltenheit zu sehen ist (Plarre & Krüger-Carstensen, 2011). Das Ausbringen von Vogelnester ähnlichen Fallen (Nesterfallen) führte im Jahr 2012 an einem (FL14) von neun beprobten Standorten zu einem erfolgreichen Fang (Plarre, 2014), der 2013 nicht reproduziert werden konnte. Und auch im Jahr 2014 war es lediglich an zwei Standorten gelungen mit diesem Fallentyp Kleidermotten einzufangen. Die beiden Standorte befanden sich auf Balkonen und somit in direkter Nähe zum Wohnraum. Auch wenn *T. bisselliella* in Nordamerika durchaus an Bienennestern zu finden ist (Linsley & McSwain, 1942), so scheint sie in unseren Breitengraden doch als synanthroper Schädling vorzuherrschen.

5.3 *TINEOLA BISSELLIELLA*, EINE SPEZIALISATION DER GATTUNG *TINEA*?

Die phylogenetischen Analysen mittels Maximum Likelihood zeigen eine klare Artabgrenzung innerhalb der Tineidae, jedoch lassen sich ihre Verzweigungen nicht verlässlich darlegen. Der Bootstrap-Konsensus-Baum zu der COI-Sequenzanalyse zeigt daher eine Polytomie. Die Merkmale zur Aufschlüsselung dieses Knotens fehlen noch. Dies bedeutet, dass jede der aufgeführten Arten theoretisch die Schwestergruppe einer jeden anderen dort mit enthaltenen Art sein kann. Die Monophylien der Arten selbst werden dadurch nicht beeinflusst, sie zeigen verlässliche Bootstrap-Wahrscheinlichkeiten. Das in der Literatur diskutierte Schwestergruppenverhältnis von *Tineola* und *Tinea* konnte somit nicht aufgeklärt werden. Die Erhebung der Gattung *Tineola* (Herrich-Schäfer, 1853) wird in keinem der Stammbäume eindeutig unterstützt. Lediglich mit einer Bootstrap-Wahrscheinlichkeit von 15 % lässt sich die Aufspaltung der beiden Arten *Tinea pellionella* und *Tineola bisselliella* im CR-Stammbaum (Abb. 4-25) darlegen. Jedoch ist an dieser Stelle zu bedenken, dass in dieser Analyse lediglich drei Arten der Tineidae berücksichtigt werden konnten, da die Kontrollregion als molekularer Marker weniger weit verbreitet ist als zum Beispiel die COI-Sequenz. Die Daten, auf

denen diese geringe Wahrscheinlichkeit basiert, sind von geringem Umfang und dürfen nicht überinterpretiert werden. Petersen (1947) fand in der Morphologie des Genitalapparates von *Tineola bisselliella* Merkmale, die für eine Spezialisierung des *Tinea*-Types sprechen. Auch die von Cook et al. (1997) untersuchten Fettsäureprofile von Tineiden legen eine Zuordnung von *T. bisselliella* in die Gattung *Tinea* nahe. Die erstellten phylogenetischen Bäume dieser Arbeit basieren auf einer äußerst geringen Anzahl an Sequenzen je Art, so dass bereits ein Anstieg der Anzahl an Vertretern einer jeden betrachteten Art zu einem klareren Bild der Evolutionslinien führen könnte. Die Sequenzierung weiterer Kontrollregionen sowohl von Vertretern der Gattung *Tinea* als aber auch von Tineiden außerhalb dieser Gattung könnten ebenfalls zur Aufschlüsselung dieses phylogenetischen Knotens beitragen. Durch das Hinzuziehen weiterer Taxa könnte so die Polytomie gelöst werden.

Die Erstellung eines Netzwerkes aus den Distanzdaten der Sequenzvergleiche stellt die Verworrenheit der phylogenetischen Linien bildlich sehr gut dar und lässt das Fehlen der aufspaltungsbestimmenden Merkmale erkennen. Die in der Berechnung berücksichtigten Merkmale geben unterschiedliche Hinweise und führen zu mehreren evolutiven Möglichkeiten. Auch ein daraus resultierender Baum mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % zeigt lediglich die bereits bekannte Polytomie aus der Maximum Likelihood Betrachtung. Interessant ist die immer wieder zu findende Aufspaltung in *Niditinea fuscipunctella* und *Tinea trinotella*. In allen betrachteten Stammbäumen und Netzwerkern ist *T. trinotella* nicht direkt im *Tinea* Komplex wiederzufinden. Dies könnte zum einen bedeuten, dass die ursprüngliche Zuordnung zu dieser Gattung nicht ganz korrekt ist. Andererseits kann es aber auch ein Indiz für die enge phylogenetische Beziehung zwischen den betrachteten Gattungen *Tineola*, *Tinea* und *Niditinea* sein.

5.4 GENETISCHE DISTANZEN UND DIE HERAUSBILDUNG VON POPULATIONEN

Evolution kann auch als ein dynamischer Prozess genetischer Veränderung gesehen werden. In diesem Fall lässt sich anhand von Veränderungen auf der Nukleotid- aber auch Proteinebene die Evolution verfolgen (Beebe & Row, 2007). Auf DNA-Ebene lassen sich schnell evolvierende von langsam evolvierten Bereichen unterscheiden. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, evolviert die mitochondriale DNA schneller als die nukleäre. Mit der enthaltenen Kontrollregion besitzt das mitochondriale Genom eine hypervariable Region, die sich vor allem für eine genetische Differenzierung von Populationen gut eignet (Galtier, et al., 2009). Neben der Kontrollregion (CR), die aufgrund des hohen AT-Gehalts meist schwer zu amplifizieren ist, ist vor allem die Cytochromoxidase I (COI) verstärkt in den Fokus molekularbiologischer Phylogenien geraten. Zahlreiche Arbeiten von Hebert et al. (2003, 2009, 2013) haben die Region der COI zu einem weit verbreiteten Barcode werden lassen. In dieser Arbeit sind beide mitochondriale Bereiche, sowohl die COI als auch die CR, für eine phylogenetische Betrachtung auf Populationsebene genutzt worden. Die COI-Region wurde jedoch nur exemplarisch mit einzelnen Vertretern von wenigen Standorten getestet. Der geringe Unterschied in den einzelnen Sequenzen führten zu keiner erwähnenswerten Aufspaltung der betrachteten Populationen. Dies bestätigt die immer wieder zu findende Meinung, dass dieser Sequenzabschnitt auf der Ebene der Subspezies meist nicht genügend Merkmale bietet

und er innerhalb der Lepidoptera eher zu den am wenigsten variablen Genen gehört (Cameron & Whiting, 2008). Die Kontrollregion liefert für die betrachteten Vertreter der verschiedenen Kleidermottenpopulationen eine Aufspaltung in drei Gruppen, von denen eine aus den Vertretern nur eines Standortes (FL26) gebildet wird. Es handelt sich dabei um den im Raum Berlin-Brandenburg am weitesten von allen anderen Fallenstandorten entfernten Standort. Die geographische Distanz spiegelt sich somit in den molekularen Mustern dieser Population wider. Während an dieser Stelle eine geographische Barriere aufgrund der großen Distanz angenommen werden kann, ist bei den anderen Standorten bei einer kontinuierlichen Verbreitung der Kleidermotte eher von einem kontinuierlichen Genfluss auszugehen, der eine Differenzierung von Populationen stark mindert. Die im Maximum Likelihood Baum der CR-Sequenzen erkennbare Aufspaltung spiegelt weder eine Verteilung der Individuen entsprechend der Standorte wider noch lässt sich ein geographisches Muster entsprechend der Lage der Standorte erkennen. Sowohl die Vertreter des Standortes FL09 und FL35 als auch die des Standortes FL44 sind nicht eindeutig einer der beiden phylogenetischen Gruppen zugeordnet. Darüber hinaus wäre gerade vom Standort FL44, der sich in England befindet eine klare Abgrenzung von den anderen Populationen erwartet worden. Die Herausbildung von molekularbiologisch standortspezifischen Populationen kann somit nur für den Standort FL26 bestätigt werden. Eine genetische Differenzierung zwischen städtischen und ländlichen Populationen konnte auch bei einer Populationsstudie zum Kleinen Kohlweißling (*Pieris rapae*) gezeigt werden (Schoville, et al., 2013). Eine Unterbrechung des Genflusses zwischen den einzelnen Populationen in Berlin kann nicht gezeigt werden. Das bedeutet jedoch nicht zwingend, dass der bestehende Genfluss auf eine aktive Verbreitung von *T. bisselliella* zurückzuführen sein muss. Selbst bei einer vorliegenden Unterteilung von Habitaten kann es zu einem Anstieg des Genflusses zwischen den Populationen der einzelnen Habitate kommen. Vor allem im Pflanzenreich trägt die Windbestäubung zum Erhalt des Genflusses bei, so dass es bei der Teilung von Wäldern zu keinem Abbruch des Genflusses kommt (Young, et al., 1993). Auch bei der Kleidermotte könnte die passive Verbreitung durch einen permanenten Eintrag bzw. Weitergabe eines Befalls für den Fortbestand des Genflusses sorgen.

5.5 SCHLUSSFOLGERUNGEN FÜR DIE PRÄVENTION EINES KLEIDERMOTTENBEFALL

Die Kleidermotte *T. bisselliella* konnte im Freiland nur in der nahen Umgebung von Wohnhäusern erfolgreich mit Pheromonfallen gefangen werden. Becherfallen und Nesterfallen wurden keineswegs von ihr bevorzugt, obwohl sie sich unter Laborbedingungen durchaus als fängig erwiesen. Ihre Toleranz gegenüber Trockenheit und ein vermuteter positiver Effekt einer hohen Populationsdichte unter eher kleinen räumlichen Bedingungen sprechen für ein synanthropes Vorkommen. Ein Befall durch *T. bisselliella* aus natürlichen Reservoiren ist sehr unwahrscheinlich. In Großstädten wie Berlin wirken sich vor allem eine hohe Bebauungsdichte und die starke Infrastruktur fördernd auf eine Verbreitung der Kleidermotte durch den Menschen selbst aus. Aufgrund eines hohen Nahrungsangebotes, beheizten Räumen, aber auch dem insgesamt eher förderlichen milden Klima in Städten gegenüber den ländlichen Regionen (Frankie & Ehler, 1978; Pickett, et al., 2001), bieten sich der Kleidermotte gute Entwicklungsbedingungen. Darüber hinaus spricht ihr eher geringes Flugverhalten (Kemper, 1935) und vor allem die Trägheit der Weibchen (Key & Common, 1959) gegen

eine aktive Verbreitung. Die Prävention eines Befalls muss somit vor allem in Form der Kontrolle von eingetragenen Materialien erfolgen. Gerade Museen mit wechselnden Ausstellungsstücken haben hier die Aufgabe die Kulturgüter zu prüfen und gegebenenfalls vor der Einfuhr ins Museum entsprechend zu behandeln. Auch die Lager von Kulturgütern müssen regelmäßig inspiziert werden und ein Teil des IPM sein.

5.6 DIE BOX-PCR, EIN FINGERPRINTSYSTEM FÜR INSEKTEN?

Für Bakterien ist das genomische Fingerprintsystem auf der Basis von rep-PCRs weit verbreitet und wird sowohl zur Identifizierung als auch zur Betrachtung der Phylogenie oder der genetischen Diversität eingesetzt (Vanparys, et al., 2007; Ines, et al., 2013). Die dabei als Basis für die Primer dienenden kurzen repetitiven DNA Sequenzen sind über das Genom verstreut. BOX, ERIC und REP sind drei Beispiele evolutiv konservierter repetitiver DNA Sequenzen in Bakterien (Versalovic, et al., 1994). Doch auch in Pilzen und mitochondrialen Genomen von Pflanzen führen die entsprechenden Primer zu reproduzierbaren Fingerprints (McDonald, et al., 2000; Zupunski, et al., 2011; Ashutosh, et al., 2005). Die Möglichkeit des Einsatzes der BOX-PCR zur Generierung eines mitochondrialen Fingerprints der Kleidermotte *T. bisselliella* und zur besseren genetischen Differenzierung auf der Eben der Subspezies sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Bevor es zu einer Anwendung dieses Fingerprintsystems kommen konnte, waren zunächst eingehende Betrachtungen möglicher Probleme zu machen. Neben den methodischen Fragen der Wiederholbarkeit und Messgenauigkeit tauchte vor allem die Frage nach dem Einfluss möglicher Darmbakterien auf.

5.6.1 QUALITATIVE ANALYSE DER BOX-PCR

Die qualitative Analyse der BOX-PCR umfasste die Betrachtungen zum Einfluss möglicher bakterieller Kontaminationen in der verwendeten Polymerase (Hughes, et al., 1994; Rand & Houck, 1990) sowie dem Einfluss eventueller Darmbakterien von *T. bisselliella*. In beiden Fällen kam die 16S rRNA PCR, ein bekanntes Tool zum Nachweis von assoziierten Bakterien, zum Einsatz.

Eine einflussnehmende Verunreinigung der verwendeten *Taq*-Polymerase konnte ausgeschlossen werden. Sie führte in der 16S rRNA in der Negativprobe zu keiner Amplifikation. Bei *Halomonas elongata* führten die universellen bakteriellen Primer für die 16S rRNA in der PCR zur Produktion einer Bande bei ~1500 bp. Dies entspricht der zu erwartenden Größe des 16S rRNA-Abschnittes bei einer Amplifikation mit den Primern 27F und 1492R. Eine Dysfunktion der Primer konnte also ausgeschlossen werden. Die bei *H. elongata* entstandenen weiteren Banden in der 16S rRNA-PCR könnten darauf zurückzuführen sein, dass die verwendeten Primer im Genom mehrmals binden. Eine kurze Suche über das BLASTN-Tool von NCBI zeigte, dass beide Primer mehrere Bindungsstellen im Genom von *H. elongata* besitzen (Daten sind nicht gezeigt). Die Bildung weiterer Amplikate ist also begünstigt. Neben der *Taq*-Polymerase von Thermo Scientific wurde eine weitere Polymerase, die *AmpliTaq* LD von Lifescience, getestet. Auch sie erzeugte in der Negativkontrolle keine Amplikate möglicher bakterieller Verunreinigungen.

Die Überprüfung auf mögliche bakterielle Kontaminationen der mtDNA-Extrakte von *T. bisselliella* erfolgte ebenfalls über die 16S rRNA PCR. Hier kam es zwar zur Produktion von Nebenbanden, jedoch sprach sowohl ihre Größe (<1500 bp) als auch ihre geringe Intensität eher für zufällige PCR-Produkte als für eine Amplifikation bakterieller DNA. Ein Ausschluss des Vorkommens von Darmbakterien bei der Kleidermotte kann mit diesen Ergebnissen jedoch nicht erfolgen. Es könnte sein, dass die von Dietz (2014) nachgewiesenen Bakterien im larvalen Darm lediglich auf dieses Entwicklungsstadium begrenzt sind und sie durch die letzte Häutung, bei der sich auch das Mitteldarmepithel mit häutet (Lotmar, 1942), verloren gehen. Sollte auch der Falter noch Darmbakterien enthalten, so müssten sie vor allem in den mtDNA-Extrakten aus Abdomen und Thorax einen Einfluss auf das BOX-PCR Ergebnis zeigen und deutlich in ihren Bandenmustern zu den Produkten der mtDNA aus Kopf und Beinen variieren. Doch diese Beobachtung konnte nicht gemacht werden. Unabhängig vom Extraktionsorgan der mtDNA zeigten sich nahezu identische Bandenmuster in den PCR-Produkten.

5.6.2 REPRODUZIERBARKEIT DER BOX-PCR BANDENMUSTER

Die Wiederholbarkeit und damit Reproduzierbarkeit der Bandenmuster aus der BOX-PCR stellt ein entscheidendes Kriterium für die weitere Anwendung dieser Methode zur Differenzierung von Populationen dar. In das Maß der Reproduzierbarkeit spielt neben einer Variation in den Produkten selbst auch eine Variation in den Messdaten aufgrund der gewählten Methode zur Bestimmung von Fragmentgröße und Konzentration eine Rolle. Das LabChip Verfahren von Agilent bewies sich bei der Auftrennung von RFLP-Mustern als eine gute alternative Methode zur Agarosegelelektrophorese (Fajardo, et al., 2009). Diese Methode sollte in dieser Arbeit ebenfalls genutzt und bezüglich seiner Effektivität im Einsatz getestet werden. Der erste Vergleich der erhaltenen Daten aus der Analyse eines Agarosegelbildes mit denen des Agilent Bioanalyzers zeigte schnell die Vorteile dieser LabChip Technik aber auch ihre Schwächen. Der verwendete DNA Chip zur Analyse umfasste eine Detektionsspanne von 100 bis 12000 bp. Dennoch zeigte sich mit größer werdenden Fragmenten auch ein zunehmendes Maß der Fehlerwahrscheinlichkeit. Auch wenn alle detektierten Banden in einer Messreihe aus zwölf Wiederholungen sich signifikant unterschieden ließen, so stellt sich doch die Frage, wie eine genaue Zuordnung von Einzelproben mit einer guten Verlässlichkeit erfolgen soll. Die Entscheidung für die Übereinstimmung zweier Bandengrößen im Vergleich von zwei Mustern verschiedener Individuen könnte ein entscheidendes Merkmal für die phylogenetische Analyse sein.

Der Vergleich der einzelnen BOX-PCR Produkte aus verschiedenen Reaktionen mit der gleichen Probe zeigten ebenfalls eine Variation in ihren Bandenmustern und ihren Intensitäten. Betrachtet man nun die Variabilität innerhalb einer Population, so nimmt die Anzahl an detektierten PCR-Banden für diese Population im Vergleich zur wiederholten PCR eines Individuums zu. Über die Berechnung des Shannon-Wiener Index und die Evenness ließ sich zeigen, dass die Diversität in den Mustern einer Population höher ist als in der Gruppe der PCR-Wiederholungen. Dies lag jedoch nicht an einer verminderten Gleichverteilung der Banden sondern der höheren Anzahl an Banden. Aus der Variabilität der Messdaten ließ sich am Ende ein Fingerprint der Kleidermotte darstellen, der die

Fragmentgrößen (Banden) enthielt, die zumindest in 75 % der zwölf betrachteten Populationsvertretern zu finden waren. Es bleibt aktuell noch offen, mit welcher Verlässlichkeit sich dieses Bandenmuster in weiteren Vertretern dieser Population, aber vor allem auch Vertretern anderer Populationen wiederfinden lässt. Die beobachteten Schwankungen in den Bandenintensitäten der Wiederholungen der BOX-PCRs könnten auf die Sensitivität dieser Methode sowohl gegenüber der Pufferkonditionen, Enzymqualität und der Primerpräparation als auch gegenüber der eingesetzten DNA-Konzentration zurückzuführen sein. So wird im Bereich des Fingerprinting dazu geraten, mit mindesten zwei Verdünnungen der eingesetzten DNA zu arbeiten (McClelland & Welsh, 1994).

5.6.3 ANALYSEN DER BOX-PCR MUSTER AUF AGAROSEGELEN MIT PYELPH

PyElph ist eine frei zugängliche Software zur Erstellung von phylogenetischen Bäumen anhand von Gelbildern. Ihre Limitierung auf die Auswertung von lediglich einem Gelbild zeigt schnell, dass damit nicht genügend Daten für eine umfassende phylogenetische Analyse gegeben sind. Auf der Ebene der Subspezies ließen sich bei einem Vergleich von sechs Mustern zwar ähnliche phylogenetische Zusammenhänge der Individuen berechnen, wie sie auch aus der Analyse der Sequenzen der Kontrollregion erhalten wurden, jedoch zeigte sich auf der Ebene der Spezies nur ein eher magerer Baum, der wenig Aussagekraft besaß. Für eine phylogenetische Analyse von BOX-PCR-Mustern sollte am besten auf Messdaten zurückgegriffen werden, die durch die Analyse mit dem Bioanalyzer erzeugt werden. Mithilfe eines entsprechenden Statistikprogramms lassen sich aus diesen Daten vermutlich weitaus verlässlichere phylogenetische Analysen erstellen.

Abschließend lässt sich die BOX-PCR als ein durchaus brauchbares Tool zur Analyse der genetischen Distanzen zwischen Subspezies bezeichnen. Für einen verlässlichen Einsatz dieser Methode sind jedoch weitere Überprüfungen bezüglich der Reproduzierbarkeit und vor allem weitere Methoden zur Darstellung in phylogenetischen Netzwerken zu testen.

Tab. 3-1: Organismengruppen und ihre Herkunft.....	18
Tab. 3-2: Versuchsansätze zur Untersuchung des Falterschlupfes von <i>Tineola bisselliella</i> bei unterschiedlicher Anzahl eingesetzter Eier und deren Verteilung auf dem Nährsubstrat.....	24
Tab. 3-3: Temperaturen und relative Luftfeuchten der sechs klimatisch differenzierten Bedingungen	26
Tab. 3-4: Fallenstandorte in den Jahren 2010-2014: Lage (Berlin, Brandenburg, S-H=Schleswig-Holstein, E=England), Standortcharakteristika (Entfernung vom geographischen Mittelpunkt von Berlin (nur für Berliner Fallenstandorte), Fallenposition und Entfernung zum Wohnhaus), verwendeten Fallentyp (Phe=Pheromonfalle, Bf=Becherfalle, Nk=Nistkastenfalle).....	32
Tab. 3-5: Protokoll zur mtDNA-Isolierung aus Faltern von <i>T. bisselliella</i> , <i>T. pellionella</i> , <i>N. fuscella</i> und <i>E. kuehniella</i>	34
Tab. 3-6: Reaktionsansatz zur CO I-PCR.....	38
Tab. 3-7: PCR-Programm zur Amplifikation des CO I Sequenzabschnitts.....	38
Tab. 3-8: Reaktionsansatz zur CR-PCR.....	39
Tab. 3-9: PCR-Programm zur Amplifikation der mitochondrialen Kontrollregion.....	40
Tab. 3-10: Reaktionsansatz zur BOX-PCR.....	40
Tab. 3-11: PCR-Programm zur BOX-PCR.....	41
Tab. 3-12: mtDNA-Proben von <i>T. bisselliella</i> zum Test der Wiederholbarkeit der generierten Bandenmuster nach der BOX-PCR.....	42
Tab. 3-13: mtDNA-Extraktionsansätze aus unterschiedlichen Körperteilen von <i>T. bisselliella</i>	43
Tab. 3-14: Protokoll zum DNase I-Verdau zur Eliminierung möglicher Verunreinigungen durch chromosomaler DNA bei der mtDNA-Extraktion.....	44
Tab. 3-15: Reaktionsansatz für die 16S rRNA-PCR mit der Taq-DNA-Polymerase (native) von Thermo Scientific.....	45
Tab. 3-16: Reaktionsansatz für die 16S rRNA-PCR mit der AmpliTaq® DNA Polymerase LD (low DNA) von Lifescience.....	46
Tab. 3-17: PCR-Programm zur 16S rRNA-PCR.....	46
Tab. 3-18: Ansätze der Klonierungsreaktion (TOPO® TA Klonierung).....	51
Tab. 3-19: Transformationsansätze zur Transformation der chemisch kompetenten <i>E. coli</i> DH5α™ Zellen.....	52
Tab. 3-20: Reaktionsansatz zur Colony-PCR mit dem Taq Master Mix von Roboklon.....	53
Tab. 3-21: PCR-Programm zur Colony-PCR.....	54
Tab. 3-22: COI-Sequenz-Quellen von NCBI.....	59
Tab. 3-23: PCR- und Sequenzierprimer.....	68
Tab. 3-24: Vektoren.....	68
Tab. 3-25: Verwendete Software, Programme und Webtools.....	69
Tab. 4-1: Größe und Konzentration der einzelnen DNA-Banden der Probe TbBZ1 (mtTbBZ1408_1 (<i>T. bisselliella</i> , BAM-Zucht)) in allen vier BOX-PCR-Ergebnissen.....	102
Tab. 4-2: Prominente, gemittelte Fragmentgrößen im BOX-PCR-Muster der Kleidermotten-Zuchtpopulation (TbBZ). Fett gedruckte Zeilen enthalten Bandenbereiche, die bei allen betrachteten Populationsvertretern eindeutig detektiert wurden (Konzentration > 0,1 ng/µl). Angabe des	

Mittelwertes (\bar{x}), der Standardabweichung (s), des Variationskoeffizienten (cv), des Minimums und Maximums sowie der Variationsbreite.....	110
Tab. 6-1: Ergebnisse der Tests der Nesterfalle innerhalb eines abgeschotteten Flugraums	135

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1-1: Imago auf dem Leim einer Falle klebend (links) und Larve im Zuchtsubstrat (rechts) der Kleidermotte <i>Tineola bisselliella</i> . (Fotos: Thomas Sommerfeld (BAM 4.1), Bianca Herrmann)	5
Abb. 1-2: Befallsspuren von <i>Tineola bisselliella</i> an einer Wollmütze (obere Bilder) und einem Lederschuh samt Einlegesohle aus Lammfell (untere Bilder). (Fotos: Bianca Herrmann)	8
Abb. 3-1: Zuchtansätze von <i>Tineola bisselliella</i> und <i>Tinea pellionella</i> im Zuchtraum.....	19
Abb. 3-2: Konkurrenzansätze unter Zuchtbedingungen.....	25
Abb. 3-3: Pheromonfalle mit Klebefläche und Pheromonköder	27
Abb. 3-4: Becherfallen aus Trichterfalle und Joghurtbecher für den Freilandfang von <i>Tineola bisselliella</i>	28
Abb. 3-5: Aufbau der Nesterfalle	29
Abb. 3-6: Skizze zu den Fallenstandorten (FL) im Raum Berlin und Umgebung	30
Abb. 3-7: Agilent DNA LabChip für die Bestimmung von Größe [bp] und Konzentration [ng/μl] von PCR-Fragmenten (DNA).	49
Abb. 3-8: pCR™4-TOPO® Vektor Karte mit dem Sequenzbereich um die TOPO® Klonierungsschnittstelle (Thermo Fischer Scientific Inc., 2014).....	53
Abb. 4-1: Durchschnittlicher prozentualer Anteil geschlüpfter Falter der Kleidermotte <i>Tineola bisselliella</i> (Filiargeneration 1) in Abhängigkeit unterschiedlicher Anzahlen und Verteilungen der Eier auf dem Nährsubstrat.	72
Abb. 4-2: Durchschnittlicher prozentualer Anteil des Falter- und Käferschlupfes innerhalb der Filiargeneration 1 (F1) der beiden Nahrungskonkurrenten <i>Tineola bisselliella</i> und <i>Anthrenus flavipes</i>	73
Abb. 4-3: Gemittelter Falterschlupf von <i>Tineola bisselliella</i> bei einer Raumtemperatur von 21° C und einer relativen Raumfeuchte von 33 %.	75
Abb. 4-4: Gemittelter Falterschlupf von <i>Tineola bisselliella</i> bei einer Raumtemperatur von 20° C und einer relativen Raumfeuchte von 65 %.	76
Abb. 4-5: Gemittelter Falterschlupf von <i>Tineola bisselliella</i> bei einer Raumtemperatur von 21° C und einer relativen Raumfeuchte von 76 %.	76
Abb. 4-6: Gemittelter Falterschlupf von <i>Tineola bisselliella</i> bei einer Raumtemperatur von 26° C und einer relativen Raumfeuchte von 33 %.	77
Abb. 4-7: Gemittelter Falterschlupf von <i>Tineola bisselliella</i> bei einer Raumtemperatur von 27° C und einer relativen Raumfeuchte von 68 %.	78
Abb. 4-8: Gemittelter Falterschlupf von <i>Tineola bisselliella</i> bei einer Raumtemperatur von 26° C und einer relativen Raumfeuchte von 76 %.	78
Abb. 4-9: Gemittelter Falterschlupf von <i>Tineola bisselliella</i> bei einer Raumtemperatur von 29° C und einer relativen Raumfeuchte von 33 %.	79

Abb. 4-10: Gemittelter Falterschlupf von <i>Tineola bisselliella</i> bei einer Raumtemperatur von 29° C und einer relativen Raumfeuchte von 70 %	80
Abb. 4-11: Gemittelter Falterschlupf von <i>Tineola bisselliella</i> bei einer Raumtemperatur von 29° C und einer relativen Raumfeuchte von 76 %	80
Abb. 4-12: Gemittelter Käferschlupf von <i>Anthrenus flavipes</i> bei einer Raumtemperatur von 26° C und einer relativen Raumfeuchte von 33 %	81
Abb. 4-13: Gemittelter Käferschlupf von <i>Anthrenus flavipes</i> bei einer Raumtemperatur von 26° C und einer relativen Raumfeuchte von 76 %	82
Abb. 4-14: Gemittelter Käferschlupf von <i>Anthrenus flavipes</i> bei einer Raumtemperatur von 29° C und einer relativen Raumfeuchte von 33 %	82
Abb. 4-15: Gemittelter Käferschlupf von <i>Anthrenus flavipes</i> bei einer Raumtemperatur von 29° C und einer relativen Raumfeuchte von 76 %	83
Abb. 4-16: Prozentuale, jahreszeitliche Verteilung der gefangenen Falter von <i>Tineola bisselliella</i> über einen Zeitraum von sieben Monaten in den Jahren 2010 und 2011 im Raum von Berlin und Umgebung	84
Abb. 4-17: Anzahl (N) gefangener Falter von <i>Tineola bisselliella</i> über einen Zeitraum von sieben Monaten (Ende März bis Ende Oktober 2010) im Raum von Berlin und Umgebung	85
Abb. 4-18: Anzahl (N) gefangener Falter von <i>Tineola bisselliella</i> über einen Zeitraum von sieben Monaten (Ende März bis Ende Oktober 2011) im Raum von Berlin und Umgebung	86
Abb. 4-19: Gemittelte jährliche Anzahl gefangener Falter von <i>Tineola bisselliella</i> über einen Zeitraum von sieben Monaten (aus den Jahren 2010 und 2011) im Raum von Berlin und Umgebung	87
Abb. 4-20: Anzahl (N) gefangener Falter von <i>Tineola bisselliella</i> im Frühling, Sommer und Herbst der Jahre 2010 und 2011 in einer Kleinstadt von Brandenburg (FL26) und einem Dorf in Schleswig-Holstein (FL25)	88
Abb. 4-21: Maximum Likelihood Baum der mt COI Sequenzen einzelner Vertreter der Tineidae, sowie <i>Ephestia kuehniella</i> (Pyralidae) als Außengruppe (Outgroup)	89
Abb. 4-22: Bootstrap-Konsensus-Baum zur Maximum Likelihood Analyse der COI-Sequenzen der Tineidae mit <i>Ephestia kuehniella</i> als Außengruppe	90
Abb. 4-23: Phylogenetisches Netzwerk auf der Basis der COI-Sequenzen der Tineidae mit <i>Ephestia kuehniella</i> als Außengruppe (Outgroup)	92
Abb. 4-24: 95 % Wahrscheinlichkeits-Netzwerk der COI-Sequenzen der Tineidae und <i>Ephestia kuehniella</i>	92
Abb. 4-25: Maximum Likelihood Kladogramm der mt CR Sequenzen einzelner Vertreter der Tineidae, sowie <i>Ephestia kuehniella</i> (Pyralidae) als Außengruppe (Outgroup)	93
Abb. 4-26: Kladogramm zum Maximum Likelihood Baum der mt COI Sequenzen von <i>Tineola bisselliella</i> verschiedener Standorte	94
Abb. 4-27: Kladogramm zum Maximum Likelihood Baum der mt CR Sequenzen von <i>Tineola bisselliella</i> verschiedener Standorte	95
Abb. 4-28: Agarosegelbild zur mtDNA basierten BOX-PCR mit dem Primer BOXA 1R und der Taq DNA Polymerase von Thermo Scientific	96
Abb. 4-29: Agarosegelbild zur 16S rRNA-PCR mit der Taq-DNA-Polymerase von Thermo Scientific (A) bzw. der <i>AmpliTaq</i> LD von Lifescience (B) und den Primern 27F und 1492R bei drei unterschiedlichen Annealingtemperaturen (1 = 46,3° C, 2 = 49,7° C, 3 = 53,8° C) und 30 Zyklen, M = 100 bp Marker von Roboklon, Einsatz von 40 ng gDNA von <i>H. elongata</i> als Positivkontrolle, Neg-Kontrolle erfolgte ohne DNA-Einsatz, Auftrag von 5 µl PCR-Produkt und 5 µl Marker	97

Abb. 4-30: Agarosegelbild zur mtDNA basierten BOX-PCR mit dem Primer BOX A1R und der <i>Taq</i> -DNA-Polymerase von Fermentas (M = 100 bp Marker von Roboklon, TbBZ1 = Probe mtTbBZ1408_1 (<i>T. bisselliella</i> , BAM-Zucht), TbBZ2 = Probe mtTbBZ1408_2 (<i>T. bisselliella</i> , BAM-Zucht), TbBZ3 = Probe mtTbBZ1408_3 (<i>T. bisselliella</i> , BAM-Zucht), TbBZ4 = Probe mtTbBZ1408_6 (<i>T. bisselliella</i> , BAM-Zucht), Einsatz von 40 ng mtDNA, Auftrag von 10 µl PCR-Ansatz und 5 µl Marker.	98
Abb. 4-31: Geldarstellung zum Agilent DNA Chip 12000 mit 12 mtDNA basierten BOX-PCR-Ergebnissen mit dem Primer BOX A1R und der <i>Taq</i> -DNA-Polymerase von Thermo Scientific bei einem Einsatz von ~40 ng mtDNA (M = Agilent DNA Leiter (L) mit einem 50 bp Marker (grün) und einem 17.000 bp Marker (violett), TbBZ1 = Probe mtTbBZ1408_1 (<i>T. bisselliella</i> , BAM-Zucht), TbBZ2 = Probe mtTbBZ1408_2 (<i>T. bisselliella</i> , BAM-Zucht), TbBZ3 = Probe mtTbBZ1408_3 (<i>T. bisselliella</i> , BAM-Zucht), TbBZ4 = Probe mtTbBZ1408_6 (<i>T. bisselliella</i> , BAM-Zucht)), Auftrag von 1 µl PCR-Produkte.....	99
Abb. 4-32: Elektropherogramm-Darstellung der Fluoreszenzwerte über die Zeit zu den Bandenmustern der BOX-PCR-Ergebnisse von TbBZ1 (Ansatz 1) und TbBZ1 (Ansatz 2) vom 27.08.14 mit dem Agilent DNA Chip 12000.....	100
Abb. 4-33: Elektropherogramm-Darstellung der Fluoreszenzwerte über die Zeit zu den Bandenmustern der BOX-PCR-Ergebnisse von TbBZ3 (Ansatz 1) vom 27.8.14 und TbBZ3 (Ansatz 1) vom 04.09.14 mit dem Agilent DNA Chip 12000.....	101
Abb. 4-34: Boxplots der Messreihe zur Fragmentgröße der Banden des 100 bp Plus Markers (Fermentas) mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer.	103
Abb. 4-35: Boxplots der Messreihe zur Fragmentgröße der Banden des BOX-PCR-Musters von <i>Tineola bisselliella</i> (BAM-Zucht) mit dem Agilent 2100 Bioanalyzer.	104
Abb. 4-36: Agarosegelbild zur Variabilität in der BOX-PCR von 6 individuellen mitochondrialen DNA-Extrakten von <i>T. bisselliella</i> (mtTb) aus der BAM-Zucht-Population (BZ).....	104
Abb. 4-37: Agarosegelbild zur Variabilität in der BOX-PCR von 8 individuellen mitochondrialen DNA-Extrakten von <i>T. bisselliella</i> (mtTb) aus der Freiland-Population Nr. 33 (33).	105
Abb. 4-38: Variabilität in der TbBZ-Population: Geldarstellung zu zwei Agilent DNA Chips 12000 mit je 12 mtDNA basierten BOX-PCR-Mustern von <i>T. bisselliella</i> (BAM-Zucht).	106
Abb. 4-39: Variabilität in der Tb35-Population: Geldarstellung zu zwei Agilent DNA Chips 12000 mit je 12 mtDNA basierten BOX-PCR-Ergebnissen von <i>T. bisselliella</i> (FL35).	107
Abb. 4-40: Elektropherogramm-Darstellung der Fluoreszenzwerte über der Fragmentgröße zu den Bandenmustern der BOX-PCR-Ergebnisse von TbBZ 1102_4 und TbBZ 1102_1 mit dem Agilent DNA Chip 12000.	108
Abb. 4-41: Elektropherogramm-Darstellung der Fluoreszenzwerte über der Fragmentgröße zu den Bandenmustern der BOX-PCR-Ergebnisse von TbBZ 1102_2 und TbBZ 2602_4 mit dem Agilent DNA Chip 12000.	109
Abb. 4-42: 16S rRNA PCR mit <i>AmpliTaq</i> LD und den Primern 27F und 1492R bei drei unterschiedlichen Annealingtemperaturen (1= 46,3° C, 2= 49,7° C, 3= 53,8° C) und 35 Zyklen, Einsatz von ~40 ng mtDNA von <i>T. bisselliella</i> aus der Zucht (TbBZ 0701_1) bzw. ~40 ng nDNA <i>H. elongata</i> als Positivkontrolle, Neg-Kontrolle ohne DNA-Einsatz, Auftrag von 5 µl PCR-Produkt und 5µl Marker. .	111
Abb. 4-43: 16S rRNA PCR mit <i>AmpliTaq</i> LD und den Primern 27F und 1492R bei drei unterschiedlichen Annealingtemperaturen (1= 46,3° C, 2= 49,7° C, 3= 53,8° C) und 30 Zyklen, Einsatz von ~40 ng mtDNA von <i>T. bisselliella</i> verschiedener Populationen (TbBZ, Tb37) mit DnaseI-Verdau (Tb37 1401_3) und ohne (Tb37 1101_4 und TbBZ 0701_1) bzw. gDNA von <i>H. elongata</i> als Positivkontrolle, Neg-Kontrolle ohne DNA-Einsatz, Auftrag von 5 µl PCR-Produkt und 5 µl Marker.	111

Abb. 4-44: 16S rRNA PCR mit <i>Taq</i> Polymerase, native (Fermentas) und den Primern 27F und 1492R bei drei unterschiedlichen Annealingtemperaturen (1= 46,3° C, 2= 49,7° C, 3= 53,8° C) und 30 Zyklen, Einsatz von ~40 ng mtDNA von <i>T. bisselliella</i> verschiedener Populationen (Tb37, TbBZ) bzw. gDNA von <i>H. elongata</i> als Positivkontrolle, Neg-Kontrolle ohne DNA-Einsatz, Auftrag von 5 µl PCR-Produkt und 5 µl Marker.....	112
Abb. 4-45: BOX-PCR mit der mtDNA aus verschiedenen Körperabschnitten von <i>Tineola bisselliella</i>	113
Abb. 4-46: mtDNA basierte BOX-PCR zum Vergleich der Arten <i>E. kuehniella</i> , <i>T. pellionella</i> und <i>T. bisselliella</i>	114
Abb. 4-47: Detektion und Vergleich der Bandenmuster in PyElph.....	115
Abb. 4-48: Neighbor Joining Baum zur gelelektrophoretischen Auftrennung der BOX-PCR Muster aus Abbildung 4-46 bzw. 4-47 in PyElph. Die über den Ästen angegebenen Zahlen entsprechenden Astlängen.....	115
Abb. 4-49: mtDNA basierte BOX-PCR für den Vergleich von Freilandpopulationen von <i>Tineola bisselliella</i>	116
Abb. 4-50: Neighbor Joining Baum zur gelelektrophoretischen Auftrennung der BOX-PCR Muster aus Abbildung 4-49 in PyElph. Die über den Ästen angegebenen Zahlen entsprechenden Astlängen....	117
Abb. 4-51: Colony-PCR nach Transformation von <i>E. coli</i> DH5α mit pCR™ 4-TOPO plus Insert 1 (mtTbBZ 1102_2 (<i>T. bisselliella</i>), ~350 bp-Bande aus der BOX-PCR 300715_BOX1) bzw. Insert 2 (mtEk 0611_14 (<i>E. kuehniella</i>), ~600 bp-Bande aus der BOX-PCR 060815_BOX2) unter Verwendung von <i>Taq</i> PCR Master Mix (2x) von Roboklon und den Primern T7 und T3, Neg = Negativ-Kontrolle ohne <i>E. coli</i> Kolonie, Auftrag von 10 µl PCR-Produkt und 5 µl Marker	118
Abb. 6-1: Gemittelter Käferschlupf von <i>Anthrenus flavipes</i> bei einer Raumtemperatur von 21° C und einer relativen Raumfeuchte von 33 %	133
Abb. 6-2: Gemittelter Käferschlupf von <i>Anthrenus flavipes</i> bei einer Raumtemperatur von 20° C und einer relativen Raumfeuchte von 65 %	133
Abb. 6-3: Gemittelter Käferschlupf von <i>Anthrenus flavipes</i> bei einer Raumtemperatur von 21° C und einer relativen Raumfeuchte von 76 %	134
Abb. 6-4: Gemittelter Käferschlupf von <i>Anthrenus flavipes</i> bei einer Raumtemperatur von 26° C und einer relativen Raumfeuchte von 33 %	134
Abb. 6-5: Gemittelter Käferschlupf von <i>Anthrenus flavipes</i> bei einer Raumtemperatur von 29° C und einer relativen Raumfeuchte von 70 %	135

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

BAM	Bundesanstalt für Materialprüfung und –forschung
BSA	Bovine Serum Albumin
bp	base pair (Basenpaar)
cm	Centimeter
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleosidtriphosphat

dsDNA	doppelsträngige DNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDTA III	Ethylendiamin-tetraessigsäure Eisen(III) Natriumsalz Trihydrat
g	Gramm/Erdbeschleunigung
inkl.	Inklusive
JKI	Julius-Kühn-Institut
M	Molar (mol/l)
max.	maximal
min	Minuten
mM	Millimolar
mg	Milligramm
mm	Millimeter
ml	Milliliter
mtDNA	Mitochondriale Desoxyribonikleinsäure
Na	Natrium
nDNA	Nukleäre DNA
Ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
Numts	nuclear mitochondrial DNA
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerasekettenreaktion)
Pg	Pikogramm
pmol	Pikomol
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
RH	relative humidity (Relative Luftfeuchte)
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen per Minute)
RT	Raumtemperatur
S	Sekunde
SDS	Sodium dodecyl sulfate (Natriumdodecylsulfat)
ssDNA	single stranded (einzelsträngige) DNA
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris-HCl	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid
U	Units
üN	über Nacht
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D galactopyranoside
μ l	Mikroliter
z.B.	zum Beispiel

Anlage 1

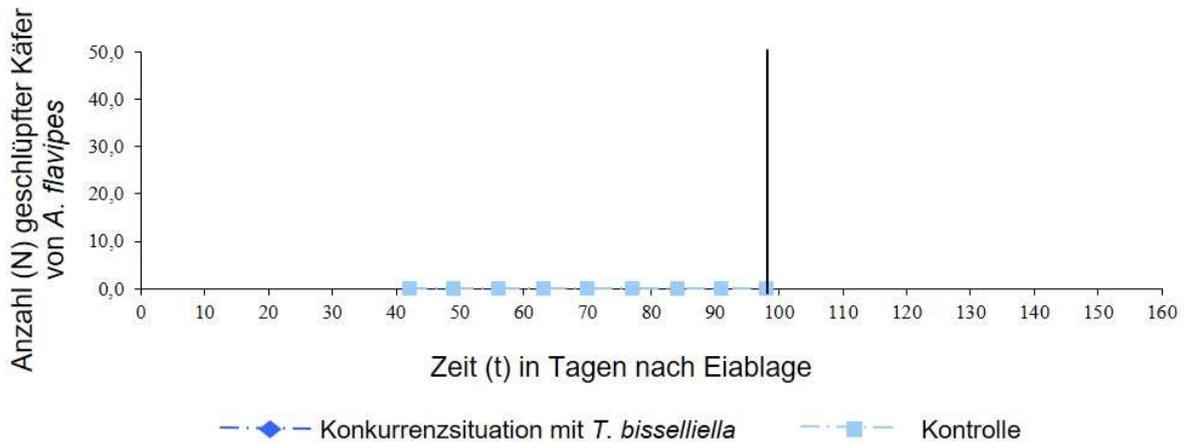


Abb. 9-1: Gemittelter Käferschlupf von *Anthrenus flavipes* bei einer Raumtemperatur von 21° C und einer relativen Raumfeuchte von 33 %.

Beobachtung der Anzahl (N) wöchentlich neu geschlüpfter Käfer von der vierten bis zu 21. Woche nach Eiablage innerhalb der Konkurrenzsituation mit *Tineola bisselliella* sowie in der Kontrolle. Einsatz von 300 Eiern je Art. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

Anlage 2

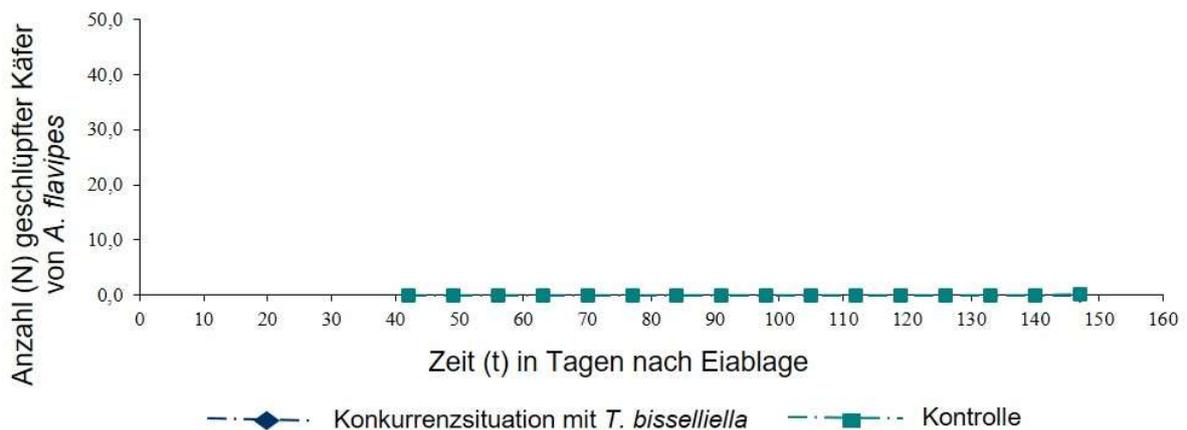


Abb. 9-2: Gemittelter Käferschlupf von *Anthrenus flavipes* bei einer Raumtemperatur von 20° C und einer relativen Raumfeuchte von 65 %.

Beobachtung der Anzahl (N) wöchentlich neu geschlüpfter Käfer von der vierten bis zu 21. Woche nach Eiablage innerhalb der Konkurrenzsituation mit *Tineola bisselliella* sowie in der Kontrolle. Einsatz von 300 Eiern je Art. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

Anlage 3

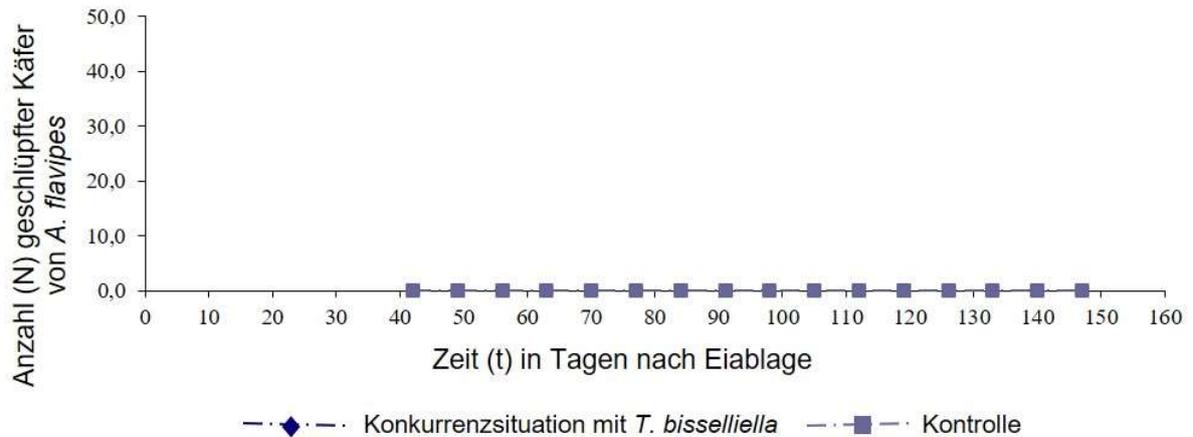


Abb. 9-3: Gemittelter Käferschlupf von *Anthrenus flavipes* bei einer Raumtemperatur von 21° C und einer relativen Raumfeuchte von 76 %.

Beobachtung der Anzahl (N) wöchentlich neu geschlüpfter Käfer von der vierten bis zu 21. Woche nach Eiablage innerhalb der Konkurrenzsituation mit *Tineola bisselliella* sowie in der Kontrolle. Einsatz von 300 Eiern je Art. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

Anlage 4

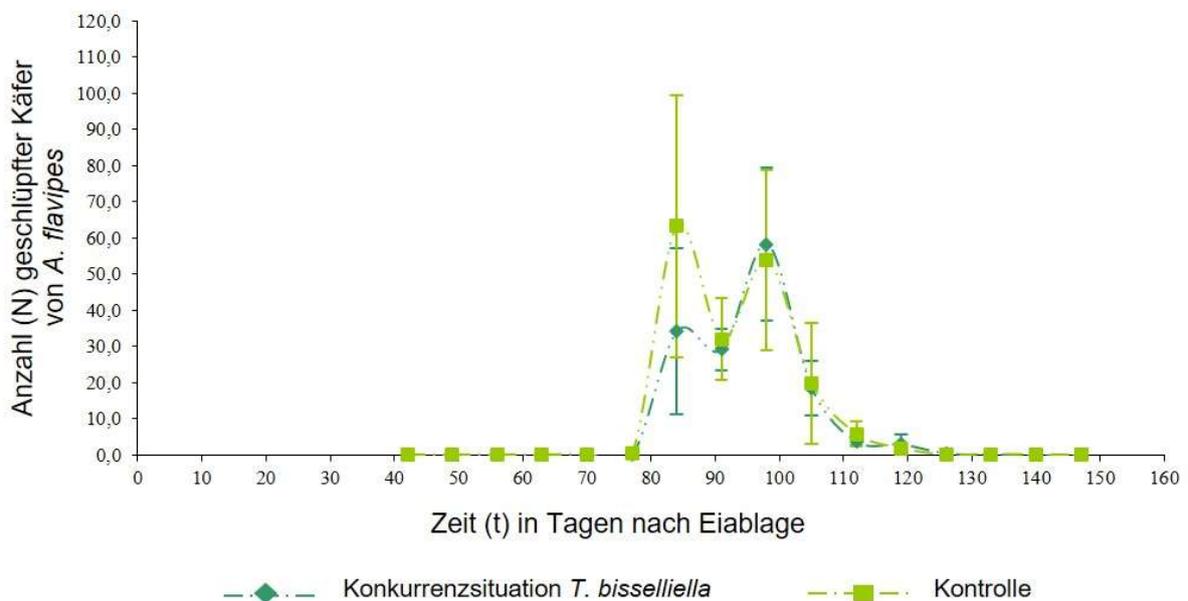


Abb. 9-4: Gemittelter Käferschlupf von *Anthrenus flavipes* bei einer Raumtemperatur von 26° C und einer relativen Raumfeuchte von 33 %.

Beobachtung der Anzahl (N) wöchentlich neu geschlüpfter Käfer von der vierten bis zu 21. Woche nach Eiablage innerhalb der Konkurrenzsituation mit *Tineola bisselliella* sowie in der Kontrolle. Einsatz von 300 Eiern je Art. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

Anlage 5

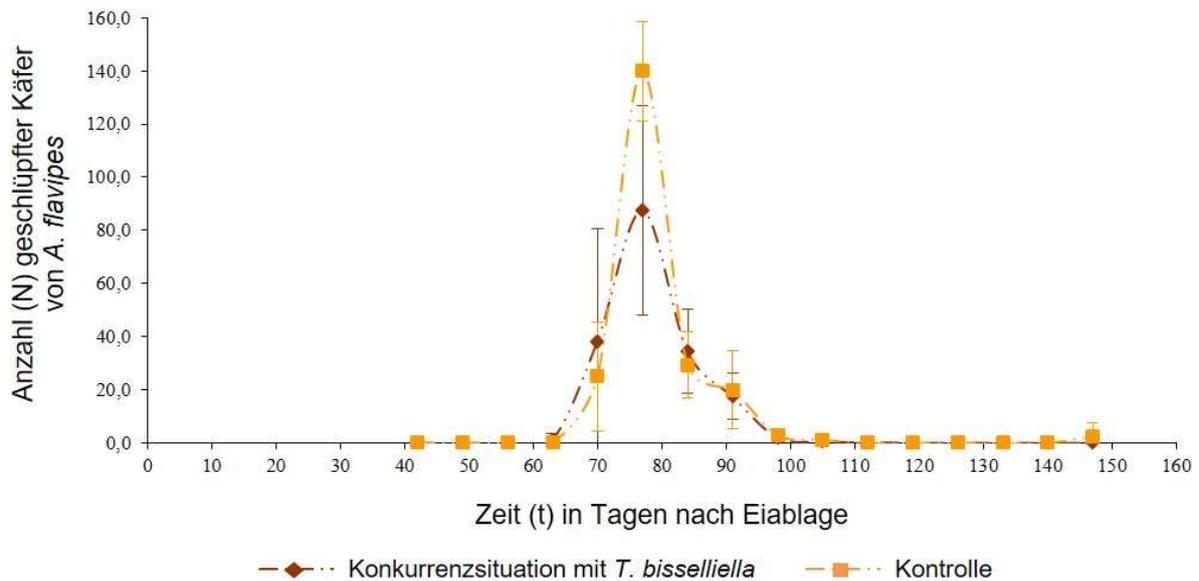


Abb. 9-5: Gemittelter Käferschlupf von *Anthrenus flavipes* bei einer Raumtemperatur von 29° C und einer relativen Raumfeuchte von 70 %.

Beobachtung der Anzahl (N) wöchentlich neu geschlüpfter Käfer von der vierten bis zu 21. Woche nach Eiablage innerhalb der Konkurrenzsituation mit *Tineola bisselliella* sowie in der Kontrolle. Einsatz von 300 Eiern je Art. Die Standardabweichung ist als Fehlerbalken dargestellt.

Anlage 6

Tab. 9-1: Ergebnisse der Tests der Nesterfalle innerhalb eines abgeschotteten Flugraums

Zeit (t) in Tagen	Anzahl eingesetzte Falter (N_e)	Anzahl gefangene Falter (N_g)		Anzahl freie Falter (N_f)		Summe N_g und N_f
	♀+♂	♀	♂	♀	♂	♀+♂
3	100	13	7	14	37	71
10	50	12	7	11	29	59
3	20	8	0	7	6	21
6	20	5	1	5	5	16
3	20	1	0	8	9	18
3	20	0	0	6	6	12

Die Fangzahlen waren schwankend und die Weibchen der Kleidermotten wurden eindeutig stärker angelockt als die Männchen. Die einzelnen Versuche fanden in nur geringen Abständen zueinander statt, so dass vereinzelte Falter auch aus einer vorangegangenen Population stammen konnten. Dennoch verlief der Fangtest erfolgreich, so dass die Nesterfallen im Feiland eingesetzt werden konnten.

Die Kleidermotte *Tineola bisselliella*, ursprünglich vermutlich aus Afrika stammend (Zeller, 1852), ist als weltweit verbreiteter Materialschädling in Wohnungen, Lagern und Museen bekannt (Key & Common, 1959; Querner, 2014). Um in Form des Integrated Pest Management (IPM) Methoden zur Erkennung, Prävention und Bekämpfung von Vorrats- und Materialschädlingen zu organisieren und zu entwickeln, ist eine genaue Kenntnis der Biologie, Ökologie und des Verhaltens des Schädlings entscheidend. In dieser Arbeit wird aufbauend auf den Studien zur Entwicklung von *T. bisselliella* unter verschiedenen Temperaturen und Luftfeuchten von Titschak (1925) das Falterschlupfverhalten quantifiziert und mit dem unter der Konkurrenzsituation mit dem aus der gleichen Nahrungsgilde stammenden Polsterwarenkäfers (*Anthrenus flavipes*) verglichen. Die Konkurrenzfähigkeit der Kleidermotte über das gesamte betrachtete Spektrum an Temperatur und Luftfeuchtigkeiten machen sie als Materialschädling so erfolgreich. Darüber hinaus wird das Vorkommen in natürlichen Reservoirien durch die Untersuchung von Freilandfängen an verschiedenen Standorten in Berlin und Umgebung als unwahrscheinlich angesehen. Molekularbiologische Betrachtungen des Genflusses anhand von mitochondrialen Sequenzabschnitten sowie BOX-PCR Mustern zeigen zwar keine Fragmentierung der Populationen in die einzelnen Fangstandorte, jedoch kann auch ein Netzwerk aus passiver Verbreitung durch den Menschen für einen kontinuierlichen Genfluss sorgen.

Abstract

The webbing clothes moth *Tineola bisselliella*, assumed to original derive from Afrika (Zeller, 1852), is a cosmopolitan pest in households, warehouses and on culture heritage (Key & Common, 1959; Querner, 2014). To organize and develop strategies for the identification, prevention and control of stored product and culture heritage pest organism in the manner of Integrated Pest Management (IPM), a precise knowledge of the biology, ecology and physiology of the pest organism is needed. Based on the observations by Titschak (1925) on the development of *T. bisselliella* under different temperatures and relative humidities, this work shows the quantification of moth eclosion under three conditions of temperature and relative humidity compared in control and interspecific competition with the furniture carpet beetle (*Anthrenus flavipes*) from the same feeding guild. The overall competition of the webbing clothes moth demonstrates her success as a culture heritage pest organism. Monitoring *T. bisselliella* at differnt outdoor stations in the broader area of Berlin leads to the absence of an occurrence in natural habitats. Molecular analysis of mitochondrial sequences as well as BOX-PCR patters demonstrate no population fragmentation into the trapping locations. Nonetheless a quite good network from passiv distribution by human being can also results in a continious geneflow.

- Agilent Technologies, Inc., 2013. *Agilent DNA 7500 and DNA 12000 Kit Guide*. s.l.:s.n.
- Agilent Technologies, Inc., 2003. *Agilent 2100 Bioanalyzer. 2100 Expert User's Guide*.
- Altschul, S. F. et al., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), pp. 3389-3402.
- Ashutosh, et al., 2005. rep-PCR helps to distinguish different alloplasmic cytoplasmic male sterile lines of *Brassica juncea*. *Plant Science*, Band 168, pp. 1083-1087.
- Back, E. A., 1931. *The Control of Moths in Upholstered Furniture*. Washington, D. C.: U. S. Department of Agriculture, Farmers' Bulletin No. 1655.
- Ball, S. L. & Armstrong, K. F., 2006. DNA barcodes for insect pest identification: a test case with tussock moths (Lepidoptera: Lymantriidae). *Canadian Journal of Forest Research*, Band 36, pp. 337-350.
- Becker, G., 1960. Biologische Untersuchungen an Textilien. In: *Handbuch der Werkstoffprüfung 2. Auflage*. Berlin/Göttingen/Heidelberg: Thieme Verlag, pp. 971-1007.
- Becker, G., 1980. Fördernde Ernährungswirkung von Pflanzenstoffen auf Kleidermotten-Raupen. *Material und Organismen*, 15(1), pp. 1-8.
- Beebee, T. & Rowe, G., 2004. Molecular identification: species, individuals, and sex. In: *An Introduction to Molecular Ecology*. 2. Auflage Hrsg. Oxford and New York: Oxford University Press, pp. 74-99.
- Beebee, T. & Row, G., 2007. A history of molecular ecology. In: *An introduction to Molecular Ecology*. s.l.:Oxford University Press, pp. 1-26.
- Behura, S. K., 2006. Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Molecular Ecology*, Band 15, pp. 3087-3113.
- Bergh, et al., 2006. A Contribution to Standards for Freezing as a Pest control Method for Museum. *Collection Forum*, 21(1-2), pp. 117-125.
- Borst, A., Box, A. T. A. & Fluit, A. C., 2004. False-Positive Results and Contamination in Nucleic Acid Amplification Assays: Suggestion for a Prevent and Destroy Strategy. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, Issue 23, pp. 289-299.
- Böttger, E. C., 1990. Frequent Contamination of Taq Polymerase with DNA. *Clinical Chemistry*, 36(6), pp. 1258-1259.
- Brokerhof, A. W., Banks, H. J. & Morton, R., 1992. A Model for Time-Temperature-Mortality Relationship for Eggs of the Webbing Clothes Moth, *Tineola bisselliella* (Lepidoptera: Tineidae), Exposed to Cold. *Journal of Stored Products Research*, 28(4), pp. 269-277.
- Brokerhof, A. W., Morton, R. & Banks, H. J., 1993. Time-Mortality Relationships for Different Species and Developmental Stages of Clothes Moths (Lepidoptera: Tineidae) Exposed to Cold. *Journal of Stored Products Research*, 29(3), pp. 277-282.
- Brutlag, D. & Kornberg, A., 1972. Enzymatic Synthesis of Deoxyribonucleic Acid: XXXVI. A Proofreading Function for the 3'-5' Exonuclease Activity in Deoxyribonucleic Acid Polymerases. *The Journal of Biological Chemistry*, 247(1), pp. 241-248.

- Bryant, D. & Moulton, V., 2004. Neighbor-Net: An Agglomerative Method for the Construction of Phylogenetic Networks. *Molecular Biology and Evolution*, 21(2), pp. 255-265.
- Bucheli, S. R., Bytheway, J. A. & Gangitano, D. A., 2010. Necrophagous Caterpillars Provide Human mtDNA Evidence. *Journal of Forensic Sciences*, 55(4), pp. 1130-1132.
- Buckland, P. C., 1981. The Early Dispersal of Insect Pests of Stored Products as Indicated by Archaeological Records. *Journal of Stored Products Research*, Band 17, pp. 1-12.
- Bullock, J. M., Kenward, R. E. & Hails, R. S. Hrsg., 2001. *Dispersal Ecology: The 42nd Symposium of the British Ecological Society*. University of Reading, Blackwell Science Ltd.
- Cameron, S. L. & Whiting, M. F., 2008. The complete mitochondrial genome of the tobacco hornworm, *Manduca sexta*, (Insecta:Lepidoptera:Sphingidae), and an examination of mitochondrial gene variability within butterflies and moths. *Gene*, Band 408, pp. 112-123.
- Chenoweth, S. F., Hughes, J. M., Keenan, C. P. & Lavery, S., 1998. Concordance between dispersal and mitochondrial gene flow: isolation by distance in a tropical teleost, Lates calcarifer (Australian barramundi). *Heredity*, Band 80, pp. 187-197.
- Chow, Y. S., Yen, D. F. & Lin, S. H., 1977. Water, a powerful attractant for the gravid females of *Plodia interpunctella* and *Cadra cautella*. *Experienta*, 33(4), pp. 453-455.
- Clark, J., 1988. Novel non-templated nucleotide addition reactions catalyzed by procaryotic and eucaryotic DNA. *Nucleic Acids Research*, 16(20), pp. 9677-9686.
- Clément, J.-L. et al., 2001. Biosystematics or Reticulitermes termites in Europe: morphological, chemical and molecular dat. *Insectes Sociaux*, Band 48, pp. 202-215.
- Cook, M. A., Harwood, L. M. & Robinson, G. S., 1997. Long-chain Fatty Acids and Systematics of the Tineidae (Lepidoptera). *Biochemical Systematics and Ecology*, 25(7), pp. 603-610.
- Cox, P. D., Pinniger, D. B. & Mueller, D., 1996. Monitoring Populations of the Webbing Clothes Moth *Tineola bisselliella*, Using Pheromone Lures. *Proceedings of the Second International Conference on Urban Pests*, pp. 541-545.
- Dasmahapatra, K. K. & Mellet, J., 2006. DNA barcodes: recent successes and future prospects. *Heredity*, Band 97, pp. 254-255.
- Day, M. F., 1951a. Studies on the Digestion of Wool by Insects. I. Microscopy of Digestion of Wool by Clothes Moth Larvae (*Tineola bisselliella* Humm.). *Australian Journal of Scientific Research Series B. Biological Sciences*, 4(1), pp. 42-48.
- Day, M. F., 1951b. Studies on the Digestion of Wool by Insects. III. A Comparison between the Tracheation of the Midgut of *Tineola* Larvae and that of Other Insect Tissues. *Australian Journal of Scientific Research Series B. Biological Sciences*, 4(1), pp. 64-74.
- Dice, L. R., 1945. Measures of the Amount of Ecologic Association Between Species. *Ecology*, 26(3), pp. 297-302.
- Dietz, R., 2014. *nicht veröffentlicht*, s.l.: s.n.
- Dinesh Kumar, V. & Narasimha, R. N., 2013. Rep-PCR Identifies Both Inter- and Intra-Specific Mitochondrial Genome Differences in *Carthamus*. *Plant molecular biology reporter*, Band 31, pp. 1150-1156.

- Dingle, H., 1996. *Migration. The Biology of Life on the Move*. 2. Edition (2014) Hrsg. New York: Oxford University Press.
- Eckert, K. A. & Kunkel, T. A., 1990. High fidelity DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Oxford University Press*, 18(13), pp. 3739-3744.
- Edgar, R. C., 2004a. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), pp. 1792-1797.
- Edgar, R. C., 2004b. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 5(113), pp. ISSN: 1471-2105 (Electronic).
- Ejaz, M., Gaisheng, Z., Oidi, Z. & Xinbo, Z., 2013. A Rapid and Efficient Method for the Isolation of Mitochondrial DNA From Wheat Crop. *Journal of Agricultural Science*, 5(6), pp. 32-35.
- Engelbrecht, H. & Reichmuth, C. Hrsg., 2005. *Schädlinge und ihre Bekämpfung: Ökologische, biologische und schädlingskundliche Grundlagen*. 4. Auflage Hrsg. Hamburg: Behr's Verlag.
- Espino, C. I. et al., 2009. Detection of *Wolbachia* Bacteria in Multiple Organs and Feces of the Triatomine Insect *Rhodnius pallescens* (Hemiptera, Reduviidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 75(2), pp. 547-550.
- Fajardo, V. et al., 2009. Application of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis and lab-on-a-chip capillary electrophoresis for the specific identification of game and domestic meats. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, Band 89, pp. 843-847.
- Felsenstein, J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17(6), pp. 368-376.
- Fraenkel, G. & Blewett, M., 1946. The Dietetics of the Clothes Moth, *Tineola bisselliella* Hum.. *Journal of Experimental Biology*, Band 22, pp. 156-161.
- Frankie, G. W. & Ehler, L. E., 1978. Ecology of Insects in Urban Environments. *Annual Review of Entomology*, Band 23, pp. 367-387.
- Gabant, P. et al., 1997. Bifunctional *lacZ* alpha-*ccdB* genes for selective cloning of PCR products. *Biotechniques*, 23(5), pp. 938-941.
- Galtier, N., Nabholz, B., Glemin, S. & Hurst, G. D. D., 2009. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*, Band 18, pp. 4541-4550.
- Geitner, O., Homma, S. & Kinzelbach, R., 2002. *Umweltforschungsplan des Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit. Texte 25/02. Bestandaufnahme und Bewertung von Neozoen in Deutschland*. , Berlin: Umweltbundesamt.
- Georg, S., 2016. *luftlinie.org*. [Online]
Available at: <https://www.luftlinie.org/#>
[Zugriff am Mai 2016].
- Gianniny, C., Stoeva, P., Cheely, A. & Dimaculangan, D., 2004. RAPD analysis of mtDNA from tomato flowers free of nuclear DNA artifacts. *BioTechniques*, Issue 36, pp. 772-776.
- Gillings, M. & Holley, M., 1997. Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primer is not necessarily directed at ERIC elements. *Letters in Applied Microbiology*, Band 25, pp. 17-21.

- Gilson, E., Clément, J.-M., Brutlag, D. & Hofnung, M., 1984. A family of dispersed repetitive extragenetic palindromic DNA sequences in *E. coli*. *The EMBO Journal*, 3(6), pp. 1417-1421.
- Gray, M., Burger, G. & Lang, B. F., 1999. Mitochondrial Evolution. *Science*, Band 283, pp. 1476-1481.
- Gray, M. W., 1989. Origin and Evolution of Mitochondrial DNA. *Annual review of cell and developmental biology*, Band 5, pp. 25-50.
- Gray, M. W., 2012. Mitochondrial Evolution. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, Band 4, p. a011403.
- Griswold, G. H., 1931. On the Length of the Adult Life in the Webbing Clothes Moth, *Tineola bisselliella* Hum.. *Annals of the Entomological Society of America*, 24(4), pp. 761-764.
- Griswold, G. H., 1944. *Studies on the biology of the webbing clothes moth (Tineola bisselliella Hum.)*. Cornell University Agricultural Experiment Station Memoir 262: pp. 1-59.
- Griswold, G. H. & Crowell, M. F., 1936. The Effect of Humidity on the Development of the Webbing Clothes Moth (*Tineola bisselliella* Hum.). *Ecology*, 17(2), pp. 241-250.
- Gunn, M., Ziaepour, H., Merizzi, F. & Naffah, C., 2007. ANOXIA, Treatment by Oxygen Deprivation, Optimizing Treatment Time of Museum Objects. *International Preservation News*, Band 42, pp. 8-13.
- Hajibabaei, M. et al., 2006. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Band 103, pp. 968-971.
- Hall, T. W. et al., 2013. Haphazard Sampling: Selection Biases and the Estimation Consequences of These Biases. *American Accounting Association*, 7(2), pp. P16-P22.
- Hannemann, H. J., 1977. Kleinschmetterlinge oder Microlepidoptera III. Federmotten (Pterophoridae) Gespinstmotten (Yponomeutidae) Echte Motten (Tineidae). In: *Die Tierwelt Deutschlands 63*. Gustav Fischer: Jena.
- Hanski, I., 1994. Metapopulation Dynamics and Conservation: A Spatially Explicit Model Applied to Butterflies. *Biological Conservation*, Band 68, pp. 167-180.
- Hanski, I. & Gilpin, M., 1991. Metapopulation dynamics: brief history and conceptual domain. *Biological Journal of the Linnean Society*, Band 42, pp. 3-16.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & deWaard, J. R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society*, Band 270, pp. 313-321.
- Hebert, P. D. N., deWaard, J. R. & Landry, J.-F., 2009. DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. *Biology Letters*, p. doi:10.1098/rsbl.2009.0848.
- Hebert, P. D. N. et al., 2013. A DNA 'Barcode Blitz': Rapid Digitization and Sequencing of a Natural History Collection. *PLOS ONE (www.plosone.org)*, Juli, 8(7), pp. 1-14.
- Hecker, K. H. & Roux, K. H., 1996. High and Low Annealing Temperatures Increase Both Specificity and Yield in Touchdown and Stepdown PCR. *BioTechniques*, March, Vol. 20(No. 3), pp. 478-485.
- Herfs, A., 1936. Über Wollschädlinge und Wollschutz. *Anzeiger für Schädlingskunde*, 12(12), pp. 137-142.
- Herrich-Schäfer, G. A. W., 1853. *Systematische Bearbeitung der Schmetterlinge von Europa, zugleich als Text, Revision und Supplement zu Jakob Hübner's Sammlung europäischer Schmetterlinge*. Fünfter Band. Die Schaben und Federmotten. Hrsg. Manz, G. J.: Regensburg.

- Herrick, G. & Griswold, G. H., 1933. On the Scientific Name of the Webbing Clothes Moth. *Science*, 77(1999), pp. 391-392.
- Herrmann, A., 2015. *Qualitätsmanagement Handbuch. Standardarbeitsanweisung StAA-QMH-4.1-1-116: Zucht von Kleidermotten (Tineola bisselliella) - Hausverfahren*. Berlin: Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung.
- Hongoh, Y., Ohkuma, M. & Kudo, T., 2003. Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera; Rhinotermitidae). *Microbiology Ecology*, Issue 44, pp. 231-242.
- Hughes, J. & Vogler, A. P., 2006. Gene expression in the gut of keratin-feeding clothes moths (*Tineola*) and keratin beetles (*Trox*) revealed by subtracted cDNA libraries. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, Issue 36, pp. 584-592.
- Hughes, M., Beck, L.-A. & Skuce, R. A., 1994. Identification and Elimination of DNA Sequences in Taq DNA Polymerase. *Journal of Clinical Microbiology*, 32(8), pp. 2007-2008.
- Hulme, P. E., 2009. Trade, transport and trouble: managing invasive species pathways in an era of globalization. *Journal of Applied Ecology*, Band 46, pp. 10-18.
- Hulton, C. S. J., Higgins, C. F. & Sharp, P. M., 1991. ERIC sequences: a novel family of repetitive elements in the genomes of *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* and other enterobacteria. *Molecular Microbiology*, 5(4), pp. 825-834.
- Huson, D. H. & Bryant, D., 2006. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23(2), pp. 254-267.
- Hwang, Y.-S., Mulla, M. & Axelrod, H., 1978. Attractants for synanthropic flies: Ethanol as Attractant for *Fannia canicularis* and other pest flies in poultry ranches. *Journal of Chemical Ecology*, Issue 4, pp. 463-470.
- Ines, M. et al., 2013. Molecular identification and assessment of genetic diversity of fluorescent pseudomonads based on different polymerase chain reaction (PCR) methods. *African Journal of Microbiology Research*, online at <http://www.academicjournals.org/AJMR>(ISSN 1996-0808).
- Invitrogen, 2004-2006. www.thermofisher.com. [Online]
Available at:
https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/subcloningefficiencydh5alpha_man.pdf
[Zugriff am 29 März 2016].
- Janzen, D. H. et al., 2009. Integration of DNA barcoding into an ongoing inventory of complex tropical biodiversity. *Molecular Ecology Resources*, 9(Suppl. 1), pp. 1-26.
- Jones, C. S., Tegelström, H., Latchman, D. S. & Berry, R. J., 1988. An Improved Rapid Method for Mitochondrial DNA Isolation Suitable for Use in the study of Closely Related Populations. *Biochemical Genetics*, 26(1/2), pp. 83-88.
- Jones, R. T., Sanchez, L. G. & Fierer, N., 2013. A Cross-Taxon Analysis of Insect-Associated Bacterial Diversity. *PLoS ONE*, 8(4), p. e61218. doi:10.1371/journal.pone.0061218.
- Joo, S. & Park, S., 2012. Identification of bird species and their prey using DNA barcode on feces from Korean traditional villagegroves and forests (maeulsoop). *Animal Cells and Systems*, 16(6), pp. 488-497.

- Junqueira, A. C. M., Lessinger, A. C. & Azeredo-Espin, A. M. L., 2002. Methods for the recovery of mitochondrial DNA sequences from museum specimens of myiasis-causing flies. *Medical and Veterinary Entomology*, Issue 16, pp. 39-45.
- Kan, E. & Waku, Y., 1985. Analysis of Oviposition Preference in the Webbing Clothes Moth, *Tineola bisselliella* Hum. (Lepidoptera: Tineidae). *Applied Entomology and Zoology*, 20(3), pp. 322-330.
- Kemper, H., 1935. Die Pelz- und Textilschädlinge und ihre Bekämpfung. In: *Hygienische Zoologie, Monographien zur Biologie und Bekämpfung der Gesundheits- und Wohnungs-Schädlinge*. Leipzig: Deutsche Gesellschaft für Kleintier- und Pelztierzucht G.m.b.H. & Co..
- Kennedy, J. S., 1985. Migration, behavioural and ecological. *Contribution in Marine Science (Suppl.)*, 27(In: Rankin, M. A. (Hrsg.): Migration: Mechanisms and Adaptive Significance), pp. 5-26.
- Key, K. H. L. & Common, I. F. B., 1959. Observations on the ecology of the cloths moths *Tineola bisselliella* (Humm) and *Tinea pellionella* L in a bulk wool store. *Australian Journal of Zoology*, 7(1), pp. 39-78.
- Kimura, M., 1980. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *Journal of Molecular Evolution*, Issue 16, pp. 111-120.
- Korbie, D. J. & Mattick, J. S., 2008. Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. *Nature Protocols*, Vol. 3(No. 9), pp. 1452-1456.
- Kumar, S., Nei, M. D. J. & Tamura, K., 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics*, 9(4), pp. 299-306.
- Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K., 2016. *MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets*. [Online]
Available at: <http://mbe.oxfordjournals.org/content/early/2016/04/13/molbev.msw054>
- Kunkel, T. A., 1988. Exonucleolytic Proofreading. *Cell*, 53(6), pp. 837-840.
- Laibach, E., 1970. Textilien - Nahrung und Unterschlupf für Insekten während des Transports, im Lager und Haushalt. *Zeitschrift für angewandte Entomologie*, 65(4), pp. 431-435.
- Lane, D. J., 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: E. S. a. M. Goodfellow, Hrsg. *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics (Modern Microbiological Methods)*. Chichester — New York — Brisbane — Toronto — Singapore: John Wiley & Sons, pp. 115-175.
- Levinson, H. & Levinson, A., 2001. Die Anfänge der Schädlingsabwehr im orientalischen Altertum. *SPIXIANA*, Supplement(27), pp. 77-106.
- Linsley, E. G. & McSwain, J. W., 1942. The Parasites, Predators, and Inquiline Associates of *Anthophora linsleyi*. *American Midland Naturalist*, 27(2), pp. 402-417.
- Lotmar, R., 1942. Das Mitteldarmepithel von *Tineola bisselliella* (Kleidermotte) während der Metamorphose. *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft*, XVIII(9/10), pp. 445-455.
- Löw, F., 1861. *Ueber die Bewohner der Schwalbennester und die Metamorphose der Tinea spretella* S. V., s.l.: Zoologisch-Botanische Gesellschaft Österreich.
- Lunt, D. H., Zhang, D.-X., Szymura, J. M. & Hewitt, G. M., 1996. The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. *Insect Molecular Biology*, 5(3), pp. 153-165.

- Lüscher, M., 1944. Experimentelle Untersuchungen über die larvale und die imaginale Determination im Ei der Kleidermotte (*Tineola bisselliella* Hum.). *Revue Suisse de Zoologie. Annales de la Société Zoologique Suisse et du Muséum d'histoire naturelle de Genève*, Tome 51(28), pp. 531-627.
- Martin, B. et al., 1992. A highly conserved repeated DNA element located in the chromosom of *Streptococcus pneumoniae*. *Nucleic Acids Research*, 20(13), pp. 3479-3483.
- Mayr, E., 1942. *Systematics and the Origin of Species from the Viewpoint of a Zoologist*. 1999 Hrsg. Cambridge: Harvard University Press.
- McClelland, M. & Welsh, J., 1994. DNA fingerprinting by arbitrarily primed PCR. *Genome Research*, pp. S59-S65.
- McDonald, J. G., Wong, E. & White, G. P., 2000. Differentiation of *Tilletia* Species by rep-PCR Genomic Fingerprinting. *Plant Diseases*, Band 84, pp. 1121-1125.
- Meier, R., Shiyang, K., Vaidya, G. & Ng, P. K. L., 2006. DNA Barcoding and Taxonomy in Diptera: A Tale of High Intraspecific Variability and Low Identification Success. *Systematic Biology*, 55(5), pp. 715-728.
- Mellanby, K., 1934. Effects of Temperature and Humidity on the Clothes Moth Larva, *Tineola bisselliella* Hum. (Lepidoptera). *Annals of Applied Biology*, 21(3), p. 476-482.
- Meyrick, E., 1927. *A Revised Handbook of British Lepidoptera*. Watkins and Doncaster: London, UK.
- Moreau, C., Wray, B., Czekanski-Moir, J. & Rubin, B., 2013. DNA preservation: a test of commonly used preservatives in insects. *Invertebrate Systematics*, Issue 27, pp. 81-86.
- Mullis, K. B., 1990. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. A surprisingly simple method for making unlimited copies of DNA fragments was conceived under unlikely circumstances- during a moonlight drive through the mountains of California. *Scientific American*, pp. 56-65.
- Mutanen, M., Wahlberg, N. & Laila, L., 2010. Comprehensive gene and taxon coverage elucidates radiation patterns in moths and butterflies. *Proceedings of the Royal Society*, Issue 277, pp. 2839-2848.
- Myers, P., 2007. Tandem Repeats and Morphological Variation. *Nature Education*, 1(1), pp. 1, http://scienceblogs.com/pharyngula/2007/10/tandem_repeats_and_morphologic.php.
- Nasu, Y. et al., 2012. Relationship Between Nest-Dwelling Lepidoptera and Their Owl Hosts. *Ornithological Science*, 11(2), pp. 77-85.
- Ohkuma, M. & Kudo, T., 1996. Phylogenetic Diversity of the Intestinal Bacterial Community in the Termite *Reticulitermes speratus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), pp. 461-468.
- O'Neill, S. L. et al., 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Issue 89, pp. 2699-2702.
- Panaro, N. J. et al., 2000. Evaluation of DNA Fragment Sizing and Quantification by the Agilent 2100 Bioanalyzer. *Clinical Chemistry*, 46(11), pp. 1851-1853.
- Parker, T. A., 1990. Clothes Moths. In: A. Mallis, Hrsg. *Handbook of Pest Control. The Behavior, life History and Control of Household Pests*. 7 Hrsg. Cleveland, Ohio: Franzak & Foster, pp. 347-413.
- Patel, H. K., 1958. The Furniture Carpet-beetle (*Anthrenus vorax* Waterhouse). *Mem. Ent. Soc. India*, Issue 6, pp. 1-47.

- Pavel, A. B. & Vasile, C. I., 2012. PyElph - a software tool for gel images analysis and phylogenetics. *BMC Bioinformatics*, 13(9).
- Petersen, G., 1957. Die Genitalien der paläarktischen Tineiden (Lepidoptera: Tineidae). *Beiträge zur Entomologie*, Band 7, pp. 55-176.
- Petersen, G., 1969. Beiträge zur Insekten-Fauna der DDR: Lepidoptera - Tineidae. *Beiträge zur Entomologie*, 19(3/6), pp. 311-388.
- Pickett, S. T. A. C. M. L. et al., 2001. Urban Ecological Systems: Linking Terrestrial Ecological, Physical, and Socioeconomic Components of Metropolitan Areas. *Annual Review of Entomology*, Band 32, pp. 127-157.
- Pinniger, D., 2010. Saving our Heritage - Pest Management in Museums and Historic Houses. *Outlooks on Pest Management*, 21(5), pp. 239-241.
- Pinniger, D., 2011. New Developments in the Pest Management for Collections in Museums and Historic Houses. *Proceedings of the Seventh International Conference on Urban Pests*, pp. 17-21.
- Pinniger, D. & Winsor, P., 2004. *Integrated pest management. a guide for museums, libraries and archives*. London: Museum. Libraries and Archives Council.
- Pissios, P. & Scouras, Z. G., 1992. Rapid isolation of mitochondrial DNA. Mitochondrial DNA from *Drosophila serrata*. *Experientia* 48, pp. 671-673.
- Plarre, R., 2014. Likelihood of Infestations by *Tineola bisselliella* (Lepidoptera: Tineidae) from Natural Reservoirs. *Proceedings of the Eighth International Conference on Urban Pests*, Zürich(2014).
- Plarre, R. & Krüger-Carstensen, B., 2011. An attempt to reconstruct the natural and cultural history of the webbing clothes moth *Tineola bisselliella* Hummel (Lepidoptera: Tineidae). *Journal of Entomological and Acarological Research*, Ser. II, 43(2), pp. 83-93.
- Plarre, R., Lieber, K., Burkhlder, W. & Phillips, J., 1999. Host and host instar preference of *Apanteles carpatus* (Say) (Hymenoptera: Braconidae) a possible parasitoid for biological control of clothes moths (Lepidoptera: Tineidae). *Journal of Stored Product Research*, Band 35, pp. 197-213.
- Powing, R. F., Day, M. F. & Irzykiewicz, H., 1951. Studies on the Digestion of Wool by Insects. II. The Properties of some Insect Proteinases. *Australian Journal of Scientific Research Series B. Biological Sciences*, 4(1), pp. 49-63.
- Querner, P., 2013. Insect pest management programmes and results from their application in two large museum collections in Berlin and Vienna. *International Biodeterioration & Biodegradation*, Band 84, p. 275-280.
- Querner, P., 2014. Linking webbing clothes moths to infested objects or other food sources in museums. *Studies in Conservation*, Issue doi: 10.1179/2047058414Y.0000000153.
- Querner, P., 2015. Insect Pests and Integrated Pest Management in Museums, Libraries and Historic Buildings. *Insects*, 6(2), pp. 595-607.
- Querner, P. & Biebl, S., 2011. Using parasitoid wasps in Integrated Pest Management in museums against biscuit beetle (*Stegobium paniceum*) and webbing clothes moth (*Tineola bisselliella*). *Journal of Entomological and Acarological Research*, Ser. II, 43(2), pp. 169-175.
- Rajendran, S. & Parveen, K. M., 2005. Insect infestation in stored animal products. *Journal of Stored Products Research*, Issue 41, pp. 1-30.

- Rand, K. H. & Houck, H., 1990. Taq polymerase contains bacterial DNA of unknown origin. *Molecular and Cellular Probes*, Issue 4, pp. 445-450.
- Rawle, S. G., 1951. The Effects of High Temperature on the common Clothes Moth, *Tineola bisselliella* (Humm.). *Bulletin of Entomological Research*, 42(1), pp. 29-40.
- Rees, D., 2003. Monitoring insect pests within buildings using traps: case studies of the use of traps to monitor activity, spatial distribution and efficacy of pest control. *AICCM Bulletin*, 28(1), pp. 44-49.
- Regier, J. C. et al., 2013. A Large-Scale, Higher-Level, Molecular Phylogenetic Study of the Insect Order *Lepidoptera* (Moths and Butterflies), *PLoS ONE* 8(3): e58568. doi: 10.1371/journal.pone.0058568.
- Robinson, C. P., Ciccotosto, S. & Sparrow, L. G., 1993. Identification of a Key Enzyme in the Digestion of Woll by Larvae of the Webbing Clothes Moth, *Tineola bisselliella*. *Journal of the Textile Institute*, 84(1), pp. 39-48.
- Robinson, G. S., 1988. A phylogeny for the Tineoidea (Lepidoptera). *Entomologica scandinavica*, 19(2), pp. 117-129.
- Robinson, G. S. & Nielsen, E. S., 1993. *Monographs on Australian Lepidoptera Volume 2: Tineid Genera of Australia (Lepidoptera)*. Melbourne: CSIRO Publications.
- Roderick, G. K., 1996. Geographic Structure of Insect Populations: Gene Flow, Phylogeography, and Their Uses. *Annual Reviews of Entomology*, Band 41, pp. 325-252.
- Roehrdanz, R. L., 1997. Identification of Tobacco Budworm an Corn Earworm (Lepidoptera: Noctuidae) During Early Developmental Stages by Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism. *Annals of the Entomological Society of America*, 90(3), pp. 329-332.
- Rychlik, W., 1995. Selection of Primers for Polymerase Chain Reaction. *Molecular Biotechnology*, Issue 3, pp. 129-134.
- Sanyal, A., O'Driscoll, S. W., Bolander, M. E. & Sarkar, G., 1997. An Effective Method of Completely Removing Contaminating Genomic DNA from an RNA Sample to be Used for PCR. *Molecular Biotechnology*, Issue 8, pp. 135-137.
- Sarkar, G. & Sommer, S. S., 1990. Shedding light on PCR contamination. *Nature*, Issue 343, p. 27.
- Savolainen, V. et al., 2005. Towards writing the encyclopaedia of life: an introduction to DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, Band 360, pp. 1805-1811.
- Schlötterer, C., 2004. The evolution of molecular markers - just a matter of fashion?. *Nature Reviews Genetics*, Band 5, pp. 63-69.
- Schöller, M. & Prozell, S., 2011. Biological control of cultural heritage pest Coleoptera and Lepidoptera with the help of parasitoid Hymenoptera. *Journal of Entomological and Acarological Research*, Ser. II, 43(2), pp. 157-164.
- Schoville, S. D., Widmer, I., Deschamps.Cottin, M. & Manel, S., 2013. Morphological Clines and Weak Drift along an Urbanization Gradient in the Butterfly, *Pieris rapae*. *PLoS ONE*, 8(12), p. e83095. doi:10.1371/journal.pone.0083095.
- Schultheiss, C., 2005. Mitten in Berlin: Wo das Herz der Stadt schlägt, kann jeder selbst bestimmen. Wo aber liegt ihr Mittelpunkt?. *Berliner Zeitung*, 19 10, Issue 244, p. 27.

- Silva-Brandao, K. L., Lyra, M. L. & Freitas, A. V. L., 2009. Barcoding Lepidoptera: Current Situation and Perspectives on the Usefulness of a Contentious Technique. *Neotropical Entomology*, 38(4), pp. 441-451.
- Simon, C. et al., 1994. Evolution, Weighting, and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Annals of the Entomological Society of America*, 87(6), pp. 651-701.
- Snäll, N., Huoponen, K., Savontaus, M.-L. & Ruohomäki, K., 2002. Tandem repeats and length variation in the mitochondrial DNA control region of *Epirrita autumnata* (Lepidoptera: Geometridae). *Genome*, Band 45, pp. 855-861.
- Strümpel, H., 1968. *Tinea columbariella* Wck als Schädling an importierten Entenfedern. *Anzeiger für Schädlingskunde*, 41(6), pp. 84-88.
- Sukopp, H., 2007. Rückeroberung? Natur in der Großstadt. *Denkanstöße*, Band 5, pp. 56-70.
- Swords, P. & Ryckeghem, A. V., 2010. Summary of commercially available pheromones of common stored product moths. *Proceedings of the 10th International Working Conference on Stored Product Protection*, Band 2, pp. 1008-1010.
- Takács, et al., 2001a. Communication Ecology of Webbing Clothes Moth: 1. Semiochemical-mediated Location and Suitability of Larval Habitat. *Journal of Chemical Ecology*, 27(8), pp. 1535-1546.
- Takács, S., Gries, G. & Gries, R., 2001b. Communication Ecology of Ebbing Clothes Moth: 2. Identification of Semiochemicals Mediating Attraction of Adults to Larval Habitat. *Journal of Chemical Ecology*, 27(8), pp. 1547-1560.
- Takács, S., Gries, G. & Gries, R., 2001c. Communication ecology of webbing clothes moth: 4. Identification of male- and female-produced pheromons. *Chemoecology*, Band 11, pp. 153-159.
- Takács, S., Gries, G. & Gries, R., 2002. Where to find a mate? Resource-based sexual communication of webbing clothes moth. *Naturwissenschaften*, Band 89, pp. 57-59.
- Takács, S. M. C. & Gries, G., 2003. Communication ecology of webbing clothes moth: attractiveness and characterization of male-produced sonic aggregation signals. *Journal of Applied Entomology*, Band 127, pp. 127-133.
- Tamura, K. & Aotsuka, T., 1988. Rapid Isolation Method of Animal Mitochondrial DNA by the Alkaline Lysis Procedure. *Biochemical Genetics*, 26(11/12), pp. 815-819.
- Tamura, K. et al., 2013. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12), pp. 2725-2729.
- Tautz, D. et al., 2003. A plea for DNA taxonomy. *TRENDS in Ecology and Evolution*, 18(2), pp. 70-74.
- Tautz, D. et al., 2002. DNA points the way ahead in taxonomy. In assessing new approaches, it's time for DNA's unique contribution to take a central role. *Nature*, Band 418, p. 479.
- Taylor, M. F. J., McKechnie, S. W., Pierce, N. & Kreitman, M., 1993. The Lepidopteran Mitochondrial Control Region: Structure and Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 10(6), pp. 1259-1272.
- Thermo Fischer Scientific Inc., 2014. User Guide TOPO® TA Cloning® Kit for Sequencing.
- Titschak, E., 1925. Untersuchungen über den Temperatureinfluß auf die Kleidermotte. (*Tineola biselliella* Hum.). *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, Band 124, pp. 213-251.

- Titschak, E., 1926. Untersuchungen über das Wachstum, den Nahrungsverbrauch und die Eierzeugung. II. *Tineola bisselliella* Hum. Gleichzeitig ein Beitrag zur Klärung der Insektenhäutung. *Zeitschrift für wissenschaftliche Zoologie*, Band 128, pp. 509-569.
- Traynier, M., R. M. & Schumacher, R. K., 1995. Yeast Odours Localize Oviposition by *Tinea translucens* and *T. pellionella* (Lepidoptera: Tineidae). *Journal of Stored Products Research*, 31(4), pp. 301-305.
- Traynier, R. M. M., Schumacher, R. K. & Lau, D. M., 1994. Oviposition site selection by *Tineola bisselliella*, *Tinea* spp (Lepidoptera: Tineidae) and *Anthrenus flavipes* (Coleoptera: Dermestidae). *Journal of Stored Product Research*, 30(4), pp. 321-329.
- Trematerra, P., 1997. Integrated Pest Management of stored-product insects: practical utilization of pheromones. *Anzeiger für Schädlingskunde, Pflanzenschutz und Umweltschutz*, 70(3), pp. 41-44.
- Tryjanowski, P. et al., 2001. Arthropods in nests of the red-backed shrike (*Lanius collurio*) in Poland. *Belgian Journal of Zoology*, 131(1), pp. 69-74.
- Tuda, M. et al., 2004. Habitat-related mtDNA polymorphism in the stored-bean pest *Callosobruchus chinensis* (Coleoptera: Bruchidae). *Bulletin of Entomological Research*, Band 94, pp. 75-80.
- Turner, S. et al., 1999. Investigating Deep Phylogenetic Relationships among Cyanobacteria and Plastids by Small Subunit rRNA Sequence Analysis. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 46(4), pp. 327-338.
- Tyler, K. D., Wang, G., Tyler, S. D. & Johnson, W. M., 1997. Guest Commentary, Factors Affecting Reliability and Reproducibility of Amplification-Based DNA Fingerprinting of Representative Bacterial Pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*, 35(2), pp. 339-346.
- Ullmann, A., Jacob, F. & Monod, J., 1967. Characterization by in vitro complementation of a peptide corresponding to an operator-proximal segment of the β -galactosidase structural gene of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, Band 24/2, pp. 339-343.
- Untergasser, A. et al., 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Research*, Issue 35, pp. W71-W74.
- Valentini, A., Pompanon, F. & Taberlet, P., 2008. DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution*, 24(2), pp. 110-117.
- Van Ryckeghem, A., 2015. <http://www.insectslimited.com/>. [Online] Available at: <http://www.insectslimited.com/files/q3wr/Issue%20113.pdf> [Zugriff am 16 April 2016].
- Vanparys, B. et al., 2007. The phylogeny of the genus *Nitrobacter* based on comparative rep_PCR, 16S rRNA and nitrite oxidoreductase gene sequence analysis. *Systematic and Applied Microbiology*, 30(4), pp. 297-308.
- Vargo, E. L., 2011. How Genetic Studies can help with subterranean Termite Management. *Proceeding of the Seventh International Conference on Urban Pests*, pp. 7-12.
- Versalovic, J., Koeuth, T. & Lupski, J. R., 1991. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Research*, 19(24), pp. 6823-6831.
- Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F. S. & Lupski, J. R., 1994. Genomic Fingerprinting of Bacteria Using Repetitive Sequence-Based Polymerase Chain Reaction. *Methods in Molecular and Cellular Biology*, Band 5, pp. 25-40.

- Vila, M. & Björklund, M., 2004. The Utility of the Neglected Mitochondrial Control Region for Evolutionary Studies in Lepidoptera (Insecta). *Journal of Molecular Evolution*, Band 58, pp. 280-290.
- Wälchli, O., 1976. Internationale Entwicklung und gegenwärtige Situation in der Methodik der Motten- und Käferrechtheitsprüfung. *Textilveredlung*, Band 6, pp. 242-248.
- Wan, X., Kim, M. J. & Kim, I., 2013. Description of new mitochondrial genomes (*Spodoptera litura*, Noctuoidea an *Cnaphalocrocis medinalis*, Pyraloidea) and phylogenetic reconstruction of Lepidoptera with the comment on optimization schemes. *Molecular Biology Reports*, Band 40, pp. 6333-6349.
- Waterhouse, D. F., 1952. Studies on the digestion of wool by insects. VI. The pH and oxidation-reduction potential of the alimentary canal of the clothes moth larva (*Tineola bisselliella* (Humm.)). *Australian Journal of Scientific Research, Series B, Biological Sciences*, 5(1), pp. 178-188.
- Weidner, H., 1958. Die Entstehung der Hausinsekten. *Zeitschrift für angewandte Entomologie*, 42(4), pp. 429-447.
- Weidner, H., 1970. Die Kleidermotte, *Tineola bisselliella* (Hummel, 1823). *Der Praktische Schädlingsbekämpfer*, 22(5), pp. 70-76.
- Whittaker, R. H., 1972. Evolution and Measurement of Species Diversity. *TAXON*, 21(2/3), pp. 213-251.
- Williams, C. L., Goldson, S. L., Baird, D. B. & Bullock, D. W., 1994. Geographical origin of an introduced insect pest, *Listronotus bonariensis* (Kuschel), determined by RAPD analysis. *Heredity*, Band 72, pp. 412-419.
- Wilson, A. C. et al., 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society*, Band 26, pp. 375-400.
- Wilson, H. F., 1940. Lures and Traps to Control Clothes Moths and Carpet Beetles. *Journal of Economic Entomology*, 33(4), pp. 651-653.
- Wohlgemuth, R., Reichmuth, C., Rothert, H. & E., B., 1987. Auftreten vorratsschädlicher Motten der Gattung *Ephestia* und *Plodia* außerhalb von Lägern und lebensmittelverarbeitenden Betrieben in Deutschland. *Anzeiger für Schädlingskunde, Pflanzenschutz und Umweltschutz*, Issue 60, pp. 44-51.
- Wolff, J. N., Shearman, D. C. A., Brooks, R. C. & Ballard, J. W. O., 2012. Selective Enrichment and Sequencing of Whole Mitochondrial Genomes in the Presence of Nuclear Encoded Mitochondrial Pseudogenes (Numts). *PLoS ONE*, 7(5), p. e37142. doi:10.1371/journal.pone0037142.
- Woolley, A. T. & Mathies, R. A., 1994. Ultra-high-speed DNA fragment separation using microfabricated capillary array electrophoresis chips. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, Issue 91, pp. 11348-11352.
- Xavier-Rowe, A. & Pinniger, D., 2001. No uninvited Guests: Successful Pest Management in Historic Houses. In: H. Kingsley, D. Pinniger, P. Winsor & A. Xavier-Rowe, Hrsg. *Integrated Pest Management for collections. Proceedings of 2001 - a Pest Odyssey*. London: Heritage, pp. 37-43.
- Yamaoka, R. et al., 1985. Structure Elucidation of Koiganal I and II, the Sex Pheromones of the Webbing Clothes Moth, Using Capillary GC/MS. *Mass Spectroscopy*, 33(3), pp. 189-195.
- Yoshimura, T. et al., 1988. L-Cysteine Lyase of the Webbing Clothes Moth, *Tineola bisselliella*. *Insect Biochemistry*, 18(8), pp. 771-777.
- Young, A. G., Merriam, H. G. & Warwick, S. I., 1993. The effect of forest fragmentation on genetic variation in *Acer saccharum* Marsh. (sugar maple) population. *Heredity*, Band 71, pp. 277-289.

Zeller, P. C., 1852. Die Schaben mit den langen Kiefertastern. *Linnaea Entomologica*, Band 6, pp. 81-197.

Zimmermann, E. G., Akins, D. R., Planz, J. V. & Schurr, M. J., 1988. A Rapid Procedure for Isolating Mitochondrial DNA. *Gene Analysis Techniques*, Issue 5, pp. 102-104.

Zupunski, V., Ignjatovi`c-Mici`c, D., Nikolic, A. & Stankovi`c, S., 2011. Identification of Tilletia Species using REP-PCR Fingerprinting Technique. *GENETIKA*, 43(1), pp. 183-195.

Krüger-Carstensen, B. & Plarre, R., 2011. **Outdoor trapping and genetical characterization of populations of the webbing clothes moth *Tineola bisselliella* (Lepidoptera: Tineidae) in the broader area of Berlin.** Journal of Entomological and Acarological Research 43, 129-135

Plarre, R. & Krüger-Carstensen, B., 2011. **An attempt to reconstruct the natural and cultural history of the webbing clothes moth *Tineola bisselliella* Hummel (Lepidoptera: Tineidae).** Journal of Entomological and Acarological Research 43, 83-93

Krüger-Carstensen, B. & Plarre, R., 2012. **Autökologische und molekularbiologische Untersuchungen zur Charakterisierung der Kleidermotte *Tineola bisselliella* Hummel, 1823 (Lepidoptera: Tineidae) als Referenzorganismus.** Mitt. Dtsch. G angew. Ent. Halle (Saale) 18, 123-128