

# Molekulare und morphologische Untersuchungen zum Status des *Nomada alboguttata* (Apiformes) Artkomplexes

Manuela Sann<sup>1</sup>, Michael Gerth<sup>2</sup>, Christian Venne<sup>3</sup>, Ralph Tiedemann<sup>1</sup>, Christoph Bleidorn<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Universität Potsdam, Institut für Biochemie und Biologie, Evolutionsbiologie/Spez. Zoologie | Karl-Liebknechtstr. 24-25, Haus 26 | 14476 Potsdam | Germany

<sup>2</sup> Universität Leipzig, Institut für Biologie II, Molekulare Evolution und Systematik der Tiere | Talstr. 33 | 04103 Leipzig | Germany

<sup>3</sup> Biologische Station Kreis Paderborn-Senne | Junkernallee 20 | 33161 Hövelhof-Riege | Germany

## Zusammenfassung

Die solitäre Wespenbiene *Nomada alboguttata* wird aufgrund ihrer Phänologie und Morphologie in vier verschiedene Formen eingeteilt. Diese sind zum Teil nur durch farbliche Merkmale voneinander unterscheidbar. In dieser Studie wurden zwei *Nomada alboguttata* Formen untersucht, welche als Brutschmarotzer unterschiedliche Wirte der Gattung *Andrena* parasitieren. Mitochondrielle *cytochrome c oxidase I* (COI) Sequenzen und nukleäre *Elongation factor I-alpha* (EF1α) Intron Sequenzen wurden als molekulare Marker für diese beiden Formen erhoben und verglichen. Weiterhin wurden im Rahmen einer morphologischen Analyse verschiedenste Parameter untersucht und statistisch analysiert. Die molekularen Analysen erbrachten nur geringfügige Unterschiede in der DNA-Sequenz der beiden *Nomada*-Formen. Die morphologischen Ergebnisse weisen jedoch darauf hin, dass aufgrund vieler signifikanter Unterschiede, z.B. Färbung und Größe, nicht auszuschließen ist, dass es sich bei *Nomada alboguttata* doch um einen kryptischen Artkomplex handelt und die untersuchten Sequenzen für die sich möglicherweise erst kürzlich getrennten Arten zu konserviert sind um diese zu unterscheiden. Als weitere Erklärung für die gefundenen signifikanten Unterschiede in der Morphologie wird das Auftreten phänotypischer Plastizität diskutiert.

## Summary

Manuela Sann, Michael Gerth, Christian Venne, Ralph Tiedemann, Christoph Bleidorn: **Molecular and morphological investigations on the *Nomada alboguttata* species complex (Apiformes)**. Due to differences in morphology and phenology four different forms of the solitary cuckoo bee *Nomada alboguttata* are distinguished. These forms are partially only distinguishable by their characteristic colouration. In this study we investigated two of these forms, which parasitize different hosts of the genus *Andrena*. We sequenced fragments of the mitochondrial COI-gene and an intron of the nuclear *EF1α*-gene for comparative analyses. Moreover, we performed a statistical analysis of various external morphological characters. Whereas the molecular analysis revealed nearly no differences between DNA-sequences of both *Nomada*-forms, we found significant differences in external morphology (e.g., colouration and size) potentially indicating a complex of cryptic species. Thus the analysed sequences might be too conserved to resolve such recently separated species. An alternative explanation for the significant differences in morphology could be phenotypic plasticity.

## Einleitung

Wie alle solitäre Wespenbienen gehört *Nomada alboguttata* (Herrich-Schäfer, 1839) zu den sogenannten „Kleptoparasiten“. Als Brutschmarotzer legen sie ihre Eier in die Nester anderer solitär lebender Bienen und bevorzugen hierbei die Nester von Sandbienen (*Andrena*). Diese bauen ihre Nester in verzweigten Erdhöhlen, wobei sich an jedem Röhrende eine Nestzelle befindet (Witt, 1992). Diese Nestzellen werden von den *Andrena*-Weibchen Pollen und Nektar verproviantiert und mit einem Ei belegt (Tengö & Bergström, 1977). Der Parasitoid legt dann in diese Nestzellen ebenfalls ein bis zwei Eier aus denen Larven schlüpfen, die den Nachwuchs des Wirtes töten und sich von dem gesammelten Pollen und Nektar des Wirtes ernähren (Cane, 1983). *Nomada alboguttata* parasitiert mindestens drei verschiedene Wirte der Gattung *Andrena*: *Andrena argentata*, *Andrena barbilabris* und *Andrena ventralis*. Bei *Nomada alboguttata* werden nach Phänologie und Morphologie vier verschiedene Formen unterschieden (Scheuchl, 2000). Die erste Form von *Nomada alboguttata* parasitiert *Andrena ventralis* (April) und die zweite

Form *Andrena barbilabris* (April – Mai). Eine dritte Form fliegt im Juli, der Wirt ist jedoch unbekannt. Eine vierte Form von *Nomada alboguttata*, mit einer Flugzeit im Hochsommer und dem Wirt *Andrena argentata*, wird als *Nomada baccata* bezeichnet (Scheuchl, 2000) – der Artstatus gilt jedoch als umstritten. Generell ist ungeklärt, ob es sich bei diesem Formen um einen Komplex nahverwandter, aber getrennter Arten handelt oder ob all diese Formen die phänotypische Plastizität einer variabel ausgeprägten Art darstellen. In dieser Studie konzentrieren wir uns auf die Untersuchung von zwei Formen von *Nomada alboguttata*, die *Andrena ventralis* und *Andrena barbilabris* parasitieren. *Andrena (Larendrena) ventralis* ist fast in ganz Europa verbreitet, hauptsächlich jedoch zwischen 40° und 58° n. Br., in Deutschland meist an Fundorten unterhalb 400m. Diese Art ist oligolektisch an Weidengewächse (*Salix*) gebunden und wird ausschließlich von *Nomada alboguttata* parasitiert (Westrich, 1990). Die polylektische *Andrena (Leucandrena) barbilabris* ist ebenfalls in ganz Europa verbreitet und wird häufig auf sandigen, vegetationsarmen Flächen angetroffen. Bei dieser Art finden sich neben *Nomada alboguttata* auch noch

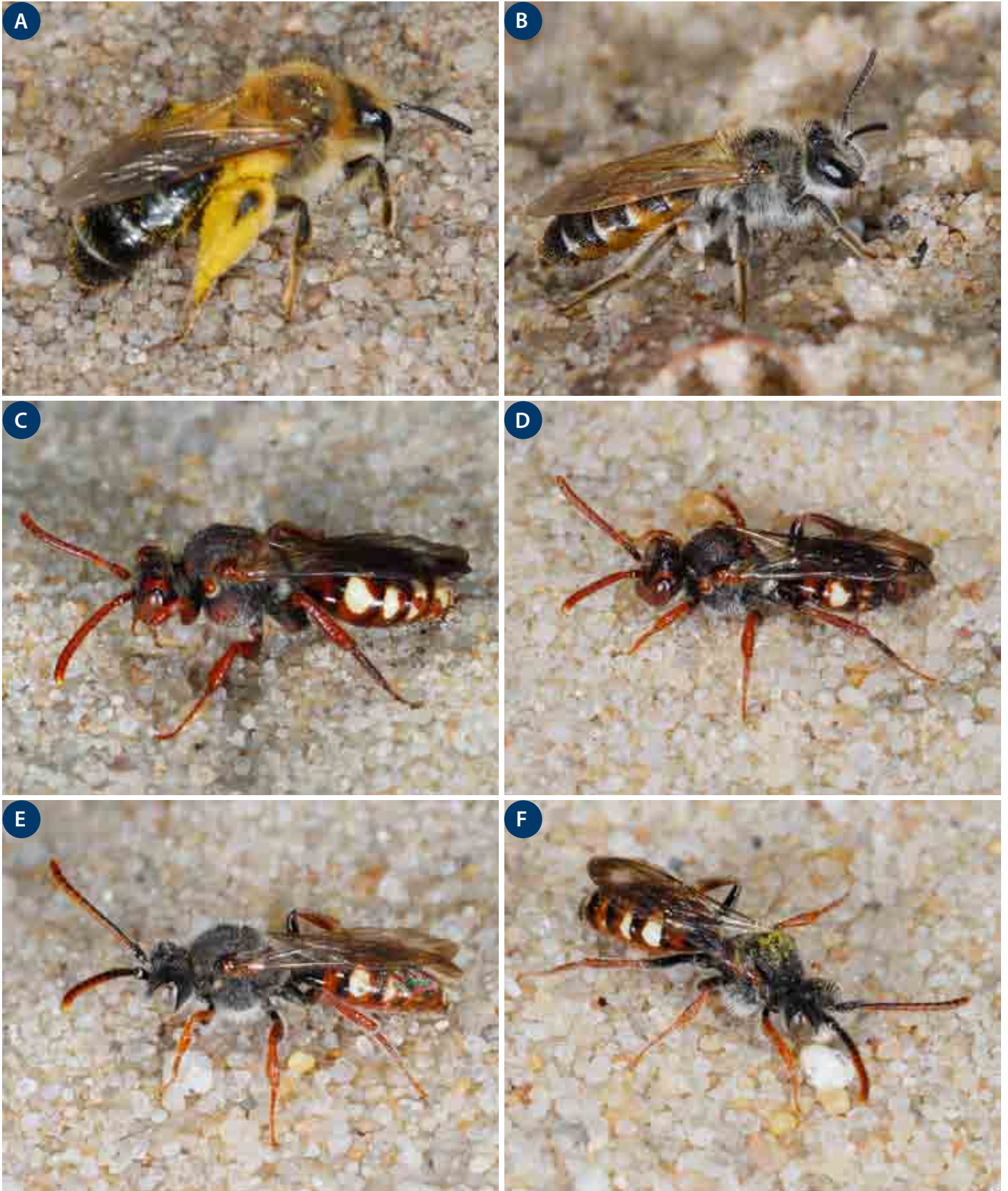


Abb. 1: Die untersuchten Formen von *Nomada alboguttata* und ihre Wirte. A: *Andrena barbilabris* (♀); B: *Andrena ventralis* (♀); C: *Nomada alboguttata* (♀) bei *Andrena barbilabris*; D: *Nomada alboguttata* (♂) bei *Andrena barbilabris*; E: *Nomada alboguttata* (♀) bei *Andrena ventralis*; F: *Nomada alboguttata* (♂) bei *Andrena ventralis*.

weitere Parasitoide der Gattung *Sphcodes* (Blutbienen) (Westrich, 1990). In unseren Untersuchungen wird versucht weitere Hinweise bezüglich des Artstatus dieser beiden Formen zu gewinnen. Dazu wurden jeweils morphologische als auch molekulare Analysen durchgeführt.

## Material und Methoden

### Probennahme

Die Probenahme erfolgte an drei verschiedenen Standorten. Die erste ist der Neue Garten in Potsdam (Brandenburg) (Standort 1), einem Parkgelände, das an den Ufern des Heiligen Sees und des Jungfernsees liegt. Bei dem zweiten Standort handelt es sich um ein Flugplatzgelände in der Nähe des Ortes Saarmund (Brandenburg) (Standort 2), ca. 20 km südwestlich von Berlin am Autobahndreieck Nuthetal. Beide Gebiete sind ca. 11 km (Luftlinie) voneinander entfernt. Bei dem dritten Standort handelt es sich um eine Ausgleichs- und Ersatzfläche am Güsenhofsee in Paderborn-Sennelager (Nordrhein-Westfalen) (Standort 3). In allen Gebieten zusammen wurden insgesamt 104 Individuen von *Nomada alboguttata* gesammelt. Davon stammen 38 Individuen vom ersten, 43 vom zweiten und 23 vom dritten Standort (Tab 1). Alle Individuen vom Standort 3 wur-

### Morphologische Untersuchungen:

Für die morphologischen Untersuchungen wurden die Individuen zum Vergleich der charakteristischen Merkmale mit einem Binokular mit integrierter Kamera (Leica DFC 480) untersucht. Von allen 104 Tieren wurden Farbaufnahmen von Kopf und Abdomen gemacht. Es wurden die Fühlerglieder und Ocellen am Kopf, sowie die Färbung auf der Oberseite des Abdomens fotografiert. Zur Vermessung der Merkmale wurde das Programm IM50 von Leica (Version 4.0 Release 117) verwendet. Analysiert wurden die Länge des zweiten und dritten Fühlergliedes, der Augenabstand und der Abstand der zweiten und dritten Ocelle zueinander (siehe Abb. 2 für eine graphische Darstellung der untersuchten Merkmale). Außerdem wurde der Flächeninhalt der weiß bis gelblich gefärbten Flecken der Tergite des Abdomens vermessen. Dazu wurde das Abdomen immer gerade unter dem Binokular ausgerichtet, um den Fehler bei der Messung des Flächeninhaltes durch die Rundung des Abdomens möglichst klein zu halten. Neben den Messungen am Binokular wurden weitere morphologische Merkmale aufgenommen: Größe und Anzahl der Dornen an den Hintertibien, Färbung von Thorax und Abdomen, Färbung der Beine und Femora und des Stirnflecks am Kopf.

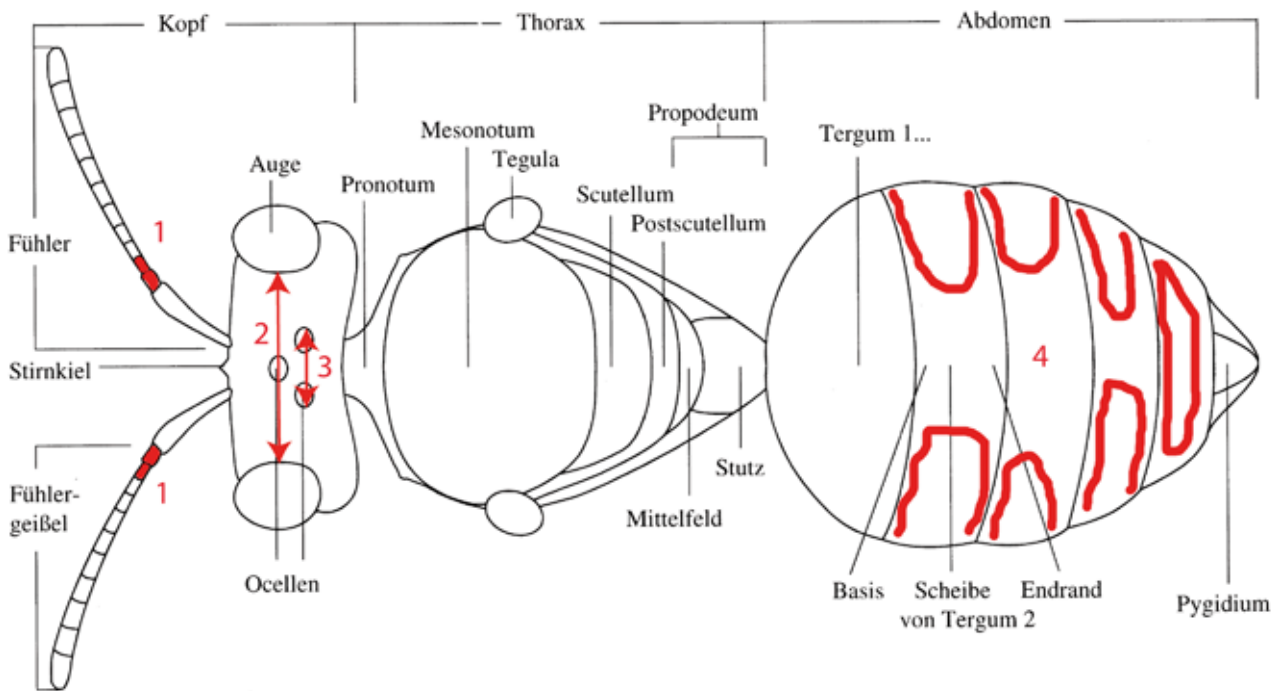
Tab. 1: Auflistung aller gesammelten Individuen, mit Fundort, Geschlecht, Anzahl und Wirt.

| Fundort                                                           | Geschlecht | Anzahl | Wirt                       |
|-------------------------------------------------------------------|------------|--------|----------------------------|
| Neuer Garten, Potsdam, Brandenburg                                | Weibchen   | 18     | <i>Andrena ventralis</i>   |
| Neuer Garten, Potsdam, Brandenburg                                | Männchen   | 20     | <i>Andrena ventralis</i>   |
| Flugplatz Saarmund, Brandenburg                                   | Weibchen   | 24     | <i>Andrena barbilabris</i> |
| Flugplatz Saarmund, Brandenburg                                   | Männchen   | 19     | <i>Andrena barbilabris</i> |
| Seeufer Güsenhofsee Paderborn-Sennelager, Nordrhein-Westfalen     | Weibchen   | 6      | <i>Andrena ventralis</i>   |
| Seeufer Güsenhofsee Paderborn-Sennelager, Nordrhein-Westfalen     | Männchen   | 5      | <i>Andrena ventralis</i>   |
| Sandfläche Güsenhofsee, Paderborn-Sennelager, Nordrhein-Westfalen | Weibchen   | 6      | <i>Andrena barbilabris</i> |
| Sandfläche Güsenhofsee, Paderborn-Sennelager, Nordrhein-Westfalen | Männchen   | 6      | <i>Andrena barbilabris</i> |

den in der Zeit vom 10.–15.04.2008 gesammelt und stammen aus einem zusammenhängenden Gebiet, das durch einen See getrennt wird. Ein Teil der Tiere wurde hier an Nestern von *Andrena barbilabris* auf einer Sandfläche südlich des Sees und ein weiterer Teil an Nestern von *Andrena ventralis* auf der nördlichen Seeseite gefangen. Die bei *Andrena ventralis* schmarotzenden Tiere vom Standort 1 wurden zwischen dem 15.04. und 24.04.2009 gesammelt, die *Andrena barbilabris* parasitierenden Individuen wurden erst ca. 3 Wochen später zwischen dem 29.04 und 10.06.2009 am Standort 2 gefunden.

### Molekulare Untersuchungen

Von den insgesamt 104 Individuen wurden 24 Tiere für die molekulare Analyse exemplarisch ausgewählt und wie im Weiteren beschrieben behandelt. Es wurden jeweils drei Weibchen und drei Männchen aus jedem Gebiet untersucht. Den Tieren wurde Thoraxmuskulatur entnommen, aus der dann mit dem DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) die DNA extrahiert wurde. Danach wurden die Primer COI-F (GAAGTTTATATTAAATT TTACCTGG) und COI-R (CCTATTGAWARAACATARTGAAAATG) zur Amplifikation des COI-Gens (siehe auch Schulmeister, 2003) und das Primerpaar EF1aF (GTAGGCACGGAGACAACATG) und EF1aR (ACACCA-



**Abb. 2:** Schematische Darstellung untersuchter morphologischer Merkmale (verändert nach Scheuchl, 2000). Rot markierte Stellen zeigen den Vermessungsbereich mit dem Programm IM50 von Leica, 1=Länge Geißelglied 2 und 3 innen, 2=Augenabstand, 3=Abstand der hinteren Ocellen, 4= Fläche der Farbflecken auf dem Abdomen.

GTTTCAACACGACC) zur Amplifikation des *EF1 $\alpha$* -Introns verwendet (siehe auch Sanchis et al., 2001). Zur Amplifikation mittels PCR wurden 23  $\mu$ l Wasser, 3,5  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub>-Puffer, 1,5  $\mu$ l dNTP's, 1  $\mu$ l 10 pmol Forward-Primer, 1  $\mu$ l 10 pmol Reverse-Primer, 0,2  $\mu$ l Taq- Polymerase und 5  $\mu$ l DNA im Gesamtvolumen von 35  $\mu$ l verwendet. Die PCR-Bedingungen für die COI-Amplifizierung bestanden aus einer Initialdenaturierung für 1 Minute bei 94 °C, gefolgt von 38 Zyklen einer Denaturierung (15 sec bei 94 °C), Annealing (15 sec bei 46 °C) und Elongation (15 sec bei 72 °C) und einer Nachsynthese von 10 Minuten bei 72 °C. Die Amplifizierung des *EF1 $\alpha$* -Introns folgt Kuhlmann et al. (2007): 4 min bei 80 °C, 40 Zyklen von 30 sec bei 95 °C, 1 min bei 50 °C und 90 sec bei 72 °C. sowie 10 Minuten bei 72 °C. Alle Produkte wurden auf einem ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer sequenziert. Alle Sequenzen wurden in der NCBI GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) hinterlegt (COI-Haplotypen: HM746773-HM746774; *EF1 $\alpha$* -Haplotypen: HM746770-HM746772).

## Datenanalyse

Die morphologischen Daten wurden nach getrennten Geschlechtern untersucht, da bei den Apiformes oft ein Sexualdimorphismus beobachtet werden kann (vgl. auch Kuhlmann et al., 2006). Da es eine Korrelation zwischen der Körpergröße und anderen Parametern geben kann, wurde der Augenabstand als Proxy für die

Körpergröße und als Kovariate in die Berechnungen einbezogen. Diese Kovariate wurde im Bezug auf die variablen Flächeninhalte der Tergitflecken, Länge des zweiten und dritten Geißelgliedes und Abstand zwischen zweiter und dritter Ocelle mit eingerechnet. Bei den gemessenen Parametern Größe, Länge der Geißelglieder zwei und drei, Anzahl der Dornen an den Hintertibien, Abstand der Augen, Abstand zwischen zweiter und dritter Ocelle und Färbung des Abdomens wurde von allen Individuen nach Geschlecht ein statistischer Vergleich vorgenommen. Für die weitere Bearbeitung der 104 Tiere wurden die Weibchen und Männchen aller drei Standorte nach dem Wirt zusammengefasst und verglichen. Zur statistischen Auswertung wurde das Programm XLSTAT (Addinsoft) für MS EXCEL verwendet und damit eine univariate Varianzanalyse (ANOVA = analysis of variance) bei einem Konfidenzintervall von 95% durchgeführt.

Die molekulare Daten (Sequenzen) wurden mit Hilfe der Software ClustalW (Thompson et al., 1994) aneinander ausgerichtet und der Abstand zwischen den Arten analysiert.

## Ergebnisse

### Morphologische Analyse

Für die morphologische Analyse wurden alle 104 Individuen der Art *Nomada alboguttata* untersucht. Dazu wurden die morphologischen Untersuchungen in zwei Teile geteilt. Der erste Teil bezog sich auf morphologische Merkmale, die nicht vermessen wurden. Diese aus der Bestimmungsliteratur stammenden Merkmale sind vor allem die Färbung des Thorax und der Beine sowie die Färbung des Stirnflecks auf dem Kopf der Tiere. Das Abdomen der Männchen ist hell bis dunkel rot gefärbt. Terga 2 und 3 zeigen querovale weißgelbe bis weiße Seitenflecke, die Terga 4 und 5 zeigen beiderseits zwei kleine gelblich-weiß gefärbte Punkte, die auch miteinander verschmolzen sein können und Tergum 6 weist einen Mittelfleck auf. Es gab lediglich ein paar Ausnahmen, die eine abweichende Färbung zu der eben beschriebenen zeigten. Der Thorax war in allen Fällen schwarz gefärbt. Die Beine waren rot gefärbt und die Schenkel meist gänzlich geschwärzt. Alle *Nomada alboguttata*-Männchen zeigen einen schwarzen Stirnfleck. Bei diesen Parametern konnten keine Unterschiede zwischen den Männchen, die *Andrena ventralis* bzw. *Andrena barbilabris* parasitieren und auch keine Unterschiede zwischen Nordrhein-Westfalen und Brandenburg gefunden werden. Etwas anders sah es bei den *Nomada alboguttata*-Weibchen aus. Der Thorax ist schwarz, mit roten Flecken auf Pronotum, Calli, Tergulae, Scutellum und Mesonotum. Das Abdomen ist rot/braun gefärbt mit rundlichen gelben Flecken auf den Tergiten 2 und 3, Tergum 4 mit zwei nach innen gerückten Flecken und Tergum 5 zeigt einen Mittelfleck. Die Beine sind auch hier rot, die Schenkel meist ganz schwarz gefärbt. Es gibt jedoch ein weiteres sehr auf-

fälliges Merkmal: die Färbung des Stirnflecks (Abb. 3). Von insgesamt 30 *Andrena barbilabris* parasitierenden *Nomada alboguttata*-Weibchen zeigen 26 eine rote bis schwach rote Färbung des Stirnflecks des Kopfes. Jedoch nur 1 von 24 Weibchen von *Nomada alboguttata*-Weibchen, die *Andrena ventralis* parasitierten zeigen solch eine rote Färbung; hier war der Stirnfleck ansonsten stets schwarz gefärbt.

Der zweite Teil der morphologischen Untersuchung befasste sich mit den Parametern, die vermessen werden konnten. Bei den Weibchen von *Nomada alboguttata* gibt es signifikante Unterschiede zwischen den *Andrena ventralis* und *Andrena barbilabris* parasitierenden Tieren in der Fläche der Färbung der Flecken des Abdomens, in der Größe, in der Länge des zweiten und dritten Geißelgliedes, sowie in der Länge des Augenabstandes (Tab. 2). Zum Beispiel zeigen *Nomada alboguttata*-Weibchen die *Andrena barbilabris* parasitieren einen signifikant höheren Farbanteil der Abdomenflecke (im Mittel 0,714 mm<sup>2</sup>) als *Nomada alboguttata*-Weibchen, die *Andrena ventralis* parasitieren (im Mittel 0,431 mm<sup>2</sup>), mit einem p-Wert von < 0,0001. Bei den Männchen von *N. alboguttata* gibt es signifikante Unterschiede in der Länge des zweiten und dritten Geißelgliedes und beim Augenabstand (Tab. 3). Die grün markierten Zahlen in Tab. 2 und Tab. 3 zeigen gleiche Abhängigkeiten zwischen *Nomada alboguttata*-Weibchen und -Männchen zu den zwei verschiedenen Wirten. Ein Beispiel wären die Länge von Geißelglied 2 und 3. Bei Männchen, als auch bei Weibchen ist das 2 und 3 Geißelglied der *Andrena ventralis* parasitierenden *Nomada alboguttata*-Tiere länger, als bei denen die *Andrena barbilabris* parasitieren (Kovariate Augenabstand in Berechnung einbezogen).

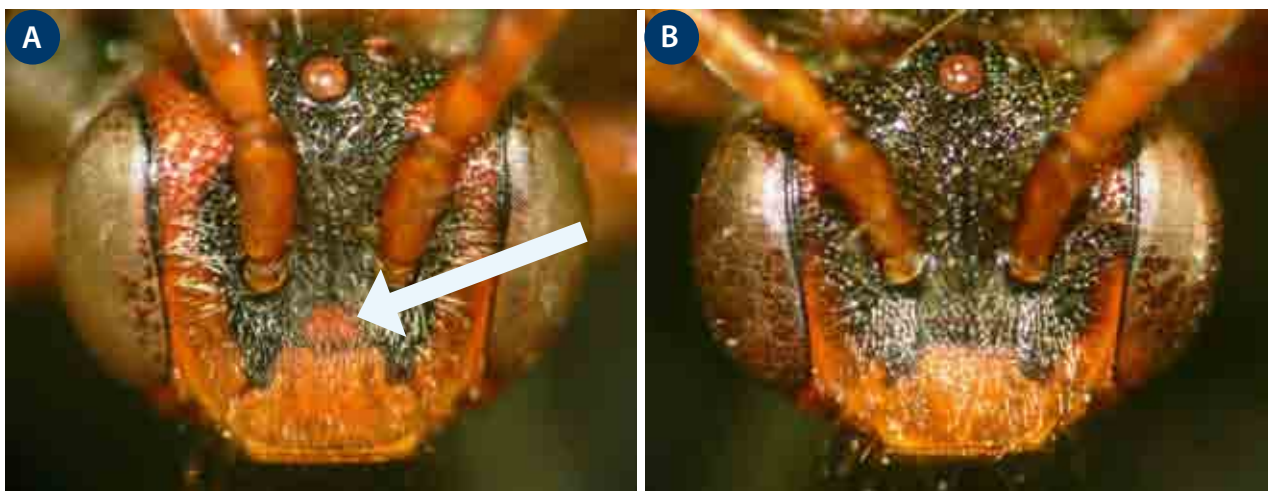


Abb. 3: A: Weibchen von *Nomada alboguttata* das bei *Andrena barbilabris* schmarotzt; B: Weibchen von *Nomada alboguttata* das bei *Andrena ventralis* schmarotzt. Der Pfeil bei A zeigt den roten Fleck auf dem Kopfschild der bei fast immer bei den bei *Andrena barbilabris* parasitierenden Tieren vorhanden ist und fast nie bei der Form die *Andrena ventralis* als Wirt hat.

**Tab. 2: Vergleich von *Nomada*-Weibchen in Abhängigkeit zu den Wirten *Andrena ventralis* und *Andrena barbilabris*;** Dargestellt sind die verschiedenen morphologischen Parameter, FG, F- und p-Wert, Signifikanz und Mittelwert des Parameters bei *Nomada alboguttata* in Abhängigkeit vom Wirt; FG= Freiheitsgrade, GG = Geißelglied, n.s. = nicht signifikant, s. = signifikant, MW = Mittelwert; rote Zahlen zeigen signifikante Unterschiede und grüne Zahlen zeigen Übereinstimmungen in den Parametern zwischen *Nomada alboguttata*-Weibchen, die Tiere aus NRW und Brandenburg wurden, je nach Wirt, zusammengefasst.

| <i>Nomada alboguttata</i> – Weibchen  |    |        |          |             | MW des Parameters von <i>Nomada alboguttata</i> in Abhängigkeit zu den Wirten: |                       |
|---------------------------------------|----|--------|----------|-------------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Parameter                             | FG | F-Wert | p-Wert   | Signifikanz | <i>A. ventralis</i>                                                            | <i>A. barbilabris</i> |
| Fläche der Färbung [mm <sup>2</sup> ] | 1  | 15,4   | < 0,0001 | s.          | 0,431                                                                          | 0,714                 |
| Größe [mm]                            | 1  | 18,6   | < 0,0001 | s.          | 0,778                                                                          | 0,861                 |
| Anzahl der Dornen                     | 1  | 2,23   | 0,142    | n.s.        | 4,56                                                                           | 4,83                  |
| Länge GG 2 [mm]                       | 1  | 7,88   | 0,007    | s.          | 0,229                                                                          | 0,216                 |
| Länge GG 3 [mm]                       | 1  | 12,8   | 0,001    | s.          | 0,209                                                                          | 0,191                 |
| Augenabstand [mm]                     | 1  | 73,7   | < 0,0001 | s.          | 1,48                                                                           | 1,74                  |
| Abstand 2-3 Ocelle [mm]               | 1  | 1,28   | 0,263    | n.s.        | 0,364                                                                          | 0,357                 |

**Tab. 3: Vergleich von *Nomada*-Männchen in Abhängigkeit zu den Wirten *Andrena ventralis* und *Andrena barbilabris*;** Dargestellt sind die verschiedenen morphologischen Parameter, FG, F- und p-Wert, Signifikanz und Mittelwert des Parameters bei *Nomada alboguttata* in Abhängigkeit vom Wirt; FG= Freiheitsgrade, GG = Geißelglied, n.s. = nicht signifikant, s. = signifikant, MW = Mittelwert; rote Zahlen zeigen signifikante Unterschiede und grüne Zahlen zeigen Übereinstimmungen in den Parametern zwischen *Nomada alboguttata*-Männchen, die Tiere aus NRW und Brandenburg wurden, je nach Wirt, zusammengefasst.

| <i>Nomada alboguttata</i> – Männchen  |    |        |          |             | MW des Parameters von <i>Nomada alboguttata</i> in Abhängigkeit zu den Wirten: |                       |
|---------------------------------------|----|--------|----------|-------------|--------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| Parameter                             | FG | F-Wert | p-Wert   | Signifikanz | <i>A. ventralis</i>                                                            | <i>A. barbilabris</i> |
| Fläche der Färbung [mm <sup>2</sup> ] | 1  | 2,59   | 0,115    | n.s.        | 0,550                                                                          | 0,662                 |
| Größe [mm]                            | 1  | 3,76   | 0,059    | n.s.        | 0,718                                                                          | 0,759                 |
| Anzahl der Dornen                     | 1  | 0,510  | 0,479    | n.s.        | 4,05                                                                           | 4,16                  |
| Länge GG 2 [mm]                       | 1  | 5,03   | 0,030    | s.          | 0,180                                                                          | 0,170                 |
| Länge GG 3 [mm]                       | 1  | 10,8   | 0,002    | s.          | 0,224                                                                          | 0,207                 |
| Augenabstand [mm]                     | 1  | 14,7   | < 0,0001 | s.          | 1,50                                                                           | 1,62                  |
| Abstand 2-3 Ocelle [mm]               | 1  | 0,463  | 0,500    | n.s.        | 0,367                                                                          | 0,36                  |

### Molekulare Analyse

Für die untersuchten 24 Individuen wurden 22 COI-Sequenzen und 9 EF1 $\alpha$ -Intron-Sequenzen erstellt. Nach dem Erstellen des Alignments konnten praktisch keine Unterschiede beim mitochondrialen Markergen COI für die ausgewählten 22 Individuen festgestellt werden. Hierbei weisen 21 der Tiere den gleichen Haplotyp auf, ein weiterer Haplotyp weist einen Unterschied an Position 255 auf (C statt T). Dieses Tier stammte aus dem Untersuchungsgebiet Flugplatz Saarmund in Brandenburg. Keine der Sequenzen weist Leserasterverschiebungen oder Stopcodons auf, so dass bei der Analyse nicht mit Problemen durch NUMTs (NUclear MiTochondrial DNA; Kernkopien von mitochondrialen Genen) gerechnet wird. Das EF1 $\alpha$ -Intron zeigte eine etwas größere Variabilität auf. Hier konnten insgesamt 3

Haplotypen festgestellt werden, jedoch gibt es keine fixierten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Formen.

### Diskussion

*Nomada alboguttata* schmarotzt sowohl bei *Andrena ventralis*, als auch bei *Andrena barbilabris*. Beide Wirte wurden verschiedenen Untergattungen zugeordnet (siehe Schmid-Egger & Scheuchl, 1997) und in der Regel parasitieren *Nomada*-Arten nur bei sehr nah verwandten *Andrena*-Arten (Scheuchl, 2000). Dies lässt sich vor allem aus der Biologie der Kuckuckswespen erklären. Tengö & Bergström (1977) haben die chemische Zusammensetzung von Stoffen, die aus der Dufour-

drüse der *Andrena*-Weibchen/ Männchen abgegeben werden, analysiert und diese mit denen ihres Parasiten, der *Nomada*-Weibchen/ Männchen, verglichen. Die Dufourdrüse ist eine zwiebelartige Hinterleibsdrüse, mit deren Sekret viele Bienen ihre Nestzellen auskleiden (Cane, 1981). Über diesen Geruch werden auch die Wirtsnester von den *Nomada*-Weibchen ausfindig gemacht (Cane, 1983). Tengö & Bergström (1977) beschreiben, dass es nie zu einem aggressiven Verhalten zwischen Parasiten und Wirt bei einem Zusammentreffen in der Luft oder vor dem Bau kam. Zusätzlich wurde gezeigt, dass *Nomada*-Männchen mit Hilfe von Mandibeldrüsen Sekrete produzieren können, die identisch mit Dufoursekreten ihres Wirtes sind (Tengö & Bergström, 1975, 1977). Die *Nomada*-Männchen sind somit in der Lage Weibchen mit diesem Duft anzulocken. Während der Kopulation werden die *Nomada*-Weibchen dann von den Männchen mit diesem Duft besprüht, so dass es ebenfalls zwischen den *Nomada*-Weibchen und dem jeweiligen Wirt, den *Andrena*-Weibchen, nicht zu einem aggressiven Verhalten kommt, sobald sich der Parasit dem Nest nähert und seine Eier ablegt (Tengö & Bergström, 1977). Passend hierzu zeigte eine aktuelle phylogenetische Analyse eine mögliche nahe Verwandtschaft der beiden Wirtsarten auf (Dubitzky, 2005).

Die Analyse der morphologischen Daten in unserer Studie spricht nun dafür, dass es sich bei den beiden untersuchten Formen möglicherweise um getrennte Arten handelt. Es gibt zum einen signifikante Unterschiede in der Körpergröße und zum anderen in der Größe der Farbflecke: die derjenigen Weibchen, die *Andrena ventralis* parasitieren, sind signifikant kleiner. Anscheinend korreliert die Größe des Parasiten mit der Größe des Wirtes. Der Wirt *Andrena barbilabris* kann von 10 bis 11 mm (Weibchen) bzw. 10 bis 12 mm (Männchen) groß werden, *Andrena ventralis* dagegen nur 7 bis 9 mm (Weibchen) bzw. 7 bis 10 mm (Männchen) (Schmid-Egger & Scheuchl, 1997). Weiterhin weisen diese Weibchen auch eine deutlich geringere Fläche an Farbflecken (0,431 mm<sup>2</sup>) des Abdomens auf, als die *Andrena barbilabris* parasitierenden Weibchen (0,714 mm<sup>2</sup>), auch unter Einbeziehung des allometrischen Wachstums durch Berücksichtigung der Kovariate Augenabstand. Weiterhin hervorzuheben ist der signifikante Unterschied der *Nomada alboguttata*-Weibchen und -Männchen in Bezug auf die Länge der Geißelglieder 2 und 3 (ebenfalls unter Einbeziehung des allometrischen Wachstums). Die *Andrena ventralis* parasitierenden Weibchen, als auch deren Männchen zeigen ein längeres zweites und drittes Geißelglied verglichen mit den *Andrena barbilabris* parasitierenden Tieren. Das spricht entgegen aller Erwartung nicht dafür, dass

mit der Größe auch die Länge der Geißelglieder wächst und ist möglicherweise als ein selektionsneutrales Merkmal zur Unterscheidung zweier kryptischer Arten zu werten. Ein nicht zu vernachlässigendes Merkmal ist die Färbung des Stirnflecks der *Nomada alboguttata*-Weibchen, der bei *Andrena barbilabris* parasitierenden Tiere: Es konnte bei 26 von 30 Tieren eine rote Färbung des Stirnflecks beobachtet werden, hingegen insgesamt nur 1 mal bei den *Andrena ventralis*-Parasiten. Insgesamt kann man also vor allem in der Größe und der Färbung signifikante Unterschiede zwischen den beiden untersuchten *N. alboguttata*-Formen entdecken. Dass solche Unterschiede in der Färbung zur Unterscheidung nah verwandter *Nomada*-Arten verwendet werden können wurde auch von Diestelhorst & Lunau (2008) gezeigt.

Im Gegensatz hierzu stehen die Ergebnisse der molekularen Analyse. Weder beim mitochondriellen COI-Gen, noch beim EF1 $\alpha$ -Intron konnten fixierte Unterschiede zwischen beiden Formen gefunden werden. Das COI-Gen findet in den letzten Jahren immer größere Verwendung in der sog. „Molekularen Taxonomie“, da es sich häufig als geeignet erwiesen hat, mit diesem Genfragment nah verwandte Arten zu unterscheiden (Hajibabaei et al., 2007; Steinke & Brede, 2006). Es hat sich jedoch schon in der Arbeit von Kuhlmann et al. (2007) zum *Colletes succinctus*-Artkomplex gezeigt, dass dieser Marker möglicherweise zu konserviert ist, um sehr rezente Speziationseignisse aufzulösen. Selbige Autoren fanden dann mit Hilfe des EF1 $\alpha$ -Introns fixierte Unterschiede zwischen den untersuchten Formen der Seidenbiene. Aber auch mit diesem Genabschnitt konnten wir keine Unterschiede zwischen den untersuchten Formen feststellen.

Unsere Ergebnisse legen zwei alternative Schlussfolgerungen nahe: 1. Es handelt sich bei den beiden Formen um getrennte Arten – genetische Unterschiede konnten jedoch bisher nicht festgestellt werden, da die Trennung beider Arten wahrscheinlich rezent stattgefunden hat und die untersuchten molekularen Marker dafür zu konserviert sind. 2. Es handelt sich um eine Art deren verschiedene Formen einen Fall von phänotypischer Plastizität widerspiegeln. Phänotypische Plastizität wird als die Fähigkeit eines Organismus beschrieben, aufgrund von biotischen und abiotischen Bedingungen unterschiedliche Phänotypen auszubilden (Agrawal, 2001). Bezug nehmend auf die beiden in dieser Studie untersuchten Formen, könnte man davon ausgehen, dass aufgrund der Wirte *Nomada alboguttata* an verschiedene Umweltfaktoren adaptiert ist. Ein denkbarer Umweltfaktor könnte im Zusammenhang mit dem Nistverhalten der Wirte stehen. *Andrena barbilabris* bevorzugt sandige Lebensräume, bei *Andrena*

*ventralis* dagegen ist eine Präferenz für feuchtere, lehmige Böden bekannt. Aufgrund dieser andersgearteten Nistbedingungen der Wirte werden mit Sicherheit mikroklimatische Unterschiede in den Wirtsnestern vorherrschen, wie z. B. unterschiedliche Temperaturen und Belüftungsbedingungen, welche die Entwicklung der Larven beeinflussen könnten. Ein weiterer Einfluss eines Umweltfaktors könnte das Nahrungsangebot darstellen. Bei *Andrena ventralis* als Spezialist für Weidengewächse und *Andrena barbilabris*, die unspezialisiert über 13 Pflanzenfamilien besammelt, findet der Parasitoid stark voneinander abweichenden Pollen und Nektar vor. Diese unterschiedlichen Nahrungsquellen könnten ebenfalls zu einer abweichenden, morphologischen Ausprägung führen.

Die erste Hypothese würde sich mit der Untersuchung weiterer, variablerer molekulare Marker überprüfen lassen. Liegt jedoch phänotypische Plastizität vor, so sollten unter gleichen Bedingungen aufgezogene *Nomada*-Larven einen einheitlichen Phänotyp hervorbringen – unabhängig davon, von welcher *Nomada*-Form die Eier stammen. In weiteren Untersuchungen soll dieser Fragestellung in Zukunft nachgegangen werden.

## Danksagung

Wir danken der zuständigen Landesbehörde Brandenburg und der Unteren Landschaftsbehörde des Kreises Paderborn für die Erteilung der Sammelgenehmigungen zum Fang von Wildbienen. Wir danken Olaf Diestelhorst, der wertvolle Tipps zur Diskussion dieses Themas geliefert hat sowie Christian Schmid-Egger und Eckart Stolle, deren Anmerkungen diese Arbeit verbessert haben.

## Literatur

- Agrawal, A. A. (2001): Phenotypic Plasticity in the Interactions and Evolution of Species. *Science* 294: 321–326.
- Cane, J. H. (1981): Dufour's gland secretion in the cell linings of bees (Hymenoptera: Apoidea). *Journal of Chemical Ecology* 7: 403–410.
- Cane, J. H. (1983): Olfactory evaluation of *Andrena* host nest suitability by cleptoparasitic *Nomada* bees (Hymenoptera: Apoidea). *Animal Behavior* 31: 138–144.
- Diestelhorst, O. & K. Lunau (2008): Beitrag zur Klärung des Artstatus von *Nomada succincta* Panzer, 1798 (Hymenoptera, Apidae). *Entomologie heute* 20: 165–171.
- Dubitzky, A. (2005): Studies in phylogeny and biosystematics of bees: The bee genus *Andrena* (Andrenidae) and the tribe Anthophorini (Apidae) (Insecta: Hymenoptera: Apoidea). Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Hajibabaei, M., Singer, G. A. C., Hebert, P. D. N. & D. A. Hickey (2007): DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. *Trends in Genetics* 23: 167–172.
- Kuhlmann, M., Else, G. R., Dawson, A. & D. L. J. Quicke, D. (2007): Molecular, biogeographical and phenological evidence for the existence of three western European sibling species in the *Colletes succinctus* group (Hymenoptera: Apidae). *Organisms, Diversity & Evolution* 7: 155–165.
- Sanchis, A., Michelena, J. M., Latorre, A., Quicke, D. L. J., Gärdenfors, U. & Belshaw, R. (2001): The phylogenetic analysis of variable-length sequence data: elongation factor-1 $\alpha$  introns in European populations of the parasitoid wasp genus *Pauesia* (Hymenoptera: Braconidae: Aphidiinae). *Molecular Biology Evolution* 18: 1117–1131.
- Scheuchl, E. (2000): Illustrierte Bestimmungstabellen der Wildbienen Deutschlands und Österreichs. Band I, Anthophoridae. Eigenverlag E. Scheuchl, 2. Auflage.
- Schmid-Egger, C. & Scheuchl, E. (1997): Illustrierte Bestimmungstabellen der Wildbienen Deutschlands und Österreichs. Band III Andrenidae; Eigenverlag E. Scheuchl, 1. Auflage
- Steinke, D. & N. Brede (2006): Taxonomie des 21. Jahrhunderts. DNA Barcoding. *Biologie in unserer Zeit* 36: 40–46.
- Schulmeister, S. (2003): Simultaneous analysis of basal Hymenoptera (Insecta): introducing robust-choice sensitivity analysis. *Biological Journal of the Linnean Society* 79: 245–275.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. & T. J. Gibson (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22: 4673–4680.
- Tengö, J. & G. Bergström (1975): Odor correspondence between *Melitta* females and males of their nest parasite *Nomada flavopicta* K. (Hymenoptera: Apoidea). *Journal of Chemical Ecology* 2: 57–65.
- Tengö, J. & G. Bergström (1977) Cleptoparasitism and Odor Mimicry in Bees: Do *Nomada* Males Imitate the Odor of *Andrena* Females? *Science* 196: 1117–1119.
- Westrich, P. (1990): Die Wildbienen: Baden-Württembergs, Spezieller Teil. Ulmer Verlag, 2. Auflage.
- Witt, R. (1992): Zur Bionomie der Sandbiene *Andrena barbilabris* (Kirby 1802) und ihrer Kuckucksbienen *Nomada alboguttata* Herrich Schäfte 1839 und *Sphecodes pellucidus* Smith 1845. *Drosera* '92: 47–81.