

UNIVERSITATEA BABES-BOLYAI, CLUJ-NAPOCA  
FACULTATEA DE BIOLOGIE SI GEOLOGIE  
CATEDRA TAXONOMIE SI ECOLOGIE

- REZUMAT -  
Teză de doctorat

# Caracterizarea unor taxoni endemici la insecte din România utilizând tehnici de microscopie electronică și biologie moleculară

Doctorand Coordonator științific,  
Mihali Ciprian Valentin Prof. univ. dr. Rakosy Laszlo

## CUPRINS

### Introducere

<b>1.</b>	<b>Taxonomia și morfologia la lepidoptere</b>	.....	<b>1</b>
1.1.	<b>Taxonomia la lepidoptere</b>	.....	<b>1</b>
1.2.	<b>Privire generală asupra lepidopterelor din România</b>	.....	<b>7</b>
1.3.	<b>Lepidoptere endemice din România, distribuția acestora</b>	.....	<b>11</b>
1.4.	<b>Lista rosie</b>	.....	<b>11</b>
1.5.	<b>Speciile abordate în prezentul studiu. Morfologie, biologie și ecologie</b>	.....	<b>12</b>
1.5.1.	<i>Dhalica rakosy</i> Weidlich 2005, ( <i>Psychidae</i> )	.....	<b>13</b>
1.5.2.	<i>Pseudophilotes bavius hungarica</i> Dioszeghy 1913, ( <i>Lycaenidae</i> )	.....	<b>15</b>
1.5.3.	<i>Euphydryas maturna opulenta</i> Rakosy & Varga 2009, ( <i>Nymphalidae</i> )	.....	<b>18</b>
1.5.4.	<i>Erebia sudetica radnaensis</i> Rebel 1915, ( <i>Nymphalidae</i> )	.....	<b>22</b>
<b>2.</b>	<b>Colorile structurale la lepidoptere</b>	.....	<b>26</b>
<b>3.</b>	<b>Stadiul actual al cunoștințelor privind utilizarea tehniciilor de microscopie electronică și biologie moleculară în caracterizarea unor specii de lepidoptere</b>	.....	<b>34</b>
3.1.	<b>Microscopia electronică</b>	.....	<b>34</b>
3.2.	<b>Biologia moleculară</b>	.....	<b>41</b>
<b>4.</b>	<b>Considerații generale asupra datelor bibliografice studiate</b>	.....	<b>46</b>
<b>5.</b>	<b>Material biologic, tehnici și metodologii</b>	.....	<b>48</b>
5.1.	<b>Materialul biologic</b>	.....	<b>48</b>
5.2.	<b>Microscopia optică</b>	.....	<b>49</b>
5.3.	<b>Microscopia electronică</b>	.....	<b>50</b>
5.3.1.	<b>Microscopie electronică de baleaj</b>	.....	<b>52</b>

<b>5.3.2.</b>	<b>Sistemul de analiză al datelor pe baza energiei de dispersie a razelor X (EDX)</b>	.....	<b>55</b>
<b>5.4.</b>	<b>Tehnici și metode moleculare utilizate</b>	.....	<b>55</b>
<b>5.4.1.</b>	<b>Studiu asupra diversității genetice a unor populații utilizând izoenzimele</b>	.....	<b>55</b>
<b>5.4.2.</b>	<b>Secvențarea ADN – ului</b>	.....	<b>64</b>
<b>6.</b>	<b>Obiective</b>	.....	<b>67</b>
<b>7.</b>	<b>Rezultate și discuții</b>	.....	<b>68</b>
<b>7.1.</b>	<b>Studii de morfologie la specia <i>Dhalica rakosy</i> Weidlich 2005, (<i>Psychidae</i>), utilizând tehnici de microscopie optică și microscopie electronică</b>	.....	<b>68</b>
<b>7.2.</b>	<b>Studii de morfologie la specia <i>Pseudophilotes bavius hungarica</i> Dioszeghy 1913, (<i>Lycaenidae</i>), utilizând tehnici de microscopie optică și microscopie electronică</b>	.....	<b>103</b>
<b>7.3.</b>	<b>Culoarea structurală la specia endemică <i>Pseudophilotes bavius hungarica</i> Dioszeghy 1913, (<i>Lycaenidae</i>), comparativ cu alte specii de lepidoptere din România</b>	.....	<b>132</b>
<b>7.3.1</b>	<b>Tipuri de solzi ce prezintă culori structurale.</b>	.....	<b>132</b>
<b>7.3.2</b>	<b>Analiza datelor pe baza energiei de dispersie a razelor X (EDX)</b>	.....	<b>144</b>
<b>7.4.</b>	<b>Studiul polimorfismului genetic în cadrul a 19 populații de <i>Erebia sudetica radnaensis</i> Rebel 1915, (<i>Nymphalidae</i>) din Europa, utilizând tehnica izoenzimelor</b>	.....	<b>152</b>
<b>7.5.</b>	<b>Secvențarea ADN-ului la specia <i>Erebia epiphron transylvanica</i> Rebel 1908, (<i>Nymphalidae</i>)</b>	.....	<b>154</b>
<b>7.6.</b>	<b>Secvențarea ADN-ului la specia <i>Euphydryas (Hypodryas) matura opulenta</i> Rakosy &amp; Varga 2009, (<i>Nymphalidae</i>)</b>	.....	<b>161</b>
<b>7.7.</b>	<b>Discuții generale</b>	.....	<b>164</b>
<b>8.</b>	<b>Concluzii</b>	.....	<b>167</b>
<b>9.</b>	<b>Bibliografie</b>	.....	<b>168</b>
<b>Anexa I</b>		.....	<b>179</b>
<b>Anexa II</b>		.....	<b>187</b>

**KEYWORDS:** lepidoptera, specii endemice, lista rosie, culori structurale, SEM, EDX, biologie moleculara, izoenzime, secentare ADN, *Erebia epiphron transylvanica*, *Dahlica rakosyi*, *Erebia sudetica radnaensis*, *Pseudophilotes bavius hungarica*, *Euphydryas maturna opulenta*.

### **Considerații generale asupra datelor bibliografice studiate**

Din datele bibliografice rezultă faptul că studiile efectuate până în prezent asupra speciilor endemice de lepidoptere din România, utilizând ca și metode microscopia optică și electronică de baleaj nu au clarificat multe din aspectele privitoare la structura, morfologia acestor specii.

In literatura de specialitate internațională, tehnica de microscopie optică și electronică a fost utilizată atât în descrierea unor stadii de dezvoltare necunoscute, prin caracterizarea morfologică a acestora (ou, larva, pupă, adult); de asemenea prin posibilitatea studiului comparativ al unor structuri morfologice omoloage și neomoloage ce furnizează informații utilizabile în taxonomia/sistematica clasică; caracterizarea morfologică a unor ultrastructuri ce explică comportamentul și biologia unor specii; nu în ultimul rând, tehniciile SEM pot fi utilizate și în studii de taxonomie/sistemantică modernă prin studii de morfologie la nivelul mai multor suprataxoni, și care au ca scop evidențierea modificărilor morfologice produse de-a lungul evoluției, realizarea de cladograme pe baza acestor diferențieri morfologice, cu evidențierea de noi clade.

La nivel molecular cele mai bogate informații s-au obținut prin tehnica secvențării ADN. De regulă sunt secvențate genele mitocondriale, dar în ultimii ani sunt secvențate și gene nucleare. O bună sinteză a metodelor ADN utilizate în sistematică și taxonomie sunt date de Hillis et al., 1996.

Alți markeri moleculari, utilizați în studiul geneticii populational sunt microsateliții ADN, sunt folosiți în studiul metapopulațiilor și în reconstrucția

filogeografică a unor populații. Aceștia sunt utilizati deoarece prezintă un nivel ridicat de polimorfism. Toate aceste metode au mărit în mod considerabil cunoștințele referitoare la evoluția și sistematica populațiilor de insecte. În ultimul timp, metodele moleculare se îndreaptă înspre două tendințe: secvențarea ADN utilizată în studiile de taxonomie/filogenie moleculară și procesele evolutive ce vor fi evidențiate de apariția unui nou sistem de markeri (Assman et al., 2007). Rezultatul unei analize moleculare filogenetice este exprimată prin construirea de arbori filogenetici. Construcția acestora se face utilizând metode computaționale filogenetice, ce presupun un algoritm de lucru, o metodă și un soft de interpretare filogenetică. Scopul este construcția arborilor filogenetici ce reprezintă o ipoteza de evoluție a unor genuri, specii sau alți taxoni.

Nici un studiu efectuat până în prezent nu a utilizat tehnica microscopiei electronice de baleaj cât și aspecte de biologie moleculară (filogenie moleculară) concomitent în descrierea unor specii de lepidoptere endemice din România.

## **Material biologic, tehnici și metodologii utilizate**

### **Specimenele utilizate în studiul morfologiei**

Specimenele de *Pseudophilotes bavius hungarica* Dioszeghy 1913, (*Lycaenidae*), în număr de 6, au fost colectate și introduse în pliculete de hârtie de formă triunghiulară, pentru a se păstra și usca în condiții optime. Materialul a fost colectat de la Suatu, județul Cluj-Napoca (leg. Mihali Ciprian Valentin).

Specimenele de *Dhalica rakosy* Weidlich 2005, (*Psychidae*), s-au recoltat după cum urmează: 2 indivizi adulți masculi, două femele adulte precum și numeroși saci larvari din care s-au extras pupele, respectiv ouăle. Specimenele recoltate s-au păstrat până la utilizarea acestora într-un pahar uscat cu capac. S-a realizat prelevarea materialului biologic din Cheile Turzii, Cluj (leg. dr. Rakosy Laszlo).

### **Specimenele utilizate în studiul izoenzimelor**

Specimenele de *Erebia sudetica radnaensis* Rebel 1915, (*Nymphalidae*), utilizate au fost în număr de 297 și au aparținut la 19 populații. Indivizii proaspăt prelevați au fost introdusi în azot lichid și păstrați la această temperatură (- 194°C) până în momentul în care s-au utilizat. S-a realizat prelevarea materialului biologic din urmatoarele locații: 75 indivizi din Elveția, câte 15 indivizi din fiecare urmatoarele locații Gletsch, Klausenpass,

Simplonpass, Pontresina, Grindelwald; 14 indivizi din Vallée des Glaciers, Franța; 12 indivizi din Grand Serre, Franța; 17 indivizi din Glandon, Franța; 15 indivizi din Glandon; 10 indivizi din Sud13, Cehia; 11 indivizi din Sud9, Cehia; 14 indivizi din Sud5, Cehia; 14 indivizi din Sud3, Cehia; 19 indivizi din Rodna, România; 13 indivizi din Făgăraș, România; 20 indivizi din Trauneralm, Austria; 18 indivizi din Zwiselstein, Austria; 23 indivizi din Obertauern, Austria; 22 indivizi din Sajatmähder, Austria. Prelevarea materialului biologic a fost realizată de prof. dr. Thomas Schmitt și de prof. dr. Rakosy Laszlo.

### **Specimenele utilizate la secvențarea ADN**

Specimenele de *Euphydryas (Hypodryas) maturna opulenta*, Rakosy & Varga, 2009 (*Nymphalidae*), în numar de 5, introduse în alcool 95% pentru a se păstra și conserva în condiții optime AND-ul. Alcoolul a fost schimbat după câteva ore deoarece apa din specimene poate să producă diluția alcoolului. S-a realizat prelevarea materialului biologic din Dobrogea, munții Măcinului, și a fost realizată de Prof. Dr. Rakosy Laszlo.

Specimenele de *Erebia epiphron transylvanica* Rebel 1908, (*Nymphalidae*), în număr de 8, introduse în alcool 95% pentru a se păstra și conserva în condiții optime AND-ul. Alcoolul a fost schimbat după câteva ore deoarece apa din specimene poate să producă diluția alcoolului. S-a realizat prelevarea materialului biologic din județul Prahova, munții Bucegi, și a fost realizată de Prof. Dr. Rakosy Laszlo.

### **Microscopia optică**

Pentru examinare la microscopul optic, fluturii au fost fixați pe un suport transparent, într-un mediu al cărui indice de refracție este cât mai apropiat de cel al sticlei. Preparatele microscopice sunt provizorii. Preparatele provizorii se păstrează numai atât cât este necesar pentru examinare rapidă.

### **Examinarea diferitelor probe în SEM**

Probele pentru examinarea în SEM sunt montate pe suporturi conductive din cupru sau aluminiu cu ajutorul unor discuri de carbon adezive pe ambele fețe. Orientarea probei pe suport în această fază este foarte importantă, ținând cont de posibilitatea limitată de înclinare a probei în microscop, aşa încât zona de interes să fie expusă direct fasciculului de electroni ce balează proba. Astfel, montarea probelor se va realiza sub lupa binocular unde, probe de tipul microfosilelor (foraminifere) sau segmente de aparate

bucale, antene, palpi (insecte), pot fi aranjate în ordine pe un singur suport. Probele astfel pregătite se introduc în microscop și se examinează la diferite mărimi, imaginile fiind preluate în format digital sau, clasic, pe film.

### **Sistemul de analiză al datelor pe baza energiei de dispersie a razelor X (EDX)**

O anexă importantă a SEM este sistemul de microanaliză elementală cu raze X (EDX). Detectorul special al EDX identifică, pe baza radiatiei X (specifică fiecarei specii chimice) generate din probă, compoziția chimică a probei analizate atât calitativ cât și cantitativ, putându-se realiza chiar hărți cu distribuția fiecarui element chimic în zona luată în studiu.

### **Studiu asupra diversității genetice a unor populații utilizând izoenzimele**

Interpretarea rezultatelor, se face statistic prin includerea tuturor indivizilor din toate populațiile la care s-a efectuat electroforeza din studiul respectiv. Se calculează frecvența alelor, distanța genetică standard Nei, precum și parametrii ai diversității genetice (numărul de alele per locus A, expectanta în ceea ce privește gradul de heterozigoție  $H_E$  (Hedrick, 2005), procentul total al locilor polimorfe  $P_{tot}$ , procentul locilor polimorfe cu cele mai frecvente alele ce nu depășesc 95%  $P_{95}$ ) (Hedrick, 2005). Acești indici se calculează utilizând programe statistice G-STAT (Siegismund, 1993). AMOVAS pentru analiza variației ierarhice genetice, ARLEQUIN 2.000 (Schneider et al., 2000) pentru testarea echilibrului Hardy-Weinberg. Fenogramele se realizează utilizând asocierea prin învecinare (neighbour joining) (Saitou și Nei, 1987).

### **Secvențarea ADN – ului**

Tehnica folosită pentru extractia ADN-ului este cea clasă, adică metoda cu fenol-cloroform și kit comercializat de extractie a ADN-ului utilizând protocoalele standard. Se utilizează specimene proaspete pentru extractia ADN sau specimene păstrate în alcool 70% pe o perioadă de câțiva ani utilizând în acest caz kituri produse special pentru probe ce conțin cantități mici de ADN. Se utilizează amorse universale pentru amplificarea unui fragment de ADN mt, COI. Producții PCR se purifică prin tăierea fragmentelor afară din gelul de agaroză. Producții sunt ulterior purificate utilizând kit PCR-cleanup, iar producții de PCR sunt verificate utilizând electroforeza în gel, și/sau spectrofotometrie utilizând NanoDrop 1000. Secvențele de ADN sunt compilate utilizând softul BioEdit (Hall, 1999) și MEGA (Tamura et al., 2007). Secvențele se liniarizează utilizând algoritmul Clustal W

în ceea ce privește implementarea în MEGA secvențele aliniate se verifică de erori. Porțiunile gap de la aliniere sunt eliminate din secvențe. Fragmentele ADN se traduc în secvențe de proteine prin îndepărțarea ulterioara a nucleotidelor pentru a se afla secvența de citire. Secvențele de proteine rezultate nu mai conțin codoni stop. În final se face alinierea bazelor azotate din secvență. Identificarea secvențelor se face utilizând funcția BLAST (Altschul et al., 1997)

## Obiective

Pe baza studiului și considerațiilor noastre asupra cercetărilor efectuate până în prezent, am stabilit realizarea următoarelor obiective în cadrul tezei de doctorat:

- studii de morfologie la specia *Dhalica rakosy* Weidlich 2005, (*Psychidae*), utilizând tehnici de microscopie optică și microscopie electronică.
- studii de morfologie la specia *Pseudophilotes bavius hungarica* Dioszeghy 1913, (*Lycaenidae*), utilizând tehnici de microscopie optică și microscopie electronică.
- studii de morfologie asupra ultrastructurii solzului la *Pseudophilotes bavius hungarica* Dioszeghy 1913, (*Lycaenidae*), comparativ cu alte specii de lepidoptere ce prezintă culori structurale.
- studiul polimorfismului genetic în cadrul a 19 populații de *Erebia sudetica radnaensis* Rebel 1915, (*Nymphalidae*), din Europa, utilizând tehnica izoenzimelor
- validarea moleculară a subspeciilor *Erebia epiphron transylvanica* Rebel 1908, (*Nymphalidae*), *Euphydryas (Hypodryas) maturna opulenta* Rakosy & Varga, 2009, (*Nymphalidae*), și încadrarea lor filetică.

- evaluarea relațiilor filogenetice între subspeciile secvențate de noi și genurile subfamiliilor *Nimphalinae*, *Satyrinae*.....

## Rezultate si discutii

### Studiile de morfologie la specia *Dhalica rakosy* Weidlich, 2005 (Psychidae) și *Pseudophilotes bavius* ssp *hungarica* Dioszeghy, 1913 (Lycaenidae) utilizând tehnici de microscopie optică și microscopie electronică

Cunoștințele referitoare la morfologia taxonului endemic *Dhalica rakosy* anterioare acestui studiu se rezumă la o sumară descriere a adultului, fără referiri la stadiile preimago. Descrierea noului taxon a avut la bază criterii taxonomice utilizate în cadrul acestui grup, respectiv morfologia solzilor alari și armătura genitală la mascul și femelă. Studiul nostru și-a propus completarea acestei descrieri, aducând numeroase date noi referitoare atât la adult, cat mai ales la stadiile preimago rămase până în prezent necunoscute. Ca noutate științifică, se ilustrează și descrie pentru prima dată femela acestei specii (fig. 1, 2).



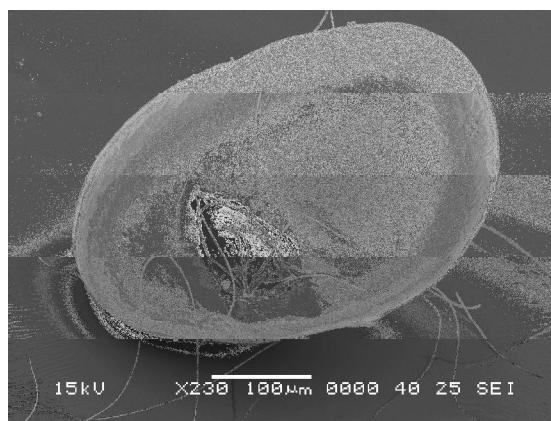
**Fig. 1.** - *Dahlica rakosyi* Weidlich 2005, (Psychidae), femelă.



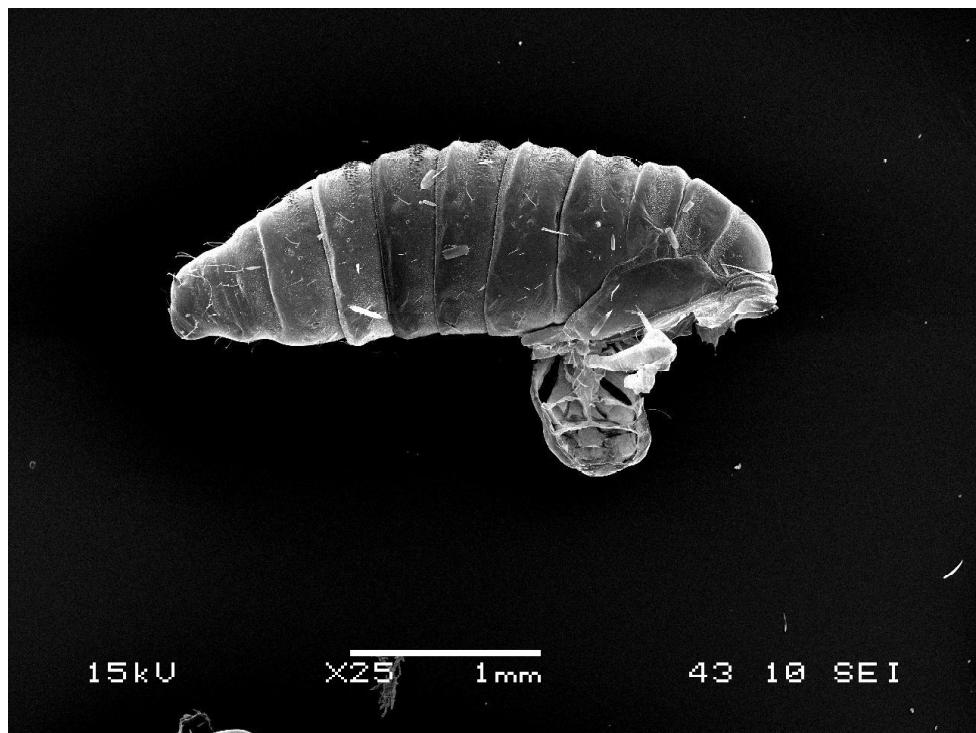
**Fig. 2.** - *Dahlica rakosyi* Weidlich 2005, (Psychidae). Femelă. Lateral.

Pe langă numeroasele noutati morfologice, studiul nostru reprezintă un model nou, mult mai exact și corect pentru abordarea descrierilor taxonomice din viitor.

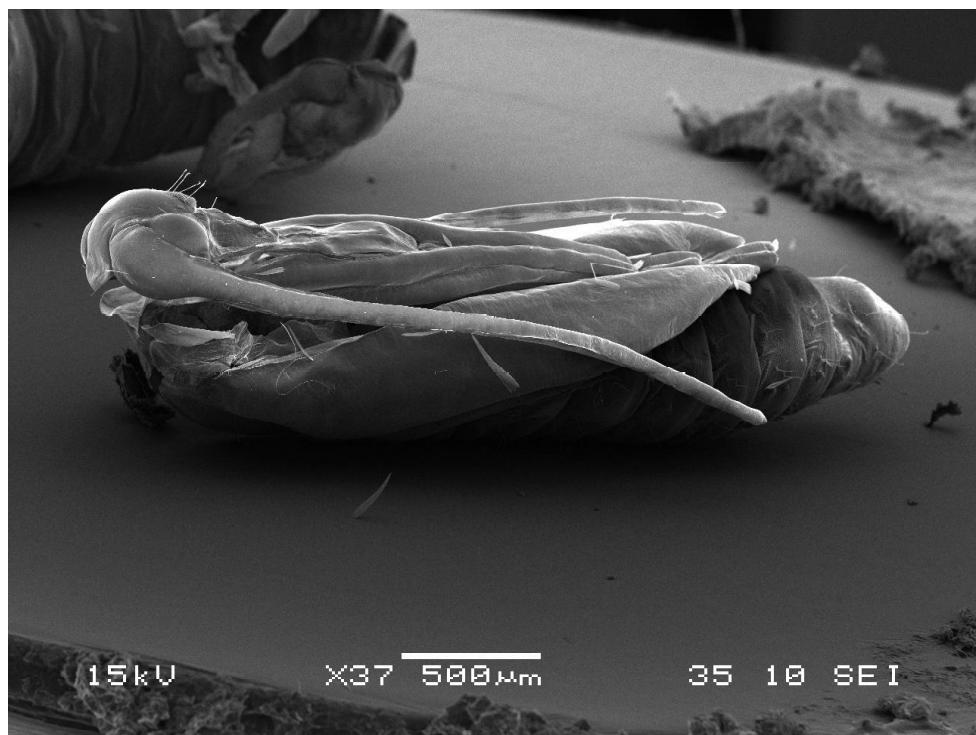
Datele referitoare la taxonul endemic *Dhalica rakosyi* sunt un pic mai detaliate în literatura de specialitate, dar se rezumă numai la descrieri făcute cu ochiul liber sau utilizând lupa binocular. Utilizând tehnica microscopiei electronice de baleaj am reusit să evidențiem numeroase structuri necunoscute încă, prezente mai ales la nivelul oului, pupei, sacilor larvari (fig.3, 4, 5, 6).



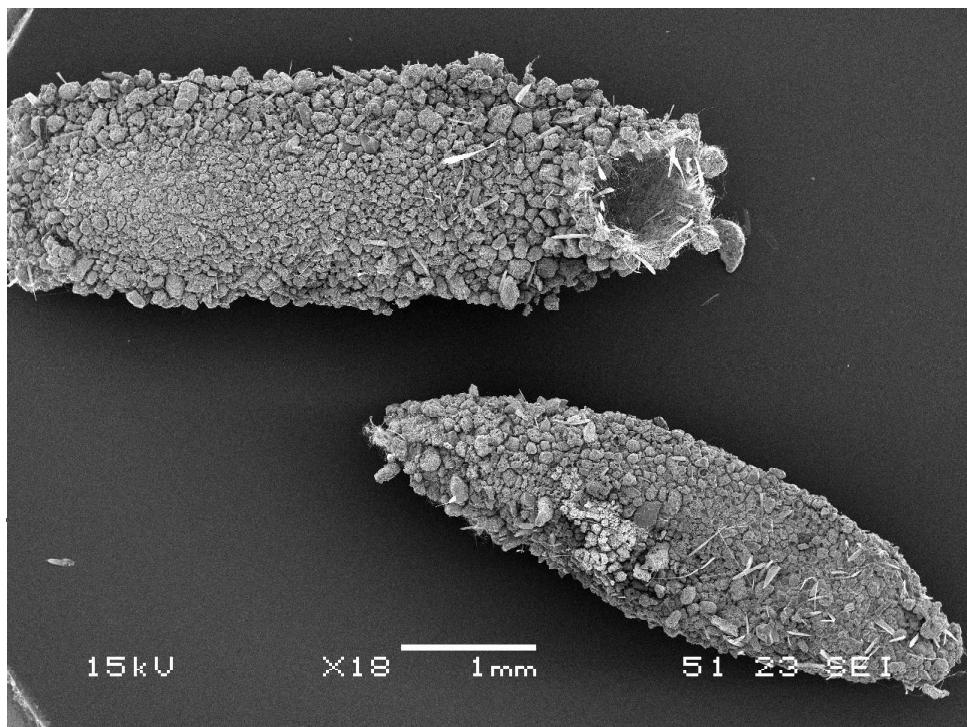
**Fig. 3.** – *Dahlica rakosyi* Weidlich 2005, (Psychidae). Ou.



**Fig. 4.** - *Dahlica rakosyi* Weidlich 2005, (Psychidae). Pupă femelă cu regiunea toracocefalică deschisă, locul pe unde adultul parăsește pupa

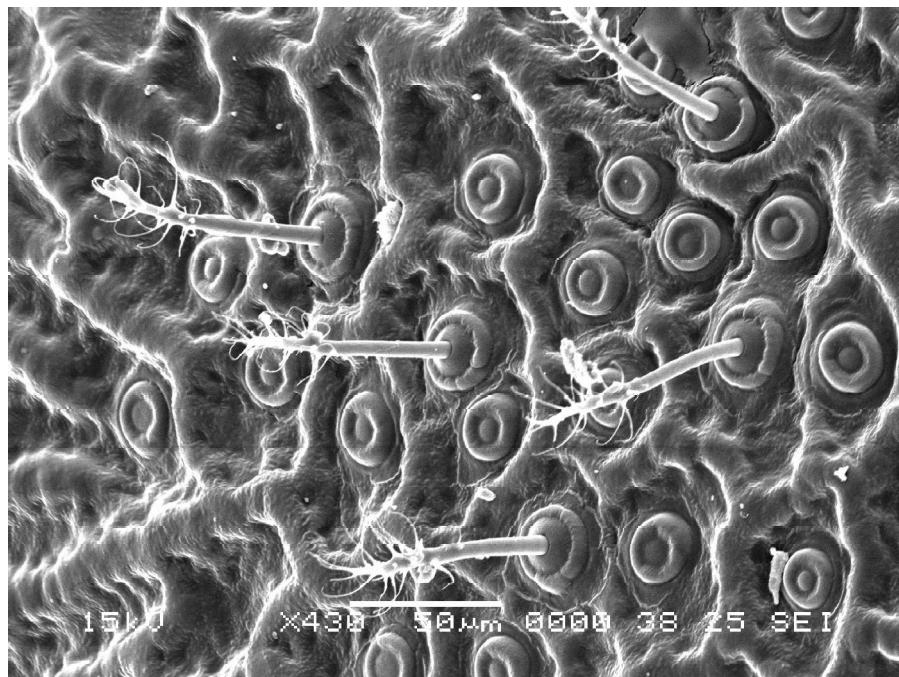


**Fig. 5.** - *Dahlica rakosyi* Weidlich 2005, (Psychidae). Pupă mascul, vedere latero-ventrală. Antene, ochi compus, labrum.



**Fig. 6.** - *Dahlica rakosyi* Weidlich 2005, (Psychidae). Saci de mătase acoperiți cu microparticule de calcar, siliciu.

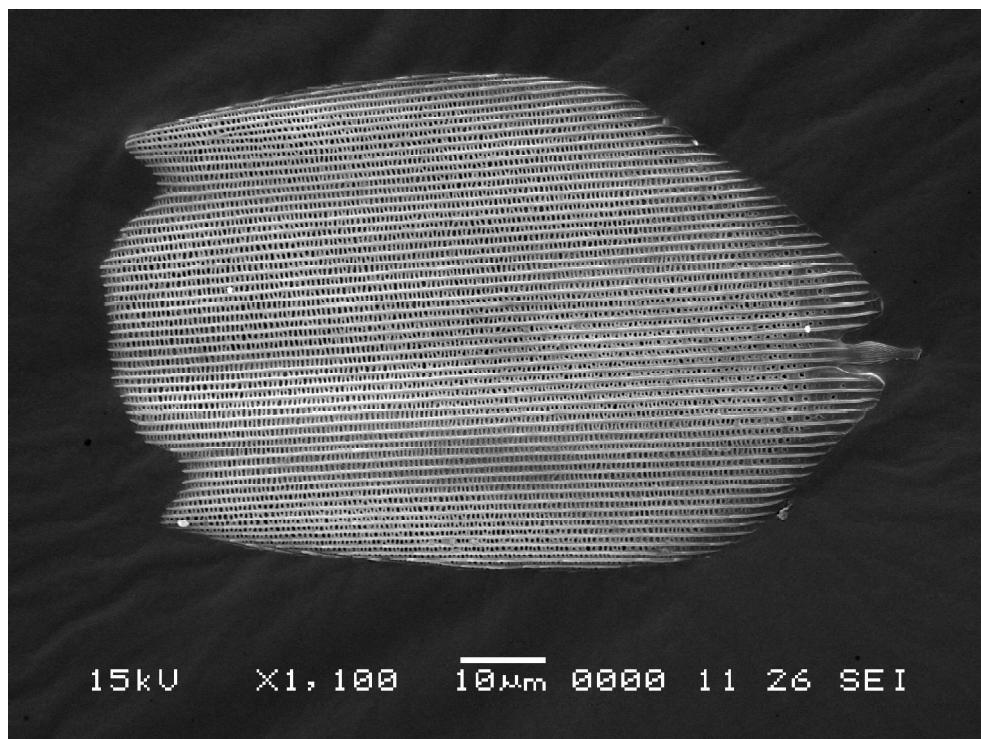
Pentru unele dintre structurile evidențiate nu se cunoaște rolul și funcționalitatea acestora ca și la pupa speciei *Pseudophilotes bavius hungarica* (fig. 7).



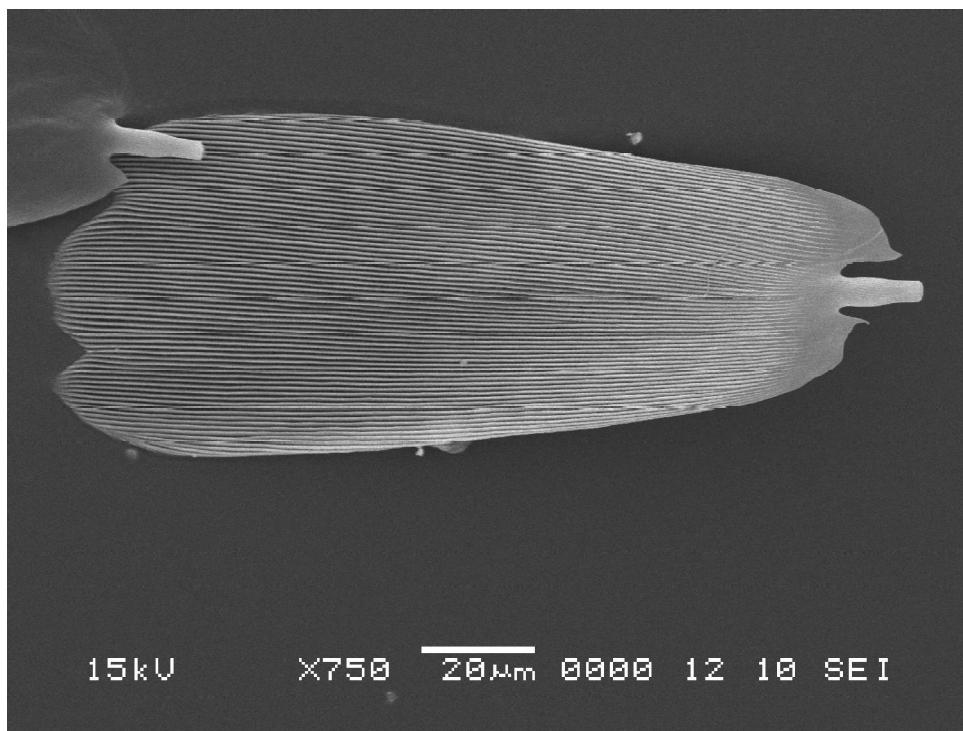
**Fig. 7.** - *Pseudophilotes bavius hungarica* Dioszeghy 1913, (Lycaenidae) – Pupă – detaliu, sensile.

**Studiul morfologiei ultrastructurii solzului la *Pseudophilotes bavius hungarica*, comparativ cu alte specii de lepidoptere ce prezintă culori structurale.**

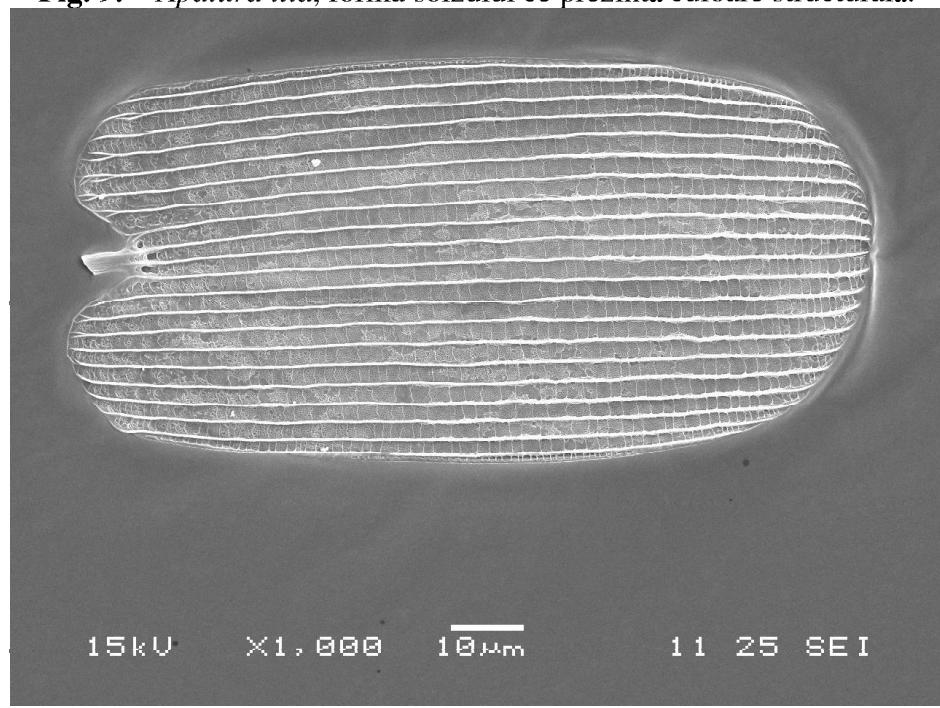
Metodele utilizate sunt reprezentative pentru această analiză (Goldstein J, 2003), respectiv s-a realizat scanarea în linie, în puncte, regiuni mici din creste și coaste, concentrația relativă în elemente chimice trecând printr-o linie de scanare prin solz precum și analiza de prezență sau absență a unui element chimic cu energie de dispersie cunoscută. Speciile care au fost analizate sunt *Apatura ilia*, *Autographa bractea*, *Pseudophilotes bavius* (fig. 8, 9, 10, 11, 12). Rezultatele comparative în studiul culorilor structurale la fluturi utilizând analiza EDX, a arătat urmatoarele: calitativ elementele chimice sunt mai bine reprezentate în spațiul delimitat de coste (crossribs) și într-un procent mai mic la nivelul crestelor (ridge-lamella). Există diferențe calitative între cele două regiuni studiate, respectiv la nivelul crestelor elementele chimice reprezentative sunt C și O și în cantități foarte mici Na, Cu, Zn. La nivelul spațiului delimitat de coastele transversale Na, Cu și Zn sunt mult mai bine reprezentate.



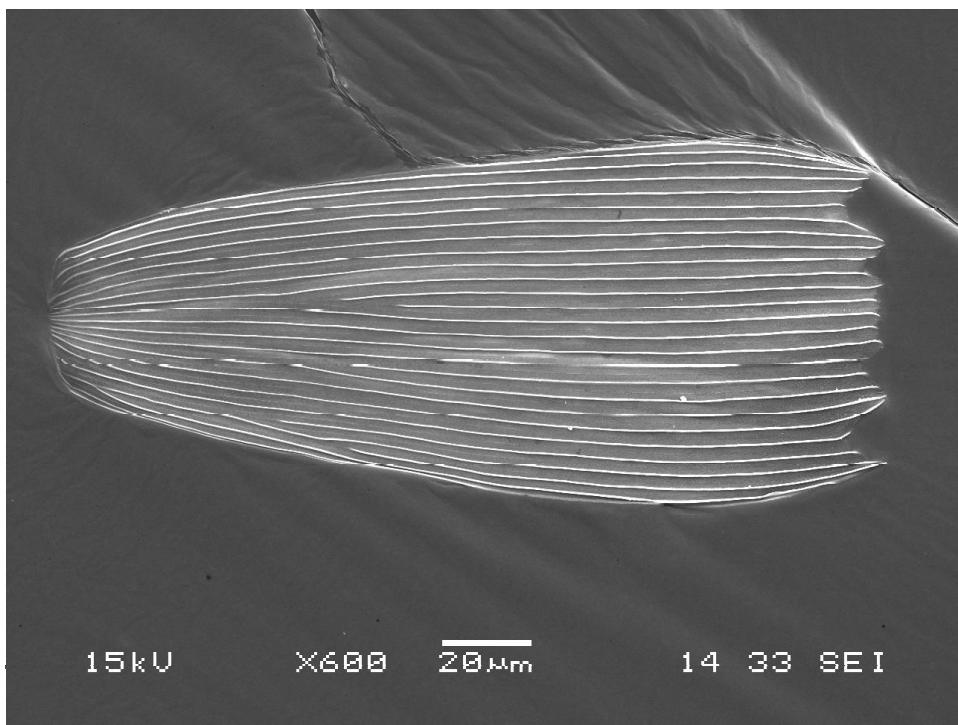
**Fig. 8. – *Pseudophilotes bavius*, forma solzului ce prezintă culoare structurală.**



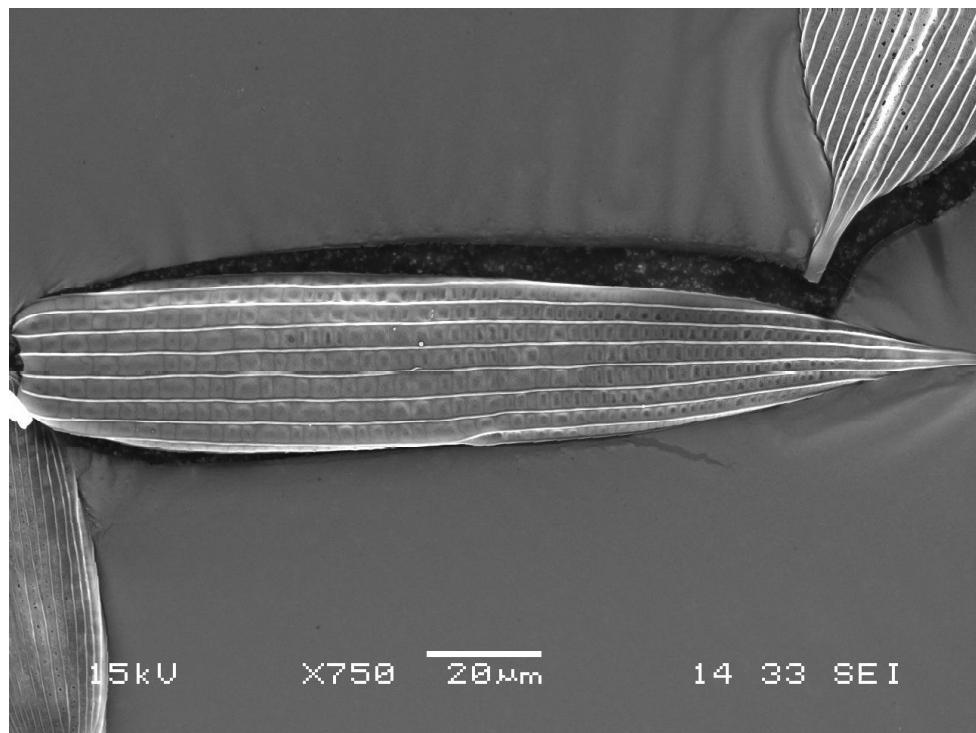
**Fig. 9.** - *Apatura ilia*, forma solzului ce prezintă culoare structurală.



**Fig. 10.** – *Lycaena helle*, forma solzului ce prezintă culoare structurală.



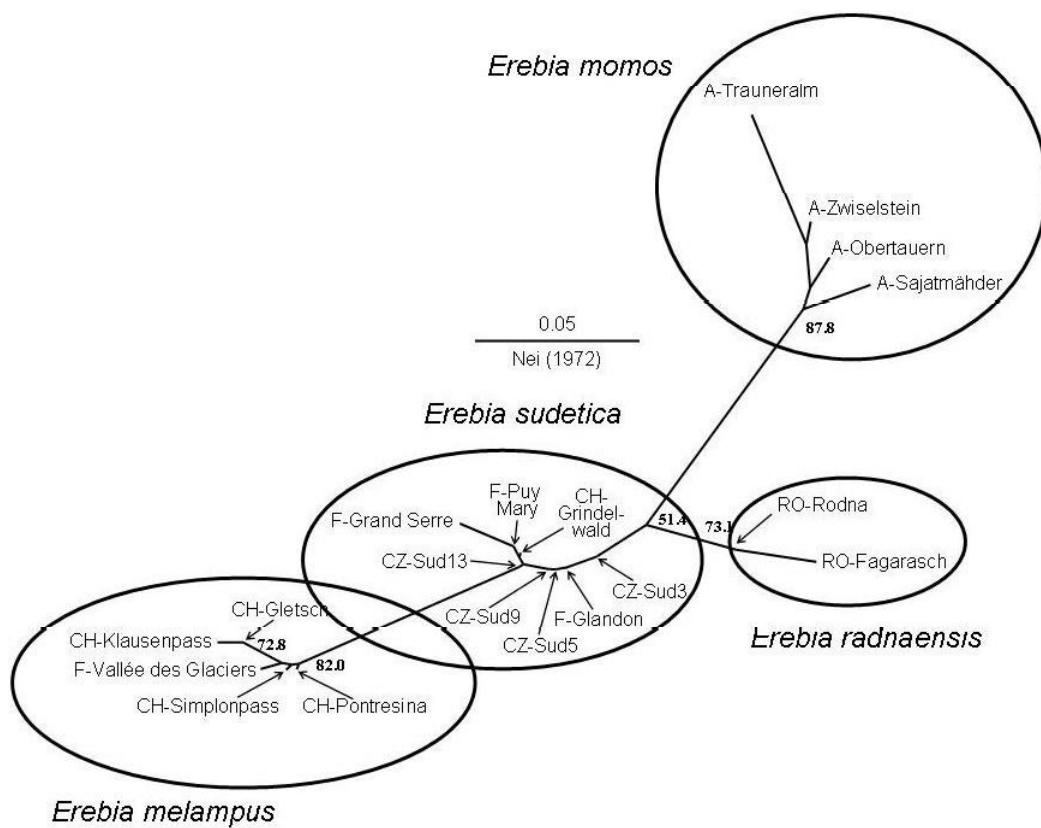
**Fig. 11.** – *Autographa bractea*, solz ce prezintă culoare structurală.



**Fig. 12.** – *Procris (Adscita) statices*, forma solzului ce prezintă culoare structurală.

## Studiul polimorfismului genetic în cadrul a 19 populații de *Erebia sudetica* radnaensis Rebel 1915, (Nymphalidae), din Europa utilizând tehnica izoenzimelor

Pe baza frecvenței allelelor, s-au calculat cu ajutorul programului BIOSYS-1 indicii de bază descriptori pentru variabilitatea inter și intra-specifică pe baza distanței genetice standard Nei, și anume  $H_E$ ,  $H_o$ ,  $P_{tot}$ ,  $P_{95}$ , A. Relațiile interpopulaționale au fost estimate prin construirea nei fenogramme cu clustere Neighbour-joining (fig. 13). S-a utilizat ca și out-grup specia *Erebia sudetica*. Diversitatea genetică din cadrul populațiilor complexului *Erebia melampus-sudetica*, este similară cu a altor specii din acest gen. Poziția intermediară a speciei *Erebia sudetica* în fenograma bazată pe distanța genetică Nei, ridică ipoteza unei origini monofiletice a complexului melampus-erebia.



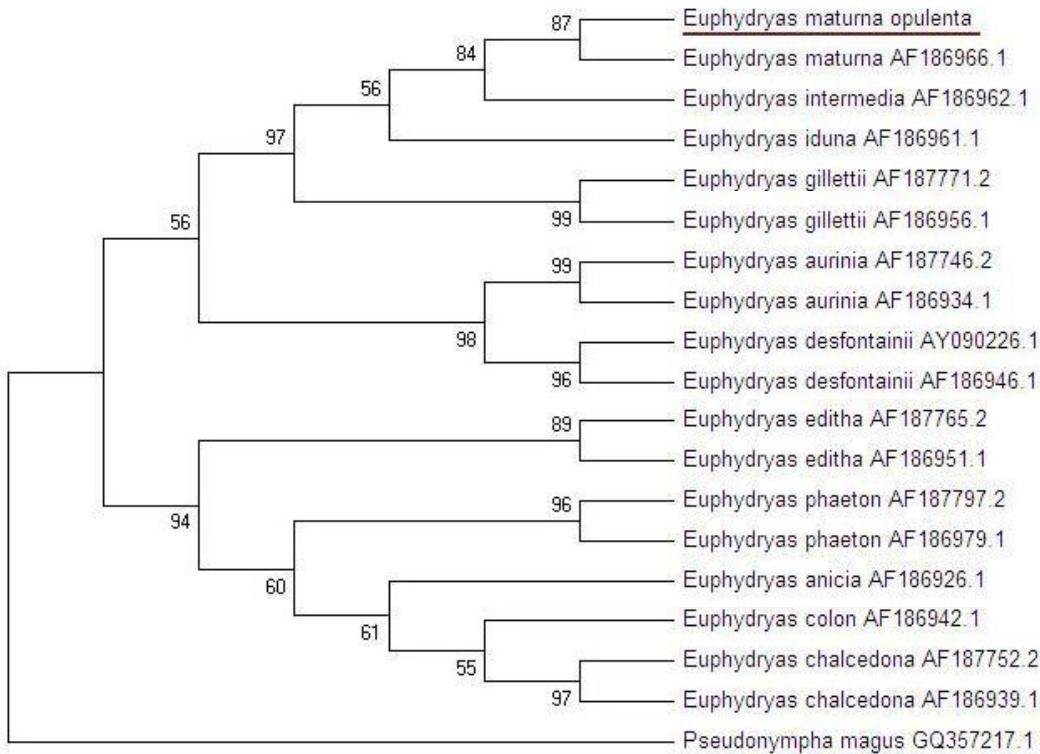
**Fig. 13 –** Fenograma Neighbour-joining realizată pe baza distanței genetice Nei (Nei 1972) la nivelul a 19 populații de *Erebia momos/sudetica/radnaensis/melampus*, fiecare populație fiind reprezentată prin minim 10 indivizi. Valorile bootstrap mai mari peste 50% sunt menționate în nodurile fenoframei (abrevierile reprezintă semnele de țară).

Se poate observa ramura de vest reprezentată prin specia *Erebia melampus* și ce de est reprezentată de specia *Erebia momos*. Între cele două se identifică specia *Erebia radnaensis*. Poziția speciei *Erebia sudetica* este situată între zona vestică și zonaestică a speciei *E. melampus*, astfel că taxonul outgroup a devenit un ingrup pe linia celor două *E. melampus*. Cele 4 grupuri din fenogramă pe baza valorilor testului bootstrap, au fost foarte bine evidențiate în frecvența allelică a câtorva loci, Me, Pgi 6Pgdh, Pgm.

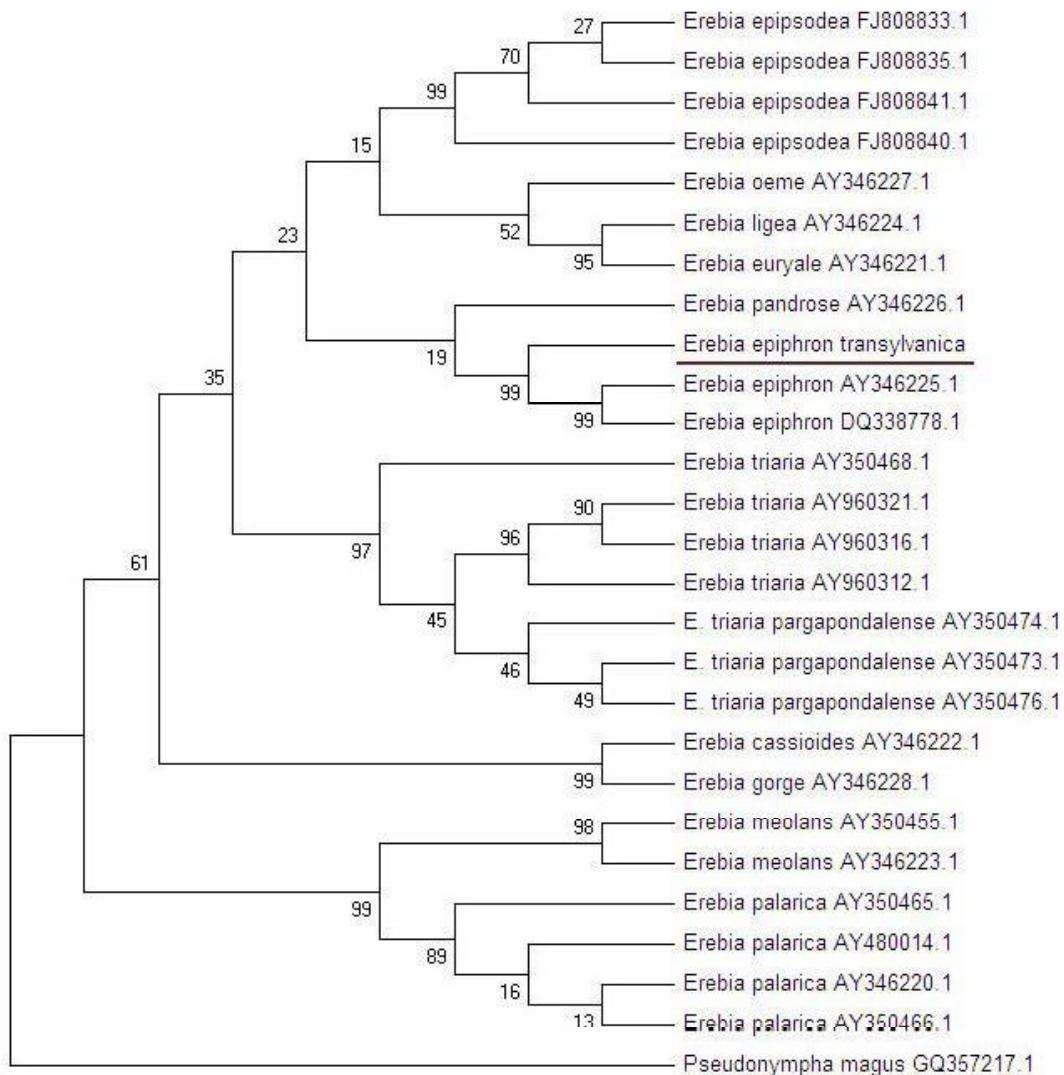
### **Secventarea ADN și construcția arborilor filogenetici**

- arborii relevă gradul de înrudire dintre diferite specii în baza unui marker molecular (în cazul nostru un fragment din COI). Markerii moleculari reprezintă portiuni din genom, în general portiuni foarte mici raportate la genomul complet al organismului, ce sunt alese ca fiind reprezentative pentru portiuni mult mai mari ale ADN-ului sau, sau chiar pentru întregul organism (în funcție de scopul analizei). Prin urmare secventele noastre sunt un substitut al speciilor pe care le reprezintă și poartă numele generic de OTUs-operational taxonomic units. Ipoteza filogenetică susține că 2 secvențe au un stramos comun (mai apropiat sau mai îndepărtat). În construcția arborilor se calculează de fapt stramosii comuni ai diferitelor secvențe ce intră în alcătuirea unui arbore. Stramosii comuni sunt inferați prin calcul și sunt reprezentati de nodurile interne. Cu cat 2 secvențe sunt mai similare, au un stramos comun mai apropiat, sunt mai înrudite, momentul divergenței lor este unul recent, iar în arbore vor fi primele care grupează 2 cîte 2 și converg către primul nod intern (ce reprezintă stramosul lor comun cel mai recent). Ulterior stramosii comuni ai mai multor secvențe vor grupa către un nod și mai intern, ce reprezintă stramosul comun al tuturor secventelor din ramura sa, și astăzi mai departe.

- dacă evaluăm taxonomia prin prisma filogeniei, o importanță mare o are masura în care grupele taxonomice se suprapun peste cele filogenetice, adică în ce masura corespund diferitelor ramuri ale arborelui nostru. Pentru arborele celor 2 genuri luate în studiu *Euphydryas maturna opulenta* respectiv *Erebia epiphron transylvanica*, subspeciile grupează împreună cum era de așteptat (fig. 14, 15).



**Fig. 14.** - Arborele filogenetic al unor specii aparținând genului *Euphydryas*, construit prin metoda parcimoniei maxime în baza unui fragment al citocrom oxidazei I subunitatea 1, relevând relațiile subspeciei *Euphydryas maturna opulenta* (secvență originală) cu alți reprezentanți ai genului. Valorile de pe ramurile interne indică testul bootstrap pentru 1000 de replicate.



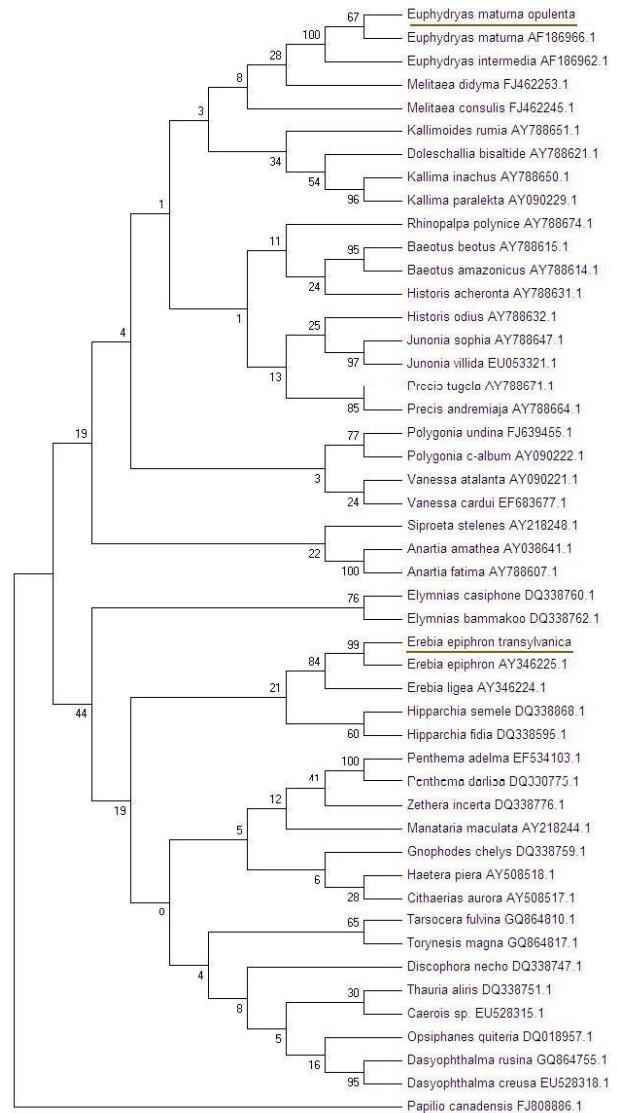
**Fig. 15.** – Arborele filogenetic al unor specii aparținând genului *Erebia*, construit prin metoda parcimoniei maxime în baza unui fragment al citocrom oxidazei I subunitatea 1, relevând relațiile subspeciei *Erebia epiphron transylvanica* (secvență originală) cu alți reprezentanți ai genului. Valorile de pe ramurile interne indică testul bootstrap pentru 1000 de replicate.

Populații ale diferitelor specii diverg din punct de vedere genetic atunci cand există o bariera fizica (populații insulare, arcuri muntoase) sau una aparentă (izolare prin distanță-de ex populații de pe continente diferite) în calea fluxului genetic. Oricare ar fi natura barierelor, rata divergenței genetice între populații este rezultanta echilibrului dintre driftul genetic ce promovează divergența și fluxul genetic ce倾de să omogenizeze variabilitatea genetică.

- pentru arborele subfamiliilor *Nymphalinae* și *Satyrinae*, acesta oglindeste perfect cele 2 subfamilii care sunt impartite in 2 ramuri distincte (fig. 16)

- testul bootstrap trebuie si el luat in analiza. Cu cat coboram in arbore, valorile bootstrap sunt mai mici, algoritmul este mai nesigur de stramosul comun inferat

**Fig. nr. 16 – Arborele subfamiliilor *Nymphalinae* și *Satyrinae*, construit prin metoda parcimoniei maxime în baza unui fragment al citocrom oxidazei subunitatea 1, relevând relațiile subspeciei *Euphydryas maturna opulenta* (secvență originală).**



## Concluzii

1. Utilizând tehnica microscopiei electronice de baleaj am reusit să evidențiem numeroase structuri morfologice care permit caracterizarea și individualizarea exactă a speciilor și subspeciilor de lepidoptere atât la adult cât și la stadiile preimago. Pentru unele dintre structurile evidențiate nu se cunoaște rolul și funcționalitatea acestora.
2. În vederea cunoașterii modului de apariție a culorilor structurale s-au pus în evidență mai multe tipuri de solzi cu nanostructura diferențiată, prin care se generează culorile metalizate. Prin tehnica EDX s-au analizat cantitativ și calitativ nanostructurile evidențiate. Există diferențe calitative între cele două regiuni studiate, respectiv la nivelul crestelor elementele chimice reprezentative sunt C și O și în cantități foarte mici Na, Cu, Zn. La nivelul spațiului delimitat de coastele transversale Na, Cu și Zn sunt mult mai bine reprezentate.
3. Din cele 19 populații și a celor 20 de loci izoenzimatici studiate, s-au diferențiat patru grupuri distincte în care outgrupul utilizat (*E. sudetica*) devine un ingroup pe linia ce unește cele două ramuri de vest (*E. melampus*) și de est (*E. momos*) a complexului *E. sudetica-melampus*. Între cele două se diferențiază distinct *E. radnaensis*.
4. S-a realizat validarea moleculară a subspeciilor *Erebia epiphron transylvanica* (Nymphalidae), *Euphydryas (Hypodryas) maturna opulenta*, (Nymphalidae) și încadrarea lor filetică.
5. S-a realizat plasarea exactă a taxonilor *Erebia epiphron transylvanica* (Nymphalidae), *Euphydryas (Hypodryas) maturna opulenta*, (Nymphalidae) și evidențierea relațiilor filogenetice în cadrul subfamiliilor *Nymphalinae* și *Satyrinae*.

## Bibliografie

- Aagaard K., Hindar K., Pullin A. S., James C. H., Hammarstedt O., Balstad T., Hanssen O., (2001): Phylogenetic relationships in brown argus butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae: Aricia) from north-western Europe. Biol. J. Linn. Soc. Lond. 75, pp. 27-37.
- Ahlen J., (1999): Evaluating the incidence function model of metapopulation dynamics on the butterfly *Euphydryas maturna* in Sweden, Exammensarbete I entomologi – Sveriges lantbruksuniversitet, pp. 1-26.
- Altschul S. F., Madden T. L., Schsaer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D. J., (1997): Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, Nucleic acids research 25(17), pp. 3389-3402
- Arthur V. E, Rosser W. G., Schlager N., Torrado-Caputo V., (2004): Grzimek's Animal Life Encyclopedia, Second Edition, Volume: 3, Insects, Schlager Group Inc., pp. 383.
- Assman T., Buse J., Drees C., Habel J., Hardtle W., Matern A., von Oheimb Goddert, Schuldt A., Wrase D. W., (2007): From Latreille to DNA systematics – towards a modern synthesis for carabidology, Proceedings of the XIII European Carabidologists meeting, pp. 41-76.
- Astrid K. B., Sally C. J., (2002): Ultraviolet reflectance patterns of male guppies enhance their attractiveness to females, The Assoc. for the stud of Anim.Beh., pp. 391-396.
- Aubert J., Barascud B., Descimon H., Michel F., (1996): Systématique moléculaire des Argynnes (Lepidoptera: Nymphalidae). Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie III. Sciences de la Vie 319, pp. 647-651.
- Aubert J., Barascud B., Descimon H., Michel F., (1997): Ecology and genetics of interspecific hybridization in the swallowtails, *Papilio hospiton* Géné and *P. machaon* L., in Corsica (Lepidoptera: Papilionidae). Biological Journal of the Linnean Society 60, pp. 467-492.
- Aubert J., Legal L., Descimon H., Michel F., (1999): Molecular phylogeny of swallowtail butterflies of the tribe Papilionini (Papilionidae, Lepidoptera). Molecular Phylogenetics and Evolution 12, pp. 156-167.
- Balint Zs., Vertesy Z., Kertesz K., Biro L. P., (2004): Scanning Electron Microscopic Investigations in Butterfly wings: detecting scale micro- and nanomorphology and understanding their functions, Current Issues on Multidisciplinary microscopy research and education, Formatex, pp. 87-92.

Beltran M. S., Jiggins C. D., Bull V., McMillan O., Bermingham E., Mallet J., Linares M., (2001): Phylogenetic discordance at the species boundary: comparative gene genealogies in *Heliconius* butterflies. GenBank., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (13.02.2009).

Blum M. J., Bermingham E., Dasmahapatra K., (2001): A molecular phylogeny of the neotropical butterfly genus *Anartia* (Lepidoptera: Nymphalidae). GenBank. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (12.04.2010).

Boggs C. L., Watt W. B., Ehrlich P. R., (2003): Butterfly Molecular Systematics: From Species Definitions to Higher-Level Phylogenies, Evolution Taking Flight, pp. 431-458.

Brookes M. I., Graneau Y. A., King P., Rose O. C., Thomas C. D., Mallet J. L. B., (1997): Genetic analysis of founder bottlenecks in the rare British butterfly *Plebejus argus*. Conservation Biology 11, pp.48-661.

Brower A. V. Z., (1994a): Phylogeny of *Heliconius* butterflies inferred from mitochondrial DNA sequences (Lepidoptera: Nymphalidae). Molecular Phylogenetics and Evolution 3 , pp. 159-174.

Brower A. V. Z., (1994b): Rapid morphological radiation and convergence among races of the butterfly *Heliconius erato* inferred from patterns of mitochondrial DNA evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A. 91, pp. 6491-6495.

Brower A.V.Z., DeSalle R., (1998): Patterns of mitochondrial versus nuclear DNA sequence divergence among nymphalid butterflies: the utility of wingless as a source of characters for phylogenetic inference. Insect Molecular Biology 7, pp. 73-82.

Brower A. V. Z., Egan M. G., (1997): Cladistics of *Heliconius* butterflies and relatives (Nymphalidae: Heliconiiti): the phylogenetic position of *Eueides* based on sequences from mtDNA and a nuclear gene. Proceedings of the Royal Society of London, B 264, pp. 969-977.

Brunton C. F. A., (1998): The evolution of ultraviolet patterns in European *Colias* butterflies (Lepidoptera, Pieridae): a phylogeny using mitochondrial DNA. Heredity 80, pp. 611-616.

Brunton C. F. A., Hurst G. D. D., (1998): Mitochondrial DNA phylogeny of brimstone butterflies (genus *Gonepteryx*) from the Canary Islands and Madeira. Biological Journal of the Linnean Society 63, pp. 69-79.

Caterino M. S., Reed R. D., Kuo M. M., Sperling F. A. H., (2001): A partitioned maximum likelihood analysis of swallowtail butterfly phylogeny (Lepidoptera: Papilionidae). Systematic Biology 50, pp. 106-127.

Caterino M. S., Sperling F. A. H., (1999): Papilio phylogeny based on mitochondrial cytochrome oxidase I and II genes. Molecular Phylogenetics and Evolution 11, pp. 122-137.

Clary D. O., Wolstenholme D. R., (1985): The mitochondrial DNA molecular of *Drosophila yakuba*: nucleotide sequence, gene organization, and genetic code, 22(3), pp. 252-271.

Cupedo F., (1995): Die morphologische Gliederung des *Erebia melampus*-Komplexes, nebst Beschreibung zweier neuer Unterarten: *Erebia melampus semisudetica* ssp. n. und *Erebia sudetica belladonnae* ssp. n. (Lepidoptera, Satyridae), Nota lepid. 18(2), pp. 95-125.

Davis S. R., (2006): Description of a new lepidopteran structure, the abdominal tubercles, Journal of the Lepidopterists Society, 60 (40), pp. 194-202.

Dincă V., Goia M., (2006): Contribuții la cunoșterea faunei lepidopterologice a Munților Rodnei / Contributions to the knowledge of the Lepidoptera fauna of Rodna Mountains. Bul. inf. entom., 16/2005, pp. 125-164.

Dioszeghy L., (1912): Adatok Magyarorszag lepkafaunajahoz. Rov. Lapok, Budapest, 19, pp. 114.

Donald R. D., David L. W., (2005): Biology and systematics of the neotropical leafminer genus *Eucosmophora* (Lepidoptera: Gracillariidae), Tropical Lepidoptera, 13 (1-2), pp. 1-40.

Doniță N., Paucă-Comănescu M., Popescu A., Mihăilescu S., Biriş I. A., (2005): Habitatele din Romania, Editura Tehnică Silvică, București, , pp.29.

Dresp B., Jouventin P., Langley K., (2005): Ultraviolet reflecting photonic microstructures in the King Penguin beak, Biology letters, pp. 310-313.

Efron B., (1982): The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans. CBMS-NSF Regional Conference Series in Applied Mathematics, Monograph 38, SIAM, Philadelphia.

Egerton R. F., (2005): Physical Principles of Electron Microscopy: An Introduction to TEM, SEM, and AEM, Springer, pp. 216.

Fanger H., (2010): Comparative morphological study of pretarsal structures of ditrysian Lepidoptera, with some phylogenetic implications, 120 (1), pp. 15-23.

Faucheu M. J., (1999): Biodiversité et unité des organes sensoriels des insectes lepidoptères, Supp. Hors Serie, Bulletin de la Société des Sciences Naturelles de l'Ouest de la France, pp. 288.

Felsenstein J., (1993): Phylogeny Inference Package (PHYLIP). Version 3.5. University of Washington, Seattle.

Felsenstein J (1985): Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39, pp.783-791.

Freese A., Benes J., Bolz R., Cizek O., Dolek M., Geyer A., Gros P., Konvicka M., Leigh A., Stettmer C., (2006): Habitat use of the endangered butterfly Euphydryas maturna and forestry in central Europe, *Animal conservation*, 9, pp. 388-397.

Goldstein J., Newbury D., E., David C. J., Lyman C., Echlin P., Lifshin E., Sawyer L., (2003): Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis, Third Edition, Springer , pp.689.

Hall T. A., (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT'. *Nucleic acids symposium series* 41, pp. 95-98.

Hebert P. D. N., Beaton M. J., (1993): Methodologies for allozyme analysis using cellulose acetate electrophoresis: a practical handbook. in Helena Laboratories, Beaumont, Texas.

Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball, and J. R. deWaard. (2003): Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B Biological Sciences* 270, pp.313-321.

Hedrick P. W., (2005): Genetics of populations, Third Edition, Jones and Bartlett Publisher, Inc., pp 737.

Helsdingen P. J., (2006): Background information on invertebrates of the habitats directive and the Bern convention, Part I – Crustacea, Coleoptera and Lepidoptera, *Nature and Environment*, no. 79, pp. 113.

Hillis D. M., Craig M., MableB. K., (1996): Molecular Systematics, Second Edition, Sinauer Associates Inc., Publishers Sunderland, pp. 6-13.

Iohara K., Yoshimura M., Tabata H., Shimizu S., (2000): *Chem. Fibers Int.*, 50, pp. 38-39.

Ingolf P. R., Modarressie R., Bakker T.C.M., (2004): Male three-spined sticklebacks reflect in ultraviolet light, *Behaviour* 141, pp. 1531-1541.

Joyce D. A., Pullin A. S., (2000): Phylogeography of the Marsh Fritillary Euphydryas aurinia (Lepidoptera: Nymphalidae) in the U.K. GenBank. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, (14.05.2010).

Jutzeler D., Rakosy L., Bros E., (1997) : Observation et elevage de *Pseudophilotes bavius* (Eversmann, 1832) des environs de Cluj; distribution de cette espece en Roumanie. Une nouvelle plante nourriciere de *Colias alfacariensis* (Ribbe, 1905), Bull. Soc. Ent. Mulhouse, vol. 53, pp. 23-30.

Konig F., (1986): Date morfologice si ecologice referitoare la Philotes bavius hungarica Dioszeghy 1913 (Lepidoptera, Lycaenidae) Lucrarile celei de a IV-a Conferinte Nationale de entomologie, Cluj-Napoca, 29-31 mai, pp. 175-182.

Kristensen N. P., (2003): Handbook of Zoology (Handbuch Der Zoologie/Handbook of Zoology, Volume IV : Arthropoda : Insecta), Lepidoptera, Moths and Butterflies, Volume2: Morphology, Physiology, and Development, Publishers Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, pp. 427.....

Kurachi M., Takaku Y., Komiya Y., Haryama T., (2002): Naturwissenschaften, 89, pp. 295-298.

Lord Rayleigh, (1917): On the reflection of light from a regularly stratified medium, Roy. Soc. Proc., A93,, pp. 565-577.

Lushai, G., Smith, D. A. S., Allen, J. A., Goulson, D. and Maclean, N., (2002): The origin and evolution of Monarch and Queen butterflies, with special references to the African Queen, *Danaus chrysippus* (L.). GenBank. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (12.10.2008).

Lythgoe J. N., Julia S., (1989): The structural basis for iridescent colour changes in dermal corneal iridophores in fish, J. exp. Biol., 141, pp. 313-325.

Makita H., Shinkawa T., Nakazawa T., (1999): GenBank. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. (13.07.2009).

Makita H., Shinkawa T., Ohta K., Kondo A., Nakazawa T., (2000): Phylogeny of Luehdorfia Butterflies Inferred from Mitochondrial ND5 Gene Sequences. Entomological Science 3: 321-329.

Makita H., Shinkawa T., Kondo K., Nakazawa T., (2001): Tribe Graphiini mitochondrial ND5 genes. GenBank. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (12.09.2008).

Martin J., Gilles A. Descimon H., (2000): Molecular phylogeny and evolutionary patterns of the European satyrids (Lepidoptera: Satyridae) as revealed by mitochondrial gene sequences. Mol. Phylogenetic Evol. 15 pp. 70-82.

Martin J. F., Gilles A., Descimon H., (2001): Species concepts and sibling species: the case of *Leptidea sinapis* and *L. reali* (Lepidoptera: Pieridae). In C. Boggs, W. Watt, and P. Ehrlich, eds. Ecology and evolution taking flight: butterflies as model study systems. University of Chicago Press, Chicago.

Mihut S., Dinca V., (2006): Important areas for Lepidoptera in Romania, Preinventory for a draft list of Natura 2000 sites for Lepidoptera species, Final Report.

Monteiro A., Pierce N., (2001): Phylogeny of *Bicyclus* (Lepidoptera: Nymphalidae) inferred from COI, COII, and EF-1a gene sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 18, pp. 264-281.

Morinaka S., Minaka N., Sekiguchi M., Erniwati D., Prijono S. N., Ida G. K., Miyata T., Hidaka T., (2000): Molecular phylogeny of birdwing butterflies of the tribe Troidini (Lepidoptera: Papilionidae). Biogeography 2, pp. 103-111.

Morinaka S., Maeyama T., Maekawa K., Erniwati D., Prijono S. N., Ginarsa I. K., Nakazawa T., Hidaka T., (1999): Molecular phylogeny of birdwing butterflies based on the representatives in most genera of the tribe Troidini (Lepidoptera: Papilionidae). Entomological Science 2, pp. 347-358.

Moss M. O., Gibbs G., (1995): The wing scales of the peacock butterfly, Quekett Journal of Microscopy, 37, pp.392-395.

Moss M. O., Gibbs G., (2000): On the nature of the hairs of the wings of the Trichoptera, Quekett Journal of Microscopy, 38, pp. 511-517.

Moss M. O., Gibbs G., (2001): The wing scales of the swallowtail butterfly, *Papilio palinurus*, Quekett Journal of Microscopy, 39, pp. 133-138.

Myers P., Espinosa R., Parr C. S., Jones T., Hammond G. S., Dewey T. A., 2008, <http://animaldiversity.ummz.umich.edu/site/accounts/classification/butterfly/> (08.02.2010).

Newton I., Opticks, (1952): Reprinted by Dover Publications, Inc., New-York, pp. 252.

Nice C. C., Shapiro A. M., (1999a): Molecular and morphological divergence in the butterfly genus *Lycaeides* (Lepidoptera: Lycaenidae) in North America: evidence of recent speciation. Journal of Evolutionary Biology 12, pp. 936-950.

Nice C. C., and Shapiro A. M., (1999b): Patterns of morphological, biochemical and molecular evolution in the *Oeneis chryxus* complex (Lepidoptera: Satyridae): a test of historical biogeographic hypotheses. GenBank.

Nice C. C., Shapiro, A. M., (2001): Patterns of Morphological, Biochemical, and Molecular Evolution in the *Oeneis chryxus* Complex (Lepidoptera: Satyridae): a test of historical biogeographical hypotheses. Mol. Phylogenetic Evol. 20, pp. 111-123.

Niculescu E.V., Koenig F., (1970) : Lepidoptera, parten generala, Fauna Republicii Socialiste Romania, Insecta: Vol. 11, Fasc. 10, 303 pg.

Noel G. R., Henk C. M., (2004): News on eggs and first instar larvae of the species of Speyeria (Nymphalidae), News of the Lepidopterists Society, Vol. 46, (2), pp. 53-58.

Nylin S., Nyblom K., Ronquist F., Janz N., Belicek J., Kallersjo M., (2001): Phylogeny of *Polygonia*, *Nymphalis* and related butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae): a total-evidence analysis. Zool. J. Linn. Soc. 132, pp. 441-468.

Otakar K., (2002): The Distribution Atlas of European Butterflies, nr.20., Apollo Books.

Page R. D. M., Holmes, E. (1998): Molecular evolution: a phylogenetic approach. Blackwell Science, Oxford.

Pollock D. D., Watt W. B., Rashbrook V. K., Iyengar E. V., (1998): Molecular phylogeny for *Colias* butterflies and their relatives (Lepidoptera: Pieridae). Annals of the Entomological Society of America 91, pp. 524-531.

Prum R. O, Torres R. H., (2003): A fourier tool for the analysis of coherent light scattering by bio-optical nanostructures, Integr. Comp., Biol., 43, pp. 591-602.

Prum R. O, Quinn T., Torres R. H, (2006): Anatomically diverse butterfly scales all produce structural colours by coherent scattering, The J. of Exp. Biol. 209, pp. 748-765.

Rakosy L., (1997): Die endemischen Lepidopteren Rumaniens, Entomologica romanica, Vol. 2., pp. 59 – 81.....

Rakosy L., (2002): Lista rosie pentru fluturii diurni din Romania – Bul. Inf. Soc. Lepid. Rom. 13 (1-4), pp. 9-26.

Rakosy L., Goia M., Kovacs Z., (2003): Catalogul Lepidopterelor Romaniei /Verzeichnis der Schmetterlinge Rumaniens, S.L.R., pp. 5-7.

Rakosy L., Goia M., (2007): Catalogul Lepidopterelor Romaniei /Verzeichnis der Schmetterlinge Rumaniens, S.L.R.

Rakosy L., Goia M., (2006): Addenda und Corrigenda zu dm Verzeichnis der Schmetterlinge Rumäniens / Addenda et corrigenda la Catalogul Lepidopterelor României, Entomol.rom.,11, pp. 69-79.

Rakosy L., Peesenye K., Mihali C., Toth A., Varga Z., (2010): Taxonomic review of *Euphydryas* (*Hypodryas*) *matura* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera, Nymphalidae) with description of a new subspecies from Dobrogea (Romania) and notes on conservation biology, Acta Zoologica Academiae Scientiarum Hungaricae 56 (2), 25-29 pp.

Rakosy L., (2005): U.E. si legislatia pentru protectia lepidopterelor din Romania, Bul. Inf. Entomol., 16, pp.89-96.

Rand D. B., Heath A., Suderman T., Pierce, N. E., (2000): Phylogeny and Life History Evolution of the Genus Chrysoritis within the Aphnaeini (Lepidoptera: Lycaenidae), Inferred from mitochondrial cytochrome oxidase I sequences. Mol. Phylogenetic Evol. 17, pp. 85-96.

Razmerita I., (1971): Rezervatia botanica de la Suatu, Ocrot. Nat., Bucuresti , 5 (2), pp. 129-138.

Rennwald E., Pro Natura, (1997): Schmetterlinge und ihre Lebensräume. Arten Gefährdung-Schutz Bd.2. Lepidopterologen-Arbeitsgruppe, Schweizerischer Bund für Naturschutz, Egg.

Richardson B. J., Baverstock P. R., Adams M., (1986): Allozyme electro- phoresis. A handbook for animal systematics and population studies, Academic Press, San Diego, pp.410.

Saitou N, Nei M., (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees, Mol Biol Evol. Jul;4(4), pp.406-25.

SBN, (1987): Tagfalter und ihre Lebensraume, Arten – Gefährdung-Schutz. – Basel, XI, p. 515.

Schmitt T., Habel, J. C., Zimmermann, M., Müller, P., (2006): Genetic differentiation of the Marbled White butterfly, *Melanargia galathea*, accounts for glacial distribution patterns and postglacial range expansion in southeastern Europe. — *Molecular Ecology* 15, pp.1889-1901.

Schmitt T., Rákosi L., Abadjiev S., Müller P., (2007): Multiple differentiation centres of a non-Mediterranean butterfly species in south-eastern Europe. — *Journal of Biogeography* 34: pp. 939-950.

Schneider S., Excoffier L., Laval, Arlequin G., (2000):Arlequin, (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis, Computational and Molecular Population Genetics Lab, Zoological Institute, University of Berne, Baltzerstrasse 6, 3012 Berne, Switzerland.

Scott J. A., (1986): The Butterflies of north America, A natural history and field guide, Stanford University Press, pp. 15.

Shuichi K., Shinya Y., (2005): Structural colors in nature: the role of regularity and irregularity in the structure, ChemPhysChem, 6, pp. 1442-1459.

Siegismund H. R., (1993): G-STAT, Version 3, Genetical Statistical Programs for the Analysis of Population Data. The Arboretum, Royal Veterinary and Agricultural University, Horsholm, Denmark.

Simon C., Frati F., Beckenbach A., Crespi B., Liu H., Flook P., (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.

Sutherland R. M., Axton J. M., (2000): PCR-RFLP and sequence identification of insect species in bird diet. GenBank., <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> (05.07.2009).

Tada H., Seth E., Mann I., Miaoulis N., Peter Y. W., (1999): Effects of a butterfly scale microstructure on the iridescent color observed at different angles, Applied Optics, Vol.5, No.4, pp. 1579-1584.

Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S., (2007): MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0, Molecular biology and evolution 24(8), pp.1596-1599.

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, pp. 1259-1272.

Tolman T., Lewington R., (1997) : Guide des papillons d'Europe et d'Afrique du nord, Delachaux et Niestle, Paris, 320 pp.

Trevor B., Graham R., (2003): Molecular Ecology, Oxford University Press, pp.123-142.

van Swaay Chris, Cuttelod A., Collins S., Maes D., Munguira M. L., Šašić M., Settele J., Verovnik R., Verstraet T., Warren M., Wiemers M., Wynhoff I., (1999): European Red List of Butterflies, Published by IUCN, pp. 191-192.

Vane-Wright R. I., Raheem D. C., Cieslak A., Vogler A. P., (1999): Evolution of the mimetic African swallowtail butterfly Papilio dardanus: molecular data confirm relationships with *P. phorcas* and *P. constantinus*. Biological Journal of the Linnean Society 66, pp. 215-229.

Vertesy Z., Balint Zs., Kertesz K., Mark I. G., Vigneron J. P., Lousse V., Biro L. P., (2003): Nanostructures in Butterfly scales: Photonic crystals generating blue colors.

Vukusic P., Sambles J. R., (2003): Photonic structures in biology, Nature, Vol.424, pp. 852-855.

Vukusic P., Sambles J. R., Lawrence C. R., Wootton R. J., (2002): Limited-view iridescence in the butterfly *Ancyluris meliboeus*, Proc. R. Soc. Lond. B, 269, pp. 7-14.

Wagner D. L., Hossler W. E., Hossler F. E., (2003): The larva and pupa of *Lytrosis permagnaria* pack. (Geometridae), Journal of the lepidopterists society, 57(2), pp. 107-112.

Wahlberg N., (2001): On the status of the scarce fritillary *Euphydryas maturna* (Lepidoptera: Nymphalidae) in Finland, Entomol. Fennica, pp. 244-250.

Wahlberg N., Zimmermann M., (2000): Pattern of phylogenetic relationships among members of the tribe Melitaeini (Lepidoptera: Nymphalidae) inferred from mtDNA sequences. Cladistics 16, pp. 347-363.

Walter B., (1895): Die Oberflachen-oder Schillerfarben, Braunschweig.

Warren B., Somerville C., (1936): Monograph of the genus *Erebia*. British Museum of Natural History, London.

Watanabe K., Hoshino T., Kanda K., Haruyama Y., Matsui J., (2005): Jpn. J. Appl. Phys. 44, pp.L48-L50.

Weidlich M., (2005): Ein neuer Sackträger aus den Muntii Apuseni in Siebenburgen (Rumanien) und ein Beitrag zur Schmetterlingsfauna des Natur-schutzgebietes "Thorenburger Schlucht" (Lepidoptera: Psychidae), Entomologische Zeitschrift, 115(6), pp. 261-266.

Weller S. J., Pashley D. P., Martin J. A., Constable J. L., (1994): Phylogeny of noctuid moths and the utility of combining independent nuclear and mitochondrial genes. Systematic Biology 43, pp. 194-211.

Weller S. J., Pashley D. P., (1995): In search of butterfly origins. Molecular Phylogenetics and Evolution 4, pp. 235-246.

Weller S. J., Pashley D. P., Martin J. A., (1996): Reassessment of butterfly family relationships using independent genes and morphology. Annals of the Entomological Society of America 89, pp. 184-192.

Wickham S., Large M. C. J., Poladian L., Jermiin L. S., (2006): Exaggeration and suppression of iridescence: the evolution of two-dimensional butterfly structural colour, J. R. Soc., 3, pp. 99-109.

Wink M., von Nickisch-Rosenegk E., (1997): Sequence data of mitochondrial 16s rDNA of Arctiidae and Nymphalidae: evidence for a convergent evolution of pyrrolizidine alkaloid and cardiac glycoside sequestration. Journal of Chemical Ecology 23, 1549-1568

Wink M., Legal L., von Nickisch-Rosenegk E., (1998): Response by Micheal Wink, Eva von Nickisch-Rosenegk, and Luc Legal. Journal of Chemical Ecology 24, 1285-1291.

Yagi T., Katoh T., Chichvarkhin A., Shinkawa T., Omoto K., (2001): Molecular phylogeny of butterflies *Parnassius glacialis* and *P. stubbendorfii*. Genes and Genetic systems 76, pp. 229-234.

Yagi T., Sasaki G., Takebe H., (1999): Phylogeny of Japanese papilionid butterflies inferred from nucleotide sequences of mitochondrial ND5 gene. Journal of Molecular Evolution 48, pp. 42-48.

Yack J. E., Timbers T. A., Conner W. E., Annette Aiello, Frank C. Schroeder, (2004): Journal of the Lepidopterists Society, 58(3), pp.173-177.

Zhang, D. X., Hewitt G. M., (1997a):Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial COI primers in insects'. Insect molecular biology 6(2), pp. 143-150.

Zhang, D.-X. and G. M. Hewitt: (1997b): Insect mitochondrial control region: a review of its structure, evolution and usefulness in evolutionary studies, Biochemical systematics and ecology 25(2), pp.99-120.

Zi J., Xindi Y., Li Y., Xinhua H., Chun X., Xingjun W., Xiaohan L., Rongtang F., (2003): Coloration strategies in peacock feathers, PNAS, vol.100, no.22, pp. 12576-12578.

Zimmermann M., Aubert J., Descimon H., (1999) : Systématique moléculaire des Mélitées (Lepidoptera: Nymphalidae). Comptes Rendus de l'Academie des Sciences Serie III. Sciences de la Vie 322, pp. 429-439.

Zimmermann M., Wahlberg N., Descimon H., (2000) : Phylogeny of Euphydryas Checkerspot Butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae) Based on Mitochondrial DNA sequence data. Ann. Entomol. Soc. Am. 93, pp. 347-355.

Zuckerkandle, L., Pauling, L. (1965): Molecules as documents of evolutionary history. Journal of Theoretical Biology, 8, pp.357-366.

- <http://taxonomicon.taxonomy.nl> (18.03.2010).