

## DNA-Barcoding der Schmetterlinge (Lepidoptera) Vorarlbergs (Österreich) - Erkenntnisse und Rückschlüsse

Nr. 15 - 2015

Peter Huemer<sup>1</sup> & Paul D. N. Hebert<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dr. Peter Huemer, Naturwissenschaftliche Sammlungen,  
Tiroler Landesmuseen Betriebsges.m.b.H., Feldstr. 11a, A-6020 Innsbruck.

E-Mail: p.huemer@tiroler-landesmuseen.at

<sup>2</sup> Prof. Dr. Paul D. N. Hebert, Biodiversity Institute of Ontario,  
University of Guelph, Guelph, ON, N1G 2W1, Canada.

### Zusammenfassung

Die vorliegende Studie präsentiert eine Barcode-Bibliothek von 1489 Schmetterlingsarten aus Vorarlberg (Österreich), basierend auf 1896 barcodekonformen genetischen Signalsequenzen des mitochondrialen COI Gens (Barcodefragment 5', 658 Basenpaare). Die Arten unterscheiden sich vom jeweils nächsten Nachbarn innerhalb der Stichprobe um durchschnittlich 6,75%. Eine erfolgreiche, genetisch und morphologisch übereinstimmende Identifikation konnte über Vergleich mit bereits existenten Barcodes in der BOLD Datenbank und unter der über diese Datenbank ermittelten Barcode Index Nummern (BIN) für 98,7% des sequenzierten Artenbestandes (1477 spp.) ermittelt werden. Wenige Fälle von identen oder überlappenden Barcodes beziehen sich auf phylogenetisch sehr nahestehende oder auf taxonomisch kritische Artenkomplexe. Umgekehrt deuten einzelne, beispielhaft diskutierte tiefe intraspezifische Splits im Barcode auf mögliche kryptische Diversität, Introgression oder phylogeographische Muster. Schließlich wird der Beitrag von DNA-Barcoding zur Faunistik anhand von 36 Landesneufunden, darunter *Ectoedemia heckfordi* und *Metalampra italica* als Erstnachweise für Österreich, dokumentiert.

### Abstract

This study presents a DNA barcode library for 1489 Lepidoptera species from Vorarlberg (Austria) based on 1896 barcode compliant sequences from the mitochondrial COI gene. Species show an average of 6.75% divergence from their Nearest Neighbor. There was concordance between identifications based on morphology and those based on DNA barcodes and barcode index numbers (BIN) in the BOLD database for 1477 (98.7%) of the species. The few cases of barcode sharing or overlap involved very closely related or taxonomically uncertain species complexes. Conversely, cases of deep intraspecific barcode divergence may reflect cryptic diversity, introgression or phylogeographic variants. Finally, the value of DNA barcoding for faunistic studies was made

clear by the recognition of 36 new species for Vorarlberg, a total that included two new records for Austria (*Ectoedemia heckfordi*, *Metalampra italica*).

### 1 Einleitung - Zielsetzung

In Zeiten eines durch Geschwindigkeit und Ausmaß bisher ungeahnten, überwiegend anthropogen verursachten globalen Artensterbens ist die Erfassung der minimal geschätzten 8 Millionen Tierarten eine der vordringlichsten Aufgaben der taxonomisch tätigen Forschergemeinschaft. Angesichts von bisher über einen Zeitraum von gut 250 Jahren lediglich etwa 1,7 Millionen beschriebenen Arten eine Herkulesaufgabe, vor allem in den besonders artenreichen tropischen Regionen. Aber auch in relativ gut untersuchten Ländern Mitteleuropas

sind viele Tiergruppen, darunter die artenreichsten Insektenordnungen wie Zweiflügler (Diptera) und Hautflügler (Hymenoptera) nur rudimentär erfasst worden. Es fehlt vor allem an Expertenwissen, um diese Vielfalt überhaupt bestimmen zu können. Die eindeutige Determination von Arten ist aber eine Grundvoraussetzung für alle mit Naturthemen Befassten und zählt zu den Kernaufgaben naturrelevanter Fragestellungen, eine Aufgabe die durch den bedrohlichen Mangel an Spezialisten zunehmend in Frage gestellt wird. Selbst routinemäßige Bestimmungsarbeiten sind vielfach nur von wenigen Experten durchführbar, deren Kapazitäten somit oft ineffizient eingesetzt werden müssen und in anderen wichtigen Forschungsbereichen fehlen. Initiativen für eine standardisierte Erfassung von Lebewesen sind daher eine wesentliche Möglichkeit,

zukünftige Bestimmungen vereinfacht und mit hohem Zuverlässigkeitsgrad durchführen zu können. In den letzten Jahren haben sich genetische Methoden als eine bedeutende Alternative bzw. Ergänzung zur klassischen morphologischen Determinationsarbeit herauskristallisiert. In umfangreichen Voruntersuchungen erwiesen sich insbesondere kurze genetische Sequenzen einer standardisierten Region des mitochondrialen COI-Genes (Cytochrom C-Oxidase), dem sogenannten DANN Barcode, als hervorragend geeignet für die Unterscheidung der bekannten Tierarten (HEBERT et al. 2003a, 2003b, 2009). Die Abfolge der Basenpaare wird dabei ähnlich wie bei einem Strichcode auf Produktverpackungen als Kennzeichen für eine Art verwendet (STEINKE & BREDE 2006) und weist typischerweise gegenüber allen anderen Arten Unterschiede auf. Die intraspezifische (innerartliche) Variationsbreite des Barcodes sollte somit deutlich geringer sein als die interspezifische (zwischenartliche) Distanz, die Barcode-Lücke (barcode gap). Diese Grundvoraussetzung für erfolgreiches Barcoding gilt für eine erheblichen Teil der eukaryotischen Organismen. Über die somit meistens arttypischen genetischen Signalsequenzen können Arten einfacher bestimmt werden und das reproduzierbar, zuverlässig, kostengünstig und weitgehend unabhängig von Taxonomen. Grundvoraussetzung ist jedoch der Aufbau einer genetischen Bibliothek verlässlich bestimmter Proben möglichst vieler Arten als Referenz für zukünftige Bestimmungen. Regionale, nationale und internationale Bestrebungen zur Erreichung dieses Ziels werden insbesondere im Rahmen der Forschungsinitiative iBOL (International Barcode of Life), initiiert und organisiert von der Universität Guelph in Kanada, gebündelt. Hier stehen inzwischen über die öffentliche Datenbank BOLD (Barcode of Life Data Systems) (RATNASHINGHAM & HEBERT 2007) mehr als 3,6 Mio. Barcodes von ca. 450.000 Arten der Forschungsgemein-

schaft zur Verfügung. Die Vorteile des DNA-Barcodings liegen auf der Hand und sind weitreichend. So kann z. B. der Land- oder Forstwirt künftig rasch eine schädliche Larve bestimmen lassen, der Lebensmitteltechniker die Zusammensetzung von fragwürdigen Fleisch- oder Fischprodukten analysieren oder der Naturschützer das Vorkommen einer geschützten, aber schwer erkennbaren Art belegen, und das *a priori* ohne über das sonst nötige Expertenwissen zu verfügen. Aber auch die Artenexperten selber profitieren. So wird beispielsweise die korrekte Zuordnung von unterschiedlichen Entwicklungsstadien und Geschlechtern zu einer bestimmten Art ebenso ermöglicht wie das Aufspüren bisher unbekannter kryptischer Arten. Gerade für Artnaubeschreibungen sind genetische Sequenzen daher ein zunehmend wichtiger Standard. Darüber hinaus dienen sie aber auch der unabhängigen Qualitätssicherung bei faunistischen Studien sowie der Kontrolle möglicher klimatisch oder anthropogen bedingter Veränderungen des Artenbestandes wie z.B. der Einführung oder Invasion von Neobiota. Das hier beschriebene Forschungsprojekt ist als ein Teil der globalen Bestrebungen zur Erstellung einer umfassenden genetischen Datenbank zu sehen. Hauptzielsetzung war und ist daher die Ermittlung von DNA-Barcodes eines möglichst großen Artenbestandes von Schmetterlingen Vorarlbergs als zukünftige Datengrundlage zur eindeutigen Artwiedererkennung sowie zur Bewertung der genetischen Vielfalt der Landesfauna im internationalen Kontext.

## 2 Material und Methodik

### 2.1 Probenauswahl und Behandlung

Die genetischen Untersuchungen basieren überwiegend auf im Rahmen des Forschungsprojektes aufgesammelten rezenten Proben von Schmetterlingen. Bereits existierendes älteres Sammlungsmaterial der

inatura sowie weiterer öffentlicher und privater Sammlungen wurde hingegen auf Grund des Risikos degraderter DNA, insbesondere durch Feuchtigkeitseinwirkung (Aufweichen zu Präparationszwecken u.ä.) verursacht, nur für eine limitierte Zahl von eher selten nachgewiesenen Arten verwendet. Ziel der Felderhebungen war die Aufsammlung zumindest eines sequenziertauglichen Belegexemplares im Hinblick auf eine möglichst umfassende Abdeckung des Artenspektrums. Zu diesem Zweck wurden punktuell über das gesamte Land verstreute repräsentative Lebensraumtypen beprobt. Die Proben verteilen sich auf 217 verschiedene Fundorte. Ein besonderer Schwerpunkt der Erhebungen lag auf Grund der hohen Artenzahlen primär auf der Erfassung nachtaktiver Arten mittels Kunstlichteinrichtungen, während tagaktive Taxa insbesondere mit Kescher aufgesammelt wurden. Um den Erfordernissen späterer molekularer Untersuchungen gerecht zu werden, wurden die Proben umgehend genadelt und getrocknet und nur in Ausnahmefällen auch klassisch präpariert. Die Artbestimmungen erfolgten zuerst provisorisch während der Felderhebungen bzw. im Labor. Um eine möglichst zeitsparende Bearbeitung zu gewährleisten, basierten diese Determinationen ausschließlich auf phänotypischen Kriterien. Kritische Taxa wurden daher vielfach nur auf Gattungsniveau vorbestimmt und erst nach genetischer Zuordnung mittels bereits vorhandener europäischer Barcode-Bibliotheken auch morphologisch auf Artniveau determiniert und in zweifelhaften Fällen auch genitalmorphologisch geprüft. Für alle Taxa liegen somit morphologische und genetische Determinationsgrundlagen vor.

Weitere Arbeitsschritte umfassten die Georeferenzierung und damit einhergehend die Etikettierung und Digitalisierung der Proben im Programm Biooffice. Insgesamt wurden 2086 Proben von 1559 Arten nach

diesen Vorgaben für die DNA-Analysen vorbereitet.

Schließlich wurden Gewebeproben (Bein- oder Teil eines Beines) von jeweils 95 Individuen auf Standardprobeplatten verteilt und für die weiteren genetischen Arbeitsschritte an das Canadian Center for DNA Barcoding (CCDB) der Universität Guelph (Ontario, Kanada) versendet.

Das den Untersuchungen zugrundliegende Belegmaterial befindet sich überwiegend in den Sammlungen der inatura in Dornbirn sowie der Naturwissenschaftlichen Sammlungen des Tiroler Landesmuseums Ferdinandeum in Innsbruck, einige relevante Belege in der Privatsammlung von Toni Mayr, Feldkirch. Genetische Proben werden hingegen als Dauerleihgabe an der Universität Guelph aufbewahrt.

## 2.2 DNA-Sequenzierungen

Die DNA Isolation, PCR Amplifikation sowie die anschließende DNA-Sequenzierung erfolgte am CCDB nach den bei IVANOVA et al. (2006) und DEWAARD et al. (2008) beschriebenen Standardprotokollen. Mit Hilfe dieser Methoden wurde eine 658 Basenpaare umfassende Region der mitochondrialen Cytochrom C Oxidase I (COI, Barcodefragment 5', 658bp) einschließlich der 648 Basenpaare des Barcodes isoliert und vervielfältigt. Insgesamt wurden 1964 Individuen und 1497 Arten erfolgreich sequenziert, von 1489 Schmetterlingsarten liegen 1896 barcodekonforme Sequenzen vor.

## 2.3 Datenverwaltung und Analyse

Sämtliche objektspezifischen Daten sowie Barcode-Sequenzen werden im Rahmen der speziell für diese Zwecke entwickelten und außerordentlich leistungsfähigen, webbasierten Datenbank BOLD (<http://www.boldsystems.org/>) verwaltet. Hier findet sich der gesamte Datenbestand aus dem gegenständlichen Forschungsprojekt, wobei objektspe-

zifische Daten inkl. geographischer Parameter, Sammlungsdaten, Aufbewahrungsort und Belegfoto in einer eigenen «specimen page» verwaltet werden (Abb. 1), die damit verbundenen genetischen Informationen in einer «sequence page» (Abb. 2). Alle diese Daten samt sample ID, process ID und GenBank Accession sind über das Datenset dx.doi.org/10.5883/DS-LEAVBG öffentlich zugänglich. Durch die nach einer Sperrfrist zwingend vorgesehene Veröffentlichung aller in BOLD verwalteten DNA-Barcodes ist der Datenbestand im internationalen Kontext einzuordnen und mit Ergebnissen aus anderen Regionen vergleichbar. Eine Kopie der objektbezogenen Daten, allerdings ohne genetische Informationen, befindet sich überdies in der Biooffice Datenbank des Tiroler Landesmuseums sowie der inatura.

BOLD bietet aber auch umfangreiche Tools zur Datenanalyse und die Auswertungen in dieser Arbeit basieren primär auf diesen Möglichkeiten wie die Berechnung paarweiser genetischer Distanzen mit Hilfe des Kimura 2 Parameter Modells (K2P) (Abb. 5, im Anhang). Weiteres bietet BOLD v.3.0. über die Barcode Index Nummer (BIN) eine Möglichkeit, jede Sequenz einem Barcode Cluster zuzuordnen, der über die Anwendung bestimmter Algorithmen einander ähnliche und optimalerweise Artkriterien entsprechende Barcodes, initial im Ausmaß von etwa 2,2% Divergenz jedoch mittels weiterer Cluster-Modelle verfeinert, umfasst (RATNASHAM & HEBERT 2013). Somit konnten die ermittelten Barcodes sämtlichen ähnlichen Barcodes in BOLD zugeordnet werden, unabhängig von der geographischen Herkunft.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Sequenzierungen - Überblick

Insgesamt wurden von 2086 Individuen Gewebeproben sequenziert. Von 1964 (94,2%) Individuen

konnte eine Sequenz des für Barcoding relevanten Abschnittes des mtDNA COI-Gens ermittelt werden, die für 1772 Individuen (84,9%) einen vollständigen Barcode von 658 Basenpaaren umfasste, hingegen bei lediglich 38 Exemplaren weniger als 600 Basenpaare. Insgesamt wurden 1896 Proben als barcodekonform bewertet. Ähnlich erfolgreich war die Sequenzierung des untersuchten Artenbestandes mit Gensequenzen für 1497 Arten, bzw. 96% der insgesamt geprobteten 1559 Arten. Für 1478 Arten wurden Sequenzen einer Länge von >600 Basenpaare ermittelt. Die durchschnittlichen Distanzen zum Nächsten Nachbarn betragen 6,75% (Min 0%, Max 16,15%), die durchschnittlichen Divergenzen zwischen allen Arten der Stichprobe hingegen 8,99%. Die Barcode-Divergenzen sämtlicher sequenzierte Arten werden im Anhang in einem Neighbour Joining tree graphisch dargestellt (Abb. 5).

Der erfolgreich sequenzierte Artenbestand von 1497 Arten verteilt sich auf 680 Gattungen und 64 verschiedene Familien. Das Ausmaß an sequenzierten höheren Taxa ist somit außerordentlich groß und übertrifft alle bisher aus Europa veröffentlichten Barcoding-Studien über Schmetterlinge. Besonders artenreich sind die Eulenfalterartigen (Noctuidae und Erebidae) (256 spp. und 55 spp.) und Spanner (Geometridae) (247 spp.), gefolgt von den Wicklern (Tortricidae) (212 spp.), Palpenfaltern (Gelechiidae) (83 spp.), Graszünslern (Crambidae) (82 spp.) und Edelfaltern (Nymphalidae) (62 spp.).

Die Anhangstabellen 1 und 2 geben einen Überblick über die erfolgreich sequenzierten Arten samt sämtlicher IDs sowie Distanzen zum jeweils nächsten Nachbarn. Weitere Detailinformationen sind über das Datenset «DS-LEAVBG Lepidoptera of the Alps – Vorarlberg» in BOLD frei zugänglich.

Von 64 Arten in 122 Individuen konnten keine Sequenzen ermittelt werden. Die Ursachen für diese Probleme

**BOLD SYSTEMS**

Specimen - Lepidoptera of the Alps - Vorarlberg 2 [PHLAW] Print

[Edit Specimen](#)

**IDENTIFIERS**

Sample ID:	TLMF Lep 09499
Process ID:	LEATA082-13
Institution Storing:	Tiroler Landesmuseum Ferdinandeum
Field ID:	1691948
Museum ID:	TLMF
Collection Code:	

**TAXONOMY**

Identification:	Achlya flavicornis (Linnaeus, 1758, 1758)
Rank:	Species
Identifier:	Peter Huemer
Identification Method:	
Identifier Institution:	
Identifier Email:	p.huemer@tiroler-landesmuseen.at
Taxonomy Note:	
Rank	Current Record (TLMF Lep 09499)
Phylum:	<a href="#">Arthropoda</a>
Class:	<a href="#">Insecta</a>
Order:	<a href="#">Lepidoptera</a>
Family:	<a href="#">Drepanidae</a>
Subfamily:	<a href="#">Thyatirinae</a>
Genus:	<a href="#">Achlya</a>
Species:	<a href="#">Achlya flavicornis</a>

**SPECIMEN DETAILS**

Voucher Status:	
Tissue Descriptor:	
Sex:	
Reproduction:	Sexual
Life Stage:	Adult
Extra Info:	
Note:	
Associated Taxa:	
Associated Specimens:	
Reference Link:	

**ANNOTATION**

[Add Tags & Comments](#) Comments: 0 Associated Tags: No Tags

?  
feedback

**PHOTOGRAPHS**

**DORSAL**

**GEOGRAPHY**

Country: Austria  
Province/State: Vorarlberg  
Region/County:  
Sector:  
Exact Site: Plattenhof/ Schnifis  
Lat/Lon: 47.218, 9.74

**COLLECTION DETAILS**

Collectors:	Huemer P.
Collection Event ID:	
Date Collected:	14-Mar-2011
Date Accuracy:	
Time Collected:	
Site Code:	
Habitat:	
Sampling Protocol:	
Coord. Source:	
Coord. Accuracy:	
Elevation:	820 m
Elevation Accuracy:	
Depth:	
Depth Accuracy:	
Collection Notes:	

**PHOTOGRAPHS**

**LICENSE**

License: Creative Commons Attribution NonCommercial ShareAlike (2013)  
Holder: Peter Huemer, Tiroler Landesmuseum Ferdinandeum

[Add Tags & Comments](#) Comments: 0 Associated Tags: No Tags

Copyright © 2014 BOLD Systems. All rights reserved.

Abb. 1: Objektspezifische Daten in BOLD

inatura – Forschung online 15 (2015)

4

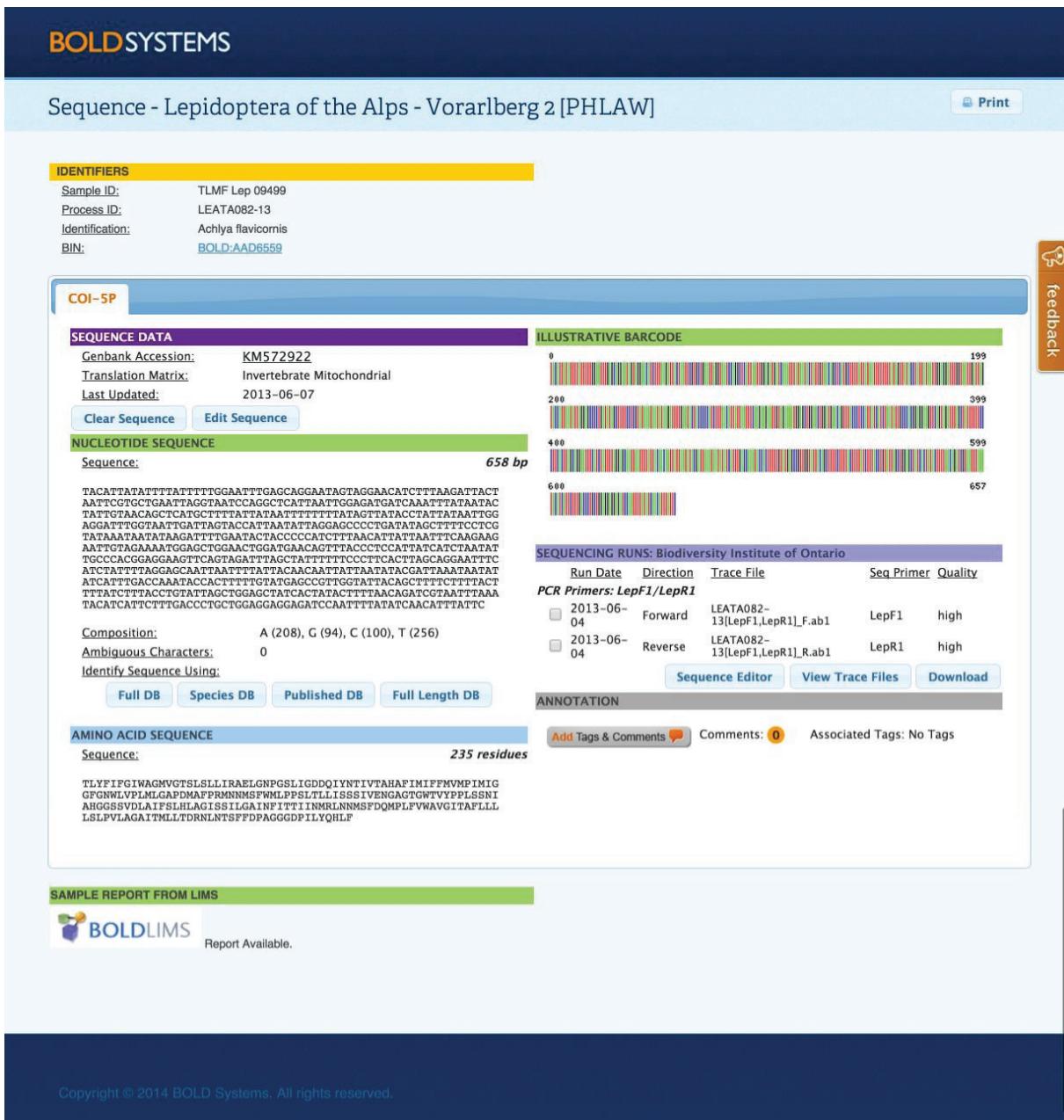


Abb. 2: «Sequence page» in BOLD mit Informationen zu den ermittelten Sequenzen

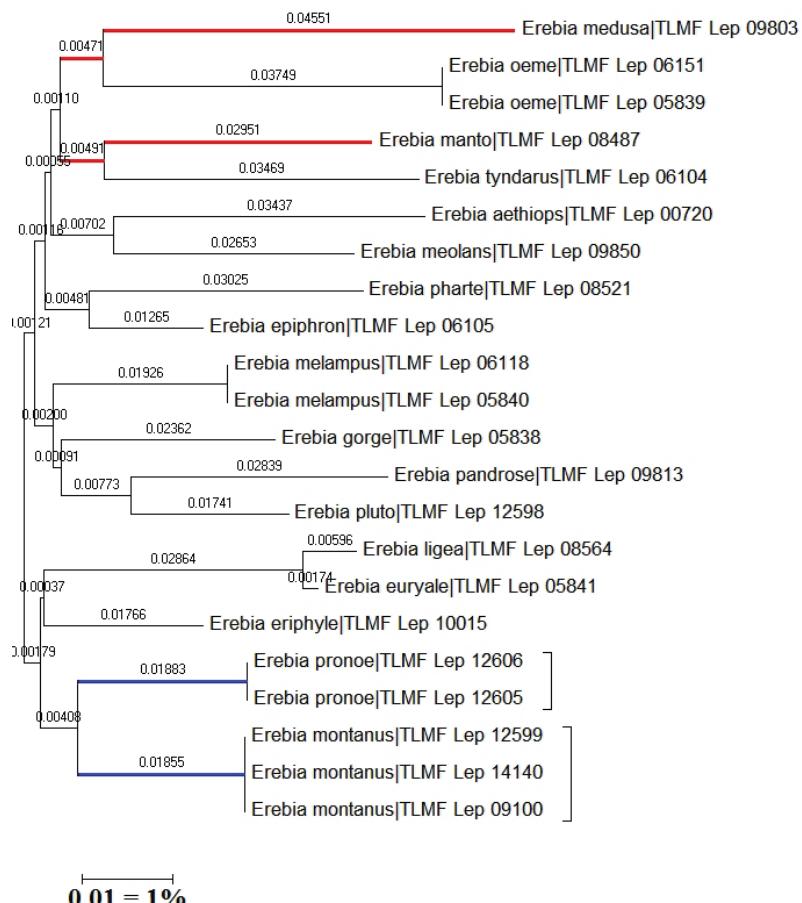
sind unbekannt, dürften aber zu einem erheblichen Teil durch DNA-Degradierung bedingt sein.

### 3.2 Artenbestand mit arttypischen Barcodes

Der weitaus überwiegende Anteil der Arten besitzt arttypische Barcodes, die gegenüber allen anderen Arten signifikante Distanzen aufweisen. Das Ausmaß intraspezifischer Variabilität versus interspezifischer Divergenzen variiert dabei von Art zu Art, kann je-

doch als Anhaltspunkt gelten, dass die Barcodelücke zwischen zwei nächststehenden Arten etwa um den Faktor 10 größer sein sollte als die innerartliche Variabilität. Alternativ wird für viele Gruppen ein Schwellenwert von ca. 2% als kritische Grenze angenommen (HEBERT et al. 2003a, 2003b). Dieser Wert gilt ebenfalls nur als grobe Orientierungshilfe zur Artunterscheidung mittels Barcodes, und Abweichungen in der artspezifischen Sequenzdivergenz nach

unten oder oben sind nicht selten. Für den gesamten sequenzierten Artenbestand von 1497 spp. in unserer Studie ergeben sich interspezifische Divergenzen von durchschnittlich 6,75% zum nächsten Nachbarn (Anhangstabelle 2). Lediglich 72 Arten weisen eine interspezifische Divergenz von < 2%, 29 Artenpaare < 1,5% auf (Tabelle 1). Bedingt durch die unzureichend bekannte innerartliche Variabilität der Barcodes sowie durch noch nicht sequenzierte Arten



**Abb. 3:** Neighbour Joining tree in der Gattung *Erebia* basierend auf Sequenzen des mtDNA COI-Gens (Barcodefragment 5', 658bp) (Kimura 2 Parameter, produziert mit MEGA 5; cf. TAMURA et al. 2011).

Divergenzen im Barcode werden hier über einen Ähnlichkeitsbaum basierend auf dem Kimura-2-Parameter (K2P) dargestellt. Beispiele: a) Distanz *Erebia medusa* (ID TLMF Lep 09803) zu *Erebia manto* (ID TLMF Lep 08487) = rote Balken; b) Distanz *Erebia pronoe* (IDs TLMF Lep 12605 + 12606) zu *Erebia montanus* (IDs TLMF Lep 12599, 14140, 09100) = blaue Balken, die intraspezifische Divergenz ist hier hingegen innerhalb beider Arten null.

ten Artenbestandes) wobei 7 Arten bisher in BOLD nicht präsente BINs aufweisen. Lediglich 65 Arten teilen sich die BIN, meistens paarweise, ausnahmsweise auch mehrere Arten. Von den über BIN nicht unterscheidbaren Taxa sind aber 45 Arten zumindest im regional-mitteleuropäischen Bereich zwar geringfügig, aber ohne Überschneidungen im Barcode differenziert. Unter Berücksichtigung dieser verfeinerten Abstufungen können 1477 Arten bzw. 98,7% des sequenzierten Artenbestandes mittels DNA-Barcode unterschieden werden.

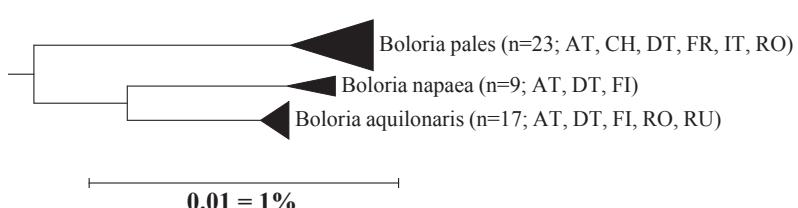
### 3.3 Artenkomplexe mit geringen interspezifischen Distanzen

Keine oder geringe interspezifische Barcode-Distanzen und damit einhergehend das Risiko von Barcode-Überschneidungen sind beim untersuchten Artenbestand selten. Lediglich 72 Arten weisen eine interspezifische Divergenz von < 2%, 29 Artenpaare < 1,5% auf (Tabelle 1). Unter Berücksichtigung weiterer, die intraspezifische Variationsbreite dokumentierender Barcode-Sequenzen in BOLD können allerdings nur für wenige dieser Artenpaare Überschneidungen bzw. völlig identische Barcodes konstatiert werden, während die Mehrzahl der Taxa trotz geringerer Divergenzen konstant differenziert ist (Abb. 4). Als im Barcode nicht oder nicht sicher

und sich daraus ergebende mögliche Barcodeüberschneidungen lassen sich die Ergebnisse jedoch nicht eins zu eins zur Differenzierung der Arten heranziehen. So zeigen beispielsweise die insgesamt 17 sequenzierten Arten der Gattung *Erebia* (Mohrenfalter) durchschnittliche interspezifische Divergenzen zum Nächsten Nachbarn von 4,28% (Maximum 7,08%) (Abb. 3). Ein Artenpaar, *Erebia euryale*/*E. ligea*, ist im Barcode mit 0,77% Divergenz jedoch so geringfügig unterschieden, dass eine gesicherte genetische Bestimmung erst nach Abgleich mit Daten aus anliegenden europäischen Ländern möglich ist. Die geringfügige genetische Distanz der beiden Proben aus Vorarlberg wird allerdings durch etliche Proben aus den Nachbargebieten in Österreich, Deutschland, Italien und der Schweiz bestätigt und somit scheinen diese beiden Arten im genannten geographischen Raum im Barcode eindeutig

differenziert. Bei Berücksichtigung weiterer Proben von *Erebia euryale*/*E. ligea* ist diese Unterscheidung jedoch nicht mehr zweifelsfrei möglich. Dank der von BOLD generierten Barcode Index Nummern (BIN) werden jedoch sämtliche gemeinsam clusternde Barcodes unabhängig von ihrer geographischen Herkunft erfasst und somit die überregionale intraspezifische Divergenz berücksichtigt. BINs eignen sich daher ideal für die Bewertung der Artspezifität von Barcodes. Zwar können auch gering differenzierte Kladen innerhalb eines BINs sehr wohl zu verschiedenen Arten gehören (Abb. 4) und umgekehrt können einzelne Arten mit großer intraspezifischer Distanz auch mehrere BINs umfassen. Diese sind jedoch im vorliegenden Artenbestand durchaus Ausnahmen.

Eine BIN-Analyse resultiert in der zweifelsfreien Diskriminierung von 1432 Arten (95,7% des sequenzi-



**Abb. 4:** Neighbour Joining Tree in der *Boloria pales*-Artengruppe (Kimura 2 Parameter, produziert mit MEGA 5; cf. TAMURA et al. 2011), basierend auf Proben aus 8 europäischen Staaten, nur vollständige Barcodesequenzen berücksichtigt. Die Breite der Dreiecke repräsentiert den Stichprobenumfang, die Tiefe die genetische Variation innerhalb des Clusters. Quelle: DNA-Barcodesequenzen aus BOLD (Barcode of Life Database, cf. RAT-NASINGHAM & HEBERT 2007).

unterscheidbar müssen aber zumindest folgende Taxa gelten: *Anchinia cristalis*/A. *laureolella*, *Stenoptilia bipunctidactyla*/S. *succisae*, *Eana incanana*/E. *frei*, *Apotomis capreana*/A. *sauciana*, *Zygaena purpuralis*/Z. *minos*, *Catoptria combinella*/C. *petrificella*, *Catoptria pyramidellus*/C. *speculalis*, *Scoparia ambigualis*/S. *basistrigalis*, *Lycia alpina*/L. *zonaria*, *Setina aurita*/S. *irrorella*.

Mit zwei Ausnahmen sind allerdings alle diese Taxa morphologisch gut differenziert und entweder phänotypisch und/oder genitalmorphologisch leicht bestimmbar. Diese Ausnahmen betreffen *Stenoptilia bipunctidactyla* und S. *succisae* sowie *Eana incanana* und E. *frei*, deren Artstatus im wesentlichen nur durch unterschiedliche Raupenfutterpflanzen begründet ist und mangels morphologischer und genetischer Differenzen bezweifelt werden muss. Ähnlich kritisch erscheint die Taxonomie der beiden Ameisenbläulinge *Maculinea alcon* und *M. rebeli*, die von vielen Autoren als artident bewertet werden. Nach den bereits umfassenden Barcode-Daten

in BOLD gehört dieses Artenpaar bei einer zunehmend vollständigen Abdeckung des Artenbestandes Vorarlbergs zu den wenigen weiteren Fällen mit identen Barcodes.

### 3.4 Potentielle kryptische Diversität

#### Arten mit großen intraspezifischen Distanzen

Große intraspezifische Divergenzen im Barcode können vielfältige Ursachen haben wie beispielsweise

eine komplexe phylogeographische Historie, Introgression, Pseudogene, Infektion durch symbiotische Bakterienstämme (*Wolbachia*), incomplete lineage sorting oder ganz einfach eine fehlerhafte Taxonomie. Sie sind aber auch ein wichtiger Hinweis auf mögliche versteckte Artenvielfalt und die Ersterkennung derartiger kryptischer Arten wird daher durch DNA-Barcoding wesentlich erleichtert. Besonderes Augenmerk ist hier auf Arten zu legen, deren Barcodes sich entweder innerhalb des Untersuchungsgebietes oder im überregionalen Vergleich durch tiefe intraspezifische Aufspaltungen - oft werden hier Divergenzen > 2% als erster Anhaltspunkt für weitere Untersuchungen angenommen - auszeichnen. Vor allem bei phylogenetisch jungen Arten können auch deutlich geringere Barcode-Divergenzen vorkommen und in manchen Fällen sind diese Arten im DNA-Barcode noch überhaupt nicht getrennt. Die ermittelten Barcode-Divergenzen können daher maximal als Hinweis auf taxonomische Probleme dienen,

Art 1	Art 2	Min Distanz
<i>Catoptria combinella</i>	<i>Catoptria petrificella</i>	0%
<i>Eana incanana</i>	<i>Eana frei</i>	0%
<i>Lycia alpina</i>	<i>Lycia zonaria</i>	0%
<i>Scoparia ambigualis</i>	<i>Scoparia basistrigalis</i>	0%
<i>Setina aurita</i>	<i>Setina irrorella</i>	0%
<i>Catoptria pyramidellus</i>	<i>Catoptria speculalis</i>	0,15%
* <i>Thera variata</i>	<i>Thera obeliscata</i>	0,15%
<i>Zygaena purpuralis</i>	<i>Zygaena minos</i>	0,15%
<i>Pieris napi</i>	<i>Pieris bryoniae</i>	0,61%
<i>Mesapamea secalis</i>	<i>Mesapamea secalella</i>	0,65%
<i>Amphipoea lucens</i>	<i>Amphipoea fucosa</i>	0,77%
<i>Apotomis capreana</i>	<i>Apotomis sauciana</i>	0,77%
<i>Erebia euryale</i>	<i>Erebia ligea</i>	0,77%
<i>Pammene fasciana</i>	<i>Pammene herrichiana</i>	0,77%
<i>Perizoma affinitata</i>	<i>Perizoma hydrata</i>	0,77%
<i>Conistra vaccinii</i>	<i>Conistra ligula</i>	0,80%
<i>Eucosma hohenwartiana</i>	<i>Eucosma parvulana</i>	0,92%
<i>Diachrysia chrysitis</i>	<i>Diachrysia stenochrysitis</i>	0,93%
<i>Oligia versicolor</i>	<i>Oligia strigilis</i>	0,93%
<i>Pyrgus malvae</i>	<i>Pyrgus malvoides</i>	1,08%
<i>Lacanobia oleracea</i>	<i>Lacanobia splendens</i>	1,24%
<i>Thera cembrae</i>	<i>Thera britannica</i>	1,24%
<i>Pyrgus andromedae</i>	<i>Pyrgus cacaliae</i>	1,31%
<i>Poecilocampa populi</i>	<i>Poecilocampa alpina</i>	1,39%
<i>Rheumaptera hastata</i>	<i>Rheumaptera subhastata</i>	1,44%

**Tab. 1:** Artenpaare mit Barcode-Divergenzen < 1,5% (basierend auf der Stichprobe aus Vorarlberg).

\* Identifikationen in dieser Gruppe sind umfassend zu überprüfen. In Mitteleuropa unterscheiden sich beide Taxa normalerweise um ca. 4%.

Art	Mean Intra-sp	Max Intra sp.	n
<i>Tinea pellionella</i>	1,18	2,03	5
<i>Odezia atrata</i>	2,18	2,18	2
<i>Ancylis badiana</i>	2,34	2,34	2
<i>Metalampra italicica</i>	2,5	2,5	2
<i>Psoricoptera gibbosella</i>	1,64	2,56	3
<i>Pseudococcyx mugiana</i>	1,35	2,66	4
<i>Anacampsis blattariella</i>	1,6	2,66	5
<i>Coleophora mayrella</i>	1,41	2,83	4
<i>Eupithecia subfuscata</i>	1,66	2,98	6
<i>Denisia stipella</i>	2,25	3	3
<i>Idaea seriata</i>	3,15	3,15	2
<i>Hepialus humuli</i>	1,72	3,31	12
<i>Aethes hartmanniana</i>	2,75	3,33	3
<i>Epirrita autumnata</i>	3,62	3,62	2
<i>Pasiphila rectangulata</i>	4,26	4,26	2
<i>Coleophora milvipennis</i>	5,78	5,78	2

**Tab. 2: Arten mit intraspezifischen Divergenzen > 2%**  
(basierend auf der Stichprobe aus Vorarlberg)

sollten jedoch ab einem Ausmaß von > 2% jedenfalls auf ihre taxonomische Relevanz hin geprüft werden.

Im Untersuchungsraum wurden innerartliche Divergenzen > 2% bei 16 Arten festgestellt (Tab. 2), allerdings liegt nur für knapp 21% des Artenbestandes mehr als eine Sequenz pro Art vor und somit ist die intraspezifische Variationsbreite sicherlich deutlich unterrepräsentiert. Nach bisher belegten genetischen Mustern europäischer Schmetterlinge (HAUSMANN et al. 2011a, 2013) sind tatsächlich für etliche Arten zusätzliche Haplotypen zu erwarten. Die Ursachen des Auftretens mehrerer Haplotypen in derselben Population oder allopatrisch innerhalb derselben Art sind fallbezogen zu untersuchen. So konnten für ein auffallendes Beispiel, den Hopfenwurzelbohrer (*Hepialus humuli*), im DNA-Barcode zwar mehrere deutlich getrennte Cluster nachgewiesen werden (Abb. 5 im Anhang), deren taxonomische Relevanz jedoch weder morphologisch noch mittels zusätzlich analysierter RpS5 Sequenzen belegt wurde (SIMONSEN & HUEMER 2013). Die drei in Vorarlberg nachgewiesenen Hapligruppen reflektieren jedoch die komplexe Phylogeographie dieser Art (SIMONSEN & HUEMER 2013). Auch das Beispiel von *Anacampsis blattariella*

ist bemerkenswert, da neben der für die Art typischen Haplogruppe in Vorarlberg ein weiterer Cluster existiert, welcher annähernd (aber nicht vollständig) mit der nächstverwandten *Anacampsis populella* übereinstimmt. Inzwischen vorliegende ITS2 Sequenzen deuten darauf hin, dass es sich hier um einen alten Fall mitochondrialer Introgression oder einen ursprünglichen Polymorphismus handelt.

Vereinzelt sind tiefe Splits nach aktuellem Kenntnisstand aber definitiv auf kryptische Diversität zurückzuführen. Als Beispiel kann *Coleophora milvipennis* gelten, unter deren Namen sich eine bisher unbekannte, zweite Art verbirgt.

Ein überregionaler Vergleich von 1004 Arten aus Vorarlberg mit demselben Artenpool aus Finnland belegt zwar einerseits eine hohe Anzahl von 124 Arten mit intraspezifischen Divergenzen > 2%, andererseits kann aber beinahe die Hälfte dieser Splits geographisch unterschiedlichen Populationen zugeordnet werden (HUEMER et al. 2014b). Beispiele möglicher allopatrischer kryptischer Diversität umfassen selbst anscheinend unverwechselbare Arten wie *Notodonta dromedarius* oder *Epiblema grandaevana*. Alle diese Fälle sind aber

wiederum im einzelnen auf ihre taxonomische Relevanz zu prüfen.

#### Weitere ungeklärte Arten

Mehrere Arten konnten bisher trotz aller Bemühungen nicht auf Artniveau determiniert werden und auch die ermittelten DNA-Barcodes lassen keine gesicherte Determination zu. Zu diesen Fällen möglicher kryptischer Diversität gehören insbesondere zwei Arten aus der Gattung *Stenoptilia*. Die Art mit BIN BOLD:AY8866 ist auch aus Dänemark, Bayern und Kärnten bekannt und wurde von BUHL et al. (2014) als mutmaßlicher Neufund von *S. inopinata* in Dänemark interpretiert, eine Art die aus Österreich unbekannt wäre. Das fragliche Taxon weist zum nächsten Nachbarn BOLD:AAO2603 (*Stenoptilia* sp.) eine genetische Distanz von 3,69% auf. Letztere Art ist gleichzeitig die zweite ungeklärte *Stenoptilia* aus dem Untersuchungsgebiet. Sie wurde aus Tirol und Kärnten, Mazedonien, Frankreich und Großbritannien nachgewiesen und teilweise in BOLD als *S. plagiadactyla* bzw. *S. cf. scabiodactyla* determiniert.

Eine weitere Art aus der Familie Tineidae mit dem BIN BOLD:ACA9708 wurde vorerst mangels genitalmorphologischer Untersuchungen keiner Gattung zugeordnet. Die isolierte Stellung in BOLD wird mit 11,4% Distanz zum nächsten Nachbarn mit dem BIN BOLD:AAF7368 (ebenfalls eine unbestimmte Tineidae) untermauert.

#### 3.5 Faunistische Ergebnisse

Die Erstellung von DNA-Barcode Bibliotheken umfasst nicht nur die Erhebung der genetischen Vielfalt und die Erkennung kryptischer Diversität, sondern kann darüber hinaus auch einen wichtigen Beitrag zur Landesfaunistik liefern (HUEMER 2014). Auch im vorliegenden Forschungsprojekt konnten mittels kombinierter morphologischer und genetischer Bestimmungsmethoden zahlreiche Neufunde für Vorarlberg

nachgewiesen werden. Besonders hervorzuheben sind die erstmals in Österreich belegten Arten *Ectoedemia heckfordi* und *Metalampra italicica*. Hinzu kommen folgende 34 Erstnachweise für Vorarlberg: *Stigmella vimineticola*, *Trifurcula subnitidella*, *Ectoedemia liebwederella*, *Agnathosia mendicella*, *Archinemapogon yildizae*, *Phyllonorycter mespilella*, *Phyllonorycter cavella*, *Argyresthia svenssoni*, *Sorhagenia rhamniella*, *Chionodes tragicella*, *Gelechia basipunctella*, *Elachista subocellea*, *Elachista zernyi*, *Elachista compsa*, *Elachista consortella*, *Spuleria flavicaput*, *Mompha divisella*, *Decantha borkhausenii*, *Coleophora orbitella*, *Coleophora congeriella*, *Coleophora virgaureae*, *Coleophora saxicolella*, *Coleophora argentula*, *Scythris noricella*, *Gynnidiomorpha alismana*, *Aethes rutilana*, *Phiaris dissolutana*, *Olethreutes subtilana*, *Cydia inquinatana*, *Grapholita fissana*, *Grapholita lobarezewskii*, *Pammene herrichiana*, *Phycitodes saxicola* und *Hypoxytis pluvialis*. Nachfolgend werden sämtliche mittels DNA-Barcoding ermittelten Landesneufunde aufgelistet. Neben Familien-, Gattungs- und Artnamen werden die Funddaten sowie die Identifikationsnummern für das Belegexemplar (Sample ID) und die damit verknüpfte Identifikationsnummer für die Sequenz (Process ID) inkl. Sequenzlänge angeführt.

- *Stigmella vimineticola* (FREY, 1856) (Nepticulidae)  
Nachweis: Langen am Arlberg/ ca 1 km NE Bahnhof, 1350 m, 22.6.2014, leg. Huemer.  
Sample ID: TLMF Lep 14909; Process ID: LASTS457-14 (658 bp).
- *Trifurcula subnitidella* (DUPONCHEL, 1843) (Nepticulidae)  
Nachweise: Zwischenwasser, Üble Schlucht Eingangsbereich, 740 m, 11.6.2006, leg. Mayr; Langen am Arlberg/ ca 1 km NE Bahnhof, 1350 m, 22.6.2014, leg. Huemer.  
Sample ID: TLMF Lep 14732, TLMF Lep 14910; Process ID: LASTS280-14 (620 bp), LASTS458-14 (658 bp).
- *Elachista subocellea* (STEPHENS, 1834) (Elachistidae)  
Nachweis: Fontanella, Ladritschvorsäß, 1250 m, 8.7.2010, leg. Huemer.  
Sample ID: TLMF Lep 07694; Process ID: PHLAH255-12 (658 bp).
- *Elachista zernyi* (HARTIG, 1941) (Elachistidae)  
Nachweis: Flexenpass NW, 1800 m, 13.7.2013, leg. Huemer.  
Sample ID: TLMF Lep 10052; Process ID: LEATA445-13 (658 bp).
- *Elachista compsa* TRAUGOTT-OLSEN, 1974 (Elachistidae)  
Nachweis: Sonntag, Buchboden, E Hintergurga, 990 m, 15.6.2010, leg. Huemer.  
Sample ID: TLMF Lep 09211; Process ID: PHLAI649-13 (658 bp).
- *Elachista consortella* STANTON, 1851 (Elachistidae)  
Nachweis: Partenen, N Vermuntstausee, In der Hölle, 1730 m, 15.8.2012, leg. Huemer.  
Sample ID: TLMF Lep 08745; Process ID: PHLAH941-12 (658 bp).
- *Spuleria flavicaput* (HAWORTH, 1828) (Parametriotidae)  
Nachweis: Zwischenwasser, Üble Schlucht Eingangsbereich, 740 m, 11.5.2012, leg. Huemer.  
Sample ID: TLMF Lep 07915; Process ID: PHAV096-12 (658 bp).
- *Mompha divisella* HERRICH-SCHÄFFER, 1854 (Morphidae)  
Nachweis: Rankweil, Umg. St. Peter Bühel, 6.2.2014, leg. Hiermann.  
Sample ID: TLMF Lep 14507; Process ID: LASTS055-14 (658 bp).
- *Decantha borkhausenii* (ZELLER, 1839) (Oecophoridae)  
Nachweis: Thüringen, Lutzau, 521 m, 10.8.2012, leg. Huemer.  
Sample ID: TLMF Lep 09195; Process ID: PHLAI633-13 (658 bp).
- *Metalampra italicica* BALDIZZONE, 1977 (Oecophoridae)  
Nachweise: Koblach, Neuburg, Schlosshügel, 500 m, 27.6.2012, leg. Huemer; Rankweil, Umg. St. Peter Bühel, 21.6.2013, leg. Hiermann.  
Sample ID: TLMF Lep 08212, TLMF Lep 09911; Process ID: PHLAH393-12 (658 bp), PHLAW114-13 (658 bp).  
Bemerkung: Die Art wurde bereits bei HUEMER (2013) als Erstmeldung für Österreich vermerkt.
- *Coleophora orbitella* ZELLER, 1849 (Coleophoridae)  
Nachweise: Langenegg-Leiten, Fohren, 640 m, 19.6.2013, leg. Huemer; Partenen, N Vermuntstausee, In der Hölle, 1730 m, 27.6.2005 leg. Mayr.  
Sample ID: TLMF Lep 09953, TLMF Lep 14724; Process ID: PHLAW156-13 (658 bp), LASTS272-14 (515 bp).
- *Coleophora congeriella* STAUDINGER, 1859 (Coleophoridae)  
Nachweis: Bludesch, Bludescher Magerrasen E, Umg. Jordan, 610 m, 15.6.2012, leg. Huemer.  
Sample ID: TLMF Lep 08066; Process ID: PHAV247-12 (658 bp).
- *Coleophora virgaureae* STANTON, 1857 (Coleophoridae)  
Nachweis: Thüringen, Lutzau, 521 m, 10.8.2012, leg. Huemer.  
Sample ID: TLMF Lep 09188; Process ID: PHLAI626-13 (658 bp).
- *Coleophora saxicolella* (DUPONCHEL, 1843) (Coleophoridae)  
Nachweis: Lustenau, Schweizer Ried, AZE Häusle S, 25.7.2012, leg. Huemer.  
Sample ID: TLMF Lep 08467; Process ID: PHLAH648-12 (658 bp).
- *Coleophora argentula* (STEPHENS, 1834) (Coleophoridae)  
Nachweis: Feldkirch, Bangs-Unterried N, 434 m, 16.6.2005, leg. Mayr.  
Sample ID: TLMF Lep 14690; Process ID: LASTS238-14 (658 bp).
- *Scythris noricella* (ZELLER, 1843) (Scythrididae)  
Nachweis: Partenen, N Vermuntstausee, In der Hölle, 1730 m, 15.8.2012, leg. Huemer.  
Sample ID: TLMF Lep 08743; Process ID: PHLAH939-12 (658 bp).
- *Gynnidiomorpha alismana* (RAGONOT, 1883) (Tortricidae)  
Nachweis: Lustenau, Schweizer Ried, AZE Häusle S, 25.7.2012, leg. Huemer.  
Sample ID: TLMF Lep 08448; Process ID: PHLAH629-12 (658 bp).

- *Aethes rutilana* (HÜBNER, 1817)  
(Tortricidae)  
Nachweis: Thüringen, Lutzau, 521 m, 12.7.2013, leg. Huemer.  
Sample ID: TLMF Lep 10043; Process ID: LEATA436-13 (658 bp).
  - *Phiaris dissolutana* (STANGE, 1866)  
(Tortricidae)  
Nachweis: Thüringen, Lutzau, 521 m, 12.7.2013, leg. Huemer.  
Sample ID: TLMF Lep 10041; Process ID: LEATA434-13 (658 bp).
  - *Olethreutes subtilana* (FALKOVITSH, 1959) (Tortricidae)  
Nachweis: Langenegg-Leiten, Fohren, 640 m, 19.6.2013, leg. Huemer.  
Sample ID: TLMF Lep 09921; Process ID: PHLAW124-13 (658 bp).  
Bemerkung: Die Art wurde bereits bei HUEMER & WIMMER (2011) als Erstmeldung für Österreich vermerkt.
  - *Cydia inquinatana* (HÜBNER, 1800)  
(Tortricidae)  
Nachweis: Zwischenwasser, Üble Schlucht Eingangsbereich, 740 m, 18.6.2012, leg. Huemer.  
Sample ID: TLMF Lep 08094; Process ID: PHLAV275-12 (658 bp).
  - *Grapholita fissana* (FRÖLICH, 1828)  
(Tortricidae)  
Nachweis: Bludesch, Bludescher Magerrasen E, Umg. Jordan, 610 m, 15.6.2012, leg. Huemer.  
Sample ID: TLMF Lep 08035; Process ID: PHLAV216-12 (658 bp).
  - *Grapholita lobarezewskii* (Nowicki, 1860) (Tortricidae)  
Nachweis: Bludesch, Bludescher Magerrasen E, Umg. Jordan, 610 m, 15.6.2012, leg. Huemer.  
Sample ID: TLMF Lep 08042; Process ID: PHLAV223-12 (658 bp).
  - *Pammene herrichiana* (HEINEMANN, 1854) (Tortricidae)  
Nachweise: Sonntag, Buchboden, WSW Unter-Überlatalpe, 1270 m, 29.5.2008; Zwischenwasser, Üble Schlucht Eingangsbereich, 740 m, 11.5.2012, leg. Huemer; Langenegg-Leiten, Fohren, 640 m, 19.6.2013, leg. Huemer.  
Sample ID: TLMF Lep 07480, TLMF Lep 07929, TLMF Lep 00942; Process ID: PLAG801-12 (658 bp),
- PHLAV110-12 (658 bp), PHLAW145-13 (658 bp).
- *Phycitodes saxicola* (VAUGHAN, 1870)  
(Pyralidae)  
Nachweis: Marul, Laguzbach, Beim alten Stafel, 1380 m, 7.7.2010, leg. Huemer.  
Sample ID: TLMF Lep 09173; Process ID: PHLAI611-13 (658 bp).
  - *Hypoxytis pluvaria* (FABRICIUS, 1787)  
(Geometridae)  
Nachweis: E Hochtannbergpass, Umg. Jägeralpe, 1580 m, 2.7.2013, leg. Huemer.  
Sample ID: TLMF Lep 10010; Process ID: LEATA403-13 (658 bp).

Artenzahl (1497 spp.), als auch im Umfang taxonomischer Großgruppen (64 Familien), allerdings mit niedriger Probenzahl von durchschnittlich lediglich 1,27 barcodekonformen Sequenzen pro Art und einer überdies ausschließlich regionalen Stichprobe. Somit berücksichtigt die ermittelte durchschnittliche Distanz von 6,75% zum jeweils nächsten Nachbarn bzw. 8,99% interpezifischer Divergenz für den gesamten Datensatz weder eine mögliche intraspezifische Variabilität innerhalb des Untersuchungsraumes und schon gar nicht eine auf das gesamte Verbreitungsareal der Arten bezogene genetische Diversität. Unsere Daten wären daher nur mit erheblichen Einschränkungen für Aussagen zur Zuverlässigkeit von Artabgrenzung bzw. Artidentifikationen mittels DNA-Barcoding anzuwenden. Durch das rezent entwickelte System von Barcode Index Nummern (BIN) (RATNAsINGHAM & HEBERT 2013) konnten aber bereits vorhandene und gemeinsam clusternde DNA-Barcodes des sequenzierten Artenbestandes aus anderen europäischen Regionen für Vergleichszwecke genutzt werden und somit das Problem der geringen Probenzahl signifikant mindern. Auch die geographische Variationsbreite spielte hier für die letztlich erfolgreiche Re-Identifikation der Arten keine signifikante Rolle, wie durch einen Vergleich von 1000 Arten aus Vorarlberg und Finnland nachgewiesen wurde (HUEMER et al. 2014b). Der Umfang diagnostischer Barcodes für 98,8% des in HUEMER et al. (2014b) untersuchten Artenbestandes ändert sich auch beim deutlich größeren Artensample unserer Studie in keiner Weise. Mittels Zuordnung zu BINs sowie zusätzlichem Feintuning, d.h. unter Berücksichtigung genetisch gering jedoch konstant differenzierter Arten, lassen sich 1477 von 1497 Arten zweifelfrei genetisch identifizieren. Diese extreme hohe Quote diagnostischer Barcodes entspricht beispielsweise auch ziemlich exakt den 99% arttypischer Barcodes für 957 Tagfalter- und Macroheterocera-

## 4 Diskussion

DNA-Barcoding hat sich in der jüngsten Vergangenheit zunehmend als eine effektive, zuverlässige und gleichzeitig kostengünstige Methode zur genetischen Bestimmung von Arten etabliert. So wurden rezent im europäischen Umfeld bereits etliche Gruppen wie beispielsweise Käfer (HENDRICH et al. 2014, PENTINSAARI et al. 2014), Wanzen (RAUPACH et al. 2014) oder Netzflügler (MORINIERE et al. 2014) auf nationaler Ebene erfolgreich auf ihre Barcode-Tauglichkeit getestet, mit durchwegs exzellenten Ergebnissen im Sinne einer zuverlässigen Identifikation. In allen genannten Gruppen konnten > 90% des jeweiligen Artenbestandes erfolgreich bestimmt werden. Ähnliches gilt auch für Schmetterlinge, eine Insektenordnung für die bereits umfangreiche und für Vergleichzwecke nutzbare Barcode-Bibliotheken vorliegen, so beispielsweise auf lokaler Ebene über die Fauna kleiner Probeflächen Südtirols (HUEMER & HEBERT 2012), national über die Großschmetterlinge sensu classico Deutschlands (HAUSMANN et al. 2011b), oder überregional über einzelne Spannergruppen Europas (HAUSMANN et al. 2013) und arktoalpine Schmetterlinge (MUTANEN et al. 2012). Unsere Studie basiert auf einer bislang in Europa unpublizierten Probengröße, sowohl in Bezug auf die sequenzierte

Arten Deutschlands (HAUSMANN et al. 2011b; hier nur deutsche Belegstücke berücksichtigt), während für 1554 Arten kanadischer Noctuoidea nur etwa 90% arttypischer Barcodes belegt wurden (ZAHIRI et al. 2014). Vice versa wurde die für Vorarlberger Schmetterlinge nachgewiesene geringe Anzahl nicht artspezifischer Barcodes auch in anderen Regionen Europas belegt. So konnten HAUSMANN et al. (2011a, 2011b) für ihre 1264 Arten umfassende Sequenzbibliothek der Macroheterocera und Rhopalocera Deutschlands und angrenzender Länder nur bei 4 Artenpaaren identische Barcodes festgestellt und insgesamt gab es lediglich bei 15 Arten (1,2%) Überschneidungen im Barcode. Die meisten dieser Problemfälle umfassen aber bereits bekannte kritische Arten mit unsicherer Taxonomie, oder phylogenetisch junge Taxa. Auch in unserer Studie finden sich gleich mehrere zweifelhafte Artenpaare mit möglichen Synonymien, darunter *Stenoptilia bipunctidactyla/S. succisae* sowie *Eana incanana/E. freii*. Von besonderem Interesse sind aber umgekehrt auch die intraspezifisch variablen Arten, mit tiefen Splits in zwei bis mehreren divergenten Haplotypen. Obwohl unterschiedliche Faktoren für diese genetische Vielfalt verantwortlich sein können, ist zumindest bei einem Teil der Arten kryptische Diversität anzunehmen. Neben genetischen Untersuchungen ist für die taxonomische Bewertung jedoch eine zeitaufwändige morphologische Untersuchung der kritischen Taxa unumgänglich und zu Recht wird hier ein integrativer Ansatz gefordert. Tatsächlich konnten so aber rezent selbst im gut erforschten Mitteleuropa bislang unbekannte kryptische Artenkomplexe entdeckt werden (HUEMER 2011, HUEMER & HAUSMANN 2009, HUEMER & HEBERT 2011, HUEMER et al. 2014a, MUTANEN et al. 2013). Mögliche kryptische Diversität ist sinnvollerweise im überregionalen Vergleich zu prüfen und dies ist für die europäische Fauna erst ansatzweise geschehen. Erste umfangreichere Datensets aus Europa deuten

jedenfalls bei Berücksichtigung größerer Areale auf beachtliche Ausmaße genetischer Splits. So weisen HAUSMANN et al. (2013) bei immerhin 188 von 778 untersuchten europäischen Geometridenarten Barcodedivergenzen von mehr als 2% nach, darunter 130 Taxa mit allopatrischer Verbreitung aber auch 58 Taxa mit genetischen Divergenzen innerhalb einer Population. Die somit für etwa ein Viertel der europäischen Spanner festgestellten tiefen genetischen Aufspaltungen könnten bei entsprechendem Probenumfang aber auch für viele andere Familien ein realistisches Maß sein. Auch bei der Vergleichsstudie von Barcodes 1000 nominell identer Schmetterlingsarten aus Vorarlberg und Finnland wurden bei geringerer Stichprobengröße für annähernd 20% des Artenbestandes zu überprüfende Divergenzen ermittelt, für 124 Taxa (12,4%) wurden im Ausmaß von > 2% (HUEMER et al. 2014b). Die Wertigkeit des DNA-Barcodings für weitere Forschungszweige konnte insbesondere im Bereich der Faunistik eindrucksvoll belegt werden. Zwar hat sich die aus Vorarlberg bekannte Artenzahl schon zwischen 1993 und 2013 von 2192 auf 2389 und somit um beinahe 200 Arten erhöht, allerdings einhergehend mit jahrelanger und intensiver Erforschung der Landesfauna, u.a. zur Erstellung der Roten Liste (Huemer 2001). Die große Zahl von 36 weiteren Landesneufunden in sehr kurzer Zeit und überdies sozusagen als «Nebenprodukt» eines genetischen Forschungsprojektes ist vor allem der nunmehr vereinfachten Determination morphologisch schwer differenzierbarer, oft auch kryptischer Arten zu verdanken. Als herausragendes Beispiel kann hier die Entdeckung von *Ectoedemia heckfordi* gelten, eine Art die bisher als Endemit Südglands galt und deren Nachweis in Vorarlberg daher auf breites mediales Interesse gestoßen ist. Ähnlich beeindruckende Ergebnisse zur Faunistik der Schmetterlinge liegen aber beispielsweise auch aus Barcodinginitiativen in Bayern (HASLBERGER et. al. 2012a, 2012b,

SEGERER et al. 2012, 2013a, 2013b) sowie aus Tirol und Südtirol (HUEMER 2014) vor, wo jeweils Dutzende Landesneufunde mittels DNA-Proben ermittelt wurden.

## 5 Dank

Besonderer Dank gebührt der inatura, Dornbirn und hier insbesondere Frau Direktor Mag. Ruth Swoboda sowie Herrn Dr. Georg Friebe für die materielle und immaterielle Unterstützung des Forschungsprojektes. Notwendige Fahrgenehmigungen wurden dankenswerterweise vom Leiter der Agrarbezirkbehörde Bregenz, Herrn DI Walter Vogel zur Verfügung gestellt. Die Kollegen Mag. Ulrich Hiermann (Rankweil), Toni Mayr (Feldkirch) und Christian Siegel (Hohenems) halfen mit ergänzendem Probenmaterial. Die Sequenzierungen wurden durch das Canadian Centre for DNA Barcoding (University of Guelph, Canada) durchgeführt und durch Mittel der kanadischen Regierung an Genome Canada über das Ontario Genomic Institute ermöglicht. Dem phantastischen Arbeitsteam in Guelph wird für die umfassende Unterstützung herzlichst gedankt. Weiters gebührt dem Ontario Ministry of Research and Innovation und dem Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada für die Unterstützung der Datenbank BOLD herzlicher Dank.

Dr. Dirk Steinke (Biodiversity Institute, University of Guelph) und Dr. Axel Hausmann (Zoologische Staatsammlung, München) kontrollierten dankenswerterweise das Manuskript, letzterer stellte überdies gemeinsam mit Dr. Marko Mutanen (University of Oulu, Finnland) großzügig einen umfangreichen, teilweise noch unveröffentlichten Barcode-Datenbestand für überregionale Vergleiche zur Verfügung.

## 6 Literatur

- BUHL, O., FALCK, P., KARSHOLT, O., LARSEN, K. & VILHELMSEN, F. (2014): Fund af småsommerfugle fra Danmark i 2013 (Lepidoptera). – Entomologiske Meddelelser, 82: 71-92.
- DEWAARD, J.R., IVANOVA, N.V., HAJIBABAEI, M. & HEBERT, P.D.N. (2008): Assembling DNA barcodes: analytical protocols. – In: MARTIN, C. (ed.). Methods in molecular biology: environmental genetics: 275-293; Totowa (Humana Press).
- HASLBERGER, A., GRÜNEWALD, T., LICHTMANNECKER, P., HEINDEL, R. & SEGERER, A. H. (2012a): Bemerkenswerte Schmetterlingsfunde aus Bayern im Rahmen des Projektes Barcoding Fauna Bavarica – 2. Beitrag (Insecta: Lepidoptera). – Nachrichtenblatt der bayerischen Entomologen, 61: 60-70.
- HASLBERGER, A., LICHTMANNECKER, P., HEINDEL, R., GRÜNEWALD, T. & SEGERER, A. H. (2012b): Bemerkenswerte Schmetterlingsfunde aus Bayern im Rahmen laufender Projekte zur genetischen Re-Identifikation heimischer Tierarten (BFB, GBOL) – 5. Beitrag (Insecta: Lepidoptera: Gracillariidae, Coleophoridae, Gelechiidae). – Nachrichtenblatt der bayerischen Entomologen, 63: 10-13.
- HAUSMANN, A., HASZPRUNAR, G. & HEBERT, P.D.N. (2011a): DNA Barcoding the Geometrid Fauna of Bavaria (Lepidoptera): Successes, Surprises, and Questions. – PLoS ONE 6(2): e17134. doi:10.1371/journal.pone.0017134
- HAUSMANN, A., HASZPRUNAR, G., SEGERER, A.H., SPEIDEL, W., BEHOUNEK, G. & HEBERT P.D.N. (2011b): Now DNA-barcoded: The Butterflies and Larger Moths of Germany (Lepidoptera: Rhopalocera, Macroheteroeca). – Spixiana, 34: 47-58.
- HAUSMANN, A., GODFRAY H.C.J., HUEMER, P., MUTANEN, M., ROUGERIE, R. VAN NIEUKERKEN, E.J., RATNASHINGHAM, S. & HEBERT, P.D.N. (2013): Genetic patterns in European geometrid moths revealed by the Barcode Index Number (BIN) System. PLoS ONE 8(12): e84518. doi:10.1371/journal.pone.0084518.
- HEBERT, P.D.N., CYWINSKA, A., BALL, S.L. & DEWAARD, J.R. (2003a): Biological identifications through DNA barcodes. – Proceedings of the Royal Society London B, 270: 313-321.
- HEBERT, P.D.N., RATNASHINGHAM, S. & DEWAARD, J.R. (2003b): Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. – Proceedings of the Royal Society of London Series B, 270 (Supplement): 96-99.
- HEBERT, P.D.N., DEWAARD, J.R. & LANDRY, J.F. (2009): DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. – Biology Letters, 6: 359-362. doi: 10.1098/rsbl.2009.084
- HENDRICH, L., MORINIÈRE, J., HASZPRUNAR, G., HEBERT, P.D.N., HAUSMANN, A., KOHLER, F. & BALKE, M. (2014): A comprehensive DNA barcode database for Central European beetles with a focus on Germany: Adding more than 3,500 identified species to BOLD. – Molecular Ecology Resources. doi:10.1111/1755-0998.12354
- HUEMER, P. (2001): Rote Liste gefährdeter Schmetterlinge Vorarlbergs. – Vorarlberger Landesregierung, 112 S + CD-ROM.
- HUEMER, P. (2011): Pseudo-endemism and cryptic diversity in Lepidoptera – case studies from the Alps and the Abruzzi. – eco.mont, 3(1): 11-18.
- HUEMER, P. (2013): Die Schmetterlinge Österreichs (Lepidoptera). Systematische und faunistische Checkliste. – Studiohefte 12, 304 S.
- HUEMER, P. (2014): DNA-Barcoding der Schmetterlinge (Lepidoptera) des zentralen Alpenraumes (Tirol, Südtirol) – Faunistische Neufunde. – Wissenschaftliches Jahrbuch der Tiroler Landesmuseen (im Druck).
- HUEMER, P. & HAUSMANN, A. (2009): A new expanded revision of the European high mountain *Sciadia tenebraria* species group (Lepidoptera, Geometridae). – Zootaxa 2117: 1-30.
- HUEMER, P. & HEBERT, P.D.N. (2011): Cryptic diversity and morphology of high alpine *Sattleria* – a case study combining DNA barcodes and morphology (Lepidoptera: Gelechiidae). – Zootaxa 2981: 1-22.
- HUEMER, P. & HEBERT, P.D.N. (2012): DNA-Barcoding von Schmetterlingen (Lepidoptera) in Waldstandorten Südtirols (IT01 Ritten und IT02 Montiggli). – Forest Observer, 6: 75-98.
- HUEMER, P. & WIMMER, J. (2011): *Olethreutes subtiliana* (FALKOVITSH, 1950) – Erstnachweis eines bemerkenswerten Kleinschmetterlings in Österreich (Lepidoptera: Tortricidae). – Beiträge zur Entomofaunistik, 12: 130-132.
- HUEMER, P., KARSHOLT, O. & MUTANEN, M. (2014a): DNA barcoding as a screening tool for cryptic diversity: an example from *Caryocolum*, with description of a new species (Lepidoptera, Gelechiidae). – ZooKeys, 404: 91-111.
- HUEMER, P., MUTANEN, M., SEFC, K. M. & HEBERT, P.D.N. (2014b): Testing DNA barcode performance in 1000 species of European Lepidoptera: Large geographic distances have small genetic impacts. – PLOS ONE 9(12): e115774. doi:10.1371/journal.pone.0115774
- IVANOVA, N.V., DEWAARD J.R. & HEBERT P.D.N. (2006): An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. – Molecular Ecology Notes, 6: 998-1002.
- MORINIÈRE, J., HENDRICH, L., HAUSMANN, A., HEBERT, P., HASZPRUNAR, G. ET AL. (2014): Barcoding Fauna Bavarica: 78% of the Neuroptera Fauna Barcoded! – PLoS ONE 9(10): e109719. doi:10.1371/journal.pone.0109719
- MUTANEN, M., HAUSMANN, A., HEBERT, P.D.N., LANDRY, J.-F., DEWAARD, J.R. & HUEMER, P. (2012): Allopatry as a Gordian knot for taxonomists: Patterns of DNA barcode divergence in arctic-alpine Lepidoptera. – PLOS ONE 7(10): e47214. doi:10.1371/journal.pone.0047214.
- MUTANEN, M., KAILA, L. & TABELL, J. (2013): Wide-ranging barcoding aids discovery of one-third increase of species richness in presumably well-investigated moths. – Scientific Reports, 3: 2901. doi: 10.1038/srep02901.
- PENTINSAARI, M., HEBERT PD.N. & MUTANEN M. (2014): Barcoding Beetles: A Regional Survey of 1872 Species Reveals High Identification Success and Unusually Deep Interspecific Divergences. – PLoS ONE 9(9): e108651. doi:10.1371/journal.pone.0108651
- RATNASHINGHAM, S. & HEBERT, P.D.N. (2007): BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). – Molecular Ecology Notes, 7: 355-364.

- RATNASHINGHAM, S. & HEBERT, P.D.N. (2013): A DNA-based registry for all animal species: The Barcode Index Number (BIN) System. – PLoS ONE 8: e66213.
- RAUPACH, M.J., HENDRICH, L., KÜCHLER, S.M., DEISTER, F., MORINIÈRE J. & GOSSNER, M.M. (2014): Building-Up of a DNA Barcode Library for True Bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera) of Germany Reveals Taxonomic Uncertainties and Surprises. – PLoS ONE 9(9): e106940. doi:10.1371/journal.pone.0106940
- SEGERER, A. H., GRÜNEWALD, T. & HASLBERGER, A. (2012): Bemerkenswerte Schmetterlingsfunde aus Bayern im Rahmen des Projektes Barcoding Fauna Bavarica (Insecta: Lepidoptera). – Nachrichtenblatt der bayerischen Entomologen 61: 2-11.
- SEGERER, A. H., LICHTMANNECKER, P., HASLBERGER, A. & GRÜNEWALD, T. (2013a): Bemerkenswerte Schmetterlingsfunde aus Bayern im Rahmen laufender Projekte zur genetischen Re-Identifikation heimischer Tierarten (BFB, GBOL) – 3. Beitrag (Insecta: Lepidoptera). – Nachrichtenblatt der bayerischen Entomologen, 62: 2-9.
- SEGERER, A. H., HASLBERGER, A., GRÜNEWALD, T., LICHTMANNECKER, P. & HEINDEL, R. (2013b): Bemerkenswerte Schmetterlingsfunde aus Bayern im Rahmen laufender Projekte zur genetischen Re-Identifikation heimischer Tierarten (BFB, GBOL) – 4. Beitrag (Insecta: Lepidoptera). – Nachrichtenblatt der bayerischen Entomologen, 62: 63-82.
- SIMONSEN, T. J. & HUEMER, P. (2014): Phylogeography of *Hepialus* (L.) (Lepidoptera: Hepialidae) in Europe: short distance vs. large scale postglacial expansions from multiple Alpine refugia and taxonomic implications. – Insect Systematic and Evolution doi 10.1163/1876312X-44032104.
- STEINKE, D. & BREDE, N. (2006): Taxonomie des 21. Jahrhunderts - DNA-Barcoding. – Biologie unserer Zeit, 36: 40-46.
- TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M. & KUMAR, S. (2011): MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. – Molecular Biology and Evolution, 28: 2731-2739.
- ZAHIRI, R., LAFONTAINE, J.D., SCHMIDT, B.C., DEWAARD, J.R., ZAKHAROV, E.V. & HEBERT, P.D.N. (2014): A transcontinental challenge – A test of DNA barcode performance for 1541 species of Canadian Noctuoidea (Lepidoptera). – PLoS ONE: 9(3): e92797. doi:10.1371/journal.pone.0092797.

**Abb. 5:** Neighbour Joining Tree von 1497 Schmetterlingsarten (Kimura 2 Parameter), basierend auf Sequenzen des mtDNA COI-Gens (Barcodefragment 5', >200 bp) aus Vorarlberg, inkl. 1489 Arten mit vollständigem Barcodefragment von 658 bp sowie zusätzlichen Angaben zu Process ID, Sample ID, Sequenzlänge und BIN. Quelle: DNA-Barcodesequenzen aus BOLD (Barcode of Life Database, cf. RATNASHAM & HEBERT 2007).

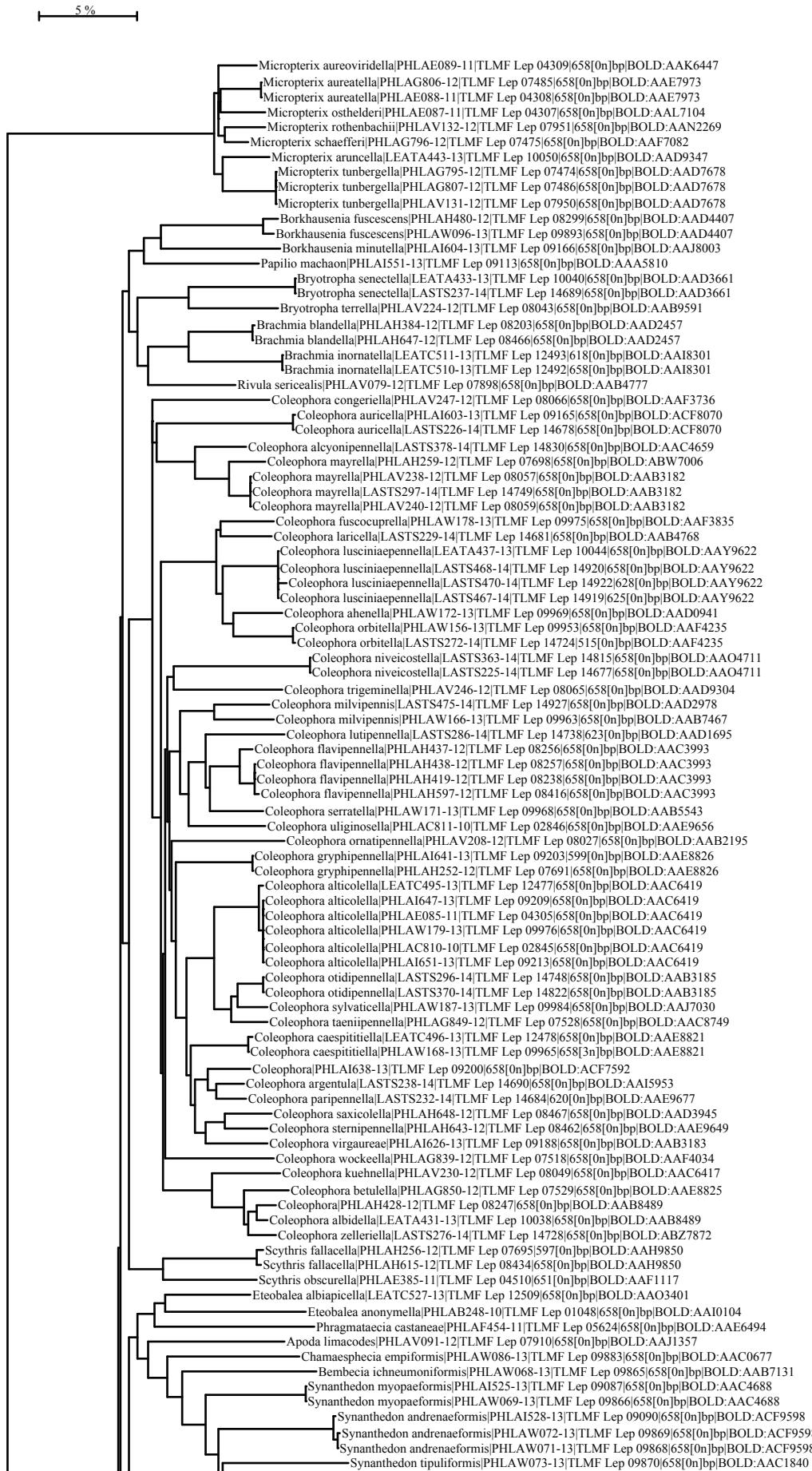
## BOLD TaxonID Tree

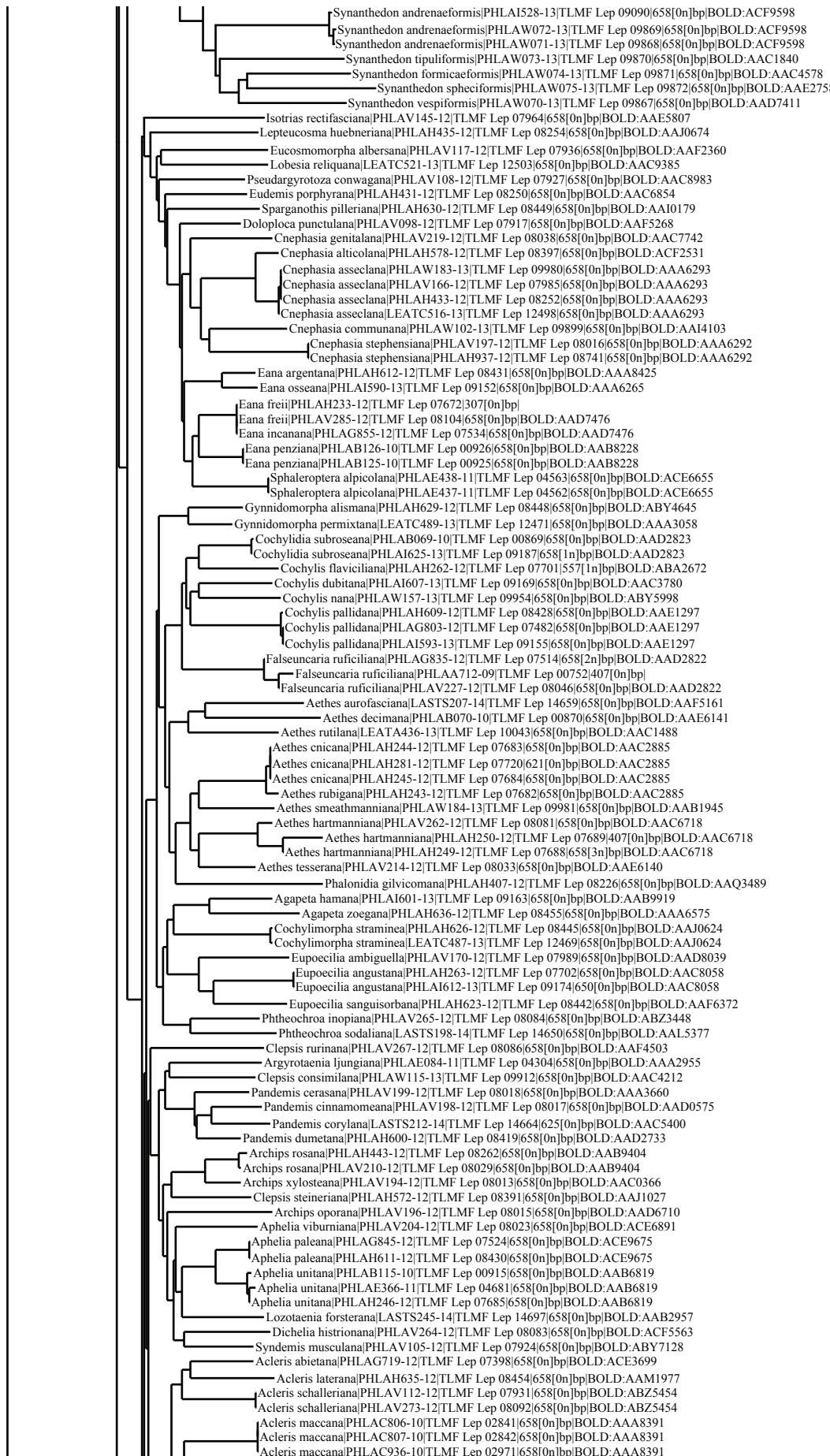
Title : Lepidoptera of the Alps - Vorarlberg [DS-LEAVBG]  
Date : 17-December-2014  
Data Type : Nucleotide  
Distance Model : Kimura 2 Parameter  
Marker : COI-5P  
Codon Positions : 1st, 2nd, 3rd  
Labels : SampleID, ProcessID, Sequence Length, BIN uri  
Filters : Length > 200, Contaminants, Stop Codons, Flagged,  
Colorization : [blue]=Stop Codons [red]=Contamination or misidentification

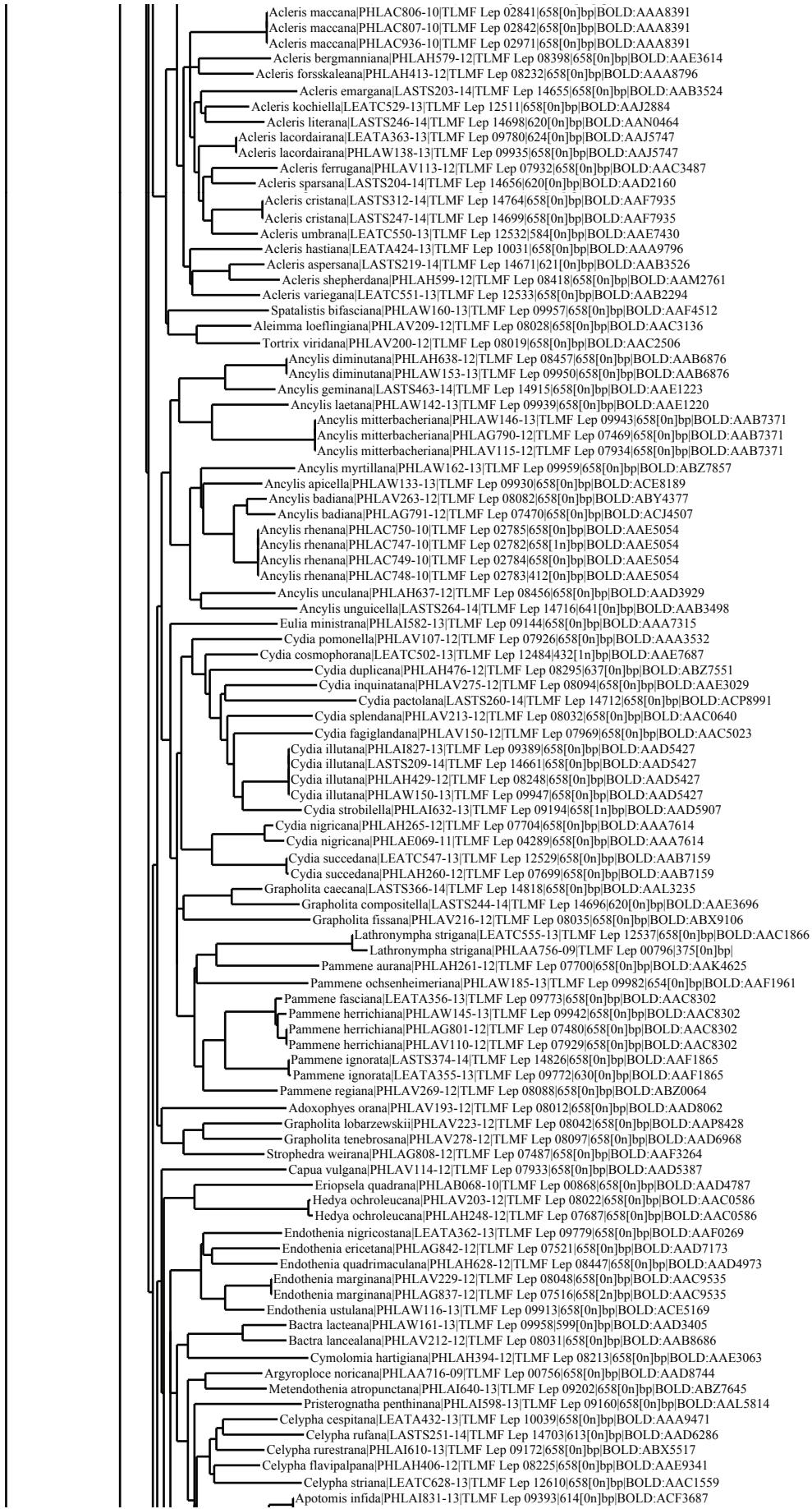
Sequence Count : 1964  
Species count : 1497  
Genus count : 680  
Family count : 64  
Unidentified : 9

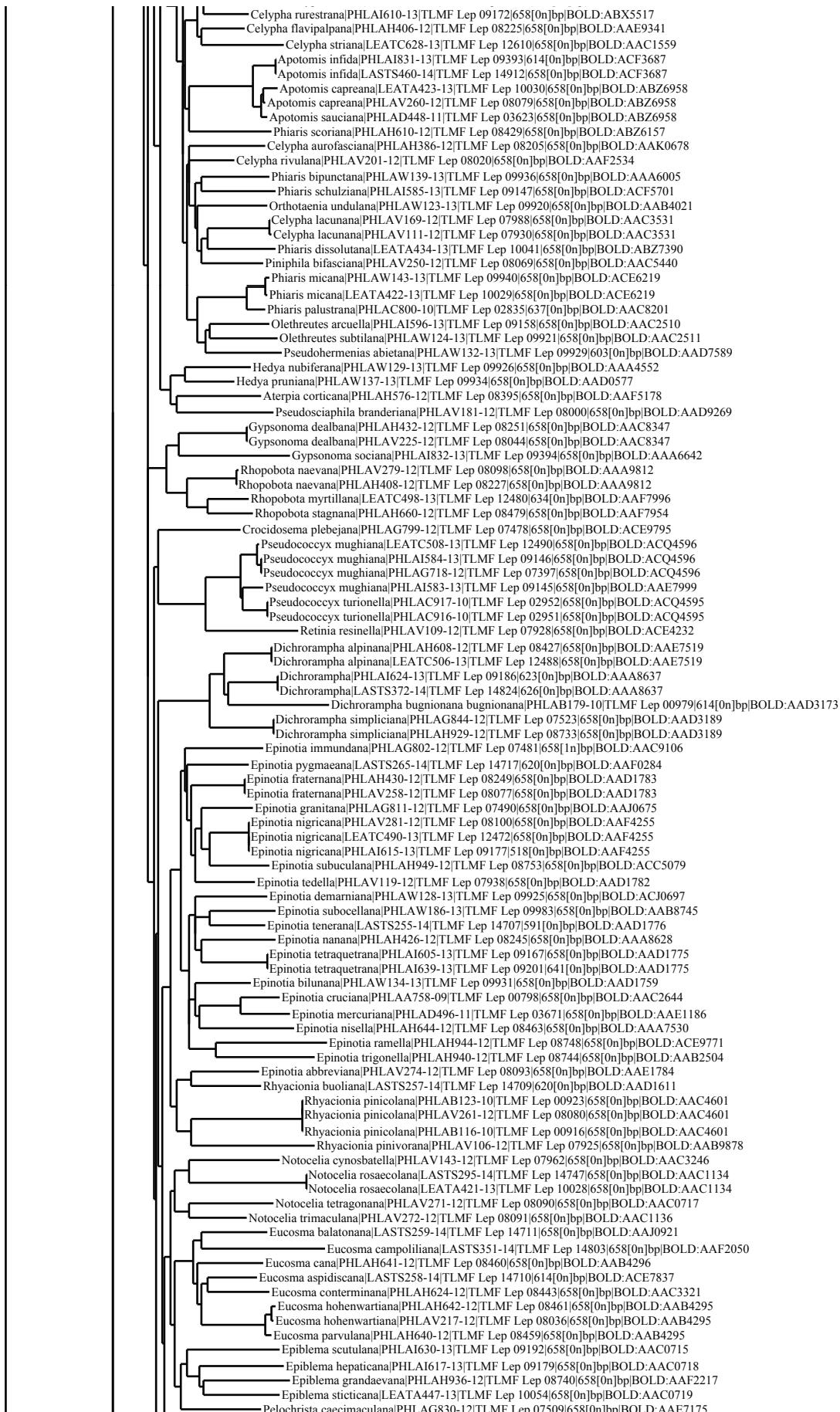
BIN Count : 1483

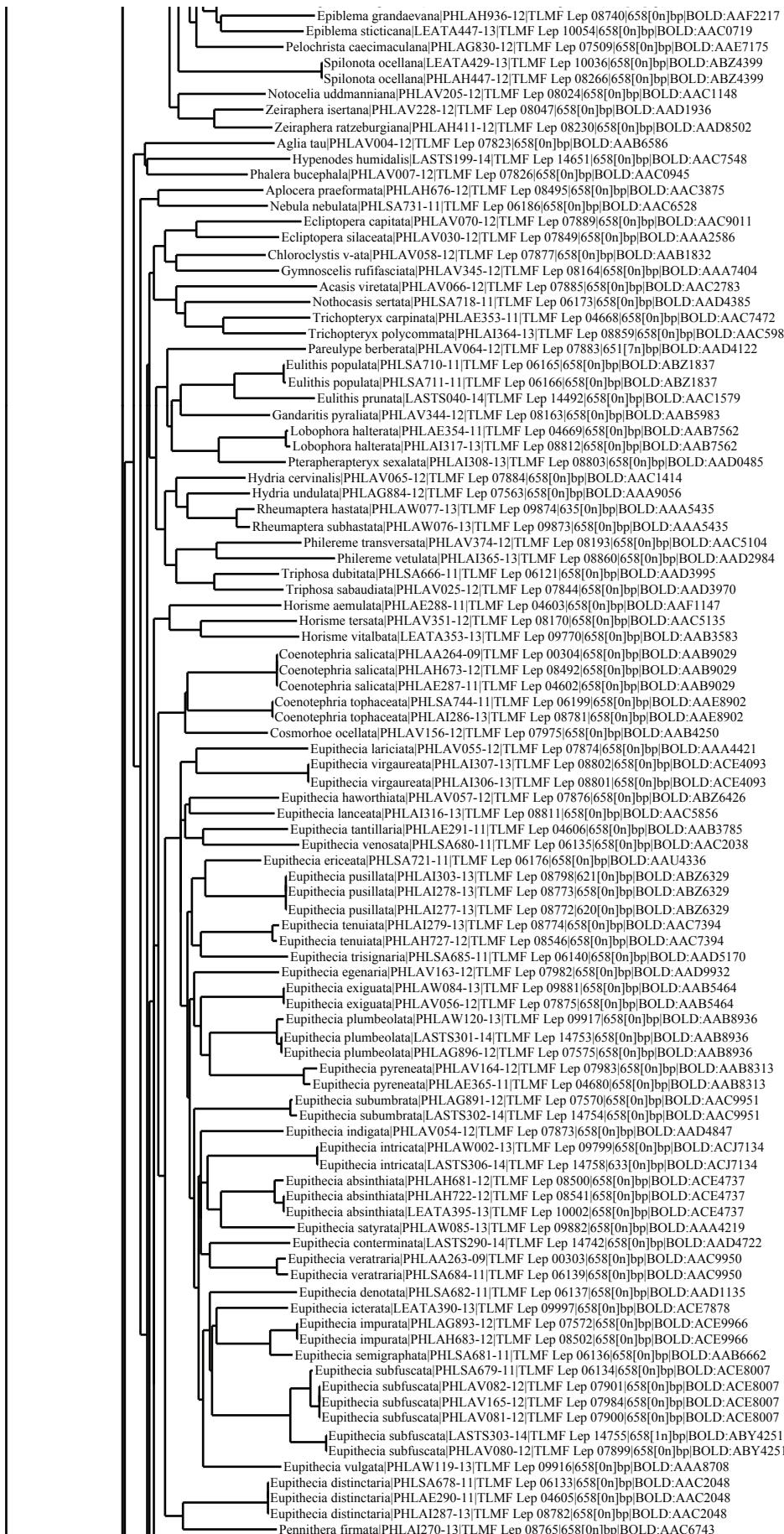
Abb. 5 (Forts.)

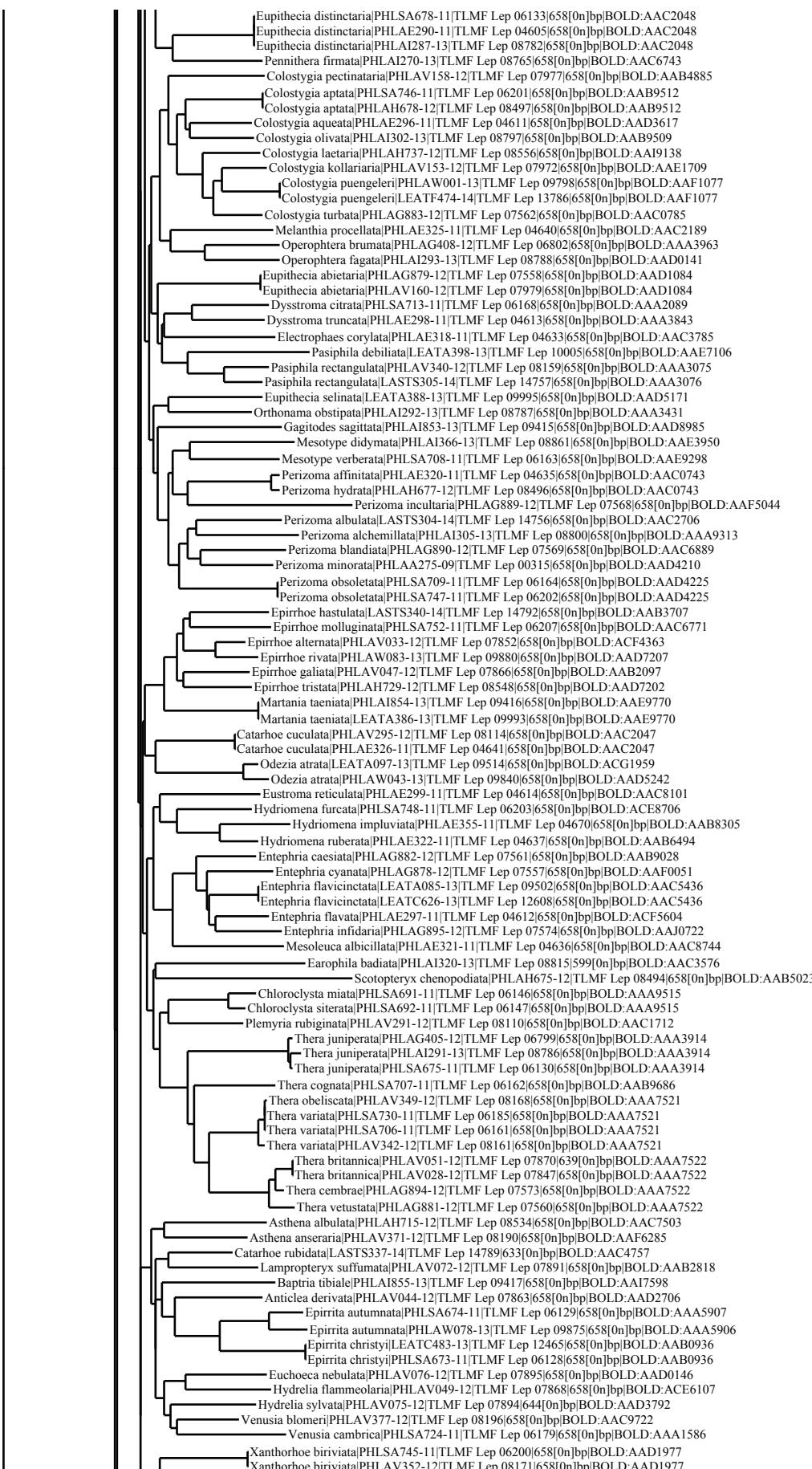


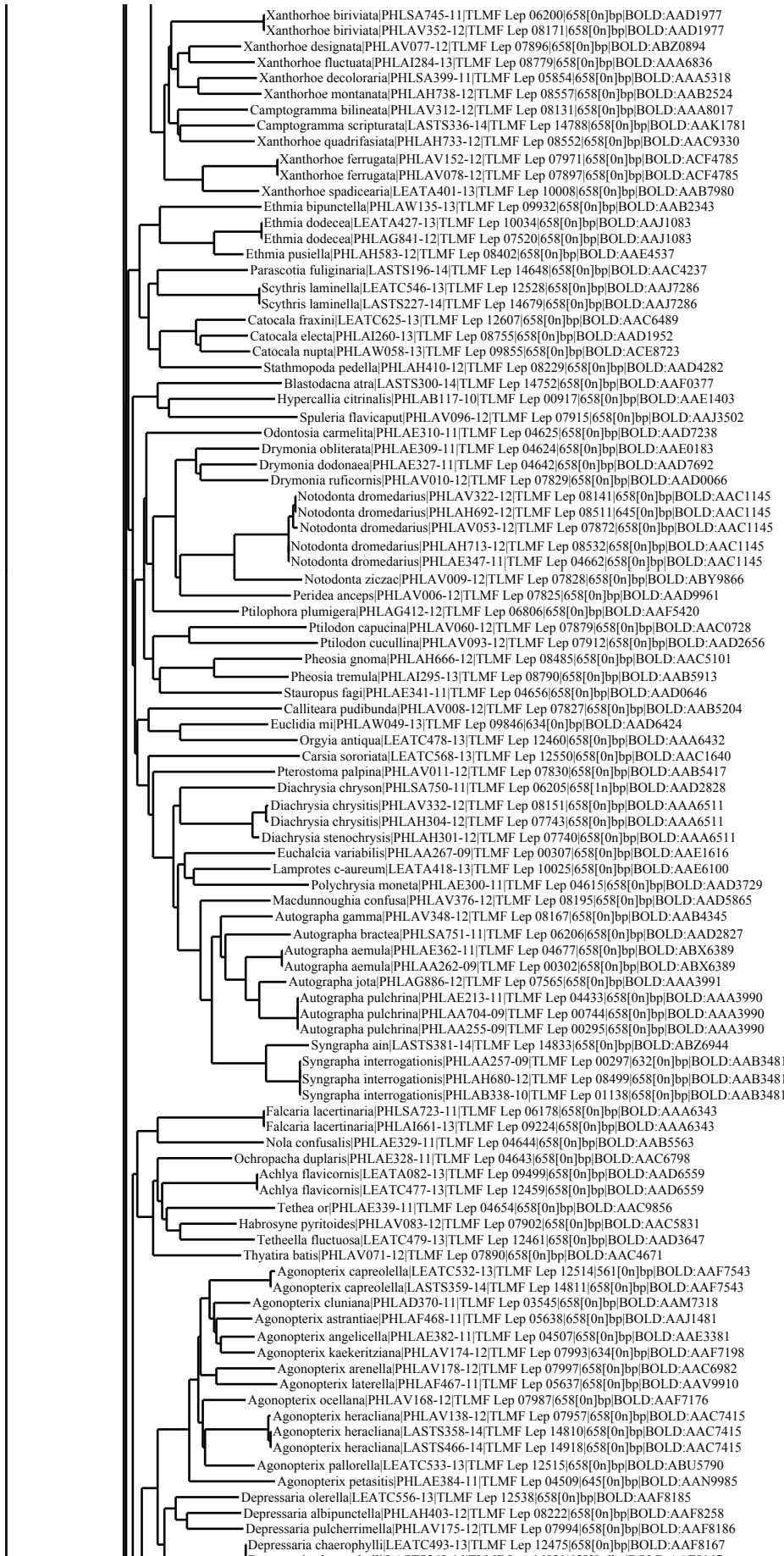


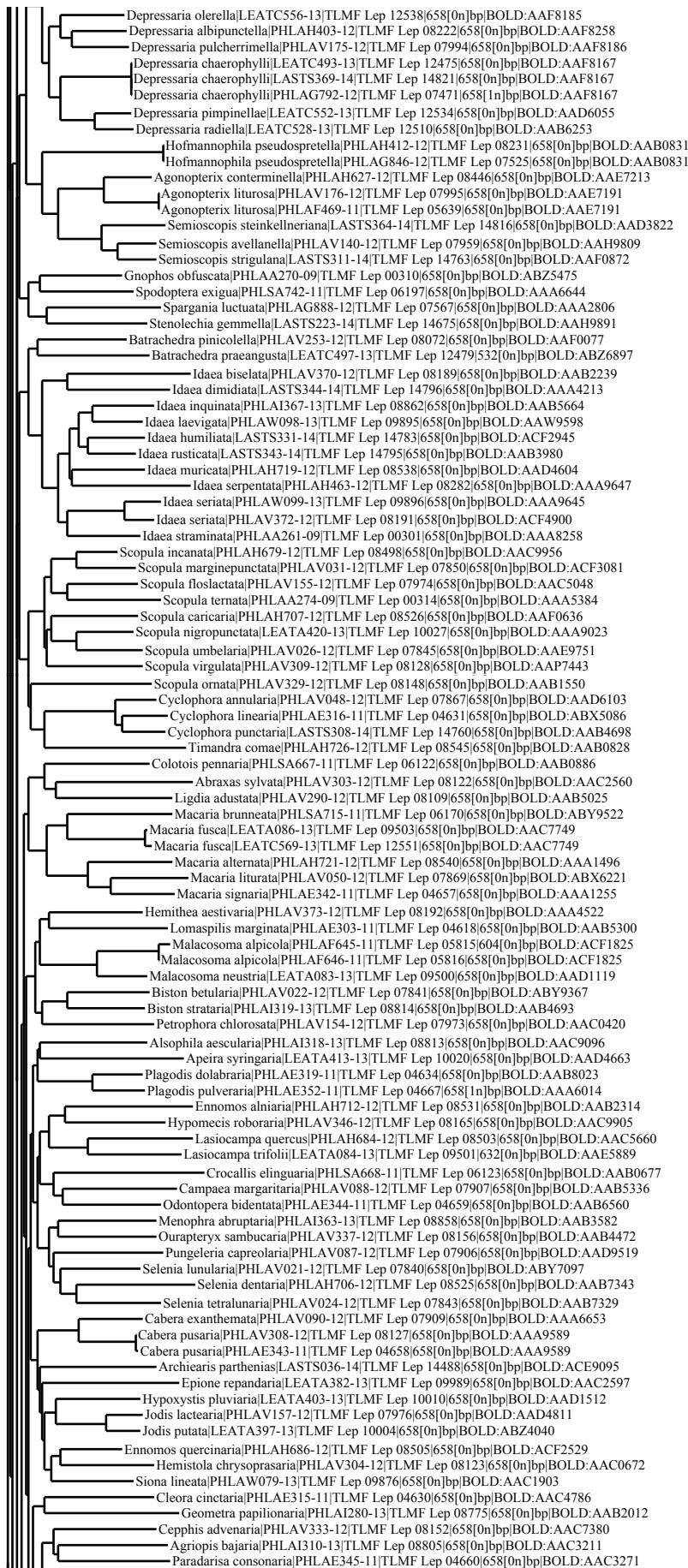


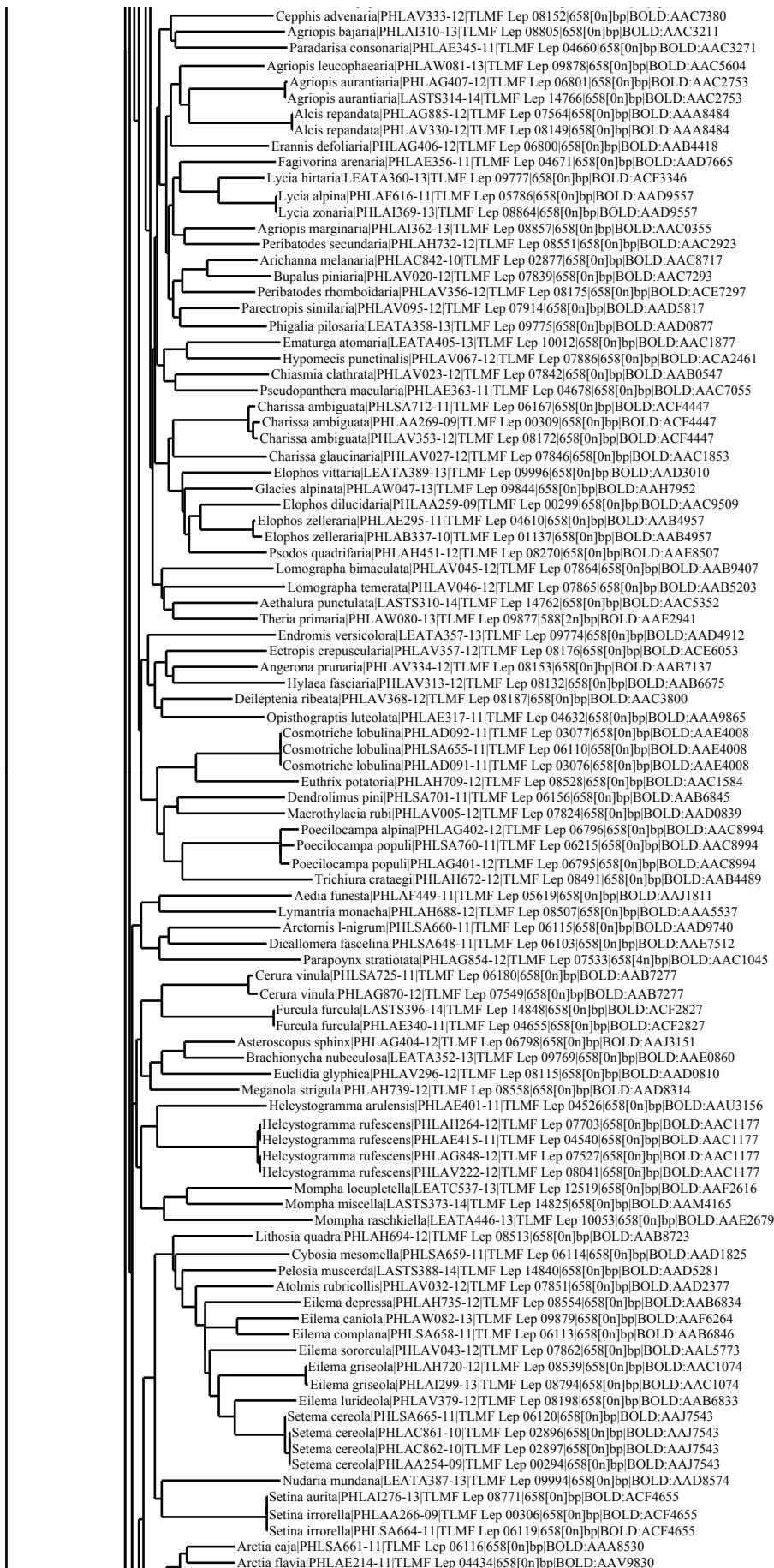


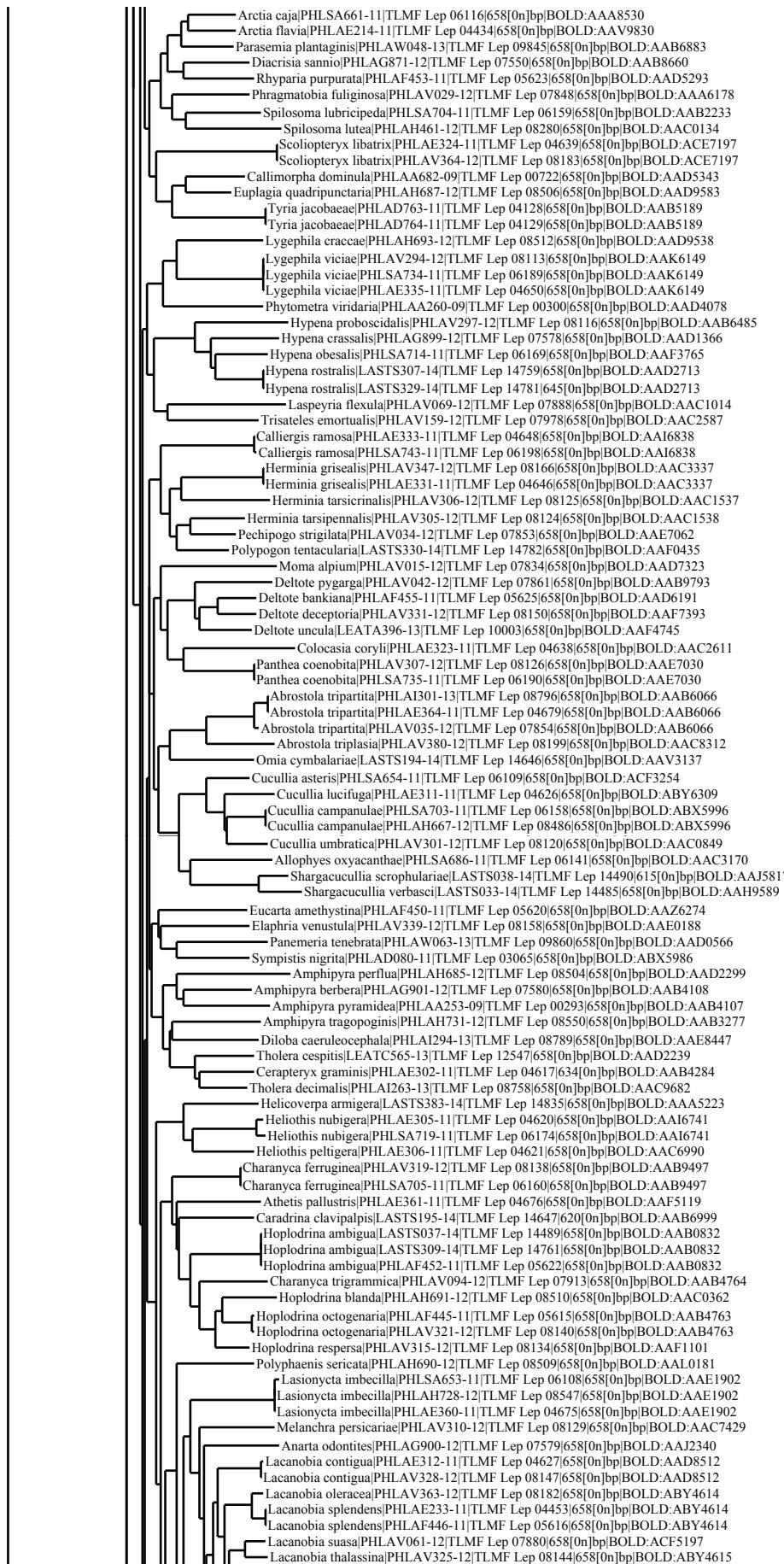


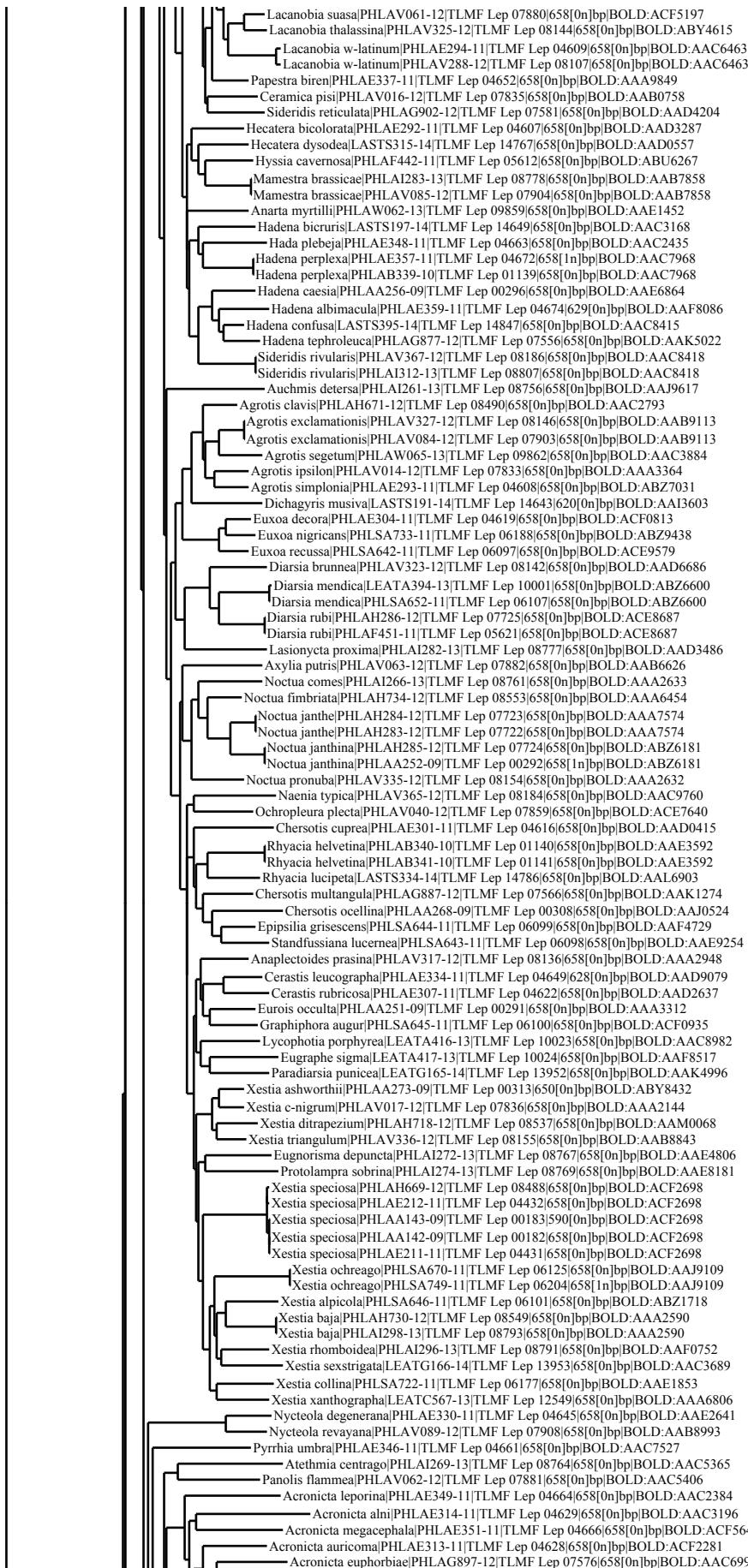


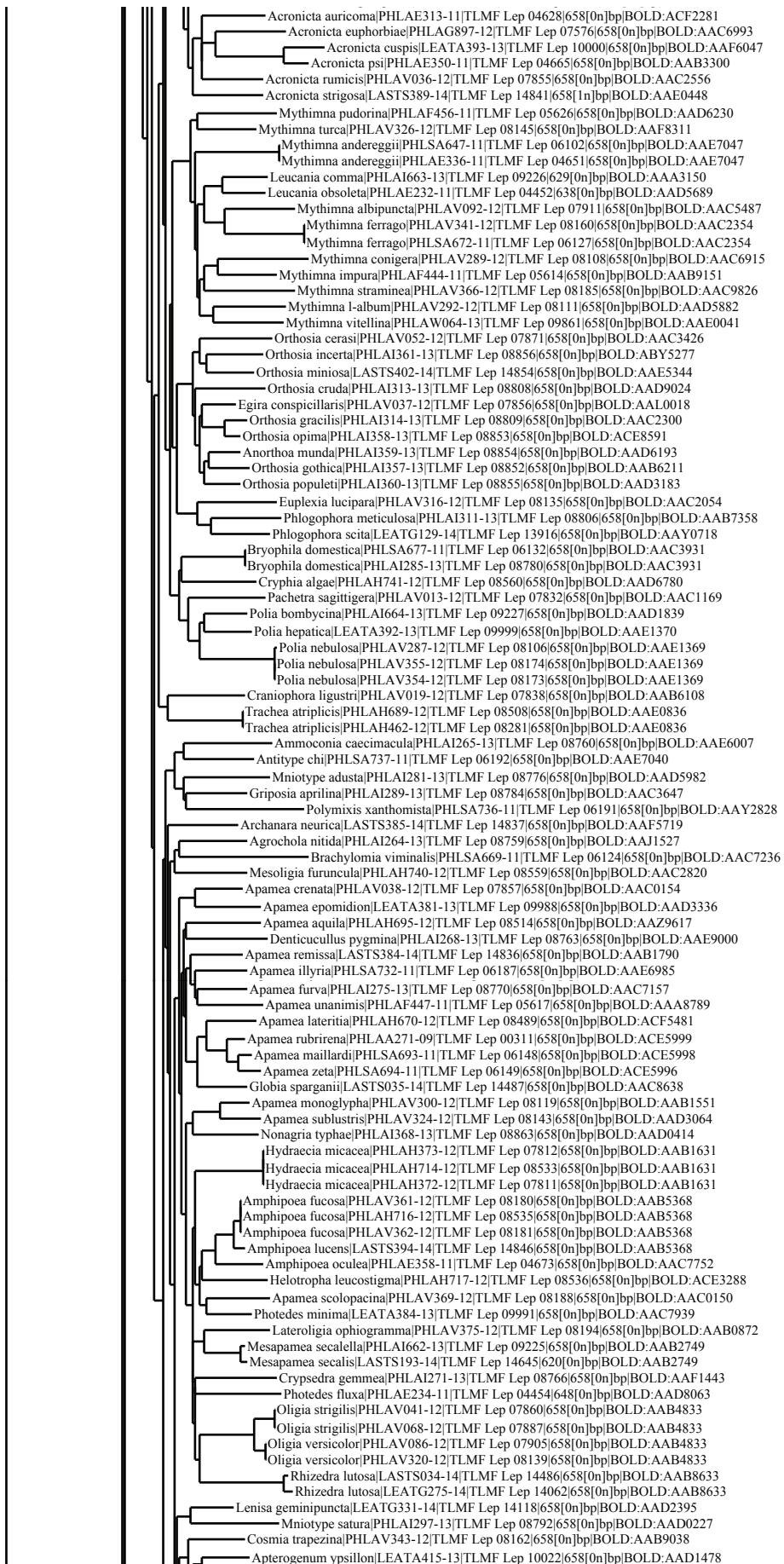


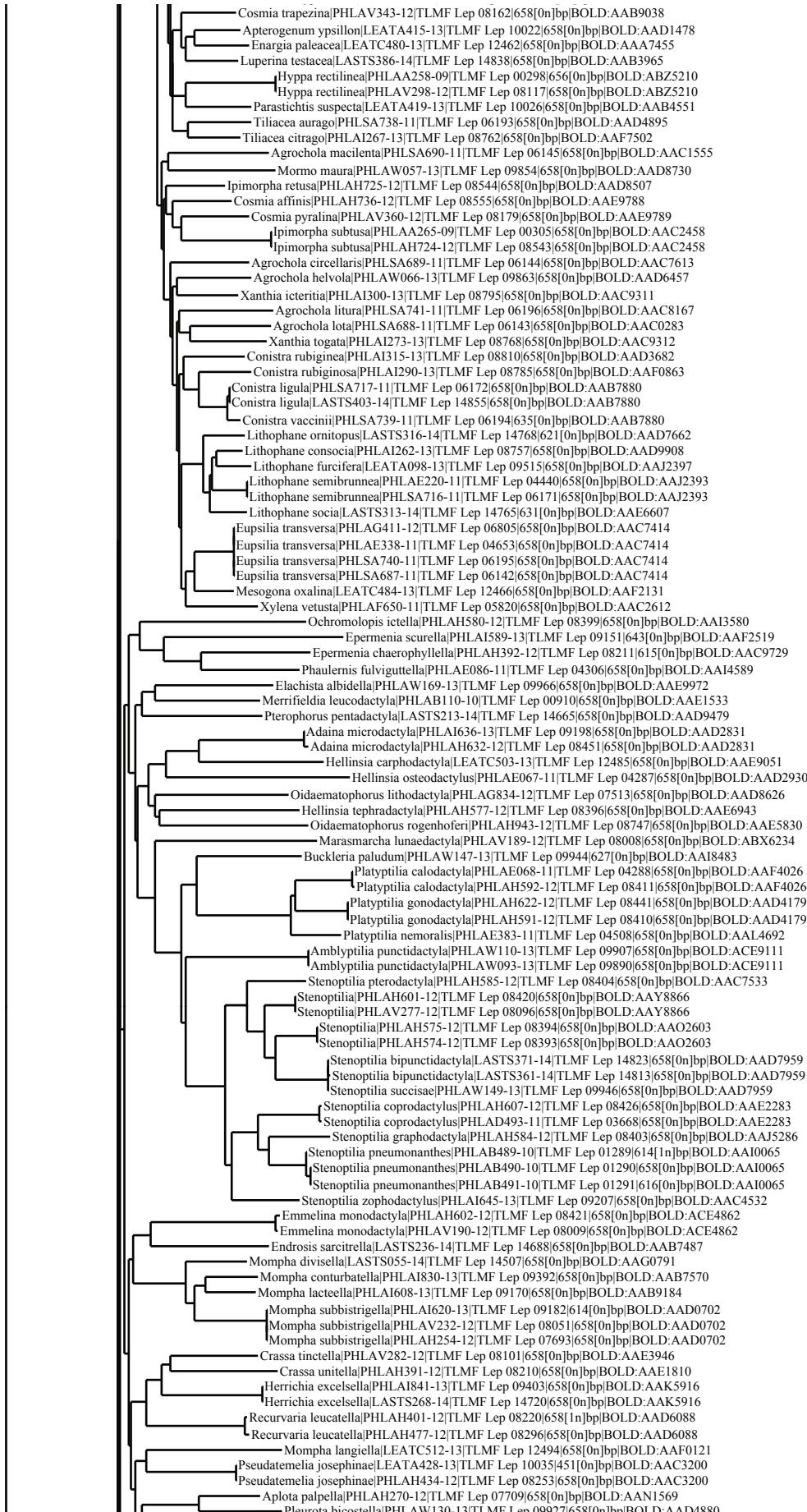


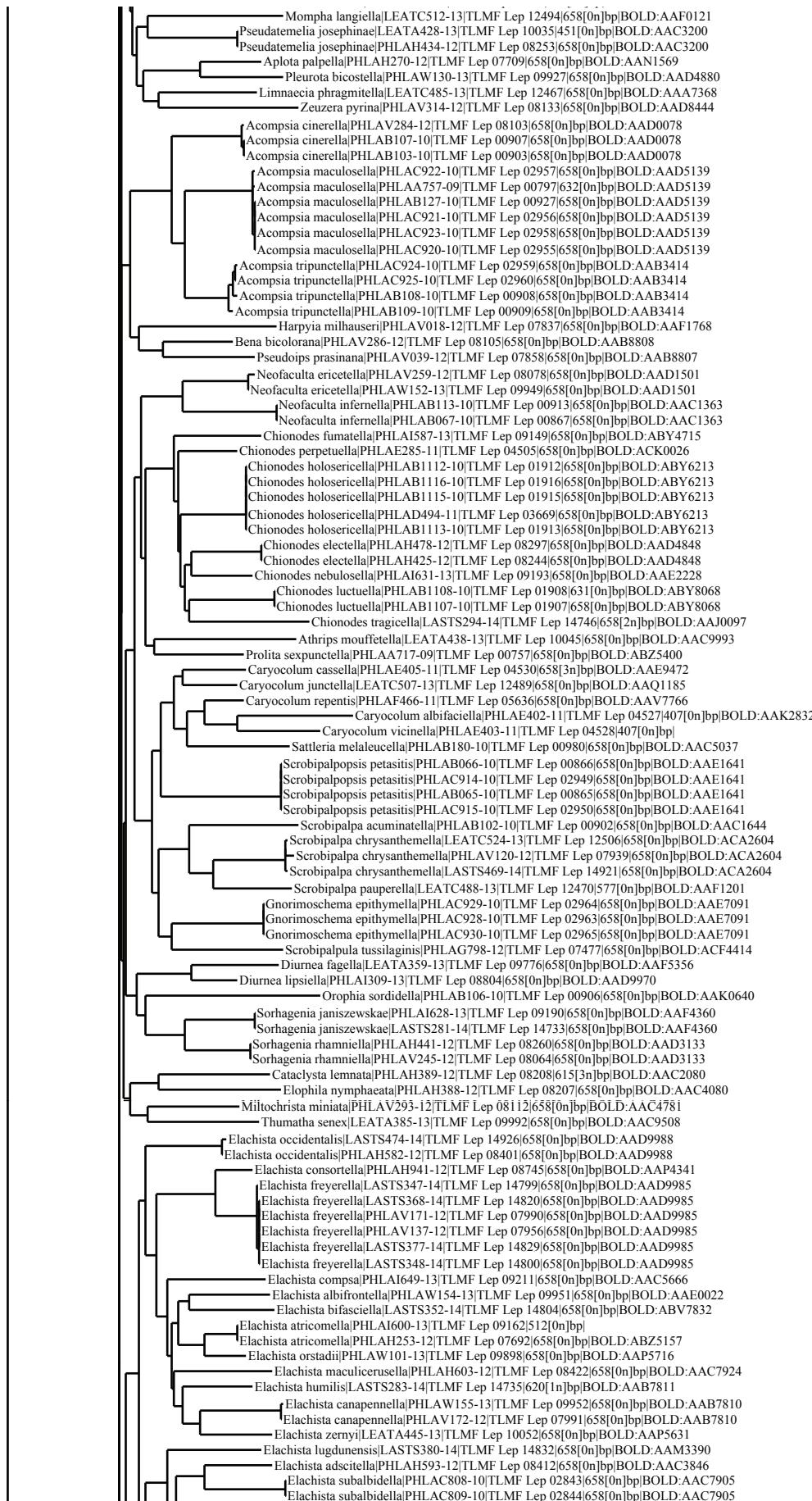


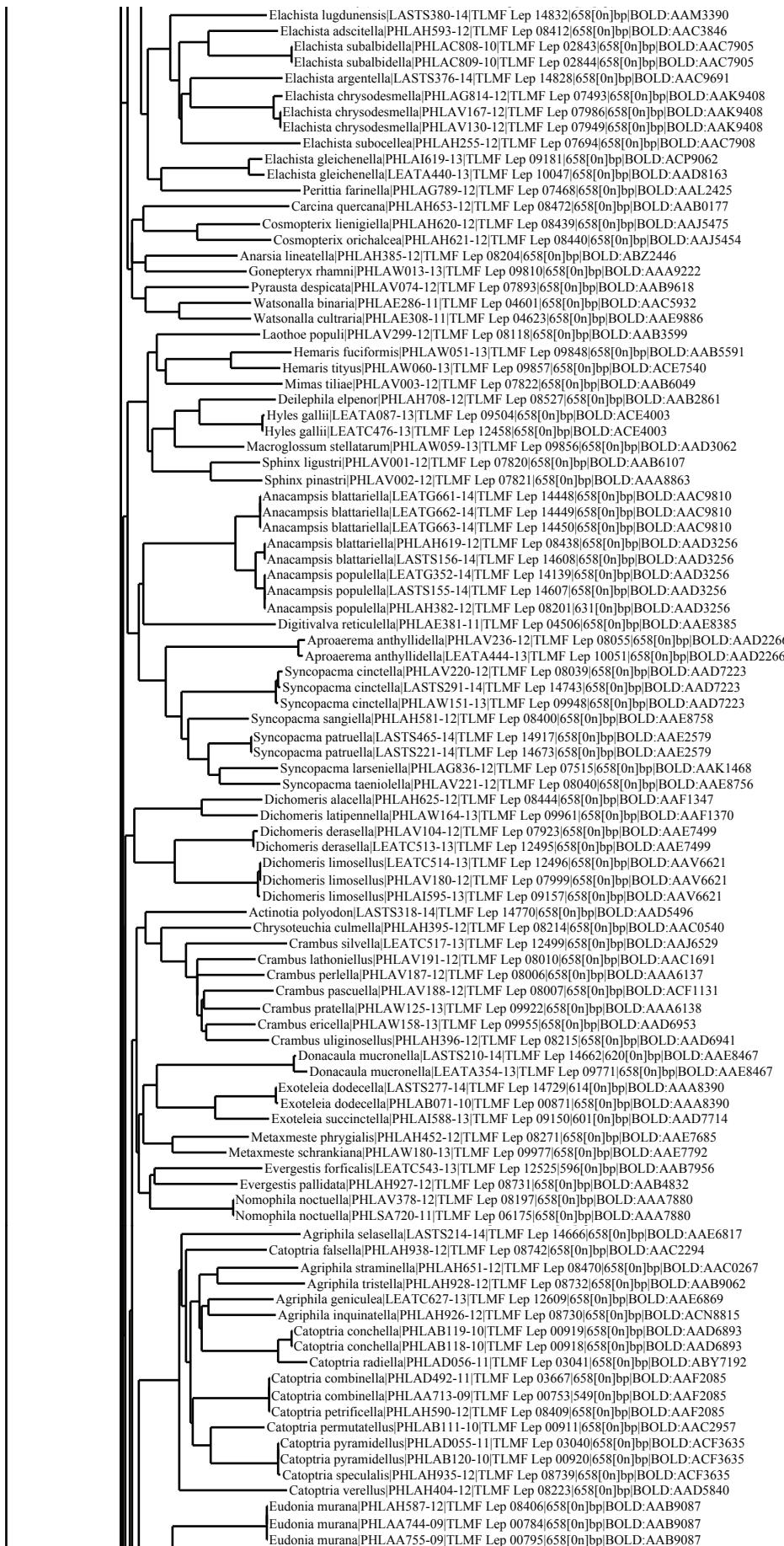


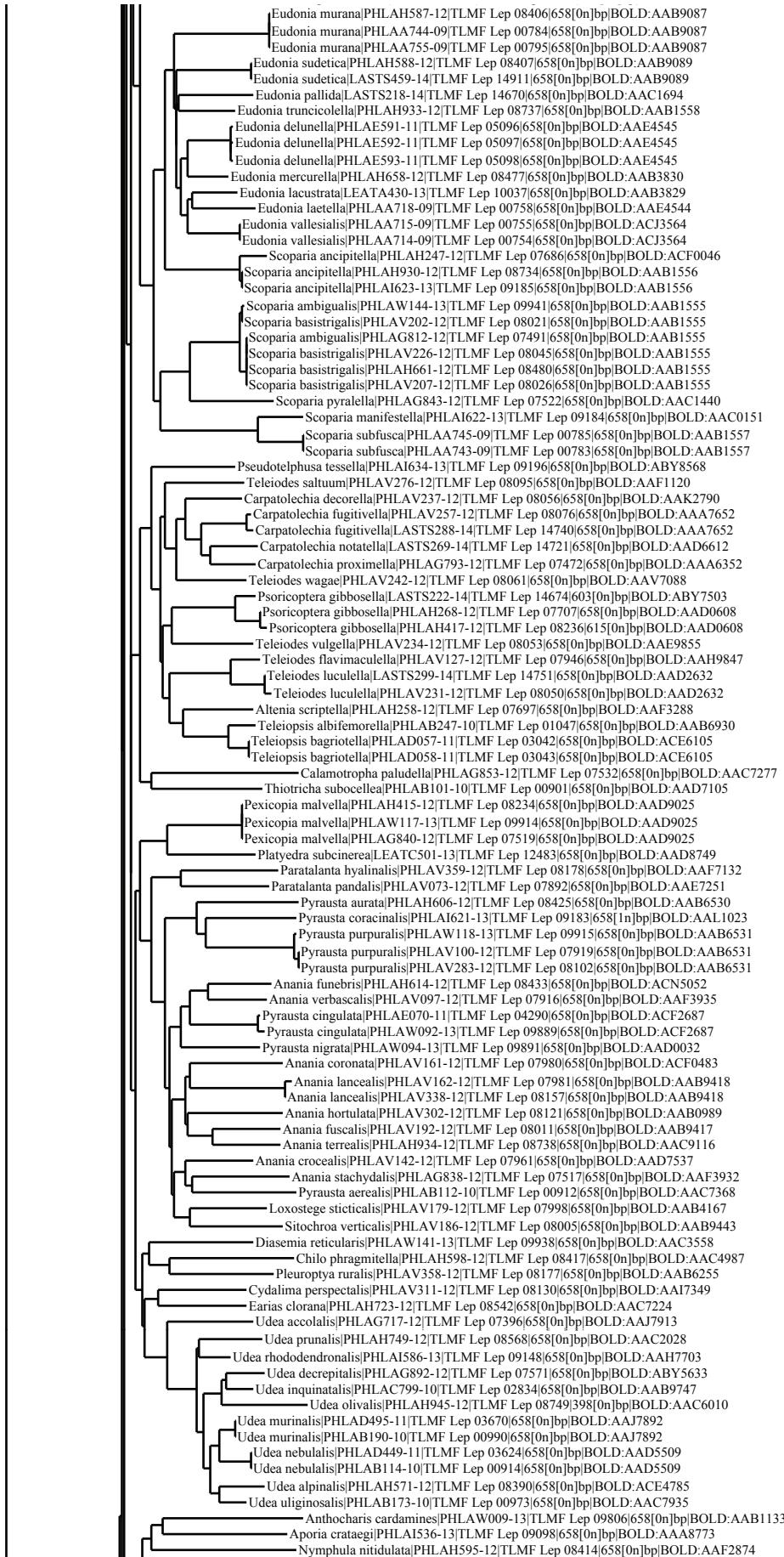


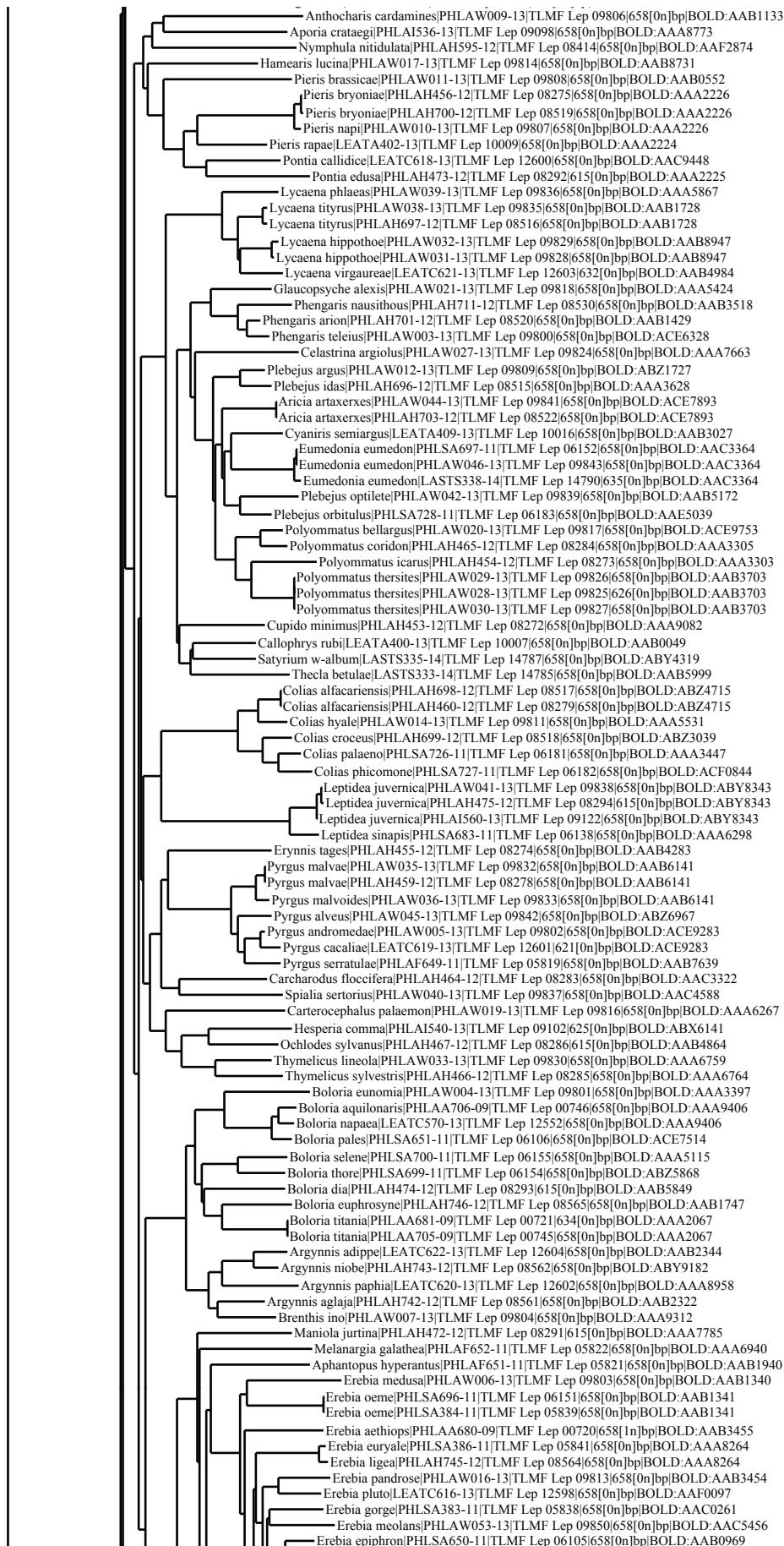


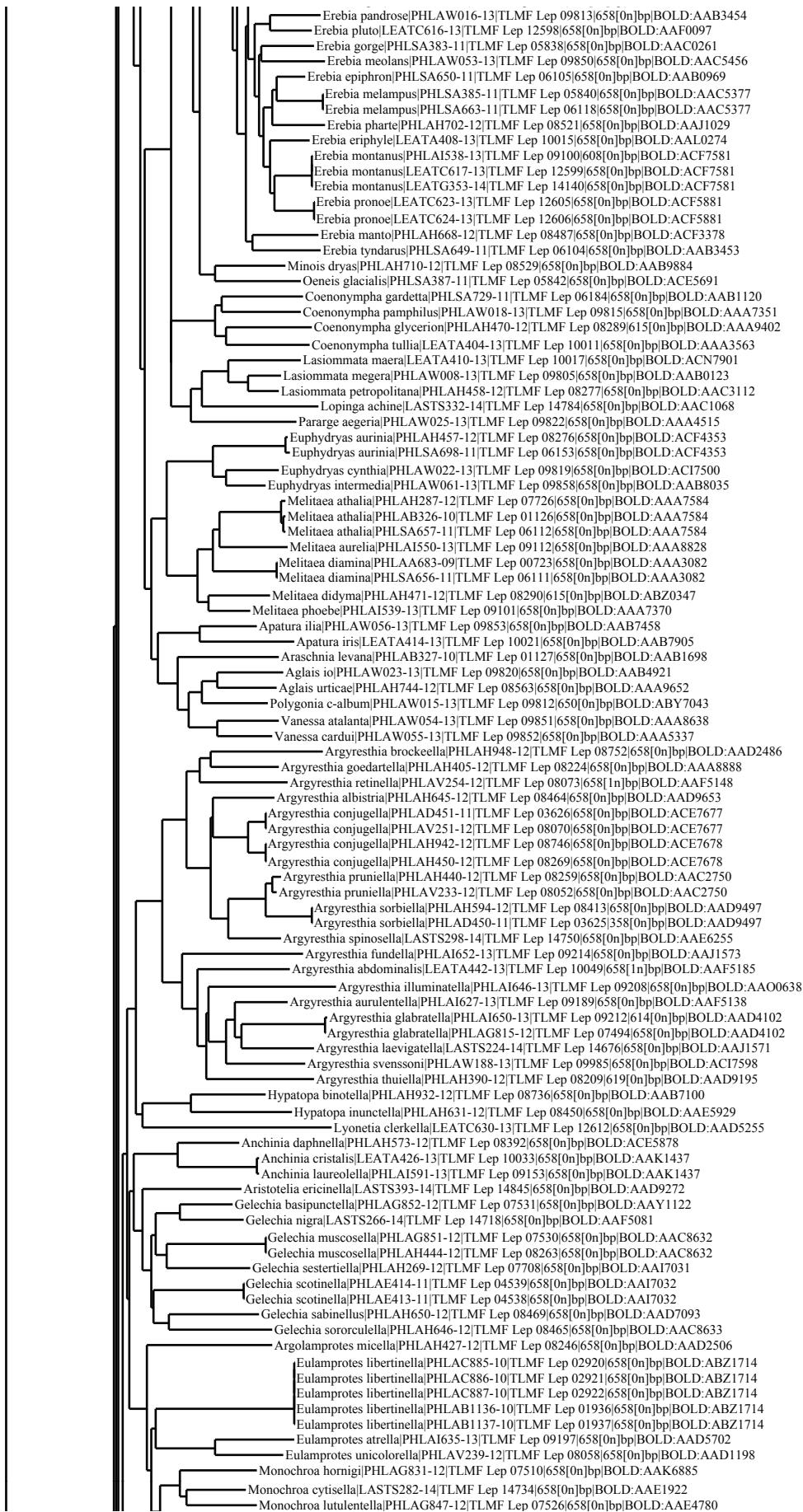


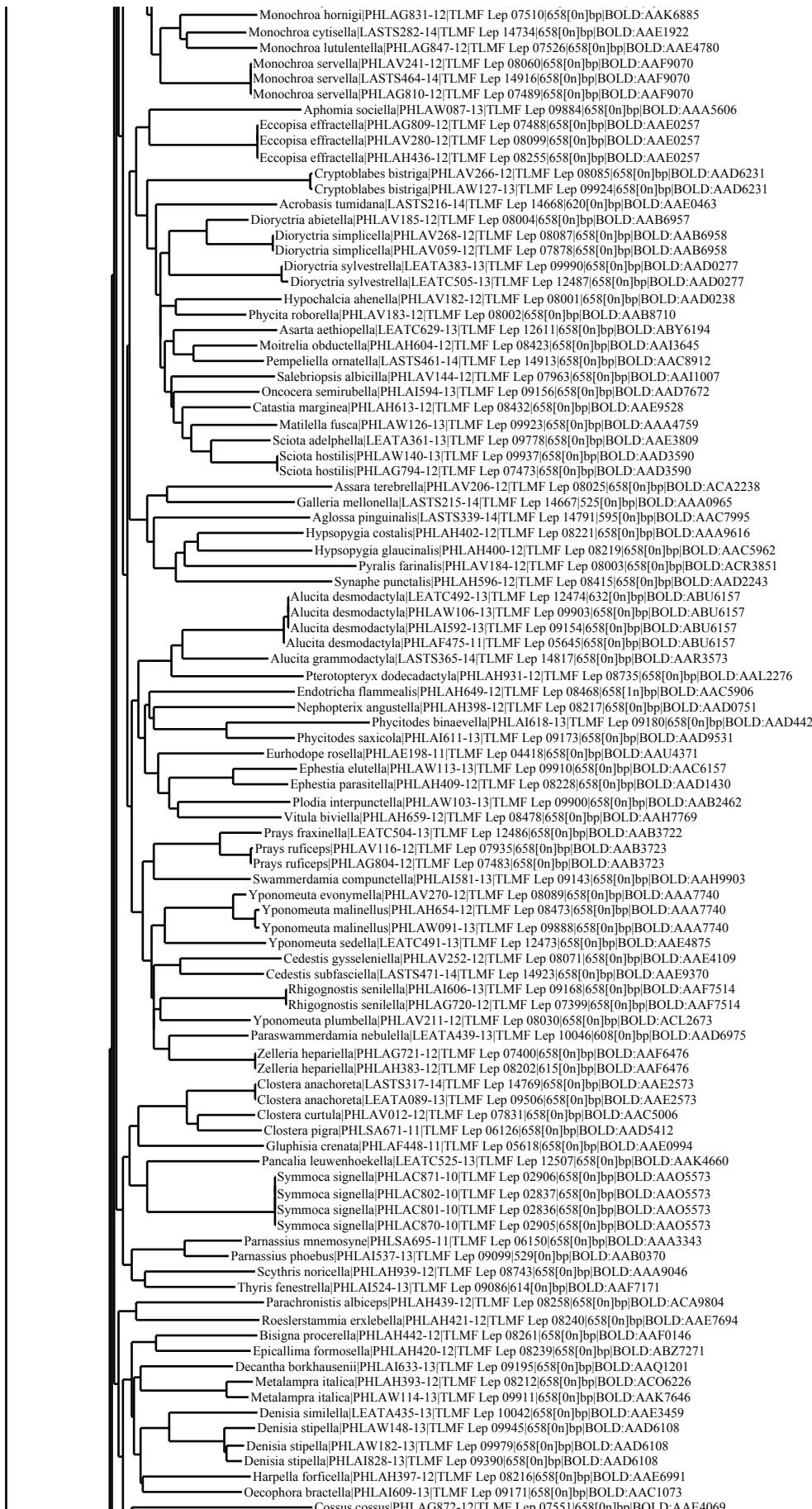


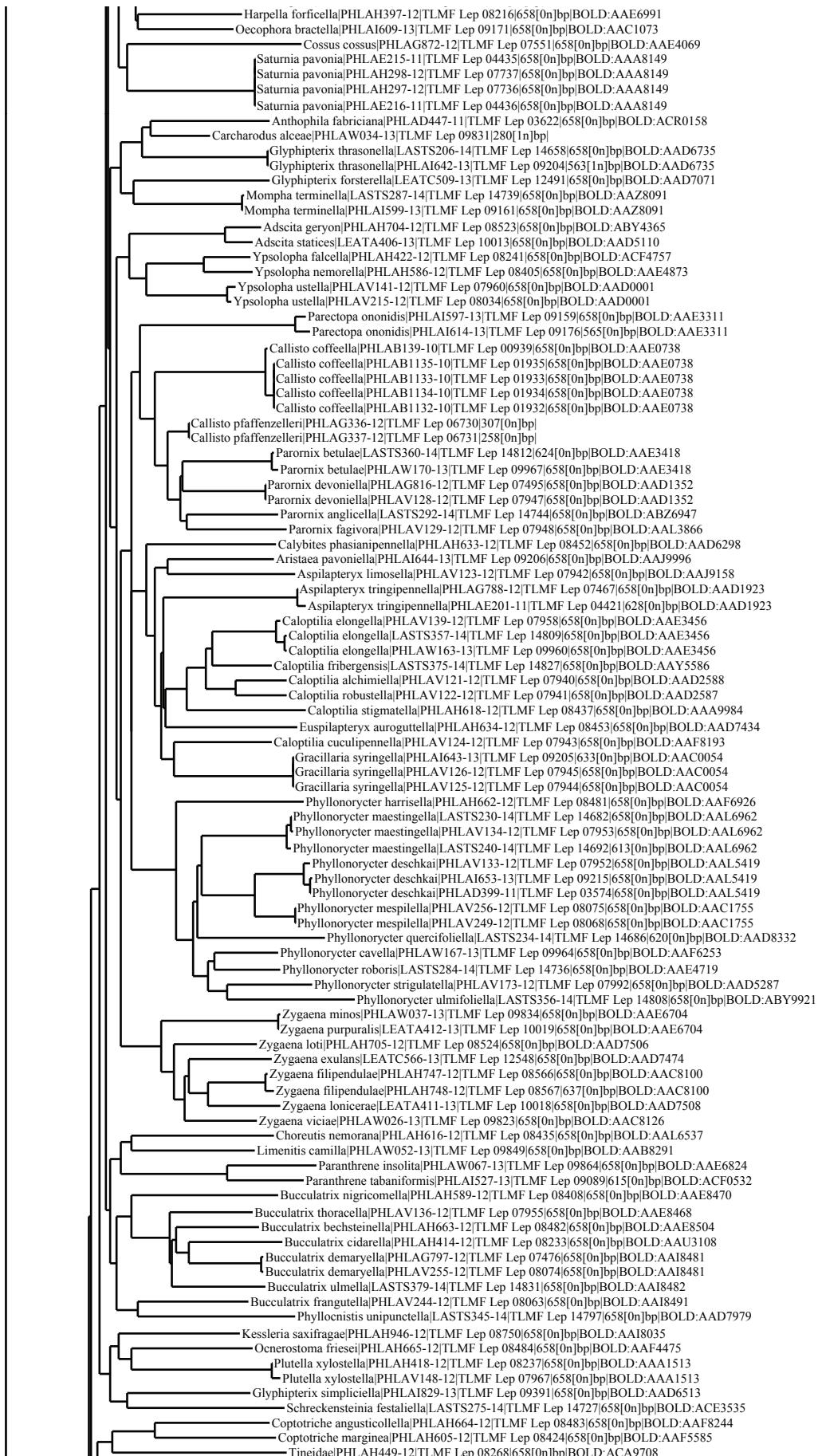


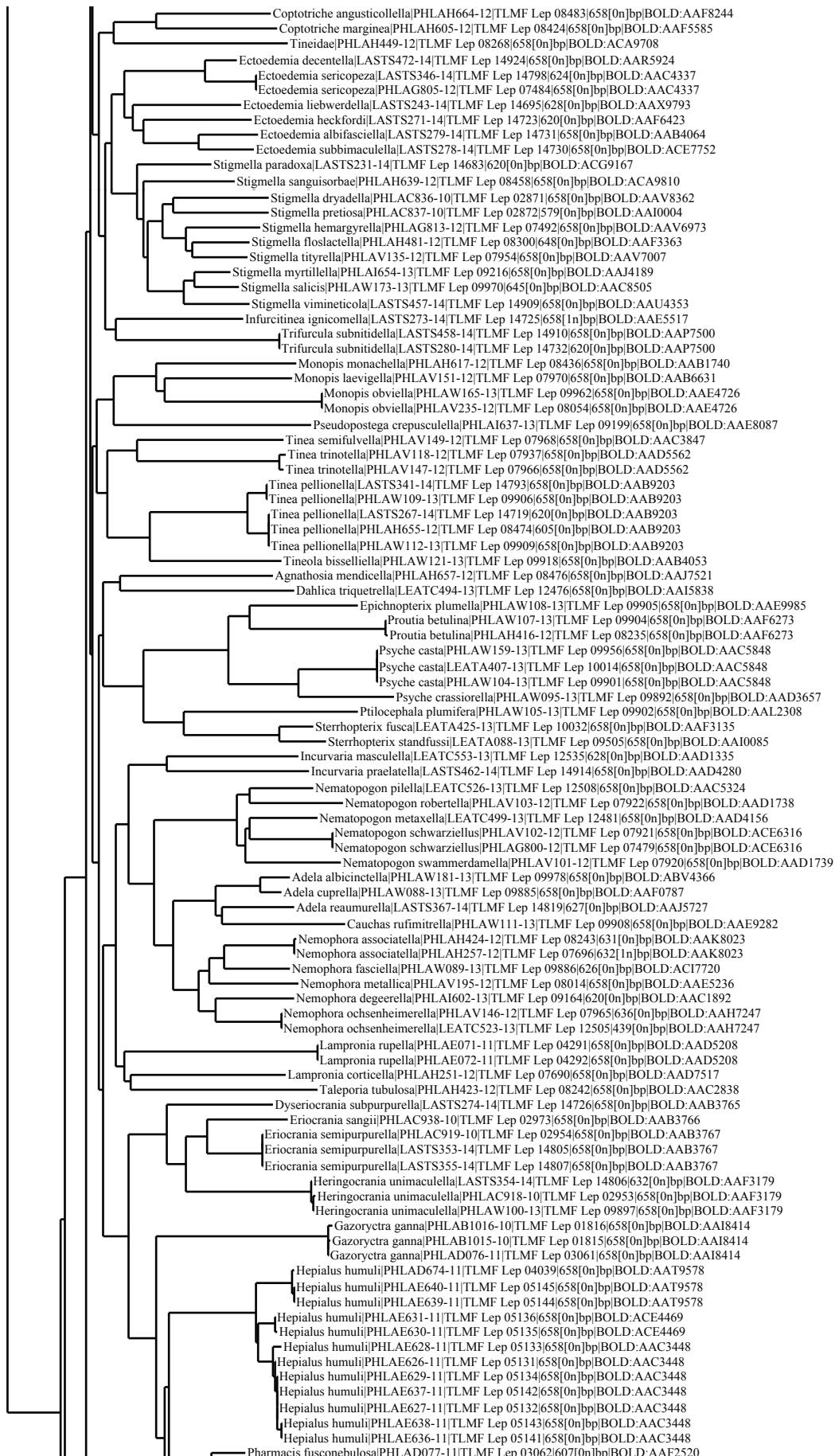


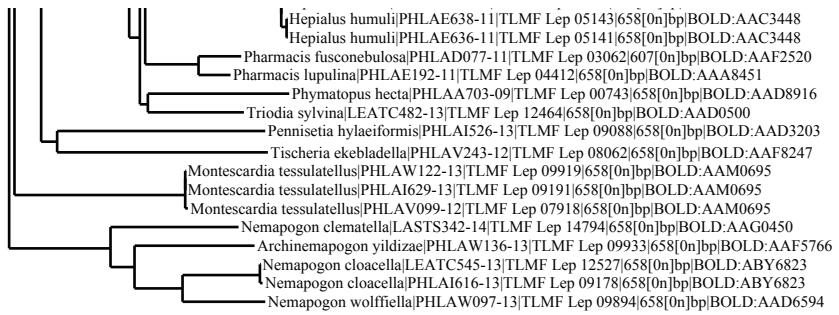












# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Inatura Forschung online](#)

Jahr/Year: 2015

Band/Volume: [15](#)

Autor(en)/Author(s): Huemer Peter, Hebert Paul D. N.

Artikel/Article: [DNA-Barcoding der Schmetterlinge \(Lepidoptera\) Vorarlbergs \(Österreich\) - Erkenntnisse und Rückschlüsse 1-36](#)