

Taxonomische Revolutionen 250 Jahre nach LINNÉ: Was DNA-Sequenzdaten sind, was sie können und was nicht

Michael BALKE

Dass es immer weniger Taxonomen gibt, ist für uns alle lange kein Geheimnis mehr, und dass die Arbeit der Taxonomen nicht weniger wird, nicht minder. In Zeiten rasanten Artenschwundes und bei gleichzeitig stetig wachsendem Bedarf an taxonomischen Ressourcen für Planungsverfahren, und zum Beispiel immer umfangreicheren ökologischen Studien, ist dieser Mangel an Taxonomen nun zum offensichtlichen Problem geworden. Diese taxonomische Misere, das "taxonomische Impediment", zu lindern, ist das Ziel zahlreicher globaler, nationaler und regionaler Initiativen.

Ich möchte hier einen derzeit besonders populären Ansatz beleuchten, den ich für vielversprechend halte, dessen nachhaltige Durchführung nur in enger Kooperation aller Taxonomen und beteiligten Wissenschaftler gelingen kann, und über den mehr bei mir im Labor in Erfahrung zu bringen ich Sie alle an dieser Stelle nachdrücklich einladen möchte.

Es geht um DNA Sequenzdaten. Ihre mögliche unterstützende Rolle in der Taxonomie wurde von TAUTZ et al. (2003, "DNA Taxonomie") und HEBERT et al. (2003, "DNA Barcoding") hervorgehoben. DNA Barcoding wurde zur weltweiten Bewegung (www.dnabarcoding.ca), welche es vermochte, Taxonomen, Molekularbiologen, Systematiker und (Wissenschafts-) Politiker im Rahmen eines gemeinsamen Vorhabens zusammenzubringen.

Hier werde ich kurz umreißen, was DNA Sequenzdaten sind, was sie als Werkzeug für die Taxonomie bewirken können – und was nicht.

Was ist DNS, oder DNA?

DesoxyriboNukleinSäure (im Englischen Säure = Acid) ist ein langes Kettenmolekül (Polymer) aus vielen Bausteinen, die man Desoxyribonukleotide oder kurz Nukleotide nennt.

Jedes Nukleotid hat drei Bestandteile: Phosphorsäure bzw. Phosphat, den Zucker Desoxyribose sowie eine heterozyklische Nukleobase oder kurz Base. Die Desoxyribose- und Phosphorsäure-Untereinheiten sind bei jedem Nukleotid gleich. Sie bilden das Rückgrat des Moleküls.

Wo findet man DNA ?

Jede Zelle eines Organismus beinhaltet DNA. Im Zellkern liegt sie in Form der **Chromosomen** vor. Im Zellplasma befinden sich zahlreiche identische kleinere ringförmige Genome in den Mitochondrien: die **mitochondriale DNA**, kurz **mtDNA**.

DNA wird oft als "Blaupause des Lebens" bezeichnet, denn sie beinhaltet die Anweisungen zum korrekten Aufbau eines Organismus und zu seinem Betrieb. *Bestimmte* Bereiche der DNA sind für *bestimmte* Funktionen und Bauelemente des Organismus verantwortlich. Solche Bereiche mit einer bestimmten Funktion nennt man **Gene**.

Also ist ein Gen ein Bereich der DNA, der z. B. für ein bestimmtes Protein kodiert, welches schließlich z.B. die Augenfarbe festlegt.

Jede Zelle eines Individuums hat dieselbe DNA. Das gilt auch für unterschiedliche Entwicklungsstadien. Die bedeutet, dass z. B. Larve, Puppe und Imago eines bestimmten Käfer-Individuums die gleiche DNA besitzen.

Wie ist die DNA aufgebaut?

DNA ist ein langes Molekül in Form einer Doppelhelix (= einer in sich verdrehten Leiter), bestehend aus zwei gegenüberliegenden DNA-Strängen. Die Seiten der Leiter sind alternierend Zucker (Deoxyribose) und Phosphate. Ihre Sprossen sind die Nukleotide, von denen es nur vier gibt. Diese vier Nukleotide (auch Basen genannt) sind: Adenin, Thymin, Guanin, Cytosin oder kurz A, T, G, C. Diese vier Buchstaben wird man immer dann sehen, wenn man sich DNA-Sequenzdatensätze ansieht. Doch dazu etwas später.

Die Nukleotide der beiden Stränge werden durch Wasserstoffbrücken zusammengehalten. Nukleotide paaren sich in einer bestimmten Weise, nach der Basenpaar-Regel:

Adenin paart sich mit Thymin (A-T)

Guanin paart sich mit Cytosin (G-C)

Diese Basenpaar-Regel ist von essentieller Bedeutung für alles Leben, denn dadurch sind die Basen entlang der beiden Stränge komplementär angeordnet, d. h. wenn auf einem Strang an einer bestimmten Position ein "T" vorliegt, *muss* auf dem Gegenstrang ein "A" liegen. Dies ist wichtig für die

DNA Replikation.

Dies ist der Prozess, bei dem DNA eine Kopie ihrer selbst anfertigt. DNA muss sich ständig replizieren, denn die Zellen des Organismus teilen und vermehren sich, damit Wachstum stattfinden kann und Reparaturen erfolgen können. Jede Zelle soll eine Kopie der DNA des Individuums in sich tragen, um funktionieren zu können.

DNA-Replikation ist semikonservativ, d. h. ein neuer Doppelstrang besteht immer aus einem "alten" Strang und einem neu synthetisierten. Damit werden Kopierfehler minimiert.

DNA wird also im Körper ständig kopiert – und das ist wichtig für den Molekularbiologen, denn der zugrunde liegende Mechanismus wurde geklärt, und man kann die Vervielfältigung von DNA heute ganz problemlos unter Laborbedingungen vornehmen. Wir kennen das Enzym, welches die Replikation treibt, und es kann problemlos gewonnen werden – die DNA-Polymerase.

Für die Funktion des Organismus ist wichtig, dass DNA eine Polarität hat, d.h. die beiden Enden des Moleküls haben verschiedene chemische Eigenschaften:

* jedes Gen hat einen Anfang und ein Ende, genannt 5' und 3'

* und wird im Organismus auch nur genau so gelesen – vom Anfang bis zum Ende, denn nur so wird sichergestellt, dass das gewünschte Produkt erzeugt wird. Man nennt dies Lesrichtung, 5' nach 3'

* im Labor können wir auch Genfragmente lesen (denn wir wollen ja keinen Organismus bauen), aber immer nur in Lesrichtung! Im Prinzip ist das wie beim Lesen – ohne Regeln und eine Ordnung wäre es hoffnungslos.

Daher kann man von einer DNA- oder zutreffender einer Nukleotid-SEQUENZ, oder kurz "Sequenz" sprechen, und

5'-ATGGCTGAACGTTTCGTAGGCT-3'

ist zum Beispiel verschieden von:

5'-ATCGCTGAACGTTACGTAGGCT-3'

da es an zwei loci Substitutionen gab. Man schreibt die Sequenz stets in der richtigen Lesrichtung, also 5'--3' Polarität.

Dies sind DNA-Sequenzdaten – oder genau genommen: Nukleotid-Sequenzdaten!

Um solche Daten produzieren und nutzen zu können, bedarf es nur dreierlei prinzipieller Schritte: (1) Feldarbeit und idealerweise taxonomische Bestimmung der Probe soweit es möglich ist, mit adäquater Konservierung der Probe, (2) Laborarbeit, (3) Auswertung der Daten.

1. Feldarbeit / taxonomische Bearbeitung

Interessanterweise ist weithin kaum verstanden, dass genau dies der wichtigste, kostenintensivste Schritt des gesamten Unterfangens ist. Während es noch trivial ist, eine Reihe von häufigen Arten aufzusammeln, wird der Aufwand, der zur sinnvollen Ergänzung von Datensätzen notwendig ist, mit jeder benötigten Art kaum kalkulierbar grösser.

Bevor Proben ins Labor gelangen, sollten sie zu einem bestimmten Grad bestimmt sein, auch dies ist keine triviale Aufgabe – man stelle sich ein 50ml Plastikröhrchen vor, gefüllt mit gemischten Käfern und Wanzen aus dem Lichtfang. In Venezuela.

Wie sollen Proben konserviert werden?

Kurz: Schlechte Konservierung = schlechte Resultate – jeder bei der Konservierung gesparte Euro = potentieller Verlust von > 10 Euro im Labor.

Proben müssen zügig entwässert werden - das ist alles.

Wasser im Gewebe führt dazu, dass DNA in kleine Stücke zersetzt wird. Dies gilt es zu verhindern. Ethanol von 95 - 100% bietet sich aufgrund der einfachen Handhabung an. Dabei soll reiner Alkohol verwendet werden, da Zusatzstoffe die DNA verändern können, reiner Alkohol ist Ethanol, man könnte ihn als extrem hochprozentigen Vodka bezeichnen. Notfalls ist sogenannter vergällter Alkohol oder Spiritus verwendbar, oder hochprozentige Spirituosen, allerdings ist dann ein möglichst zügiger Transfer in reinen Alkohol angezeigt.

Ethanol entwässert Gewebe, und damit dies effizient funktioniert, muss der Alkohol hochprozentig sein. Der Alkohol im Sammelgefäß muss in der Regel gewechselt werden – denn sobald ein Insekt in den Alkohol gegeben wird, wird der Alkohol verdünnt. Dies geschieht, da aus dem Gewebe Wasser in den Alkohol diffundiert – der gewünschte Effekt. Je mehr Gewebe eingetragen wird, desto stärker ist jedoch diese Verdünnung, und desto weniger effektiv wird Gewebe entwässert. Daher wechselt man den Alkohol.

TIP: Im Gelände wechsele ich am Nachmittag oder Abend, und hebe den 1. “Abfallalkohol” in einem 50ml Röhrchen für den nächsten Tag auf, um grössere Käfer abzutöten, da der Abfallalkohol in der Regel immer noch stark genug ist, um Gewebe anfänglich zu entwässern. Nachdem ich in der Regel nach einer Stunde des Sammelns dieses Recycling-Röhrchen etwas mit grösseren Käfern gefüllt habe, wird der Alkohol abgegossen und durch 100% ersetzt.

- Möglichst große Behälter für die Entwässerung verwenden.
- Alkohol wechseln, denn er wird durch das Gewebewasser verdünnt! Ich wechsele je nach Füllung der Behälter, Grösse der Individuen, und “Bauchgefühl” mindestens 2x – am Abend, und dann meist im Laufe der folgenden Woche. Wenn man jedoch zum Beispiel *wirklich* nur ein Lepidopterenbein oder eine winzige Wanze in einem gefüllten 2ml Röhrchen konserviert, ist ein Alkoholwechseln nicht notwendig.
- Später, zum Transport, können kleinere Behälter verwendet werden, zum Flug kann der Alkohol abgegossen werden, und nur getränkter Zellstoff verbleibt in jenen Röhrchen, welche grössere Insekten enthalten. Am Zielort sofort auffüllen!
- Ein Behälter kann mehrere Arten enthalten.
- Besonders große Tiere kann man wie gewohnt abtöten, ich verwende eine Ethanol-Injektion ins Abdomen, und entnehme dem Insekt dann ein Hinterbein, welches ich in einem 2-8 ml Röhrchen konserviere. In diesem Fall muss allerdings auch das dazugehörige Insekt separat aufbewahrt und bezettelt werden – denn man will ja in der Regel später wissen, welche DNA zu welchem Individuum gehört. Bei Lepidopteren hätte man zum Beispiel ein Briefchen mit dem Falter, und ein Röhrchen mit einem Bein, und beide hätten z. B. die Nummer BAY-00089.

TIP: Wenn man z. B. bei einem Käfer den Prothorax mit einer Pinzette nach dorsal biegt, bricht der Käfer zwischen Hinterleib und Prothorax auf – dort sieht man dann zahlreiche Muskelfasern, welche

für die DNA-Extraktion besonders wertvoll sind. Erscheinen diese Muskelfasern eben als feste Fasern und von schneeweisser Farbe, war die Konservierung hervorragend. Braune gallertartige Masse wäre das Gegenteil – völlige Zersetzung, mit wenig Aussicht auf Erfolg bei der geplanten Laborarbeit.

2. Laborarbeit

Dieser Schritt sei hier nur sehr stark vereinfacht dargestellt. Bitte, kontaktieren Sie mich bei Interesse, denn ich lade gerne zu einem "Einführungskurs" in unser DNA-Labor ein.

Ziel ist es zunächst, DNA dem Gewebe zu entnehmen und sie zu purifizieren. Das heisst, man möchte eine Lösung haben, die Wasser, oder einen Puffer, sowie DNA enthält, nicht aber Proteine, welche die folgenden Schritte vereiteln könnten. Nun soll ein bestimmtes Fragment, in der Regel Teil eines Gens, der DNA in großen Mengen erzeugt werden – denn nur so kann die Nukleotid-Sequenz dieses Zielfragmentes, oder Genfragmentes, später maschinell bestimmt werden. Diese Vervielfältigung erfolgt durch die Polymerase-Ketten ("chain" im Englischen)-Reaktion, oder kurz: PCR.

Man benötigt dazu eine DNA-Probe, ein Enzym, welches DNA vervielfältigt (die DNA-Polymerase), sowie einen Puffer, der unter anderem die einzelnen Bausteine der DNA enthält, also die vier Nukleotide. Diese benötigt die Polymerase als Baumaterial, um einen bestimmten Genbereich der in der Probe enthaltenen DNA zu kopieren und zu kopieren und zu kopieren – wobei das Wachstum exponentiell ist, und der Genbereich definiert ist durch zwei dem PCR-Gemisch beigefügte Primer. Ein Primerpaar, das sind 2 kurze DNA-Stücke, die an der Ausgangs-DNA ein bestimmtes Genstück, in der Regel 400-800 Nukleotide lang, zum Ziel haben und genau dort, und nur dort, die Vervielfältigung steuern. Tatsächlich sind alle benötigten Zutaten heute in benutzerfreundlichen Paketen erhältlich, und die Standard-DNA Extraktion und PCR kann innerhalb weniger Stunden durchgeführt werden. Das PCR-Produkt wird dann als Ausgangsmaterial für die Sequenzierreaktion verwendet, an deren Ende man wiederum eine Vervielfältigung des gewünschten Genfragmentes erzielt hat, wobei Nukleotide fluoreszenzmarkiert sind und dann von einem Laser in der Sequenziermaschine detektiert werden. Der Sequenzierer liest also die Nukleotid-Sequenz, besser, detektiert 4 verschiedene Wellenlängen, deren Bedeutung wir festgelegt haben und übersetzen können in eine Nukleotid-Sequenz, da bekannt ist, welches Nukleotid welche Fluoreszenzmarkierung hat, z. B. also ATAAGCAGTTAC und so weiter. Meistens werden mitochondriale Gene (mtDNA) untersucht, denn sie sind sehr variabel und für Untersuchungen auf Artniveau gut geeignet, vor allem aber sehr zuverlässig sequenzierbar, da sie in jeder Zelle in den Mitochondrien in sehr großer Anzahl vorliegen.

3. Auswertung der Daten

Sobald zwei oder mehr Sequenzen vorliegen, kann die Divergenz zwischen ihnen verglichen werden, d. h. in wie vielen Positionen sich Unterschiede finden. Bei etwa 650 Nukleotiden des Gens cytochrome c oxidase 1 (co1 oder cox1) ist z. B. die Divergenz innerhalb einer Morphospezies in der Regel geringer als 2%, zwischen Arten ist sie höher, um die 5% oder mehr. Sequenzdaten lassen sich rasch mit dem von Rudolf MEIER und Koautoren entwickelten Programmpaket TaxonDNA sortieren und ihre Divergenzen analysieren (code.google.com/p/taxondna/downloads/list). Den Informationsgehalt gerade größerer Datensätze kann man auch in Form eines Diagramms in Baumform visualisieren (z.B. mit der Software Garli, www.zo.utexas.edu/faculty/antisense/garli/Garli.html), wobei prinzipiell dargestellt wird, wie ähnlich die verschiedenen Sequenzen zueinander sind – und der Taxonom kann dann entscheiden, ob z. B. die 10 Sequenzen in « Gruppe 1 » zu einer Morphospezies gehören, und die 7 Sequenzen in « Gruppe 2 » sowie die einzelne Sequenz in « Gruppe » 3 zu zwei weiteren Morphospezies, oder vielleicht nur zwei Populationen einer Morphospezies sind, die morphologisch identisch, aber genetisch verschieden sein mögen. Die Entscheidung, wieviele Arten vorliegen, können DNA-Sequenzdaten dem Taxonomen nicht abnehmen – sie sind nur ein

weiteres Indiz auf dem Weg zu einer überzeugenden Klassifikation. Erfahrungswerte, basierend auf umfangreichen organismenspezifischen Datensätzen, können sicherlich hilfreich sein, was aber tun, wenn eine Morphospezies viele genetisch sehr unterschiedliche Populationen aufweist? Zusammenfassend ist hier zu sagen: DNA-Sequenzdaten können eine sehr große Hilfe für den Taxonomen sein, vor allem, wenn große Divergenzen zwischen Populationen zum « nochmal hinschauen » anisieren und sich dann auch morphologische Unterschiede finden. Auch können sie eine große Hilfe darstellen, wenn es darum geht, z. B. Larven oder Weibchen einer bestimmten Morphospezies zuzuordnen. Oft zeigt sich, dass Populationen genetisch mehr oder weniger divergieren – und dies hat vor allem Bedeutung für den Naturschutz! Alle diese Fälle wird man in der praktischen Arbeit häufig antreffen und so zu faszinierenden, neuen An- und Einsichten gelangen.

Was können DNA-Sequenzdaten nicht? Dass eine DNA-Sequenz nicht automatisch Auskunft gibt, was eine Art ist und was nicht, wurde bereits erwähnt. Besonders trickreich ist jedoch der Fall junger Arten, denn sequenziert werden in aller Regel Gene, die nicht unmittelbar dazu beitragen, wie sich die Morphologie oder das Verhalten verändern, wenn neue Arten entstehen! Dies bedeutet: Haben sich Arten erst relativ rezent getrennt, dann können sie durchaus morphologisch sehr unterschiedlich erscheinen und sich auch sehr unterschiedlich verhalten. Die DNA-Sequenzen, welche wir untersuchen, können jedoch durchaus entweder identisch sein, oder sehr ähnlich, oder « nicht geordnet » sodass in einer genetischen Gruppe von 10 Tieren 6 Sequenzen (1, 2, 3, 4, 5, 6) liegen, die zu Morphospezies A gehören, und 4 Sequenzen (7, 8, 9, 10), die zu Morphospezies B gehören, wobei z. B. Sequenz 1 identisch mit 9 und 10 ist, Sequenzen 2, 3, 4 sehr ähnlich 7 sind, und 5 und 6 eher 8 ähneln. Dies liegt daran, dass unser untersuchtes Gen nach der Artbildung in den zwei Schwesterarten noch nicht durch die Evolution « sortiert » wurde – wenn man also nur die DNA-Sequenz betrachtet, ist es nicht möglich zu entscheiden, welche Morphospezies sie repräsentiert. Dieses Szenario wird oft als Sonderfall bezeichnet, eine Eigentümlichkeit, die man vielleicht auf jungen ozeanischen Inseln antreffen mag. Untersuchungen z. B. an Wasserkäfern zeigen jedoch, dass solche Fälle überall auf der Welt auftreten können, so auch im eiszeitlich geprägten Europa, mit seinen zahlreichen sehr jungen Arten!

Mein Fazit daher: DNA Sequenzdaten sind eine fantastische Quelle neuer Information. Sie können viel, aber nicht alles, für die Taxonomie bewirken. Nur sorgfältig zusammengestellte Datenbanken gepaart mit taxonomischer Expertise lassen sie zum einem Werkzeug werden, welches im Rahmen der Taxonomie nachhaltig gutes bewirken kann und wird.

Literatur

- HEBERT, P. D. N., CYWINSKA, A., BALL, S. L. & J. R. DEWAARD 2003: Biological identifications through DNA barcodes. - *Proceedings of the Royal Society of London, Series B* **270** (1512), 313-321.
- TAUTZ, D., ARCTANDER, P., MINELLI, A., THOMAS, R. H. & A. P. VOGLER: 2003: A plea for DNA taxonomy. – *Trends in Ecology & Evolution* **18**, 70-74.

Anschrift des Verfassers:

Dr. Michael BALKE,
 Zoologische Staatssammlung München
 Münchhausenstraße 21
 D-81247 München
 E-mail: coleoptera-zsm@zsm.mwn.de

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Nachrichtenblatt der Bayerischen Entomologen](#)

Jahr/Year: 2008

Band/Volume: [057](#)

Autor(en)/Author(s): Balke Michael

Artikel/Article: [Taxonomische Revolutionen 250 Jahre nach Linné: Was DANN-Sequenzdaten sind, was sie können und was nicht 90-94](#)