©Ampulex online, Christian Schmid-Egger; download unter http://www.ampulex.de oder www.zobodat.at

DNA-Barcoding – Revolution in der Taxonomie?

Dr. Christian Schmid-Egger[1], Dr. Stefan Schmidt[2]

[1] Fischerstraße 1 | 10317 Berlin | Germany | christian@ampulex.de | www.bembix.de
[2] Zoologische Staatssammlung München | Münchhausenstraße 21 | 81247 München | Germany | hymenoptera.zsm@gmail.com

Zusammenfassung

Die Autoren geben eine Übersicht über den aktuellen Stand und neue Entwicklungen im bayerischen, bzw. deutschlandweiten Barcoding der Hymenopteren. Beim DNA-Barcoding von Tieren wird ein Genabschnitt des mitochondrinalen Cytochrome c Oxidase I (COI)-Genes sequenziert und in einer Datenbank im Internet frei zur Verfügung gestellt. Die nationalen Barcoding-Projekte sind Teil des weltweiten International Barcode of Life-Projektes (iBOL) des Forschers Paul Hebert in Guelph/Kanada, bei dem die Zoologische Staatsammlung München die Daten deutscher Tierarten zuliefert. Anhand des COI-Genabschnittes, des DNA-Barcodes, können nahezu alle Tierarten sicher und kostengünstig voneinander unterschieden werden. Die erste Projektphase verfolgt das Ziel, Barcodes von möglichst vielen deutschen Hymenopterenarten zur Verfügung zu stellen. Bei den Stechimmen ist dieses Ziel zu etwa 90 Prozent erreicht. Mit den Barcodes sind verschiedene Nutzanwendungen denkbar: Identifikation von Präimaginalstadien, Identifikation von Schädlingen, die Konservierung taxonomischen Wissens, die Neubewertung kritischer Arten oder Artengruppen. Bisher sind die Ergebnisse vor allem bei den Stechimmen sehr ermunternd. So konnten bereits verschiedene Zwillingsartenkomplexe geklärt sowie neue Zwillingsarten in Mitteleuropa entdeckt werden. Der Artikel beschäftigt sich ebenfalls mit der Kritik am Barcoding und zeigt, dass häufig vorgebrachte Argumente gegen das Barcoding nicht haltbar sind.

Summary

Christian Schmid-Egger, Stefan Schmidt: **DNA-Barcoding – Revolution in taxonomy?** An overview is given about current status and new developments of DNA barcoding projects in Germany. DNA Barcoding of animals uses a short, standardised fragment of the mitochondrial cytochrome c oxidase I (COI) gene, the DNA barcode. The DNA sequences and associated data are stored in a database that is accessible through the internet. The German barcoding projects are part of the international Barcode of Life Project (iBOL). iBOL was initiated in 2009 by the Canadian researcher Paul Hebert and the Zoologische Staatssammlung in Munich provides data of German animals. The barcode fragment allows to reliably and cheaply identify animals to species level. The first project phase aims to generate barcodes of as many German animal species as possible. For the aculeate wasps this aim has been achieved for about 90% of the species. DNA barcoding can be used for a wide range of different application, including the identification of pest species, preservation of taxonomic knowledge, and taxonomic revisions of critical species or complexes of species. So far the results for aculeate wasps are very encouraging and several taxonomically difficult species complexes were resolved and new cryptic species were discovered in Central Europe. The criticism of the barcoding is discussed and it is shown that common arguments against the method are not tenable.

1. Einleitung

Seit rund zehn Jahren ergänzt die molekulargenetische Technik des DNA-Barcoding die klassische morphologische Taxonomie von Insekten und anderen Organismengruppen, sowohl bei Tieren als auch Pflanzen (Tautz et al. 2004, Hausmann 2011). Die Zoologische Staatsammlung München (ZSM) ist seit 2006 an einem weltweiten Projekt beteiligt, bei dem Forscher genetische „Barcodes" aller Tierarten erfassen und in einer Internet-Datenbank frei verfügbar machen (siehe www.boldsystems.org). Diese „Bibliothek des Lebens" und die damit verbundenen Möglichkeiten stellen derzeit eines der innovativsten Projekte in den Biowissenschaften dar. Das DNA-Barcoding bietet vielfältige Möglichkeiten, Arten zu determinieren, aber auch völlig neue Einblicke in die Taxonomie und Phylogenie von Arten zu bekommen.

Auf der anderen Seite hat das Barcoding auch Kritik hervorgerufen und manche konventionell arbeitende Taxonomen und Ökologen verunsichert. Gerüchte über die „Abschaffung der morphologischen Bestimmungsarbeit" bis hin zum Überflüssigwerden von insektenkundlichen Experten machen die Runde.

In unserem Artikel wollen wir am Beispiel der Stechimmen (Hymenoptera: Aculeata) darstellen, was Barcoding ist, was es kann und wo seine Möglichkeiten, aber auch seine Grenzen liegen. Als Datenbasis und Erfahrungshorizont stehen uns derzeit mehr als 4.000 Sequenzen bayerischer, bzw. mitteleuropäischer Stechimmen von etwa 990 Arten zur Verfügung.

2. Was ist Barcoding?

Im Jahr 2003 entwickelte der kanadische Forscher und Entomologe Paul Hebert von der Universität Guelph bei Ontario die Idee, Arten mit Hilfe eines kurzen und standardisierten Genfragmentes zu bestimmen (Hebert et al. 2003). Die Idee dahinter ist so einfach wie genial: Nahezu alle Tierarten besitzen in den Mitochondrien, den Kraftwerken der Zelle, das Gen für die Cytochrome Oxidase 1 („cox-1" oder „COI"). Aus diesem lässt sich schnell und kostengünstig eine bestimmte Region sequenzieren, die 658 Basenpaare lang ist. Das Besondere an dieser Sequenz ist, dass sie sich bei (fast) allen Arten unterscheidet, während sie bei Populationen innerhalb einer Art auch von verschiedenen Fundorten

©Ampulex online, Christian Schmid-Egger; download unter http://www.ampulex.de oder www.zobodat.at

weitgehend identisch bleibt. Sie ist daher vor allem zur Unterscheidung von Taxa auf dem Niveau der Art oder Gattung geeignet. Bedingt lassen sich damit auch populationsgenetische Fragestellungen untersuchen, die Forschung zum letzteren Punkt steht jedoch noch am Anfang.

Die sehr geringe genetische Variabilität dieses COI Genfragmentes innerhalb einer Art sowie der große Unterschiede, beziehungsweise eine große genetische Distanz zwischen verschiedenen Arten ergibt die so genannte „Barcoding Gap" (= Barcoding-Lücke), die das DNA-Barcoding überhaupt möglich macht.

Diese Barcode-Sequenz entspricht somit einem Wort aus 658 Buchstaben, welche im Unterschied zum normalen Alphabet nicht aus 24, sondern nur aus insgesamt vier „Buchstaben" aufgebaut ist, nämlich den vier Basen, aus denen die DNA gebildet wird. Wenn also der genetische Code des COI-Gens einer Art bekannt ist, können weitere Individuen derselben Art genetisch damit determiniert werden. Damit können Forscher auch unbekannte Tiere mit Hilfe einer genetischen Datenbank einfach und vor allem fehlerfrei bestimmen, auch wenn sie keine Experten für die entsprechende Gruppe sind. Das setzt natürlich voraus, dass alle Arten einer bestimmten Tiergruppe und einer geografischen Region in der Datenbank vorhanden sind und sich genetisch einwandfrei voneinander abgrenzen.

Damit ist die einfache, aber geniale Idee von Paul Herbert beschrieben.

Der kanadische Forscher und Visionär wurde Anfangs für seine Idee belacht, weil es doch über 1.8 Millionen beschriebene Organismenarten auf diesem Planeten gibt und die Aufgabe schier unerfüllbar erschien. Die Anzahl der unbeschriebenen Arten wird zudem noch um einiges höher geschätzt und liegt nach neuesten Schätzungen bei rund 9 Millionen Arten (Mora et. al 2011).

Doch Hebert machte sich ans Werk, konnte kanadische Institutionen von seiner Idee begeistern, gründete das Projekt iBOL (International Barcode of Life) und baute in Guelph ein zentrales Forschungszentrum auf. Dieses stattete er neben einem Team hoch motivierter und kompetenter Mitarbeiter vor allem mit leistungsfähigen Maschinen zur Gensequenzierung sowie einer funktionalen Datenbank aus, die über ein Internetportal die Verwaltung der Daten für alle Mitarbeiter weltweit erlaubt.

Um die Datenbank auch mit Gensequenzen zu füllen, suchte und fand Hebert schnell Projektpartner in aller Welt. Diese stellten ihm sicher determinierten Referenzexemplare, beziehungsweise genetische Proben dieser Tiere zur Verfügung. In Kanada sequenzierten die Forscher die Proben und füllten die iBOL-Datenbank mit den Referenzdaten.

Inzwischen kann das Projekt iBOL beeindruckende Erfolge vorweisen. Hebert war es möglich, eine sehr grosse Anzahl von Genproben von determinierten Belegexemplaren zu gewinnen und auch verschiedene methodische Probleme und Schwierigkeiten bei der Genanalyse in den Griff zu bekommen. Mittlerweise enthält die kanadische Datenbank Sequenzen von rund 113.000 Tierarten, 40.000 Pflanzenarten, und 2.300 Pilzen und anderen Lebensformen. Das ehrgeizige Ziel des iBOL-Projektes ist es, bis zum Dezember 2015 Barcodes von 500.000 Arten zu erstellen.

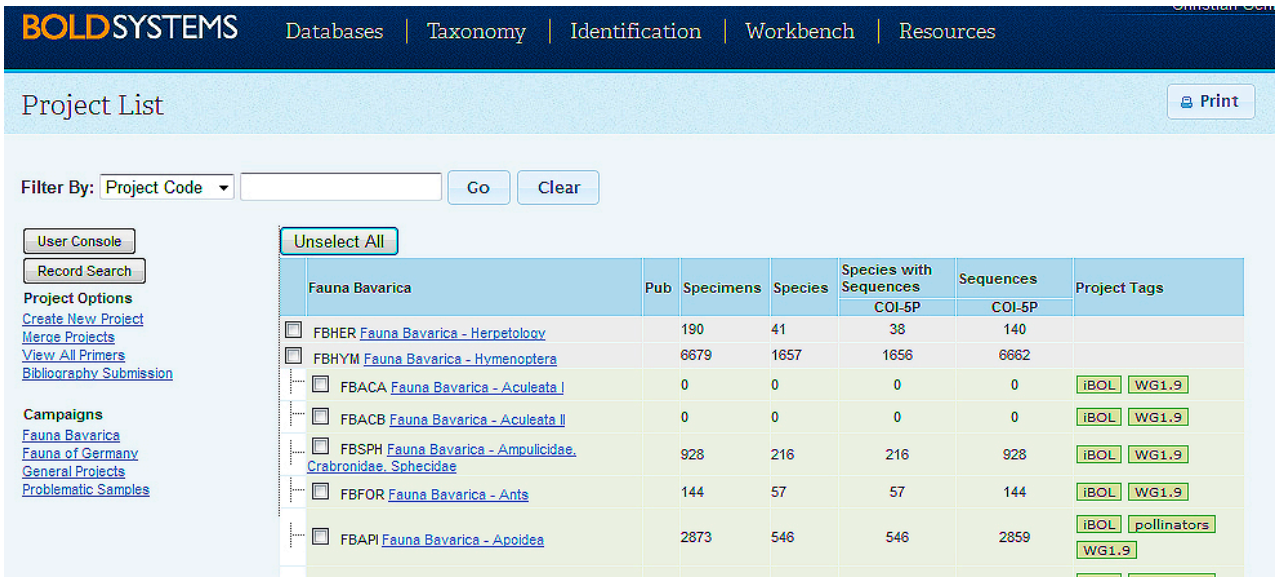

Abb. 1: Auszug (Screenshot) aus der aktuellen ibol-Datenbank mit Anzahl aktueller Barcodes im Bayern-Projekt.

©Ampulex online, Christian Schmid-Egger; download unter http://www.ampulex.de oder www.zobodat.at

Infokasten Vom Gen zum ‚Baum'

Wie kommt es überhaupt dazu, dass sich die Genome zweier Arten unterscheiden? Gene unterliegen ständig Mutationen. Meist tauschen sich einzelne Basenpaare einfach aus, oder es werden ganze Genabschnitte ausgetauscht und an einer anderen Stelle eingelagert. Wenn diese Mutation ein hoch proteinkodierendes Gen wie das COI-Gen betrifft, kann der Austausch einer Aminosäure für den Träger tödlich sein. Das betreffende Individuum entwickelt sich erst gar nicht. Die Mutation kann jedoch auch neutral sein. In diesem Fall bleiben die Aminosäuren identisch, nur die Sequenz ändert sich.

Bei Artbildungsprozessen wird in der Regel eine kleine Teilpopulation von der Hauptpopulation abgespalten und entwickelt sich im weiteren Zeitverlauf unterschiedlich weiter. Sobald in dieser Teilpopulation eine erfolgreiche genetische Veränderung – eine Mutation – stattfindet, kann sich diese in der gesamten Teilpopulation ausbreiten, während die Stammpopulation ohne diese Mutation auskommt. Beide Populationen sind ab diesem Zeitpunkt genetisch unterschiedlich und behalten diesen genetischen Unterschied auch in den folgenden Generationen bei, wenn die Unterschiede so groß sind, dass sie sich nicht mehr untereinander paaren. Fortan können sie genetisch unterschieden werden. Natürlich besagt die Mutation in der Teilpopulation noch nicht, dass sich aus den beiden Populationen bereits selbständige Arten entwickelt haben.

Dieser Prozess ist hier natürlich nur sehr einfach und schematisch dargestellt, da die wirklichen Artbildungsprozesse sehr viel komplexer ablaufen.

Als Besonderheit kann das Barcoding-Gen nur über weibliche Tiere weitervererbt werden, weil es nicht im Zellkern, sondern in den Mitochondrien lokalisiert ist. Diese werden bei der sexuellen Paarung in der Regel nicht zwischen den Partnern ausgetauscht, sondern nur vom Weibchen wie in einer Klonlinie direkt an die Nachkommen weitergegeben. Männchen tragen das COI-Gen allerdings auch und können damit ebenfalls „gebarcodet" werden.

Bei der Genanalyse im Barcoding wird der Abstand zur nächsten Population in Prozent (der veränderten DNA) ermittelt. Das Ergebnis wird als „Baum" („tree") bezeichnet. Aus der Lage der Äste (die Äste entsprechen den einzelnen Individuen) lässt sich die Stellung der Individuen, Populationen und Arten zueinander erkennen.

Das primäre Ergebnis der Barcoding-Daten stellt allerdings noch keinen echten phylogenetischen Stammbaum („phylogenetic tree") dar, sondern zeigt nur Ähnlichkeiten auf und wird „neighbor-joining-tree" genannt. Dieser ist in idealer Weise dazu geeignet, um auch nahe verwandte Arten gegeneinander abzugrenzen. Ein „neighbor-joining-tree" hat den Vorteil, dass er sich viel schneller erstellen lässt als ein phylogenetischer Stammbaum, dessen Berechnung bei großen Datenmengen sehr viel Zeit beansprucht. Es ist auch möglich, aus den Barcoding-Sequenzen mit entsprechenden Computer-Programmen phylogenetische Beziehungen zu untersuchen. Ein solcher Stammbaum sagt dann aus, wie sich die Arten aufgespalten haben könnten, allerdings nur auf Basis des COI-Gens. Je nach verwendeter Methode ergibt dies zum Beispiel einen „maximum-likelihood-tree", „Mr Bayes-tree" oder einen „parsimony-tree".

Bei einem solchen Stammbaum werden alte Mutationen vorangegangener Artaufspaltungen miteinander verglichen. Wenn also Art A eine gemeinsame Mutation mit den Arten B und C trägt, sich Art B und C jedoch durch eine weitere Mutation unterscheiden, die bei A nicht vorkommt, so lässt sich daraus ableiten, dass A die Stammart zu B und C ist.

Die Aussagen zur Phylogenie höherer Taxa (Tribus, Unterfamilie, Familie, Ordnung etc) durch das COI-Gen sind allerdings äußerst beschränkt, weil der untersuchte Genabschnitt relativ kurz ist und sich das Gen relativ schnell weiterentwickelt. Dadurch können identische Mutationen zufällig auch bei nicht miteinander verwandten Taxa auftreten, die dann bei der Auswertung als Verwandtschaft interpretiert werden. Zudem ‚verrauschen' die phylogenetischen Signale bei hoher Mutationsrate mit zunehmender Zeitdauer schnell durch Hin- und Rückmutationen. Als Faustregel gilt, dass die phylogenetischen Aussagen des Barcoding vor allem innerhalb der Gattungen (Artengruppen und Arten) sehr präzise sind, während sie bei den höheren Taxa (Familie etc.) unschärfer werden. Nicht selten gruppieren aber auch die Gattungen zueinander entsprechend ihrer mutmaßlichen Verwandtschaft. Für aussagekräftige genetische Phylogenien der höheren Taxonomie sollten jedoch möglichst mehrere Gene und vor allem auch Kerngene untersucht werden. Mehr zu diesem Thema findet sich auch weiter unten.

©Ampulex online, Christian Schmid-Egger; download unter http://www.ampulex.de oder www.zobodat.at

3. Der bayerische Beitrag zum Barcoding

Seit dem Jahr 2006 ist die Zoologische Staatsammlung München Projektpartner von iBOL. Die Wissenschaftler der ZSM gründeten 2009 ein eigenes Projekt – Barcoding Fauna Bavarica (www.faunabavarica.de) – mit dem Ziel, alle etwa 34.000 in Bayern nachgewiesenen Tierarten genetisch zu erfassen und die Barcodes über die iBOL-Datenbank (‚BOLD') international verfügbar zu machen. Ziel war es, bis 2014 Sequenzen von mindestens 10.000 Arten zu generieren, eine Zahl, die mittlerweile schon übertroffen wurde. Die beiden Autoren des vorliegenden Artikels, Stefan Schmidt und Christian Schmid-Egger betreuen in diesem Projekt die Stechimmen. Die Blattwespen (Symphyta) werden zusätzlich von Andreas Taeger, Andrew Liston, und Stephan Blank im Deutschen Entomologischen Institut in Müncheberg bearbeitet, während Stefan Schmidt außerdem die parasitischen Hymenopteren verwaltet.

3.1 Die Methode

Proben für die DNA-Gewinnung können von getrockneten Sammlungstieren gewonnen werden. Darin liegt ein grosser Vorteil des Projektes. Die Forscher in Guelph verbesserten die Methoden zur DNA-Gewinnung aus Museumsexemplaren im Lauf der vergangenen Projektjahre zudem beträchtlich. Derzeit ist es möglich, brauchbare DNA aus getrockneten Tieren zu gewinnen, die mehrere Jahrzehnte alt sind. Erklärtes Ziel der Guelpher Forscher ist es, auch altes Typusmaterial genetisch verfügbar zu machen. Inzwischen wurden die Methoden so verfeinert, dass sich über 200 Jahre alte Typenexemplare von Schmetterlingen erfolgreich sequenzieren ließen.

Entscheidend für die Qualität der DNA ist vor allem die Art der Tötung und die Aufbewahrung der Belegtiere direkt nach dem Töten. Alkohol konserviert das Erbmaterial, Feuchtigkeit und damit verbundene Zersetzungsprozesse oder Formaldehyd zerstören sie. Optimalerweise werden die Tiere daher direkt in 96-prozentigem Ethanol abgetötet und die Proben im Kühlschrank in Alkohol gelagert oder rasch verarbeitet. Doch auch Tiere, die aus dem Alkohol heraus getrocknet werden, funktionieren auch nach Jahren noch sehr gut. Alternativ können die Tiere auch im Gefrierfach getötet und genadelt werden.

Für Praxiszwecke reicht es auch aus, die Tiere in 80prozentigem vergällten Ethanol abzutöten oder nach sehr kurzer Verweildauer in Essigsäureethylester sofort zu nadeln.

Letztendlich hängt der Erfolg der Sequenzierung von verschiedenen Faktoren ab und kann nur schwer vorhergesagt werden. Bei bis zu 10 Jahre altem Sammlungsmaterial aus verschiedenen Herkünften liegen die Erfolgsraten bei rund 70 – 100 Prozent, bei 10 – 20 Jahre alten Exemplaren meist bei rund 40 – 60 Prozent. Zur DNA-Gewinnung reicht ein Bein oder bei größeren Insekten gar nur der Tarsus aus. Das Belegtier bleibt somit weitgehend erhalten und kann später nochmals überprüft werden. Routinemäßig entnehmen die Techniker in der ZSM ein Mittelbein für die Probe, weil es nach allgemeiner Erfahrung die wenigsten bestimmungsrelevaten Merkmale bei den Hymenopteren trägt. Kleinere Insekten wie zum Beispiel parasitische Wespen, die oft nur wenige Millimeter groß sind, werden als Ganzes extrahiert und anschließend präpariert. Die Extraktion erfolgt damit zerstörungsfrei.

3.2 Die Voucherexemplare

Das iBOL Projekt machte von Anfang an zur Vorraussetzung, dass jeder Barcode mit einem überprüfbaren Belegtier (Voucher) in der Sammlung verbunden ist. Diese Voucherexemplare spielen eine zentrale Rolle im Barcoding. Sie werden mit einer eindeutigen Nummer versehen, die mit der Nummer in der BOLD-Datenbank übereinstimmt, routinemäßig fotografiert und in öffentlichen Sammlungen wie der ZSM aufbewahrt. Alle Daten wie Fundort, Datum, Sammler und zahlreiche weitere Infos sind in der BOLD-Datenbank zusammen mit dem Referenzfoto abgelegt und verfügbar.

Die Voucherexemplare bestimmen letztendlich, welcher Barcode für welche Art steht. Daher werden beim Barcoding streng genommen keine Tiere determiniert, sondern das zu prüfende Tier über den Barcode mit einem Referenz-Voucherexemplar verglichen. Die Determinations-Qualität der Voucherexemplare bestimmt daher letztendlich, wie gut das Barcoding funktioniert. Dieser Unterschied ist wesentlich, weil er viel von der Kritik entschärft, die am Barcoding geübt wird.

Zu den Aufbauarbeiten der BOLD-Datenbank zählt damit die Pflege der entsprechenden Datensätze und die ständige Überprüfung der Tiere, deren Barcodes nicht mit den übrigen Barcodes der mutmaßlich selben Art übereinstimmen. Fehlerquellen gibt es viele. Sie reichen von Fehlbestimmungen über Fehlern in der Bearbeitung der Tiere bis hin zu Kontaminationen bei der Gen-Sequenzierung. Daher akzeptiert BOLD eine Art auch erst als registriert, wenn sie durch mindestens zwei Belegtiere gleicher Sequenz in der Datenbank vertreten ist.

©Ampulex online, Christian Schmid-Egger; download unter http://www.ampulex.de oder www.zobodat.at

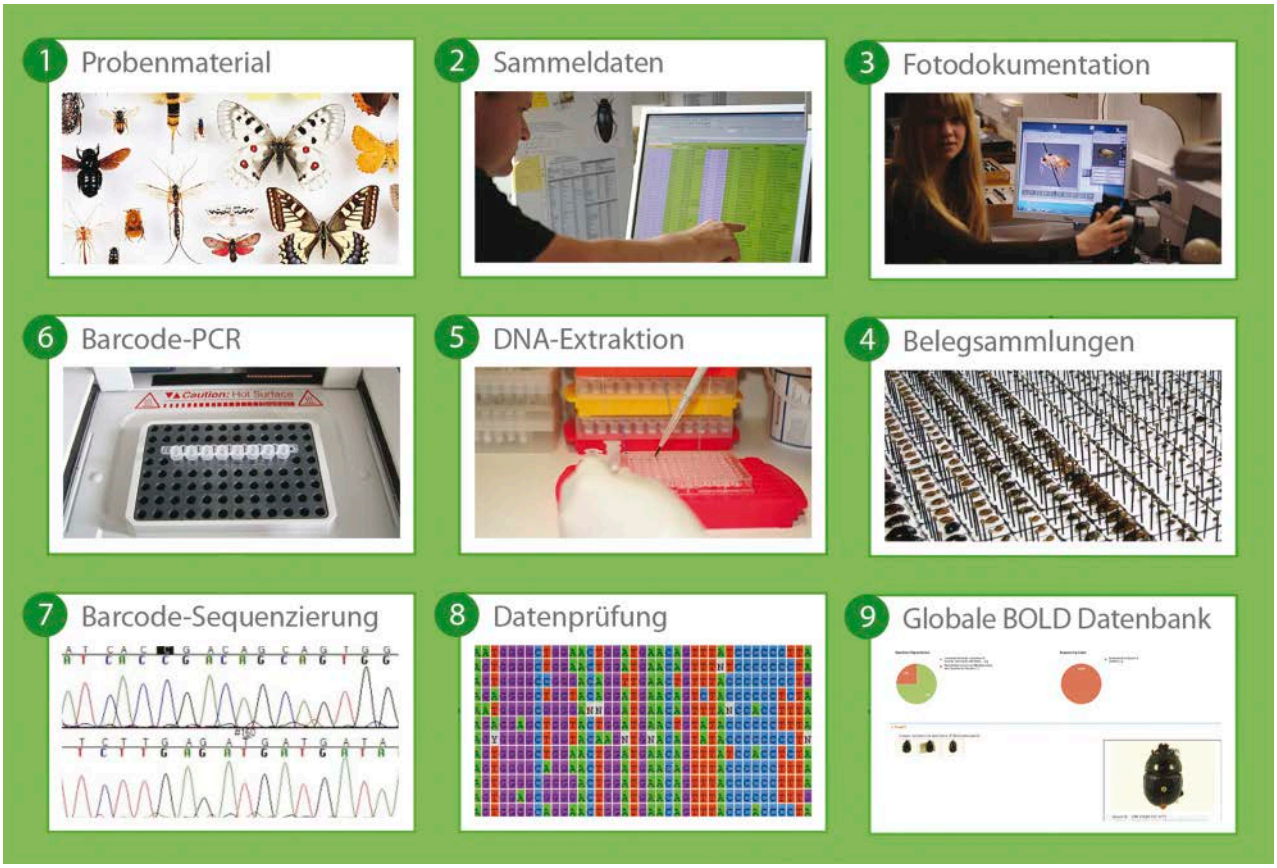

Abb. 2: Notwendige Arbeitsschritte, um einen DNA-Barcode zu erzeugen und in die Datenbank zu überführen. (Grafik: Jasminka Krobot, Fotos: Stefan Schmidt).

3.3 Das Material

In der ersten Phase des Fauna Bavarica Projektes von 2009 – 2011 griffen wir vor allem auf frischeres Material im Bestand der ZSM, auf Material der Sammlung Schmid-Egger sowie auf weiteres Material verschiedener Sammler wie Frank Burger, Gerd Reder, Erwin Scheuchl oder Jakub Straka zurück. Ziel dieser Phase war es, mindestens vier Barcodes von möglichst vielen bayerischen Arten für einen ersten Überblick zu gewinnen. Dabei verwendeten wir auch Material aus anderen deutschen Bundesländern, aus den Südalpen, aus der Tschechischen Republik sowie in einzelnen Fällen auch andere Herkünfte im Mittelmeerraum, falls die betreffende Art in Bayern sehr selten und daher nicht zu beschaffen oder ausgestorben ist. Neben den bayerischen Arten werteten wir auch zahlreiche weitere Arten aus dem angrenzenden deutschen Bundesländer sowie dem übrigen Mitteleuropa mit aus. Bis Ende 2011 konnten wir auf diese Weise bei den Hymenopteren bisher ca. 8.200 Barcodes von fast 2.000 Arten gewinnen, darunter rund 990 Stechimmen, 540 Symphyta, und 580 Arten parasitischer Wespen.
In der zweiten Projektphase 2012 – 2014 ist geplant, weiteres Material aus verschiedenen deutschen Großregionen auszuwerten, welches vor allem in einem größeren Malaisefallenprojekt gewonnen wird.

4. Wie funktioniert Barcoding

Das Barcoding verfolgt in der aktuellen Projektphase das Ziel, möglichst viele gesicherte Datensätze determinierter Tierarten zu erhalten. Dabei wird länder- und tiergruppenweise vorgegangen und der Zugang der Proben durch Projektpartner gesichert. Sobald diese Phase abgeschlossen und die Datenbanken in einem gegebenen Bezugsraum oder für eine Tiergruppe einigermassen vollständig sind, werden die Daten veröffentlicht und über das Internet frei verfügbar gemacht. Die Arbeit mit der BOLD-Datenbank funktioniert dann wie folgt:

1. Ein Forscher will eine unbekannteTierart identifizieren. Über ein Molekularlabor lässt er die Basenabfolge des COI-Gens bestimmen. Für diese Routinetätigkeit, die wenige Tage dauert, werden derzeit von verschiedenen Anbietern zwischen 20 und 25 Euro berechnet.

©Ampulex online, Christian Schmid-Egger; download unter http://www.ampulex.de oder www.zobodat.at

2. Diese Basenabfolge kann er nun in die BOLD-Eingabemaske eingeben (▸ http://www.boldsystems.org/index.php/IDS_OpenIdEngine) Das System zeigt ihm daraufhin diejenigen Arten an, die in der gesamten Datenbank mit derzeit über 1,6 Millionen Barcodes seiner unbekannten Probe am nächsten kommen. Dabei wird der Ausschnitt eines mit Fotos verknüpften „Baumes" angezeigt, aus dem der Fragesteller ersehen kann, ob seine unbekannte Art mit einer im System hinterlegten Referenzart übereinstimmt oder wie weit sie von dieser entfernt ist. Außerdem wird die Wahrscheinlichkeit angegeben, dass die Platzierung des Individuums im Vergleich zu den Referenzarten richtig ist. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass auch Arten, die aus Deutschland noch nicht gemeldet sind, einwandfrei identifiziert werden können, sofern sie in der weltweiten Datenbank enthalten sind. Das kann vor allem bei eingeschleppten Schädlingen wichtig werden.

3. Wenn BOLD kein eindeutiges Ergebnis anzeigt, der Forscher aus anderen Gründen unsicher ist oder der Barcode zu einer im System nicht registrierten Art gehört, muss ein Spezialist hinzugezogen werden und die Art auf herkömmliche Weise bestimmen. Ausschlaggebend für die Bestimmungssicherheit ist der Unterschied in Prozent zu den nächsten Referenzarten. Im Durchschnitt aller Proben unterscheiden sich Arten der gleichen Gattung dabei um etwa 2,1 Prozent voneinander, allerdings ist der Unterschied bei einigen wenigen Artenpaaren auch deutlich geringer.

5. Praktische Anwendung des DNA-Barcoding

Aus diesem Ablauf heraus sind verschieden Nutzanwendungen für das Barcoding denkbar oder werden bereits angewandt. In Zukunft werden sich zudem weitere Möglichkeiten ergeben, die vielfältigen Möglichkeiten des Barcoding zu nutzen.

5.1 Schädlinge schnell erkennen

Eine wichtige Nutzanwendung des Barcoding besteht darin, Schädlinge früh zu erkennen. Diese Möglichkeit betrifft zwar kaum die Stechimmen, weil es hier keine Schädlinge gibt, doch für Fliegen oder Blattwespen sieht es dabei schon ganz anders aus. Einen Präzedenzfall schaffte die ZSM vor kurzem selbst. Dieter Doczkal, Spezialist für Fliegen an der ZSM, fand im Sommer 2011 in Malaisefallenausbeuten aus Baden, die er im Rahmen des Barcoding auswertete, ein Exemplar der Kirsch-Essigfliege *Drosophila suzukii*. Dieser gefährliche Schädling von Beerenfrüchten und Kirschen stammt aus Ostasien und wurde vor wenigen Jahren nach Südeuropa eingeschleppt. Dort verursachte er bereits verheerende Schäden an Kirschen und im Weinanbau, die lokal bis zum Totalausfall der Ernte reichten. Dieser Fund ist der erste deutsche Nachweis der Kirsch-Essigfliege, dessen Determination über den „genetischen Fingerabdruck" abgesichert werden konnte – in diesem Fall durch Vergleich mit Barcodes der Art aus Kalifornien, wo die Art ebenfalls als Schädling auftritt. Das stellt einen bedeutenden Vorteil bei einem so schwer zu bestimmenden Schädling dar, für den zudem in Deutschland noch kein Vergleichsmaterial in den Sammlungen vorliegt.

Die immense Bedeutung des Barcoding in der Schädlingsbekämpfung wird vor allem darin liegen, dass Phytopathologen künftig auch Larven von Fruchtfliegen und anderen Schädlingen („Maden", „Engerlinge", „Raupen", „Würmer" u.s.w.) zuverlässig determinieren können, was bisher selbst für Spezialisten unmöglich war. Dadurch können Landwirte einen solchen Schädling sehr früh erkennen und rechtzeitig gezielt bekämpfen. Bei den Hymenoptera sind vergleichbare Fälle vor allem bei den Symphyta zu erwarten. Ein weiteres Anwendungsgebiet des Barcoding wird in der Bestimmung und Zucht von parasitischen Erzwespen und anderen Nützlingen liegen. Diese Zuchten werden häufig von Hyperparasiten infiziert, deren Identifikation schwierig ist und die mit dem Barcoding ebenfalls zweifelsfrei bestimmbar sind.

5.2 Insekten in naturschutzfachlichen Gutachten determinieren

Die potenzielle Anwendung des Barcoding in naturschutzfachlichen Gutachten sorgt bereits jetzt für rege Diskussionen bei Freilandökologen. Häufig ist hier das Argument zu hören, dass mit Hilfe des Barcoding jeder Gutachten machen könne, und die Gutachten nicht mehr an (hoch spezialisierte) Fachleute gebunden wären. Hierzu gibt es eine Reihe interessanter Gesichtspunkte:

- Gutachten werden bereits jetzt häufig von Nichtexperten gemacht. Nicht spezialisierte Gutachterbüros stellen Fallen auf, die Ausbeute wird für die Determination nach aussen gegeben, häufig noch nicht einmal an ausgewiesene Experten, und niemand überprüft die Qualität der Bestimmungen. Der Einsatz des Barcoding würde hier helfen, die Qualität der Determination zu sichern.

- Auch erfahrene Bienen- und Wespenfachleute wissen, wie bei geringer Bezahlung manchmal mit schwierig zu bestimmenden Arten umgegangen

©Ampulex online, Christian Schmid-Egger; download unter http://www.ampulex.de oder www.zobodat.at

wird. Sie fallen unter den Tisch oder werden schlampig und teilweise falsch bestimmt. Würde man Barcoding daher zum Beispiel selektiv für bestimmte Gattungen wie *Sphecodes* oder manche *Andrena*-Artengruppen einsetzen, wäre das sicher ein Gewinn für die Qualität von Gutachten.

- Weiterhin stellt sich die Frage, ob ein hoch qualifizierter Biologe oder Landschaftsplaner seine wertvolle Arbeitszeit mit dem Determinieren von Insekten aus Fallenausbeuten verbringen sollte. Meist ist das eine eintönige und wenig kreative Tätigkeit. In vielen anderen Bereichen werden solche Tätigkeiten längst von Maschinen erledigt. Die Interpretation von Artenlisten oder das Abfassen eines Gutachtens hingegen ist wiederum ein Job für Experten. Daher könnten entomologische Spezialisten durch das Barcoding sogar entlastet werden.

- Das Auffinden naturschutzfachlich relevanter Tier- und Pflanzenarten im Freiland wird auch mit dem Barcoding nicht einfacher und wird auch weiterhin den Einsatz gut ausgebildeter Freilandbiologen erfordern.

- Natürlich ist die Determination von Tieren per Barcoding auch eine Kostenfrage. Bei derzeit marktüblichen Preisen von 0,5 – 2 Euro pro konventionell bestimmter Wespe oder Biene für einen Biologen und Barcoding-Kosten zwischen 20 und 25 Euro pro Tier ist ein Massenbarcoding sicher noch nicht interessant. Doch das könnte sich schnell ändern, wenn die Kosten für das Sequenzieren von Genen weiter sinken. Das ist in Kürze zu erwarten.

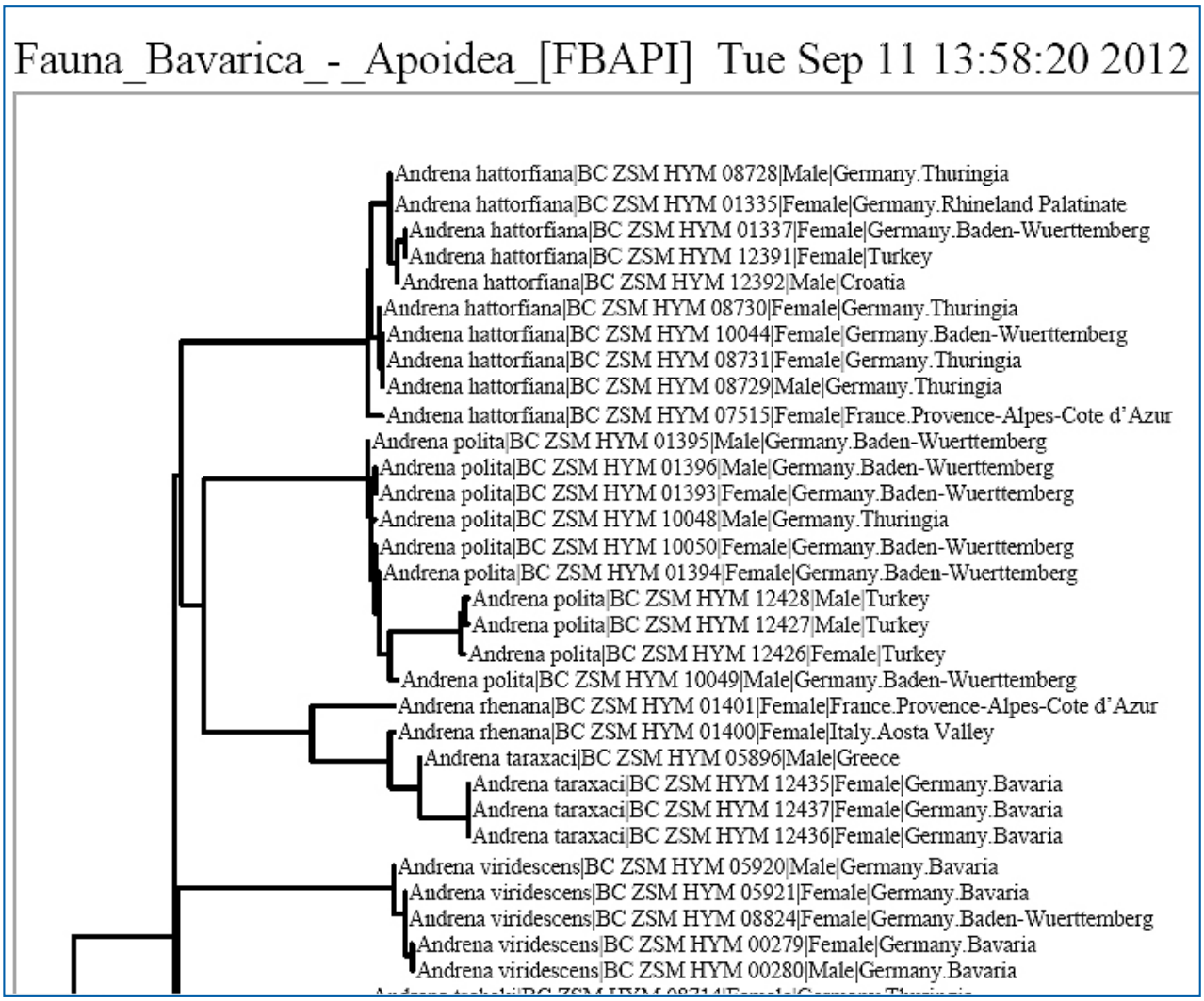

Abb. 3: Ausschnitt aus dem Ergebnisbaum. Hier wird die erste Seite der Bienen dargestellt.

©Ampulex online, Christian Schmid-Egger; download unter http://www.ampulex.de oder www.zobodat.at

5.3 Präimiginalstadien von Insekten determinieren

Ein grosser Vorteil des Barcodings liegt daran, dass auch Präimaginalstadien sicher gebarcodet werden können. Denn die Gene von Eiern, Larven oder Puppen sind natürlich mit denen der Imagines identisch. Für die Grundlagenforschung wird diese Anwendung sicher hoch interessant werden. So scheitert beispielsweise die Frage nach den Wirt-Parasit-Verhältnissen bei Stechimmen häufig daran, dass aus einer Niströhre zahlreiche Arten schlüpfen und die Parasiten wegen überbauter Nester oder mehrfacher Belegung der Niströhren nicht ihrem Wirten zugeordnet werden können. Das könnte sich mit dem Barcoding ändern, weil jetzt Larven direkt aus Nestern untersucht werden können. Das war so bisher noch nicht möglich. Auch Parasitenlarven aus Erdnestern lassen sich künftig mit dieser Methode determinieren. Auch parasitische Wespen phytophager Insekten lassen sich erstmals mit dieser Methode sicher bestimmen, ohne die Notwendigkeit die Larven züchten zu müssen, ein Unterfangen, das oft mit viel Arbeit und hohen Verlusten verbunden ist.

5.4 Expertenwissen konservieren

Auch wenn derzeit manche Spezialisten um ihre Zukunft als Experte fürchten, wenn sich das Barcoding etabliert, sieht die Realität ganz anders aus. Taxonomische Spezialisten werden immer älter, sie werden zudem immer weniger und zählen selbst bald zu einer ausgestorbenen Spezies. Doch wie soll sich beispielsweise in 10, 20 oder 30 Jahren ein Diplomand in Wildbienen einarbeiten, wenn es dann vielleicht niemanden mehr gibt, der noch eine gute Artenübersicht besitzt? Die BOLD Datenbank wird dieses Übersichtswissen konservieren und – sofern keine dramatischen Dinge mit dem Internet passieren – dieses Expertenwissen auch in ferner Zukunft noch zur Verfügung stellen. Von der BOLD-Datenbank gibt es inzwischen mehrere identische Kopien, z.B. in Neuseeland, Brasilien, und Australien, um Datenverluste zu vermeiden.

Schon jetzt ist es Realität, dass man als Experte mehr Arbeit hat, als man bewältigen kann. Zudem halten wir es für sinnvoller, wenn sich ein erfahrener Experte ungelösten taxonomischen Fragen oder der Fauna unbekannter Regionen widmet, anstatt seine knappe Zeit mit Determination von Massenausbeuten, zum Beispiel aus Diplomarbeiten oder Doktorarbeiten, zu vergeuden. Denn hochwertige taxonomische Arbeit können nur wenige vollbringen, während solche Massenbestimmungen die Wissenschaft meist kaum oder nur in sehr kleinen Schritten weiterbringen. Doch sie binden enorme zeitliche Ressourcen. Gerade hier sehen wir große Einsatzmöglichkeiten des Barcoding, die schon jetzt sehr dringend benötigt werden.

Ein aktuelles Beispiel dazu stammt aus der marinen Forschung. Dort fehlen für viele Gruppen von Kleinkrebsen bereits Experten. Dabei geht es hier häufig um wirtschaftliche wichtige Klassifikationen von Organismen, zum Beispiel bei der Suche nach neuen Organismen für die menschliche Ernährung.

Ein weiteres Beispiel sind die parasitischen Wespen (Parasitoide), die mit rund 7.300 Arten über ¾ der heimischen Hymenopterenfauna ausmachen, von denen die meisten jedoch aufgrund fehlender Experten nicht bestimmbar sind.

5.5 Taxonomische Bewertung von Arten

Seinen größten aktuellen Nutzen besitzt das Barcoding jedoch in der Grundlagenforschung. So ist es möglich, kritische Artengruppen zu barcoden und anhand der „Ergebnisbäume“ einen zusätzlichen, objektiven Merkmalssatz zur Bewertung des Artranges sowie der systematischen Stellung der Individuen und Arten zueinander zu erhalten. Diese Möglichkeit führte bei den mittel- und südeuropäischen Stechimmen bereits zu verschiedenen Überraschungen, siehe dazu die folgenden Kapitel.

Natürlich kann man das Barcoding auch anders herum nutzen. Wenn man künftig beispielsweise ein unbekanntes Ökosystem zum Beispiel im tropischen Regenwald untersucht, aus dem kaum Arten beschrieben sind, kann man die gefunden Tiere im ersten Schritt barcoden und alle weitere taxonomische Analyse auf den Ergebnissen des Barcoding aufbauen („reverse taxonomy“). Das erspart die mühsame Zuordnung von Männchen und Weibchen sowie Fehler, die durch Polymorphismus entstehen. Gerade bei parasitischen Wespen tritt dieses Phänomen recht häufig auf. Erstbeschreibungen von Arten würden in Zukunft einen Barcode enthalten, was den Aufwand bei späteren Identifikationen deutlich verringern würde.

6. Bisherige taxonomische Erfahrungen mit Aculeata

Die oben geschilderten Nutzanwendungen sind teilweise noch Zukunftsmusik, weil zuerst die Datenerfassung über die Voucherexemplare abgeschlossen werden muss. Doch aus den bisherigen Daten lassen sich vor allem auf der taxonomischen Ebene bereits zahlreiche interessante Ergebnisse erkennen. Unsere vollständigen Ergebnisse zu den Stechimmen und Symphyta sollen in Kürze in einem Data-Release veröffentlicht werden. Vorab möchten wir daher nur ausgewählte Ergebnisse, Trends und Schlussfolgerungen darstellen. Bisher konnten wir im Rahmen des Bar-

©Ampulex online, Christian Schmid-Egger; download unter http://www.ampulex.de oder www.zobodat.at

coding Fauna Bavarica bei den Hymenoptera Sequenzen von über 9.000 Tieren erhalten, die zu rund 2400 Arten gehören. Auf diesen Datensätzen beruhen die folgenden Einschätzungen.

6.1 Bisheriges Artkonzept durch das Barcoding bestätigt

Die bestehenden Artabgrenzungen beruhen bisher fast ausschließlich auf dem Konzept der „Morphospezies" (= Arten, die aufgrund von Körpermerkmalen unterschieden werden). Das aktuelle Konzept der Morphospecies bildet sich auch über den genetischen Baum mit dem COI-Gen erstaunlich gut ab. Die die genetischen Daten bestätigen damit die bestehende und überwiegend auf morphologischen Merkmalen beruhende Taxonomie. Etwa 80 – 90 Prozent aller bisher bearbeiteten Hymenopterenarten lassen sich eindeutig voneinander trennen. Innerhalb der Arten liegen die Barcodes in der Regel sehr nahe zusammen, zudem gibt es bei sehr vielen Arten kaum Unterschiede zwischen Populationen aus Berlin/Brandenburg, Bayern und den Südalpen, wobei die maximale Variationsbreite meist unter einem Prozent liegt. Interessanterweise lassen sich auch die Arten zahlreicher taxonomischer Problemgruppen und morphologisch schwer abgrenzbare Artengruppen bei den Stechimmen wie der *Sphecodes crassus*-Gruppe, die *Nomada sheppardana*-Gruppe oder nahe verwandten *Hylaeus*- und *Lasioglossum*-Arten gut mit dem Barcoding erkennen.

Nur schätzungsweise drei Prozent aller etablierten Stechimmenarten differenzieren über das COI-Gen nicht oder kaum aus. In größeren Umfang ist das vor allen in der Gattung Nomada sowie bei einigen *Andrena*-Artengruppen der Fall. Unter „etablierten" Arten verstehen wir Taxa, die morphologisch unterscheidbar sind und in der Literatur mitteleuropäischer Stechimmen bisher als valide angesehen werden. Doch müssen einige dieser Konflikt-Fälle mit weiterem Material überprüft werden.

6.2 Identifikation kritischer Zwillingsarten besser als gedacht

Bei Artenpaaren oder Artengruppen, deren Artstatus in der neueren Literatur umstritten ist („kritische Zwillingsarten") zeichnen sich unterschiedliche Fälle ab.

Einige Artenpaare oder Artengruppen lassen sich mit den Barcoding-Ergebnissen einwandfrei in valide Arten differenzieren. Ein Beispiel ist die *Andrena bicolor*-Gruppe. Die aktuellen Ergebnisse zeigen bei der Auswertung der reinen genetischen Ähnlichkei-

Abb. 4: Ausschnitt aus dem Ergebnisbaum: die *Andrena bicolor*-Gruppe (Apidae). Die Abgrenzung und Eigenständigkeit der umstrittenen Taxa *Andrena montana* und *Andrena allosa* ist klar erkennbar. Zusätzlich werden bei *Andrena bicolor* zwei Cluster sichtbar, die noch abgeklärt werden müssen.

©Ampulex online, Christian Schmid-Egger; download unter http://www.ampulex.de oder www.zobodat.at

ten, dass die fünf untersuchten Taxa alle gute Arten sind. *Andrena bicolor* ist dabei zu *Andrena* symphyti am ähnlichsten. Beide Arten bilden eine „Schwestergruppe" zu den vier Arten *Andrena montana/allosa* und *fulvata/angustior.* Der Schrägstrich symbolisiert das „Schwestergruppen"verhältnis innerhalb der Teilgruppen. Schwestergruppe ist hier in Anführungszeichen gesetzt, weil hier reine genetische Ähnlichkeiten und keine Verwandtschaften überprüft wurden.

Natürlich sind das noch vorläufige Ergebnisse. Doch sie lassen schon jetzt erkennen, dass die Barcoding-Ergebnisse in diesem und anderen Fällen wahrscheinlich eine mehr als 60jährige Diskussion unter Bienenforschern mit objektivierten Ergebnissen beenden werden. Alle diese Arten scheinen genetisch eindeutig getrennt und damit valide zu sein.

Bei anderen Artenpaaren sind keine genetischen Unterschiede auf dem COI-Gen erkennbar (z.B. *Andrena cineraria/barbareae*). Diese genannten Fälle bedürfen jedoch noch weiterer Untersuchungen, vor allem mit weiteren Tieren auch anderer Fundorte. Doch selbst wenn das Barcoding hier keine Ergebnisse liefert, ist das noch längst kein Beweis für die Konspezifität dieser Artenpaare oder Artengruppen. Vielmehr müssen dann weitere Gene untersucht werden, die bei nahe verwandten Arten aussagekräftiger sind. Vergleiche hierzu auch Sann et. al. (2011) und ihre Anmerkungen zur *Nomada alboguttata*-Gruppe.

6.3 Entdeckung neuer Zwillingsarten

Ein überraschender Begleiteffekt des Barcoding ist die Entdeckung neuer Arten quasi vor der Haustüre. Insbesondere die Familie der Mutillidae erwies sich als überraschend ergiebig. Wir fanden bisher drei neue Arten, die alle auch in Deutschland vorkommen (Schmid-Egger, Schmidt, Lelej & Burger in Vorbereitung). Für die neuen Arten konnten nach eingehender Untersuchung des Materials basierend auf den genetischen Daten auch morphologische Unterscheidungsmerkmale gefunden werden. Dies war möglich, weil durch das Barcoding feststand, welche Individuen zu welchen Arten gehörten. Daraufhin ließen sich diese Tiere gezielt miteinander vergleichen.

Auch bei den Mauerbienen (*Osmia*) und anderen Bienengattungen gibt es einige genetisch unklare Artengruppen mit zum Teil grossen genetischen Unterschieden innerhalb bekannter Morphospezies. *Tiphia femorata*, eine sehr variable „Art", besteht alleine in Deutschland nach dem ersten Screening aus mindestens vier deutlich voneinander getrennten genetischen Spezies. Der wirkliche Status dieser und anderer „genetischer Linien" aus Mitteleuropa muss durch künftige Untersuchungen geklärt werden.

Weitere unerkannte Zwillingsarten lassen sich beim Vergleich mitteleuropäischer mit südeuropäischen Populationen erwarten. Bereits aus den wenigen bisher untersuchten Vergleichen mitteleuropäischer mit südeuropäischen Tieren geht hervor, dass wir dort mit

Abb. 5: Ausschnitt aus dem Ergebnisbaum. Hier werden Teile von *Tiphia femorata* (Tiphiidae) dargestellt als Beispiel für eine „Art", die in Wirklichkeit eine bisher unerkannte Artengruppe mit mehreren Arten umfasst.

©Ampulex online, Christian Schmid-Egger; download unter http://www.ampulex.de oder www.zobodat.at

einer weit größeren Anzahl von genetisch unterscheidbaren Taxa rechnen müssen. Einige der bisher ermittelten Unterschiede übertreffen die erwähnte kritische Distanz von zwei Prozent sehr deutlich und könnten auf valide Arten hinweisen. Das Postulat einer „kritischen Distanz" von zwei Prozent als Kriterium für separaten Artstatus sollte allerdings primär nur bei sympatrischem Vorkommen angewandt werden und gilt nicht automatisch für allopatrische Populationen, also für Populationen aus entfernten Gebieten. In der Nearktis konnten Buck et al. (2012) zwei neue *Polistes*-Arten (Vespidae) durch das Barcoding neu beschreiben.

6.4 Bewertung genetischer Artunterschiede

Der routinemäßige Einsatz genetischer Analysen mit dem Barocding-Gen wird die Alpha-Taxonomie (das Erkennen und Beschreiben von Arten) vor neue Herausforderungen stellen. Die folgenden Fälle können auftreten:

1. Bisher bekannte Arten („Morphospezies") sind mit dem COI-Gen unterscheidbar. Das bestehende Konzept der Morphospezies wird damit bestätigt. Dies ist im weitaus überwiegenden Teil aller Arten der Fall.

2. Arten, die morphologisch unterscheidbar sind, lassen sich über das COI-Gen nicht unterscheiden. Das bedeutet keinesfalls, dass alle Taxa dieser Artengruppen oder –paare synonym sind. In solchen Fällen müssen weitere Merkmale, z.B. andere Gene herangezogen werden, die eine bessere Differenzierung erlauben. Es ist bereits bekannt, dass sich das Barcoding z.B. oft nur schlecht zur Unterscheidung sehr junger Artenpaare eignet. Auch *Wolbachia*-Bakterien (Sann et al. 2011, siehe unten) oder Introgression durch singuläre Hybridisierungsereignisse können dafür verantwortlich sein.

3. Innerhalb bekannter „Morphospezies" werden neue „genetische" Zwillingsarten gefunden. Anhand der Voucherexemplare können nun differenzierende morphologische Merkmale gesucht werden. Werden diese gefunden, kann die neue Art wie bisher üblich beschrieben werden.

4. Wie unter 3. werden neue „genetische" Arten gefunden, doch es lassen sich keine differenzierenden morphologischen Merkmale finden. Hier muss mit Hilfe weiterer Methoden nach Unterscheidungsmerkmalen gesucht werden.

5. Wie unter 3, doch die genetischen Unterschiede zwischen den untersuchten Populationen sind sehr gering. Hier muss überprüft werden, ob auch eine innerartliche Variabilität innerhalb des COI-Gens in Frage kommt. Es muss untersucht werden, ob es sich tatsächlich um verschiedene Arten handelt. Zum Beispiel können innerhalb der Art verschiedene genetische Typen von Mitochondrien-DNA (Haplotypen) vorkommen. Auch das kann vorwiegend durch die Untersuchung weiterer Gene abgeklärt werden. Untersuchungen bei Wasserkäfern weisen darauf hin, dass das COI-Gen geografisch sehr stark variieren kann (Bergsten et al. 2012). Ähnliches gilt für Inselpopulationen von Schmetterlingen (Hausmann 2011).

Infokasten Was sind genetische Arten

In den Biowissenschaften finden sich verschiedene Artkonzepte, die zum Teil miteinander konkurrieren. Das biologische Artkonzept ist dabei das am weitesten verbreitete und akzeptierte Konzept. Bei den Stechimmen wurden Arten bisher meist aufgrund morphologischer Merkmale definiert („Morphospezies"), doch auch die Phänologie, Ökologie, die Verbreitung oder andere Informationen werden gelegentlich mit herangezogen, um den Artstatus zu untermauern. Diese Ansätze werden seit kurzem unter dem Oberbegriff der „Integrativen Taxonomie" zusammengefasst.

Was ändert das Barcoding an dieser Praxis? Dazu folgende Grundüberlegung: Ein Individuum besteht aus einem Genotyp und einem Phänotyp. Der Genotyp wird dabei aus der Gesamtheit aller Gene gebildet, die ein Individuum besitzt. Der Phänotyp entsteht erst aus dem Genotyp, das heißt die Gene bestimmen in Abhängigkeit von verschiedenen Umweltfaktoren, wie das Tier später aussieht und welche sonstigen Eigenschaften (Pheromone, Paarungsverhalten, Körpergröße, Nahrungspräferenzen, Sinnesleistungen) es besitzt. Eine neue Art kann zum Beispiel dann entstehen, wenn

©Ampulex online, Christian Schmid-Egger; download unter http://www.ampulex.de oder www.zobodat.at

eine Population einer Art von der Hauptpopulation abgetrennt wird (Inselbildung, Eiszeit, etc.) und in einem anderen Lebensraum überleben muss als die Stammpopulation. In den meisten Fällen wird die isolierte Population aussterben, oder aber sie schafft es, sich unter dem bestehenden Selektionsdruck den veränderten Umweltbedingungen anzupassen. Genetisch festgelegte Merkmale können in einer isolierten Teilpopulation auch verloren gehen. Innerhalb jeder Teilpopulation werden die Gene jedoch stets zwischen allen Individuen ausgetauscht und bilden einen gemeinsamen „Genpool". Irgendwann im Verlauf des Artbildungsprozesses geht die Fähigkeit zur sexuellen Fortpflanzung mit der Stammpopulation verloren. Treffen beide Populationen später wieder aufeinander, so können sie keine Gene mehr austauschen. Falls doch, kommt es zur Hybridisierung mit der Folge, dass entweder die nachteiligen Gene ausgemerzt werden oder die kleinere Population in der größeren aufgeht. Andernfalls, d.h. wenn sich die Populationen unter natürlichen Bedingungen nicht mehr untereinander fortpflanzen, ist – vereinfacht beschrieben – eine neue Art entstanden.

Es kann auch sein, dass sich der Phänotyp einer neuen Art in den morphologischen Merkmalen nicht von der Stammart unterscheidet. Vielleicht unterscheidet sich die neue Art nur in Stoffwechselprozessen, in der Bildung unterschiedlicher Pheromone, in Habitat- oder Futterpflanzenpräferenzen, oder in tageszeitlich bzw. saisonal unterschiedlicher Erscheinungsweise. Diese „kryptischen Arten" kommen bei vielen Tiergruppen vor, zum Beispiel bei parasitischen Wespen, aber auch bei Schmetterlingen, Heuschrecken oder Seefröschen.

Das in der bisherigen Taxonomie der Stechimmen verwendete Konzept der „Morphospezies" ist daher insbesondere bei als taxonomisch schwierig geltenden Artenkomplexen fehleranfällig, weil nicht zwangsläufig morphologische Unterschiede zwischen biologischen Arten vorhanden sein müssen. Oder die Unterschiede sind so geringfügig, dass sie nicht jeder Taxonom erkennt. Gerade das unterschiedliche Bewerten von Merkmalen durch verschiedene Taxonomen verursachte in den letzten 60 Jahren zahlreiche kontroverse Diskussionen vor allem bei den Bienen, die bis heute anhalten und zeigt daher sehr deutlich die Grenzen des Morphospezies-Konzeptes auf.

Der Genotyp hingegen lässt sich durch eine Genuntersuchung nach objektiven Kriterien ermitteln. Das Ergebnis ist beliebig wiederholbar und unabhängig von der Qualität der Technik oder anderer Faktoren. Der genetische Merkmalsvergleich zwischen zwei Taxa ergibt als Ergebnis eine genetische Buchstabenabfolge, die präzise ist und als solche nicht in Frage gestellt werden kann.

Man kann sich in der Diskussion nun auf die Bedeutung der genetischen Unterschiede konzentrieren und diskutieren, welche Relevanz sie für die Abgrenzung der Arten besitzen. In der Genetik haben wir also objektiv feststellbare Merkmale (genetischer Code) sowie Unterschiede zwischen Individuen, die in Prozentzahlen ausdrückbar sind. Das ging mit morphologischen Merkmalen bisher nicht, bzw. diese sind - wissenschaftlich ausgedrückt – anfällig für Messfehler und subjektive Einschätzungen der einzelnen Bearbeiter. Allerdings wird es taxonomische Interpretationen von Barcode-Daten nie ohne morphologische Merkmale geben, denn auch die genetische Methode ist fehleranfällig. Die Stärke neuer Methoden besteht in der Kombination voneinander unabhängiger Merkmale, wie es zum Beispiel morphologische und genetische Merkmale darstellen.

Natürlich muss der genetische Abstand zwischen zwei Individuen oder Populationen auch in Zukunft interpretiert werden. Das erfordert auch weiterhin die Fachkenntnis von Taxonomen. Die Bewertung des Artstatus genetisch divergierender Populationen ist genauso eine wissenschaftliche Hypothese wie die Bewertung von Arten nach morphologischen Merkmalen. Idealerweise werden daher verschiedene Merkmalskomplexe wie genetische und morphologische Merkmale, unter Umständen auch akustische, chemische, und ökologische Merkmale kombiniert, um Interpretationen von Arten abzusichern.

Häufig basieren morphologische Artkonzepte auf Aussagen wie: „ich glaube, dass sich Art A von Art B durch einen stärker gewölbten Hinterkopf unterscheidet". In einem solchen Fall wäre ein Unterschied zwischen Art A und Art B durch fünf 5 Prozent Differenz im COI-Gen durchaus ein verlässlicheres Merkmal.

Wir müssen natürlich einschränken, dass – wie oben angemerkt - das im Barcoding verwendete COI-Gen einige Besonderheiten aufweist und nicht alle oben genannten Aussagen dafür zutreffen. Diese beziehen sich vor allem auf Gene aus dem Zellkern, die sexuell ausgetauscht werden. Da männliche Stechimmen haploid sind (also nur einen Satz Chromosomen enthalten), kommen weitere Besonderheiten dazu.

Die Vorstellung, dass sich Arten zwar genetisch, aber nicht morphologisch trennen lassen, mag den einen oder anderen konventionell arbeitenden Taxonomen irritieren. Doch sie gehört zur biologischen Realität des Lebens und wird künftig in modernen taxonomischen Konzepten ihren Platz finden

©Ampulex online, Christian Schmid-Egger; download unter http://www.ampulex.de oder www.zobodat.at

6.5 Phylogenetische Aussagen mit Barcoding

Zu diesem Thema möchten wir vor allem ein aktuelles Projekt von Williams et. al. (2012) zitieren. Die Autoren „barcodeten" zahlreiche Exemplare der *Bombus-subterraneus*-Gruppe aus der gesamten Paläarktis und verglichen diese genetischen Ergebnisse mit einem Verwandschaftsbaum, den sie auf konventionelle Weise über das Bewerten morphologischer Merkmale gewonnen hatten. Sie kamen zum Ergebnis, dass beide Methoden dieselbe Aussagequalität besitzen. Das Barcoding bewerten sie als einfacher und kostengünstiger im Vergleich zur traditionellen morphologischen Methode. In diese Thematik möchten wir an dieser Stelle nicht weiter einsteigen, sondern auf die zahlreiche Literatur zu diesem Thema verweisen. Es ist jedoch festzustellen, dass das COI-Gen inzwischen zum Standard in vielen genetischen Grundlagenuntersuchungen geworden ist.

7. Kritik am Barcoding

Das Barcoding hat in den letzten Jahren verschiedentlich auch Kritik hervorgerufen. Wir möchten auf einige kritische Meinungen kurz eingehen und dazu Stellung beziehen. Die genannten Gründe beziehen sich in gleicher Weise natürlich auch auf die Analyse anderer Gene als das COI-Gen.

7.1 *Wolbachia*-Infektionen verhindern erfolgreiches Barcoding

Wolbachia ist ein parasitischer Einzeller, der zahlreiche Insektenarten befällt und intrazellulär lebt. Wolbachien sind dafür bekannt, dass sie einen Selektionsdruck auf das COI-Gen ausüben und damit seine Entwicklung beeinflussen können. Sie vermehren sich normalerweise nur innerhalb einer Wirtsart und manipulieren seine Fortpflanzungsbiologie, doch in seltenen Fällen können sie auch zwischen Arten übertragen werden. In diesem Fall besteht die Möglichkeit, dass sie das COI-

Abb. 6: Neben der Trugameise *Myrmosa atra*, hier ein Weibchen, konnten wir im Rahmen des Barcoding eine zweite, bisher unbeschriebene Art der Gattung *Myrmosa* in Deutschland entdecken (Foto: Wolfgang Rutkies).

©Ampulex online, Christian Schmid-Egger; download unter http://www.ampulex.de oder www.zobodat.at

Gen des neuen Wirts genauso verändern wie das des alten Wirts so dass beide Wirtsarten über das COI-Gen nicht unterschieden werden können (Sann et. al. 2011). Das *Wolbachia*-Problem im Barcoding ist seit längerem bekannt. Allerdings deuten die aktuellen Ergebnisse nicht darauf hin, dass Wolbachien bei den Stechimmen ein größeres Problem darstellen (Smith et al. 2012). Sie könnten höchstens für die hohe Ähnlichkeit weniger Zwillingsartenkomplexe verantwortlich sein. Sann et. al. (2011) vermuten das für die *Nomada-alboguttata*-Gruppe, doch der Beweis steht dafür noch aus.

7.2 Barcoding stellt kein Konzept einer Art dar

In der Kritik des Barcoding wird verschiedentlich behauptet, dass die Ergebnisse des Barcoding kein Artkonzept ergäben (Kunz 2009). Hier liegt ein grundlegendes Missverständnis über die Möglichkeiten molekulargenetischer Methoden zu Grunde. Artabgrenzungen werden immer von Forschern als Ergebnisse der Untersuchung verschiedener Merkmalskomplexe (genetische Unterschiede, morphologische Unterschiede etc.) festgelegt. Sie sind damit bestenfalls eine Interpretation genetischer Daten. Genetische Daten selbst können kein Konzept einer Art ergeben, sie zeigen lediglich Unterschiede zwischen Arten an.

7.3 Barcoding kann nicht funktionieren, weil Experten fehlen

Dieses Argument wird verschiedentlich von Barcoding-Skeptikern geäußert, doch es ist kein echtes Argument gegen das Barcoding. Natürlich ist eine Barcoding-Datenbank immer nur so gut wie der Artenbestand, der ihr zu Grunde liegt. Wenn es keine Bearbeiter von Tiergruppen gibt oder diese kein genetisches Material zur Verfügung stellen können, ist die Gruppe in der BOLD-Datenbank nicht verfügbar. Doch es zeichnet sich jetzt schon ab, dass zum Beispiel wirtschaftlich wichtige Gruppen (z.B. Pflanzenschädlinge) mit Hochdruck bearbeitet werden und die oben genannten Nutzanwendungen des Barcoding teilweise schon jetzt umfassend möglich sind. Wenn ein Forscher taxonomisch schwierige Insektengruppen in einer bisher unbearbeiteten Region neu bearbeiten will, kann sich das Barcoding für ihn zudem als sehr nützlich erweisen. Der Bearbeiter kann die Tiere, die er zum Beispiel aus Fallen erhält, vorab barcoden und erst dann morphologisch bearbeiten. Somit kann er bereits vorab abschätzen, welche Individuen zusammengehören oder auch welche Geschlechter zu einer Art gehören.

7.4 Barcoding macht klassische Taxonomen überflüssig

Dies ist ein weit verbreitetes Vorurteil, welches sehr leicht entkräftet werden kann. Das Barcoding wird vielleicht irgendwann das Determinieren erleichtern. Doch es wird, wie bereits weiter oben erwähnt, niemals Taxonomen überflüssig machen, weil es keine Aussagen über den Status von Arten liefert. Diese Aussagen können erst Forscher treffen, wenn sie die Gesamtheit der Fakten über eine Art bewerten. Taxonomen legen fest, welche genetischen Entitäten eine Art darstellen und welche nicht. Ein Prozentwert wird niemals dem Taxonomen seine Entscheidung abnehmen. Ganz im Gegenteil wird das Barcoding die Arbeit von Taxonomen deutlich erleichtern. Das zeigt auch die Praxis, weil ernstzunehmende und moderne taxonomische Arbeiten, insbesondere bei taxonomisch schwierigen Organismen, kaum noch ohne genetische Merkmale auskommen.

8. Das Bild des Taxonomen wandelt sich

Die Kritik des Barcoding ist auch vor einem anderen Hintergrund zu sehen. Die klassische Insektentaxonomie wurde vor allem in Mitteleuropa in der Vergangenheit überwiegend von Amateuren betrieben, die ohne aufwändige Laboreinrichtungen oder die Unterstützung großer Arbeitsgruppen einen Großteil der heute bekannten Fauna in Mitteleuropa beschrieben. Der „entomologische Amateur“ ist jedoch zunehmend selbst eine aussterbende Spezies, weil es kaum Nachwuchs gibt und viele der geschätzten Kollegen auf das Rentenalter zusteuern.

Gleichzeitig hat sich, ausgehend von den USA, in den letzten Jahrzehnten ein neuer Arbeitsstil in der systematischen Entomologie etabliert. Entomologen sind vielfach an Universitäten oder anderen wissenschaftlichen Einrichtungen beschäftigt, verfügen über ein naturwissenschaftliches Studium, modernes Wissen über Genetik und Evolution und bearbeiten taxonomische Fragen im Rahmen ihrer Diplom- oder Doktorarbeiten. Zudem haben sich die Methoden verändert: Raster-Elektronenmikroskop, aufwändige Computerprogramme zur Erstellung phylogenetischer Analysen sowie seit gut einem Jahrzehnt auch molekulargenetische Analysen gehören zum modernen Handwerkszeug eines taxonomisch arbeitenden Entomologen genauso wie das Einhalten wissenschaftlicher Standards beim Abfassen von Publikationen. Diese Veränderungen haben natürlich auch den einen oder anderen konventio-

©Ampulex online, Christian Schmid-Egger; download unter http://www.ampulex.de oder www.zobodat.at

nell arbeitenden Amateur-Entomologen verunsichert. Nicht nur in der Entomologie verursachen Veränderungen jedoch häufig Gegenwehr. Manche Kritik am Barcoding entspringt daher in Wirklichkeit dieser Angst vor Veränderungen, wie sich aus verschiedenen Publikationen und auch Gesprächen mit Kollegen unschwer herauslesen und -hören lässt. Zudem ist das Barcoding natürlich nur ein kleiner Teilbereich dessen, was an neuen Methoden in der Entomologie angewandt wird. Doch zum ersten Mal betrifft mit dem Barcoding eine molekulargenetische Methode die breite Masse der Arten in Mitteleuropa und kann nicht mehr ignoriert werden. Das ist das grundlegend Neue am Barcoding.
Wir selbst sehen im Barcoding eine große Chance auch und gerade für die Amateurentomologie. Denn diese genoss in den letzten Jahrzehnten unter Wissenschaftskollegen ein eher geringes Ansehen. Das ist unseres Erachtens ein Hauptgrund dafür gewesen, dass immer mehr Lehrstühle in der biologischen Systematik in den letzten Jahren an den Unis verloren gingen.
Doch über den breiten Einsatz molekulargenetischer Methoden (von denen das Barcoding nur eine ist) sowie anderer moderner Methoden ändert sich dieses Bild derzeit. Es ist zu hoffen, dass dieser Trend in der Zukunft anhält und die entomologische Taxonomie ihr altes Ansehen wieder zurückerhält und auch durch Drittmittel weiter gefördert wird. Für die Amateurentomologie liegt hier eine grosse Chance. Denn die (immer noch) wenigen professionellen Entomologen an wissenschaftlichen Einrichtungen sind dringend auf Amateure angewiesen, was Artenkenntnis, Material und praktische Unterstützung betrifft. Das zeigt sich im aktuellen Barcodingprojekt jetzt schon sehr deutlich, nutzen wir doch die Ressourcen zahlreicher „Amateure“ zur Materialbeschaffung, aber auch zur Determination kritischer Taxa.
Und Amateure ihrerseits können von diesem neuen Trend profitieren, indem sie mit Museen und anderen wissenschaftlichen Einrichtungen kooperieren und dort zum Beispiel genetische Analysen ihrer Spezialgruppen durchführen lassen oder hochwertige optische Ausrüstungen nutzen, um Fotos zu erstellen. Sie erhalten damit die Möglichkeit, auch als Privatperson hochwertige wissenschaftliche Arbeiten zu publizieren, vielleicht verstärkt durch einen Coautor der betreffenden Einrichtung.

9. Unsere abschließende Bewertung und Ausblick

Als Fazit einer inzwischen dreijährigen Erfahrung mit dem „Barcoding Fauna Bavarica“ Projekt können wir feststellen, dass die bisherigen Ergebnisse unsere Erwartungen in großem Maße übertroffen haben. Auch wir waren anfangs skeptisch und sind inzwischen nur noch begeistert von den Möglichkeiten, die aktuelle Taxonomie abzubilden und zu erweitern. Natürlich lassen sich nicht alle Probleme damit lösen. Doch das wussten wir bereits vor dem Projekt, und wir hatten ganz im Gegenteil nicht erwartet, dass der Anteil ungelöster Arten bei den als gut bearbeitet geltenden Gruppen nur so gering ist, wie es sich bisher abzeichnet.
Als Ausblick zeigen wir kurz auf, wo die Reise für das Projekt „Barcoding Fauna Bavarica“ und angeschlossener Projekte hingehen wird.

- In den nächsten drei Jahren werden wir verstärkt daran arbeiten, vor allem im Ergänzungsprojekt „German Barcode of Life“ die deutsche Fauna so weit als möglich zu erfassen und auch Material aus den großen Regionen in Deutschland Norden, Süden, Osten und Westen berücksichtigen. Damit hoffen wir, weitere Zwillingsarten zu entdecken, die über die drei klassischen Einwanderungspforten Südwesten (von Südfrankreich), Südosten (über die Donau) und Osten (über Polen) zu uns kommen. Gleichzeitig werden wir in diesem Rahmen auch Arten der Nachbargebiete berücksichtigen, um der aktuellen Faunenveränderung (Einwanderung mediterraner Arten) Rechnung zu tragen. Durch die breitere geographische Abdeckung werden wir genetische Variabilität innerhalb einer Art besser verstehen können.

- Parallel arbeiten wir daran, Stechimmenarten aus der westlichen und mittleren Paläarktis zu barcoden. Hierfür kooperieren wir mit weiteren Stechimmenforschern (bzw. suchen solche). Ziel ist es, die BOLD-Datenbank möglichst umfangreich zu gestalten. Ein aktuelles Projekt ist zum Beispiel das Barcoding der Stechimmenfauna der Vereinigten Arabischen Emirate.

- Aus den bisherigen Ergebnissen zeichnen sich bereits mehrere Artengruppen ab, die eine tiefer gehende Revision erforderlich machen. Soweit als möglich, werden wir von diesen Artengruppen größere Stückzahlen barcoden. Wir sehen es als unsere Aufgabe an, die Daten und Möglichkeiten für Kollegen zur Verfügung zu stellen, die sich in Zukunft mit diesen Themen beschäftigen wollen.

©Ampulex online, Christian Schmid-Egger; download unter http://www.ampulex.de oder www.zobodat.at

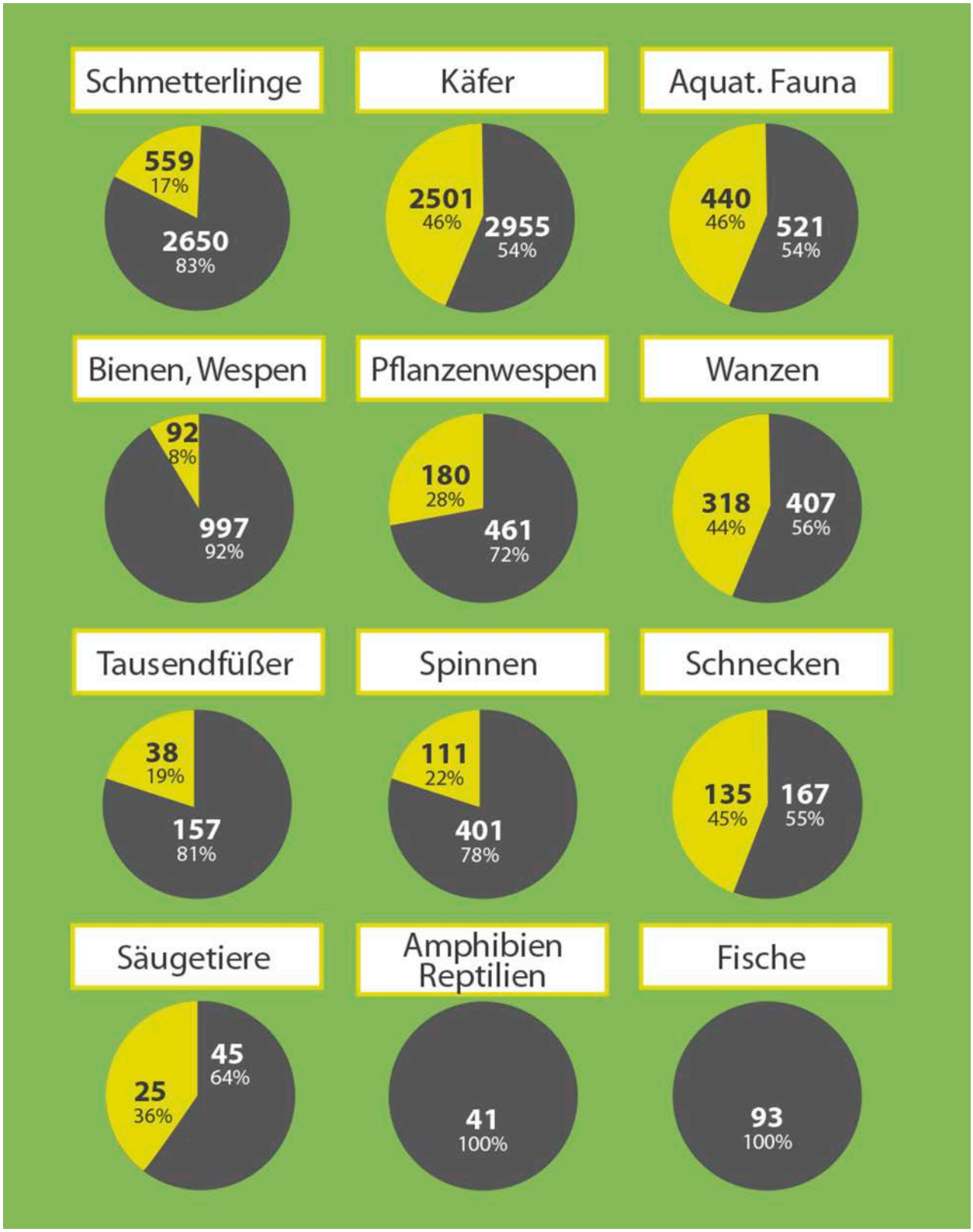

Abb. 7: Anteil der bayerischen Tierarten, für die bereits ein DNA-Barcocde vorliegt (ausgewählte Tiergruppen). Grau = Anteil bereits sequenzierter Arten, Gelb = Anteil noch fehlender Arten (Grafik: Jasminka Krobot).

©Ampulex online, Christian Schmid-Egger; download unter http://www.ampulex.de oder www.zobodat.at

- Zusätzlich besteht unsere Vision darin, künftige Taxonomen darin zu unterstützen, bei Revisionen und Neubeschreibungen Barcoding als Standardmethode zu verwenden und DNA Barcodes in die Beschreibung von Arten zu integrieren. Dabei sollen und können sie natürlich auf die bestehenden BOLD-Daten und unsere Voucherexemplare zurückgreifen.

Natürlich ist das Barcoding – die Analyse des COI-Gens – nur ein erster Schritt. In Zukunft ist zu erwarten, dass weitere Gene in solche Analysen mit einbezogen werden, vor allem um kritische Artengruppen zu klären oder verwandtschaftliche Beziehungen zwischen den Arten zu klären.

10. Danksagung

Wir danken Axel Hausmann für die konstruktive Durchsicht des Manuskripts.

11. Literatur

Bergsten, J., Bilton, D. T., Fujisawa, T., Elliott, M., Monaghan, M. T., Balke, M., Hendrich, L., et al. (2012): The Effect of Geographical Scale of Sampling on DNA Barcoding. *Systematic Biology* 61(5): 851 – 869. ▸ http://sysbio.oxfordjournals.org/content/61/5/851.full.pdf+html.

Buck, M., T.P. Cobb, J.K. Stahlhut & R.H. Hanner (2012): Unravelling cryptic species diversity in eastern Nearctic paper wasps, *Polistes* (*Fuscopolistes*), using male genitalia, morphometrics and DNA barcoding, with descriptions of two new species (Hymenoptera: Vespidae). *Zootaxa* 3502: 1 – 48.

Hausmann, A. (2011): An integrative taxonomic approach to resolving some difficult questions in the Larentiinae of the Mediterranean region (Lepidoptera, Geometridae). – *Mitteilungen der Münchner Entomologischen Gesellschaft* 101: 73 – 97.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003): Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings Biological sciences* / The Royal Society, 270(1512): 313 – 321.

Kunz, W. (2009): Ist die Technik des DNA-Barcodings wirklich die Zukunft der Taxonomie? *Acta Biologica Benrodis* 15 (2008/2009): 101 – 139.

May, R.M. (1992): How many species inhabit the earth? *Scientific American* 10: 18–24.

Mora, C., Tittensor, D.P., Adl, S., Simpson, A.G.B., Worm, B. (2011): How Many Species Are There on Earth and in the Ocean? *PLoS Biology* 9(8). ▸ http://www.plosbiology.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pbio.1001127.

Sann, M, M. Gerth, C. Venne, R. Tiedemann & C. Bleidorn (2011): Molekulare und morphologische Untersuchungen zum Status des *Nomada alboguttata* (Apiformes) Artkomplexes. *Ampulex* 2: 65 – 72.

Smith, M. A., Bertrand, C., Crosby, K., Eveleigh, E. S., Fernandez-Triana, J., Fisher, B. L., Gibbs, J., et al. (2012): *Wolbachia* and DNA Barcoding Insects: Patterns, Potential, and Problems. (J. H. Badger, Ed.) *PLoS ONE*, 7(5). ▸http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0036514.

Mehr Informationen zum Barcoding auf
▸http://www.faunabavarica.de

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Ampulex - Zeitschrift für aculeate Hymenopteren

Jahr/Year: 2012

Band/Volume: 5

Autor(en)/Author(s): Schmid-Egger Christian, Schmidt Stefan

Artikel/Article: DNA-Barcoding - Revolution in der Taxonomie? 19-35