

DNA-Barcoding – Perspektiven und Chancen: Eine Fallstudie am Beispiel der Laufkäfer (Coleoptera: Carabidae)

DNA Barcoding – Perspectives and Chances:
A Case Study on Ground Beetles (Coleoptera: Carabidae)

MICHAEL J. RAUPACH, KARSTEN HANNIG & JOHANN-WOLFGANG WÄGELE

Zusammenfassung: Die automatisierte Identifizierung von Organismen mit Hilfe von DNA-Sequenzen spielt im Rahmen umfangreicher ökologischer Fragestellungen und Biodiversitätsstudien eine immer größere Rolle. In diesem Zusammenhang hat sich das Fragment der mitochondrialen Cytochrom *c* Oxidase Untereinheit I (COI) als effektiver Standardmarker etabliert. Die Nutzung von COI ist jedoch nicht immer unproblematisch, da introgressive Hybridisierungen, unvollständige Linientrennungen (incomplete lineage sorting), mitochondriale Pseudogene (numts), Heteroplasmie und mütterlich vererbte intrazelluläre Endosymbionten Einfluss auf die Variabilität mitochondrialer DNA nehmen können. In diesem Zusammenhang untersuchten wir die Effizienz des COI-Barcodes und dreier nuklearer ribosomaler Expansionssegmente (18S rDNA: V4, 18S rDNA: V7 und 28S rDNA: D3), um 75 Arten mitteleuropäischer Laufkäfer zu identifizieren. Mit Hilfe des COI-Barcodes war es möglich, 73 (97 %) der untersuchten 75 Laufkäferarten korrekt zu identifizieren, während die Kombination der drei nuklearen Marker 71 Arten (95 %) aufzulösen vermochte. Unsere Ergebnisse zeigen das große Potenzial des COI-Barcodes und der nuklearen ribosomalen Expansionselemente als ergänzende Marker für die Identifizierung von Laufkäferarten.

Schlüsselwörter: COI, DNA-Barcoding, Mitteleuropa, molekulare Artidentifizierung, nukleare rDNA-Expansionselemente

Abstract: The automated identification of organisms using DNA sequences becomes more and more important in comprehensive ecological and biodiversity studies. In this context, a fragment of the mitochondrial cytochrome *c* oxidase I (COI) gene has been proposed as standard DNA barcoding marker for the identification of organisms. However, limitations of the COI barcoding approach can arise from the effect of introgressive hybridization, incomplete lineage sorting, numts, heteroplasmy and maternal inheritance of intracellular endosymbionts. Our study tests the effectiveness of the COI barcoding region and of three nuclear ribosomal expansion segments (18S rDNA: V4, 18S rDNA: V7 and 28S rDNA: D3) in discriminating 75 Central European ground beetle species. 73 species (97%) of the analysed species could be accurately identified using COI, while the combined approach of all three nuclear markers provided resolution among 71 (95%) of the studied ground beetles. Our results reveal the high potential of COI barcodes and nuclear ribosomal expansion segments as supplementary marker in discriminating carabid species.

Keywords: COI, DNA barcoding, Central Europe, molecular species identification, nuclear rDNA expansion segments

1. Einleitung

Die Erfassung der Biodiversität stellt eine der größten Herausforderungen in der Biologie dar. Aktuelle Schätzungen zufolge existieren zwischen 30 und 100 Millionen Arten von Organismen auf unserem Planeten (MAY 1988; BLAXTER 2003). In den letzten 250 Jahren der überwiegend morphologisch-systematischen Arbeit konnten bislang allerdings nur rund 1,8 Millionen Arten beschrieben werden. Bei maximal zu prognostizierender Artenzahl sind daher bei gleich bleibender Arterfassungsrate noch weitere 15000 Jahre zur vollständigen Erfassung der Biodiversität notwendig. Alternative Methoden zur beschleunigten Erfassung der Biodiversität in einer Zeit des globalen Klimawandels und weitreichender Umweltzerstörung sind daher gefragt. Eine viel versprechende Möglichkeit stellt hierbei die Verwendung von DNA-Sequenzen zur Artidentifizierung dar. Ziel des ambitionierten und visionären „Barcode of Life“-Projekts (www.ibolproject.org), initiiert von PAUL HEBERT (HEBERT et al. 2003a, b) aus Kanada, ist die Erfassung und Beschreibung aller Arten mittels eines sogenannten „DNA-Barcodes“ (Abb. 1). Die Nutzung eines solchen molekularen Markers ermöglicht sowohl die Bestimmung aller Entwicklungsstufen von Organismen als auch die von Organismusfragmenten unter Zuhilfenahme von Automatisierungsprozessen und ist daher insbesondere für umfangreiche Biodiversitätsstudien von großem Nutzen.

Als molekularer Marker hat sich in diesem Zusammenhang ein etwa 600 Basenpaare langes Fragment der mitochondrialen Cytochrom *c* Oxidase Untereinheit I (COI) bei sehr vielen Tierarten bewährt (HEBERT et al. 2003a, b). Die Vorteile der Verwendung mitochondrialer DNA für molekular-taxonomische Zwecke sind vielfältig. So werden mit wenigen bislang bekannten Ausnahmen Mitochondrien maternal vererbt; entsprechend unterliegt die mitochondriale DNA faktisch keiner Rekombination. Mitochondriale DNA

zeichnet sich weiterhin in vielen Abschnitten durch eine allgemein hohe Mutationsrate aus. Darüber hinaus erlauben im Falle des COI hoch konservierte Regionen, die den Barcode-Abschnitt flankieren, die Verwendung von universellen Primern für eine Vielzahl von Taxa. Bereits heute bestätigen zahlreiche Studien die Effizienz dieser Methodik (z. B. SMITH et al. 2005; CLARE et al. 2006; COSTA et al. 2007, 2009; HUBERT et al. 2008; SMITH & FISHER 2009; ZHOU et al. 2009).

Von entscheidender Bedeutung ist jedoch die Existenz einer so genannten Barcoding Lücke (barcoding gap): die innerartliche (intraspezifische) Variabilität muss einen geringeren Wert einnehmen als die zwischenartliche (interspezifische) Variabilität. Innerhalb einer Art liegen gewöhnlich verschiedene Haplotypen oder Varianten eines Gens vor. Die Unterschiede sind oft gering und beschränken sich meist auf wenige einzelne Mutationen in den Nukleotidsequenzen. Dies gilt auch für das als Barcode verwendete COI-Gen. Die für das Barcoding relevante intraspezifische Variabilität beschreibt somit nichts anderes als die Diversität der COI-Haplotypen innerhalb einer Art. Verschiedene Barcodingstudien unterschiedlichster Taxa zeigen, dass die beobachtete intraspezifische COI-Variabilität in den meisten Fällen recht gering ist (weniger als 1 %) und nur selten über 2 % liegt (z. B. HEBERT et al. 2003a, b, 2004a, b; BALL et al. 2005; WARD et al. 2005; HAJIBABAEI et al. 2006; BUCKLIN et al. 2007; JOHNSON et al. 2008; HOLMES et al. 2009). Liegen nun reproduktiv isolierte Gruppen von Organismen vor, ist kein Genfluss und keine Vermischung der unterschiedlichen Haplotypen zwischen den Populationen mehr zu beobachten. Dies führt dazu, dass sich nun unabhängig in den distinkten Populationen zufällige, aber unterschiedliche Mutationen anhäufen und manifestieren. Im Laufe der Zeit verändert sich dadurch die Zusammensetzung der Haplotypen innerhalb einer Art, die interspezifische Variabilität wächst an und wird letztlich größer als die intraspezifische Variabilität der zwei

Imagine...

a world in which you can know the name of

any animal any plant any fungus any organism

on the spot in an instant anywhere on our planet

This is the world that iBOL will build

iBOL International Barcode of Life Project
Assembling the DNA barcode library of life

Abb. 1: Werbung für das internationale Barcode of Life(iBOL)-Projekt.

Fig. 1: Advertisement for the international Barcode of Life(iBOL)-Project.

nun isolierten Arten. Es liegt dann die so genannte Barcodinglücke (barcoding gap) vor. Nur wenn eine solche Barcodinglücke existiert, ist zwangsläufig eine einwandfreie Artidentifizierung möglich (Abb. 2). Zur Abgrenzung von Schwesterarten wird für viele

Taxa eine Sequenzdivergenz von etwa 2 % angesehen (siehe oben, Abb. 2). Dieser Schwellenwert wurde im Rahmen umfangreicher Studien ermittelt (AVISE 2000; HEBERT et al. 2003a). Es ist aber zu berücksichtigen, dass dieser Wert nicht pauschal für alle Organismen als „Art-

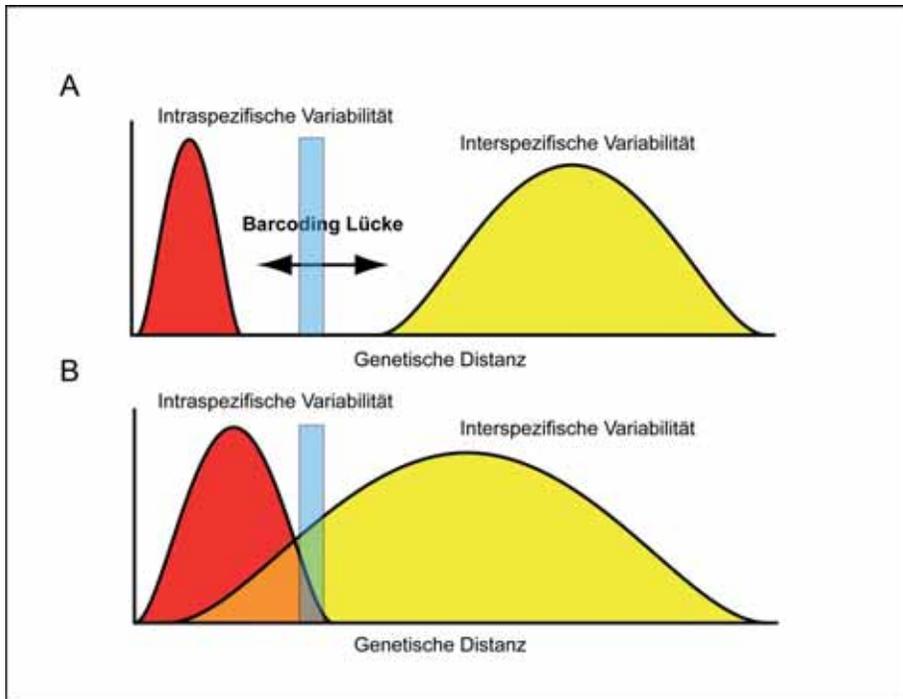


Abb. 2: Schematische Darstellung der intra- und interspezifischen genetischen Distanz mit (A) und ohne (B) Barcodinglücke. Der blaue Balken symbolisiert einen ungefähren Schwellenwert, der für viele Taxa als „Artgrenze“ angesehen werden kann und bei einer Sequenzdivergenz von etwa 2 % liegt (siehe Einleitung).

Fig. 2: Schematic display of intra- and interspecific genetic distance with (A) and without (B) barcoding gap. The blue bar indicates a rough threshold for species identification for many taxa with about 2% sequence divergence (see introduction).

grenze“ angesehen werden kann und entsprechend (und berechtigterweise) kontrovers diskutiert wird (z. B. VENCES et al. 2005; LEFÉBURE et al. 2006; FRÉZAL & LEBLOIS 2008). Weiterhin ist eine sichere Artidentifizierung bei Arten, die erdgeschichtlich betrachtet erst vor sehr kurzer Zeit entstanden sind, oder Organismen, die sich noch im Artbildungsprozess befinden, nicht immer möglich. Als klassische Beispiele hierfür können unter anderem Fruchtfliegen (MALLET 2006; KULATHINAL et al. 2009) und Buntbarsche (Cichliden) (KOCHER 2004; SEEHAUSEN 2006) angesehen werden. In solchen Fällen können schneller evolvierende Marker aus dem Bereich der Populationsgenetik wie zum Beispiel Mikrosatelliten zur Determinierung nützlicher sein.

Es soll nicht unterschlagen werden, dass die Verwendung von COI auch mit anderen Problematiken behaftet sein kann. Hybridisierungen, eine „unvollständige Liniensortierung“ (incomplete lineage sorting), aber auch das Auftreten intrazellulärer Endosymbionten (zum Beispiel *Wolbachia* oder *Rickettsia*) können zu einer Verfälschung der mitochondrialen Variabilität führen (z. B. CIANCHI et al. 2003; HUNDSDOERFER et al. 2005; PERLMAN et al. 2006; NAGATA et al. 2007; ZHANG & SOTA 2007; DURON et al. 2008). Heteroplasmie, also das Vorhandensein verschiedener mitochondrialer Genkopien in einer Zelle oder einem Individuum (KMEC et al. 2006; siehe aber auch PARR et al. 2009), und die Existenz mitochondrialer Genabschnitte, die durch Trans-

lokationsprozesse in den Zellkern übertragen wurden und nun keinem Selektionsdruck mehr unterliegen (sog. numts) können ihrerseits erhebliche Probleme bei der Amplifizierung bereiten (z. B. BENSASSON et al. 2000; PAMILO et al. 2007; SONG et al. 2008; BUHAY 2009; HLAING et al. 2009). Und schließlich konnte in Einzelfällen die zur Artdifferenzierung notwendige Barcodinglücke nicht nachgewiesen werden (MEYER & PAULAY 2005; WIEMERS & FIEDLER 2007; Abb. 2).

Es erscheint somit durchaus sinnvoll, sich bei der molekulartaxonomischen Erfassung von Arten nicht nur auf ein mitochondriales Genfragment zu verlassen, sondern nach einer ersten Analyse des COI-Fragments andere geeignete, möglichst nukleare Genabschnitte zu untersuchen. Als alternative Marker bieten sich hier so genannte hypervariable Expansionssegmente der ribosomalen DNA (rDNA) an. Im Gegensatz zu proteinkodierenden DNA-Abschnitten zeichnen sich ribosomale Expansionssegmente auf Grund von Substitutionen, Insertionen und Deletionen durch mitunter große Längenvariationen selbst zwischen nahe verwandten Arten aus (zum Beispiel HANCOCK & VOGLER 2000; HWANG et al. 2000; XIE et al. 2009), während innerhalb einer Art keine Variabilität auf Grund des Prinzips der „concerted evolution“ (z. B. HILLIS & DIXON 1991; LIAO 1999; EICKBUSH & EICKBUSH 2007; GANLEY & KOBAYASHI 2007) zu erwarten ist. Allerdings evolvieren diese Bereiche der rDNA im Vergleich zu mitochondrialer DNA deutlich langsamer. Entsprechend können bereits einzelne Substitutionen, Deletionen oder Insertionen auf distinkte und reproduktiv isolierte Taxa hinweisen.

In unserer Fallstudie untersuchten wir die Effizienz des COI Barcodes für die Identifikation verschiedener ausgewählter Laufkäferarten aus Mitteleuropa (Abb. 3). Ergänzend testeten wir den Nutzen dreier ausgewählter nuklearer ribosomaler Expansionssegmente (18S rDNA: V4, V7; 28S rDNA: D3) als unterstützende Marker.

In Mitteleuropa werden aktuell mehr als 750 Laufkäferarten unterschieden (MÜLLER-MOTZFELD 2004), wobei zahlreiche Arten in mitunter sehr komplexen taxonomischen Konstrukten zusammengefasst werden, die sich unter anderem in der Existenz zahlreicher „Untergattungen“ und „Unterarten“ widerspiegeln. In vielen Fällen ist es allerdings nicht sicher, ob lediglich eine phänotypische oder morphologische Variabilität beobachtet wird oder Populationen tatsächlich reproduktiv isoliert sind. Da viele Laufkäferarten als Indikatorarten für einen bestimmten Lebensraum oder für eine bestimmte Habitatqualität gelten, ist jedoch eine genaue Kenntnis der Taxonomie für viele naturschutzfachliche und ökologische Fragestellungen essenziell. Von besonderem Interesse ist die Fähigkeit der genutzten molekularen Marker, nahe verwandte „Artenpaare“ der Laufkäfer unterscheiden zu können. Hierzu wurden die drei Artenpaare *Bembidion lampros/properans*, *Clivina collaris/fossor* und *Pterostichus nigrita/rhaeticus* genauer untersucht. Im Falle von *B. lampros/properans* sind die morphologischen Unterschiede zwischen beiden Arten mitunter nur sehr gering sind, z. B. die Ausprägung der Flügeldeckenstreifung und der Stirnfurchen (MÜLLER 1971; LINDROTH 1985; MÜLLER-MOTZFELD 2004). Ähnliches gilt auch für die zwei untersuchten *Clivina*-Arten. So gilt *Clivina fossor* als Schwesterart von *Clivina collaris*, wurde aber in der Vergangenheit bisweilen als deren Unterart angesehen. Eine Zusammenfassung dieser taxonomischen Thematik gibt SOKOLOWSKI (1955). Im Gegensatz zu *Clivina fossor* ist *Clivina collaris* jedoch durchschnittlich etwas kleiner und zweifarbig; verschiedene morphologische Merkmale (u. a. die Ausprägung der Kinnmittelzahnspezitze sowie der Tuberkel an der Basis der Flügeldeckenintervalle) sowie unterschiedliche ökologische Präferenzen unterstützen die Vorstellung, dass es sich hier um zwei distinkte Arten handelt (z. B. SOKOLOWSKI 1955; MÜLLER-MOTZFELD 2004). Etwas schwieriger gestaltet sich dagegen die Situation bei *Pterosti-*

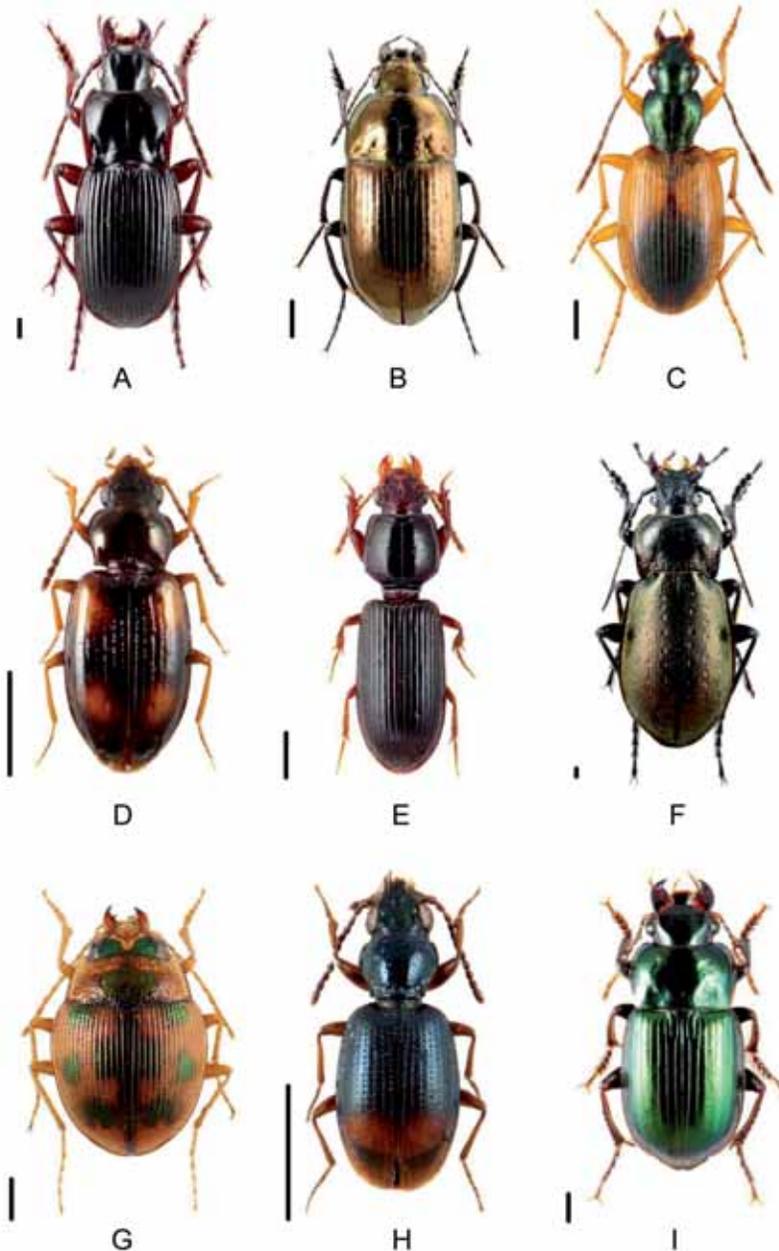


Abb. 3: Aufnahmen einiger ausgewählter Vertreter der bearbeiteten Laufkäfer. **A:** *Abax beckenhauptii*, **B:** *Amara erratica*, **C:** *Anchomenus dorsalis*, **D:** *Elaphropus quadrisignatus*, **E:** *Clivina fossor*, **F:** *Carabus nemoralis*, **G:** *Omophron limbatum*, **H:** *Benbidion aspericolle*, **I:** *Harpalus affinis*. Maßstabsbalken = 1 mm. Mit freundlicher Genehmigung von ORTWIN BLEICH.

Fig. 3: Images of some selected species of the analysed ground beetles. **A:** *Abax beckenhauptii*, **B:** *Amara erratica*, **C:** *Anchomenus dorsalis*, **D:** *Elaphropus quadrisignatus*, **E:** *Clivina fossor*, **F:** *Carabus nemoralis*, **G:** *Omophron limbatum*, **H:** *Benbidion aspericolle*, **I:** *Harpalus affinis*. Scale bar = 1 mm. By courtesy of ORTWIN BLEICH.

chus nigrita/rhaeticus. Ökologische Studien und Kreuzungsexperimente ausgewählter Populationen geben Hinweise auf die Existenz zweier *Pterostichus*-Arten, die jedoch lange Zeit nicht als solche erkannt wurden (THIELE 1977; KOCH 1984; MÜLLER-MOTZFELD & HARTMANN 1985; ANGUS et al. 2000, 2008). Die morphologischen Unterschiede sind dagegen äußerst subtil: So können Männchen primär an der Ausprägung der rechten Paramere unterschieden werden, während Weibchen in der Form des 8. Abdominalsternits variieren. Für beide Merkmale liegen jedoch zahlreiche Übergangsformen vor (MÜLLER-MOTZFELD & HARTMANN 1985; ANGUS et al. 2000, 2008), so dass sich auch die Frage stellt, in welchem Maße sich eine phänotypische und/oder morphologische Plastizität in diesen Merkmalen widerspiegelt.

2. Material und Methoden

2.1. Bearbeitete Taxa

Im Rahmen unserer Studie wurden bislang 344 Laufkäfer aus 75 Arten bearbeitet (Tab. 1). Eine solche Studie kann durch die Anzahl und den Fundort der untersuchten Individuen maßgeblich beeinflusst werden. Prinzipiell sollten daher Exemplare aus dem gesamten Verbreitungsgebiet einer Art einfließen. Dies ist aus nachvollziehbaren finanziellen und logistischen Gründen bislang jedoch nur begrenzt möglich. Erste Fallstudien zeigten weiterhin, dass eine entsprechend umfassende Beprobung des Verbreitungsgebietes nicht zwingend notwendig ist (z. B. LUKHTANOV et al. 2009; HEBERT et al. 2010; JENNINGS et al. 2010). Für unsere Studie wurden (und werden) im Rahmen unserer Möglichkeiten Vertreter aus unterschiedlichen geographischen Regionen untersucht, um zumindest eine grobe Vorstellung von der genetischen Variabilität der untersuchten Arten zu erhalten. Es wurden mindestens zwei und maximal 13 Individuen pro Art untersucht; der Durchschnitt lag bei fünf Käfern je Art.

2.2. DNA-Extraktion, Amplifizierung und Sequenzierung

Genomische DNA wurde aus frisch gesammelten Käfern, Alkoholpräparaten (96% Ethanol) oder genadelten Individuen („Trockenpräparate“) extrahiert, wobei von großen Arten einzelne Beine und im Falle kleiner bis sehr kleiner Arten auch komplette Individuen eingesetzt wurden. Zur DNA-Isolierung wurde das QIAmp Tissue Kit (Qiagen GmbH, Hilden) laut Herstellerprotokoll verwendet. Alle bearbeiteten Käfer sind in der Sammlung des Zoologischen Forschungsmuseums Alexander Koenig (ZFMK) in Bonn hinterlegt; die verwendete DNA wurde in der neu gegründeten hauseigenen DNA Bank des ZFMK als Bestandteil des DNA-Bank-Netzwerks (www.dnabank-network.org) deponiert.

Für die Amplifizierung der COI wurden Standardprimer und -protokolle genutzt (siehe FOLMER et al. 1994), während die Expansionssegmente mittels eigens generierter Primer amplifiziert wurden. Detaillierte Informationen bezüglich der verwendeten Primerpaare und PCR-Profile können beim Erstautor erfragt werden. Aufgereinigte PCR-Produkte wurden von einem kommerziellen Sequenzierservice (Macrogen, Seoul) unter Verwendung der PCR-Primer doppelsträngig sequenziert. Alle Sequenzen wurden beim National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide>) hinterlegt (accession numbers: GU347009-GU348384).

2.3. Datenanalysen

Alle COI- und Expansionsfragmentsequenzen wurden mittels MUSCLE V3.6 (EDGAR 2004) unter Verwendung der Grundeinstellung aliniert. Zur Analyse der intra- und interspezifischen genetischen Variabilität der COI-Sequenzen wurden die für Barcodinganalysen üblichen Kimura 2-Parameter (K2P)-Distanzen (KIMURA 1980) mittels PAUP*4.0b10

Tab. 1: Bearbeitete Laufkäferarten, Anzahl der untersuchten Individuen und maximale intraspezifische K2P-Distanzen des COI-Barcodefragments (* im Falle von *Pterostichus nigrita/rhaeticus* war keine Differenzierung möglich).

Tab. 1: Analysed ground beetle species, number of used specimens and maximum intraspecific K2P-distances of the COI barcode fragment (* it was not possible to make a differentiation between *Pterostichus nigrita/rhaeticus*).

Tribus	Gattung	Art	Anzahl (n)	Intraspezifische COI-Variabilität (K2P) [%]
Omopronini	<i>Omopron</i>	<i>limbatum</i>	4	0
Carabini	<i>Carabus</i>	<i>auroniensis</i>	7	0,0077
		<i>monilis</i>	4	0,0015
		<i>nemorialis</i>	6	0,0267
		<i>nitens</i>	4	0
Cychrini	<i>Cybebus</i>	<i>caraboides</i>	3	0,0016
Nebriini	<i>Nebria</i>	<i>bellvigii</i>	5	0,038
		<i>jockischii</i>	5	0,0108
Elaphrini	<i>Elaphrus</i>	<i>castanea</i>	3	0,0046
		<i>ovatus</i>	4	0,0015
		<i>cupreus</i>	4	0
Loriccerini	<i>Loricera</i>	<i>riparius</i>	4	0,0046
		<i>pilicornis</i>	4	0,0015
		<i>collaris</i>	4	0,0015
Scaritini	<i>Clivina</i>	<i>fossor</i>	4	0,0061
		<i>aeneus</i>	4	0,0015
		<i>chalcus</i>	4	0,0016
		<i>thoracicus</i>	4	0,0062
Bembidiini	<i>Elaphropus</i>	<i>parvulus</i>	3	0,0093
		<i>quadrisingatus</i>	4	0,0015
	<i>Bembidion</i>	<i>articulatum</i>	5	0
		<i>aspericolle</i>	5	0,0015
		<i>decoratum</i>	4	0,0015
		<i>decorum</i>	10	0,0046
		<i>elongatum</i>	4	0,0015
		<i>lampyris</i>	10	0
		<i>litorale</i>	4	0,0093
		<i>pollidipenne</i>	4	0,0015
		<i>properans</i>	7	0,0187
		<i>punctulatum</i>	4	0,0046
		<i>ruficornis</i>	4	0,0015
		<i>semipunctatum</i>	4	0,0015
		<i>tetracolum</i>	6	0,0015
		<i>tibiale</i>	4	0,0093
		Pterostichini	<i>Poecilus</i>	<i>cupreus</i>
<i>Pterostichus</i>	<i>anthracinus</i>	3	0	
	<i>aterimus</i>	5	0,0108	
	<i>illygeri</i>	3	0	
	<i>jurinei</i>	8	0,0077	
	<i>melanarius</i>	7	0,0124	
	<i>niger</i>	10	0,0061	
	<i>nigrita</i>	10	0,0047*	
	<i>oblongopunctatus</i>	5	0	
	<i>panzeri</i>	5	0,0031	
	<i>rhaeticus</i>	7	0,0047*	
	<i>unctulatus</i>	3	0	
	<i>ziegleri</i>	3	0,0015	
	<i>Molops</i>	<i>piceus</i>	2	0
	<i>Abax</i>	<i>beckenhauptii</i>	3	0,0155
		<i>ovatus</i>	6	0,0031
<i>parallelepipedus</i>		5	0	
Platynini	<i>Limodromus</i>	<i>assimilis</i>	13	0,0139
		<i>dorsalis</i>	6	0,0015
	<i>Agonum</i>	<i>emarginatum</i>	3	0
	<i>marginatum</i>	4	0,0031	
	<i>micans</i>	4	0,0031	

Tab. 1: Fortsetzung.
Tab. 1: Continued.

Tribus	Gattung	Art	Anzahl (n)	Intraspezifische COI-Variabilität (K2P) [%]
	<i>Agonum</i>	<i>muelleri</i>	3	0,0031
	<i>Agonum</i>	<i>viduum</i>	3	0
Zabryni	<i>Amara</i>	<i>antibolia</i>	2	0,0032
	<i>Amara</i>	<i>anlica</i>	2	0,0033
	<i>Amara</i>	<i>erratica</i>	5	0,0015
	<i>Amara</i>	<i>quenseli</i>	5	0,0031
	<i>Amara</i>	<i>similata</i>	3	0
Harpalini	<i>Anisodactylus</i>	<i>binotatus</i>	2	0,0034
	<i>Harpalus</i>	<i>affinis</i>	9	0,0015
	<i>Harpalus</i>	<i>rubripes</i>	3	0
	<i>Harpalus</i>	<i>rufipes</i>	3	0
	<i>Dicheirotichus</i>	<i>gustavii</i>	5	0,0031
	<i>Dicheirotichus</i>	<i>obsoletus</i>	4	0
	<i>Stenolophus</i>	<i>mixtus</i>	2	0
	<i>Stenolophus</i>	<i>teutonus</i>	5	0,0124
Licinini	<i>Licinus</i>	<i>hoffmannseggii</i>	4	0,0046
Lebiini	<i>Dramus</i>	<i>quadrimaculatus</i>	3	0,0186
	<i>Philorhizus</i>	<i>melanocephalus</i>	3	0
	<i>Philorhizus</i>	<i>sigma</i>	2	0

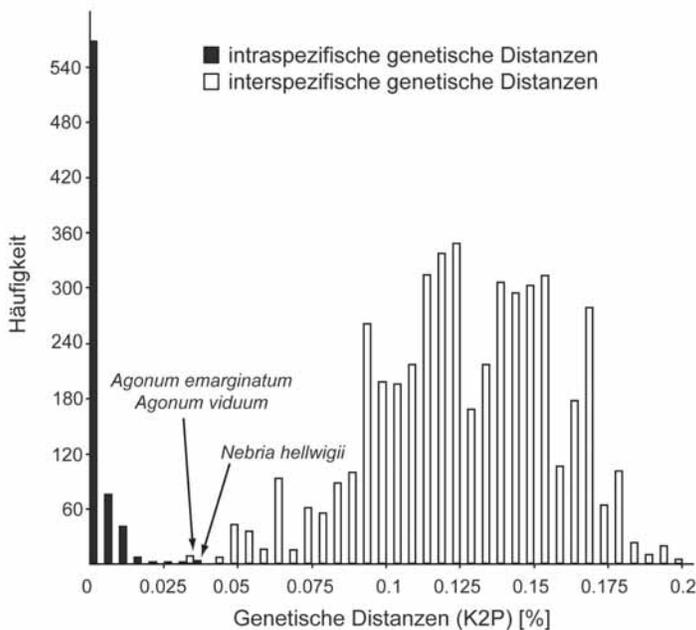


Abb. 4: Histogramm der berechneten intra- und interspezifischen K2P-Distanzen des COI-Barcodefragments.

Fig. 4: Histogram of the calculated intra- and interspecific K2P-distances of the COI barcode fragment.

(SWOFFORD 2002) berechnet (Tab. 1, Abb. 4) und mit Hilfe des Programms PAST Version 1.94b (HAMMER et al. 2001) als Histogramm dargestellt. Weiterhin wurde das Neighbour-joining-Clusterverfahren (SAITOU & NEI 1987) unter Verwendung des K2P-Modells zur Distanzkorrektur bei der Topologiekonstruktion der COI-Daten mittels PAUP*4.0b10 verwendet (Abb. 5). Für die einzelnen ribosomalen Datensätze wurden patristische Distanzen (p-Distanzen) unter Verwendung von PAUP* berechnet (nicht dargestellt) und ebenfalls als Neighbour-joining-Topologie visua-

lisiert (nicht dargestellt). Für alle Topologien wurde *Priacma serrata* (Coleoptera, Archostemata, Cupedidae) als Außengruppentaxon verwendet; die Sequenzen wurden vom National Center for Biotechnology Information bezogen (COI: EU839762, 18S rDNA: EU797411, 28S rDNA: EU797380).

Es soll an dieser Stelle nochmals explizit betont werden, dass die erhaltenen Topologien keinesfalls als Rekonstruktion der Verwandtschaftsverhältnisse gedeutet werden dürfen. Vielmehr handelt es sich hierbei um eine Methodik, Sequenzen gemäß ihrer Ähnlich-

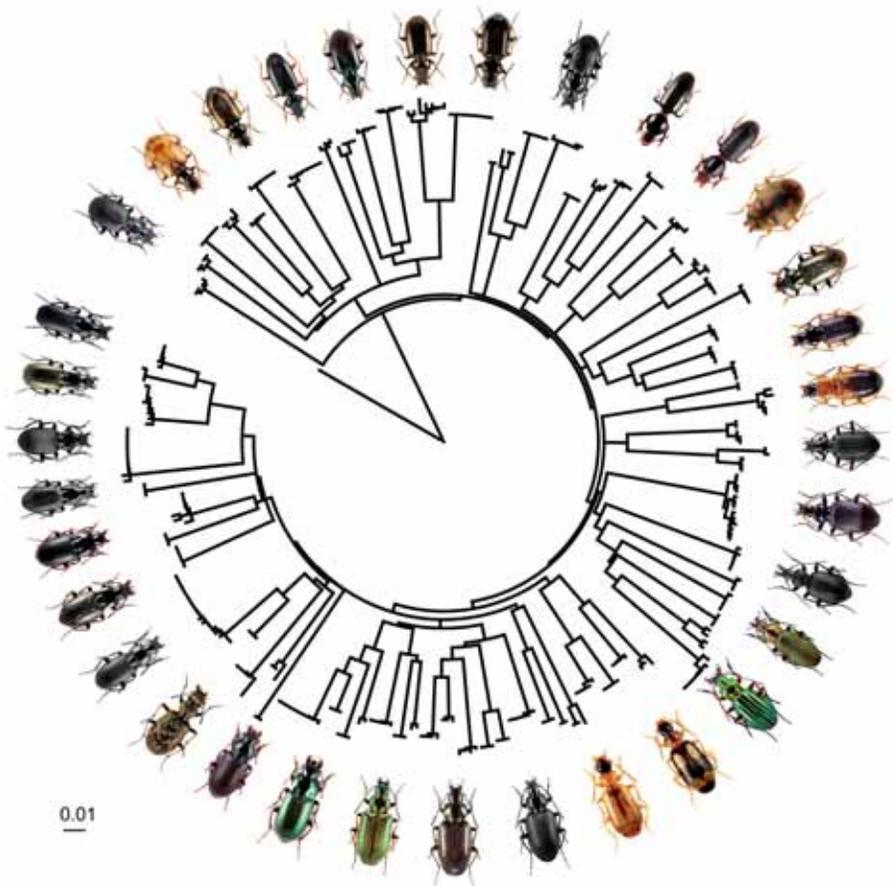


Abb. 5: Neighbour-joining-Phylogramm des COI-Datensatzes, basierend auf K2P-Distanzen sowie Abbildungen einiger ausgewählter Arten.

Fig. 5: Neighbour-joining phylogram of the COI data set, based on K2P-distances, as well as images of selected analysed species.

keit zu gruppieren, als Baum darzustellen und unter Verwendung entsprechender Parameter Arten zu unterscheiden (siehe auch BLAXTER 2004; STEINKE et al. 2005; ASTRIN et al. 2006).

3. Ergebnisse

3.1. Der COI-Datensatz

Die durchschnittliche K2P-Distanz innerhalb aller analysierten Laufkäferarten (intraspezifische Distanz) lag bei 0,2 %, während die durchschnittliche Distanz zwischen den Arten (interspezifische Distanz) innerhalb einer Gattung 12,6 % betrug. Die niedrigsten interspezifischen K2P-Distanzen fanden sich in der Gattung *Agonum*. Hier betrug die Distanzen zwischen *Agonum emarginatum* und *Agonum viduum* 3,14 %. Im Rahmen des untersuchten Artenspektrums wiesen zehn Laufkäferspezies eine intraspezifische COI-Variabilität zwischen 1 und 2 % auf, wobei für zwei Arten Werte über 2 % ermittelt wurden: Im Falle von *Carabus nemoralis* betrug

die K2P-Distanzen bis zu 2,7 %, für *Nebria hellwigi* die Werte sogar 3,8% (siehe Tab. 1). Für beide Arten konnten weiterhin je zwei distinkte Haplotypen nachgewiesen werden. Dagegen war es nicht möglich, Individuen von *Pterostichus nigrita* und *Pterostichus rhaeticus* artspezifisch zu differenzieren (Abb. 6). Beide Arten teilten sich identische Haplotypen und die berechneten K2P-Distanzen lagen für beide Arten zwischen 0 und 0,5 %.

3.2. Die rDNA-Datensätze

Bei den analysierten Laufkäfern waren mitunter große Längenunterschiede bei den analysierten Expansionsfragmenten zu beobachten. Die Fragmentlängen lagen für das D3-Fragment mit einer durchschnittlichen Länge von 198 Basenpaaren (bp) zwischen 185 (verschiedene Arten) und 254 Basenpaaren (bp) (*Molops piceus*), für das V4-Fragment zwischen 355 bp (*Dromius quadrimaculatus*) und 515 bp (*Omophron limbatum*) und einer durchschnittlichen Länge von 384 bp und für das V7-Fragment zwischen 388 bp (beide *Philorhi-*

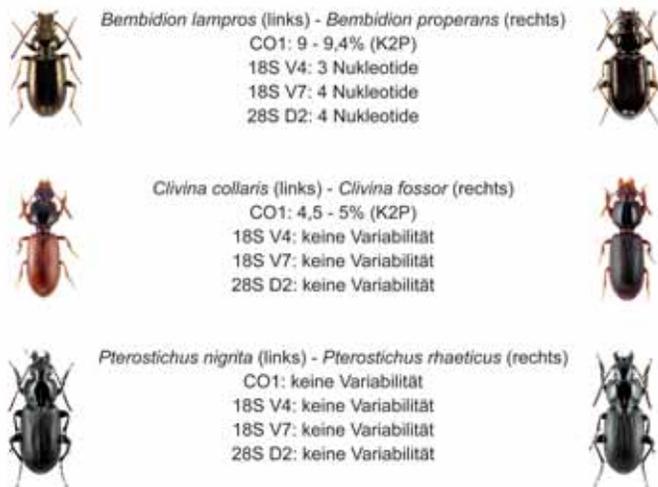


Abb. 6: Variabilität der vier untersuchten molekulartaxonomischen Marker für *Bembidion lampros/properans*, *Clivina collaris/fossor* und *Pterostichus nigrita/rhaeticus*.

Fig. 6: Variability of the four analysed molecular taxonomic makers for *Bembidion lampros/properans*, *Clivina collaris/fossor*, and *Pterostichus nigrita/rhaeticus*.

zus-Arten) und 504 bp (*Omophron limbatum*). Im letzteren Fall betrug die durchschnittlichen Fragmentlänge 414 bp. Die Analyse der einzelnen Fragmente ergab, dass sich nahe verwandte Arten oft nur durch Substitutionen, Insertionen oder Deletionen einzelner Basen bei allen drei analysierten Markern unterscheiden, zum Beispiel *Amara anthobia/erratica* (D3), *Agonum viduum/marginatum* (V4), und *Harpalus affinis/Harpalus rubripes* (V7). Dagegen wurden bei verschiedenen Arten identische Sequenzen nachgewiesen, was eine erfolgreiche Artidentifizierung verhinderte. Für das D3-Fragment traf dies für die Artenpaare *Agonum emarginatum/viduum*, *Amara anthobia/similata*, *Bembidion decorum/tetracolum*, *Elaphropus parvulus/quadrisingnatus*, *Harpalus affinis/rubripes* und *Stenolophus mixtus/teutonius* zu. Mit Hilfe des V4-Fragments ließen sich folgende Arten nicht unterscheiden: *Agonum marginatum*, *micans* und *mülleri*, *Anisodactylus binotatus* und *Harpalus rubripes*, *Dyschirius aeneus/thoracicus*, *Elaphropus parvulus/quadrisingnatus*, *Harpalus affinis/rufipes* und *Pterostichus jurinei/panzeri/ziegleri*. Im Falle des V7-Fragments wurden für *Agonum micans/mülleri*, *Amara anthobia/erratica* und *Pterostichus panzeri/ziegleri* keine Unterschiede festgestellt. Zusätzlich gelang es mit keinem der verwendeten rDNA Marker, die Artenpaare *Clivina collaris/fossor* und *Pterostichus nigrita/rhaeticus* aufzulösen (Abb. 6). Dagegen konnten im Falle der untersuchten Individuen von *Nebria hellwigii* zwei unterschiedliche V7-Sequenzen nachgewiesen werden, die mit den gefundenen zwei COI-Linien übereinstimmen. Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass mit Hilfe des D3 Fragments 61 (81 %) der untersuchten 75 Arten korrekt identifiziert werden konnten. Im Falle des V4-Fragments konnten 57 Arten (76 %) unterschieden werden, während das V7-Fragment für 65 Arten (87 %) eine eindeutige Zuordnung ermöglichte. Werden jedoch die Ergebnisse aller drei Marker kombiniert (multimarker approach), konnten 71 Arten (95 %) determiniert werden.

4. Diskussion

Unsere Ergebnisse belegen den großen Nutzen von DNA-Sequenzen zur erfolgreichen Bestimmung der untersuchten Laufkäfer. Mit Hilfe des COI-Barcodes konnten 73 (97 %) der analysierten Arten korrekt zugeordnet werden, ein deutlicher Beleg für das große Potenzial des COI-Fragments bei der Artdifferenzierung selbst von nahe verwandten Carabidenspezies. Wir konnten weiterhin den Nutzen von nuklearen ribosomalen Expansionsfragmenten als wertvolle und effiziente Ergänzung zum klassischen DNA-Barcoding zeigen, um mögliche Probleme bei der alleinigen Nutzung von mitochondrialer DNA zu umgehen. Die Analyse der drei Fragmente in Kombination ermöglichte die Differenzierung von 71 Arten (95 %).

4.1. Liegt für die untersuchten Laufkäferarten eine Barcodinglücke vor?

Auf den ersten Blick lag für den analysierten Datensatz keine Barcodinglücke vor (Abb. 4), da die höchste intraspezifische Variabilität (3,8 % bei *Nebria hellwigii*) einen deutlich höheren Wert einnahm als die niedrigste interspezifische Variabilität (*Agonum emarginatum/viduum*: 3,14 %). Für *Nebria hellwigii* deuten die vorliegenden nuklearen Daten (zwei unterschiedliche V7-Sequenzen, die mit den gefundenen zwei COI-Linien übereinstimmen) jedoch auf die Existenz zweier kryptischer Arten hin. Mit 2,8 % lag die intraspezifische COI-Variabilität bei *Carabus nemoralis* ebenfalls auffällig hoch; mit 1,87% hatte *Bembidion lampros* die dritthöchste, aber deutlich geringere intraspezifische Variabilität. Bei *Carabus nemoralis* lag im Gegensatz zu *Nebria hellwigii* keine Variabilität auf nuklearer Ebene vor. Die beobachtete COI-Variabilität kann daher durch Introgression und/oder eine „unvollständige Liniensortierung“ (incomplete lineage sorting) verursacht worden sein. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch für andere *Carabus*-Arten nachgewiesen (z. B. SOTA et al.

2001; STREIFF et al. 2005; NAGATA et al. 2007). Für eine Bestätigung beider Hypothesen müssen allerdings weitere Individuen sowohl molekular als auch morphologisch analysiert werden. Entsprechend dieser Beobachtungen nimmt die vorliegende Barcodinglücke mit lediglich 0,34 % einen recht niedrigen Wert ein.

4.2. Erfolgreiche Artidentifizierung bei *Bembidion lampros/properans*, *Clivina collaris/fossor* und *Pterostichus nigrita/rhaeticus*?

Im Falle von *Bembidion lampros/properans* bestätigten alle molekularen Daten die Existenz zweier distinkter Arten. So lagen die interspezifischen K2P-Distanzen für die COI-Sequenzen zwischen 9 und 9,4 %, während für die nuklearen Marker drei (V4) oder vier (V7, D3) Basensubstitutionen festgestellt wurden und somit reproduktiv distinkte Arten kennzeichneten (Abb. 6). Etwas anders verhielt es sich bei dem Artenpaar *Clivina collaris/fossor*. Die interspezifischen K2P-Distanzen lagen mit 4,5 bis 5,3 % deutlich über 3,14%, welche für *Agonum emarginatum* und *Agonum viduum* ermittelt wurde (siehe oben). Dagegen wiesen die nuklearen Marker keine Sequenzvariationen auf (Abb. 6). Das Artaufspaltungsereignis ist vermutlich jüngeren Ursprungs, eine molekulare Datierung steht aber noch aus. Vergleichbares gilt auch für *Pterostichus nigrita/rhaeticus*, allerdings konnten die einzelnen Arten in diesem Fall auch nicht mit Hilfe des COI-Barcodes unterschieden werden (Abb. 6). Die interspezifischen K2P-Distanzen für die COI-Sequenzen betragen maximal 0,2 %, während auf nuklearer Ebene keine Substitutionen zu beobachten waren. Somit war eine Differenzierung der beiden *Pterostichus*-Arten mittels der verwendeten molekularen Marker nicht möglich. Es stellt sich daher die Frage, ob tatsächlich zwei Arten vorliegen. Diesbezüglich sollte jedoch auch bedacht werden, dass bei Arten, die jungen Ur-

sprungs sind oder aktuellen Artbildungsprozessen unterliegen, sich mitunter noch keine charakteristischen Mutationen manifestieren konnten (TAUTZ et al. 2003). Weiterhin können morphologische Merkmale schneller evolvieren als die untersuchten „Standard“-Gene. Für eine eindeutige Klärung dieses Sachverhaltes ist die Analyse weiterer Individuen und anderer, schneller evolvierender molekularer Marker (zum Beispiel Mikrosatelliten) zwingend notwendig.

5. Schlussfolgerungen

Unsere Ergebnisse zeigen, dass Laufkäfer erfolgreich mit Hilfe der untersuchten molekularen Marker differenziert werden können. Die niedrigsten interspezifischen K2P-Distanzen aller untersuchten Taxa liegen mit 3,14 % bei dem Artenpaar *Agonum emarginatum/viduum* vor. Basierend auf den vorliegenden Daten kann dieser Wert als Mindestschwellenwert zur Determination distinkter Arten angesehen werden. Neben dem klassischen COI-Barcode sind weiterhin die untersuchten nuklearen ribosomalen Expansionsfragmente effektive ergänzende Marker, wobei der Schwellenwert für alle drei Marker eine Basensubstitution, Insertion oder Deletion beträgt. Mit Hilfe der nuklearen Marker konnten im Falle *Carabus nemoralis* deutliche Hinweise für Introgression und/oder eine „unvollständige Linienartierung“ (incomplete lineage sorting) gefunden werden, während im Falle von *Nebria hellwigii* die Existenz eines kryptischen Artkomplexes zu klären ist. Von besonderem Interesse ist weiterhin die Analyse zusätzlicher Exemplare des Artkomplexes *Pterostichus nigrita/rhaeticus*, wobei die Verwendung von Mikrosatelliten in Betracht gezogen werden sollte. Ein wichtiger Aspekt für die Zukunft ist fraglos die Analyse momentan noch fehlender Arten. Auch sollte die Anzahl der analysierten Individuen pro Art erhöht werden, um so einen verlässlicheren Eindruck der vorliegenden genetischen Variabilität zu erhalten.

6. DNA-Barcoding: Perspektiven und Chancen

Die Verwendungsmöglichkeiten von DNA-Barcodes sind in der modernen Biologie enorm vielfältig und beschränken sich nicht nur auf die Klärung rein taxonomischer Fragestellungen (z. B. FISHER & SMITH 2008). Bei einer entsprechend hohen Anzahl an untersuchten Individuen einer Art aus verschiedenen Regionen können zusätzlich phylogeographische Fragestellungen untersucht werden (z. B. LÁZARO et al. 2009). Eine sichere Artidentifizierung mittels molekularer Marker ist auch für viele andere Bereiche der Biologie wichtig, wenn nicht sogar essenziell. Hierzu zählen unter anderem die Ökologie (VALENTINI et al. 2009; CARREON-MARTINEZ & HEALTH 2010), Biodiversitätsforschung (SMITH et al. 2005; ZHOU et al. 2009; RADULOVIC et al. 2010), Invasionsbiologie (ARMSTRONG & BALL 2005; DEWAARD et al. 2009; SMITH & FISHER 2009) und der Umwelt- und Artenschutz (EVANS et al. 2008; SWARTZ et al. 2008, WARD et al. 2008). Eine gezielte Identifizierung von Parasiten (BESANSKY et al. 2003; KUMAR et al. 2007; GARROS et al. 2008; STEINKE et al. 2009) und Schädlingen (BALL & ARMSTRONG 2006; GLOVER et al. 2009) ist mitunter von hoher ökonomischer Bedeutung. Im Bereich von Nahrungsmitteluntersuchungen (SMITH et al. 2008; EATON et al. 2010; HOLMES et al. 2009; LOWENSTEIN et al. 2009) oder der Forensik (DAWNAY et al. 2007; NELSON et al. 2007) können sich Barcodes ebenfalls als nützlich erweisen.

Neben den mannigfaltigen Anwendungsmöglichkeiten ist die rasante technologische Entwicklung auf dem molekularbiologischen Sektor ein weiterer wichtiger Umstand, der die Nutzung von Barcodes massiv unterstützt. Die aufblühende Verwendung sogenannter „next generation“-Sequenzieretechniken (RONAGHI 2001; MARGULIES et al. 2005; TUCKER et al. 2009) ermöglicht eine zeitgleiche parallele Analyse tausender Proben, gekoppelt mit einer drastischen Minimierung

der anfallenden Kosten und des notwendigen Arbeits- und Zeitaufwands. Erste Publikationen deuten an, in welche bislang unbekannt Dimensionen sich die Hochdurchsatzanalysen von Umweltproben entwickeln werden (PARAMESWARAN et al. 2007; DEAGLE et al. 2009; MEDINGER et al. 2010).

Die Nutzung von DNA-Sequenzen im Rahmen der Artidentifizierung ist ein neues, modernes und unverzichtbares Werkzeug der Zukunft, aber kein Ersatz für die klassische Taxonomie und auch kein „heiliger Gral“. Es ist daher wichtig, sich der möglichen Probleme bewusst zu sein, die die Verwendung von COI mit sich bringt, und entsprechend ergänzende, alternative Marker im Bedarfsfall zu nutzen (siehe Einleitung). DNA-Barcoding kann ohne die wirklichen Spezialisten in einzelnen Organismengruppen nicht funktionieren, denn nur so kann das dem Barcode zugrunde liegende Individuum zuverlässig definiert werden. Wie bei den traditionellen biologischen Disziplinen (u. a. Taxonomie oder Systematik) geht es letztlich auch beim DNA-Barcoding darum, den größten Schatz unseres Planeten, die biologische Vielfalt, umfangreich zu dokumentieren und für die Nachwelt zu erhalten.

Danksagung

Wir möchten uns ganz herzlich bei CHRISTINA BLUME, CLAUDIA ETZBAUER und BIRTHE THORMANN für ihre Hilfe und Unterstützung im Labor bedanken. Weiterer Dank gebührt BERNHARD MISOF und THOMAS WAGNER, die unserer Studie Käfer verschiedenster Arten zur Verfügung stellten. ORTWIN BLEICH gestattete uns freundlicherweise, Laufkäferaufnahmen der Internetseite www.eurocarabidae.de im Rahmen unseres Projektes und der Publikation zu verwenden. Ihm sei an dieser Stelle dafür ganz besonders gedankt. Bei MARCELL PETERS möchten wir uns für die Durchsicht des Artikels sowie hilfreiche Anregungen bedanken. Für hilfreiche und konstruktive Kommentare möchten wir uns bei einem anony-

men Gutachter bedanken. MICHAEL J. RAUPACH wurde durch Sachmittel der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziert (INST 427/1-1), welche von JOHANN-WOLFGANG WÄGELE eingeworben wurden.

Literatur

- ANGUS, R.B., BROWN, R.E., & BRYANT, L.J. (2000): Chromosomes and identification of the sibling species *Pterostichus nigrita* (Paykull) and *P. rhaeticus* Heer (Coleoptera: Carabidae). *Systematic Entomology* 25: 325-337.
- ANGUS, R.B., GALIÁN, J., WRASE, D.W., & CHALADZE, G. (2008): The western Palaearctic species of the *Pterostichus nigrita* (Paykull) complex, with the description of a new species from Spain and a new subspecies of *P. nigrita* from Anatolia (Coleoptera, Carabidae). *Nouvelle Revue d'Entomologie (NS)* 25: 297-316.
- ARMSTRONG, K.F., & BALL, S.L. (2005): DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 360: 1813-1826.
- ASTRIN, J.J., HUBER, B.A., MISOF, B., & KLÜTSCH, C.F.C. (2006): Molecular taxonomy in pholcid spiders (Pholcidae, Araneae): evaluation of species identification methods using CO1 and 16S rRNA. *Zoologica Scripta* 35: 441-457.
- AVISE, J.C. (2000): *Phylogeography. The history and formation of species.* Harvard University Press; Cambridge, MA.
- BALL, S.L., HEBERT, P.D.N., BURIAN, S.K., & WEBB, J.M. (2005): Biological identifications of mayflies (Ephemeroptera) using DNA barcodes. *Journal of the North American Benthological Society* 24: 508-524.
- BALL, S.L., & ARMSTRONG, K.F. (2006): DNA barcodes for insect pest identification: a test case with tussock moths (Lepidoptera: Lymantriidae). *Canadian Journal of Forest Research* 36: 337-350.
- BENSASSON, D., ZHANG, X.-D., & HEWITT, G.M. (2000): Frequent assimilation of mitochondrial DNA by grasshopper nuclear genomes. *Molecular Biology and Evolution* 17: 406-415.
- BESANSKY, N.I., SEVERSON, D.W., & FERDIG, M.T. (2003): DNA barcoding of parasites and invertebrate disease vectors: what you don't know can hurt you. *Trends in Parasitology* 19: 545-546.
- BLAXTER, M.L. (2003): Counting angels with DNA. *Nature* 421: 122-124.
- BLAXTER, M.L. (2004): The promise of a molecular taxonomy. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 359: 669-679.
- BUHAY, J.E. (2009): "COI-like" sequences are becoming problematic in molecular systematic and DNA barcoding studies. *Journal of Crustacean Biology* 29: 96-110.
- BUCKLIN, A., WIEBE, P.H., SMOLENACK, S.B., COPLEY, N.J., BEAUDET, J.G., BONNER, K.G., FÄRBER-LORDA, J., & PIERSON, J.J. (2007): DNA barcodes for species identification of euphausiids (Euphausiacea, Crustacea). *Journal of Plankton Research* 29: 483-493.
- CARREON-MARTINEZ, L., & HEATH, D.D. (2010): Revolution in food web analysis and trophic ecology: diet analysis by DNA and stable isotope analysis. *Molecular Ecology* 19: 25-27.
- CIANCHI, R., UNGANO, A., MARINI, M., & BULLINI, L. (2003): Differential patterns of hybridization and introgression between the swallowtails *Papilio machaon* and *P. hospiton* from Sardinia and Corsica islands (Lepidoptera, Papilionidae). *Molecular Ecology* 12: 1461-1471.
- CLARE, E.L., LIM, B.K., ENGSTROM, M.D., EGER, J.L., & HEBERT, P.D.N. (2006): DNA barcoding of neotropical bats: species identification and discovery within Guyana. *Molecular Ecology Notes* 7: 184-190.
- COSTA, F.O., DEWAARD, J.R., BOUTILLIER, J., RATNASINGHAM, S., DOOH, R.T., HAJIBABAEI, M., & HEBERT, P.D.N. (2007): Biological identifications through DNA barcodes: the case of the Crustacea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science* 64: 272-295.
- COSTA, F.O., HENZLER, C.M., LUNT, D.H., WHITELEY, N.M., & ROCK, J. (2009): Probing marine *Gammarus* (Amphipoda) taxonomy with DNA barcodes. *Systematics and Biodiversity* 7: 365-379.
- DAWNAY, N., OGDEN, R., MCEWING, R., CARVALHO, G.R., & THORPE, R.S. (2007): Validation of the barcoding gene COI for the use in forensic genetic species identification. *Forensic Science International* 173: 1-6.
- DEAGLE, B.E., KIRKWOOD, R., & JARMAN, S.N. (2009): Analysis of Australian fur seal diet by pyrosequencing prey DNA in faeces. *Molecular Ecology* 18: 2022-2038.

- DEWAARD, J.R., LANDRY, J.-F., SCHMIDT, B.C., DERHOUSOFF, J., MCLEAN, J.A., & HUMBLE, L.M. (2009): In the dark in a large urban park: DNA barcodes illuminate cryptic and introduced moth species. *Biodiversity and Conservation* 18: 3825-3839.
- DURON, O., BOUCHON, D., BOUTIN, S., BELLAMY, L., ZHOU, L., ENGELSTÄDTER, J., & HURST, G.D. (2008): The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. *BMC Biology* 6: 27.
- EATON, M.J., MEYERS, G.L., KOLOKOTRONIS, S.-O., LESLIE, M.S., MARTIN, A.P., & AMATO, G. (2010): Barcoding bushmeat: molecular identification of Central African and South American harvested vertebrates. *Conservation Genetics* 11: 1389-1404.
- EDGAR, R.C. (2004): MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics* 5: 113.
- EICKBUSH, T.H., & EICKBUSH, D.G. (2007): Finely orchestrated movements: evolution of the ribosomal RNA genes. *Genetics* 175: 477-485.
- EVANS, B.J., CARTER, T.F., TOBIAS, M.L., KELLEY, D.B., HANNER, R., & TINSLEY, R.C. (2008): A new species of clawed frog (genus *Xenopus*) from the Itombwe Massif, Democratic Republic of the Congo: implications for DNA barcodes and biodiversity conservation. *Zootaxa* 1780: 55-68.
- FISHER, B.L., & SMITH, M.A. (2008): A revision of malagasy species of *Anochetus* Mayr and *Odontomachus* Latreille (Hymenoptera: Formicidae). *Public Library of Science One* 3: e1787.
- FOLMER, O., BLACK, M., HOEH, W., LUTZ, R., & VRIJENHOEK, R. (1994): DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294-299.
- FRÉZAL, L., & LEBLOIS, R. (2008): Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution* 8: 727-736.
- GANLEY, A.R.D., & KOBAYASHI, T. (2007): Highly efficient concerted evolution in the ribosomal DNA repeats: total rDNA repeat variation revealed by whole-genome shotgun sequence data. *Genome Research* 17: 1-7.
- GARROS, C., NGUGI, N., GITHEKO, A.E., TUNO, N., & YAN, G. (2008): Gut content identification of larvae of the *Anopheles gambiae* complex in western Kenya using a barcoding approach. *Molecular Ecology Resources* 8: 512-518.
- GLOVER, R.H., COLLINS, D.W., WALSH, K., & BOONHAM, N. (2009): Assessment of loci for DNA barcoding in the genus *Thrips* (Thysanoptera: Thripidae). *Molecular Ecology Resources* 10: 51-59.
- HAJIBABAEI, M., SMITH, M.A., JANZEN, D.H., RODRIGUEZ, J.J., WHITFIELD J.B., & HEBERT, P.D.N. (2006): A minimalist barcode can identify a specimen whose DNA is degraded. *Molecular Ecology Notes* 6: 959-964.
- HAMMER, Ø., HARPER, D.A.T., & RYAN, P.D. (2001): PAST: Palaeontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 4: 4.
- HANCOCK, J.M., & VOGLER, A.P. (2000): How slippage-derived sequences are incorporated into rRNA variable-region secondary structure: implications for phylogenetic reconstructions. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 14: 366-374.
- HEBERT, P.D.N., CYWINSKA, A., BALL, S.L., & DE WAARD, J.R. (2003a): Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 270: 313-321.
- HEBERT, P.D.N., RATNASINGHAM, S., & DE WAARD, J.R. (2003b): Barcoding animal life: cytochrome 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., PENTON, E.H., BURNS, J.M., JANZEN, D.H., & HALLWACHS, W. (2004a): Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 14812-14817.
- HEBERT, P.D.N., STOEKLE, M., ZEMLAJ, T., & FRANCIS, C.M. (2004b): Identification of birds through DNA barcodes. *Public Library of Science Biology* 2: 1657-1668.
- HEBERT, P.D.N., DEWAARD, J.R., & LANDRY, J.-F. (2010): DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. *Biology Letters* 6: 359-362.
- HILLIS, D.M., & DIXON, M.T. (1991): Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic

- inference. *The Quarterly Review of Biology* 66: 411-453.
- HLAING, T., WILLOUGHBY, T.-L., SOMBOON, P., SOCHEAT, D., SETHA, T., MIN, S., CHANG, M.S., & WALTON, C. (2009): Mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome of *Aedes aegypti* mosquitoes: implications for past and future population genetic studies. *BMC Genetics* 10: 11.
- HOLMES, B.H., STEINKE, D., & WARD, R.D. (2009): Identification of shark and ray fins using DNA barcoding. *Fisheries Research* 95: 280-288.
- HUBERT, N., HANNER, R., HOLM, E., MANDRAK, N.E., TAYLOR, E., BURRIDGE, M., WATKINSON, D., DUMONT, P., CURRY, A., BENTZEN, P., ZHANG, J., APRIL, J., & BERNATCHEZ, L. (2008): Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes. *Public Library of Science ONE* 3: e2490.
- HUNDSDOERFER, A.K., KITCHING, I.J., & WINK, M. (2005): The phylogeny of the *Hyles euphorbiae* complex (Lepidoptera: Sphingidae): Molecular evidence from sequence data and ISSR-PCR fingerprints. *Organisms, Diversity and Evolution* 5: 173-198.
- HWANG, U.O., REE, H.I., & KIM, W. (2000): Evolution of hypervariable regions, V4 and V7, of insect 18S rRNA and their phylogenetic implications. *Zoological Science* 17: 111-121.
- JENNINGS, R.M., BUCKLIN, A., & PIERROT-BULTS, A. (2010): Barcoding of arrow worms (phylum Chaetognatha) from three oceans: genetic diversity and evolution within an enigmatic phylum. *Public Library of Science ONE* 5: e9949.
- JOHNSON, S.B., WARÉN, A., & VRIJENHOEK, R.C. (2008): DNA barcoding of *Lepetodrilus* limpets reveals cryptic species. *Journal of Shellfish Research* 27: 43-51.
- KIMURA, M. (1980): A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Biology* 16: 111-120.
- KMIEC, B., WOLOSZYNSKA, M., & JANSKA, H. (2006): Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals. *Current Genetics* 50: 149-159.
- KOCH, D. (1984): *Pterostichus nigrita*, ein Komplex von Zwillingarten. *Entomologische Blätter* 79: 141-152.
- KOCHER, T.D. (2004): Adaptive evolution and explosive speciation: the cichlid fish model. *Nature Reviews Genetics* 5: 288-298.
- KULATHINAL, R.J., STEVISON, L.S., & NOOR, M.A.F. (2009): The genomics of speciation in *Drosophila*: diversity, divergence, and introgression estimated using low-coverage genome sequencing. *Public Library of Science Genetics* 5: e10000550.
- KUMAR, N.P., RAJAVEL, A.R., NATARAJAN, R., & JAMBULINGAM, P. (2007): DNA barcodes can distinguish species of Indian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 44: 1-7.
- LÁZARO, E.M., SLUYS, R., PALA, M., STOCCHINO, G.A., BAGU?A, J., & RIUORT, M. (2009): Molecular barcoding and phylogeography of sexual and asexual freshwater planarians of the genus *Dugesia* in the Western Mediterranean (Platyhelminthes, Tricladida, Dugesidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 52: 835-845.
- LEFÉBURE, T., DOUADY, C.J., GOUY, M., & GIBERT J. (2006): Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: proposal of a molecular threshold to help species delimitation. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 40: 435-447.
- LIAO, A. (1999): Concerted evolution: molecular mechanism and biological implications. *American Journal of Human Genetics* 64: 24-30.
- LINDROTH, C.H. (1985): The Carabidae (Coleoptera) of Fennoskandia and Denmark. *Fauna Entomologica Scandinavica* 15: 1-232.
- LOWENSTEIN, J.H., AMATO, G., & KOLOKOTRONIS, S.-O. (2009): The real *maccoyii*: identifying tuna sushi with DNA barcodes – contrasting characteristic attributes and genetic distances. *Public Library of Science ONE* 4: e7866.
- LUKHTANOV, V.A., SOURAKOV, A., ZAKHAROV, E.V., & HEBERT, P.D.N. (2009): DNA barcoding Central Asian butterflies: increasing geographical dimension does not significantly reduce the success of species identification. *Molecular Ecology Resources* 9: 1302-1310.
- MALLET, J. (2006): What does *Drosophila* genetics tell us about speciation? *Trends in Ecology and Evolution* 21: 386-393.
- MARGULIES, M., ENGHOLM, M., ALTMAN, W.E., ATTIYA, S., BADER, J.S., BEMBEM, L.A., BERKA, J.,

- BRAVERMAN, M.S., CHEN, Y.-J., CHEN, Z., DEWELL, S.B., DU, L., FIERRO, J.M., GOMES, X.V., GODWIN, B.C., HE, W., HELGESEN, S., HO, C.H., IRZYK, G.P., JANDO, S.C., ALENQUER, M.L.I., JARVIE, T.P., JIRAGE, K.B., KIM, J.-B., KNIGHT, JR., LANZA, J.R., LEAMON, J.H., LEFKOWITZ, S.M., LEI, M., LI, J., LOHMAN, K.L., LU, H., MAKHJANI, V.B., McDADE, K.E., McKENNA, M.P., MYERS, E.W., NICKERSON, E., NOBILE, JR., PLANT, R., PUC, B.P., RONAN, M.T., ROTH, G.T., SARKIS, G.J., SIMONS, J.F., SIMPSON, J.W., SRINIVASAN, M., TARTARO, K.R., TOMASZ, A., VOGT, K.A., VOLKMER, G.A., WANG, S.H., WANG, Y., WEINER, M.P., YU, P., BERGLEY, B.F., & ROTHBERG, J.M. (2005): Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376-380.
- MAY, R.M. (1988): How many species are there on earth? *Science* 241: 1441-1449.
- MEDINGER, R., NOLTE, Y., PANDEY, R.V., JOST, S., OTTENWÄLDER, B., SCHLÖTTERER, C., & BOENIGK, J. (2010): Diversity in a hidden world: potential and limitation of next-generation sequencing for surveys of molecular diversity of eukaryotic microorganisms. *Molecular Ecology* 19: 32-40.
- MEYER, C.P., & PAULAY, G. (2005): DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. *Public Library of Science Biology* 3: e422.
- MÜLLER, G. (1971): *Bembidion lampros* Hrbst. und *B. properans* Steph. – zwei Arten? *Entomologische Nachrichten* 15: 119-124.
- MÜLLER-MOTZFELD, G., & HARTMANN, M. (1985): Zur Trennung von *Pterostichus rhaeticus* HEER and *P. nigrita* PAYK. (Col., Carabidae). *Entomologische Nachrichten und Berichte* 29: 13-17.
- MÜLLER-MOTZFELD, G. (Hrsg.) (2004): Vol. 2 Adephegata 1: Carabidae (Laufkäfer). S. 1-521 in: FREUDE, H., HARDE, K.W., LOHSE, G.A., KLAUSNITZER, B. (Hrsg.): Die Käfer Mitteleuropas. Spektrum-Verlag: Heidelberg/Berlin.
- NAGATA, N., KUBOTA, K., & SOTA, T. (2007): Phylogeography and introgressive hybridization of the ground beetle *Carabus yamato* in Japan based on mitochondrial gene sequences. *Zoological Science* 24: 465-474.
- NELSON, L.A., WALLMAN, J.F., & DOWTON, M. (2007): Using COI barcodes to identify forensically and medically important bowflies. *Medical and Veterinary Entomology* 21: 44-52.
- PAMILO, P., VIJAKAINEN, L., & VIHAVAINEN, A. (2007): Exceptionally high density of NUMTs in the honeybee genome. *Molecular Biology and Evolution* 24: 1340-1346.
- PARAMESWARAN, P., JALILI, R., TAO, L., SHOKRALLA, S., GHARIZADEH, B., RONAGHI, M., & FIRE, A.Z. (2007): A pyrosequencing-tailored nucleotide barcode design unveils opportunities for large-scale sample multiplexing. *Nucleic Acids Research* 35: e130.
- PARR, R.L., MAKI, J., REGULY, B., DAKUBO, G.D., AGUIRRE, A., WITTOCK, R., ROBINSON, K., JAKUPCIAK, J.P., & THAYER, R.E. (2009): The pseudo-mitochondrial genome influences mistakes in heteroplasmy interpretation. *BMC Genomics* 7: 185.
- PERLMAN, S.J., HUNTER, M.S., & ZCHORI-FEIN, E. (2006): The emerging diversity of *Rickettsia*. *Proceedings of the Royal Society of London Series B* 273: 2097-2106.
- RADULOVICI, A.E., SAINTE-MARIE, B., & DUFRESNE, F. (2010): DNA barcodes for marine biodiversity: moving fast forward? *Diversity* 2: 450-472.
- RONAGHI, M. (2001): Pyrosequencing sheds light on DNA sequencing. *Genome Research* 11: 3-11.
- SAITOU, N., & NEI, M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.
- SEEHAUSEN, O. (2006): African cichlid fish: a model system in adaptive radiation research. *Proceedings of the Royal Society B* 273: 1987-1998.
- SMITH, M.A., FISHER, B.L., & HEBERT, P.D.N. (2005): DNA barcoding for effective biodiversity assessment of a hyperdiverse arthropod group: the ants of Madagascar. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 360: 1825-1834.
- SMITH, M.A., & FISHER, B.L. (2009): Invasion, DNA barcodes, and rapid biodiversity assessment using the ants of Mauritius. *Frontiers in Zoology* 6: 31.
- SMITH, P.J., McVEAGH, S.M., & STEINKE, D. (2008): DNA barcoding for the identification of smoked fish products. *Journal of Fish Biology* 72: 464-471.
- SOKOLOWSKI, K. (1955): *Clivina fassor* L. 1758 und *collaris* Herbst. 1786 zwei distinkte Arten. *Entomologische Blätter* 51: 81-84.
- SONG, H., BUHAY, J.E., WHITING, M.F., & CRANDALL, K.A. (2008): Many species in one:

- DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105: 13486-13491.
- SOTA, T., ISHIKAWA, R., UJIE, M., KUSUMOTO, F., & VOGLER, A.P. (2001): Extensive trans-species mitochondrial polymorphisms in the carabid beetles *Carabus* subgenus *Ohomopterus* cause by repeated introgressive hybridization. *Molecular Ecology* 10: 2833-2847.
- STEINKE, D., SALZBURGER, W., VENCES, M., & MEYER, A. (2005): TaxI - A software tool for DNA barcoding using distance methods. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 360: 1975-1980.
- STEINKE, D., ZEMLAJ, T.S., & HEBERT, P.D.N. (2009): Barcoding Nemo: DNA-based identifications for the ornamental fish trade. *Public Library of Science ONE* 4: e6300.
- STREIFF, R., VEYRIER, R., AUDIOT, P., MEUSNIER, S., & BROUAT, C. (2005): Introgression in natural populations of bioindicators: a case study of *Carabus splendens* and *Carabus punctatauratus*. *Molecular Ecology* 14: 3775-3786.
- SWARTZ, E.R., MWALE, M., & HANNER, R. (2008): A role for barcoding in the study of African fish diversity and conservation: a review article. *South African Journal of Science* 104: 293-298.
- SWOFFORD, D.L. (2002): PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland/Massachusetts.
- TAUTZ, D., ARCTANDER, P., MINELLI, A., THOMAS, R.H., & VOGLER, A.P. (2003): A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 70-74.
- THIELE, H.U. (1977): Differences in measurement of day-length and photoperiodism in two stocks from subarctic and temperate climates in the carabid beetle *Pterostichus nigrita* F. *Oecologia* 30: 349-365.
- TUCKER, T., MARRA, M., & FRIEDMAN, J.M. (2009): Massively parallel sequencing: the next big thing in genetic medicine. *The American Journal of Human Genetics* 85: 142-154.
- VALENTINI, A., POMPANON, F., & TABERLET, P. (2009): DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution* 24: 110-117.
- VENCES, M., THOMAS, M., VAN DER MEIJDEN, A., CHIARI, Y., & VIETES, D.R. (2005): Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians. *Frontiers in Zoology* 2: 5.
- WARD, R.D., ZEMLAJ, T.S., INNES, B.H., LAST, P.R., & HEBERT, P.D.N. (2005): DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B* 360: 1847-1857.
- WARD, R.D., HOLMES, B.H., WHITE, W.T., & LAST, P.R. (2008): DNA barcoding Australasian chondrichthyans: results and potential uses in conservation. *Marine and Freshwater Research* 59: 57-71.
- WIEMERS, M., & FIEDLER, K. (2007): Does the DNA barcoding gap exist? – a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). *Frontiers in Zoology* 4: 8.
- XIE, Q., TIAN, X., QIN, Y., & BU, W. (2009): Phylogenetic comparison of local length plasticity of the small subunit of nuclear rDNAs among all Hexapoda orders and the impact of hyperlength-variation on alignment. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 50: 310-316.
- ZHANG, A.-B., & SOTA, T. (2007): Nuclear gene sequences resolve species phylogeny and mitochondrial introgression in *Leptocarabus* beetles showing trans-species polymorphisms. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45: 534-546.
- ZHOU, X., ADAMOWICZ, S.J., JACOBUS, L.M., DEWALT, R.E., & HEBERT, P.D.N. (2009): Towards a comprehensive barcode library for arctic life – Ephemeroptera, Plecoptera, and Trichoptera of Churchill, Manitoba, Canada. *Frontiers in Zoology* 6: 30.

Dr. Michael J. Raupach
 Senckenberg am Meer
 Deutsches Zentrum für Marine Biodiversitätsforschung
 AG Molekulare Taxonomie mariner Organismen
 Südstrand 44
 D-26382 Wilhelmshaven
 E-Mail: mraupach@senckenberg.de

Dipl.-Biol. Karsten Hannig
 Dresdener Straße 6
 D-45731 Waltrop.
 E-Mail: karsten.hannig@gmx.de

Prof. Dr. Johann-Wolfgang Wägele
Zoologisches Forschungsmuseum Alexan-
der Koenig
Adenauerallee 160-162
D-53113 Bonn
E-Mail: w.waegle.zfmk@uni-bonn.de

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Entomologie heute](#)

Jahr/Year: 2010

Band/Volume: [22](#)

Autor(en)/Author(s): Raupach Michael J., Hannig Karsten, Wägele Johann Wolfgang

Artikel/Article: [DNA-Barcoding – Perspektiven und Chancen: Eine Fallstudie am Beispiel der Laufkäfer \(Coleoptera: Carabidae\). DNA Barcoding – Perspectives and Chances: A Case Study on Ground Beetles \(Coleoptera: Carabidae\) 171-190](#)