

Neuer Wein aus alten Schläuchen: DNA-Untersuchungen an Sammlungsmaterial

STEFFEN ROTH

In den letzten Jahren haben genetische Methoden bei phylogentisch-taxonomischen und ökologischen Fragestellungen zunehmend an Bedeutung gewonnen. Im Folgenden sollen die Möglichkeiten und Grenzen der Nutzung von Sammlungsmaterial für derartige Studien aufgezeigt werden. Darüber hinaus werden Konsequenzen für das Abtöten und Aufbewahren von Insekten unter dem Gesichtspunkt der DNA- Konservierung diskutiert.

Bei phylogenetischen Untersuchungen werden Sequenzen diverser Gene von verschiedenen Taxa analog zu morphologischen Untersuchungen auf ihre Homologie verglichen. Die daraus resultierenden Hypothesen über Verwandtschaftsverhältnisse werden dann mit anderen, etwa morphologischen oder biogeographischen Hypothesen verglichen und kombiniert. In den letzten Jahren sind molekulare und morphologische Methoden immer mehr als sich ergänzende und gegenseitig stimulierende Ansätze verstanden und verwendet worden (siehe z.B. SCHUH et al. 2009). Vereinfacht gesagt gilt es bei diesen Untersuchungen, die Sequenzen von möglichst vielen Genen (mitochondriale, ribosomale, nukleare G.) und von diesen möglichst lange Genabschnitte zu vergleichen. Gerade bei Sammlungsmaterial ist dies aber oft nicht gewährleistet. Es bleiben meist nur kurze Bruchstücke weniger Gene erhalten (siehe unten).

WANDELER et al (2007) stellen in einer Übersichtsarbeit die Verwendung von Museumsmaterial (meist Fell, Federn, Knochen) für Genanalysen zusammen. Dabei geben sie unter anderem Beispiele wie mittels populationsgenetischer Untersuchungen, konkret dem Vergleich von Genen aus historischem Museumsmaterial und aktuellen Freilandpopulationen einer Art, ein Verlust oder Rückgang von genetischer Mannigfaltigkeit auf Populationsniveau dokumentiert wurde. Unter den etwa genannten 50 Tierarten sind aber nur zwei Insektenarten aufgelistet. Dabei handelt es sich um Studien zur genetischen Drift eines Schmetterlings (Himmelblauer Bläuling *Polyommatus bellargus*) bzw. zur Insektizidresistenz einer Schmeißfliege (*Lucilia cuprina* sheep blowfly).

Weiterhin relevant für die genetische Untersuchung von Sammlungsmaterial ist das sogenannte „DNA- Barcoding“. Auf WIKIPEDIA wird die Methode treffend so beschrieben: „DNA-Barcoding ist eine taxonomische Methode zur Artenbestimmung anhand der DNA-Sequenz eines Markergens. Die Abfolge der Basenpaare wird dabei analog wie der Strichcode auf Lebensmittel-Verpackungen als Kennzeichen für eine bestimmte Art verwendet. Der Name Barcoding (bar: engl.: Balken) entstammt dieser Analogie.“ Dabei geht es nicht darum, die gängige Publikationspraxis in der Taxonomie zu ersetzen, sondern die klassische Artbeschreibung um ein genetisches Merkmal zu ergänzen. Ein weitere Vorteil ist das Aufspüren so genannter kryptischer Arten, also (vermeintlich) morphologisch identischer Arten mit unterschiedlichem Genmaterial (z.B. in asiatischen Vertretern der Gattung *Apolygus* (JUNG et al. 2010)). Bei Insekten hat sich ein ca. 680 Basenpaare langer Genabschnitt der Cytochromoxidase I (COI) als Markergen durchgesetzt. (Die Cytochromoxidase selbst ist ein Enzym der mitochondrialen Atmungskette).

Nur von 0,8% der weltweit beschriebenen ca. 42.500 Wanzenarten wurde bislang der COI-Barcode ermittelt, die Mehrzahl davon sind mit ca. 220 Arten Miridae (PARK et al. 2011). Bei Vergleichen von Individuen innerhalb einer Art war die Ähnlichkeit der COI-Sequenz meist >98%. Dies traf für ca. 90% der untersuchten 344 Arten zu, wobei die Unähnlichkeit zwischen 0 und 7.72% schwankte. Beim Vergleich von 26 Artgruppen mit 2 oder mehr nahe verwandten Arten schwankte die Unähnlichkeit zwischen 0 und 24.8%, wobei

für 77% der Artengruppen die Unähnlichkeit der Sequenz größer als 3% war. Diese Zahlen belegen, dass sich keine (wie von einigen Pionieren des DNA-Barcodings ursprünglich angenommen) Grenzwerte der genetischen Ähnlichkeit (z.B. bei 95 oder 97% gleichem Barcode) zur Artabgrenzung festlegen lassen. Aber Unterschiede in den Sequenzen von deutlich mehr als 3-5%, sollten zumindest bei Wanzen als Hinweis auf kryptische Arten angesehen werden und zu morphologischen Detailstudien anregen (siehe Beispiele von nordamerikanischen *Lygocoris pabulinus* und *Plagiognathus obscurus* (PARK et al. 2011)).

Für eine Reihe von Insektenarten konnte aus Sammlungsmaterial mit teilweise beträchtlichem Alter genetisches Material isoliert werden. Beispielhaft seien genannt: *Anopheles gambiae* 15-93 Jahre altes Material (TOWNSON et al. 1999), diverse Carabidae 30-50 Jahre alt (GILBERT et al. 2007), diverse Heteroptera 25-30 Jahre alt (LI et al. 2007, PARK et al. 2011). Bemerkenswert ist auch, dass mittlerweile Verfahren existieren, bei denen die Tiere nicht zusätzlich beschädigt werden müssen und die DNA über die Körperöffnungen der getrockneten Tiere (und/oder den Einstich der Insektennadel) transferiert und chemisch isoliert wird (GILBERT et al. 2007). Leider sind die aus älteren Museumsmaterial gewonnenen Genabschnitte sehr kurz, meist nur etwa 200 Basenpaare lang und daher für DNA-Barcoding nur bedingt und für phylogenetische Analysen kaum zu gebrauchen. In 70%igem Alkohol aufbewahrte Arthropoda sind in der Regel selbst bei kühler Lagerung von 2-4°C oft nur einige Monate oder gar Wochen für DNA-Analysen verwendbar (z.B. VINK et al. 2005, DEAN & BALLARD 2001), wobei aber immer wieder positive Ergebnisse auch nach mehrjähriger Aufbewahrung erzielt werden können (M. GROSSER in litt., eigene unpubl. Daten).

Die wesentlichen Prozesse der DNA-Zerstörung und die dafür verantwortlichen Faktoren seien hier kurz noch einmal zusammengefasst (nach BROWN 1999):

1. Denaturierung - Aufwinden der DNA- Doppelhelix
2. 'Cross-linking'- Austausch von Genabschnitten beider Helixstränge
3. Zerbrecen der Stränge in viele Teilabschnitte
4. Chemische Veränderungen, welche eine Veränderung der Basensequenz bewirken

Entscheidende Faktoren sind dabei Hydrolyse, Oxidationen, Radiationen durch UV-Licht und hohen Temperaturen. Daraus lassen sich auch einfache Richtlinien zur Bewahrung von DNA in Sammlungsmaterial ableiten. Einschränkend muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die bisherigen Untersuchungen über der Einfluss verschiedener Konservierungsmethoden zum Erhalt der DNA oft uneinheitliche Ergebnisse erbrachten, mit teilweise enormen Unterschieden zwischen verschiedenen Taxa und sogar innerhalb eines Taxons (siehe z.B. Literaturübersicht in STOECKLE et al. 2010). Dies gilt auch für das Verwenden von Abtötungsmitteln.

Auf jeden Fall sollte das natürliche Absterben der Tiere verhindert werden. Der damit einhergehende Zelltod (Autolyse) führt zu einem natürlichen Abbau der gesamten DNA. Für das Abtöten empfehlen sich Maßnahmen, die bereits mit einem schnellen Entzug des Wassers aus den Zellen und damit der Verhinderung der Hydrolyse einhergehen. Am besten geeignet ist Einfrieren oder das Abtöten mit speziellen Chemikalien (siehe unten). Zumindest kleinere Tiere können nach dem Einfrieren auch wieder aufgetaut, dann luftgetrocknet und präpariert werden, wie DEAN et al. (2001) an *Drosophila* zeigten. Der als Tötungsmittel oft verwendete Essigsäureethylester hat bei geringer Einwirkungszeit (<10 min) vermutlich keinen negativen Einfluss auf den Erhalt der DNA (DEAN et al. 2001, BJARTE JORDAL mdl. Mittlg.), bei deutlich längerem Einwirken werden vermutlich hydrolytische Prozesse nicht hinreichend gestoppt (siehe DILLON et al. 1996, STOECKLE et al. 2010).

Langfristiges Aufbewahren bei -15°C oder kälter, ermöglicht eine langfristige

Konservierung der DNA. Am stabilsten ist wohl das Einfrieren isolierter DNA, eine Aufgabe, der sich mehr und mehr Museen annehmen.

Mit der wichtigen Einschränkung, dass nur kurze DNA-Bruchstücke erhalten bleiben, findet sich bei getrocknetem Material (z.B. klassisch genadelten Insekten) eine gewisse Konservierung von DNA über einen langen Zeitraum. Bei Lagerung in 70-90%igem Alkohol bleibt die DNA nur bei gleichzeitigem Einfrieren langfristig erhalten (siehe z.B. DEAN 2001, VINK et al. 2005, MANDRIOLI 2006). Bessere Ergebnisse brachte eine kühle Lagerung (4°C) in 96-100%igem Alkohol (z.B. MANDRIOLI 2006), während Formalaldehyd die DNA nahezu völlig zerstörte (DILLON et al. 1996, STOECKLE et al. 2010). Eine vergleichende Studie von vergälltem und nicht vergälltem Alkohol ist mir nicht bekannt. Wenngleich immer wieder erfolgreich DNA aus in vergälltem Alkohol konserviertem Material gewonnen werden konnte (eigene Daten), warnen eine Vielzahl von Laborbiologen vor dessen Verwendung oder zumindest vor einer Aufbewahrung über einen längeren Zeitraum. Überhaupt ist Alkohol nicht die optimale Lösung, bestenfalls als 95-100%ige Lösung und anschließender, möglichst kalter Aufbewahrung des Materials.

Abgesehen von speziellen Chemikalien wie z.B. RNAlater[®] (VINK et al. 2005) scheint nach den bisherigen Kenntnisstand Aceton das beste Abtötungs- und Aufbewahrungsmittel zu sein (VINK et al. 2005, MANDRIOLI et al. 2006), zumal es nicht gesundheitsschädigend (außer inhaliert oder getrunken), billig und auch einfach für Privatpersonen zu erhalten ist. Allerdings verdampft es sehr schnell und ist leicht brennbar, was bei Exkursionen und dem Einsatz von Dauerfallen beachtet werden sollte und Aceton als Fangflüssigkeit für Fallen ungeeignet macht. In Aceton aufbewahrtes Material hatte auch bei Lagerung bei Zimmertemperatur noch stabile DNA (MANDRIOLI et al. 2006).

Eine Übersicht über geeignete Chemikalien bei Anwendung von Langzeitfallen geben STOECKLE et al. (2010), wobei sie Glycerin, Ethylenglycol und RENNER-Lösung als geeignete Mittel zur DNA-Konservierung empfehlen.

Als Faustregeln können gelten:

1. Das Material sollte nur so kurz wie möglich UV- Licht ausgesetzt sein.
2. Immer so kalt als möglich: Wenn es geht, Material einfrieren.
3. Langfristiges Aufbewahren ausserhalb des Gefrier-/Kühlschranks: lieber als genadeltes Material als in Alkohol
4. Alkohol ist nicht das optimale Konservierungsmittel!!! Wenn doch verwendet, dann so hochprozentig wie nur möglich und dennoch einfrieren (und kühl zwischenlagern)
5. Aceton ist gut geeignet für DNA-Konservierung.

Die Aufbewahrung von Insektenmaterial für (spätere) genetische Untersuchungen in sogenannten Genbanken ist wohl vorrangig eine Aufgabe für staatliche Sammlungen und Museen. Dennoch sollte auch der Privatsammler die genetische Analysierbarkeit seines Materials bei neuen, unbeschriebenen Arten, Sammlungen von potentiellen Unterarten, speziellen Morpho- und Ökotypen und bei schwierigen/zweifelhaften Taxa in Erwägung ziehen. Darüber hinaus ist es natürlich wünschenswert, nach konkreter Ansprache mit Kollegen/Innen, für deren molekulare Untersuchungen, geeignetes Material ausgewählter Taxa von Exkursionen und Sammlungsreisen mitzubringen.

Literatur:

- BROWN, TA. (1999): Genetic material. - In: CARTER, D. & WALKER, A. (Hrsg.): Care and Conservation of Natural History Collections, 133-138.
- DEAN, MD. & BALLARD, JWO. (2001): Factors affecting mitochondrial DNA quality from museum preserved *Drosophila simulans*. - Entomologia Experimentalis et Applicata **98**, 279-283.
- DILLON N., AUSTIN A. D. & BARTOWSKY E. (1996): Comparison of preservation techniques for DNA extraction from hymenopterous insects. - Insect Molecular Biology **5**, 21-24.

- GILBERT, MTP., MOORE, W., MELCHIOR, L. & WOROBEY, M. (2007): DNA Extraction from Dry Museum Beetles without Conferring External Morphological Damage.-PIOS ONE **2(3)**, e 272, DOI: 10.1371/journal.pone.0000272.
- JUNG, S., DUWAL, RK. & LEE, S. (2010): COI barcoding of true bugs (Insecta, Heteroptera). - Molecular Ecology Resources **11**, 266-270.
- LI, H., SITES, RW. & SONG, Q. (2007): Recovery of mitochondrial and nuclear DNA for systematic studies of Naucoridae (Heteroptera): an assessment of preservation techniques and specimen age. - Insect Systematics & Evolution **38**, 167-172.
- MANDRIOLI, M., BORSATTI, F. & MOLA, L. (2006): Factors affecting DNA preservation from museum-collected lepidopteran specimens. - Entomologia Experimentalis et Applicata **120**, 239-244.
- PARK, D-S., FOOTITT, R. MAW, E. & HEBERT, PDN. (2011): Barcoding Bugs: DNA-Based Identification of the True Bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera). - PLOS ONE **6(4)**, e 18749, DOI: 10.1371/journal.pone.0018749.
- SCHUH, RT., WEIRAUCH, C. & WHEELER, WC. (2009): Phylogenetic relationships within the Cimicomorpha (Hemiptera: Heteroptera): a total-evidence analysis. - Systematic Entomology **34**, 15-48.
- STOECKLE, BC., DWORSCHAK, K., GOSSNER, MM. & KUEHN, R. (2010): Influence of arthropod sampling solutions on insect genotyping reliability. - Entomologia Experimentalis et Applicata **135**, 217-223.
- TOWNSON, H., HARBACH, RE., CALLAN, TA. (1999): DNA identification of museum specimens of the Anopheles gambiae complex: an evaluation of PCR as a tool for resolving the formal taxonomy of sibling species complexes. - Systematic Entomology **24**, 95-100.
- VINK, CJ., THOMAS, SM., PAQUIN, P., HAYASHI, CY. & HEDIN, M. (2005): The effects of preservatives and temperatures on arachnid DNA. - Invertebrate Systematics **19**, 99-104.
- WANDELER, P., HOECK, PEA. & KELLER, LF. (2007): Back to the future: museum specimens in population genetics. - Trends in Ecology & Evolution **22**, 634-642.

Anschrift des Autors:

Steffen Roth, The Natural History Collections, University Museum of Bergen (Norway),
BERGEN, email steffen.roth@bm.uib.no

Zum Vortrag auf dem Treffen in Fischbach 2011 von

D.J. WERNER: *Leptoglossus occidentalis* als Neozoon in Europa und in Deutschland

s. die Publikation

WERNER, D.J. (2011): Die amerikanische Koniferen-Samen-Wanze *Leptoglossus occidentalis* (Heteroptera: Coreidae) als Neozoon in Europa und in Deutschland: Ausbreitung und Biologie. - Entomologie heute **23**, 31-68. (auch pdf)

Eine Ergänzung mit neueren Daten ist für eines der nächsten Hefte des HETEROPTERON geplant.

Kurzberichte zu den folgenden beiden Vorträgen stehen noch aus.

CARSTEN MORKEL: True bug species diversity of Kellerwald-Edersee National Park: Results of a six year initial survey

VIKTOR HARTUNG: Mooswanzen und ihre Nahrungspflanzen in Neuseeland. – Host-Plant relationship of Peloriidae in New Zealand

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Heteropteron - Mitteilungsblatt der Arbeitsgruppe Mitteleuropäischer Heteropterologen](#)

Jahr/Year: 2012

Band/Volume: [36](#)

Autor(en)/Author(s): Roth Steffen

Artikel/Article: [Neuer Wein aus alten Schläuchen: DNA-Untersuchungen an Sammlungsmaterial 5-8](#)