

Barcoding europäischer Wanzen - Möglichkeiten und Grenzen

MARTIN M. GOSSNER, LARS HENDRICH, STEFAN M. KÜCHLER & MICHAEL J. RAUPACH

Abstract

During the last years DNA-barcoding has become an efficient method for species identification. Although demanding, applications of barcoding to the species and ecological diverse Heteroptera are still scarce. We analyzed DNA barcodes for 1.742 specimens of 457 Central European species, comprising 39 families of the Heteroptera. With a successful identification rate of 94.5% we showed that this method has great potential as complementary method to species identification based on morphological characteristics. Moreover, our study revealed several taxonomic uncertainties and surprises. We found evidence for ongoing hybridization as well as the putative existence of cryptic species.

Einleitung

DNA-Barcoding hat sich in den letzten Jahren zu einer effizienten Methode für die Identifikation von Arten entwickelt, insbesondere bei den artenreichen Insekten (z. B. SMITH & FISHER 2009, HAUSMANN et al. 2011, RAUPACH et al. 2011, WOODCOCK et al. 2013). Dabei ist zu betonen, dass es sich hierbei um keine DNA-Taxonomie (TAUTZ et al. 2003) handelt, sondern lediglich um eine molekulare Methode zur Bestimmung bekannter Arten anhand der DNA eines Markergens. Die Abfolge der Basenpaare wird dabei analog wie der Strichcode auf Lebensmittel-Verpackungen als Kennzeichen für eine bestimmte Art verwendet (STEINKE & BREDE 2006). DNA-Sequenzen verändern sich in gleichmäßiger Rate durch Punktmutationen, und somit besitzen näher verwandte Individuen (und Arten) ähnlichere Sequenzen. Solange eine Art ungeteilt bleibt, d.h. einen gemeinsamen Genpool besitzt, werden Unterschiede zwischen verschiedenen Populationen durch Genfluss immer wieder ausgeglichen. Ist dies nicht mehr der Fall entsteht eine sogenannte Barcoding Lücke (oder barcoding gap), d.h. die intraspezifische Variabilität wird im Laufe der Zeit geringer als die interspezifische Variabilität. Diese Barcoding Lücke ist somit maßgeblich verantwortlich für die korrekte Identifizierung von Arten. Durch umfangreiche Studien hat sich bei vielen Taxa ein Schwellenwert von ca. 2% Sequenzdifferenz für die Trennung von „Arten“ als Richtwert etabliert (HEBERT et al. 2003a, 2003b).

Im Vergleich zur Kern-DNA hat die mitochondriale DNA eine Reihe von Vorteilen und wird deshalb bei Insekten und den meisten anderen Tieren für das Barcoding herangezogen (HEBERT et al. 2003a, 2003b): 1.) im Vergleich zur Kern-DNA ist Rekombination (Neuanordnung von genetischem Material) äußerst selten, da sie maternal vererbt wird, 2.) sie hat eine hohe Mutationsrate, die Voraussetzung für die Unterscheidung von Arten anhand von DNA-Sequenzen ist, 3.) hochkonservierte flankierende Regionen erlauben die Verwendung universeller Primer, die den DNA-Abschnitt festlegen, der amplifiziert und anschließend sequenziert werden soll. Für eine Vielzahl von Taxa, darunter die Wanzen, ist der Standard eine rund 650 Basenpaar lange Region des mitochondrialen Gens, welches die Untereinheit I der Cytochrom *c* Oxidase (COI oder *cox1*) codiert.

Wanzen sind eine sehr artenreiche und ökologisch sehr diverse Gruppe. Aufgrund ihrer Indikatorfunktion (DUELLI & OBRIST 1998, ACHTZIGER et al. 2007, SKERN et al. 2010) ist eine gute Kenntnis der Taxonomie für naturschutzfachliche und ökologische Fragestellungen sehr wichtig. In einigen Gruppen innerhalb der Wanzen gibt es jedoch Unsicherheiten auf Grundlage morphologischer Merkmale. Hier könnten molekulare Methoden zu einer Lösung der taxonomischen Fragen beitragen. Die Anwendbarkeit des Barcodings bei Wanzen ist bisher jedoch noch unzureichend untersucht. Im Jahr 2010 haben wir deshalb damit begonnen eine Barcode-Datenbank in Zusammenarbeit mit dem Projekt FAUNA BAVARICA an der Zoologischen Staatssammlung München und in Kooperation mit dem Biodiversity Institute of

Ontario ('BIO', Guelph, Canada) aufzubauen (siehe auch RAUPACH et al. subm.). In diesem Beitrag soll der derzeitige Stand der Arbeiten aufgezeigt und sowohl Möglichkeiten als auch Grenzen des Barcodings bei Wanzen diskutiert werden.

Methoden

Alle untersuchten Wanzen wurden zwischen 2005 und 2012 mit unterschiedlichen Methoden gesammelt (Handaufsammlungen, Kescherfänge, Fallenfänge mit Boden-, Fenster- und Malaisefallen). Laborarbeiten wurden am Canadian Center for DNA Barcoding (CCDB), University of Guelph, mit Hilfe von standardisierten Hochdurchsatzverfahren für DNA Barcode Amplifizierung und Sequenzierung (IVANOVA et al. 2006, DEWAARD et al. 2008) durchgeführt. Hierfür wurden microplates entweder mit einem oder mehreren Beinen pro Tier oder mit ganzen Tieren (Körpergröße < 3 mm) bestückt und nach Kanada geschickt. Alle relevanten Informationen inklusive DNA Barcodes sind über das Projekt GEBUG, welches ein Zusammenschluss aus der Fauna Bavarica (BALKE et al. 2011) und der privaten Initiative EUBUG von MMG und MJR im Barcode of Life Datasystem (BOLD; <http://www.boldsystems.org>) (RATNASINGHAM & HERBERT 2007), verfügbar. Details finden sich in RAUPACH et al. (subm.).

Ergebnisse

Insgesamt analysierten wir Barcodes von 1.742 Individuen aus 457 Arten und 39 Familien der Wanzen. Insgesamt konnten 94,5% der Arten (432) erfolgreich identifiziert werden. Dies verdeutlicht das Anwendungspotenzial von Barcoding bei Wanzen. Als Beispiel zeigt Abb. 1 die Topologie aller analysierten Pentatomidae. Fast alle interspezifischen Distanzen sind > 3,09%, wodurch eine einwandfreie Art determinierung bei den untersuchten Pentatomidae gegeben ist. Die einzige Ausnahme bilden *Chlorochroa junipera* (ein untersuchtes Tier, im Baum blau) und *C. pinicola* (zwei untersuchte Tiere, im Baum rot), die eine geringe Distanz aufwiesen (0,93%).

Es konnten jedoch auch einige Überraschungen und Unsicherheiten festgestellt werden. Die Analyse erbrachte Beispiele von Arten: 1.) deren Artstatus bereits anhand morphologischer Merkmale angezweifelt wurde und genetisch bestätigt wurde (Bsp. *Charagochilus gyllenhalii/weberi*), 2.) die morphologisch klar unterscheidbar, genetisch jedoch nicht zu differenzieren sind (Bsp. *Nabis* spp.), und 3.) die morphologisch nicht unterscheidbar sind, aber genetisch eine sehr große Distanz zwischen Gruppen von Individuen aufweisen (z.B. *Orius niger*) (Details siehe RAUPACH et al., subm.).

Diskussion

Die hohe erfolgreiche Identifikationsrate unterstreicht die Bedeutung von DNA-Barcoding als ergänzende Methode zur morphologischen Artbestimmung. Unsere Studie hat darüber hinaus jedoch auch klare Grenzen des Barcodings aufgezeigt. Beispielsweise erbrachten unsere Resultate deutliche Hinweise auf mögliche Hybridisierung, als Erklärung für die genetische Nähe genital-morphologisch deutlich unterscheidbarer Arten (z.B. *Nabis* spp.). Darüber hinaus fanden wir in einer Reihe von Gattungen unterschiedlichster Familien Hinweise auf die Existenz kryptischer Arten. Dies sind spannende Fälle, mit denen wir uns in Zukunft intensiver beschäftigen möchten. Eine enge Zusammenarbeit zwischen molekular und morphologisch arbeitenden Taxonomen erwies sich in unserer Studie als äußerst effizient. Deshalb sollte eine Intensivierung der Kooperation der beiden Disziplinen in Zukunft angestrebt werden, um bestehende taxonomische Unklarheiten zu lösen.

Die Vorteile des Barcodings sind weitreichend und können mittlerweile nicht mehr ignoriert werden. So sind kleinste Proben (Gewebe, Blut, Eier, Larven) für eine Artbestimmung ausreichend. Eine Identifizierung unabhängig von Geschlecht und Entwicklungsstand der Tiere ist in den meisten Fällen nun möglich. Gerade die Bestimmung von Entwicklungsstadien oder Weibchen mancher Arten stellt die morphologischen Wanzen-Taxonomen vor große Schwierigkeiten, insbesondere wenn es um die schnelle Identifikation großer Probenmengen geht. Durch den Aufbau einer umfassenden und verifizierten Datenbank können darüber hinaus Synonyme für Arten vermieden (v.a. bzgl. Artbeschreibungen in den artenreichen Tropen) und eingeschleppte oder eingewanderte Arten schneller entdeckt werden. In der ökologischen Forschung bildet das Barcoding einen wichtigen Baustein für den Aufbau von Art-Phylogenien, die im Bereich der Gemeinschaftsökologie zunehmend an Bedeutung gewinnen (CAVENDER-BARES et al. 2009).

Die größten derzeitigen Nachteile des Barcodings sind, dass 1.) die Abundanz der Arten in einer Probe, beispielsweise aus einer Biodiversitätsstudie, derzeit noch nicht verlässlich abgeschätzt werden können, 2.) Arten sehr junger Artenradiationen auf Grundlage des Barcodings nicht trennbar sind [Bsp. Fruchtfliegen, Buntbarsche; hier sind schneller evolvierende Marker (z.B. Mikrosatelliten) hilfreich], und 3.) Verunreinigungen durch die aufgenommene Nahrung, Parasitierung und Endosymbioten (z.B. WHITWORTH et al. 2007) Probleme bei der genetischen Identifizierung verursachen können.



Abb.1: Neighbour-Joining-Topologie aller analysierten Pentatomidae (29 Arten, 109 Individuen) basierend auf K2P-Distanzen. In der Mitte: *Graphosoma lineatum* (LINNAEUS, 1758). Roter Ast \ast : *Chlorochroa pinicola* (MULSANT & REY, 1852), blauer Ast \ast : *Chlorochroa juniperina* (LINNAEUS, 1758).

Die Entwicklung molekularer Methoden wird weitergehen und auch eine Lösung für bisherige Probleme finden. Wir sehen im Zusammenspiel von morphologischen und molekularen Methoden die einzige zielführende Möglichkeit, die anstehenden und zukünftigen Herausforderungen an die Taxonomie zu bewältigen.

Danksagung

Das Projekt wurde durch die Bayerische Staatsregierung und das Bundesministeriums für Bildung und Forschung finanziell unterstützt. Wir bedanken uns bei R. NIEDRIGHAUS, F. SCHMOLKE and H. SIMON für die Zurverfügungstellung von Wanzenexemplaren und A. GRUPPE und J. MÜLLER für die Erlaubnis Individuen aus Biodiversitätsprojekten verwenden zu dürfen. Einige Tiere wurden im Rahmen des DFG Schwerpunktprogramms 1374 "Infrastructure-Biodiversity-Exploratories" (WE 3018/21-1) durch MMG gesammelt, der auch durch dieses Projekt finanziell gefördert wurde.

Literatur:

- ACHTZIGER, R., FRIEB, T., & RABITSCH, W. (2007): Die Eignung von Wanzen (Insecta, Heteroptera) als Indikatoren im Naturschutz. – *Insecta* **10**, 5-39.
- BALKE, M., HASZPRUNAR, G., HAUSMANN, A. & SCHMIDT, S. (2011): Project Barcoding Fauna Bavarica. – World Wide Web electronic publication. www.faanabavarica.de
- CAVENDER-BARES, J., KOZAK, K.H., FINE, P.V.A., & KEMBEL, S.W. (2009): The merging of community ecology and phylogenetic biology. – *Ecology Letters* **12**, 693-715.
- DEWAARD, J.R., IVANOVA, N.V., HAJIBABAEI, M. & HEBERT, P.D.N. (2008): Assembling DNA barcodes: analytical protocols. – In: Martin, C. (ed.). *Methods in molecular biology: environmental genetics*. Totowa: Humana Press, 275-293.
- DUELLI, P. & OBRIST, M.K. (1998): In search of the best correlates for local organismal biodiversity in cultivated areas. – *Biodiversity and Conservation* **7**, 297-309.
- HAUSMANN, A., HASZPRUNAR, G., SEGERER, A. H., SPEIDEL, W., BEHOUNEK, G. & HEBERT, P.D.N. (2011): Now DNA-barcoded: the butterflies and larger moths of Germany (Lepidoptera: Rhopalocera, Macroheterocera). – *Spixiana* **34**, 47-58.
- HEBERT, P.D.N., CYWINSKA, A., BALL, S.L. & DEWAARD, J.R. (2003a): Biological identifications through DNA barcodes. – *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* **270**, 313-321.
- HEBERT, P.D.N., RATNASINGHAM, S. & DEWAARD, J.R. (2003b): Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. – *Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* **270** (Supplement), 96-99.
- IVANOVA N.V., DEWAARD J.R. & HEBERT P.D.N. (2006): An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. – *Molecular Ecology Notes* **6**, 998-1002.
- RATNASINGHAM, S. & HEBERT, P.D.N. (2007): BOLD: The Barcode of Life data systems. – *Molecular Ecology Notes* **7**, 355-364.
- RAUPACH, M. J., HENDRICH, L., KUECHLER, S. M. & GOSSNER, M. M. (subm.): Building-up of a DNA barcode library for True Bugs (Insecta: 1 Hemiptera: Heteroptera) of Germany reveals taxonomic uncertainties and surprises. – PLOS ONE.
- RAUPACH, M. J., HANNIG, K. & WÄGELE, J. W. (2011): Identification of Central European ground beetles of the genus *Bembidion* (Coleoptera: Carabidae) using DNA barcodes: a case study of selected species. – *Angewandte Carabidologie* **9**, 63-72.
- SMITH, M. A. & FISHER, B. L. (2009): Invasions, DNA barcodes, and rapid biodiversity assessment using ants of Mauritius. – *Frontiers in Zoology* **6**, 31.
- SKERN, M., ZWEIMÜLLER, I. & SCHIEMER, F. (2010): Aquatic Heteroptera as indicators for terrestrialisation of floodplain habitats. *Limnologica. – Ecology and Management of Inland Waters* **40**, 241-250.
- STEINKE, D. & BREDE, N. (2006): Taxonomie des 21. Jahrhunderts - DNA-Barcoding. – *Biologie unserer Zeit* **36**, 40-46.
- 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.
- WHITWORTH, L., DAWSON, R.D., MAGALON, H. & BAUDRY, E. (2007): DNA barcoding cannot reliably identify species of the blowfly genus *Protocalliphora* (Diptera: Calliphoridae). – *Proceedings of the Royal Society London Series B* **274**, 1731-1739.
- WOODCOCK, T.S., BOYLE, E.E., ROUGHLEY, R.E., KEVAN, P.G., LABBEE, R.N. et al. (2013) The diversity and biogeography of the Coleoptera of Churchill: insights from DNA barcoding. – *BMC Ecology* **13**, 40.

Anschrift der Autoren:

Martin M. Gossner, Lehrstuhl für Terrestrische Ökologie, Department für Ökologie und Ökosystemmanagement, Technische Universität München, Hans-Carl-von-Carlowitz-Platz 2, D-85354 FREISING-WEIHENSTEPHAN, e-mail: martin.gossner@tum.de

Lars Hendrich, Sektion Insecta varia, Zoologische Staatssammlung München, Münchhausenstraße 21, D-81247 MÜNCHEN, e-mail: hendrich@zsm.mwn.de

Stefan M. Kuechler, Department für Tierökologie II, Universität Bayreuth, Universitätsstraße 30, D-95440 BAYREUTH, e-mail: stefan.kuechler@uni-bayreuth.de

Michael J. Raupach, Molekulare Taxonomie mariner Organismen, Deutsches Zentrum für Marine Biodiversitätsforschung (DZMB), Senckenberg am Meer, Südstrand 44, D-26382 WILHELMSHAVEN, e-mail: michael.raupach@senckenberg.de

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

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

Jahr/Year: 2014

Band/Volume: [41](#)

Autor(en)/Author(s): Goßner [Gossner] Martin, Hendrich Lars, Kückler Stefan, Raupach Michael J.

Artikel/Article: [Barcoding europäischer Wanzen - Möglichkeiten und Grenzen 7-11](#)