Vitecek, S., Pauls, S. U. & Graf, W. (2017): Barcoding der Köcherfliegen und Steinfliegen Vorarlbergs.
inatura – Forschung online, 35: 16 S.

inatura Forschung online

Nr. 35 - 2017

Barcoding der Köcherfliegen und Steinfliegen Vorarlbergs

Simon Vitecek[1], Steffen U. Pauls[2], Wolfram Graf[3]

[1] Dr. Simon Vitecek, Department für Limnologie und Bio-Ozeanographie, Universität Wien, UZA I, Althanstrasse 14, A-1090 Wien.
E-Mail: simon.vitecek@univie.ac.at

[2] Dr. Steffen U. Pauls, Senckenberg Forschungsinstitut und Naturmuseum Frankfurt, Senckenberganlage 25, D-60325 Frankfurt am Main.
E-Mail: steffen.pauls@senckenberg.de

[3] Dr. Wolfram Graf, Institut für Hydrobiologie und Gewässermanagement, Universität für Bodenkultur Wien, Gregor-Mendel-Straße 33, A-1180 Wien.
E-Mail: wolfram.graf@boku.ac.at

Abstract

This study presents a genetic barcode library for 66 caddisfly (Insecta, Trichoptera) and 50 stonefly (Insecta, Plecoptera) species based on 275 barcode compliant partial sequences of the subunit 1 of the mitchondrial cytochrome-oxidase gene (COI). For quality control purposes and to assess the relevance of small regional projects for national and global barcoding initiatives the generated sequence data were (i) compared with existing reference libraries and (ii) analysed by means of phylogenetic inference. Species assignment based on genetic data and morphological identification of individuals was mostly congruent. Single cases of contamination and taxonomic mis-identification of mostly female specimens were recognized, and the dataset was harmonized accordingly. In total 44% of the known caddisfly fauna of Vorarlberg could be assessed here, together with 71,4% of the known stonefly taxa. Reference sequences for 15 caddisfly and 48 stonefly species were generated based on Austrian specimens for the first time. The dataset presented further comprises 2 caddisfly species and 1 subspecies that were hitherto not included in international barcode reference libraries. Likewise, 12 of the 50 stonefly species treated here were not represented in available reference libraries so far. We provide important base data that contributes to national and international efforts to collate comprehensive reference data of DNA barcodes..
Key words: DNA-barcoding, COI, Trichoptera, Plecoptera, Austria, Österreich, ABOL

Zusammenfassung

Die vorliegende Studie präsentiert eine genetische Barcode-Bibliothek von 66 Köcherfliegenarten (Insecta, Trichoptera) und 50 Steinfliegenarten (Insecta, Plecoptera) basierend auf 275 barcodekonformen partiellen Sequenzen der Untereinheit 1 des mitochondrialen Cytochromoxidase-Gens (COI). Zur Qualitätskontrolle und zur Bewertung der Relevanz kleinräumiger Einzelprojekte für nationale und globale Bestrebungen zum Aufbau von Barcode-Referenzdatenbanken wurden die erzeugten Sequenzdaten mit bestehenden Referenzbibliotheken abgeglichen und in einem phylogenetischen Ansatz ausgewertet.
Die genetische Zuordnung war zumeist kongruent mit der morphologischen Identifikation der Individuen. Einzelfälle von Kontamination und taxonomischer Fehlidentifikation einiger, vornehmlich weiblicher Tiere konnten erkannt, und der Datensatz demnach bereinigt werden. Insgesamt wurden 44% der aus Vorarlberg bekannten Köcherfliegenarten und 71,4% der nachgewiesenen Steinfliegenarten behandelt. Dabei wurden erstmals Referenzdaten für 15 Köcher- und 48 Steinfliegenarten anhand österreichischen Materials erstellt. Unter den bearbeiteten Köcherfliegenarten befinden außerdem 2 Arten und 1 Unterart, die bisher nicht in internationalen Datenbanken eingetragen waren. Desgleichen finden sich unter den 50 bearbeiteten Steinfliegenarten 12 Arten, von denen bislang keine Daten vorhanden waren. Die vorliegende Studie liefert daher höchst bedeutsame Grundlagendaten für den Aufbau umfassender nationaler und internationaler Vergleichsdatenbanken.

Eingegangen: 21.12.2016; Publiziert: 18.01.2017

1 Einleitung

Neben vielfältigen anderen Methoden der molekularen Taxonomie wurde das DNS-Barcoding basierend auf einem protein-kodierenden Abschnitt des mitochondriellen Erbguts zur Identifikation von Tieren etabliert. Dabei werden homologe, arttypische partielle Sequenzen der Subeinheit 1 des mitochondrialen Cytochromoxidase-Gens erzeugt und zur Artidentifikation genutzt (Hebert et al. 2003a, 2003b, 2009). Insbesondere wird diese Methode erfolgreich zur Erleichterung der Determination und Aufklärung von schwer differenzierbaren oder kryptischen Arten eingesetzt. Zum Beispiel konnte bei einigen in der klassischen Taxonomie als einheitlich behandelten Gruppen mit Hilfe dieses Verfahrens eine ungewöhnlich hohe kryptische Diversität nachgewiesen werden (Pauls et al. 2010; Huemer & Hebert 2011; Previšić et al. 2014). Weitere Anwendungsmöglichkeiten der Methode sind die Qualitätssicherung und Kontrolle von Nahrungsmitteln (Barcaccia et al. 2015), oder der Nachweis invasiver Arten (Armstrong & Ball 2005; Saunders 2009; Dejean et al. 2012). Ein weiterer Anwendungsbereich betrifft die beschleunigte Erfassung von Biodiversität im Rahmen ökologischer Studien in taxonomisch unzureichend bearbeiteten Gebieten (Craft et al. 2010; Hoppeler et al. 2016), oder bei der ökologischen Bewertung der Gewässergüte (Hajibabaei et al. 2011; Jackson et al. 2014).

Vor allem angewandte Ansätze zur Gewässerbewertung erfordern eine möglichst vollständige Erhebung der genetischen Diversität der als Qualitätselemente genutzten Arten. Daher ist für eine derartige Anwendung die Erstellung umfassender und vollständiger Referenzdatenbanken unumgänglich. Eine solche Referenzdatenbank sollte sich dabei nicht nur auf einzelne Vertreter der Arten beschränken, sondern der geographischen Verbreitung von Arten Rechnung tragen, um den Nutzen der Datenbank zu maximieren. Initiativen zur Erstellung einer genetischen Vergleichsdatenbank basierend auf taxonomisch sicher bestimmter Proben möglichst vieler verschiedener Arten sind insbesondere im Rahmen des *international Barcode of Life* [iBOL; ibol.org]-Projekts organisiert. Die Barcode of Life Datenbank BOLD (Ratnasingham & Hebert 2007; www.boldsystems.org), organisiert und kuratiert von der Universität Guelph, Kanada (ccdb.ca), stellt mittlerweile zur Identifikation von Tieren mehrere genetische Referenzdatensätze zur Verfügung. Momentan besteht ein öffentlich verfügbarer Datensatz auf Artniveau, der 84.965 Arten durch 1.012.364 Sequenzen erfasst, und von Forschungstreibenden und angewandt arbeitenden Wissenschaftern genutzt werden kann. Ein etwas umfassenderer Datensatz beruht auf 2.687.251 Sequenzen, die 174.696 Arten zugeordnet sind, der allerdings nur begrenzt zugänglich ist und im Moment nur zur molekulargenetischen Identifikation genutzt werden kann (BOLD Systems V3 2016). Zur Erweiterung dieses Datensatzes werden insbesondere nationale Projekte ausgeführt (z.B., German Barcode of Life [GBOL; German Barcode of Life Consortium 2011-2016], Austrian Barcode of Life [ABOL; www.abol.ac.at]), aber auch Forschungsbestrebungen auf taxonomische Gruppen fokussiert (Trichoptera Barcode of Life [TBOL, trichopterabol.org]). Da dabei eine möglichst flächendeckende Erfassung der genetischen Diversität einzelner Arten angestrebt werden muss, sind gezielte, kleinräumige Kampagnen ein optimales Mittel zur Vervollständigung der notwendigen Vergleichsdatenbanken. Als Zielregionen eignen sich vor allem Regionen hoher Biodiversität, da so besonders effektiv umfassende Vergleichsdaten generiert werden können. Innerhalb Österreichs stellt Vorarlberg daher eine besonders lohnenswerte Forschungsregion dar, da hier ein Großteil der bekannten Köcher- und Steinfliegenfauna nachgewiesen werden konnte. Österreichweit sind 308 Arten von Köcherfliegen bekannt, davon viele kleinräumige Endemiten (Malicky 2009). In Vorarlberg gibt es rezente Aufsammlungen, die 179 Köcherfliegenarten nachweisen konnten (Graf et al. 2005; Aistleitner & Malicky 2007). Zudem sind aus dem Bundesland Vorarlberg schon Sequenzdaten von 24 Köcherfliegenarten vorhanden. Die Steinfliegenfauna Österreichs umfasst 134 Arten (Graf 2010; Graf et al. 2014), von denen einige in den letzten Jahren neu beschrieben wurden. Aufsammlungen und gezielte Nachsuchen in Vorarlberg ergaben bisher den Nachweis von 70 Steinfliegenarten in Vorarlberg (Graf & Schmidt-Kloiber 2010). Sowohl Steinfliegen als auch Köcherfliegen sind im Larvenstadium wesentliche Qualitätselemente des nationalen Gewässergüte-Bewertungsverfahrens (Moog 1995, 2002, 2004; Moog et al. 2004). Somit ist die Erfassung dieser Gruppen in molekulargenetischen Vergleichsdatenbanken von besonderem nationalen und internationalen Interesse. Erweiterte Gewässergüteerhebungsprotokolle schlagen die Einbeziehung molekulartaxonomischer Methoden vor, um eine präzisere taxonomische Bearbeitung und damit eine genauere und vergleichbarere Einstufung der jeweiligen Gewässer zu erzielen.

Im Rahmen des 2014 initiierten ABOL Projekts sollen die DNS-Barcodes aller österreichischen Tiere, Pflanzen und Pilze zu erfasst und via BOLD bereitgestellt werden. Insbesondere sollen Bioindikatoren und für den Menschen bedeutsame Taxa erfasst werden. Hauptziel des hier dargestellten Projekts war daher die teilweise Erfassung der genetischen Diversität der Köcher- und Steinfliegenfauna Vorarlbergs sowie die Erzeugung und Veröffentlichung von genetischen Sequenzdaten (DNS-Barcodes) im Rahmen der nationalen österreichischen Barcode of Life Initiative ABOL und damit der Österreichischen Biodiversitäts-Strategie 2020+ (Umweltbundesamt, 2014).

2 Material und Methoden

Das Material wurde im Rahmen der Erstellung der Roten Listen des Landes Vorarlberg gesammelt. Dabei wurden im Tagfang Keschergänge angewandt und durch gezielte Aufsammlungen Larvenmaterial gesammelt; der Nachtfang erfolgte durch den Einsatz von Lichtfallen.

Auf Artniveau bestimmtes Material wurde in weiterer Folge zur Erstellung eines DNS-Barcode-Datensatzes verwendet. Dazu wurden aus Beinen und Thoraxsegmentteilen vermittels der *HotShot*-Methode vollständige, genomische DNS extrahiert (Truett et al. 2000). Zur Extraktion wurden die Gewebeproben für 30-35 Minuten bei 96 °C in 75 µl eines alkalischen Lyse-Puffers (25 mM NaOH, 0,2 mM EDTA [Ethylendiamintetraacetat]) inkubiert, und anschließend auf 4 °C gekühlt und mit 75 µl eines Neutralisationspuffers (40 mM Tris-HCl) neutralisiert.

Zur Amplifizierung partieller Sequenzen des Ziel-Genabschnitts (Cytochromoxidase Untereinheit I, COI) wurde eine Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) in 10 µl Reaktionsvolumen unter Standardbedingungen mit Hilfe eines degenerierten Primerpaars, HCO2198-L und LCO1490-L (5′-TAAACTTCWGGRTGWCCAAARAATCA-3′ & 5′-GGTCWACWAATCATAAAGATATTGG-3′; Nelson et al. 2007), durchgeführt. Dazu wurde das peqGOLD Hot Taq Set nach den Angaben des Herstellers verwendet (PeqLAB VWR, Deutschland). Die Reaktionen enthielten 25 µM jedes Primers, 0,2 mM Desoxy-Nukleotide, 1 Einheit DNS-Polymerase und 1 Einheit Reaktionspuffer S (enthält 100 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, 0,1 % Tween 20 und 15 mM $MgCl_2$). Temperaturbedingungen während der Reaktion entsprachen den Folgenden: 5' 95 °C, 5 x (30" 95 °C, 1' 44 °C, 1' 72 °C), 15 x (30" 95 °C, 30" 48 °C, 1' 72 °C), 20 x (30" 95 °C, 30" 50 °C, 1' + (10" * n) 72 °C); wobei n gleich der Anzahl der Zyklen ist. Verdünnte, nicht aufgereinigte PCR-Produkte wurden auf einem ABI 3177XL Kapillarsequenziergerät am Senckenberg Biodiversität und Klima Forschungszentrum unter Verwendung der Primer HCO2198 und LCO1490 (5′-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3′ und 5′-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3′; Folmer et al. 1994) sequenziert.

Derart erzeugte Sequenzen wurden in Geneious R6 (Kearse et al. 2012) nachbearbeitet und unter Verwendung des MAFFT-Algorithmus (Katoh & Standley 2013) via MAFFT v7 in Geneious R6 aligniert. Die Sequenzen wurden einzeln gegen Vergleichsdatenbanken (BOLD, und GenBank via BLAST [Johnson et al. 2008; Benson et al. 2013]) und mit unveröffentlichten, im Rahmen des Trichoptera Barcode of Life-Projekts, generierten Daten abgeglichen, um (i) den Bestand an Sequenzen abzufragen, und (ii) die taxonomische Identifikation der Individuen zu verifizieren.

Des Weiteren wurden die erzeugten Sequenzdaten und in einem phylogenetischen Ansatz verglichen. Dazu wurden in einem Maximum-Likelihood-Ansatz unter Verwendung adäquater Partitionierungsmuster (die mittels Partitionfinder v.1.1.3 [Lanfear et al. 2012] abgeschätzt wurden) die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den einzelnen Individuen mittels RAxML (Stamatakis 2014) hergeleitet und als phylogenetischer Stammbaum dargestellt. Die Analysen wurden mit dem voreingestellten GTR+Γ Nukleotid-Substitutionsmodell durchgeführt. Bootstrap-Unterstützung der phylogenetischen Maximum-Likelihood Topologien wurde mittels des f*ast bootstrap* Algorithmus mit 1000 Replikaten ermittelt. Als Außengruppe wurde eine DNS-Barcodesequenz des noctuiden Nachfalters *Agrotis exclamationis* (GenBank-Zugangsnummer KX044714.1) in dem Datensatz ergänzt.

Nach Bereinigung des Datensatzes von Kontaminationen und taxonomischen Fehlzuordnungen wurden die erstellten Barcode-Sequenzdaten in der BOLD-Datenbank eingegeben.

3 Ergebnisse

Im Rahmen dieses Projekts wurden unterschiedliche Naturräume und Regionen Vorarlbergs besammelt (*Abb. 1*, *Abb. 2*). Die Gesamtzahl aller bisher im Bundesland Vorarlberg erfolgten Punktaufsammlungen zur Erfassung der genetischen Diversität von Trichopteren und Plecopteren konnte dabei mehr als verdoppelt werden. Exakte faunistische Ergebnisse sowie eine Rote Liste für die Stein- und Köcherfliegen des Bundeslandes Vorarlberg werden in einer separaten Publikation abgehandelt (Graf, in Vorbereitung).

Insgesamt wurden 317 Individuen mittels molekulargenetischer Methoden bearbeitet. Von 275 Individuen konnten Sequenzdaten generiert werden; dies entspricht einer Erfolgsrate von 86,75 %. Die Sequenzdaten mitsamt den korrespondierenden Metadaten können auf BOLD unter dem Projekt-Titel »inatura - Trichoptera and Plecoptera Barcode of Vorarlberg« und dem Projekt-Kürzel »INTAP« abgerufen werden.

3.1 Taxonomische Kongruenz und Kontamination

Die molekulargenetische Abgrenzung der einzelnen Arten ist Großteils kongruent mit der morphologischen Identifikation. Im Zuge der Qualitätskontrolle durch Abgleich der Sequenzdaten mit bestehenden Datenbanken (GenBank und BOLD), der Herleitung phylogenetischer Beziehungen der bearbeiteten Individuen und der anschließenden morphologischen Nachprüfung der bearbeiteten Individuen konnte bei einigen Tieren eine bessere taxonomische Zuordnung erzielt werden (*Abb. 3*, *Abb. 4*). Darüber hinaus wurden 5 Fälle von Kontaminationen gefunden (*Abb. 3*, *Abb. 4*). Die taxonomischen Ungenauigkeiten wurden überprüft, morphologisch nachbestimmt, und nach Korrektur richtig benannt in die BOLD-Datenbank eingespeist. Dabei wurde die von BOLD und GenBank vorgeschlagene Klassi-

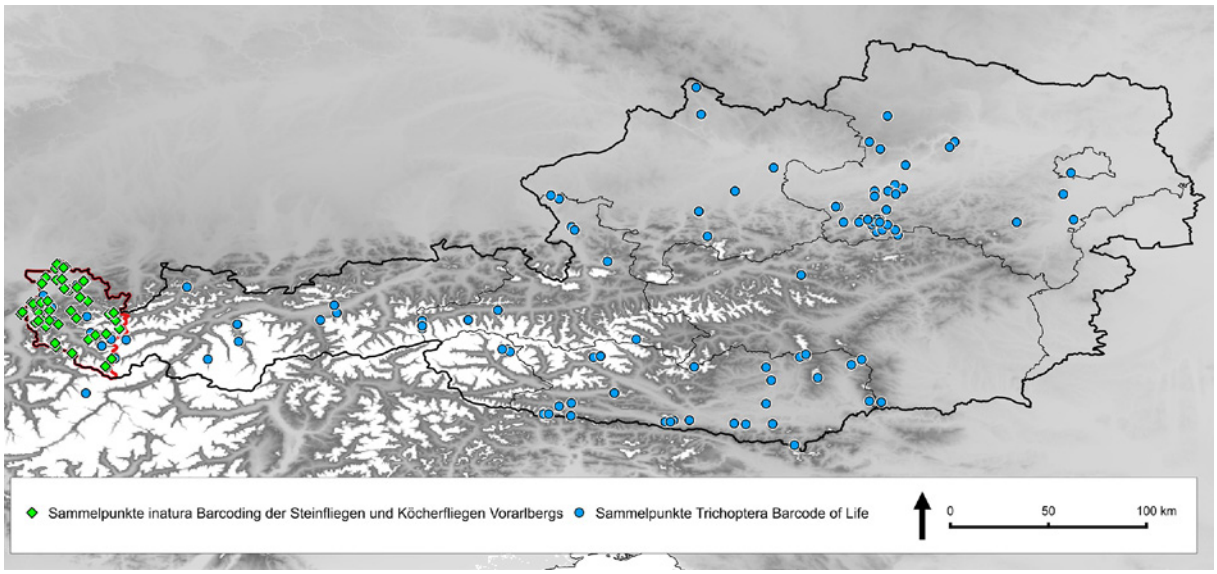


Abb. 1: Karte der Probenahmestellen zur molekulargenetischen Erfassung der Österreichischen Köcherfliegen und Steinfliegen. Das Bundesland Vorarlberg ist zur besseren Kenntlichkeit rot umrahmt. Im Zuge dieses Projekts konnte die Gesamtzahl der in Vorarlberg besammelten Stellen wesentlich erhöht werden.

fikation des Individuums PE208_Sericostoma_flavicorne als *Sericostoma galeatum* ignoriert. In diesem spezifischen Fall widerspricht die erneute morphologische Determination als *Sericostoma flavicorne* der molekulargenetischen Zuordnung eindeutig, und die sehr leicht zu identifizierende Art *Sericostoma galeatum* ist bisher nur aus dem süd-westlichen Alpenbogen und dem Apennin sowie Sardinien bekannt (Moretti & Cianficconi 1978). Die in der phylogenetischen Analyse als ident gewerteten Sequenzen von Individuen der Arten *Leuctra helvetica* und *Leuctra niveola* (*Abb. 4*; PE197_Leuctra_helvetica, PE220_Leuctra_niveola, PE208_Leuctra_niveola, PE273_Leuctra_helvetica, PE285_Leuctra_niveola) konnten nicht über einen Abgleich der Sequenzdaten in BOLD oder GenBank nachgeprüft werden, da bislang keinerlei Daten dieser Arten verfügbar sind.

3.2 Barcoding der Köcherfliegen Österreichs

Im Rahmen dieser Studie wurden 44,1 % der bekannten Vorarlberger Köcherfliegenfauna erfasst (79 von 179 [55 Arten in diesem Projekt neu sequenziert + 24 weitere Arten die im Rahmen von TBOL bereits sequenziert wurden]). Insgesamt waren 14 von 66 bearbeiteten Arten bisher nicht anhand österreichischen Materials in internationalen Referenzdatenbanken vorhanden. Zusätzlich konnten erstmals Sequenzdaten von 2 Arten und 1 Unterart in die bestehenden Datenbanken eingespeist werden (*Tab. 1*). Zudem konnte neben der Neuerfassung einiger Arten der Umfang der bestehenden Referenzdatenbanken vergrößert werden (*Tab. 1*).

3.3 Barcoding der Steinfliegen Österreichs

Mit dem vorliegenden Datensatz konnten rund 37,3 % (50 von 134 bekannten Arten) der Steinfliegenfauna Österreichs, und 71,4 % (50 von 70 Taxa) der aus Vorarlberg gemeldeten Steinfliegenarten abgedeckt werden. Sämtliche im Rahmen dieses Projekts erstellten Sequenzdaten von Steinfliegen sind von nationalen und internationalen Interesse: sie stellen den ersten Schritt zur vollständigen molekularen Erfassung der (österreichischen) Steinfliegenfauna dar, und tragen damit zur weltweiten Erfassung der Plecopterendiversität bei. Ein Abgleich mit den BOLD- und GenBank-Datenbanken legt nahe dass die hier generierten Daten einen gewissen Beitrag zur Vervollständigung von bestehenden Datensätzen leisten: 12 der 50 hier bearbeiteten Steinfliegenarten wurden erstmals weltweit genetisch charakterisiert. Außerdem konnten von diesen 50 Arten erstmals 48 Arten basierend auf österreichischem Material genetisch bearbeitet werden (*Tab. 2*). Mehrere Arten (zum Beispiel *Leuctra cingulata*, *Leuctra major*) waren in den bisher verfügbaren Datensätzen nur in geringer Anzahl vertreten, sodass die hier generierten Daten die Gesamtzahl der verfügbaren artgenauen Barcode-Sequenzen zum Teil mehr als verdoppeln (*Tab. 2*). Von besonderem Interesse ist die Bestätigung der morphologischen Identifikation von *Nemoura rivorum* (*Abb. 4*): diese Art wird hiermit erstmals für Österreich und Vorarlberg nachgewiesen.

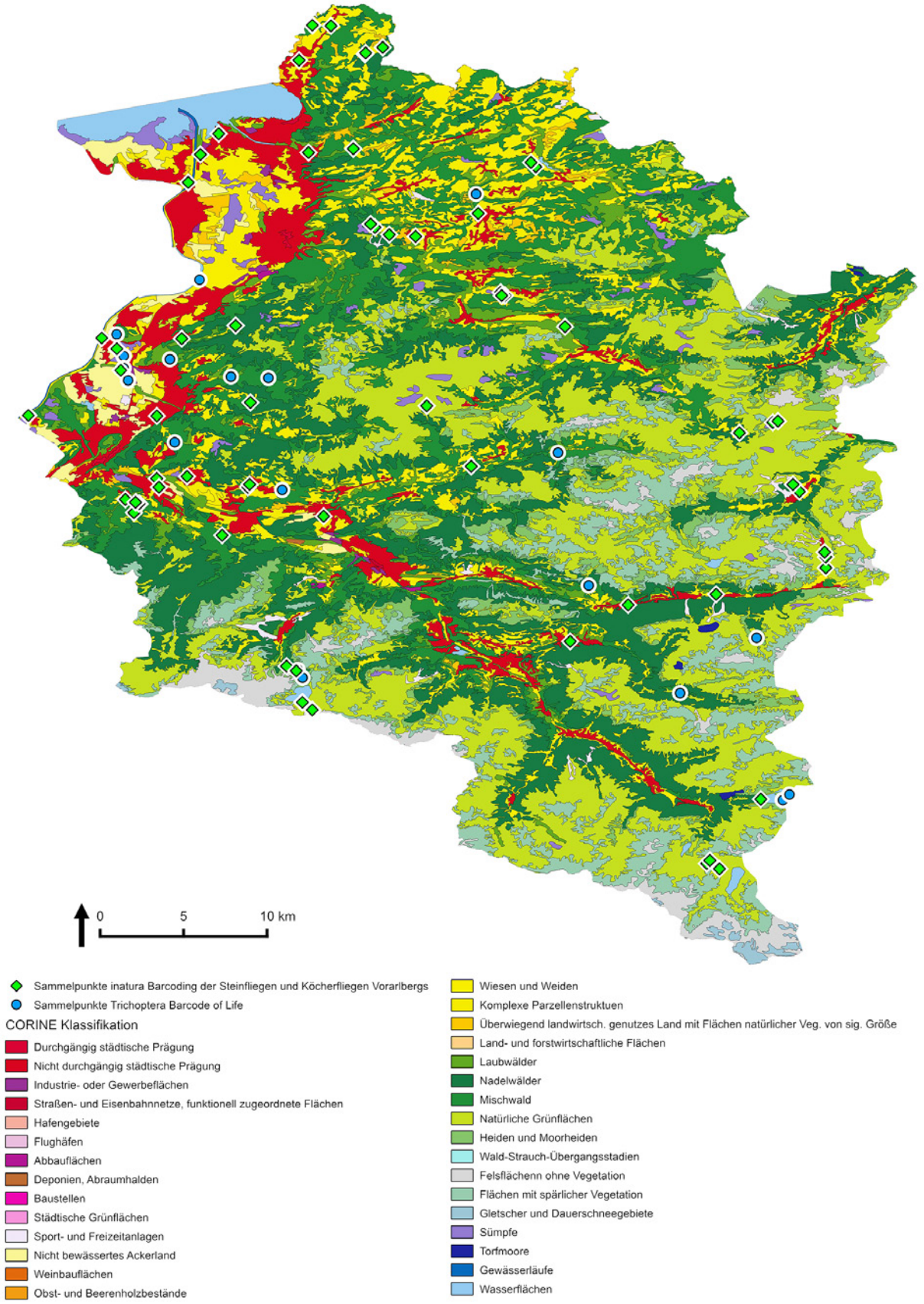


Abb. 2: Karte der Probenahmestellen innerhalb des Bundeslandes Vorarlberg unter Darstellung der verschiedenen Naturräume nach der CORINE-Datenbank. Der Großteil der besammelten Stellen liegt außerhalb menschlicher Siedlungsräume.

Abb. 3: Beispiele zur Erläuterung des Vorgehens bei Kontamination (A, B) oder taxonomischer Fehlzuordnung eines Individuums (C, D). Die von Kontamination betroffenen Individuen sind eindeutig falsch zugeordnet und teilen entweder als Chimären molekulargenetische Merkmale der beiden Arten deren Erbgut vermischt wurde (Beispiel A), oder sind durch eine eindeutig falsche Zuordnung im phylogenetischen Baum erkenntlich (Beispiel B). Taxonomische Fehlidentifikationen einzelner Individuen (Beispiele C, D) sind zumeist innerhalb der Gattung isoliert und wurden nach neuerlicher Determination und Abgleich der Sequenzen über GenBank und BOLD korrekt zugeordnet. In Fettdruck neben der ursprünglichen Zuordnung sind entweder die kongruenten Ergebnisse dieser Nachkontrolle dargestellt (blau unterlegt), beziehungsweise die wahrscheinlichste Kontaminationsquelle angegeben (rot unterlegt).

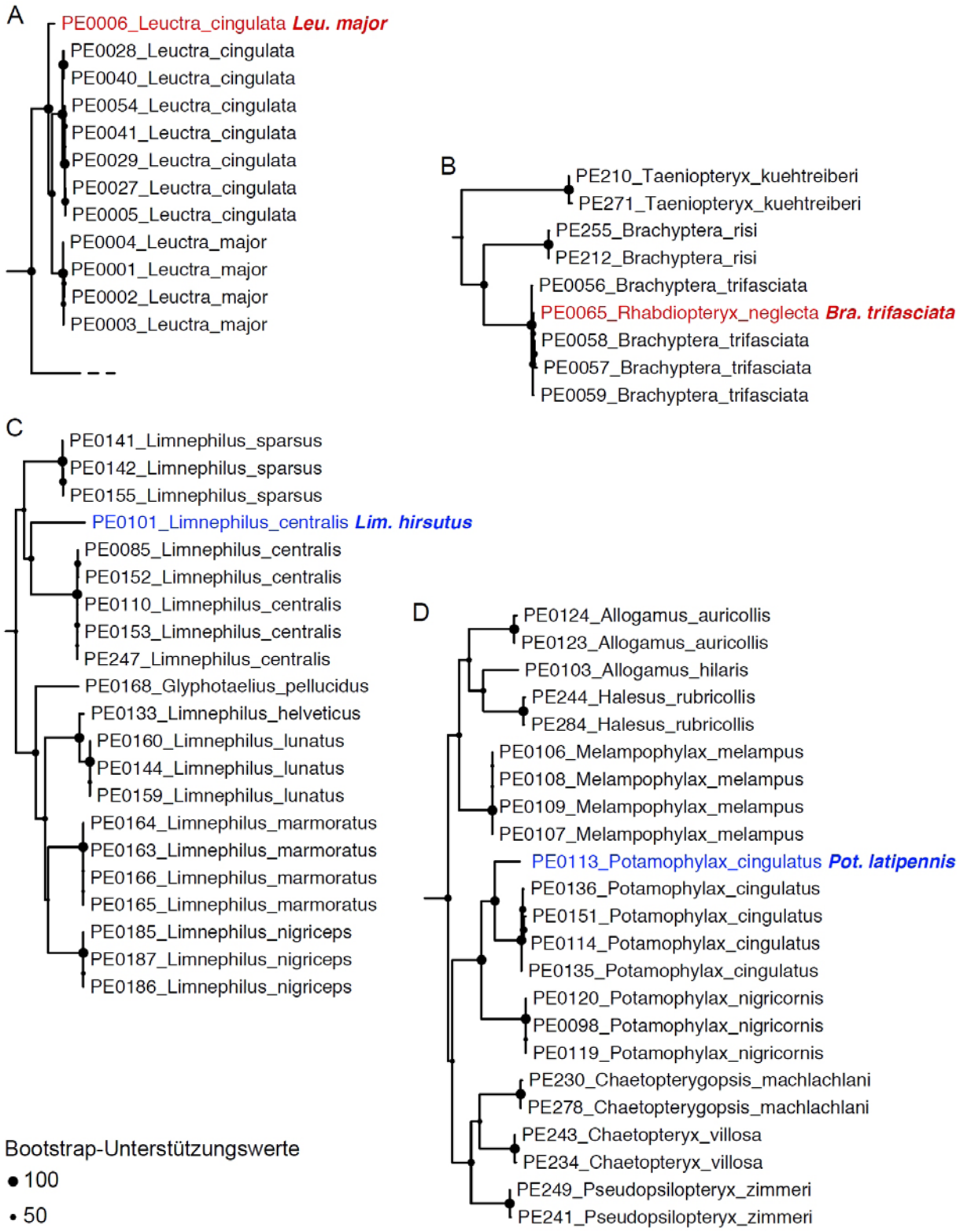
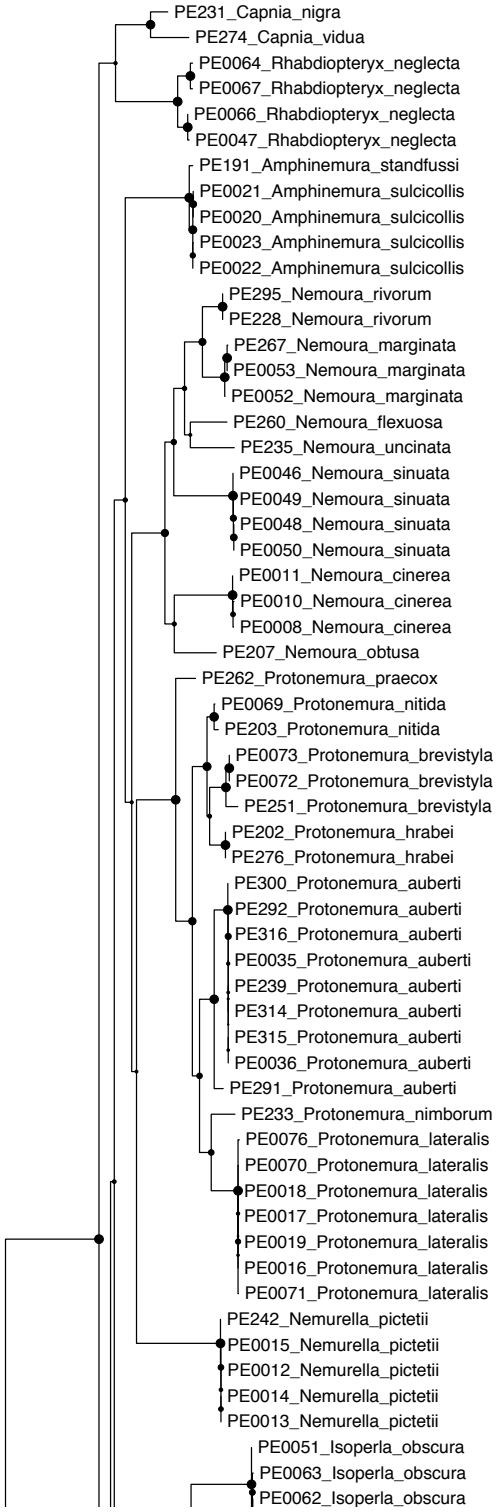


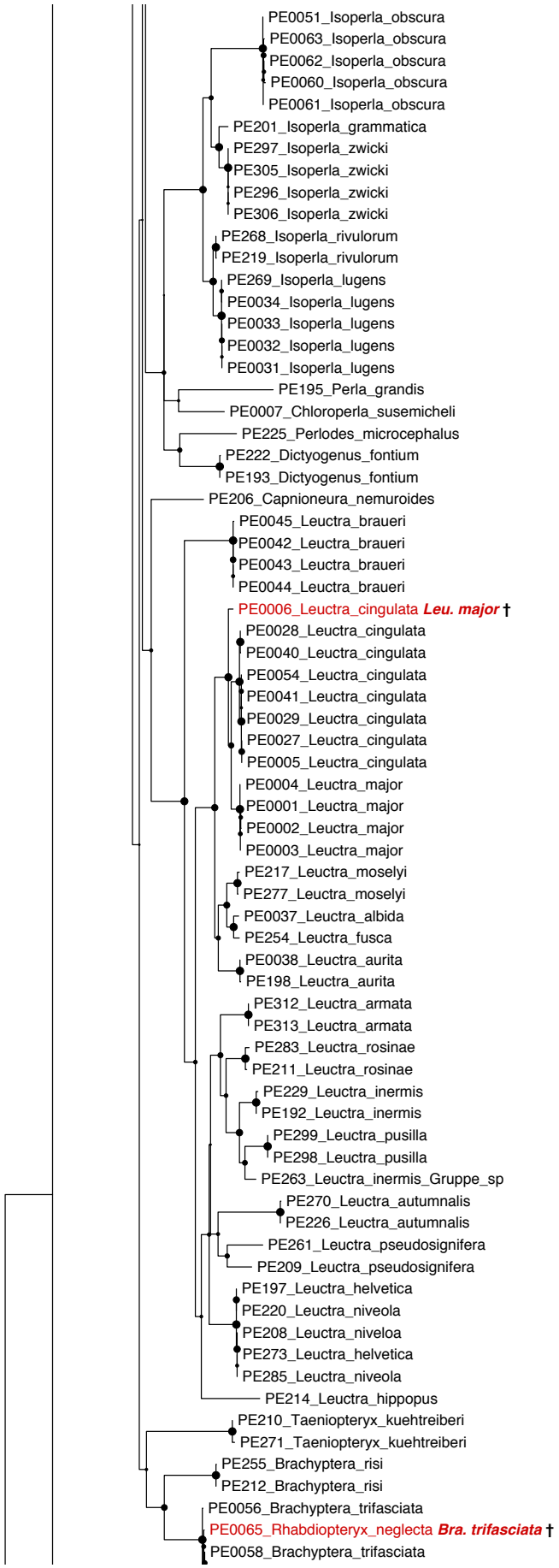
Abb. 4: Ergebnisse der phylogenetischen Maximum-Likelihood Analysen. Rot unterlegt und mit einem † markierte Individuen wurden als kontaminiert betrachtet (die wahrscheinlichste Kontaminationsquelle ist in Fettdruck neben der ursprünglichen Zuordnung angegeben) und aus dem endgültigen Datensatz entfernt. Im Falle einer ungenauen taxonomischen Bestimmung – blau unterlegt – wurde die Artzuordnung der Individuen über Abgleich mit vorhandenen Sequenzdatenbanken revidiert und morphologisch nachgeprüft, und der derart korrigierte Datensatz in die BOLD eingespeist. Grau unterlegt und mit einem * gekennzeichnet ist die fälschliche molekulargenetische Zuordnung eines Individuums der Art *S. flavicorne* zu *S. galeatum*.



4 Diskussion

Das vorliegende Projekt konnte insgesamt 14 von 116 bearbeiteten Stein- und Köcherfliegenarten erstmals in die BOLD Datenbank einspeisen und stellt die österreichische ABOL Initiative damit in einen globalen Kontext. Damit wird die Bedeutung regionaler Studien geringen Umfangs für internationale Projekte unterstrichen.

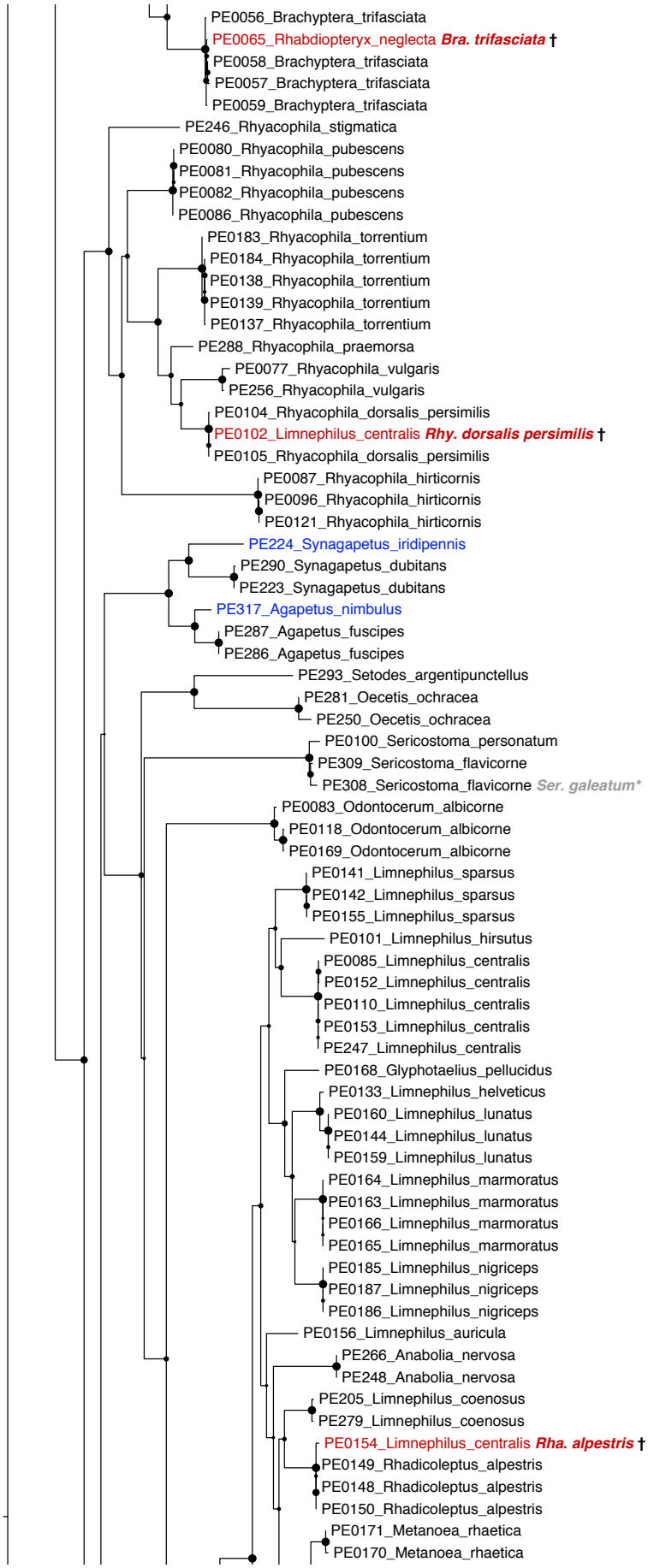
Mit zunehmender Verfügbarkeit von analytischen Methoden die eine verbesserte und vereinfachte Interpretation von DNS-Barcodingdatensätzen ermöglichen wird außerdem die Relevanz der hier erzeugten Daten steigen. Momentan verfügbare methodische Ansätze zur Identifikation neuer Arten basieren unter anderem auf Ähnlichkeitsanalysen des Barcoding-Abschnitts der COI. Beispiele hierfür sind ABGD (Puillandre et al. 2012) – einem Ansatz in dem automatisiert nach eindeutigen Unterschieden zwischen inner- und zwischenartlichen Sequenzen gesucht wird – und das in BOLD implementierte System der Barcode Index Nummern (BIN) (Ratnasingham & Hebert 2013), in dem über spezifische Algorithmen jede Sequenz basierend auf ihrer Ähnlichkeit einer Gruppe von Sequenzen zugeordnet wird, die über eine BIN zusammengefasst werden und idealerweise einer Art entsprechen. Auch Kombinationen von phylogenetischen Analysen und anschließender Bewertung der einzelnen phylogenetischen Gruppen werden zur Artidentifikation bzw. -differenzierung verwendet – wie beispielsweise verfügbar durch den GMYC (Fujisawa & Barraclough 2013) oder den PTP (Zhang et al. 2013) Algorithmus. Insbesondere wird die Kombination mit partiellen Sequenzdaten weiterer Genabschnitte bestehende Verfahren zur Arttrennung erweitern. DNS-Barcodingdaten liefern außerdem auch bedeutsame Informationen zur Herleitung von Verwandtschaftsbeziehungen innerhalb taxonomischer Großgruppen (Kjer et al. 2014; Zhou et al. 2016).



4.1 Bedeutung und Einschränkungen der Barcoding-Methode

DNS-Barcoding hat sich in zunehmendem Ausmaß als wesentliche Quelle objektiver Information in integrativen taxonomischen Ansätzen bewiesen. Verschiedenste Insektengruppen wie Käfer, Wanzen, Netzflügler oder Schmetterlinge können mit Hilfe von DNS-Barcoding auf Artniveau identifiziert werden (Hendrich et al. 2014; Pentisaari et al. 2014; Morinière et al. 2014). Dabei ist vor allem die Ansprechbarkeit taxonomisch schwierig zu erkennender Arten hervorzuheben, die mehrfach zu Neunachweisen bestimmter Taxa genutzt werden konnte (Hausmann et al. 2011; Haslberger et al. 2012; Segerer et al. 2013; Huemer 2014; Huemer & Hebert 2015).

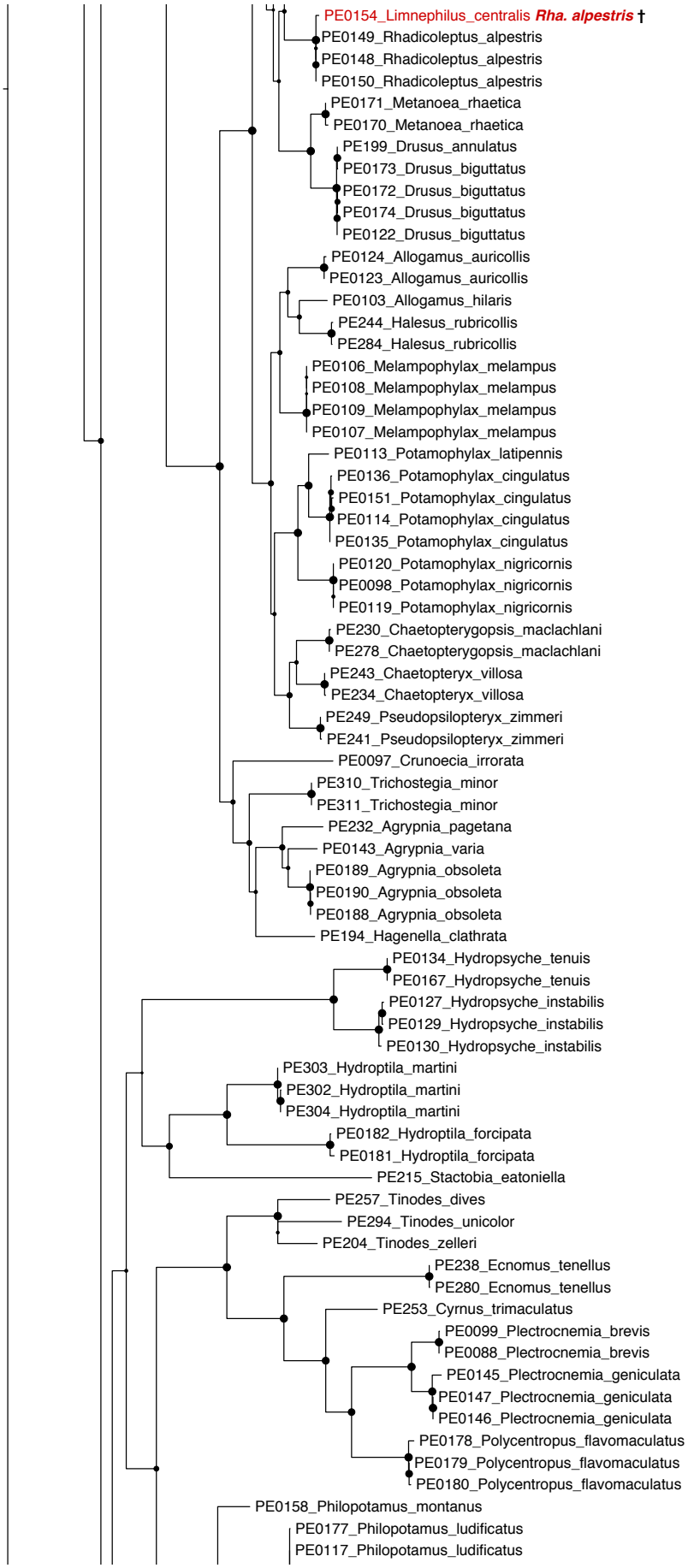
In der vorliegenden Studie ist der Neunachweis von *Nemoura rivorum* aus Österreich besonders hervorzuheben. Diese Art wurde anhand italienischen Materials aus dem nördlichen Apennin beschrieben, und ist auch aus den Meeralpen und den Ligurischen Alpen bekannt (Ravizza & Ravizza-Dematteis 1995). Morphologisch ist die Art in die *Nemoura flexuosa-marginata* Gruppe einzuordnen, zu der unter anderem *N. flexuosa*, *N. uncinata*, *N. marginata* und *N. rivorum* gehören (Ravizza & Ravizza-Dematteis 1995). Diese Arten werden auch in einer phylogenetischen Analyse als eine nah verwandte Gruppe dargestellt (*Abb. 4*). Insgesamt ist die *Nemoura flexuosa-marginata* Gruppe revisionsbedürftig, und sämtliche in dieser Gruppe zusammengefassten Arten sollten in einem integrativen Ansatz unter Einbeziehung morphologischer und molekulargenetischer Daten neu bearbeitet werden. Dies würde insbesondere zu einer besseren Datenlage bezüglich der Verbreitung und Abgrenzung der einzelnen Arten führen, und womöglich in der Beschreibung neuer Arten aus dieser Gruppe enden. Das vorliegende Projekt erleichtert einen solchen integrativen Ansatz durch



die Bereitstellung von Sequenzdaten aus bisher nicht erfassten Gebieten und die Erweiterung des bestehenden Datensatzes um die Art *N. rivorum*. Ein Abgleich mit in BOLD und GenBank verfügbaren Sequenzen bestätigt die morphologische Klassifikation der bearbeiteten Individuen von *N. flexuosa*, *N. uncinata*, und *N. marginata*. Abgesehen von den hier erzeugten Daten sind bislang keinerlei Vergleichsdaten von *Nemoura rivorum* vorhanden, mittels derer die morphologische Bestimmung verifiziert werden könnte. Die Auftrennung der als *N. marginata* und *N. rivorum* identifizierten Individuen in der phylogenetischen Analyse (vgl. *Abb. 4*) legt jedoch nahe, dass es sich tatsächlich um die entsprechenden Arten handelt.

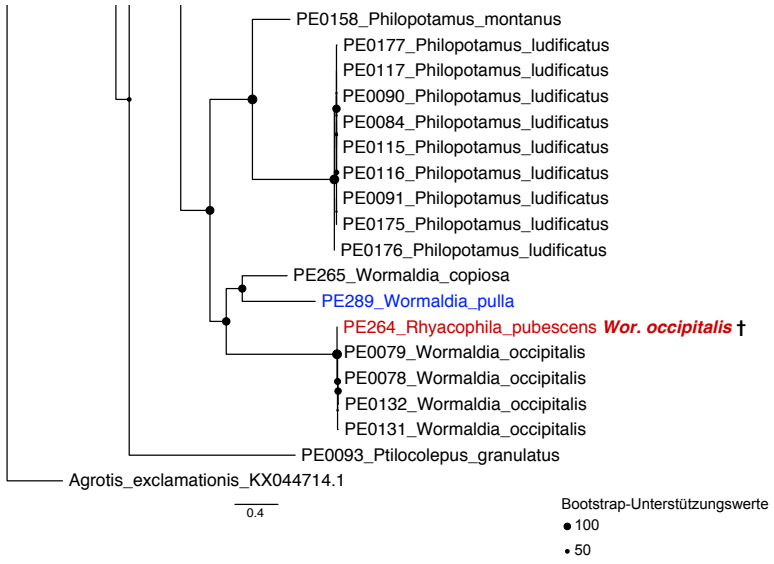
Die von BOLD und GenBank vorgeschlagene Re-Klassifizierung eines Individuums von *Sericostoma flavicorne* als *Sericostoma galeatum* zeigt die bestehenden Schwächen des Systems auf. Die Gattung *Sericostoma* (und darin insbesondere die Arten *S. personatum* und *S. flavicorne*) ist taxonomisch herausfordernd (siehe dazu auch Botosaneanui & Schmid 1973; Moretti & Cianficconi 1978). In Konsequenz ergibt sich aufgrund der relativ unpräzisen morphologischen Identifikationsmöglichkeiten, die auch durch eine große Variabilität innerhalb der Gattung erschwert werden (Malicky 2004), eine molekulargenetisch wie auch in klassischer taxonomischer Bearbeitung schwierig zu fassende Gruppe. Dies spiegelt sich in den in GenBank und BOLD verfügbaren Sequenzen wider, die sehr ähnlich und nur anhand geringfügiger Abweichungen trennbar sind. Die Arten der Gattung *Sericostoma* sind daher mit einem klassischen DNS-Barcodingansatz der einzig auf die Analyse des COI-Gens abzielt nicht oder nur begrenzt auf Artniveau identifizierbar.

Außerdem sind auch andere taxonomische Gruppen wie Culicidae (Insecta, Diptera) – die aufgrund ihres Vektorpotenzials von beachtlichem Interesse für die menschliche Gesellschaft sind



– zum Teil mittels des klassischen DNS-Barcoding nicht gut ansprechbar und erfordern die Analyse weiterer Genabschnitte (z. B. Smith & Fonseca 2004; Werblow et al. 2016). Andere Gruppen wie Schmetterlinge oder Zuckmücken verhalten sich zum Teil ähnlich (Wiemers & Fiedler 2007; Kim et al. 2012). Um eine vollständige Möglichkeit zur molekular-taxonomischen Identifikation zu schaffen ist daher eine Erweiterung des DNS-Barcoding vonnöten, indem beispielsweise weitere Genabschnitte analysiert werden (Previšić et al. 2014) oder andere Informationsquellen (Verbreitung, Ökologie, etc.) genutzt werden (Ibrahimi et al. 2016).

Eine weitere Beschränkung des DNS-Barcodingverfahrens im Sinne von Hebert et al. (2003a) ist, wie auch in dieser Studie nachgewiesen, die bislang unzureichende Erfassung der weltweit vorhandenen Biodiversität (Boykin et al. 2012). Einzig gezielte Projekte, die verfügbare taxonomische und methodische Ressourcen optimal nutzen, können hier zu einer Verbesserung der Lage beitragen. Das schweizerische DNS-Barcoding-Projekt SwissBOL hat kürzlich durch eine gezielte Kampagne zur Erfassung der Plecopterenfauna wesentlich zur Vervollständigung der vorhandenen Sequenzdatenbanken beitragen können (Gattoliat et al. 2016). Im Rahmen der hier präsentierten Studie wurde ein ähnlicher Ansatz demonstriert: Frisch gesammeltes Material das von Spezialisten auf Artniveau bestimmt wurde, wurde zur Generierung der hier vorliegenden Daten herangezogen. Dieser synergetische Ansatz war nur möglich, weil ein faunistisches Projekt zur Erstellung der Roten Listen der Köcherfliegen und der Steinfliegen des Landes Vorarlberg Material zur Verfügung stellen konnte das zeitnah einer molekulargenetischen Bearbeitung zugeführt werden konnte. Die hier weltweit erstmals erzeugten Sequenzdaten von 14 Arten und einer Unterart unterstreichen die Bedeutung von spezifischen regionalen Projekten für globale DNS-Barcoding-Initiativen.



4.2 Verwendung von Stein- und Köcherfliegen DNS-Barcoding-Datensätzen

Der hier vorliegende Datensatz ist außerdem von Relevanz für die Weiterentwicklung von Methoden zur Gewässergüteerhebung. Köcherfliegen und Steinfliegen sind gemeinsam mit den Eintagsfliegen (Ephemeroptera) Tiergruppen von großer Bedeutung für die ökologische Wasserqualitätsüberwachung im Rahmen der EU-Wasserrahmenrichtlinie (AQEM Konsortium 2002; Graf et al. 2002; Hering et al. 2004; Hering et al. 2006). Besonders die hochdifferenzierte ökologische Einnischung der einzelnen Arten macht diese Gruppen zu bedeutsamen Indikatororganismen. Der hohe spezifische Indikatorwert ist ursächlich auf die komplexe Evolution und Diversifikation, insbesondere unter Einfluss von geologischen und klimatischen Faktoren, zurückzuführen, die zu einer hohen ökologischen Diversität von Stein- und Köcherfliegen geführt haben (z.B. Graf et al. 2008; Graf et al. 2009). Daher ist die taxonomische Bearbeitung auf Artniveau von wesentlicher Bedeutung, um das volle Indikatorpotential dieser Gruppen ausschöpfen zu können (Resh & Unzicker 1975; Stubauer & Moog 1996; Usseglio-Polatera et al. 2000; Verdonschot 2000; Lenat & Resh 2001).

Kürzlich initiierte Forschungsvorhaben – wie zum Beispiel die DNAqua-Net Initiative (DNAqua-Net Consortium 2016) – zielen darauf ab, erweiterte Barcoding-Ansätze für die Gewässergütebewertung zu etablieren. Dies ist begründet in der zum Teil schwierigen taxonomischen Bearbeitung bestimmter Gruppen, die jahrelange Erfahrung benötigt, und in der erhöhten taxonomischen Auflösung die solche Methoden ermöglichen (Stein et al. 2014; Valentini et al. 2016). Außerdem ist nur ein Teil des im Rahmen von Gewässegüteerhebungen gesammelten Larvenmaterials verlässlich ansprechbar – beispielsweise sind die Arten der Gattungen *Leuctra* (Plecoptera) und *Limnephilus* (Trichoptera) im Larvenstadium kaum zu trennen und verringern zwangsläufig die potentielle taxonomische und damit methodische Auflösung. Zur erfolgreichen Umsetzung solcher Ansätze eine vollständige Erfassung der bestehenden Biodiversität vonnöten um verlässlich jede Art identifizieren zu können, und um bereits bestehende Datenbanken, welche die ökologische Einstufung von Indikatororganismen zusammenfassen (z.B., freshwater-ecology.info [Schmidt-Kloiber & Hering 2015]), zu nutzen, zu erweitern und langfristig zu revidieren. Außerdem ist die Erfassung jeder lokalen Varietät einer Art erforderlich um einen solchen Ansatz in die Praxis umsetzen zu können, da widrigenfalls nicht zuordenbare, molekular als unbekannt identifizierte Taxa die Auflösung der Methode einschränken. Besonders der Umfang des Referenzdatensatzes für die Steinfliegengattung *Leuctra* konnte kürzlich vergrößert werden (Gattoliat et al. 2016), und wurde im Rahmen des DNS-Barcoding-Projekts zur Erfassung der Stein- und Köcherfliegen Vorarlbergs nochmals erweitert. Der hier vorliegende Datensatz trägt trotz seiner geringen taxonomischen Mächtigkeit (insgesamt wurden 116 Arten erfasst) zu einer beträchtlichen Erweiterung bereits bestehender Datenbanken bei, und ermöglicht somit nicht nur zu deren Vervollständigung sondern auch die Weiterentwicklung erprobter Techniken.

5 Danksagung

Unser besonderer Dank gilt der inatura Dornbirn für die Unterstützung des Forschungsprojekts. Gilles Vinçon leistete unabkömmliche Hilfe bei der Bestimmung einiger Plecopterengruppen. Carina Zittra sei für Ihre wertvolle Unterstützung während der Organisation des Datensatzes gedankt.

Tab. 1: Abgleich der im Rahmen dieses Projekts generierten barcode-konformen Sequenzdaten von Köcherfliegenarten mit bereits in der BOLD-Datenbank verfügbaren Sequenzdaten. †, Neueintrag einer Art in die BOLD. Die Art *Hydroptila martini* ist in bestehenden Datenbanken bislang nur als Einzelsequenz aus Österreich vorhanden.

Taxon	Anzahl neue Sequenzen	Anzahl Sequenzen in BOLD	Neueintrag aus Österreich	Neueintrag aus Vorarlberg
Agapetus fuscipes	2	34		x
Agapetus nimbulus	1	7	x	x
Agrypnia obsoleta	3	36		x
Agrypnia pagetana	1	87	x	x
Agrypnia varia	1	24		x
Allogamus auricollis	2	44		x
Allogamus hilaris	1	7		x
Anabolia nervosa	2	32	x	x
Chaetopterygopsis maclachlani	2	12		x
Chaetopteryx villosa	2	135		x
Crunoecia irrorata	1	7	x	x
Cyrnus trimaculatus	1	22	x	x
Drusus annulatus	1	30	x	x
Drusus biguttatus	4	25		
Ecnomus tenellus	2	31		x
Glyphotaelius pellucidus	1	28		x
Hagenella clathrata	1	6	x	x
Halesus rubricollis	2	24		
Hydropsyche instabilis	3	80		x
Hydropsyche tenuis	2	19		x
Hydroptila forcipata	2	27		x
Hydroptila martini	3	4	(x)	x
Limnephilus auricula	1	18		
Limnephilus centralis	5	20	x	x
Limnephilus coenosus	2	65		x
Limnephilus helveticus	1	3		x
Limnephilus hirsutus	1	7		x
Limnephilus lunatus	3	40		
Limnephilus marmoratus	4	18		
Limnephilus nigriceps	3	157	x	x
Limnephilus sparsus	3	40		x
Melampophylax melampus	4	21		x
Metanoea rhaetica	2	16		
Odontocerum albicorne	3	59		x
Oecetis ochracea	2	55		x
Philopotamus ludificatus	9	21		x
Philopotamus montanus	1	67		x
Plectrocnemia brevis	2	2		x
Plectrocnemia geniculata	3	13		
Polycentropus flavomaculatus	3	39		x
Potamophylax cingulatus	4	55		x
Potamophylax latipennis	1	23		x
Potamophylax nigricornis	3	29		x
Pseudopsilopteryx zimmeri	2	7		
Ptilocolepus granulatus	1	10		x
Rhadicoleptus alpestris	3	46		
Rhyacophila dorsalis persimilis †	2		x	x
Rhyacophila hirticornis	3	8		x
Rhyacophila praemorsa	1	3		x
Rhyacophila pubescens	4	5		x
Rhyacophila stigmatica	1	6		x
Rhyacophila torrentium	5	10		
Rhyacophila vulgaris	2	16		
Sericostoma flavicorne	1	13		x
Sericostoma personatum	1	26		
Setodes argentipunctellus	1	1	x	x
Stactobia eatoniella	1	1		x
Synagapetus dubitans †	2		x	x
Synagapetus iridipennis	1	2		x
Tinodes dives	1	9		x
Tinodes unicolor	1	6		x
Tinodes zelleri †	1		x	x
Trichostegia minor	2	10		x
Wormaldia copiosa	1	18		x
Wormaldia occipitalis	4	27		x
Wormaldia pulla	1	7		x

Tab. 2: Abgleich der im Rahmen dieses Projekts generierten barcode-konformen Sequenzdaten von Steinfliegenarten mit bereits in der BOLD-Datenbank verfügbaren Sequenzdaten. †, Neueintrag einer Art in die BOLD-Datenbank.

Taxon	Anzahl neue Sequenzen	Anzahl Sequenzen in BOLD	Neueintrag aus Östereich
Amphinemura standfussi	1	94	x
Amphinemura sulcicollis	4	22	x
Brachyptera risi	2	35	x
Brachyptera trifasciata †	4		x
Capnia nigra	1	6	
Capnia vidua	1	11	
Capnioneura nemuroides	1	1	x
Chloroperla susemicheli	1	4	x
Dictyogenus fontium	2	1	x
Isoperla grammatica	1	28	x
Isoperla lugens †	5		x
Isoperla obscura	5	18	x
Isoperla rivulorum †	2		x
Isoperla zwicki †	4		x
Leuctra albida	1	8	x
Leuctra armata	2	5	x
Leuctra aurita	1	4	x
Leuctra autumnalis †	2		x
Leuctra braueri	4	23	x
Leuctra cingulata	7	5	x
Leuctra fusca	1	65	x
Leuctra helvetica †	2		x
Leuctra hippopus	1	68	x
Leuctra inermis	2	5	x
Leuctra inermis Gruppe sp.	1		x
Leuctra major	4	1	x
Leuctra moselyi	2	2	x
Leuctra niveola †	3		x
Leuctra pseudosignifera	2	1	x
Leuctra pusilla †	2		x
Leuctra rosinae	1	33	x
Nemoura cinerea	3	96	x
Nemoura flexuosa	1	18	x
Nemoura marginata	3	14	x
Nemoura obtusa	1	2	x
Nemoura rivorum †	2		x
Nemoura sinuata	4	5	x
Nemoura uncinata	1	1	x
Nemurella pictetii	5	89	x
Perla grandis	1	3	x
Perlodes microcephalus	1	10	x
Protonemura auberti	9	39	x
Protonemura brevistyla †	3		x
Protonemura hrabei †	2		x
Protonemura lateralis	8	11	x
Protonemura nimborum	1	2	x
Protonemura nitida †	2		x
Protonemura praecox	2	2	x
Rhabdiopteryx neglecta	4	3	x
Taeniopteryx kuehtreiberi	2	2	x

6 Literatur

Aistleitner, U. & Malicky, H. (2007): Neue und interessante Nachweise von Köcherfliegen aus Vorarlberg, Austria occ. (Insecta: Trichoptera). – Entomologische Berichte Luzern, 58: 165-170.

AQEM Konsortium (2002): Manual for the application of the AQEM system. A comprehensive method to assess European streams using benthic macroinvertebrates, developed for the purpose of the Water Framework Directive.

Armstrong, K. F. & Ball, S. L. (2005): DNA barcodes for biosecurity: invasive species identification. – Philosophical Transactions of the Royal Society London B: Biological Sciences, 360(1462): 1813-1823.

Barcaccia, G., Lucchin, M. & Cassandro, M. (2015): DNA Barcoding as a Molecular Tool to Track Down Mislabeling and Food Piracy. – Diversity, 8(1): 2.

Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J. & Sayers, E. W. (2013): GenBank. – Nucleic Acids Research, 41 (D1): D36-D42.

Botosaneau, L. & Schmid, F. (1973): Les Trichopteres du Museum d'Histoire naturelle de Geneve. – Revue suisse de Zoologie, 80: 251-254.

Boykin, L. M., Armstrong, K., Kubatko, L. & De Barro, P. (2012): DNA barcoding invasive insects: database roadblocks. – Invertebrate Systematics, 26(6): 506-514.

Craft, K. J., Pauls, S. U., Darrow, K., Miller, S. E., Hebert, P. D. N., Helgen, L. E., Novotny, V. & Weiblen, G. D. (2010): Population genetics of ecological communities with DNA barcodes: an example from New Guinea Lepidoptera. – Proceedings of the National Academy of Sciences, 107: 5041–5046.

Dejean, T., Valentini, A., Miquel, C., Taberlet, P., Bellemain, E. & Miaud, C. (2012): Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. – Journal of Applied Ecology, 49(4), 953-959.

DNAqua-Net Consortium (2016): DNAqua-Net: Developing new genetic tools for bioassessment and monitoring of aquatic ecosystems in Europe. – Research Ideas & Outcomes, 2: e11321.

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(5): 294-299.

Fujisawa, T., & Barraclough, T. G. (2013). Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent (GMYC) approach: a revised method and evaluation on simulated datasets. – Systematic Biology, 62(5): 707-724.

German Barcode of Life Consortium [Wägele, W., Haszprunar, G., Eder, J., Xylander, W., Borsch, T., Quandt, D., Grobe, P., Pietsch, S., Geiger, M., Astrin, J., Rulik, B., Hausmann, A., Moriniere, J., Holstein, J., Krogmann, L., Monje, C., Traunspurger, W., Hohberg, K., Lehmitz, R., Müller, K., Nebel, M., Hand, R.] (2011 – continuously updated): GBOL Webportal, https://www.bolgermany.de

Gattoliat, J. L., Vinçon, G., Wyler, S., Pawlowski, J., & Sartori, M. (2016): Toward a comprehensive COI DNA barcode library for Swiss Stoneflies (Insecta: Plecoptera) with special emphasis on the genus *Leuctra*. - Zoosymposia, 11, 135-155.

Graf, W. (2010): Aktualisierte Check-Liste der Steinfliegen (Insecta: Plecoptera) Österreichs. – Lauterbornia, 71: 175-183.

Graf, W. & Schmidt-Kloiber, A. (2010): Taxonomie und Verbreitung von Steinfliegen – Plecoptera in Österreich. – Unterlagen zu „Taxonomie und Ökologie aquaitscher wirbelloser Organismen – TEIL VII", Eigenverlag.

Graf, W., Grasser, U. & Waringer, J. (2002): Trichoptera. Teile IIIA, IIIB, IIIC, IIID: 41 pp. – In: Moog, O. (Ed.), Fauna Aquatica Austriaca (2. Lieferung); Wien (Wasserwirtschaftskataster, Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft).

Graf, W., Hutter, G. & Schmidt-Kloiber, A. (2005): Ein Beitrag zur Kenntnis der Köcherfliegen (Trichoptera) Vorarlbergs. – Lauterbornia, 54: 53-61.

Graf, W., Konar, M., Muranyi, D., Orci., K. M. & Vitecek, S. (2014): A new species of *Isoperla* (Insecta, Plecoptera) from the Karawanken, with considerations on the Southern Limestone Alps as centers of endemism. – ZooKeys, 448: 27-36.

Graf, W., Lorenz, A., Tierno de Figueroa, J. M., Lücke, S., López-Rodríguez, M. J. & Davies, C. (2009): Distribution & ecological preferences of European freshwater organisms. Vol. 2: Plecoptera. – 262 pp.; Sofia-Moscow (Pensoft).

Graf, W., Murphy, J., Dahl, J., Zamora-Muñoz, C. & López Rodríguez, M. J. (2008): Distribution & ecological preferences of European freshwater organisms. Vol. 1: Trichoptera. – 388 pp.; Sofia-Moscow (Pensoft).

Hajibabaei, M., Shokralla, S., Zhou, X., Singer, G. A. C. and Baird, D. J. (2011): Environmental Barcoding: A Next-Generation Sequencing Approach for Biomonitoring Applications Using River Benthos. – PLoS ONE, 6(4): e17497.

Haslberger, A., Grünewald, T., Lichtmannecker, P., Heindel, R. & Segerer, A. H. (2012): Bemerkenswerte Schmetterlingsfunde aus Bayern im Rahmen des Projektes Barcoding Fauna Bavarica – 2. Beitrag (Insecta: Lepidoptera). – Nachrichtenblatt der bayerischen Entomologen, 61: 60-70.

Hausmann, A., Haszprunar, G. & Hebert, P. D. (2011): DNA barcoding the geometrid fauna of Bavaria (Lepidoptera): successes, surprises, and questions. – PLoS One, 6(2): e17134.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L. & deWaard, J. R. (2003a): Biological identifications through DNA barcodes. – Proceedings of the Royal Society London B, 270: 313-321.

Hebert, P. D. N., deWaard, J. R. & Landry, J. F. (2009): DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. – Biology Letters, 6: 359-362.

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, 270 (Supplement): 96-99.

Hendrich, L., Morinière, J., Haszprunar, G., Hebert, P. D. N., Hausmann, A., Köhler, F. & Balke, M. (2014): A comprehensive DNA barcode database for Central European beetles with a focus on Germany: Adding more than 3,500 identified species to BOLD. – Molecular Ecology Ressources, 15(4):795-818.

Hering, D., Johnson, R. K., Kramm, S., Schmutz, S., Szoszkiewicz, K. & Verdonschot, P. F. M. (2006): Assessment of European streams with diatoms, macrophytes, macroinvertebrates and fish: a comparative metric-based analysis of organism response to stress. – Freshwater Biology 51: 1757-1785.

Hering, D., Moog, O., Sandin, L. & Verdonschot, P. F. M. (2004): Overview and application of the AQEM assessment system. – Hydrobiologia, 516: 1-20.

Hoppeler, F., Shah, T., Devi, R., Shah, D. N., Jähnig, S. C., Tonkin, J. D., Sharma, S. & Pauls, S. U. (2016): Environmental and spatial characterisation of an unknown fauna using DNA sequencing–an example with Himalayan Hydropsychidae (Insecta: Trichoptera). – Freshwater Biology, 61(11), 1905-1920.

Huemer, P. (2014): DNA-Barcoding der Schmetterlinge (Lepidoptera) des zentralen Alpenraumes (Tirol, Südtirol) – Faunistische Neufunde. – Wissenschaftliches Jahrbuch der Tiroler Landesmuseen 7: 161-187.

Huemer, P. & Hebert, P. D. N. (2011): Cryptic diversity and morphology of high alpine *Sattleria* – a case study combining DNA barcodes and morphology (Lepidoptera: Gelechiidae). – Zootaxa, 2981: 1-22.

Huemer, P. & Hebert, P. D. N. (2015): DNA-Barcoding der Schmetterlinge (Lepidoptera) Vorarlbergs (Österreich) - Erkenntnisse und Rückschlüsse. – inatura - Forschung online, 15: 36 S.

Ibrahimi, H., Vitecek, S., Previšić, A., Kučinić, M., Waringer, J., Graf, W., Bálint, M., Keresztes, L. & Pauls, S. U. (2016): *Drusus sharrensis* sp. n. (Trichoptera, Limnephilidae), a new species from Sharr National Park in Kosovo, with molecular and ecological notes. – ZooKeys, 559: 107-124.

Jackson, J. K., Battle, J.M., White, B.P., Pilgrim, E. M., Stein, E. D., Miller, P. E. & Sweeney, B. W. (2014): Cryptic biodiversity in streams: a comparison of macroinvertebrate communities based on morphological and DNA barcode identifications. – Freshwater Science, 33: 312-324.

Johnson, M., Zaretskaya, I., Raytselis, Y., Merezhuk, Y., McGinnis, S. & Madden, T. L. (2008): NCBI BLAST: a better web interface. – Nucleic Acids Research, 36 (suppl 2): W5-W9.

Katoh, K. & Standley, D. M. (2013): MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. – Molecular Biology and Evolution, 30(4): 772-780.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., Buxton, S., Cooper, A., Markowitz, S., Duran, C., Thierer, T., Ashton, B., Meintjes, P. & Drummond, A. (2012): Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. – Bioinformatics, 28(12): 1647-1649.

Kim, S., Song, K.-H., Ree, H.-I. & Kim, W. (2012): A DNA Barcode Library for Korean Chironomidae (Insecta: Diptera) and Indexes for Defining Barcode Gap. – Molecules and Cells, 33(1): 9-17.

Kjer, K. M., Zhou, X., Frandsen, P. B., Thomas, J. A. & Blahnik, R. J. (2014): Moving toward species-level phylogeny using ribosomal DNA and COI barcodes: an example from the diverse caddisfly genus Chimarra (Trichoptera: Philopotamidae). – Arthropod Systematics & Phylogeny, 72(3): 345-354.

Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S. Y. & Guindon, S. (2012): PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. – Molecular Biology and Evolution, 29(6): 1695-1701.

Lenat, D. R. & Resh, V. H. (2001): Taxonomy and stream ecology – the benefits of genus- and species-level identifications. – Journal of the North American Benthological Society, 20(2): 287-298.

Malicky, H. (2004): Atlas of European Trichoptera. – 341 pp.; Dordrecht (Springer Netherlands).

Malicky, H. (2009): Rote Liste der Köcherfliegen Österreichs (Insecta, Trichoptera). – In: Zulka, K.P. (Ed), Rote Listen gefährdeter Tiere Österreichs. Checklisten, Gefährdungsanalysen, Handlungsbedarf. – Grüne Reihe des Lebensministeriums, 14/3: 319-359; Wien (Böhlau).

Moog, O. (Ed.) (1995): Fauna Aquatica Austriaca. Lieferung 1995. – Wien (Wasserwirtschaftskataster, Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft).

Moog, O. (Ed.) (2002): Fauna Aquatica Austriaca. Lieferung 2002. – Wien (Wasserwirtschaftskataster, Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft).

Moog, O. (Ed.) (2004): Fauna Aquatica Austriaca. Katalog zur autökologischen Einstufung aquatischer Organismen Österreichs. Teil V, Ergänzungen 2003. – Wien (Wasserwirtschaftskataster, Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft).

Moog, O., Graf, W., Janecek, B. F. U. & Ofenböck, T. (2004): Inventory of Sensitive taxa of Austrian rivers and streams. – in: Moog, O. (Ed.) (2004): Fauna Aquatica Austriaca. Katalog zur autökologischen Einstufung aquatischer Organismen Österreichs. Teil V, Ergänzungen 2003. – Wien (Wasserwirtschaftskataster, Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft).

Moretti, G. P. & Cianficconi, F. (1978): The *Sericostoma* Latr. genus in Italy. – Proceedings of the 2nd International Symposium on Trichoptera: 7-30; Dordrecht (Springer Netherlands).

Morinière, J., Hendrich, L., Hausmann, A., Hebert, P., Haszprunar, G. & Gruppe, A. (2014): Barcoding Fauna Bavarica: 78% of the Neuropterida fauna barcoded! – PloS ONE, 9(10): e109719.

Nelson, L. A., Wallman, J. F. & Dowton, M. (2007): Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. – Medical and Veterinary Entomology, 21(1): 44-52.

Pauls, S. U., Blahnik, R. J., Zhou, X., Wardwell, C. T. & Holzenthal, R. W. (2010): DNA barcode data confirm new species and reveal cryptic diversity in Chilean Smicridea (Smicridea) (Trichoptera: Hydropsychidae). – Journal of the North American Benthological Society, 29: 1058–1074.

Pentinsaari, M., Hebert, P. D. N. & Mutanen, M. (2014): Barcoding Beetles: A Regional Survey of 1872 Species Reveals High Identification Success and Unusually Deep Interspecific Divergences. – PLoS ONE 9(9): e108651.

Previšić, A., Graf, W., Vitecek, S., Kučinić, M., Balint, M., Keresztes, L., Pauls, S. U. & Waringer, J. (2014): Cryptic diversity of caddisflies in the Balkans: The curious case of *Ecclisopteryx* species (Trichoptera: Limnephilidae). – Arthropod Systematics & Phylogeny, 72: 309-329.

Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S. & Achaz, G. (2012): ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. – Molecular Ecology, 21(8), 1864-1877.

Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. (2007): BOLD: The Barcode of Life Data System (http://www. barcodinglife. org). – Molecular Ecology Notes, 7(3): 355-364.

Ratnasingham, S. & Hebert, P. D. N. (2013): A DNA-based registry for all animal species: The Barcode Index Number (BIN) System. – PLoS ONE 8: e66213.

Ravizza, C. & Ravizza-Dematteis, E. (1995): *Nemoura rivorum*, a new species of stonefly from the Northern Apennines (Plecoptera, Nemouridae). – Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft, 68(1-2): 153-158.

Resh, V. H., & Unzicker, J. D. (1975): Water quality monitoring and aquatic organisms: the importance of species identification. – Journal (Water Pollution Control Federation), 47(1): 9-19.

Saunders, G. W. (2009): Routine DNA barcoding of Canadian Gracilariales (Rhodophyta) reveals the invasive species Gracilaria vermiculophylla in British Columbia. – Molecular Ecology Resources, 9(s1): 140-150.

Schmidt-Kloiber, A. & Hering D. (2015): www.freshwaterecology.info - an online tool that unifies, standardises and codifies more than 20,000 European freshwater organisms and their ecological preferences. – Ecological Indicators, 53: 271-282.

Segerer, A. H., Grünewald, T. & Haslberger, A. (2012): Bemerkenswerte Schmetterlingsfunde aus Bayern im Rahmen des Projektes Barcoding Fauna Bavarica (Insecta: Lepidoptera). – Nachrichtenblatt der bayerischen Entomologen, 61: 2-11.

Smith, J. L. & Fonseca, D. M. (2004): Rapid assays for identification of members of the *Culex* (*Culex*) *pipiens* complex, their hybrids, and other sibling species (Diptera: Culicidae). – The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 70(4): 339-345.

Stamatakis, A. (2014): RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. – Bioinformatics, 30(9): 1312-1313.

Stein, E. D., Martinez, M. C., Stiles, S., Miller, P. E. & Zakharov, E. V. (2014): Is DNA Barcoding Actually Cheaper and Faster than Traditional Morphological Methods: Results from a Survey of Freshwater Bioassessment Efforts in the United States? – PLoS ONE 9(4): e95525.

Stubauer, I. & Moog, O. (1996): Gütebeurteilung österreichischer Fließgewässer mittels BMWP/ASPT - Ein Methodenvergleich mit dem Saprobiensystem. – Deutsche Gesellschaft für Limnologie (DGL), Tagungsbericht 1995: 622-626.

Truett, G. E., Heeger, P., Mynatt, R. L., Truett, A. A., Walker, J. A. & Warman, M. L. (2000): Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). – Biotechniques, 29(1): 52-54.

Umweltbundesamt [Stejskal-Tiefenbach, M., Rabitsch, W., Ellmauer, T., Schwaiger, E., Schwarzl, B., Gaugitsch, H. & Banko, G.] (2014): Biodiversitäts-Strategie Österreich 2020+ Vielfalt erhalten - Lebensqualität und Wohlstand für uns und zukünftige Generationen sichern! – 50 S.; Wien (Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt & Wasserwirtschaft).

Usseglio-Polatera, P., Bournaud, M., Richoux, P. & Tachet, H. (2000): Biomonitoring through biological traits of benthic macro-invertebrates: how to use species traits databases? – In: Jungwirth, M., Muhar, S. & Schmutz, S. (eds.): Assessing the Ecological Integrity of Running Waters. Hydrobiologia 422/423: 153-162.

Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., Gaboriaud, C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, G. H., Geniez, P., Pont, D., Argillier, C., Baudoin, J.-M., Peroux, T., Crivelli, A. J., Olivier, A., Acqueberge, M., Le Brun, M., Møller, P. R., Willerslev, E. & Dejean, T. (2016): Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. – Molecular Ecology 25: 929-942.

Verdonschot, P. F. M. (2000): Integrated ecological Assessment methods as a basis for sustainable catchment management. – In: Jungwirth, M., Muhar, S. & Schmutz, S. (eds.): Assessing the Ecological Integrity of Running Waters. – Hydrobiologia 422/423: 389-412.

Werblow, A., Flechl, E., Klimpel, S., Zittra, C., Lebl, K., Kieser, K., Laciny, A., Silbermayr, K., Melaun, C. & Fuehrer, H.-P. (2016): Direct PCR of indigenous and invasive mosquito species: a time- and cost-effective technique of mosquito barcoding. – Medical and Veterinary Entomology, 30(1): 8-13.

Wiemers, M. & Fiedler, K. (2007): Does the DNA barcoding gap exist? – a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). – Frontiers in Zoology, 2007, 4:8.

Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P. & Stamatakis, A. (2013): A General Species Delimitation Method with Applications to Phylogenetic Placements. – Bioinformatics, 29(22): 2869-2876.

Zhou, X., Frandsen, P. B., Holzenthal, R. W., Beet, C. R., Bennett, K. R., Blahnik, R. J., Bonada, N., Cartwright, D., Chuluunbat, S., Cocks, G. V., Collins, G. E., deWaard, J., Dean, J., Flint, O. S., Hausmann, A., Hendrich, L., Hess, M., Hogg, I. D., Kondratieff, B. C., Malicky, H., Milton, M. A., Moriniere, J., Morse, J. C., Mwangi, F. N., Pauls, S. U., Gonzalez, M. R., Rinne, A., Robinson, J. L., Salokannel, J., Shackleton, M., Smith, B., Stamatakis, A., St-Clair, R., Thomas, J. A., Zamora-Munoz, C., Ziesmann, T. & Kjer, K. M. (2016): The Trichoptera barcode initiative: a strategy for generating a species-level Tree of Life. – Philosophical Transactions of the Royal Society B, 371: 20160025.

ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: Inatura Forschung online

Jahr/Year: 2017

Band/Volume: 35

Autor(en)/Author(s): Vitecek Simon, Pauls Steffen U., Graf Wolfram

Artikel/Article: Barcoding der Köcherfliegen und Steinfliegen Vorarlbergs 1-16