

## DNA-Barcoding von Schmetterlingen – alpine Artenvielfalt neu bewertet

Peter HUEMER

In einem Zeitraum von etwa 5 Jahren wurden im Rahmen einer iBOL (International Barcode of Life Projekt) Kampagne mehr als 16.000 DNA-Barcodes von ca. 3400 Schmetterlingsarten aus dem Alpenraum erfolgreich sequenziert. Somit sind bereits etwa 60 % des Artenbestandes in der internationalen Referenzdatenbank gespeichert, wenn auch die innerartliche genetische Variationsbreite oft noch ungenügend bekannt ist. Erste integrativ-taxonomische Analysen belegen ein hohes Ausmaß an bisher übersehener, bereits bewiesener oder wahrscheinlicher kryptischer Diversität, die insbesondere kleinräumig verbreitete alpine Endemiten umfasst. So wurden mit Hilfe von DNA-Barcodes etwa 30 Arten mit direktem Bezug zur Kampagne „Lepidoptera of the Alps“ beschrieben. Umgekehrt konnten aber in der ersten Projektphase auch bereits bisher unbekannte Synonymien aufgedeckt werden. Besonders hervorzuheben ist schließlich der beachtliche Beitrag des DNA-Barcodings zur Erweiterung faunistischer Kenntnisse sowie zur Klärung phylogeographischer Probleme.

### **HUEMER P., 2015: DNA barcoding of butterflies and moths – alpine species diversity newly assessed.**

More than 16,000 DNA barcodes, covering approximately 3400 species of butterflies and moths from the Alpine region were sequenced within the framework of iBOL (International Barcode of Life Project) over a period of about 5 years. Thus, already a first barcode library was built up for about 60 % of the species inventory, although the intraspecific genetic variation is often insufficiently documented. First integrative-taxonomic analyses prove a high degree of hitherto overlooked or likely cryptic diversity, covering in particular locally distributed alpine endemics. So far about 30 species were described with the aid of DNA barcodes from material directly related to the campaign “Lepidoptera of the Alps”. Conversely, however, unknown synonymies were uncovered in the first project phase. Of further particular value is the significant contribution of DNA barcoding to faunistics and the method furthermore helped to explain phylogeographic problems.

**Keywords:** Lepidoptera, Alps, DNA barcoding, cryptic diversity, faunistic.

### **Einleitung**

In den letzten Jahren haben sich genetische Methoden, allen voran das DNA-Barcoding, auch in der Taxonomie etabliert. So werden zunehmend kurze genetische Sequenzen parallel zur klassischen morphologischen Determinationsarbeit zur Bestimmung von Arten herangezogen. Für die Unterscheidung von Eukaryoten hat sich hier eine Standardregion des mitochondrialen Cytochrom C-Oxidase-Gens als besonders geeignet erwiesen (HEBERT et al. 2003a, 2003b, 2009). Über die meistens arttypischen Barcode-Sequenzen können Arten reproduzierbar, zuverlässig und kostengünstig bestimmt werden. Grundvoraussetzung ist jedoch der Aufbau einer genetischen Referenzdatenbank verlässlich determinierter Proben möglichst vieler Arten. Die Erreichung dieses Ziels wird global im Rahmen der Initiative iBOL (International Barcode of Life – <http://ibol.org/>) vorangetrieben. Die ermittelten Barcodes sowie Objektdaten stehen über die am Biodiversity Institute of Ontario der Universität Guelph angesiedelte öffentliche Datenbank BOLD (Barcode of Life Data Systems – <http://www.boldsystems.org/>) der Scientific Community zur Verfügung (RATNASINGHAM & HEBERT 2007), inzwischen sind dies bereits fast 5 Mio. Barcodes von ca. 450.000 Arten.

Zahlreiche regionale und nationale Initiativen unterstützen die Ziele von iBOL. Auch die hier beschriebene Barcodingkampagne „Lepidoptera of the Alps“ ist als Teil der Bestrebungen zur Erstellung einer umfassenden genetischen Datenbank zu sehen und soll gleichzeitig auch die Entdeckung kryptischer Diversität fördern. Aus mehreren Gründen eignen sich Schmetterlinge besonders gut für ein Pilotprojekt: (i) hohe Popularität, (ii) Naturschutzrelevanz, (iii) „einfache“ morphologische Bestimmbarkeit, (iv) überdurchschnittlicher taxonomischer Bearbeitungsstand, (v) hohe Artendiversität (ca. 5500 Arten im Alpenraum) mit zahlreichen Relikten und/oder Endemiten, (vi) beachtliche Dichte an Amateurexperten, sowie (vii) vergleichsweise große Daten- und Sammlungsbestände. Die geographische Beschränkung auf die Alpen folgte pragmatischen Gründen. So verfügt die Projektleitung mit den Sammlungen der Tiroler Landesmuseen über den weltweit größten Bestand an Alpenschmetterlingen und der nötigen personellen Expertise und erwies sich daher als prädestiniert, die Koordination der Kampagne zu übernehmen. Die Felderhebungen sowie genetischen Untersuchungen wurden jedoch durch eine Vielzahl von Institutionen und Privatpersonen unterstützt und teilweise finanziell gefördert, u.a. durch die Autonome Provinz Bozen – Südtirol, Abteilung Bildungsförderung, Universität und Wissenschaft im Rahmen des Projektes „Erstellung einer DNA-Barcode-Bibliothek der Schmetterlinge des zentralen Alpenraumes (Autonome Provinz Bozen – Südtirol; Land Tirol)“, die *inatura* Erlebnis Naturschau Dornbirn sowie das Ontario Ministry of Research and Innovation mit Förderungen von Genome Canada über das Ontario Genomics Institute als Unterstützung des International Barcode of Life Projektes.

Die hier dargestellten vielversprechenden ersten Ergebnisse des Alpenbarcodings haben dazu geführt, Schmetterlinge als eine der 4 Pilotgruppen des für Österreich fundamental bedeutenden, vom Bundesministeriums für Wissenschaft, Forschung und Wirtschaft wesentlich mitgetragenen und unterstützen Barcodingprogrammes ABOL (>Austrian Barcode of Life – <https://www.abol.ac.at/>) auszuwählen. Diese von praktisch allen wichtigen mit Naturwissenschaften befassten Institutionen Österreichs unterstützte und vom Naturhistorischen Museum mitgetragene und koordinierte Initiative zielt letztlich auf eine umfassende genetische Erfassung der Biodiversität des Bundesgebietes. Im Rahmen des Pilotprojektes über Schmetterlinge sollen in Kombination mit Daten aus dem Alpenprogramm innerhalb von 3 Jahren von 60 % des Artenbestandes genetische Daten vorliegen, im Idealfall von 4 Proben aus unterschiedlichen Regionen. Die Durchführung dieses Teilprojektes obliegt wiederum den Tiroler Landesmuseen, in enger Kooperation mit verschiedenen Partnern, insbesondere dem Landesmuseum Kärnten.

## Material und Methodik

### Probenmaterial

Die genetischen Untersuchungen basieren größtenteils auf Sammlungsmaterial der Tiroler Landesmuseen und weiterer Institutionen, insbesondere der *inatura* Erlebnis Naturschau Dornbirn, dem Landesmuseum Kärnten und dem Naturmuseum Südtirol, sowie privater Sammlungen. Um den Erfordernissen späterer molekularer Untersuchungen gerecht zu werden, wurden im Rahmen umfassender Freilandbeprobungen frische Tiere aufgesammelt bzw. Material mit geringem Risiko degradiert DNA, also jüngere und nicht durch Feuchtigkeitseinwirkung (Aufweichen zu Präparationszwecken) beeinflusste, zumindest genadelte und getrocknete, teilweise auch klassisch präparierte Proben, ausgewählt. Die Objektwahl

orientierte sich in der Initialphase an einer möglichst umfassenden Abdeckung des Artenbestandes an Alpenschmetterlingen und berücksichtigte gleichzeitig schon bekannte oder vermutete taxonomische Problemfälle. Die Artbestimmung erfolgte teilweise bereits während der Felderhebungen bzw. später durch morphologische Analysen im Labor. Kritische Taxa wurden vielfach nur auf Gattungsniveau vorbestimmt und erst nach genetischer Zuordnung mit Hilfe bereits vorhandener Barcodes provisorisch auf Artniveau determiniert, jedoch im Anschluss morphologisch eingehend geprüft, in zweifelhaften Fällen auch genitalmorphologisch. Für alle Taxa liegen somit kongruente morphologische und genetische Determinationsgrundlagen vor.

Das Belegmaterial wurde etikettiert, georeferenziert und im Programm Biooffice digitalisiert sowie nach den Vorgaben von BOLD photographisch dokumentiert. Schließlich wurden von den Belegtieren Gewebeproben (Bein oder Teil eines Beines) entnommen und auf Standardplatten von jeweils 95 Proben verteilt und für die weiteren genetischen Arbeitsschritte an das Canadian Center for DNA Barcoding (CCDB) der Universität Guelph (Ontario, Kanada) versendet. Insgesamt wurden von September 2010 bis April 2015 ca. 17.000 Proben von ca. 3500 Arten nach diesen Vorgaben für die DNA-Analysen vorbereitet.

Während die Referenztiere in den jeweiligen Sammlungen verbleiben, werden die Gewebeproben bzw. DNA-Extrakte als Dauerleihgabe an der Universität Guelph aufbewahrt.

### **DNA-Sequenzierungen**

Die DNA Isolation, PCR Amplifikation sowie DNA-Sequenzierungen erfolgten am CCDB nach den bei DEWAARD et al. (2008) beschriebenen Standardprotokollen. Mit Hilfe dieser Methoden wurde eine 658 Basenpaare umfassende Region des COI-Gens sequenziert, in der die 648 Basenpaare des Standard-Barcodes beinhaltet sind.

### **Datenverwaltung und Analyse**

Sämtliche objektspezifischen Daten sowie Barcode-Sequenzen und zugehörige „Trace Files“ (Elektropherogramme der Sequenzierungen, die der Qualitätskontrolle dienen) werden im Rahmen der webbasierten Datenbank BOLD verwaltet und sind dort in unterschiedlichen Projekten zusammengefasst. Die objektspezifischen Daten wie geographische Parameter, Sammeldaten, Aufbewahrungsort und Belegfoto werden in einer „Specimen Page“ verwaltet, die damit verbundenen genetischen Informationen in der zugehörigen „Sequence Page“. Die Datenbank BOLD ermöglicht aber darüber hinaus auch umfassende Analysen und Auswertungen der genetischen Daten unter Beiziehung von Fremddaten aus anderen Projekten.

## **Ergebnisse – Diskussion**

### **Barcode-Bibliothek – Artdifferenzierung**

In etwa 5 Jahren wurden über 16.000 DNA-Barcodes von ca. 3400 Schmetterlingsarten aus dem Alpenraum erfolgreich sequenziert. Somit sind etwa 60 % des Artenbestandes von Österreich in zumindest einer Sequenz erfasst. Die Erfolgsquote der Sequenzierungen erwies sich dank der hohen Qualität des Probenmaterial als groß, bei frisch aufgesammelten Tieren erreichte sie ca. 99 %.

Bisherige unveröffentlichte, auf Grund des Stichprobenumfangs noch als präliminär zu sehende, Auswertungen der Barcode-Bibliothek alpiner Schmetterlinge belegen eine durchschnittliche interspezifische Distanz zum bisher bekannten nächsten Nachbarn von etwa 8%, jedoch eine innerartliche Divergenz von nur etwa 0,4%. Die untersuchten Arten lassen sich somit auf Grund der signifikant geringeren inner- versus zwischenartlichen Divergenz meistens sicher unterscheiden und DNA-Barcoding erweist sich demnach für Schmetterlinge als hervorragende Methode zur Art differenzierung. So weisen HUEMER & HEBERT (2015) bei einer Stichprobe von knapp 1500 Arten aus Westösterreich unter Beiziehung weiterer Daten aus BOLD eine eindeutige Wiederkennungsrate von 98,7% des sequenzierten Artenbestandes nach. Die vereinzelt Fälle von identen oder überlappenden Barcodes beziehen sich fast ausnahmslos auf phylogenetisch sehr nahestehende oder auf taxonomisch kritische Artenkomplexe (HAUSMANN et al. 2011, HEBERT et al. 2003b).

### Kryptische Diversität

DNA-Barcoding ermöglicht, dank der zunehmend umfassenden und die innerartliche genetische Variationsbreite berücksichtigenden Datenbank BOLD, erstmals den raschen und einfachen überregionalen Vergleich großer Artenbestände. Dies trägt wesentlich dazu bei, potentielle kryptische Artenkomplexe zu erkennen (HUEMER et al. 2014, MUTANEN et al. 2012). Durch einen integrativ-taxonomischen Ansatz und die damit einhergehende Bewertung beispielsweise morphologischer Merkmale sowie teilweise die Berücksichtigung weiterer Gene konnte so im Rahmen der Alpenkampagne eine Vielzahl von neuen Arten entdeckt werden. Insgesamt wurden seit 2011 etwa 30 Schmetterlingsarten mit Hilfe von Barcodes aus der Alpenkampagne beschrieben (z. B. HUEMER & HEBERT 2011, HUEMER & MUTANEN 2015) und eine größere Anzahl von noch unbenannten kryptischen Arten ist bereits taxonomisch abgesichert. Im Gegenzug wurden aber auch bislang unerkannte Synonymien erkannt. Neue Methoden wie Next Generation Sequencing sollen die Vielzahl noch ungeklärter Problemfälle, beispielsweise tiefer Barcode-Divergenzen ohne offensichtliche morphologische Differenzierung, klären. Neben echten kryptischen Arten spielen hier auch potenzielle Fehlinterpretationen durch z. B. Introgression, Pseudogene, genetischer Polymorphismus oder *Wolbachia*-Infektionen eine bedeutende Rolle, die es jedoch im Einzelfall zu klären gilt.

### Faunistik und Phylogeographie

DNA-Barcoding der Alpenschmetterlinge hat über diverse Feldforschungsprogramme zu einer erheblichen Verbesserung der Kenntnisse regionaler Faunenzusammensetzungen geführt. So wurden alleine für das Bundesland Tirol bzw. Südtirol insgesamt etwa 80 Arten erstmals entdeckt und mittels DNA-Barcodes bestimmt. Einige Arten sind Neufunde für größere Gebiete wie Österreich oder Italien und vereinzelt wurden sogar Erstnachweise für den gesamten Alpenbogen gemacht, darunter als unveröffentlichte Beispiele *Elachista deriventa* aus Nordtirol und *Chrysoclista abchasica* aus Südtirol. Als mediales Highlight gilt Heckford's Zwergminierfalter (*Ectoedemia heckfordi*) aus Vorarlberg, ein Art die bislang als Endemit Südenglands gegolten hatte. Die Verbreitung von Arten kann nunmehr besser und zuverlässiger erfasst werden und DNA-Barcoding kann hier auch wichtige Daten zur Klärung phylogeographischer Fragestellungen liefern wie u.a. der Fall des Hopfenwurzelbohrers (*Hepialus humuli*) zeigt (SIMONSEN & HUEMER 2014).

## Literatur

- DE WAARD J.R., IVANOVA N.V., HAJIBABAEI M. & HEBERT P.D.N., 2008: Assembling DNA Barcodes: Analytical Protocols. In CRISTOFRE M (Ed): Methods in Molecular Biology. Environmental Genetics. Humana Press Inc., Totowa, USA, 275–293.
- HAUSMANN A., HASZPRUNAR G. & HEBERT P.D.N., 2011: DNA barcoding the geometrid fauna of Bavaria (Lepidoptera): Successes, surprises, and questions. PLoS ONE 6 (2), e17134. doi:10.1371/journal.pone.0017134.
- HEBERT P.D.N., CYWINSKA A., BALL S.L. & DE WAARD J.R., 2003a: Biological identifications through DNA barcodes. – Proceedings of the Royal Society London B 270, 313–321.
- HEBERT, P.D.N., RATNASINGHAM, S. & DE WAARD, 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.
- HEBERT P.D.N., DE WAARD J.R. & LANDRY, J.-F., 2009: DNA barcodes for 1/1000 of the animal kingdom. – Biology Letters 6, 359–362. doi: 10.1098/rsbl.2009.084.
- 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, Nr. 15, 36 S.
- HUEMER P. & MUTANEN M., 2015: Alpha taxonomy of the genus *Kessleria* Nowicki, 1864, revisited in light of DNA-barcoding (Lepidoptera, Yponomeutidae). Zookeys 503, S. 89–133. doi:10.3897/zookeys.503.9590.
- MUTANEN M., HAUSMANN A., HEBERT P.D.N., LANDRY J.-F., DE WAARD J.R. & HUEMER P., 2012: Allopatry as a Gordian knot for taxonomists: Patterns of DNA barcode divergence in arctic-alpine Lepidoptera. PLOS ONE 7(10), e47214. doi:10.1371/journal.pone.0047214.
- RATNASINGHAM S. & HEBERT P.D.N., 2007: BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). Molecular Ecology Notes 7, S. 355–364. doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x.
- SIMONSEN TH. J. & HUEMER P., 2014: Phylogeography of *Hepialus humuli* (L.) (Lepidoptera: Hepialidae) in Europe: short distance vs. large scale postglacial expansions from multiple Alpine refugia and taxonomic implications. Insect Systematics & Evolution (2014), 41 S.

### Anschrift:

Mag. Dr. Peter HUEMER, Naturwissenschaftliche Sammlungen, Tiroler Landesmuseen Betriebsges. m. b. H., Feldstraße 11a, A-6020 Innsbruck.  
E-Mail: p.huemer@tiroler-landesmuseen.at



# ZOBODAT - [www.zobodat.at](http://www.zobodat.at)

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Verhandlungen der Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Wien. Frueher: Verh.des Zoologisch-Botanischen Vereins in Wien. seit 2014 "Acta ZooBot Austria"](#)

Jahr/Year: 2015

Band/Volume: [152](#)

Autor(en)/Author(s): Huemer Peter

Artikel/Article: [DNA-Barcoding von Schmetterlingen - alpine Artenvielfalt neu bewertet 161-165](#)