

Das Projekt Barcoding Fauna Bavarica: Monitoring von Bestandsveränderungen und Einwanderungen von Insekten in Bayern

Axel Hausmann

Zusammenfassung

Mit knapp 30000 Arten stellen Insekten ca. 80 % der Fauna Bayerns. Sie besiedeln die unterschiedlichsten Lebensräume und ökologischen Nischen. Aufgrund des hohen Anteils stenöker Arten sind sie als Indikatoren für Umweltveränderungen hervorragend geeignet. Das Monitoring wird jedoch erschwert durch (1) meist schwierige Bestimmbarkeit der Arten und mangelnde verfügbare Expertise und (2) den erforderlichen Zeitaufwand angesichts der immensen anfallenden Individuen- und Artenzahlen. Daher wurde Insektenmonitoring bisher zumeist auf Tagfalter, Heuschrecken und Libellen beschränkt, die jedoch in Bayern nur ca. 1 % der Insektenarten ausmachen. Das Problem kann durch das DNA-Barcoding, der Artermittlung per DNA-Sequenz (COI-5'-Gen), überwunden werden. Seit 2009 wurden an der Zoologischen Staatssammlung München im Projekt »Barcoding Fauna Bavarica« für 20000 bayerische Tierarten (57 %) derartige DNA-Barcodes erstellt und in einer internationalen online-Datenbank hinterlegt. So konnten für Mitteleuropa 6, für Deutschland 26 und für Bayern 60 neue Schmetterlingsarten nachgewiesen werden, bei den Haut- und Zweiflüglern liegen die Neunachweise in einem noch wesentlich höheren Bereich. Aus Massenproben können durch die neu entwickelte Methode des »Next-Generation-Sequencing« (NGS) nunmehr schnell, kostensparend und verlässlich die enthaltenen Tierarten in einem einzigen Analysegang identifiziert werden. Die Effizienz und Verlässlichkeit der NGS-Analyse zeigte sich bereits in einem Pilotprojekt (Frühwarnsystem für invasive und forstrelevante Arten in Bayern; Projekt »German Barcode of Life«).

Summary

**The project Barcoding Fauna Bavarica:
monitoring of population changes and range extensions of insects in Bavaria**

The insect fauna of the state of Bavaria comprises some 30000 species (about 80 % of Bavaria's fauna). Insects live in all types of habitats and ecological niches. A high percentage of the species have narrow niche requirements, making them good indicators of environmental change. Monitoring of insects, however, is hampered by difficult species identification, a lack of taxonomists, and immensely time-consuming workflows, especially considering the huge numbers of individuals and species from bulk samples. Insect monitoring has therefore been largely restricted to butterflies, grasshoppers, and dragonflies. These easily identifiable groups, however, make up just 1 % of the Bavarian insect fauna. The problem can be overcome by DNA barcoding, i. e., by species identification through a sequence in the mitochondrial COI 5' gene. As part of the "Barcoding Fauna Bavarica" project, which began in 2009, the Bavarian State Collections of Zoology have produced DNA barcodes for 20000 species, all deposited and accessible in an international online database. Up to now, six new lepidopteran (moth) species for Central Europe, 26 new species for Germany, and 60 new species for Bavaria, and even higher numbers of hymenopteran and fly species have been discovered. The recently developed method of Next-Generation Sequencing (NGS) allows the identification of numerous species from a single sample. The efficiency and reliability of NGS analyses was demonstrated in a pilot project (early warning system for invasive and pest-relevant species; project "German Barcode of Life").

✉ Dr. Axel Hausmann, SNSB – Zoologische Staatssammlung München, Sektion Lepidoptera, Münchhausenstraße 21, 81247 München; axel.hausmann@zsm.mwn.de

Einführung

Zu Beginn möchte ich kurz an die Nuklearkatastrophe von Fukushima im März 2011 erinnern. Angesichts des Entweichens von Radioaktivität stand man vor einer doppelten Herausforderung: Erstens musste man die Situation rasch und verlässlich erkennen und verstehen und zweitens musste man Maßnahmen ergreifen, um schnell und nachhaltig zu einer Lösung des Problems zu kommen (was nicht unbedingt gelungen ist). Ähnlich war es bei der Explosion der Ölbohrplattform Deepwater Horizon im April 2010: Man musste erstens schnell die Situation erfassen und zweitens die richtigen Maßnahmen ergreifen.

Damit will ich auf unser heutiges Thema, die Artenvielfalt, die Biodiversität, überleiten: Wir stehen vor einer weiteren Katastrophe, wenn dies auch nicht in ähnlicher Weise wie bei anderen Katastrophen in den Medien transportiert wird. Wir stehen vor einem dramatischen Verlust an Biodiversität weltweit (MA 2005, de Vos et al. 2015). Die Ursachen sind in erster Linie anthropogen bedingt, die Hauptursache ist die Zerstörung der Lebensräume (Brooks et al. 2002, Fahrig 2003).

Artenvielfalt in Bayern

Wie sieht es mit der Biodiversität in Bayern aus? Kennen wir überhaupt die Artenvielfalt in unserem Heimatland? Ich habe versucht, auf der ansonsten sehr guten Internetpräsenz des Bayerischen Landesamtes für Umwelt herauszufinden, wie viele Tierarten es in Bayern gibt, habe aber keine Gesamtartenzahl gefunden. In einem Nebensatz zur Einleitung der »Roten Liste« des Bayerischen Umweltministeriums wird die Zahl grob auf 30 000 bis 35 000 vielzellige Tierarten geschätzt (LfU 2003). In der Broschüre »Bayern Arche: Artenschutzbericht Bayern« (BStMUG 2010) steht auf S. 94: »In Bayern konnte bis heute knapp die Hälfte (16 000 Arten aus 56 Tierartengruppen) der etwa 37 000 heimischen Tiere in den Roten Listen nach ihrer Gefährdung beurteilt werden.« Dies bedeutet, dass wir in Bayern etwa 80 % der für Deutschland vom Bundesamt für Naturschutz veranschlagten »Metazoa«-Zahl von 44 800 haben (vgl. Völkl & Blick 2004). Wie verteilt sich diese Zahl auf die unterschiedlichen Tiergruppen? In Bayern gibt es 3 200 Schmetterlingsarten (Lepidoptera; Haslberger & Segerer

2016), ca. 5 500 Käferarten (Coleoptera; LfU 2003), 8 000–9 000 Hautflüglerarten (Hymenoptera) und 9 000–10 000 Arten von Zweiflüglern (Diptera; Fliegen und Mücken); bei den letzten beiden Gruppen ist die Dunkelziffer und damit der Forschungsbedarf besonders groß. Weiter gibt es noch ca. 2 500 sonstige Insektenarten, zu denen z. B. die Wanzen (Heteroptera) gehören – was bedeutet, dass 80 % der Tierarten Bayerns Insekten sind (Abb. 1). Auch von den restlichen 20 % entfallen sehr viele auf Gliedertiere, v. a. auf Spinnen (Arachnida) und z. B. auf Tausendfüßer (Myriapoda; Hundert-, Wenig-, Zwerg- und Doppelfüßer). Dazu kommen z. B. Weichtiere (Mollusca); nur ca. 1 % der Tierarten Bayerns sind Wirbeltiere.

Letztere (v. a. Fische, Vögel, Säuger, z. B. Fledermäuse) werden dennoch häufig in Gutachten und Umweltstudien als Indikatorgruppen verwendet; innerhalb der Insekten sind die am häufigsten für diese Zwecke verwendeten Tiergruppen die Tagfalter (Rhopalocera, 0,5 % der bayerischen Insektenfauna), die Heuschrecken (Orthoptera/Saltatoria, 0,2 %) und die Libellen (Odonata, 0,2 %). Hier müssen wir uns fragen, ob wir es uns leisten können, die restlichen immensen Artenzahlen von Insekten unberücksichtigt zu lassen obwohl sie durch ihre breite Einnischung als Indikatoren hervorragend geeignet wären. Tun wir wirklich genug, um unsere Umwelt zu erfassen und Veränderungen in ihr zu überprüfen? Ein afrikanischer Kollege hat sich in einem Kongressbeitrag kürzlich beklagt, dass sich alle immer nur um die »big five« kümmern, während das Gebot der Stunde eigentlich wäre, sich intensiv mit den 500 000 kleinen Arten zu befassen. Übertragen auf die Fauna von Bayern könnte man fragen: Ist es wirklich genug, dass wir uns um die »easy four« kümmern? Diese vier Gruppen (Wirbeltiere, Tagfalter, Heuschrecken, Libellen) sind leicht zu erfassen, da viele Vertreter dieser Gruppen tagaktiv und vergleichsweise leicht zu identifizieren sind – aber genügt das wirklich als Kriterium?

Erfassung der Artenvielfalt: Methoden und ihre Grenzen

Die Verfügbarkeit von Naturführern (deren großen Wert ich keinesfalls bezweifeln will) darf uns nicht darüber hinwegtäuschen, dass die Vertreter der allermeisten Insektengruppen bei ihrer Iden-

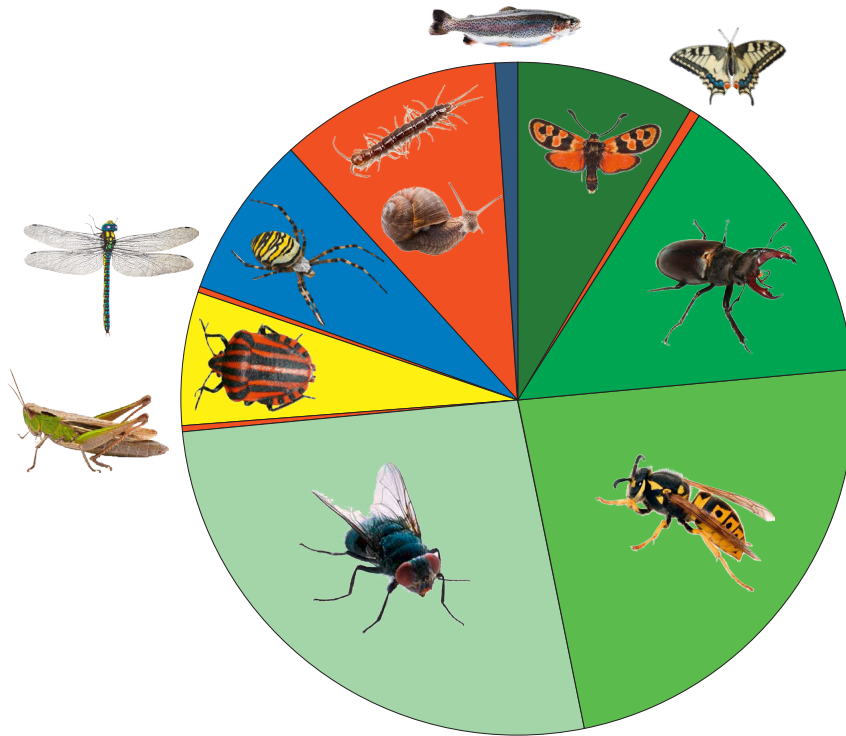


Abb. 1. Zusammensetzung der Fauna Bayerns nach Großgruppen. Die für Umweltgutachten häufig herangezogenen Tagfalter, Heuschrecken und Libellen machen zusammen nur ca. 1 % der bayerischen Insektenfauna aus. – Daten auf Basis eigener Erkenntnisse aus dem BFB-Projekt; Schmetterlinge vgl. auch Haslberger & Segerer (2016), Käfer, Heuschrecken, Libellen, Wirbeltiere vgl. LfU (2003).

tifizierung erhebliche Probleme bereiten. Das betrifft v.a. die vielen »kleinen, hässlichen und schwarzen, grauen oder braunen« Arten (Abb. 2). Diese Schwierigkeit führt viele Kollegen dazu, ihre Forschung gar nicht auf die Artenebene zu stützen, sondern sich auf Biomasseforschung, Modellberechnungen, Computersimulationen oder Ökosystem-Funktionsanalysen zu beschränken. Dies hat alles seine Berechtigung – aber »artfreie« Analysen als »Biodiversitätsforschung« zu titulieren, ist Etikettenschwindel. Ich behaupte vielmehr, man muss die Erforschung unserer Artenvielfalt und das Monitoring auf die Artenebene stützen. Es gibt den bekannten Ausspruch »Man kann nur lieben, was man kennt«, der auf den Kirchenlehrer Augustinus zurückgeht (de Trinitate, X. Buch). Auf unsere Natur bezogen bedeutet dies: Ohne Artenkenntnis kann man die Natur weder schützen noch schätzen.

Die Hauptprobleme bei der Identifizierung von Arten betreffen auf der Objektebene den Le-

benszyklus, das Geschlecht und die Probenform und auf Seiten des Bearbeiters den jeweiligen taxonomischen oder geografischen Fokus und die zur Verfügung stehenden Zeitressourcen.

- **Lebenszyklus:** Die allermeisten Insektenarten sind im Ei- oder Larvenstadium so gut wie unbestimmbar. Zur vollständigen Bestimmung bedarf es bei vielen Arten der Zucht zum adulten Stadium. Es gibt aber auch umgekehrt Spezialfälle, nämlich dass zwei Schmetterlingsarten im adulten Stadium auch von Spezialisten nicht voneinander zu unterscheiden sind. Hier muss man die jeweilige Raupenfutterpflanze kennen, um die Arten unterscheiden zu können (Abb. 3a).
- **Geschlecht:** Die Vertreter vieler Insektengruppen sind nur im männlichen Geschlecht durch Spezialuntersuchungen bestimmbar. Auch bei den Schmetterlingen gibt es Fälle, in denen Weibchen unbestimmbar sind, z. B. im Schwesterartenpaar *Chlorissa viridata* und

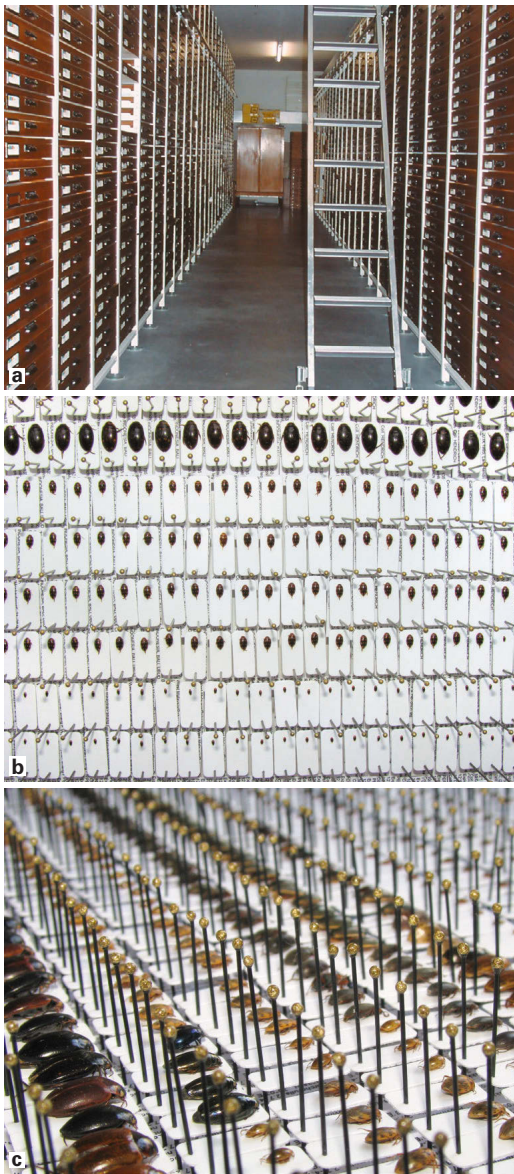


Abb. 2. Blick in die Sammlungsräume der Zoologischen Staatssammlung München (a) und Sammlungsausbeuten von Wasserkäfern (b,c) als Beispiel für schwer zu bestimmende Arten. – Fotos: ZSM.

C. cloraria (Spanner, Geometridae; Abb. 3b).

- Probenform: Die meisten Arten lassen eine Bestimmung nur anhand eines kompletten Individuums zu. Falls jedoch nur Teilstücke oder Fäzes vorliegen, ist es i. d. R. unmöglich, die Art zu bestimmen. Um z. B. festzustellen,

welche Insekten auf der Frontseite eines ICE oder auf den Rotorblättern einer Windkraftanlage verwendet sind, reichen die herkömmlichen Bestimmungsmethoden nicht.

- Taxonomischer Fokus: Die Experten sind in der Regel auf eine begrenzte Anzahl von Taxa spezialisiert. Ein Käferforscher z. B., der Milben bestimmen soll, hat keine Chance. Er kann durchaus auch in dem ihm fachfremden Feld der Schmetterlinge an seine Grenzen stoßen, wenn er z. B. entscheiden soll, ob zwei Extremformen noch zur gleichen Art gehören oder nicht (Abb. 3c).
- Geografischer Fokus: Hinzu kommt, dass Experten in der Regel auf eine bestimmte geografische Region spezialisiert sind. Beispielsweise gibt es keinen Experten für mitteleuropäische Samtmilben (Acari, Trombidiformes; 1000 Arten in Deutschland), lediglich eine ausländische Spezialistin, deren Expertise weitgehend auf Osteuropa beschränkt ist.
- Kapazität (Zeit, Menge): Da sich stets nur eine bestimmte Anzahl von Individuen innerhalb einer gewissen Zeit durch Experten bestimmen lassen, kommen wir Spezialisten bei der Bearbeitung von Massenproben sehr schnell an unsere Grenzen. Dies erschwert v. a. die Untersuchung von Ausbeuten aus Malaise-Fallen (s. unten: XXL-Biomonitoring).

Angeichts dieser Herausforderungen fühlen wir uns oft wie ein Esel, der einen LKW ziehen soll. Es stellt sich die Frage: Sollen/können wir mehr Esel einspannen oder gibt es eine alternative Lösung in Form einer verbesserten Technik?

Art-Identifizierung durch DNA-Barcoding

Erlauben Sie mir zu Beginn einen kurzen Exkurs in die Geschichte der Naturwissenschaften. Astronomen beobachteten um 1850 den Himmel mit großen Fernrohren. Heute, 170 Jahre später, stehen uns hierfür gigantische Spiegel- oder Radioteleskope oder sogar Weltraumteleskope zur Verfügung. Auch in der klassischen Physik und in der Chemie hat ein Labor vor 170 Jahren nichts mehr mit unseren heutigen Forschungseinrichtungen zu tun, wenn Sie z. B. an Großgeräte wie den Teilchenbeschleuniger am Europäischen Kernforschungszentrum CERN bei Genf denken oder an neueste NMR-Spektrometer zur chemi-

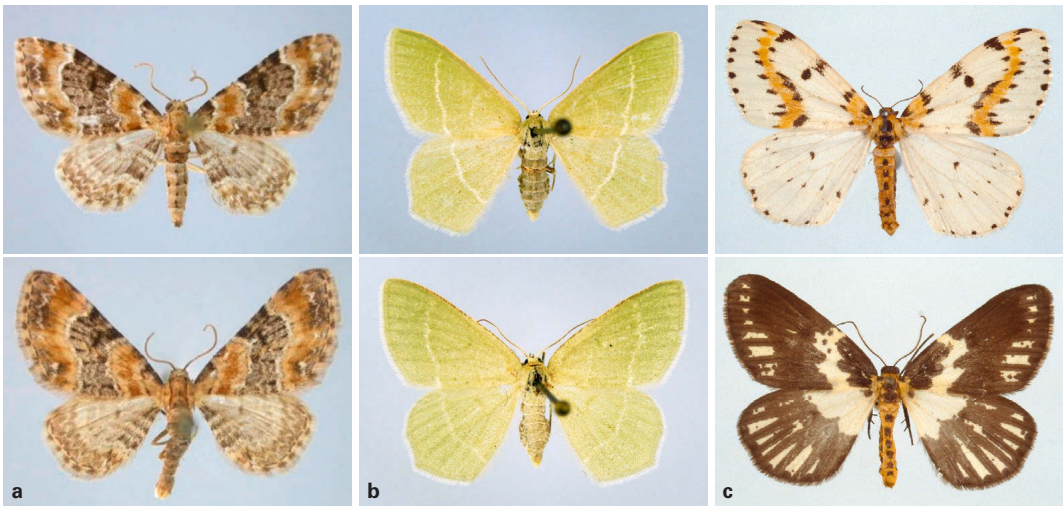


Abb. 3. Beispiele für schwer bestimmbare Schmetterlingsarten: **a**, adulte Tiere von *Eupithecia pulchellata* (oben), und *Eupithecia pyreneata* (unten): Die Bestimmung erfolgt über die Raupenfutterpflanze; **b**, Adulte von *Chlorissa viridata* (oben) und *C. cloraria* (unten): Bestimmung nur durch Vergleich der männlichen Geschlechtsorgane möglich; **c**, Extremformen adulter Stachelbeerspanner (*Abraxas grossulariata*): Bestimmung durch Experten. – Fotos: ZSM.

schen Strukturaufklärung. Aber in der Biologie ist zwischen dem Arbeitszimmer von Charles Darwin von 1850 und dem von E. O. Wilson, einem der namhaftesten Biologen heutiger Zeit, kein allzu großer Unterschied festzustellen, mit Ausnahme eines etwas moderneren Lichtmikroskops am Schreibtisch. Ist etwa in der Biologie die Zeit an uns vorbeigelaufen? Ich meine nicht. In allen sechs der o. g. Problemfelder schafft die molekulare Identifizierung, das DNA-Barcoding, die Lösung, es funktioniert über alle diese Grenzen hinweg.

Die Idee geht zurück auf den kanadischen Wissenschaftler Paul Hebert, der 2003 vorgeschlagen hat, für genetische Identifizierungen von Arten ein kurzes, standardisiertes Genfragment des COI-Gens, zu benutzen (Hebert et al. 2003). Es handelt sich um ein »Wort« mit 658 Basenpaaren (»Buchstaben«; Abb. 4). Seine grafische Darstellung erinnert sehr an den Strichcode zur Erkennung von Waren im Supermarkt, daher der Name »DNA-Barcode«.

In den letzten 10–15 Jahren sind weltweit in einer einzigartigen Initiative über 5 Mio. solcher Barcodes für Tiere, Pflanzen und Pilze erstellt worden, mit großen Flaggschiff-Projekten in Kanada und Bayern. Alle diese Barcodes sind in einer übers Internet öffentlich zugänglichen

Datenbank hinterlegt.¹ Eine weitere wesentliche Eigenart dieses Projekts ist, dass alle Barcodes nicht nur fotografisch dokumentiert, sondern auch mit einem Belegexemplar in Sammlungen verknüpft sind. Etwa 250 000 dieser Belegexemplare liegen in der Zoologischen Staatssammlung München, die insgesamt über 25 Mio. Exemplare umfasst (vgl. Abb. 2).

Als wir an der ZSM im Jahr 2009 mit Unterstützung des Bayerischen Wissenschaftsministeriums das Projekt »Barcoding Fauna Bavarica« (BFB) starten konnten,² war es unser ehrgeiziges Ziel, für alle gut 35 000 Arten Bayerns aus vier verschiedenen Regionen jeweils eine solche DNA-Sequenz zu ermitteln (Haszprunar 2009). Jetzt, neun Jahre später, haben wir einen Erfassungsgrad von 57 % der Gesamtfaua erreicht. Die für Deutschland erfassten Arten nach Großgruppen zeigt Abbildung 5. Die Schmetterlinge (Lepidoptera) und die Stechimmen (Bienen/Wespen) sind komplett erfasst (Hausmann et al.

1 Barcode of Life Data Systems (BOLD): www.barcodinglife.com [zuletzt aufgerufen am 26.10.17].

2 Barcoding Fauna Bavarica (BFB): www.barcoding-zsm.de [zuletzt aufgerufen am 26.10.17], gefördert durch das Bayerische Staatsministerium für Bildung und Kultus, Wissenschaft und Kunst.



AACATTATACTTTATTTTGGAGTTTGAGCAGGAATAGTAGGAACATCAT
TAAGAATTCTAATTCGTATAGAATTGAGAACCCTGGATCATTAAATTG
GAGATGATCAAAATTTATAATACTATCGTTACAGCTCATGCATTAT
TATAATTTTTTTTATAGTTATACCCATTATAATCGGAGGGTTTGGTAA
CTGATTAGTTCCTTTAATATTAGGAGCACCTGACATAGCCTTCCC
TCGATTAAATAATATAAGATTCTGATTATTACCTCCATCATTGATT
TACTAATTTCTAGAAGAATTGTAGAAAATGGAGCAGGAACAGGAT
GAACAGTTTATCCCCACTTTTCATCTAATATTGCACACAGAGGATC
TTCTGTAGATTTAGCAATTTTCTCTCTTCATTTAGCTGGGATTTT
TTCAATTTTAGGAGCAATTAATTTTATTACAACATCATTAATATAC
GAGTAAATAATTTATCCTTTGATCAAAATCATTATTTTATTTGAGCAG
TAGGAATTACAGCATTATTATTACTTTTATCTTTACCTGTATTAGCTG
GAGCAATTACTATATTATTAACATGATCGAAACCTCAATACCTCATT
TTTGATCCAGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATCAACATTTATTT



Abb. 4. Ausschnitt aus dem COI-Gen (cox1-Gen) (hier des Hauhechel-Bläulings *Polyommatus icarus*), das für das DNA-Barcoding verwendet wird (oben), und grafische Darstellung eines COI-Genabschnitts als Strichcode. – Foto: ZSM; Daten aus BOLD Data Systems.

2011; Schmidt et al. 2015), bei den großen Gruppen der Käfer (Coleoptera) und der Zweiflügler (Diptera; »Fliegen/Mücken«) liegen wir bei einem Abdeckungsgrad von etwa 60 % (Hendrich et al. 2015), bei einigen weiteren wichtigen Insektengruppen zwischen 65 und 85 % (Morinière et al 2014, 2017a).

Ergebnisse aus dem Projekt »Barcoding Fauna Bavarica« (BFB)

Alle unsere DNA-Barcodes werden im Rahmen großer Data-Releases (z. B. Schmetterlinge: Hausmann et al. 2011; Käfer: Hendrich et al. 2015; Bienen: Schmidt et al. 2015, Wasserinsekten: Morinière et al. 2017a u. v. m.) öffentlich zugänglich gemacht. Eine Besonderheit gibt es bei den Zweiflüglern (Diptera). An der ZSM

(D. Doczkal, J. Morinière et al.) wird derzeit eine Publikation mit dem Titel »Barcoding in the Dark« vorbereitet, was sich auf die Tatsache bezieht, dass wir bei vielen Dipterengruppen, z. B. bei den Gallmücken (Cecidomyiidae), im Stadium der Sequenzierung der Gewebeproben noch wenig über die wissenschaftlichen Artnamen wissen. So konnten wir bei der Einreichung der Proben nur neun bayerische Arten benennen, aber die DNA-Analyse ergab dann 900 Arten, die bisher nur über ihre BIN (barcode index number) registriert sind. Aus jedem genetischen Cluster wird nun ein Belegexemplar an einen (bezahlten) Spezialisten geschickt und wir hoffen, auf diese Weise die gesamte Referenzbibliothek kalibrieren zu können.

Für die Schmetterlinge konnten Haslberger & Segerer (2016) eine revidierte systematische

Tab. 1. Artenzahlen von Schmetterlingen in den vier naturräumlichen Hauptregionen und in Gesamtbayern. AVA: Alpen und Alpenvorland; TS: Tertiär-Hügelland und Schotterebene nordwärts bis zum Donautal; SL: Schichtstufenland im Norden und Nordwesten; OG: Ostbayerisches Grundgebirge. – Aus Haslberger & Segerer (2016).

Faunistischer Status	AVA	TS	SL	OG	Bayern
Bodenständige Arten	2290	2523	2738	2346	3138
Arealerweiterer	8	10	11	9	15
Neozoa (etabliert)	14	28	26	21	34
Zuwanderer	33	39	38	26	45
Status unklar	2	8	11	6	11
Gesamt	2347	2608	2824	2408	3243
Davon rezent	1729	2050	2217	1779	2815
% Defizit von Gesamt	-26 %	-21 %	-21 %	-26 %	-13 %

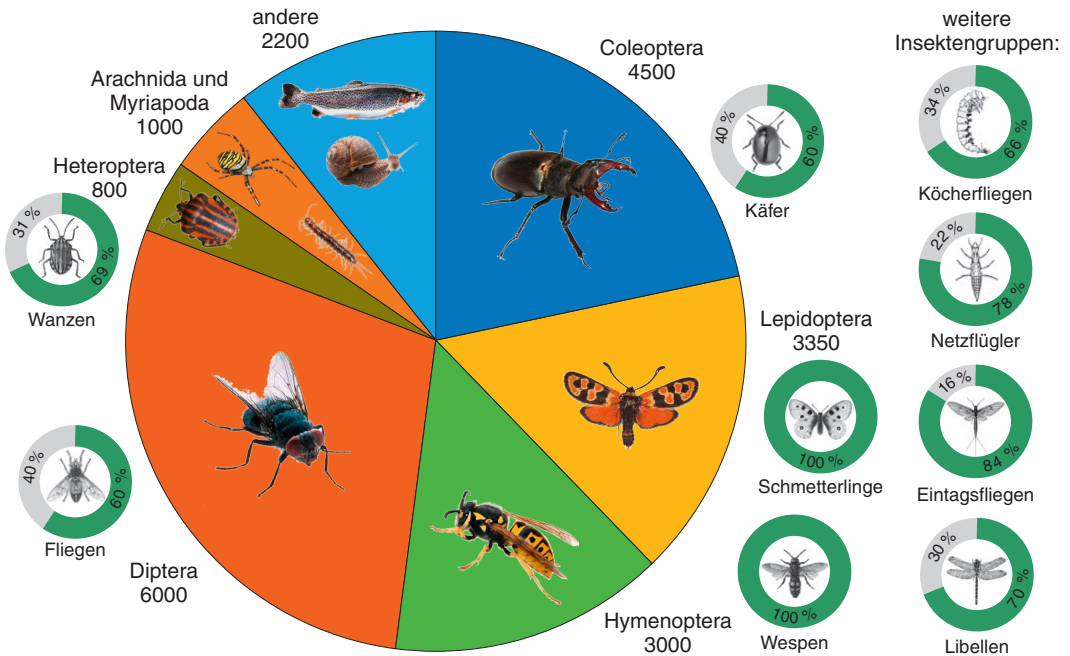


Abb. 5. Artenzahlen der in den Projekten Barcoding Fauna Bavarica und German Barcode of Life in Deutschland bereits erfassten Tierarten nach Großgruppen. – Daten aus BOLD Data Systems.

Checkliste der Schmetterlinge Bayerns veröffentlicht, wobei sich die Datenerhebung in den letzten Jahren schon stark auf unsere molekularen Methoden der Artidentifizierung und Arterfassung stützte. In der Gesamtbilanz ist insgesamt ein Rückgang der Arten festzustellen (Tab. 1), der über ganz Bayern verteilt 13 % der Arten beträgt – d. h. immerhin etwa 400 Arten, die nach der Jahrtausendwende nicht mehr nachgewiesen werden –, in den einzelnen Naturregionen sind die Verluste dramatischer. So beträgt der Rückgang in der Tagfalterfauna von Regensburg nach Habel et al. (2016) von 1840 (117 Arten) bis 2013 (71 Arten) 39 % – trotz der Verwendung der neuen molekularbiologischen gegenüber den damaligen rein herkömmlichen Methoden.

Andererseits konnten in den letzten Jahren über das DNA-Barcoding für Mitteleuropa 6, für Deutschland 26 und für Bayern 60 neue Schmetterlingsarten (Lepidoptera) nachgewiesen werden (pers. Mitteilung A. Segerer, ZSM). Bei den Hautflüglern (Hymenoptera) und den Zweiflüglern (Diptera) liegen die Neunachweise in einem noch wesentlich höheren Bereich. In Abbildung 6 sind beispielhaft einige der neu

für Bayern bzw. Deutschland nachgewiesenen Schmetterlingsarten dargestellt (aus Haslberger & Segerer 2016):

- Im unteren Donautal bei Passau konnten wir z. B. eine neue Spannerart nachweisen (Abb. 6a), die vermutlich von Osten her über das Donautal eingewandert ist.
- *Rhigognostis schmaltzella* (Schleierfalter, Plutellidae; Abb. 6b), konnten wir anhand der Übereinstimmung der DNA-Barcodes von Faltern aus den Berchtesgadener Alpen nachweisen, einer der vielen Schmetterlings-Neunachweise für Deutschland. Vermutlich wurde sie bisher für ihre Schwesterart gehalten, *Rh. incarnatella*, die an vielen Stellen in Bayern vorkommt.
- *Coleophora paramayrella* (Miniersackträger, Coleophoridae; Abb. 6c), deren Typenfundort im fernen Südostfrankreich liegt, konnte durch DNA-Barcoding bei Regensburg nachgewiesen werden, auch dies ein Neunachweis für Deutschland.
- In der Stadt Laufen konnte die hübsche *Phylloscopus platani* (Minierfalter, Gracillariidae, Abb. 6d) als neu für den deutschen Alpenraum und das Alpenvorland nachgewiesen werden.



Abb. 6. Neu für Bayern bzw. Deutschland nachgewiesene Schmetterlingsarten: **a**, *Lomaspilis opis* (Spanner, Geometridae); **b**, *Rhigognostis schmaltzella* (Schleierfalter, Plutellidae); **c**, *Coleophora paramayrella* (Miniersackträger, Coleophoridae); **d**, *Phyllonorycter platani* (Minierfalter, Gracillariidae). – Fotos: a, Rudolf Ritt; b,c: ZSM/Andreas Segerer; d, Peter Lichtmannecker.

Diese Beispiele sollen auch zeigen, dass wir bei der Komplettierung der DNA-Referenzbibliotheken schon sehr weit gekommen sind und die Methodik zur Anwendungsreife, z.B. im Monitoringbereich, gebracht haben.

Perspektiven für ein XXL-Biomonitoring: Next Generation Sequencing von Massenproben

Im Rahmen des Projekts »German Barcode of Life« (GBOL), das die Inventarisierung und genetische Charakterisierung der Tiere, Pflanzen und Pilze Deutschlands zum Ziel hat,³ erarbeiten wir in einigen Anwendungsprojekten innovative Technologien für Umweltmonitoring. Beim Monitoring stellt sich oft das Problem der großen Masse: So

ist das Sortieren und Identifizieren von Fängen aus Malaise-Fallen, Bodenproben oder Lichtfallen oft sehr zeitintensiv. Dazu zwei Beispiele:

- In einem Monitoringprojekt bei Grenzach-Wyhlen im Dreiländereck Schweiz, Frankreich und Deutschland fielen in einem einzigen Jahr, 2008, in 20 Malaise-Fallen bei 411 Leerungen etwa 1 Mio. Insekten an (Ssymank & Doczkal 2017; Abb. 7). Nach 9 Jahren Auswertung der Fallenfänge sind bisher knapp 10 % der Insekten identifiziert. Die Vorsortierung dauerte 2100 Stunden, die Identifizierung 1700 Stunden. Umgerechnet in Arbeitszeit und Kosten ergibt sich für die genannte Studie ein sechsstelliger Eurowert.
- Im Rahmen des weltweiten Projekts »Global Malaise Trap Program« (GMTP)⁴ wurden

3 German Barcode of Life (GBOL): www.bolgermany.de [zuletzt aufgerufen am 26.10.17]; gefördert vom Bundesministerium für Bildung und Forschung.

4 Global Malaise Trap Program (GMTP): <http://biodiversitygenomics.net/projects/gmp/> [zuletzt aufgerufen am 26.10.17]; Centre for Biodiversity Genomics (SBG) an der University of Guelph, Ontario, Canada.



Abb. 7. Malaise-Falle an einem Standort bei Grenzach-Wyhlen (Dreiländereck Schweiz, Frankreich, Deutschland). – Foto: D. Doczkal.

37274 Insekten aus zwei Malaise-Fallen in Bayern und in Nordrhein-Westfalen aussortiert und einzeln auf herkömmliche Art nach der Sanger-Methode sequenziert. Auf diese Weise konnten wir in diesen beiden Fallenfängen 5301 BINs (»Arten«) nachweisen (Geiger et al. 2016).

Die zweitgenannte Studie erfreute sich zwar – dank der molekularen Methodik – einer deutlich verbesserten Geschwindigkeit (Ergebnisse in weniger als einem Jahr) und der Unabhängigkeit von Experten zur Artenbestimmung, jedoch stand man angesichts des immensen Aufwands von zigtausenden Einzelsequenzierungen vor der Herausforderung, den Analyseaufwand zu verringern, um eventuell aus solchen Massenfängen in einem einzigen Analysegang ganze Artenlisten erstellen zu können. Dies ist heute durch das Next Generation Sequencing (NGS) möglich geworden, sowohl aus Artgemischen

als auch, mit gewissen Grenzen, aus überstehendem Wasser oder Alkohol. Dies eröffnet ungeahnte Perspektiven z. B. für das Monitoring von Schädlingen in Ackerbau und Forst, von invasiven Arten, von vertikalen Shifts in den Alpen im Rahmen des Klimawandels oder auch für andere Monitoringprojekte (z. B. im Boden, in der Gewässergütekontrolle, an Windkraftanlagen u. v. m.).

Im GBOL-Projekt konnten wir nun ein spezielles Monitoring für invasive und forstrelevante Arten entwickeln,⁵ eine Art Frühwarnsystem. Bisher werden dazu insgesamt 9 Fallen in zwei Transekten im Nationalpark Bayerischer Wald

5 Projekt »Entwicklung einer NGS-gestützten Monitoring Strategie am Beispiel invasiver Arten im NP Bayerischer Wald«; ZSM, im Rahmen von GBOL, in Kooperation mit der Nationalparkverwaltung, Dr. J. Müller.

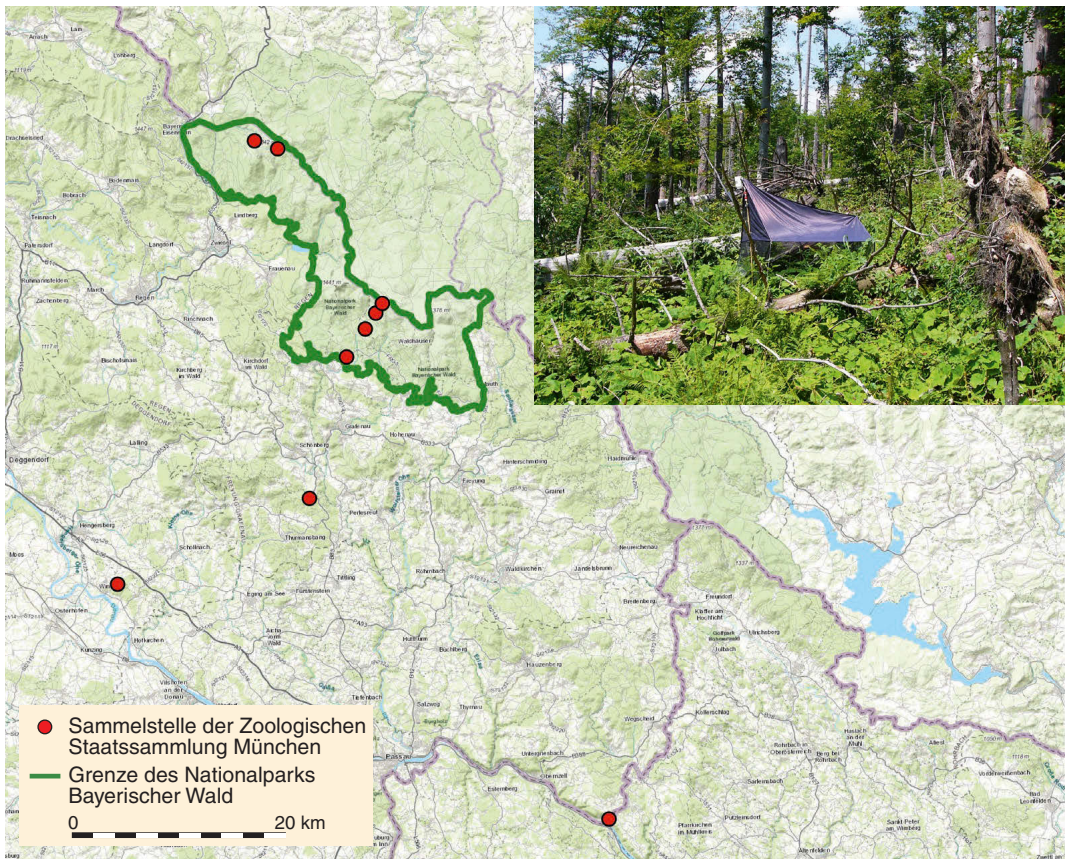


Abb. 8. Malaise-Falle im Nationalpark Bayerischer Wald (Foto rechts oben) und Standorte der Malaise-Fallen des GBOL-Projekts. – Foto: Jörg Müller, Karte: © OpenStreetMap contributors, and the GIS User Community, modifiziert von Niko Friess.

sowie zwischen Donau und Nationalpark betreut (Abb. 8), weitere Fallen werden folgen. Die Methodik wurde dabei im Wesentlichen in folgenden drei Punkten verbessert und weiterentwickelt:

1. Effizienz der DNA-Extraktion: Wir haben herausgefunden, dass man im Vergleich zu einer unsortierten Analyse des Gesamtgemisches 30 % mehr Arten bekommt, wenn sie nach Größe vorsortiert werden (Morinière et al. 2017b). Diese Vorsortierung lässt sich relativ einfach über einen oder mehrere Siebe realisieren. Bei einer weiteren Vorsortierung bis zur jeweiligen Insektenordnung kann die Artenausbeute um weitere 30 % gesteigert werden (Morinière et al. 2016). Diese Vorsortierung können Studenten durchführen und je nach Fragestellung und verfügbaren Ressourcen kann es angezeigt sein, diesen
2. Schritt einzuplanen oder nicht. Aus diesen und anderen Ergebnissen wurde eine »Best-Practice Strategie« für die DNA-Extraktion entwickelt.
2. Effizienz der COI-Amplifizierung: In weiteren Versuchen werden wir noch verschiedene Primer-Kombinationen sowie verschiedene »Zielarten-Primer« zur Identifizierung der DNA invasiver bzw. schädlicher Arten in Massenaufsammlungen testen.
3. Bioinformatische Pipeline: In dem o.g. Malaise-Programm erhielten wir über das Next Generation Sequencing ca. 36 Mio. DNA-Sequenzen. Eine Doktorandin entwickelte eine reibungslose und automatisierte Pipeline zur Erkennung von »Arten« (MOTUs) und zur Generierung von Artenlisten und wird diese in den kommenden Monaten weiter verbessern.

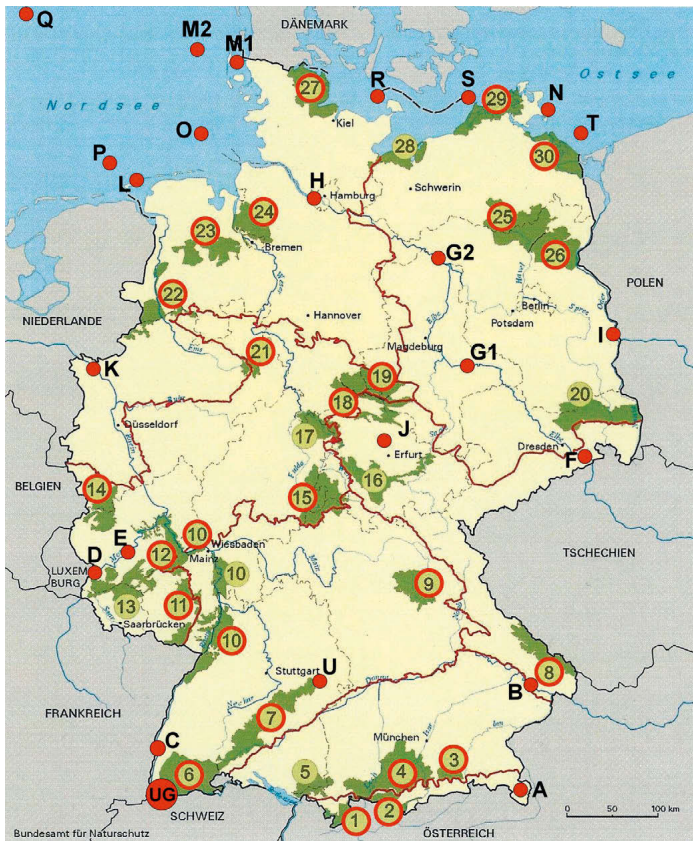


Abb. 9. Vorgeschlagene Kerngebiete für Biodiversitäts- und Klimawandelmonitoring. UG: Untersuchungsgebiet; rote Kreise (mit Nummern): Hotspots aus dem Bundesprogramm »Biologische Vielfalt für ein Biodiversitätsmonitoring«; rote gefüllte Punkte (mit Buchstaben): zusätzliche Kerngebietsvorschläge. – Aus: Ssymank (2017).

Ausblick

Bei dem Projekt bei Grenzach-Wyhlen wurde bereits punktuell die molekulare Arterkennung angewendet und damit konnten z.B. die Erstfänge für Deutschland der gefährlichen Kirsch-Essigfliege (*Drosophila suzukii*)⁶ sowie einer neuen Tagfalterart, *Pieris mannii*, belegt und abgesichert werden. In der Publikation der Ergebnisse dieses Projekts werden 30 Kerngebiete für Biodiversitäts- und Klimawandelmonitoring vorgeschlagen (Abb. 9, Ssymank & Doczkal 2017), deren dauerhafter Betrieb das Wissen um die Artenvielfalt in Deutschland (endlich) auf eine solide Basis stellen, wenn auch einen nicht

unerheblichen Personal- und Kostenaufwand bedeuten würde. Wir von der ZSM schlagen Dauerbeobachtungsstellen für ein kontinuierliches Monitoring von invasiven Arten in Deutschland (gestützt auf Malaise- und Lichtfallen mit NGS-Analyse) an folgenden fünf Haupt-Einfallswegen vor: (1) an der unteren Donau in Bayern (bereits in GBOL etabliert), (2) Dreiländereck F/CH/D (vgl. Ssymank & Doczkal 2017), (3) Bodensee (Baden-Württemberg/Bayern), (4) Mosel (Rheinland-Pfalz) und (5) an der Elbe (Sachsen). Diese Dauerbeobachtungsstellen ließen sich mit relativ geringen Finanzmitteln betreiben. Es gibt Dienstleistungsanbieter, die die hierfür nötigen Next-Generation-Sequencing-Analysen bereits für einen fünfstelligen Eurobetrag pro Jahr übernehmen könnten.

⁶ Vgl. www.barcoding-zsm.de/schaedlinge [zuletzt aufgerufen am 29.06.17].

Danksagung

Herzlich gedankt sei meinen Kollegen von der ZSM für deren tatkräftige Mitarbeit in den BFB- und GBOL-Projekten, v. a. G. Haszprunar, J. Morinière, S. Schmidt, A. Segerer, M. Balke, L. Hendrich, L. Hardulak, J. Spelda, B. Cancian de Araujo und D. Doczkal. Herrn J. Müller vom Nationalpark Bayerischer Wald sei gedankt für die Organisation und Durchführung des auf Malaise-Fallen gestützten Frühwarnsystems für invasive Arten. Für Bereitstellung von Foto- und Bildmaterial danke ich A. Segerer, P. Lichtmanecker, R. Ritt, J. Morinière, J. Müller, N. Friess, D. Doczkal und A. Ssymank. Paul D. N. Hebert (BIO, Guelph, Canada) und sein kompetentes Team halfen im Rahmen einer über 10-jährigen engen Kooperation bei der Sequenzierung von ca. 250 000 Insekten, z. B. auch im Rahmen des »Global Malaise Trap Program«. Sujeevan Ratnasingham (BIO, Guelph, Canada) stellte die bioinformatischen Voraussetzungen zur Datenanalyse bereit (BOLD data systems). Unsere Projekte wurden vom Bundesministerium für Bildung und Forschung (GBOL) und vom Bayerischen Staatsministerium für Bildung und Kultus, Wissenschaft und Kunst (BFB) finanziell gefördert.

Literatur

- Brooks, T. M., R. A. Mittermeier, C. G. Mittermeier, G. A. B. da Fonseca, A. B. Rylands, W. R. Konstant, P. Flick, J. Pilgrim, S. Oldfield, G. Magin & C. Hilton-Taylor. 2002. Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. – *Conservation Biology*, 16(4): 909–923.
- BStMUG (Bayer. Staatsministerium für Umwelt und Gesundheit). 2010. Bayern Arche. Artenschutzbericht Bayern. – München, 508 S.
- De Vos, J. M., L. N. Joppa, J. L. Gittleman, P. R. Stephens & S. L. Pimm. 2015. Estimating the normal background rate of species extinction. – *Conservation Biology*, 29(2): 452–462.
- Fahrig, L. 2003. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. – *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 34: 487–515.
- Geiger, M. F., J. Morinière, A. Hausmann, G. Haszprunar, W. Wägele, P. D. N. Hebert & B. Rulik. 2016. Testing the Global Malaise trap Program – How well does the current barcode reference library identify flying insects in Germany? – *Biodiversity Data Journal*, 4: e10671; doi: 10.3897/BDJ.4.e10671.
- Habel, J. C., A. Segerer, W. Ulrich, O. Torchyk, W. W. Weisser & T. Schmitt. 2016. Butterfly community shifts over two centuries. – *Conservation Biology*, 30(4): 754–762.
- Haslberger, A. & A. Segerer. 2016. Systematische, revidierte und kommentierte Checkliste der Schmetterlinge Bayerns (Insecta: Lepidoptera). – *Mitteilungen der Münchner Entomologischen Gesellschaft*, 106, 336 S.
- Haszprunar, G. 2009. Barcoding Fauna Bavarica – eine Chance für die Entomologie. – *Nachrichtenblatt der bayerischen Entomologen*, 58(1/2): 45–47.
- Hausmann, A., G. Haszprunar, A. H. Segerer, W. Speidel, G. Behounek & P. D. N. Hebert. 2011. Now DNA-barcoded: the butterflies and larger moths of Germany (Lepidoptera: Rhopalocera, Macroheterocera). – *Spixiana* 34(1): 47–58, Appendices unter www.pfeil-verlag.de/publikationen/spixiana-zeitschrift-fuer-zoologie-inhalt-band-34/ [zuletzt aufgerufen am 26.10.17].
- Hebert, P. D. N., A. Cywinska, S. L. Ball & J. R. de Waard. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. – *Proceedings of the Royal Society B*, 270(1512): 313–321.
- Hendrich, L., J. Morinière, G. Haszprunar, P. D. N. Hebert, A. Hausmann & F. Köhler. 2015. A comprehensive DNA barcode database for Central European beetles: Adding more than 3,500 identified species to BOLD. – *Molecular Ecological Resources*, 15(4): 795–818.
- LfU (Bayer. Landesamt für Umweltschutz) (Hrsg.). 2003. Rote Liste gefährdeter Tiere Bayerns. – *Schriftenreihe LfU. Augsburg*, 348 S.
- MA (Millennium Ecosystem Assessment). 2005. Ecosystems and human well-being: Biodiversity Synthesis. – *World Resources Institute, Washington, DC, USA*, 86 p.
- Morinière, J., L. Hendrich, A. Hausmann, P. Hebert, G. Haszprunar & A. Gruppe. 2014. Barcoding Fauna Bavarica: 78 % of the Neuropterida Fauna Bar-coded! – *PLOS ONE*, 9(10): e109719; doi:10.1371/journal.pone.0109719.
- Morinière, J., B. Cancian de Araujo, A. W. Lam, A. Hausmann, M. Balke, S. Schmidt, L. Hendrich, D. Doczkal, B. Fartmann, S. Arvidsson & G. Haszprunar. 2016. Species identification in malaise trap samples by DNA barcoding based on NGS technologies and a scoring matrix. – *PLOS ONE*, 11(5): e0155497; doi:10.1371/journal.pone.0155497.
- Morinière, J., L. Hendrich, M. Balke, A. J. Beermann, T. König, M. Hess, S. Koch, R. Müller, F. Leese, P. D. N. Hebert, A. Hausmann, C. F. Schubart & G. Haszprunar. 2017a. A DNA barcode library for Germany's mayflies, stoneflies and caddisflies (Ephemeroptera, Plecoptera & Trichoptera). – *Molecular Ecology Resources*, 27 June; doi: 10.1111/1755-0998.12683.
- Morinière, J., S. Duncan, M. Akbarian, S. Islam, A. Lopez, L. A. Hardulak, B. Cancian de Araujo, A. Hausmann, M. Balke, S. Schmidt, L. Hendrich, D. Doczkal & G. Haszprunar. 2017b. Size does matter – A study of size and order pre-sorting with subsequent Next Generation DNA Barcoding and target species capture. – *PLOS ONE* (akzeptiert).
- Schmidt, S., C. Schmid-Egger, J. Morinière, G. Haszprunar & P. D. N. Hebert. 2015. DNA barcoding largely supports 250 years of classical taxonomy: identifications for Central European bees (Hyme-

- noptera, Apoidea partim). – *Molecular Ecological Resources*, 15(4): 985–1000.
- Ssymank, A. 2017. Kap. 9. Ausblick und Überblick über die bisherigen Ergebnisse. – In: Ssymank, A. & D. Doczkal: Biodiversität des südwestlichen Dinkelbergrandes und des Rheintals bei Grenzach-Wyhlen. – *Mauritiana* (Altenburg), 34: 891–900.
- Ssymank, A. & D. Doczkal (Hrsg.). 2017. Biodiversität des südwestlichen Dinkelbergrandes und des Rheintals bei Grenzach-Wyhlen. – *Mauritiana* (Altenburg), 34(2017): 910 S.

Völkl, W. & T. Blick. 2004. Die quantitative Erfassung der rezenten Fauna von Deutschland – Eine Dokumentation auf der Basis der Auswertung von publizierten Artenlisten und Faunen im Jahr 2004. – Dokumentation zum Werkvertrag; im Auftrag des Bundesamtes für Naturschutz, Bonn, 33 S; www.bfn.de/fileadmin/MDB/documents/dokumentationartenvielfalt.pdf [zuletzt aufgerufen am 26.10.17].

Diskussion

W. Fiedler: Wie kommen der Artbegriff und Ihre Arbeit zusammen? Steht am Anfang die klassische Art, um eine Referenz für den Barcode zu haben, oder sehen Sie sich zuerst die Barcodes an und unterteilen diese dann nach einer Definition in Arten?

A. Hausmann: Der Aufbau der Referenzbibliothek geschieht in aller Regel durch die jeweilig spezialisierten Experten. Das heißt, wir identifizieren die Arten zunächst verlässlich nach herkömmlichen Kriterien und erhalten damit eine nachhaltige, molekulare Referenz. In manchen Fällen geht dies nicht so einfach, zum Beispiel bei mehreren Familien der Fliegen und Mücken (Diptera), wo es – wenn überhaupt – jeweils nur einen Spezialisten gibt, der meist vollkommen überlastet ist. Hier betreiben wir »Reverse Taxonomy«, das heißt, wir bauen zuerst eine DNA-Bibliothek mit möglichst vielen verschiedenen, sich ergebenden genetischen Clustern auf, die wir nach einer groben Morphospezies-Vorsortierung erhalten. Erst dann schicken wir jeweils ein Exemplar pro Cluster zum Spezialisten und können – wenn er denn Zeit hat – in einem zweiten Schritt das System kalibrieren. Das Schöne an dem DNA-Barcoding-System ist, dass es allgemein übers Internet zugänglich ist und dass es nachhaltig ist.

P. Heinzlmeier: Haben Sie auch Erkenntnisse darüber, wie lange es dauern bzw. wie schnell es gehen kann, bis sich infolge einer Verinselung eines Vorkommens oder einer Isolierung einer Population mangels Vernetzung eine neue Art bildet?

A. Hausmann: Das sind phylogenetische Vorgänge, die wir in unserer Lebensspanne nicht messen können. Die Artbildung dauert auch bei Insekten mit ihren kurzen Generationszeiten in der Natur sehr, sehr lange, in der Regel mindestens mehrere Tausend Jahre.

K. O. Stetter: Was genau ist das COI-Gen, das für das DNA-Barcoding benutzt wird?

A. Hausmann: COI ist die Abkürzung für die Untereinheit 1 der mitochondrialen Cytochrom-c-Oxidase.

K. O. Stetter: Das heißt, Sie benutzen mit dem Mitochondrium einen Teil eines vor langer Zeit eingewanderten Bakteriums.

A. Hausmann: Ja. Der große Vorteil ist, dass das Teilstück sehr divers und für die jeweilige Tierart spezifisch ist, sodass man damit sehr gut die Arten unterscheiden kann.¹

M. Wikelski: Ich habe noch eine Nachfrage zu der Artbildung. Es gibt Leute wie Peter und Rosemary Grant, die aufgrund ihrer Arbeiten an Darwinfinken behaupten, dass innerhalb von 40 Jahren eine neue Art durch Hybridisierung und Separation entstanden ist.² Wie stehen Sie dazu?

1 Hebert, P. D. N., S. Ratnasingham & J. R. deWaard. 2003. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. – *Proceedings of the Royal Society B* (Suppl.), 270: S96–S99.

A. Hausmann: Da müsste man wissen, ob sich dieser postulierte Artbildungsprozess auch schon im COI-Gen niedergeschlagen hat oder ob man ihn bisher nur anhand des Verhaltens oder der phänotypischen Ausprägungen gemessen hat. Ich vermute, er hat sich noch nicht wesentlich im Genom niedergeschlagen.

M. Wikelski: Vom COI weiß ich es nicht, aber angeblich ist das Genom bei den Individuen, die durch Hybridisierung entstanden sind, anders als bei ihren Eltern.

A. Hausmann: Das muss man tatsächlich von Fall zu Fall testen. Es gibt Fälle von jungen Arten, wo wir noch keinen Unterschied im COI Gen finden, bei Insekten in der Regel in weniger als einem Prozent der Arten. Oder es handelt sich um eine Artaufspaltung mit mehreren genetischen Linien, die dann in beiden neuen Arten auftauchen. Solche Fälle gibt es und die muss man natürlich kennen. Hier ist es unsere Aufgabe, die Referenzbibliothek zu kalibrieren und auf Probleme bei einer Art hinzuweisen.

G. Haszprunar: Ich darf vielleicht noch ergänzen, dass wir eine ganze Reihe solcher Fälle über alle Triben hinweg klären konnten. Bei den rasanten, explosionsartigen Artbildungen – ich denke dabei an die Buntbarsche (Cichlidae) in den Seen Ostafrikas – tickt die Uhr im COI zu langsam. Diese Artbildungen lassen sich mit dem COI-Gen nicht nachweisen, da müssen Sie auf »schnellere« Gensonden umsteigen. Das kann auch innerhalb einer Teilgruppe stattfinden, wie

wir an den Nacktschnecken festgestellt haben. Das DNA-Barcoding mit COI klappt bei allen Nacktschnecken in ganz Europa wunderbar, nur nicht in Korsika. Da haben wir eine ganz rapide Artdifferenzierung und da können wir mit dem COI-Gen nichts machen. Solche Fälle kommen vor, sind aber zum Glück sehr selten.

N. Schäffer: Sehen Sie die Gefahr, dass durch die neuen Methoden die klassische Artenkenntnis noch mehr an Bedeutung verliert? Biologen werden künftig womöglich der Meinung sein, dass sie eine Art nicht mehr am Phänotyp zu erkennen brauchen, wenn man die Arten über Massenanalysen relativ einfach bestimmen kann.

A. Hausmann: Das ist ein Argument, das wir in der Tat oft hören. Ich denke, da darf man nicht Artenkenner und Molekularbiologen gegeneinander ausspielen. Ich selber bin ein klassischer Entomologe, liebe die Morphologie und habe schon über 250 Tierarten beschrieben. Ich sehe es eher umgekehrt: Für alle diese Problemgruppen, die ich kurz erwähnt habe, gab es auch früher schon keine oder zu wenige Spezialisten. Schon bevor wir begannen, DNA-Barcoding zu betreiben, hatten wir das Problem, dass uns der Nachwuchs an Spezialisten fehlte. Mit den neuen Methoden werden die wenigen Spezialisten, die noch übrig sind, endlich von Routineaufgaben entlastet. Ich muss jetzt nicht mehr Tausende von Allerweltsarten identifizieren, sondern kann endlich wieder das machen, wozu ich eigentlich an der Zoologischen Staatssammlung angestellt worden bin.

-
- 2 Grant, B. R. & P. R. Grant. 1993. Evolution of Darwin's finches caused by a rare climatic event. – *Proceedings of the Royal Society London B*, 251: 111–117.
 Grant, B. R. & P. R. Grant. 2006. Evolution of character displacement in Darwin's finches. – *Science*, 313(5784): 224–226.