

Entomologica Austriaca	20	207-213	Linz, 16.3.2013
------------------------	----	---------	-----------------

DNA-Barcoding – von iBOL zu ABOL

D. ZIMMERMANN, H. SATTMANN & E. HARING

Abstract: Titel: **DNA barcoding – from iBOL to ABOL.** – DNA barcoding describes the technique of identifying organisms based on variable, species-specific DNA sequences. A major advantage of this technique is that any tissue samples– even of unidentifiable developmental stages or of damaged specimens can be used for identification by DNA barcoding. Limitations are young species and species with extraordinary high intraspecific variability. A prerequisite for the identification with a DNA barcode is the generation of a reliable database harbouring all the reference sequences. The International Barcode of Life Project (iBOL) is coordinating a variety of initiatives working on establishing such a reference database for taxonomic groups, particular regions or nations. In 2012, the Austrian Barcode of Life initiative (ABOL) was founded with the goal to record Austrian biodiversity by the use of DNA barcoding.

Key words: DNA barcoding, species identification, International Barcode of Life Project (iBOL), Austrian Barcode of Life initiative (ABOL).

DNA-Barcoding

DNA-Barcoding bezeichnet eine Technik, bei der ein kurzer, besonders variabler Abschnitt der DNA zur Artbestimmung herangezogen wird. Für tierische Organismen wird meist standardmäßig eine 648 Basenpaare lange Sequenz des mitochondrialen CO1-Gens eingesetzt, jedoch sind weitere Gene für verschiedene Organismengruppen in Verwendung. Gemeinsames Ziel aller DNA-Barcoding-Projekte ist letztendlich, eine Datenbank aller Organismen zu erstellen, welche die Referenz-Sequenzen korrekter bestimmter Taxa allgemein zugänglich macht. Zu den Standards des DNA-Barcodings gehört, dass pro Art mehrere Proben von verschiedenen Fundorten sequenziert werden. Bei der weltweiten Datenbank des "international Barcode of Life" BOLD (Barcode of Life Data Systems) müssen 10 Proben kongruente Ergebnisse liefern, bevor sie in der Datenbank freigegeben werden. Im Rahmen nationaler Initiativen genügen weniger, da auch nur ein kleineres Verbreitungsgebiet abgedeckt werden muss. Im Sinne von Qualitätssicherung und Nachvollziehbarkeit müssen die Belegexemplare und Gewebeproben nachweislich in geeigneten wissenschaftlichen Sammlungen deponiert werden. Bestimmung und Kontrolle der Bestimmung muss durch ausgewiesene Taxonomen erfolgen. Daher wird für die Etablierung von DNA-Barcoding-Datenbanken nach Möglichkeit auch Museumsmaterial herangezogen. Voraussetzung ist, dass die DNA in den Museumsexemplaren gut erhalten ist. Insekten, die in hochprozentigem Alkohol oder gut getrocknet vorliegen, sind meist gut analysierbar. Nochmaliges Aufweichen wirkt sich negativ auf den Zustand der DNA aus und kann dazu führen, dass die DNA degradiert

und die Barcode-Sequenz nicht gewonnen werden kann. Ebenso kann längeres Einwirken von Essigäther und die Fixierung in Formol die DNA nachhaltig degradieren.

Sobald eine Sequenz über die Datenbank verfügbar ist, kann sie von jedem genutzt werden. Für die taxonomische Bestimmung eines Organismus wird von einem kleinen Gewebestück oder Teil des Organismus die DNA isoliert und die DNA-Barcodingsequenz bestimmt. Ein Vorteil des DNA-Barcodings ist, dass hierfür auch Proben verschiedener Entwicklungsstadien sowie deformierter Exemplare oder Gewebeproben (ohne Verfügbarkeit des ganzen Individuums) verwendet werden können. Die erhaltene Sequenz speist man mittels eines Suchprogramms in die Datenbank ein und erhält als Ergebnis jene Art(en), die die ähnlichste(n) Sequenz(en) aufweist/aufweisen. Im Idealfall findet man eine 100 %ige Übereinstimmung. Allerdings besitzen Individuen einer Art aufgrund der innerartlichen Variation oft leicht unterschiedliche Sequenzen. Dies stellt in den meisten Fällen jedoch kein Problem dar, da sich üblicherweise die innerartliche Diversität nicht mit der zwischenartlichen überschneidet (die nächstverwandte Art weist eine deutlich höhere Sequenzdivergenz auf).

Da die Einträge der Datenbank durch Voucherexemplare belegt und mit Bildern dokumentiert sind, haben Nutzer die Möglichkeit einer zusätzlichen Plausibilitätskontrolle.

Im Zuge von DNA-Barcoding-Initiativen werden bisweilen auch Fehlbestimmungen erkannt und kryptische Arten entdeckt. Ein beispielhaftes Ergebnis der Initiative "Barcoding Fauna Bavarica" (BVB, <http://www.faanabavarica.de/>) war die Entdeckung einer neuen Mutillidenart in Deutschland (NATZER 2012).

In diesem Zusammenhang muss betont werden, dass es Grenzen der Anwendbarkeit des DNA-Barcodings gibt. Hervorzuheben sind hier zwei Phänomene:

(1) Junge Arten, die sich in den DNA-Markersequenzen noch so wenig differenziert haben, dass eine eindeutige Zuordnung nicht möglich ist. Als Beispiel wären hier die Hierofalken (vier Arten der Gattung *Falco*; NITTINGER et al. 2007) zu nennen. Eine DNA-Barcodingsequenz würde hier nur eine Gruppenzuordnung jedoch keine klare Bestimmung auf Artniveau zulassen.

(2) Arten mit ungewöhnlich hoher innerartlicher Variation, bei denen noch keine definitiven Schlussfolgerungen bezüglich Artabgrenzung gezogen wurden. Ein Beispiel aus dem Bereich der Mollusca kann dies verdeutlichen: In der weitverbreiteten Landschneckenart *Trochulus hispidus* wurde eine Vielzahl stark unterschiedlicher genetischer Linien (bis zu 20 % Sequenzdivergenz) gefunden. Einige dieser Linien sind näher mit morphologisch klar abgrenzbaren Arten (z. B. *Trochulus striolatus*) verwandt. Die Art *T. hispidus* ist somit in gegenwärtiger Auffassung paraphyletisch und nicht klar mittels DNA-Sequenzen eingrenzbar (KRUCKENHAUSER et al. in prep.).

Kryptische Arten – also morphologisch kaum unterscheidbare Arten, die sich genetisch klar voneinander absetzen – stellen kein Problem dar, wenn sie erfasst und bekannt sind. Gerade hier ist ein wichtiges Anwendungsgebiet des DNA-Barcodings gegeben. Allerdings ist zu betonen, dass eine Fülle kryptischer Arten (noch) nicht entdeckt ist. Für alle Arten und Artengruppen, deren phylogenetische Verwandtschaftsbeziehungen noch ungenügend untersucht sind, wird eine Bestimmung mittels DNA-Barcodings ein ungenaues Ergebnis liefern. Dies gilt jedoch in solchen Fällen auch für die morphologische Bestimmung. Ein großer Vorteil breit angelegter DNA-Barcodingprojekte ist, dass sie das Vorhandensein möglicher kryptischer Arten aufzeigen können und damit detaillier-

tere Analysen und Forschungsprojekte anregen können, in welchen Systematik und Taxonomie der entsprechenden Gruppe mit einer möglichst breiten Palette an Methoden geklärt werden.

Fakten zum DNA-Barcoding der Geometriden-Fauna Bayerns aus HAUSMANN et al. (2011):

- Von den 1818 analysierten Individuen konnten 77 % erfolgreich sequenziert werden; von 50,7 % wurde die vollständige 648 Basenpaare lange Sequenz erhalten.
- 96,5 % der Geometriden-Arten können eindeutig per DNA Barcode identifiziert werden.
- In nur einem Fall waren zwei Arten aufgrund zu ähnlicher Sequenzen nicht unterscheidbar. Bei einigen weiteren Arten könnte ein ähnlicher Effekt eintreten, wenn sie über ihr gesamtes Verbreitungsgebiet untersucht würden.
- In 5 % der Arten war die innerartliche Sequenzdivergenz über 2 %. Hier sind weitere Untersuchungen notwendig, denn es könnte sich zumindest in einigen Fällen um kryptische Arten handeln.
- Die durchschnittliche intraspezifische Variation in den restlichen Arten lag bei 0,23 %.

DNA-Barcoding versus morphologische Bestimmung

Beide Methoden, DNA-Barcoding und klassische morphologische Bestimmung, haben Vor- und Nachteile, Stärken und Schwächen. Ziel des DNA-Barcodings ist nicht, eine Methode durch eine andere zu ersetzen, sondern Synergien zu schaffen. Die Verfügbarkeit zweier etablierter Methoden ermöglicht die Testbarkeit von Artbestimmungs- und Artabgrenzungshypothesen im Sinne einer integrativen Taxonomie. Das DNA-Barcoding ist eine neue, nützliche und in vielen Fällen funktionierende Methode, die als Ergänzung und Erweiterung der klassischen Taxonomie genutzt werden sollte. Ziel ist es, für möglichst viele Anwendungen eine schnelle und zuverlässige Artbestimmung zu ermöglichen.

DNA-Barcoding Initiativen

Eine Stärke des DNA-Barcodings ist die gute weltweite Organisation und Vernetzung. Das ist unter anderem darauf zurückzuführen, dass es einen klaren Anfang hatte und von Beginn an umfassend angelegt war: 2003 publizieren Dr. Paul Hebert (University of Guelph, Canada) und sein Team erstmals die Idee des DNA Barcodings und die Vision einer weltweiten Datenbank, in der die DNA-Barcodes aller rezenten Organismen eingespeist werden sollen (HEBERT et al. 2003). Wenige Zeit später bewilligte die Sloan Foundation 669.000 USD für die Gründung eines Konsortiums für einen Barcode of Life, das an der Umsetzung dieser Idee arbeiten sollte (CBOL, 2010-2012). Im Februar 2005 fand bereits die erste Internationale Barcoding Konferenz statt.

Mittlerweile gibt es zahlreiche Barcoding-Initiativen weltweit, und die meisten sind unter dem Dach des "international Barcode of Life" (iBoL, <http://ibol.org/>) zusammengefasst. Es gibt Initiativen mit inhaltlichem Schwerpunkt, wie weltweite DNA-Barcoding-Projekte zu Bestäubern, Schadorganismen, und ausgewählten Organismengruppen wie Pilzen, Landpflanzen und Wirbeltieren. Darüber hinaus gibt es regionale und nationale Initiativen, in denen versucht wird, die Organismen einzelner Regionen oder Länder zu

erfassen. Eine regionale Initiative ist beispielsweise das "Barcoding Fauna Bavarica" – Projekt der Zoologischen Staatssammlung München, das zum Ziel hat, alle 34.000 in Bayern vorkommenden Arten per Barcode bestimmbar zu machen (Barcoding Fauna Bavarica, 2012). Nach drei Jahren liegen hier bereits Sequenzen von über 10.000 Arten vor. Damit gehört die "Barcoding Fauna Bavarica"-Initiative weltweit zu den Spitzenreitern. Mittlerweile wurde in Deutschland auch ein nationales DNA-Barcoding-Projekt initiiert, der German Barcode of Life (GBOL, www.bolgermany.de/). GBOL besteht aus einem breit gefächerten Netzwerk deutscher Museen und Universitäten und wird vom Ministerium für Bildung und Forschung finanziell unterstützt (GERMAN BARCODE OF LIFE 2012). Darüber hinaus existieren in Europa nationale DNA-Barcoding-Projekte in Frankreich, Finnland, den Niederlanden, Portugal, Großbritannien (INTERNATIONAL BARCODE OF LIFE 2012a) sowie der Schweiz (INTERNATIONAL BARCODE OF LIFE 2012b).

ABOL – Die Österreichische DNA-Barcoding-Initiative

Im Jahr 2012 wurde die "Austrian Barcode of Life"-Initiative (ABOL) ins Leben gerufen, die sich die Erfassung der österreichischen Biodiversität mittels DNA-Barcoding zum Ziel gesteckt hat. Diese Idee ist mit großem positivem Echo aufgenommen worden und es zeigte sich, dass sich eine Vielzahl an Personen und Institutionen an diesem Projekt beteiligen würden. Aufgaben und Ziele von ABOL wurden in einer Deklaration zusammengefasst, die im Folgenden wiedergegeben wird. Unabhängig davon, ob das Projekt realisiert werden kann, haben bereits diverse Einzelprojekte – seien es dezidierte DNA-Barcodingprojekte oder umfassende phylogenetische Studien, im Zuge derer qualitativ hochwertige genetische Daten produziert werden – zur Erfassung der österreichischen Biodiversität beigetragen und dies wird in Zukunft vermehrt geschehen. Eine konzertierte Initiative, wie sie in ABOL konzipiert ist, würde zur intensiven Vernetzung der in der Taxonomie tätigen Wissenschaftler Österreichs führen und dadurch die Generierung qualitativ hochwertiger Daten ermöglichen und wäre daher sehr zu begrüßen. Wir sind der Überzeugung, dass das geplante österreichische Barcoding-Projekt der Taxonomie einen innovativen positiven Input und den wissenschaftlichen Sammlungen eine neue Dimension geben würde.

Zusammenfassung

DNA-Barcoding ist eine Technik zur taxonomischen Bestimmung von Organismen anhand eines variablen, im Idealfall artspezifischen Teilstücks der DNA. Zu den Vorteilen des DNA-Barcodings gehört, dass hierfür verschiedenste Gewebeproben, zum Beispiel verschiedener Entwicklungsstadien oder von deformierten Exemplaren verwendet werden können. An seine Grenzen stößt es bei jungen Arten und Arten mit ungewöhnlich hoher innerartlicher Variation. Grundvoraussetzung für die Bestimmung mittels DNA-Barcode ist eine hochqualitative Datenbank mit Referenzsequenzen. Das "International Barcode of Life"-Projekt (iBOL) koordiniert eine Vielzahl an Initiativen, die an der Erstellung solcher Referenzdatenbanken für Organismengruppen, Regionen oder Länder arbeiten. Im Jahr 2012 wurde die "Austrian Barcode of Life"-Initiative (ABOL) ins Leben gerufen, die sich die Erfassung der österreichischen Biodiversität mittels DNA-Barcoding zum Ziel gesteckt hat.

Literatur

- BARCODING FAUNA BAVARICA (2012): DNA-Barcoding der Fauna Bavarica (BFB)Erstellung einer genetischen Bibliothek der bayerischen Tierarten. — <http://www.faanabavarica.de/>, Startseite.
- CBOL (2010-2012): What Is CBOL? History of DNA Barcoding and CBOL. — <http://www.barcodeoflife.org/content/about/what-cbol>.
- GERMAN BARCODE OF LIFE (2012): German Barcode of Life – Inventarisierung und genetische Charakterisierung der Tiere, Pflanzen und Pilze Deutschlands. — Broschüre auf <https://www.bolgermany.de/gbol/was-ist-gbol>.
- HAUSMANN A., HASZPRUNAR G. & P. HEBERT (2011): DNA Barcoding the Geometrid Fauna of Bavaria (Lepidoptera): Successes, Surprises, and Questions. — PLoS ONE **6** (2): e17134.
- HEBERT P., CYWINSKA A., BALL S. & J.R. DE WAARD (2003): Biological identifications through DNA barcodes. — Proceedings of the Royal Society of London, Series B **270**, 1512: 313-321.
- INTERNATIONAL BARCODE OF LIFE (2012a): Partner Nations – National, Regional and Central Nodes. — <http://www.ibol.org/about-us/partner-nations/>.
- INTERNATIONAL BARCODE OF LIFE (2012b): iBOL membership beckons for Switzerland – SwissBOL created at Geneva meeting. – <http://ibol.org/ibol-membership-beckons-for-switzerland/>.
- NATZER, E. (2012): DNA-Barcoding erhöht Artenvielfalt – neue Wespenart in Deutschland. — Pressemitteilung xam 04.07.2012 auf <http://idw-online.de/pages/de/news486852>.
- KRUCKENHAUSER L., DUDA M., BARTEL D., SATTMANN H., HARL J. & E. HARING (in prep.): Highly divergent mitochondrial lineages within the *Trochulus hispidus/sericeus* species complex and related Taxa.
- NITTINGER F., GAMAUF A., PINSKER W., WINK W. & E. HARING (2007): Phylogeography and population structure of the Saker Falcon (*Falco cherrug*) and the influence of hybridization, mitochondrial and microsatellite data. — Molecular Ecology **16**: 1496-1517.

ABOL - Austrian Initiative for the Barcode of Life

Deklaration

Österreich nimmt in Europa einen Spitzenplatz in Bezug auf biologische Vielfalt ein. Angesichts des anhaltenden Artensterbens und globalen Wandels sind leistungsfähige Expertensysteme zur schnellen Artbestimmung unerlässlich.

ABOL ist eine Initiative biowissenschaftlicher Institutionen Österreichs zur Erfassung der im Land vorkommenden Arten (Tiere, Pflanzen, Pilze) anhand ihres DNA-Barcodes. Ziele sind (1) die Erstellung einer Sammlung von Referenz-DNA-Sequenzen (DNA-Datenbank), (2) damit einhergehend die Erfassung der österreichischen Biodiversität, (3) die Bereitstellung der Daten für Forschung, Lehre und praktische Anwendungen und (4) die Vernetzung dieser Daten mit internationalen Datenbanken (ECBOL, iBOL). Die genannten Institutionen (Liste wird in einer folgenden Aussendung angehängt) werden sich an diesem Gemeinschaftsprojekt beteiligen und bekräftigen mit dieser Deklaration dessen Dringlichkeit. Ein legislatives Argument für die ABOL-Initiative ergibt sich auch aus der von Österreich ratifizierten *Convention on Biological Diversity*.

DNA-Barcoding ist die standardisierte genetische Analyse bestimmter Abschnitte der DNA, welche die Identifizierung der meisten Arten schnell und sicher ermöglicht. Die ABOL-Datenbank wird eine aktuelle Dokumentation der Biodiversität Österreichs liefern und zur Identifizierung bisher unentdeckter Arten führen. Als unmittelbares Ergebnis wird ABOL eine Datenbank der Referenz-Sequenzen, Artenlisten, Verbreitungskarten, optimierte Laborprotokolle, DNA-Proben sowie Belege in wissenschaftlichen Sammlungen liefern. Die Datenbank wird eine Vielzahl von Anwendungen erlauben, wie rasche und kostengünstige Identifikation für Land- und Forstwirtschaft, Industrie, Medizin und Kriminalistik sowie effiziente Artenerfassung für Kartierung und Monitoring im Naturschutz. Weiters können die Daten wichtige Entscheidungsgrundlage für Behörden darstellen sowie in Forschung und Lehre genutzt werden. ABOL wird Grundlage für viele wissenschaftliche Projekte sein.

Projektstruktur

Für die Koordination des Gesamtprojekts bietet sich das NHM Wien an. Für einzelne Organismengruppen schließen sich Arbeitsgruppen zusammen, die für Koordination, Organisation und Budget selbständig verantwortlich sind. Die Koordination dieser Einzelprojekte wird sich auf verschiedene Institute verteilen.

Ablauf

Die Schaffung einer DNA-Barcode-Datenbank erfolgt durch:

- Aufbau eines Expertensystems (professionelle Taxonomen und "Citizen Scientists")
- Ausbau vorhandener Strukturen in Forschungseinrichtungen unter Nutzung von Synergien (z. B. DNA/Gewebe-Bank, Datenbanken, Sammlungen)
- Auswahl von vorhandenem Material in wissenschaftlichen Sammlungen sowie Sammeln frischer Belege
- Bestimmung und genetische Bearbeitung durch Experten. Alle Daten werden in eine zentrale Datenbank eingespeist
- Qualitätskontrolle, begleitende Dokumentation des Projekts und Vergleich mit internationalen Daten
- Kommunikation nach außen (auch als Grundlagen für die Nutzung der Daten); diese erfolgt konzertiert

Zeitplan

Von den geschätzten 68.000 Arten (Tiere, Pflanzen, Pilze) in Österreich sollen in den ersten drei Jahren 15.000 mittels DNA-Barcoding erfasst werden. In der Folge werden etablierte Routinen zu einer Beschleunigung des Durchsatzes führen. Für die Gesamtdauer des Projekts werden 10 Jahre veranschlagt.

Eine detaillierte Kostenschätzung wird von den beteiligten Organisationen gemeinsam erarbeitet.

Kooperationspartner

ABOL ist ein Projekt, das die in der Biodiversitätsforschung relevanten österreichischen Organisationen zusammenführen und stärken soll: Naturkundemuseen, Universitäten, Biosphären- und Nationalparks, Forschungsanstalten, Naturschutzabteilungen und naturwissenschaftliche Vereine. ABOL wird die Vernetzung mit dem "International Barcode of Life"-Projekt (iBOL) sowie weiteren nationalen Projekten (z.B. GBOL) und vor allem mit den Nachbarländern suchen.

Anschriften der Verfasser: Dominique ZIMMERMANN
Helmut SATTMANN
Elisabeth HARING
Naturhistorisches Museum Wien
Burgring 7, A-1010 Wien
E-Mails: dominique.zimmermann@nhm-wien.ac.at
helmut.sattmann@nhm-wien.ac.at
elisabeth.haring@nhm-wien.ac.at