Chancen und Grenzen von klassischer Insektenbestimmung und DNA-Barcoding: Eine Fallstudie

Robert Künast

Die Welt der Insekten – mehr als nur bunte Schmetterlinge

In Deutschland gibt es ca. 48 000 Tierarten, etwa 30 000 – also knapp drei Fünftel davon – sind Insekten (Riedel et al. 2016). Aber wer kennt diese Vielfalt? Die attraktiven, großen Schmetterlinge, Libellen und Käfer finden durchaus Beachtung, doch die allermeisten Insekten sind unauffällig. Fliegen, Mücken, Schlupfwespen, Pflanzenläuse, Kleinschmetterlinge oder Wanzen sind nur wenigen Experten vertraut. Es ist also keine Überraschung, wenn diese Tiere seitens des Naturschutzes stiefmütterlich behandelt werden. Wer mit einem Insektennetz durch die Vegetation fährt, findet eine Vielfalt unscheinbarer Insekten vor, die mit einiger Fachkompetenz zwar auf den ersten Blick als Wanzen, Käfer oder Fliegen zu erkennen sind, weitere Aussagen über die systematische Zugehörigkeit sind allerdings kaum möglich (Abb. 1). Dieses „Gewimmel der Insekten" kann in seiner Bedeutung aber gar nicht hoch genug eingeschätzt werden (Rosenberg et al. 1986). Neben ihrer Bedeutung als Nahrungsquelle für andere Tiergruppen spielen Insekten bei vielen „ökologischen Dienstleistungen" eine zentrale Rolle. Sie sind Blütenbestäuber, bauen als Destruenten organische Substanzen ab und sind sowohl Schädlinge (Kremen et al. 2007) als auch Gegenspieler von Schädlingen in der Landwirtschaft („Nützlinge", Abb. 2).

Abb. 1: Das Tagpfauenauge (Aglais io) ist ein bekannter Tagfalter, der leicht zu erkennen ist (links). Die Insektenvielfalt in einer Sammelprobe ist im Gegensatz dazu wenig überschaubar (rechts). (Fotos: R. Künast)

Abb. 2: Unscheinbare, aber wichtige Insekten: Eine Blütenfliege (Fam. Anthomyiidae) ist Blütenbestäuber (links), zwei Larven des Asiatischen Marienkäfers (Harmonia axyridis) fressen gemeinsam eine Blattlaus (rechts) und sind somit Gegenspieler dieser Pflanzensauger. (Fotos: R. Künast)

Der massive Rückgang der Insekten (z. B. Hallmann et al. 2017) hat entsprechend vielschichtige negative Auswirkungen auf unsere Ökosysteme.
Ist man darauf angewiesen, im Rahmen naturschutzfachlicher Studien die Vielfalt der Insekten zu beschreiben, stößt man auf gravierende Probleme. Wie bereits beschrieben, ist es durchaus möglich, eine „Fliege" als zur Ordnung der Zweiflügler zugehörig zu erkennen, allerdings ist „Fliege" als Beschreibung eines Insekts im wissenschaftlichen und naturschutzfachlichen Rahmen selten ausreichend. Fliegen oder gar parasitische Hautflügler anhand morphologischer Merkmale zu identifizieren, bedarf vieler Jahre Übung und einer ganz persönlichen „Leidenschaft". Entsprechend ist es in einer Zeit, die in akademischen Kreisen auf einen schnellen und standardisierten Wissensgewinn fokussiert ist, kaum verwunderlich, dass die Entomofaunistik sowohl in als auch außerhalb der Universitäten einen massiven Schwund von Anhängern verzeichnet (Hopkins & Freckleton 2002). Diese Entwicklung ist besonders dramatisch, da Artenlisten und Verbreitungskarten das Fundament des Natur- und Artenschutzes bilden. Der immer kleiner werdende Kreis an Taxonomen kann der Herausforderung, die das Artensterben der letzten Jahre stellt, kaum gerecht werden. Um diesem Dilemma zu begegnen, wird das DNA-Barcoding als ein neuer und vielversprechender Ansatz angesehen (Hebert et al. 2003).

DNA-Barcoding: Pro und Contra

Um DNA-Barcoding anzuwenden, ist keine profunde entomologische Kenntnis nötig. Im Prinzip wird bei einem unbekannten Insekt ein Abschnitt eines Gens (Cytochrom-Oxidase-1, CO1) auf der Mitochondrien-DNA abgelesen (sequenziert) und die ca. 300 Basenpaare lange Zielsequenz (der sogenannte „Barcode") mit einer Referenzdatenbank (z. B. BOLD Systems, NCBI GenBank) abgeglichen. Ab einer zuvor definierten Übereinstimmung der Sequenzen (z. B. 97 % oder höher) geht man von einer Artgleichheit aus. Die wichtigste Voraussetzung für eine zuverlässige Artbestimmung ist, dass von der jeweiligen Art die Sequenz der Barcode-Region in der Datenbank korrekt hinterlegt ist. Ein Vorteil des DNA-Barcoding besteht darin, dass nur ein kleiner Teil eines Tieres für die Analyse benötigt wird. Aus einem Insektenbein kann bereits die nötige Menge an DNA extrahiert werden. Aus diesen Gründen bietet sich das Barcoding von Insekten auch in der Naturschutzpraxis an (Geiger et al. 2016).
Die praktische Durchführung einer DNA-Barcoding-Studie ist heutzutage denkbar einfach. Während in den ersten Jahren der „Barcoding-Ära" für jedes Individuum der DNA-Barcode einzeln mithilfe der Sanger-Sequenzierung (Sanger et al. 1977) bestimmt werden musste, stehen seit etwa 15 Jahren die verschiedenen Methoden des „Next-Generation-Sequencing" (NGS) zur Verfügung (z. B. Mardis 2008). Mit Hilfe dieses als „Metabarcoding" bezeichneten Ansatzes lassen sich Proben von hunderten von verschiedenen Insekten gleichzeitig und damit schnell und im Vergleich zu den früheren Methoden kostengünstig sequenzieren. Der Ablauf ist weitgehend standardisiert und bedarf keiner taxonomischen Expertise. Für den Praktiker bedeutet das, dass lediglich eine Mischprobe von Insekten (z. B. in Ethanol konserviert) an ein entsprechendes Unternehmen geschickt werden muss, alles Übrige wird von der Firma automatisiert durchgeführt. Als Ergebnis erhält der Auftraggeber eine Artenliste inklusive Angaben zur Übereinstimmung der gefundenen Sequenzen mit solchen aus der Datenbank. Die Kosten für eine solche Analyse sind überschaubar, so beliefen sich die Kosten für das Metabarcoding in der hier durchgeführten Fallstudie auf ca. 80 Euro für eine Mischprobe mit bis zu 500 Individuen. Die Bearbeitungszeit durch die beauftragte Firma belief sich auf ca. zwölf Wochen.
Dass auch das DNA-Barcoding nicht alle Probleme lösen kann, liegt auf der Hand. Die größte Einschränkung erfährt die Methode dadurch, dass nur solche Arten eindeutig und fehlerfrei zugeordnet werden können, deren Barcode-Sequenzen in der Referenzdatenbank korrekt hinterlegt sind. Auch die Frage, wie sehr ein gefundener DNA-Barcode von einer hinterlegten Sequenz abweichen darf, um noch von derselben oder aber bereits von zwei verschiedenen Arten zu sprechen, ist nicht immer eindeutig zu beantworten. Ein weiterer großer Nachteil besteht darin, dass auf der Basis von Mischproben zwar Arten, aber keine Individuenzahlen bestimmt werden können, was gerade bei naturschutzfachlichen Fragen oft von wesentlicher Bedeutung ist.
Vergleiche zwischen klassischer morphologischer Artbestimmung und DNA-Barcoding sind aufwendig, da dafür sowohl Expertise im morphologischen als auch im molekulargenetischen Bereich benötigt wird. Eine 2020 bis 2021 an der Universität Kassel durchgeführte Masterarbeit (Künast 2021) hatte genau solch einen Vergleich zum Ziel, um unter anderem folgende Frage an einer konkreten Fallstudie zu untersuchen: Was sind die Möglichkeiten, was die Grenzen von Metabarcoding und klassischer morphologischer Artbestimmung von Insekten? Der durchführende Wissenschaftler befasst sich schon seit vielen Jahren im Rahmen eines Hobbies mit Insekten, ist allerdings kein Experte für eine bestimmte Gruppe.

Material

Die Insekten wurden im Sommer 2019 auf vier Versuchsflächen in Nordhessen gesammelt. Es handelt sich dabei um Ausgleichsflächen zum Flughafen Kassel-Calden bei Fürstenwald sowie ein benachbartes Naturdenkmal, die Koppensteine (Abb. 3). Insgesamt wurden 1 801 Insekten mit Kescherproben entlang von Transekten gesammelt. Jede Fläche wurde dafür an zehn Terminen aufgesucht. Die Insekten aus den so gewonnenen Sammelproben wurden in Konservierungsflüssigkeit (Ethanol) abgetötet und zunächst morphologisch mithilfe eines Binokulars und anschließend mittels DNA-Metabarcoding identifiziert.

Morphologische Identifikation

Für die morphologische Identifikation wurden die Mischproben zuerst in Morphospezies sortiert. Morphospezies sind Gruppen aus Insekten, welche gleiche

Abb. 3: Zusammenstellung der vier Versuchsflächen. Fläche 1: Koppensteine (Magerrasen und Naturdenkmal bei Fürstenwald, oben links), Fläche 2: Strukturreiche Weide (oben rechts), Fläche 3: Feuchtwiese (unten links) und Fläche 4: Strukturarme Weide (unten rechts) (Fotos: R. Künast)

morphologische (äußere) Merkmale aufweisen. Diesen Morphospezies wurden im Laufe der morphologischen Identifikation Artnamen zugeordnet. Dazu wurden primär öffentlich zugängliche Quellen genutzt und Bildvergleiche durchgeführt (Benisch 2021, Funk 2021). Als Resultat entstand für jede der vier Versuchsflächen eine Artenliste. In Tab. 1 sind beispielhaft die Funddaten von Marienkäfern (Fam. Coccinellidae) von der Fläche 2 aufgeführt. Obwohl in dieser Studie vor allem Vertreter unscheinbarer, aber dafür häufiger Insektengruppen gefangen wurden, werden hier bewusst die Daten der deutlich seltener gefangenen Marienkäfer illustrierend dargestellt, da diese allgemein bekannter und die zugehörigen Art- und Individuenzahlen übersichtlicher sind. Wenn eine Morphospezies nicht als Art identifiziert werden konnte, wurde dies durch ein „–“ gekennzeichnet und nur die Familie genannt (Tab. 1, a).

Die meisten gefangenen Individuen gehörten den vier in unserer Kulturlandschaft häufigsten Insektenordnungen an: Käfer (Coleoptera), Zweiflügler (Diptera), Schnabelkerfe (Heteroptera) und Hautflügler (Hymenoptera) (Abb. 4). Nur vereinzelt wurden Vertreter weiterer Ordnungen wie Ohrwürmer (Dermaptera) und Netzflügler (Neuroptera) gefangen. Erwartungsgemäß konnten gerade bei Zweiflüglern, vor allem aber bei Hautflüglern (hier in erster Linie kleinwüchsige Schlupfwespen), viele Morphospezies nicht bis zur Art identifiziert werden, wohingegen bei den Käfern und Schnabelkerfen der Anteil der bestimmbaren Arten deutlich höher lag.

Artbestimmung mittels DNA-Metabarcoding

Für die Barcoding-Analyse wurden die vier nach Versuchsflächen sortierten Insektenmischproben im Anschluss an die morphologische Identifikation zu AIM – Advanced Identification Methods GmbH geschickt. Dieses Unternehmen hat sich u. a. auf das Identifizieren von Insektenmischproben via DNA-Metabarcoding spezialisiert. Mit Hilfe von NGS-Technologien (Illumina-Sequenzierung) wurden für jede der vier Mischproben jeweils ca. 50 000 „reads“ (Einzelsequenzen der CO1-Region) erhalten. Diese Sequenzen wurden zunächst bioinformatisch aufbereitet (offensichtlich fehlerhafte Sequenzen aussortiert, [fast] identische Sequenzen gepoolt etc.) und anschließend in verschiedene Referenzdatenbanken für einen Artabgleich eingegeben. Als Resultat entstand für jede Versuchsfläche eine eigene Artenliste auf Basis der gefundenen DNA-Barcoding-Sequenzen (Tab. 1, b). Auf der Artenliste des DNA-Barcoding wurden einige Einträge gefunden, die nicht zu den eingeschickten Insektenproben passten. Besonders bei Heuschrecken war dieser Umstand auffällig: Es

Tab. 1: Beispielhafte Darstellung der Ergebnisse zur Artbestimmung der Marienkäfer von Fläche 2, anhand morphologischer Identifikation (a) und mittels DNA-Metabarcoding (b)

a) Artbestimmung nach morphologischen Merkmalen		
Familie	**Art**	**Anzahl Individuen**
Coccinellidae	Siebenpunkt-Marienkäfer *(Coccinella septempunctata)*	2
Coccinellidae	Vierzehnpunkt-Marienkäfer *(Propylea quatuordecimpunctata)*	1
Coccinellidae	Sechzehnpunkt-Marienkäfer *(Tytthaspis sedecimpunctata)*	2
Coccinellidae	Zweiundzwanzigpunkt-Marienkäfer *(Psyllobora vigintiduopunctata)*	1
Coccinellidae	– (nicht bestimmte Morphospezies)	1
b) Artbestimmung mithilfe von DNA-Barcoding		
Familie	**Art**	**Sequenzenübereinstimmung (Bold-Systems)**
Coccinellidae	Siebenpunkt-Marienkäfer *(Coccinella septempunctata)*	100%
Coccinellidae	Vierzehnpunkt-Marienkäfer *(Propylea quatuordecimpunctata)*	100%
Coccinellidae	Sechzehnpunkt-Marienkäfer *(Tytthaspis sedecimpunctata)*	100%

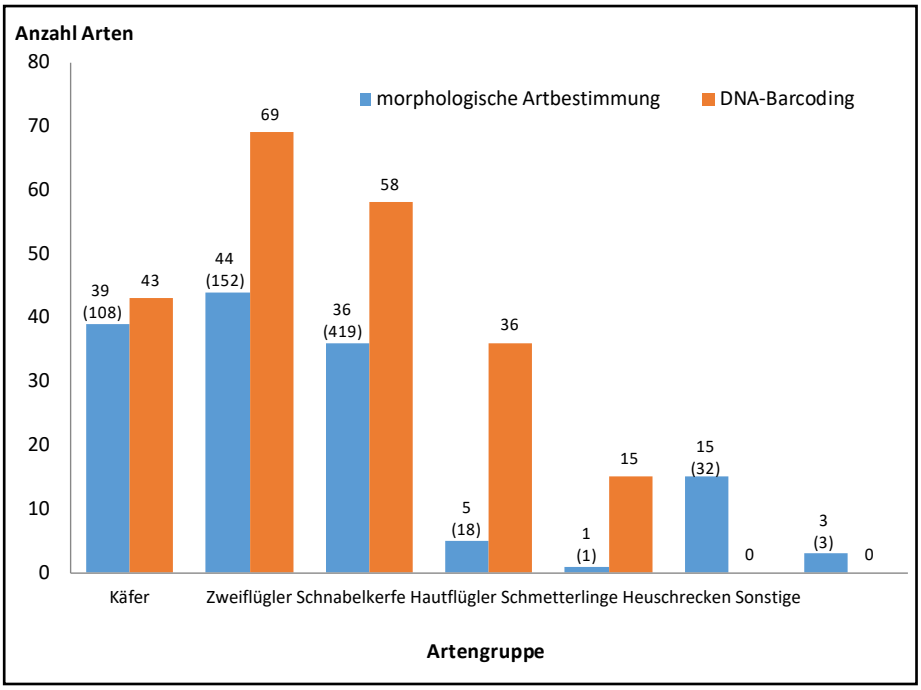

Abb. 4: Anzahl der Insektenarten (Summe aller vier Vesuchsflächen), die durch morphologische Bestimmung (blau) und DNA-Metabarcoding (orange) identifziert werden konnten, die Zahlen in Klammern geben die morphologisch bestimmten Individuenzahlen an.

wurden insgesamt 46 Individuen von Heuschrecken zum Sequenzieren geschickt. Bei der Sequenzierung wurden jedoch 308 verschiedene CO1-Gen-Sequenzen für diese Gruppe gefunden, was eindeutig eine zu große Anzahl von Heuschreckenarten vortäuschte. Die Ursache für das Auftreten dieser „überzähligen Arten" liegt wahrscheinlich darin, dass bei dieser Tiergruppe das CO1-Gen häufig in zusätzlichen Kopien in der Kern-DNA vorkommt, sogenannten „Numts" (nuclear mitochondrial DNA sequences), von denen die meisten funktionslos sind (Song et al. 2008). Für die hiesige Studie bedeutete das, dass die Ergebnisse des DNA-Metabarcodings in der Gruppe der Heuschrecken nicht verwertbar waren.

Vergleich von DNA-Barcoding und morphologischer Identifikation

Der Vergleich der durch morphologische Identifikation und durch DNA-Barcoding erhaltenen Artenlisten erlaubt einige konkrete Aussagen zu Vor- und Nachteilen der beiden Methoden: Insgesamt war im Rahmen dieser Studie die Zahl der identifizierten Arten beim DNA-Barcoding (Summe: 217 identifizierte Arten) höher als bei der morphologischen Identifikation (Summe: 143 identifizierte Arten). Wie erwartet gestaltete sich die Anwendbarkeit der beiden Methoden in Abhängigkeit von der taxonomischen Gruppe unterschiedlich: So war z. B. für die Gruppen der Käfer und Schnabelkerfen die morphologische Artbestimmung in der Lage, den größten Anteil an Individuen und Morphospezies korrekt und – ein klarer Vorteil gegenüber dem DNA-Barcoding – inklusive der Angabe von Abundanzen zu bestimmen. Gerade bei „schwierigen" Insektengruppen (wie z. B. unscheinbaren Schmetterlingen und Hautflüglern), die mit klassischen morphologischen Methoden außer für Experten nicht zu bearbeiten sind, bietet das DNA-Barcoding jedoch eine schnelle und kostengünstige Alternative. Trotz aller Standardisierung und Automatisierung ist ein Grundverständnis des Barcoding-Verfahrens und seiner möglichen Fehlerquellen jedoch unabdingbar, um die Daten korrekt zu interpretieren. In dieser Studie wurde das unter anderem durch das Auftreten von „Numts" bei der Sequenzierung von Heuschrecken deutlich. In der Praxis wird das DNA-Barcoding aufgrund verschiedener methodischer Fallstricke bislang vorwiegend für Direkt-

vergleiche zur Biodiversität auf verschiedenen Versuchsflächen genutzt (z. B. Sato et al. 2017), es kann aber auch einen wichtigen Beitrag zum Monitoring von Insekten leisten (Deiner et al. 2017, Young et al. 2021). Um bei einer konkreten Studie möglichst umfassende Aussagen zur Diversität von Insekten treffen zu können, sollte bei der Planung genau darauf geachtet werden, welche Daten benötigt werden, welche taxonomischen Gruppen im Fokus der Studie liegen und welcher Ansatz unter den gegebenen zeitlichen und finanziellen Ressourcen die besten Ergebnisse erbringen kann. Für viele Studien wird eine Kombination aus beiden Methoden (klassische morphologische Artbestimmung und DNA-Metabarcoding) die besten Ergebnisse liefern, um die Vorteile beider Verfahren voll auszuschöpfen (weiterführende Informationen zu diesem Aspekt in Künast 2021). Aber gerade, wenn es um die Bestimmung von Abundanzen und die Beschreibung und Sequenzzuordnung neuer Arten geht, kann man auf die Expertise der taxonomisch arbeitenden Entomologen nicht verzichten.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei PD Dr. Kai Füldner und Prof. Dr. Kurt Weising bedanken, die meine Masterarbeit betreut und begutachtet haben.

Kontakt

Robert Künast
67166 Otterstadt
Salierstraße 2
Robert.Kuenast@web.de

Literatur

Benisch, C. (2021): Käfer (Coleoptera) der deutschen Käferfauna (www.kerbtier.de, zuletzt geprüft am 6.4.2021)

Deiner, K.; Bik, H. M.; Mächler, E.; Seymour, M.; Lacoursière-Roussel, A.; Altermatt, F.; Creer, S.; Bista, I.; Lodge, D. M.; De Vere, N.; Pfrender, M. E.; Bernatchez, L. (2017): Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. Mol. Ecol. 26: 5872-5895. DOI: 10.1111/mec.14350

Funk, W. (2021): Insekten – Box: Steckbriefe (www.insektenbox.de, zuletzt geprüft am 6.4.2021)

Geiger, M. F.; Moriniere, J.; Hausmann, A.; Haszprunar, G.; Wägele, W.; Hebert, P. D. N.; Rulik, B. (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

Hallmann, C. A.; Sorg, M.; Jongejans, E.; Siepel, H.; Hofland, N.; Schwan, H.; Stenmans, W.; Müller, A.; Sumser, H.; Hörren, T.; Goulson, D.; De Kroon, H. (2017): More than 75 percent decline over 27 years in total flying insect biomass in protected areas. PLoS ONE 12(10): e0185809, DOI: 10.1371/journal.pone.0185809

Hebert, P. D. N.; Cywinska, A.; Ball, S. L.; Dewaard, J. R. (2003): Biological identifications through DNA barcodes. Proc. R. Soc. B 270(1512): 313-321. DOI: 10.1098/rspb.2002.2218

Hopkins, G. W.; Freckleton, R. P. (2002): Declines in the numbers of amateur and professional taxonomists: implications for conservation. Anim. Conserv. 5(3): 245-249. DOI: 10.1017/S1367943002002299

Kremen, C.; Williams, N. M.; Aizen, M. A.; Gemmill-Herren, B.; Lebuhn, G.; Minckley, R.; Packer, L.; Potts, S. G.; Roulston, T.; Steffan-Dewenter, I.; Vázquez, D. P.; Winfree, R.; Adams, L.; Crone, E. E.; Greenleaf, S. S.; Keitt, T. H.; Klein, A.-M.; Regetz, J.; Ricketts, T. H. (2007): Pollination and other ecosystem services produced by mobile organisms: a conceptual framework for the effects of land-use change. Ecol. Lett. 10(4): 299-314. DOI: 10.1111/j.1461-0248.2007.01018.x

Künast, R. (2021): Naturschutz zwischen Tradition und Fortschritt. Konzept für eine innovative Methode zur Messung entomologischer Vielfalt auf Ausgleichsflächen in Calden-Fürstenwald. MSc-Arbeit Univ. Kassel.

Mardis, E. R. (2008): Next-generation DNA sequencing methods. Ann. Rev. Genomics Hum. Genet. 9: 387-402. DOI: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164359

Riedel, W.; Lange, H.; Jedicke, E.; Reinke, M. (Hrsg.) (2016): Landschaftsplanung. 3. Aufl. Berlin, Heidelberg. 546 S.

Rosenberg, D. M.; Danks, H. V.; Lehmkuhl, D. M. (1986): Importance of insects in environmental impact assessment. Environ. Manage. 10: 773-783, DOI: 10.1007/BF01867730

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74(12): 5463-5467, DOI: 10.1073/pnas.74.12.5463.

Sato, H.; Sogo, Y.; Doi, H.; Yamanaka, H. (2017): Usefulness and limitations of sample pooling for environmental DNA metabarcoding of freshwater fish communities. Sci. Rep. 7: 14860. DOI: 10.1038/s41598-017-14978-6

Song, H.; Buhay, J. E.; Whiting, M. F.; Crandall, K. A. (2008): Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 105(36): 13486-13491. DOI: 10.1073/pnas.0803076105

Young, R. G.; Milián-García, Y.; Yu, J.; Bullas-Appleton, E.; Hanner, R. H. (2021): Biosurveillance for invasive insect pest species using an environmental DNA metabarcoding approach and a high salt trap collection fluid. Ecol. Evol. 11: 1558-1569. DOI: 10.1002/ece3.7113