

1 DNA-Metabarcoding - Auswertung von Insektensamples

1.1 Hintergrund

Der Rückgang der Artenzahlen von Insekten, Spinnen und anderen wirbellosen Tieren ist Teil der Biodiversitätskrise, welche seit Beginn der Industrialisierung und im Zuge der Intensivierung der Landnutzung bei allen Organismengruppen festzustellen ist. Dieser Verlust der Vielfalt von Insekten in den letzten Jahren (Sanchez-Bayo et al. 2019) stellt weltweit ein großes Problem dar, nicht zuletzt auch für die Aufrechterhaltung der Funktionalität unserer Ökosysteme. Angesichts dieser alarmierenden Zahlen besteht die Notwendigkeit, möglichst schnell ein dauerhaftes und flächendeckendes Insektenmonitoring aufzubauen. Solche Diversitätserhebungen sind jedoch sehr zeit- und kostenaufwändig. Die großen Mengen an Insekten, welche bei diesen Untersuchungen anfallen, stellen selbst für erfahrene Entomologen eine Herausforderung dar. In der Regel bedarf es unterschiedlicher Experten für die verschiedenen taxonomischen Gruppen, um die in einer Probe enthaltenen Tiere bestimmen zu können. Nicht immer sind solche Experten greifbar – denn die Verfügbarkeit anerkannter Taxonomen hat in den vergangenen Jahrzehnten stark abgenommen (Mailky 2019). DNA-basierte Methoden bieten hier eine innovative Lösungsmöglichkeit für dieses Dilemma, da mit ihrer Hilfe in verhältnismäßig kurzer Zeit zuverlässige und überprüfbare Daten generiert werden können. In zahlreichen Studien hat der Einsatz molekularer Methoden bewiesen, dass damit ein großflächiges, standardisiertes und regelmäßiges Biodiversitätsmonitoring möglich wird, was z.B. auch eine rasche und einfache Evaluierung von etwaigen gesetzten Maßnahmen erlaubt.

Grundsätzlich stehen verschiedene Möglichkeiten zur molekularen Artidentifikation zur Verfügung. Die derzeit am häufigsten eingesetzten Methoden sind das DNA-Barcoding (Hebert & Gregory 2005) als auch das DNA-Metabarcoding (Taberlet et al. 2012). In beiden Fällen bedient man sich der Vervielfältigung und des Lesens eines DNA-Abschnitts, welcher anhand eines Vergleiches mit Referenzdatenbanken, eine Identifikation der Arten erlaubt.

1.2 Methodik Metabarcoding

Beim DNA-Metabarcoding werden die Individuen nicht einzeln erfasst. Dieses Verfahren ermöglicht, aus Mischproben (Englisch „Bulk samples“) die darin enthaltenen Organismen anhand Ihrer DNA zu identifizieren und so umfangreiche Artenlisten von Insekten und anderen Arthropoden zu generieren. Es handelt sich somit um eine genetische Analyse einer Probe, welche sich aus einer Vielzahl von Individuen zusammensetzt. Die Proben, die hier untersucht werden, können aus unterschiedlichen Typen von Insektenfallen stammen. Dazu zählen beispielsweise Malaisefallen (weiße Fangzelte, benannt nach den Entomologen René Malaise), Bodenfallen (Barberfallen), Flugabfangfallen (Fensterfallen), Gelbschalen oder auch

Kicknetzproben, wie sie zur Erhebung des Makrozoobenthos in Gewässern eingesetzt werden. Ebenso lassen sich aber auch die Artengemeinschaften in Boden- oder Wasserproben molekular identifizieren, sowie auch das Beutespektrum von insektenfressenden Tieren anhand von DNA-Analysen aus Kotproben (z.B. Gordon et al 2018), Speiballen oder dem Mageninhalt (Waldner & Traugott 2012). Selbst Mischproben mit Substrat können in einem Mixer komplett zerkleinert und als Basis für eine erfolgreiche DNA-Analyse genutzt werden (Pereira-da-Conceicao et al. 2019). Für Fließgewässerorganismen aus finnischen Flüssen konnten z. B. über die DNA-basierte Methode deutlich mehr bewertungsrelevante Tiere identifiziert werden als im Vergleich zu den klassischen Verfahren (Elbrecht et al. 2017). Zudem können auch neue Indikatorarten, die stärker auf Stressfaktoren reagieren, klar unterschieden werden (Macher et al. 2016).

Wenn man die Organismen anhand ihrer DNA identifizieren möchte, ist dies bereits beim Aufstellen der Fallen bzw. bei der Probennahme zu berücksichtigen. Die Beständigkeit und damit die Verwendbarkeit von DNA für eine Identifikation ist von vielen Faktoren abhängig. So kann sie durch Konservierungsflüssigkeiten oder Zusätze zerstört werden. Zahlreiche eingesetzte Fangflüssigkeiten eignen sich nicht zur molekularen Weiterverarbeitung, da sie Einfluss auf die Qualität der DNA nehmen. Daher empfiehlt es sich etwa anstatt von Propylenglykol, einer gängigen Fangflüssigkeit für Insektenfallen, eine gesättigte Salzlösung mit einem Tropfen Spülmittel zu verwenden. Entsprechend kürzer können die Fallen im Gelände exponiert bleiben bzw. müssen diese in zeitlich engeren Abständen geleert werden um eine Zersetzung der gefangenen Tiere vorzubeugen. Die Proben sollten daher möglichst gekühlt ins Labor transportiert werden. Auch bei der Lagerung der Mischproben muss auf den Erhalt der DNA Rücksicht genommen werden. In Abhängigkeit von den Lagerbedingungen, insbesondere auch der Temperatur zersetzt sie sich sonst langsam im Laufe der Zeit (Ssymank et al 2018). Idealerweise wird daher hochprozentiges Ethanol als Fixiermedium verwendet (95-98%) - keine Formaldehydlösungen oder ähnliches - und die Proben werden dunkel und kühl gelagert.

Bei der anschließenden Probenaufbereitung im Labor unterscheiden wir zwei Herangehensweisen: die destruktive und die nicht-destruktive Methode.

- Beim destruktiven Verfahren wird die Mischprobe in der Regel zuerst getrocknet und mit einem Mixer oder eine Kugelmühle homogenisiert und daraus die von allen Individuen gewonnen (z.B. Hajibabaei et al. 2011).
- Bei nicht destruktiven Verfahren erfolgt die Gewinnung der DNA entweder aus dem dekantierten Probenalkohol (Hajibabaei et al. 2012) oder aber die Mischprobe wird getrocknet, gesamt in Lysispuffer überführt und daraus die DNA isoliert (Braukmann et al. 2018).

DNA-Methoden mit Erhalt des Probenmaterials sind den destruktiven Ansätzen vorzuziehen, da sie bei Bedarf eine „konventionelle“ morphologische Bestimmungen zu einem späteren Zeitpunkt ermöglichen. Sie haben den Vorteil, dass bei Bedarf im Nachhinein auch Aussagen zur Abundanz bzw. Biomasse möglich sind bzw. das Material für eine Nachbearbeitung zur Verfügung steht. Bei den nicht invasiven Methoden ist man dazu übergegangen, den primären Fixieralkohol zu entfernen und die DNA aus dem frischen Alkohol, der nachträglich dazu gegeben wird, zu analysieren. Mitunter ist eine Größenfraktionierung der Proben vor der DNA-Extraktion von Vorteil, um kleinere und weniger abundante Arten erfolgreich zu detektieren und so eine bessere Auflösung zu erhalten.

Aus der gemahlten Mischprobe bzw. dem Lysat wird die DNA der Tiere isoliert. Hierzu gibt es zahlreiche kommerzielle Extraktionskits, deren Effizienz und Preis sich deutlich unterscheiden kann. Nach der DNA Extraktion erfolgt die Vervielfältigung des Barcoding Abschnitts im Rahmen einer Polymerasekettenreaktion (kurz „PCR“). Bei der anschließenden Hochdurchsatz-Sequenzierung (HTS), auch Next generation sequencing (NGS) genannt, werden die Basenabfolgen dieser Genabschnitte für mehrere Zehn- bis Hunderttausend DNA Fragmente aus der Probe mittels Hochdurchsatztechnologien simultan gelesen. Die so generierten Millionen von DNA-Sequenzen werden im Zuge der bioinformatischen Verarbeitung durch Algorithmen sortiert und können durch den Abgleich mit öffentlich zugänglichen Sequenzdatenbanken (NCBI, BOLD Systems) den verschiedenen Arten zugeordnet werden. Durch die individuelle molekulare Markierungen von einzelnen Proben können viele derartige Mischproben parallel analysiert werden, wodurch mehrere hunderte Proben parallel bearbeitet werden können (Brandon-Mong et al. 2015, Kitson et al. 2018).

Eine Standardisierung der kompletten Prozesskette auf internationaler Ebene, von der Probenentnahme über die Laboranalysen und die Bioinformatik ist in Vorbereitung (z. B. Europäisches Komitee für Normung (CEN)), sodass zu erwarten ist, dass in den kommenden Jahren erste Standards in diesem Bereich vorliegen werden. Das Analyseverfahren für ein Metabarcoding aus Insektenmischproben beinhaltet konkret folgende Schritte:

1. Vorbereitung der Proben (destruktiv, nicht destruktiv)
2. DNA Extraktion
3. PCR Amplifikation (Vervielfältigung des Barcoding-Gens)
4. Qualitätskontrolle
5. Vorbereitung der NGS-Library
6. Parallelsequenzierung
7. Bioinformatische Analyse
8. Sequenzabgleich zur Artenidentifikation

Der Umfang an verfügbaren DNA-Sequenzen in den öffentlich zugänglichen Referenzdatenbanken wächst täglich. Hier ist es allerdings wichtig zu berücksichtigen, dass in den Datenbanken mitunter auch Fehler zu finden sind. So können z.B. die hinterlegten Arten falsch bestimmt worden sein, oder es wurden irrtümlich Sequenzen von Pilzen oder Bakterien, welche sich in den Tierproben befanden, hochgeladen. Daher empfiehlt es sich, vorzugsweise kuratierte Datenbanken für eine Identifizierung mit den generierten Sequenzen zu heranzuziehen (z.B. in GBOL, ABOL). Darüber hinaus sollte man die Daten für eine korrekte Interpretation der Ergebnisse auch einem Plausibilitäts-Check unterziehen. Hierzu bedarf es einiges an Erfahrung, weshalb es sich empfiehlt auf Anbieter zurückzugreifen die entsprechendes Knowhow besitzen.

1.3 Vorteile und Herausforderungen

Ein klarer Vorteil des Metabarcoding gegenüber herkömmlichen Methoden zur Erfassung der Diversität in Mischproben von Insekten und anderen wirbellosen Tieren liegt darin, dass auch ohne Spezialisten für die verschiedenen taxonomischen Gruppen und aufwändige Einzelbestimmungen rasch Ergebnisse in Form umfassender Taxalisten generiert werden können. Man erhält dabei eine unvergleichbar breite taxonomische Abdeckung bei vielen Gruppen bis zur Art, wobei die Bestimmungsmöglichkeiten täglich durch die Einträge in die Sequenzdatenbanken wachsen. Die molekulare Artidentifikation ist unabhängig vom Stadium und Geschlecht der Tiere. So können auch ansonsten oftmals schwer bestimmbare Jugendstadien eindeutig anhand ihrer DNA identifiziert werden. Die generierten Daten sind sequenzbasiert und somit jederzeit durch einen wiederholten Datenbankabgleich überprüfbar. Auch können bislang nicht beschriebene bzw. noch nicht in DNA-Datenbanken vertretene Arten, als sogenannte molecular operational taxonomic units (MOTUs) miterfasst werden. Dadurch besteht die Möglichkeit, Gesamtmessgrößen der α -Diversität wirbellosen Tieren aus Serien von Mischproben zu erhalten. Ausgehend von nur einer Probe können auch mehrere Analysen durchgeführt werden. Wenn man beispielsweise neben einer Erfassung der Biodiversität gezielt nach bestimmten Arten suchen möchte, wie etwa nach Indikatorarten, oder geschützten oder invasiven Spezies. Hierzu eignen sich insbesondere Analyseverfahren, welche sich spezifischer molekularer Sonden bedienen, anhand derer gezielt nach der DNA der Zielarten gesucht werden kann.

DNA-Extrakte lassen sich bei entsprechender Lagerung über lange Zeit aufbewahren, sodass weitere Analysen auch noch viele Jahre nach der eigentlichen Probennahme durchgeführt werden können, etwa wenn man wissen möchte, ob zu einer bestimmten Zeit diese oder jene Arten (noch) in einem Gebiet vorgekommen sind oder ob sie bereits verschwunden waren. Darüber hinaus können neben der Artzusammensetzung auch weitergehende Informationen

aus den Mischproben gewonnen werden. So wird z.B. Pollen von entomophilen Pflanzen eingetragen, anhand derer auch eine Bestimmung der vorkommenden Pflanzenarten möglich ist. Auch nicht-invasive Ansätze, wo die nachzuweisenden Tiere sich selbst nicht in den Proben befinden, sind möglich: So hat eine aktuelle Studie kürzlich gezeigt, dass man blütenbesuchende Insekten und Spinnentiere, allein anhand der DNA-Spuren, welche sie auf den Blüten hinterlassen mittels Metabarcoding identifizieren kann (Thomsen & Sigaard 2019).

Wie jede Methode bringt auch der Einsatz von molekularen Methoden gewisse Einschränkungen mit sich. Neben der Information, welche Arten in einem bestimmten Lebensraum vorkommen, möchte man in der Praxis meist auch wissen, wie groß die Individuenzahl ist. Hier gilt zu berücksichtigen, dass eine Quantifizierbarkeit über DNA-basierte Methoden nur bedingt möglich ist. Zwar korreliert die Menge an DNA in einer Mischprobe zu einem gewissen Grad mit der Biomasse der darin enthaltenen Organismen, aber man erhält keine Angaben zu den sich in der Probe befindlichen Individuenzahlen. Auch Angaben zum Geschlechterverhältnis oder zum Entwicklungsstadium sind derzeit nicht ableitbar. Darüber bestehen in den Referenzdatenbanken für einzelne Tiergruppen, wie z.B. Haut- und Zweiflügler, noch Lücken. Um diese entsprechend befüllen zu können, ist eine enge Kooperation mit Taxonomen und Museen entscheidend. Diese wird aktuell sehr erfolgreich in den nationalen und internationalen Barcode-Projekten wie GBOL, ABOL und SwissBOL umgesetzt. Entscheidend für den erfolgreichen Einsatz der neuen DNA-basierten Techniken wie dem Metabarcoding im Biodiversitätsmonitoring von Insekten wird in den nächsten Jahren auch der Aufbau von Kompetenzzentren an Universitäten, Museen, Behörden und der Industrie sein. Darüber hinaus ist die Einbeziehung politischer Entscheidungsträger und der breiteren Gesellschaft wichtig, um der großen Aufgabe des Biodiversitätsverlusts zu begegnen. Dank der ungleich schnelleren Analyse von Mischproben aus Insektenfall bietet der Einsatz dieser neuartigen Technologien nun erstmals auch die Möglichkeit, die Bevölkerung im großen Stil in Biodiversitätserhebungen mit einzubeziehen.

Autoren:

Dr. Corinna Wallinger, Sinsoma GmbH – DNA Analysis Services, www.sinsoma.com

Prof. Dr. Michael Traugott, Institut für Zoologie, Universität Innsbruck

1.4 Literatur

Brandon-Mong et al. (2015) DNA metabarcoding of in-sects and allies: an evaluation of primers and pipelines. – Bulletin of entomological research 105(6): 717–727.

- Braukmann et al. (2018) Revealing the Complexities of Metabarcoding with a Diverse Arthropod Mock Community. *bioRxiv*, 1– 40.
- Elbrecht et al. (2017) Assessing strengths and weaknesses of DNA metabarcoding-based macroinvertebrate identification for routine stream monitoring. *Methods in Ecology and Evolution* 8, pp. 1265-1275.
- Gordon et al. (2019) Molecular diet analysis finds an insectivorous desert bat community dominated by resource sharing despite diverse echolocation and foraging strategies *Ecology & Evolution* 9 (6) 3117-3129 <https://doi.org/10.1002/ece3.4896>
- Hajibabaei et al. (2011) Environmental barcoding: A next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos. *PLoS ONE*, 6, 1– 7.
- Hajibabaei et al. (2012) Assessing biodiversity of a freshwater benthic macroinvertebrate community through non-destructive environmental barcoding of DNA from preservative ethanol. *BMC Ecology*, 12, 28.
- Hebert & Gregory (2005) The Promise of DNA Barcoding for Taxonomy. *Systematic Biology* 54, pp. 852-859.
- Kitson et al. (2016) Nested metabarcode tagging: a robust tool for studying species interactions in ecology and evolution. *bioRxiv*, 035071.
- Macher et al. (2016) Multiple-stressor effects on stream invertebrates: DNA barcoding reveals contrasting responses of cryptic mayfly species. *Ecological Indicators* 61, pp. 159-169.
- Malicky (2019) Sterben die Spezialisten aus? In: Vom Handwerk der Entomologie; Ed. Malicky, Springer Spektrum, Lunz a See, pp. 261-265 <https://doi.org/10.1007/978-3-662-59525-1>
- Pereira-da-Conceicao, et al. (2019) Metabarcoding unsorted kick-samples facilitates macroinvertebrate-based biomonitoring with increased taxonomic resolution, while outperforming environmental DNA. *bioRxiv* 792333, 2019.
- Sanchez-Bayo et al. (2019) Review: Worldwide decline of the entomofauna: A review of its drivers. *Biological Conservation*, pp. 8-27
- Ssymank et al. (2018) Praktische Hinweise und Empfehlungen zur Anwendung von Malaisefallen für Insekten in der Biodiversitätserfassung und im Monitoring Series *Naturalis* Vol. 1), pp. 1-12.
- Taberlet et al. (2012) Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding (2012) *Molecular Ecology* 21(8) 2045-2050. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x>

Thomsen & Sisgaard (2019) Environmental DNA metabarcoding of wild flowers reveals diverse communities of terrestrial arthropods. *Ecology & Evolution* 9(4) pp. 1665-1679.

Waldner & Traugott (2012) DNA-based analysis of regurgitates: a noninvasive approach to examine the diet of invertebrate consumers. *Molecular Ecology Resources* 12 (4) 669-675 <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2012.03135.x>