



Abschlussbericht

Genetische Artbestimmung – ein Beitrag zur Qualitätssicherung in der biologischen Analytik von Oberflächengewässern

Projektlaufzeit: 2016 – 2020

UmweltProjekt

Impressum

Genetische Artbestimmung – ein Beitrag zur Qualitätssicherung in der biologischen Analytik von Oberflächengewässern

Herausgeber:

Bayerisches Landesamt für Umwelt (LfU)
Bürgermeister-Ulrich-Straße 160
86179 Augsburg
Tel.: 0821 9071-0
E-Mail: poststelle@lfu.bayern.de
Internet: www.lfu.bayern.de/

Konzept/Text:

Dr. Cornelia Morawetz, Dr. Margit Schade
LfU, Referat 73

Redaktion:

Dr. Cornelia Morawetz, Dr. Margit Schade
LfU, Referat 73

Bildnachweis

Alle Bilder des Zwischenberichtes sind im Rahmen des Projektes von Mitarbeiterinnen des LfU gemacht worden.

Stand:

August 2021

Diese Publikation wird kostenlos im Rahmen der Öffentlichkeitsarbeit der Bayerischen Staatsregierung herausgegeben. Jede entgeltliche Weitergabe ist untersagt. Sie darf weder von den Parteien noch von Wahlwerbenden oder Wahlhelfern im Zeitraum von fünf Monaten vor einer Wahl zum Zweck der Wahlwerbung verwendet werden. Dies gilt für Landtags-, Bundestags-, Kommunal- und Europawahlen. Missbräuchlich ist während dieser Zeit insbesondere die Verteilung auf Wahlveranstaltungen, an Informationsständen der Parteien sowie das Einlegen, Aufdrucken und Aufkleben parteipolitischer Informationen oder Werbemittel. Untersagt ist gleichfalls die Weitergabe an Dritte zum Zweck der Wahlwerbung. Auch ohne zeitlichen Bezug zu einer bevorstehenden Wahl darf die Publikation nicht in einer Weise verwendet werden, die als Parteinahme der Staatsregierung zugunsten einzelner politischer Gruppen verstanden werden könnte. Den Parteien ist es gestattet, die Publikation zur Unterrichtung ihrer eigenen Mitglieder zu verwenden.

Das Werk ist urheberrechtlich geschützt. Alle Rechte sind vorbehalten. Die publizistische Verwertung der Veröffentlichung – auch von Teilen – wird jedoch ausdrücklich begrüßt. Bitte nehmen Sie Kontakt mit dem Herausgeber auf, der Sie – wenn möglich – mit digitalen Daten der Inhalte und bei der Beschaffung der Wiedergaberechte unterstützt.

Diese Publikation wurde mit großer Sorgfalt zusammengestellt. Eine Gewähr für die Richtigkeit und Vollständigkeit kann dennoch nicht übernommen werden. Für die Inhalte fremder Internetangebote sind wir nicht verantwortlich.



BAYERN | DIREKT ist Ihr direkter Draht zur Bayerischen Staatsregierung. Unter Tel. 0 89 12 22 20 oder per E-Mail unter direkt@bayern.de erhalten Sie Informationsmaterial und Broschüren, Auskunft zu aktuellen Themen und Internetquellen sowie Hinweise zu Behörden, zuständigen Stellen und Ansprechpartnern bei der Bayerischen Staatsregierung.

Inhaltsverzeichnis

Kurzfassung	4
1 Einleitung	5
2 Methodik	5
2.1 Probenahme	6
2.2 DNA-Extraktion	6
2.3 Primer-Design, Amplifikation des Markergens und Gelelektrophorese	6
2.4 Sequenzierung und Sequenz-Analyse	8
2.5 Datenbankanalyse	9
3 Ergebnisse und Diskussion	9
3.1 Probenkonservierung	9
3.2 Methodenentwicklung und Primerdesign	9
3.3 Untersuchte Makrozoobenthos-Proben	10
3.4 Genetische Bestimmung der Makrozoobenthos-Proben mittels Sequenzanalyse	11
3.4.1 Gattung und Art bestätigt	13
3.4.2 Gattung bestätigt, Art weicht von morphologischer Bestimmung ab	14
3.4.3 Gattung bestätigt, Art bestimmt	15
3.4.4 Gattung bestätigt, Artbestimmung genetisch nicht möglich	16
3.4.5 Gattung und Art weichen von morphologischer Bestimmung ab	17
3.4.6 Gattung und Art bestimmt	18
3.5 Publikationen	19
4 Fazit	19
5 Literatur	20

Kurzfassung

In dem Projekt „Genetische Artbestimmung – ein Beitrag zur Qualitätssicherung in der biologischen Analytik von Oberflächengewässern“ wurde der Einsatz von DNA-Barcoding als Instrument der biologischen Qualitätssicherung bei der Artbestimmung von Einzelorganismen des Makrozoobenthos geprüft. Es wurde die Analytik bezüglich Probenkonservierung und DNA-Extraktion optimiert und die Methodik zur Bestimmung von Arthropoden durch das Design neuer Primer für die Vervielfältigung des spezifischen Markergens COI (Untereinheit 1 der Cytochrom-c-Oxidase) weiterentwickelt. Nach Etablierung und Optimierung der Methodik wurden Makrozoobenthos-Proben für die Wasserwirtschaftsämter und die Regierungen im Rahmen des biologischen Fließgewässer-Monitorings nach Wasserrahmenrichtlinie mittels DNA-Barcoding untersucht.

Die Mehrzahl der zu untersuchenden Proben (ca. 60 %) gehörte den EPT-Taxa an (Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera), wobei Köcherfliegen (Trichoptera) mit 43 % den deutlich größten Anteil ausmachten. Auch Coleoptera (Käfer) waren mit 14 % häufig vertreten. Weitere Proben waren den Zweiflüglern, Egel, Schecken, Krebstieren, Muscheln und Libellen zuzuordnen.

81 % der Proben konnten mittels DNA-Barcoding bis auf Art-Niveau bestimmt werden. Bei 7 % der Proben war eine Bestimmung bis zur Gattungsebene möglich. Die DNA-Sequenzen des COI-Gens unterscheiden sich hier bei verschiedenen Arten der Gattung nicht stark genug, um eine eindeutige Zuordnung auf Spezies-Ebene vornehmen zu können. Für etwa 4 % der Proben konnte beim Abgleich der DNA-Sequenzen mit den Referenzdatenbanken keine Zuordnung zu einer Gattung oder Art getroffen werden. Das zeigt, dass die Datenbanken noch Lücken aufweisen. Bei 8 % der Proben konnte keine DNA-Sequenz bestimmt werden. Hier wurde entweder das Barcoding-Gen COI nicht vervielfältigt (Probe zu stark degradiert; Primer passen nicht) oder die Sequenzierung des amplifizierten Gens lieferte eine Mischsequenz (z.B. durch eine Kontamination der Probe).

Der Vergleich der Ergebnisse von morphologischer und genetischer Bestimmung ergab für die Mehrzahl der Proben eine Übereinstimmung. Einige Proben, die anhand morphologischer Merkmale nicht eindeutig identifizierbar waren, konnten mit Hilfe des DNA-Barcoding exakt bestimmt werden. Bei einem geringen Teil der Proben wurden Abweichungen zwischen klassischer und genetischer Identifizierung festgestellt. Die Gründe hierfür müssen jeweils im Einzelfall geklärt werden. So kann bei der genetischen Bestimmung die DNA eines Nicht-Zielorganismus amplifiziert worden sein, beispielsweise von Beutetieren aus dem Mageninhalt des Zielorganismus oder durch Verunreinigungen beim Sammeln der Proben. Denkbar sind auch Fehler bei der morphologischen Bestimmung. Des Weiteren können die öffentlich zugänglichen Referenzdatenbanken – selbst wenn Qualitätssicherungsmaßnahmen durchlaufen werden – Fehler enthalten. Dies verdeutlicht wie wichtig es ist, die Datenbanken nicht nur mit weiteren Sequenzdaten zu füllen, sondern diese Daten auch einer sorgfältigen Qualitätskontrolle zu unterziehen.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse des Projekts, dass das DNA-Barcoding zur Artbestimmung von Einzelorganismen des Makrozoobenthos geeignet ist und ein wichtiges Instrument im Rahmen der biologischen Qualitätskontrolle darstellt. Es wurde mittlerweile als Baustein der biologischen Qualitätssicherung in Teil B 1.1 „Monitoring WRRL– Makrozoobenthosbeprobung in Fließgewässern“ des HB tGewA aufgenommen: Kap. 3.10 (Entnahme von Organismen) und Kap 4.3 (Genetische Analysen).

1 Einleitung

Die Einstufung des ökologischen Zustandes von Oberflächengewässern (Flüsse, Seen) basiert auf der Bestimmung der dort lebenden Gewässerorganismen. Für die Untersuchung werden die vier biologischen Qualitätskomponenten Makrozoobenthos (MZB), Makrophyten & Phytobenthos, Phytoplankton und Fische betrachtet. Konventionelle Bestimmungsmethoden für die jeweiligen Arten erfolgen über morphologische Merkmale. Sind diese Merkmale nicht zweifelsfrei erkennbar oder werden sie nur zeitweise ausgebildet, kann eine genetische Identifizierung (DNA-Barcoding) weiterhelfen. Die Identifizierung erfolgt dabei anhand der DNA-Sequenz eines spezifischen Markergens.

Ziel des Projekts war, die molekularbiologische Bestimmung von Makrozoobenthos mittels DNA-Barcoding am LfU zu etablieren, optimieren und anschließend in der Praxis anzuwenden. Dies soll die Wasserwirtschaftsämter bei der Artbestimmung von MZB unterstützen und als Instrument der biologischen Qualitätssicherung im Rahmen der Gewässerkartierung dienen.

Im ersten Teil des Projekts erfolgte die Etablierung der Methodik im Hinblick auf folgende Punkte:

- Probenahme und Lagerung der Proben
- Extraktion der DNA
- Primer-Design für das Markergen COI (Untereinheit 1 der Cytochrom-c-Oxidase), Optimierung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)
- Tests zur Anwendung der Methoden auf Makrozoobenthos-Proben

Im weiteren Verlauf des Projekts wurde die Methodik weiterentwickelt und optimiert (z.B. Entwicklung zusätzlicher Primer) und auf Proben der Wasserwirtschaftsämter angewendet.

2 Methodik

In Abbildung 1 sind die Verfahrensschritte bei der genetischen Artbestimmung von Einzelorganismen dargestellt.

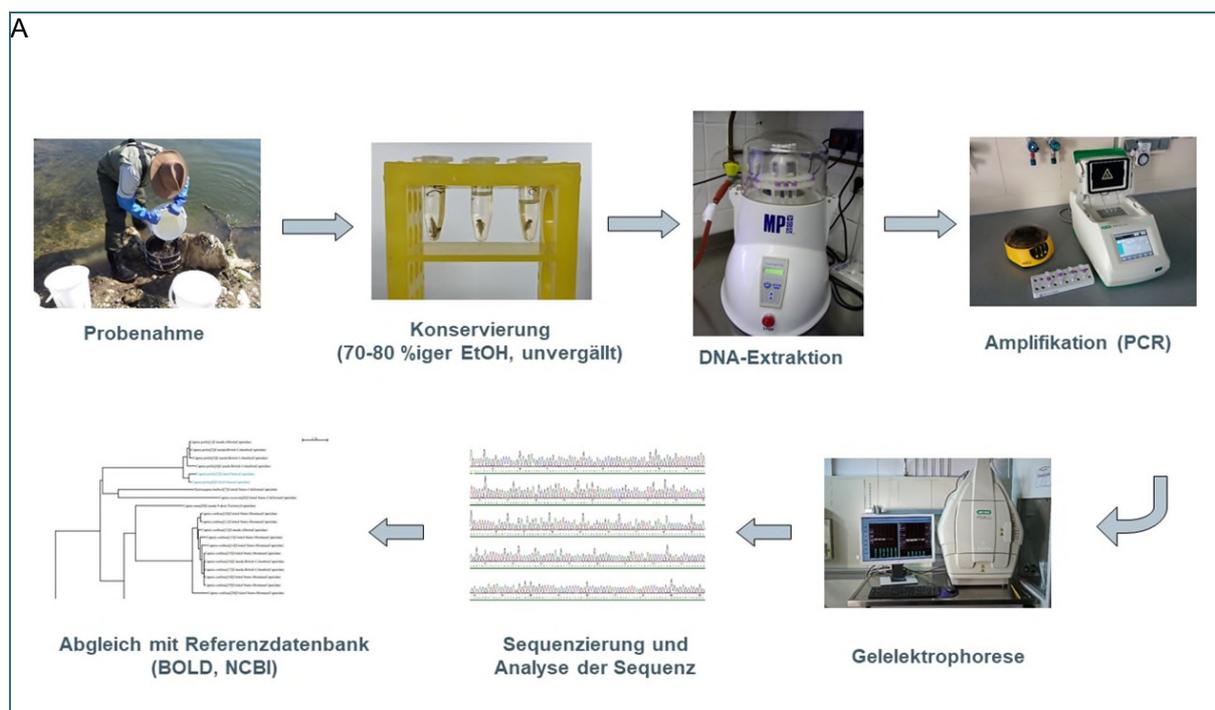


Abb. 1: DNA-Barcoding von Einzelorganismen: Arbeitsschritte

und Formeln in Excel entwickelt. Bei nicht-einheitlichen Sequenzen wurden sog. „wobble-bases“ verwendet. So bedeutet beispielsweise die wobble base „M“, dass die Hälfte der Primer an dieser Stelle ein Adenin (A), die andere Hälfte ein Cytosin (C) trägt. Die entwickelten Primer (siehe Tabelle 1 und Abbildung 3) wurden von externen Firmen (z. B. Biomers) synthetisiert. Diese wurden dann an *Daphnia magna* (Crustacea), *Hydropsyche incognita* (Ephemeroptera) und *Limnius volkmari* (Coleoptera) getestet.

Tab. 1: Verwendete Primer und deren Sequenzen (F = forward primer; R = reverse primer)

Primer		Sequenz (5' → 3')	Referenz
LCO1490	F	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer et al. (1994)
HCO2198	R	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	Folmer et al. (1994)
neofor	F	GATTATTTTCAACAAAYCAYAARGATATTGG	diese Studie
neo21	F	TYTCHACWAAYCAYAARGAYATYGG	diese Studie
neo41	F	TTYTCHACWAAYCAYAARGAYATTGG	diese Studie
neo81	F	TTTTCHACWAAYCAYAARGAYATTGG	diese Studie
fo1	F	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	diese Studie
neo43	F	TGATTTTTTGGTCAYCCTGAAGTTTA	diese Studie
TRI140	F	CTATAATGTTCTAGTWACAGCHCATGC	diese Studie
neo42	R	ACTTCWGGRTGWCCAAARAATC	diese Studie
neo82	R	ACTTCWGGRTGWCCAAARAATCA	diese Studie
f02	R	TGATTTTTTGGTCACCCTGAAGTTTA	diese Studie
y1w2r5	R	GCTCCYATAGAWARWACATARTGRAARTGRGC	diese Studie

Die Amplifikation des Markergens erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) in einem Thermocycler (iCycler) der Firma Bio-Rad. Der Reaktionsansatz (Gesamtvolumen 30 µl) enthielt 15 µl Hot-Star Taq Master-Mix (Qiagen), je 833 nmol/l forward und reverse Primer und 1 µl des DNA-Extrakts. Die optimale Temperatur für die Anlagerung der Primer (Annealing) wurde in Vorversuchen ermittelt und lag bei 40 °C. Folgendes Temperaturprotokoll wurde verwendet: 95 °C für 15 min (Aktivierung der Polymerase) und 40 Zyklen bei 95 °C für 30 s (Denaturierung), 40 °C für 30 s (Annealing) und 72 °C für 90 s (Elongation). Im Anschluss daran folgte ein finaler Elongationsschritt bei 72 °C für 7 min. Danach wurde die Temperatur bei 15 °C gehalten.

Zur Überprüfung von Menge und Qualität der amplifizierten Genabschnitte wurden je 7,5 µl der PCR-Produkte in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt. Um die Größe der Fragmente abschätzen zu können, wurde ein sog. DNA-Leiter auf das Gel aufgetragen, der DNA-Fragmente mit bekannter Größe enthält. Durch Vergleich mit diesem Größenstandard kann die Länge der amplifizierten DNA-Fragmente abgeschätzt werden. Das Ergebnis wurde fotografisch dokumentiert.

Bevor die PCR-Produkte zur Sequenzierung verschickt werden, müssen diese aufgereinigt werden, um überschüssige, nicht-eingebaute Primer und Nukleotide abzutrennen. Dies erfolgte durch eine en-

zymatische Behandlung mit dem ExoSAP-IT™ Express PCR Product Cleanup-Kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher). Dazu wurden je 5 µl des Exo/Sap-Reagenzes zu den PCR-Produkten gegeben und die Ansätze zunächst für 30 min bei 37 °C und danach für 30 min bei 85 °C inkubiert.

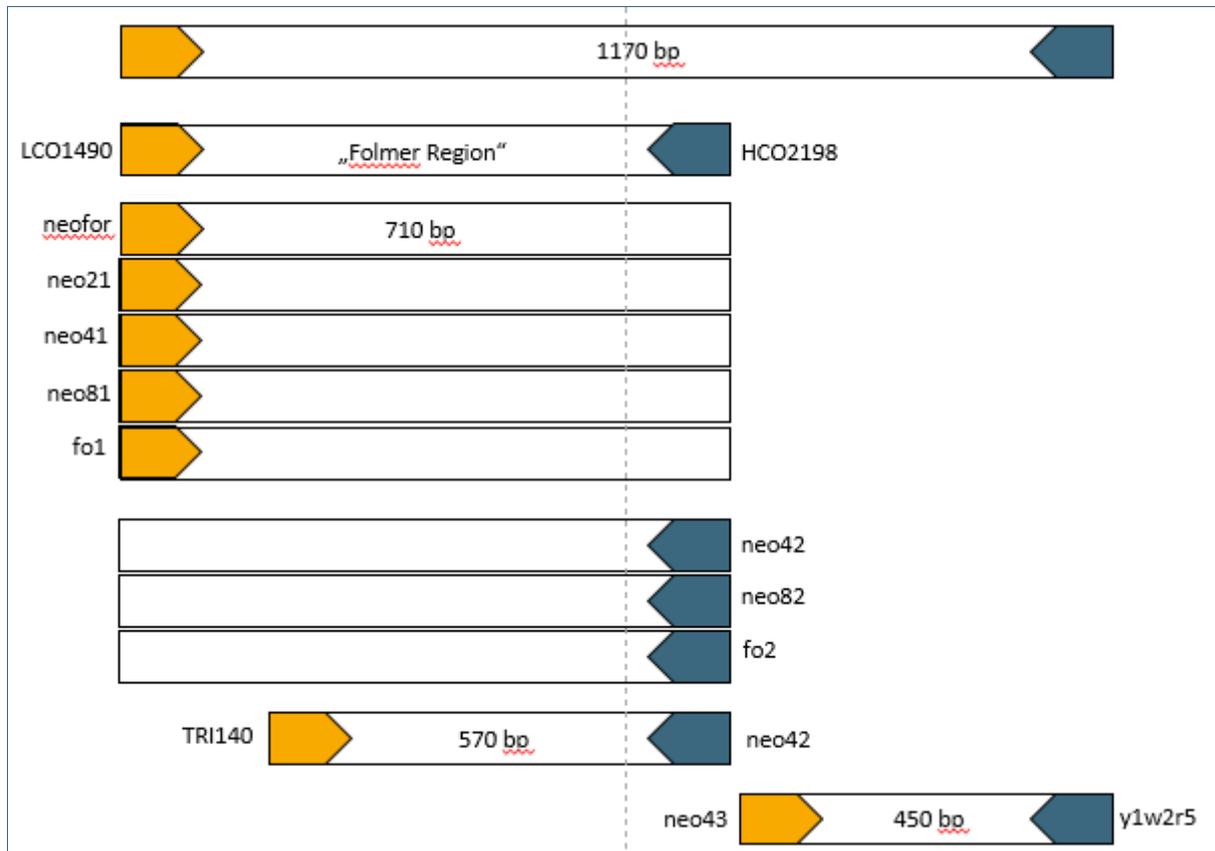


Abb. 3: Entwickelte Primer zur Amplifikation von Genabschnitten der Untereinheit 1 der Cytochrom-c-Oxidase und Länge der Amplifikate (bp: Basenpaare; orange: forward primer; grau: revers primer)

2.4 Sequenzierung und Sequenz-Analyse

Die Sequenzierung der PCR-Produkte erfolgte durch die Firma Eurofins. Die Sequenzdaten können online auf der Homepage der Firma abgerufen werden. Die FASTA-Formate der Sequenzen wurden in Word eingelesen und anschließend mit Hilfe eines Makros bearbeitet, um Zeilenumbrüche zu entfernen. Zum Teil war eine manuelle Nachbearbeitung der Sequenzen notwendig, um unklare Nukleotide (sog. Wobble-Basen) eindeutig zuzuordnen. Hierzu wurden die Chromatogramme der Sequenzen herangezogen (siehe Abbildung 4).



Abb. 4: Manuelle Nachbearbeitung von Sequenzdaten mit Hilfe der Chromatogramme (grün = A; rot = T; schwarz = G; blau = C): Eindeutige Nukleotide (A, T, G, C) werden in Großbuchstaben in schwarzer Schrift dargestellt. Ist das Ergebnis der Rohdaten nicht eindeutig (sog. Wobble-Basen, z.B. W, Y, R etc.), wird der höhere Peak als relevant gewertet und die Wobble-Base durch die entsprechende „normale“ Base ersetzt. Diese Nukleotide werden als kleine Buchstaben in blauer Schrift gekennzeichnet. Falls nicht erkennbar ist, welcher Peak der höhere ist, wird die Wobble-Base belassen.

Die Qualität der Sequenz berechnet sich aus dem Anteil eindeutig bestimmbarer Nukleotide im Verhältnis zur Gesamtzahl der Nukleotide. Werte zwischen 98 und 100 % zeigen eine sehr gute Qualität der Sequenz an. Liegen die Werte unterhalb von 80 % bedeutet das entweder eine Kontamination der Probe oder eine ungenügende Ausbeute an PCR-Produkt zur Sequenzbestimmung.

2.5 Datenbankanalyse

Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte mittels BLAST und BOLD.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ist das weltweit am meisten genutzte Programm zur Analyse biologischer Sequenzdaten. Die zu bestimmende Sequenz wird dabei mit bereits in der Datenbank vorhandenen Sequenzen verglichen. Das Programm liefert als Ergebnis eine Reihe von Alignments, in denen die Stücke der gesuchten Sequenz ähnlichen DNA-Abschnitten aus der Datenbank gegenübergestellt werden. Dabei wird angegeben, wie hoch die Übereinstimmung ist. Das Tool kann online unter https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome aufgerufen werden.

Das Datenbanksystem BOLD (Barcode of Life Data System) widmet sich speziell dem DNA-Barcoding und enthält DNA-Sequenzen der 5'-Region des COI-Gens. Die Plattform ist ebenfalls online öffentlich zugänglich (<https://www.boldsystems.org/>). Neben den DNA-Sequenzen enthält die Plattform auch Daten zum Fundort und weitere Informationen wie Taxonomie, Lagerungsort, Fotos, Verbreitungskarten etc.

Bei der Sequenzanalyse mit BLAST ist zu beachten, dass die in der Datenbank hinterlegten Sequenzen im Gegensatz zu BOLD keine Qualitätssicherungsmaßnahmen durchlaufen haben. BLAST kann somit Fehler enthalten. Dafür sind die in BOLD hinterlegten Daten weniger umfangreich.

Ist die Qualität der gesuchten Sequenz sehr viel besser als die Homologie zur aufgeführten Spezies, handelt es sich bei der Probe wahrscheinlich um eine noch nicht sequenzierte oder in der Datenbank hinterlegte Art.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Probenkonservierung

Zu Beginn der Untersuchung der MZB-Proben trat häufig das Problem auf, dass bei der Amplifikation des Markergens kein PCR-Produkt gebildet wurde. Nach eingehender Ursachenforschung wurde schließlich ein Zusammenhang mit der Art der Konservierung des Probenmaterials festgestellt. Die Konservierung erfolgte bis dahin immer in 70-80 %igem, vergälltem Alkohol. Wurden die Proben dagegen in unvergälltem Alkohol fixiert, gab es keine Probleme bei der Vervielfältigung des Markergens.

Vergällter Alkohol (Brennspiritus) enthält Methylethylketon, das bereits nach wenigen Stunden die DNA irreversibel schädigt. Das kann dazu führen, dass keine oder nur eine sehr viel schlechtere Amplifikation der DNA bei der PCR möglich ist. Die Ämter und Regierungen wurden daraufhin gebeten, für die Konservierung zukünftig ausschließlich unvergällten Alkohol zu verwenden.

3.2 Methodenentwicklung und Primerdesign

Für das DNA-Barcoding der Makrozoobenthos-Proben ergab die Primerkombination neo21 / neo42 die besten Ergebnisse (siehe Abb. 5). Je nach Art entsteht ein 709 bis 715 bp langes Fragment.

Auch die Primerkombinationen TRI140 / neo 42 und neo43 / y1w2r5 erwiesen sich als geeignet (siehe Abb. 6 und 7). Der forward primer TRI140 wurde speziell für MZB-Proben aus der Ordnung der Köcherfliegen (Trichoptera) entwickelt, da die PCR mit dem Primerpaar neo21 / neo42 für diese Organismen des Öfteren kein Produkt lieferte.



Abb. 5: Gelelektrophorese: fluoreszierende Banden mit einer Größe von ca. 700 bp zeigen eine erfolgreiche Amplifikation des Markergens COI mit dem Primerpaar neo21 (forward primer) und neo42 (revers primer) an; links und rechts außen befindet sich ein Größenstandard mit DNA-Fragmenten bekannter Länge

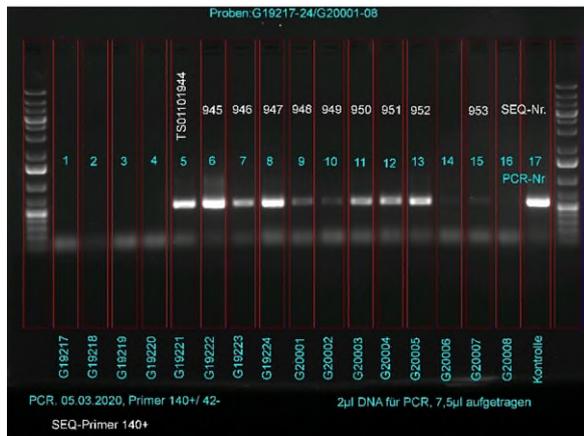


Abb. 6: Gelelektrophorese: PCR-Produkt (570 bp) nach Amplifikation mit den Primern TRI140 (forward) und neo42 (revers)

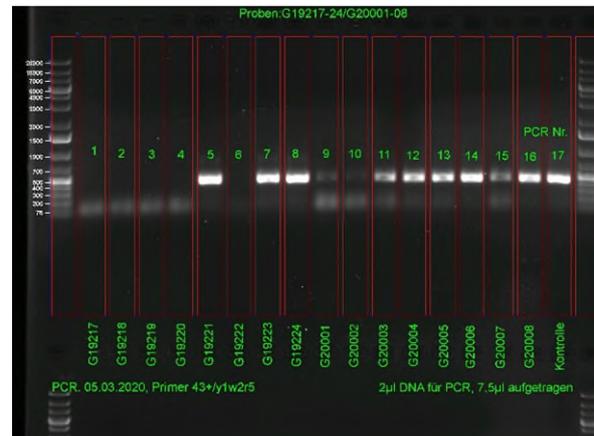


Abb. 7: Gelelektrophorese: PCR-Produkt (450 bp) nach Amplifikation mit den Primern neo43 (forward) und y1w2r5 (revers)

3.3 Untersuchte Makrozoobenthos-Proben

Nach erfolgreicher Etablierung der Methodik wurden die von den Wasserwirtschaftsämtern und Regierungen eingesandten MZB-Proben genetisch überprüft. Die Mehrzahl der zu untersuchenden Proben (ca. 60 %) gehörte den EPT-Taxa an (Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera; siehe auch Abb. 8). Dabei war der Anteil an Köcherfliegen (Trichoptera) mit 43 % besonders groß. Die zweithäufigste Gruppe waren mit 14 % die Coleoptera, gefolgt von Diptera, Hirudinea, Gastropoda und Crustacea (6,5 – 4 %). In geringerer Häufigkeit waren Muscheln (Bivalvia) und Libellen (Odonata) vertreten. Einzelne Individuen weiterer Gruppen können der Abbildung 8 entnommen werden.

Die Ergebnisse der genetischen Identifizierung wurden den Ämtern bzw. Regierungen nach erfolgter Sequenzanalyse mitgeteilt.

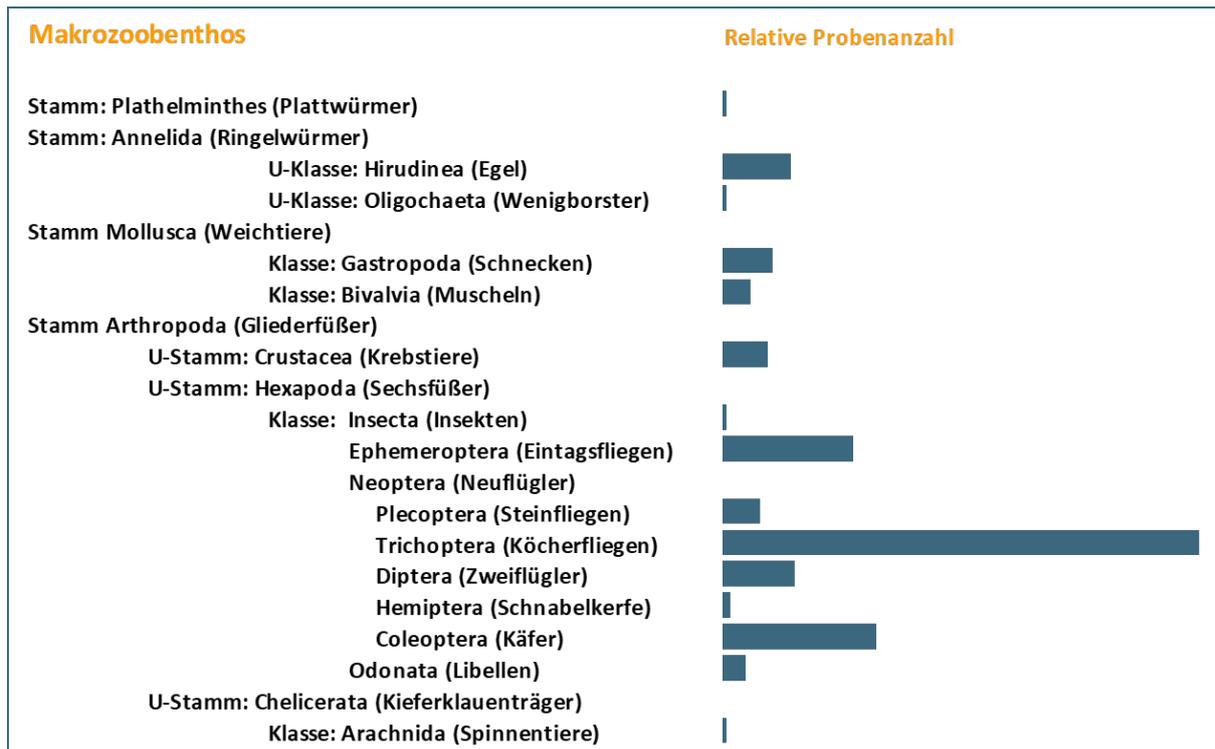


Abb. 8: Genetisch überprüfte Taxa

3.4 Genetische Bestimmung der Makrozoobenthos-Proben mittels Sequenzanalyse

Im Projektzeitraum wurden ca. 900 Analysen durchgeführt. 81 % der Proben konnten mittels DNA-Barcoding bis auf Art-Ebene bestimmt werden (siehe Abb. 9). Bei 7 % der Proben war eine Bestimmung bis zur Gattungsebene möglich. Die DNA-Sequenzen des für das Barcoding verwendeten Abschnitts des COI-Gens unterscheiden sich hier bei verschiedenen Arten der Gattung nicht stark genug, um eine eindeutige Zuordnung auf Spezies-Ebene vornehmen zu können. In solchen Fällen müssen evtl. andere Gene herangezogen werden, die eine bessere Differenzierung ermöglichen (Schmid-Egger und Schmidt 2012).

Für etwa 4 % der Proben wurde zwar eine DNA-Sequenz ermittelt, es konnte jedoch mit keiner der verwendeten Referenzdatenbanken eine Zuordnung zu einer Gattung oder Art getroffen werden. Vermutlich fehlen hier die entsprechenden Sequenzdaten in den Datenbanken.

Bei 8 % der Proben konnte keine DNA-Sequenz bestimmt werden. Dies kann verschiedene Gründe haben:

- Das Markergen wurde nicht amplifiziert, da die DNA der Probe bereits zu stark degradiert war.
- Das Markergen wurde nicht amplifiziert, da die verwendeten Primer nicht binden konnten und somit für die Probe nicht geeignet waren.
- Das Markergen wurde zwar amplifiziert, aber die Sequenzierung lieferte eine Mischsequenz (siehe Abb. 10). Dies kann passieren, wenn in einem Probenahme-Gefäß Zellen verschiedener Organismen enthalten waren. Nach der DNA-Extraktion können dann im Verlauf der PCR mehrere unterschiedliche Produkte amplifiziert worden sein.

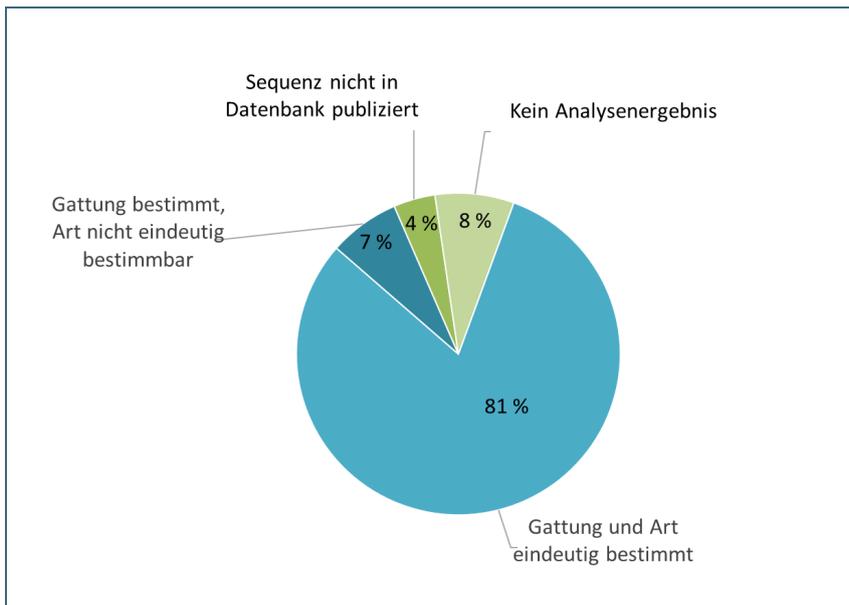


Abb. 9: DNA-Barcoding der MZB-Proben: Prozentuale Anteile an erfolgreich bestimmten bzw. nicht-bestimmbaren Proben

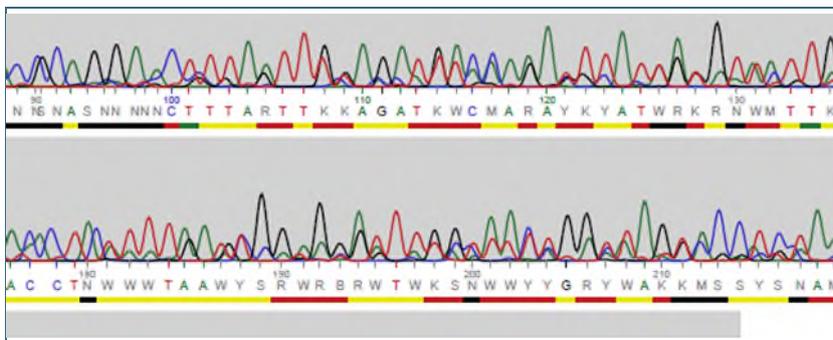


Abb. 10: Chromatogramm einer Sequenzierung: Beispiel für eine Mischsequenz

Für die Proben, die genetisch auf Art- bzw. Gattungsniveau identifiziert werden konnten (88 % der Proben), wurde ein Abgleich mit den Daten der morphologischen Bestimmung vorgenommen. Je nach Übereinstimmung zwischen genetischer und morphologischer Bestimmung lassen sich die Ergebnisse in sechs Kategorien einteilen (siehe Tabelle 2). Im Folgenden wird für jede Kategorie ein Beispiel vorgestellt.

Tab. 2: Vergleich der Ergebnisse der genetischen und morphologischen MZB-Bestimmung

Kategorie	
3.4.1 Gattung und Art bestätigt	34,4 %
3.4.2 Gattung bestätigt, Art weicht von morphologischer Bestimmung ab	17,4 %
3.4.3 Gattung bestätigt, Art bestimmt	10,0 %
3.4.4 Gattung bestätigt, Artbestimmung genetisch nicht möglich	7,1 %
3.4.5 Gattung und Art weichen von morphologischer Bestimmung ab	10,9 %
3.4.6 Gattung und Art bestimmt	8,1 %
Auf Art- bzw. Gattungsniveau bestimmte Proben	88 %

3.4.1 Gattung und Art bestätigt

Proben-Nr. (LfU-73)	G20001
Auftraggeber:	Regierung von Oberbayern
Art morphologisch	<i>Anacaena limbata</i>
Art genetisch	<i>Anacaena limbata</i>
Ort der Probennahme	Schandel, Br. Flugplatz

Sequenzierergebnis:

Sequenzlänge: 521 bp

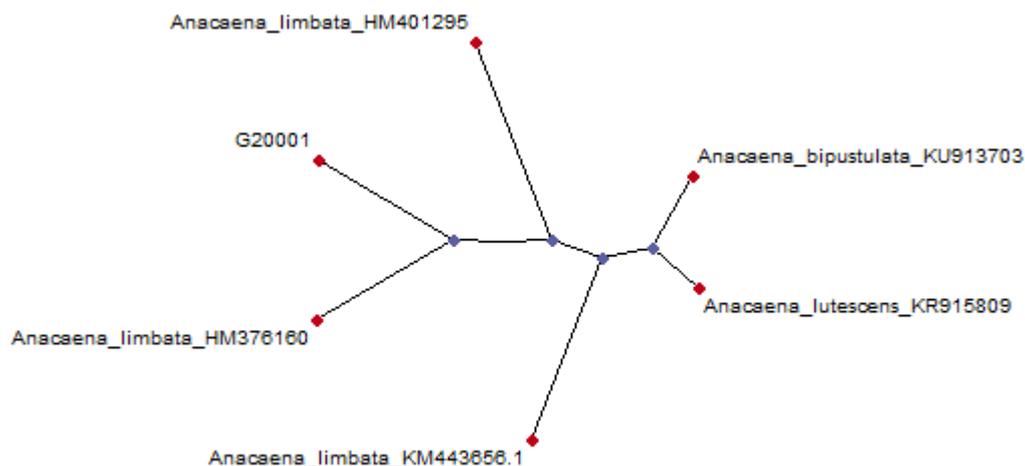
NANCCNTATTATAATTGGCGGATTTGGTAATTGATTAGTCCCTCTTATATTAGGTGCCCCAGATA
TAGCATTTCCCGAATAAATAATATAAGATTTTGGCTTTACCCCCCTCTCTTACACTACTATTAAT
AAGAAGAATAGTAGAAWATGGAGCAGGTACAGGATGAACAGTGYATCCCCCACTGTCATCAAATA
TTGCTCATGGAGGGGCTTCTGTAGATTTAGCTATTTTTAGTCYACATTTAGCTGGAATTTCTGTCTAT
TTAGGTGCTGTAAATTTTACTACAGTAATTAATATACGATCTGATAGAATAACTTATGACCGA
TTACCTTTATTTGTAKGGTCTGTAGCTATTACTGCCTTATTATTACTATCCTTACCAGTATTAGC
TGGTGCAATTACAATACTATTAACTGATCGAAATTTAAACACATYAYTTTTTGGATCCGGCTGGGGG
AGGAGATCCTATTCTATATYAACATTTATTTTGATTCTTTGGWCACCYWGAAGTN

Untersuchungsergebnis (BOLD):

Art genetisch: *Anacaena limbata*; 100 % Übereinstimmung

Top 10 Matches (BOLD)

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Subspecies	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Hydrophilidae	<i>Anacaena</i>	<i>limbata</i>		100	Private
Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Hydrophilidae	<i>Anacaena</i>	<i>limbata</i>		100	Private
Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Hydrophilidae	<i>Anacaena</i>	<i>limbata</i>		100	Private
Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Hydrophilidae	<i>Anacaena</i>	<i>limbata</i>		100	Published 🔗
Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Hydrophilidae	<i>Anacaena</i>	<i>limbata</i>		100	Published 🔗
Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Hydrophilidae	<i>Anacaena</i>	<i>limbata</i>		100	Published 🔗
Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Hydrophilidae	<i>Anacaena</i>	<i>limbata</i>		100	Early-Release
Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Hydrophilidae	<i>Anacaena</i>	<i>limbata</i>		100	Early-Release
Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Hydrophilidae	<i>Anacaena</i>	<i>limbata</i>		100	Early-Release
Arthropoda	Insecta	Coleoptera	Hydrophilidae	<i>Anacaena</i>	<i>limbata</i>		100	Early-Release



3.4.2 Gattung bestätigt, Art weicht von morphologischer Bestimmung ab

Proben-Nr. (LfU-73)	G20020
Auftraggeber:	Regierung von Oberbayern
Art morphologisch	<i>Caenis luctuosa</i>
Art genetisch	<i>Caenis macrura</i>
Ort der Probennahme	Sims, uh Pegelhaus

Sequenzierergebnis:

Sequenzlänge: 649 bp

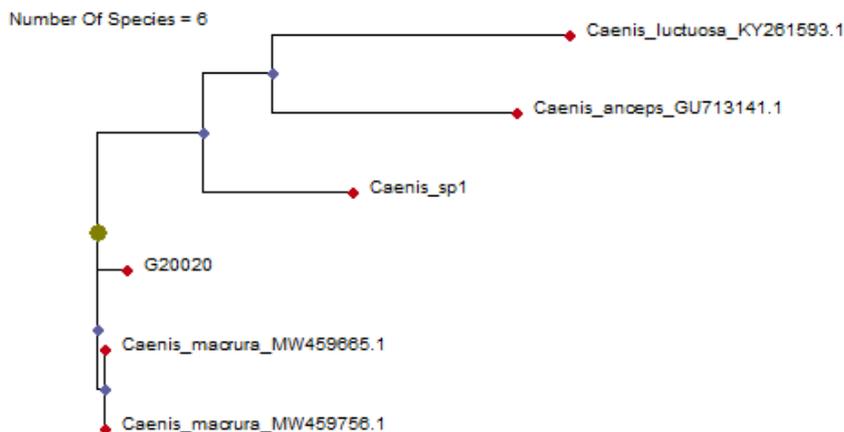
RGNCCTTGGTCTGGTNATAGTAGKARCCTCATTRAGAYWNTTAATCCGGGCTGAATTAGGTCACC
 CCGGGTCTTTAATTGGGGATGACCAAATTTATAACGTAATCGTTACTGCCCATGCTTTCATTATAA
 TTTTCTTTATGGTTATGCCATTATGATTGGGGGATTTGGAAATTGGCTAGTCCCCCTAATACTTG
 GGGCCCTGATATAGCTTTCCCGCGTATAAATAATATAAGCTTTTGGTTATTACCCCTGCCCTTA
 CCCTTTTATTGACTAGCAGCTTARTGGAAAACGGAGCTGGTACTGGTTGAACGGTCTACCCGCCA
 CTTGCTGCAGGTATTGCCCATGCCGGTGCCTCTGTAGATTTGGCTATTTTTTCTCTTCACCTGGCA
 GGTATCTCATCTATTTTAGGTGCAGTAAATTTCACTACTACAATTAATATGCGAGCTAGAGGAA
 TAACTATAGACCGTATTCCATTATTTGTTTGGTCAGTAGTAATTAATGCTGTGTTACTATTGTC
 TTTACCTGTTCTGGCTGGGGCCATTACGATATTATTAACAGATCGTAACTTAAATACCTCATTCTTT
 GACCCCGCGGGTGGGGGAGACCCTATCCTTTACCAACACTTATTCTGANNNTNS

Untersuchungsergebnis (BOLD):

Art genetisch: *Caenis macrura*; 99,7 % Übereinstimmung

Top 10 Matches (BOLD)

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Subspecies	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Insecta	Ephemeroptera	Caenidae	<i>Caenis</i>	<i>macrura</i>		99.68	Published ↗
Arthropoda	Insecta	Ephemeroptera	Caenidae	<i>Caenis</i>	<i>macrura</i>		99.68	Published ↗
Arthropoda	Insecta	Ephemeroptera	Caenidae	<i>Caenis</i>	<i>macrura</i>		98.39	Private
Arthropoda	Insecta	Ephemeroptera	Caenidae	<i>Caenis</i>	<i>macrura</i>		98.39	Published ↗
Arthropoda	Insecta	Ephemeroptera	Caenidae	<i>Caenis</i>	<i>macrura</i>		98.39	Private
Arthropoda	Insecta	Ephemeroptera	Caenidae	<i>Caenis</i>	<i>macrura</i>		98.23	Published ↗
Arthropoda	Insecta	Ephemeroptera	Caenidae	<i>Caenis</i>	<i>macrura</i>		98.23	Private
Arthropoda	Insecta	Ephemeroptera	Caenidae	<i>Caenis</i>	<i>macrura</i>		97.75	Published ↗
Arthropoda	Insecta	Ephemeroptera	Caenidae	<i>Caenis</i>	<i>macrura</i>		97.61	Private
Arthropoda	Insecta	Ephemeroptera	Caenidae	<i>Caenis</i>	<i>macrura</i>		97.58	Private



3.4.3 Gattung bestätigt, Art bestimmt

Proben-Nr. (LfU-73)	G20016
Auftraggeber:	Regierung von Oberbayern
Art morphologisch	<i>Limnophora spec.</i>
Art genetisch	<i>Limnophora olympiae</i>
Ort der Probennahme	Sims, uh Pegelhaus

Sequenzierergebnis:

Sequenzlänge: 681 bp

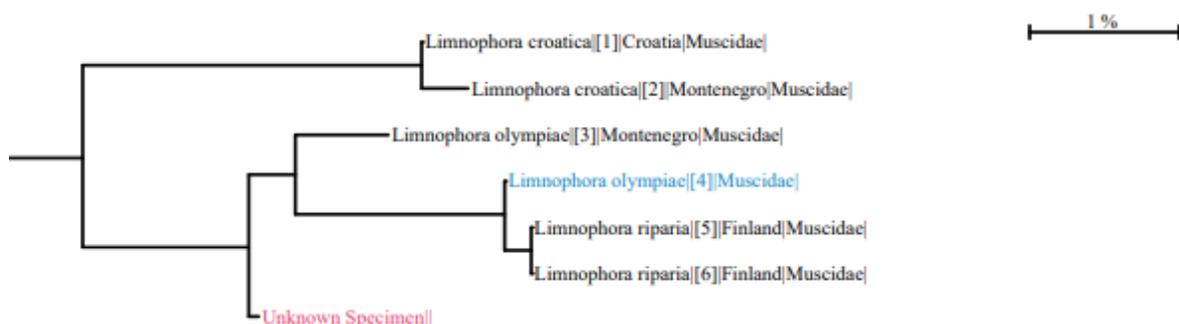
AANNNTTATATTTTCAATTTTTTNGGAGCTTGAGCAGGAATAGTAGGAACCTTCTTTAAGTATTTTAA
 TTCGAACAGAATTAGGACATCCWGGASCAKTAATTGGAAATGATCAAATYTATAAYGTAATCGKAA
 CTGCCCATGCYYTYRTTATAATTTTTTTTTATAGTTATRCCAATTATAATTGGAGGAKTTGGRAATTG
 ATTAGTTCCTTTAAYATTARGAGCYCCMGATATAGCTTTYCCYCGAATAAATAATATAAGTTTTTGA
 TTACYTCCYCTGSTTTAATCCTTCTTAGTCAGTAGAATAATTGAAACCGGAGCTGGAACGGGA
 TGAAGTGTACCTCCTTTRCTGCAAACACAGCTCACAGTGGCCCTTCTGTTGATTTAGCAATT
 TTTTCCCTTCACTTASCTGGAATCTCTTCCATTTTAGGAGCTGTTAATTTTATTACAACAGTAATAAA
 CATACGATCTGTTGGAATTACATTTAACCGAATACCTTTATTTGTCTGATCAGTAGCTATTACTGCT
 TTACTIONTACTATCTTTACCCGTATTAGCAGGAGCAATTACAATATTATTAACAGATCGAAATTT
 AAATACCTCATTTTTTGACCCTGCTGGAGGAGGTGATCCTATTCTTTATCAACATTTATTTTGATTC
 TTKSNCCCCCN

Untersuchungsergebnis (BOLD):

Art genetisch: *Limnophora olympiae*; 99,2 % Übereinstimmung

Top 10 Matches (BOLD)

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Subspecies	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Insecta	Diptera	Muscidae	<i>Limnophora</i>	<i>olympiae</i>		99.18	Private
Arthropoda	Insecta	Diptera	Muscidae	<i>Limnophora</i>	<i>olympiae</i>		98.15	Published ↗
Arthropoda	Insecta	Diptera	Muscidae	<i>Limnophora</i>	<i>riparia</i>		97.92	Private
Arthropoda	Insecta	Diptera	Muscidae	<i>Limnophora</i>	<i>riparia</i>		97.88	Private
Arthropoda	Insecta	Diptera	Muscidae	<i>Limnophora</i>	<i>croatica</i>		96.31	Early-Release
Arthropoda	Insecta	Diptera	Muscidae	<i>Limnophora</i>	<i>croatica</i>		95.99	Private
Arthropoda	Insecta	Diptera	Muscidae	<i>Limnophora</i>	<i>sp. 1 AKR</i>		91.23	Published ↗
Arthropoda	Insecta	Diptera	Muscidae	<i>Limnophora</i>	<i>sp. 1 AKR</i>		91.07	Published ↗
Arthropoda	Insecta	Diptera	Muscidae	<i>Limnophora</i>	<i>sp. 1 AKR</i>		91.07	Published ↗
Arthropoda	Insecta	Diptera	Muscidae	<i>Limnophora</i>	<i>sp. 1 AKR</i>		91.07	Published ↗



3.4.4 Gattung bestätigt, Artbestimmung genetisch nicht möglich

Proben-Nr. (LfU-73)	G20021
Auftraggeber:	Regierung von Oberbayern
Art morphologisch	<i>Siphonurus spec.</i>
Art genetisch	<i>Siphonurus spec.</i>
Ort der Probennahme	Sims, uh Pegelhaus

Sequenzierergebnis:

Sequenzlänge: 668 bp

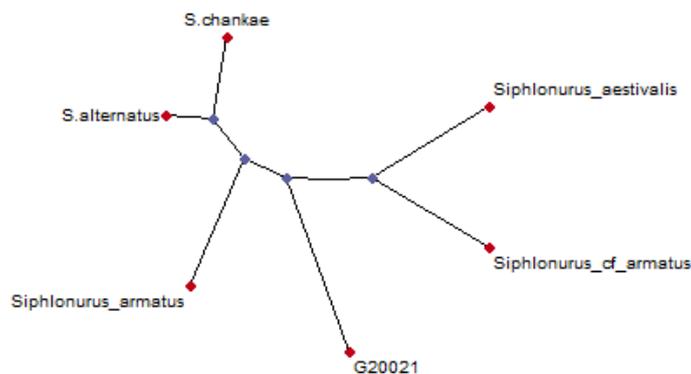
NANNNTTATATTTTTATTTTTGGTGCTTGAGCTGGAATAGTAKGAACCTTCCTTAAGCTTATTAATT
 CGTGCTGAGCTTGGTCAACCCGGTTCTTTAATTGGAGATGATCAAATTTATAATGTAATTGTGACT
 GCTCATGCTTTTGTATAATTTCTTTATAGTTATACCAATTATAATTGGAGGGTTTGGTAATTGACT
 GGTTCCCTTAATGTTAGGGGCACCTGATATAGCTTTTCTCGGATAAATAATATGAGTTTCTGGCT
 TCTTCTCCTGCTCTAACTCTTCTACTTGCTAGTAGCATAGTTGAAAGTGGAGCGGGGACTGGGT
 GAACGGTTTACCCACCACTTTCTTCAGGTATTGCCCATGCTGGAGCTTCTGTTGATTTAGCAATTT
 TTTCTTTCATCTCGCCGGTGTTCCTCAATTTTAGGAGCGGTAAATTTTATTACTACTACAATTA
 CATGCGTTCTAGTGAATAACTCTTGATCGAATTCCTCTATTTGTTTGATCCGTAGTTATTACAGCT
 ATTCTTCTTTACTTTCACTACCAGTTTAGCTGGAGCTATTACTATATTATTAACAGATCGAAATTT
 AAACACCTCATTCTTTGATCCCGCAGGAGGAGGTGACCCAATTTTGTATCAACACWTATTTTNNAT
 N

Untersuchungsergebnis (BOLD):

Art genetisch: *Siphonurus cf. armatus*: 99,7 % Übereinstimmung
Siphonurus aestivalis: 99,7 % Übereinstimmung
Siphonurus armatus: 99,7 % Übereinstimmung

Top 10 Matches (BOLD)

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Subspecies	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Insecta	Ephemeroptera	Siphonuridae	<i>Siphonurus</i>	<i>cf. armatus</i>		99.69	Published 🔗
Arthropoda	Insecta	Ephemeroptera	Siphonuridae	<i>Siphonurus</i>	<i>aestivalis</i>		99.69	Private
Arthropoda	Insecta	Ephemeroptera	Siphonuridae	<i>Siphonurus</i>	<i>armatus</i>		99.69	Private
Arthropoda	Insecta	Ephemeroptera	Siphonuridae	<i>Siphonurus</i>	<i>aestivalis</i>		99.69	Private
Arthropoda	Insecta	Ephemeroptera	Siphonuridae	<i>Siphonurus</i>	<i>aestivalis</i>		99.54	Private
Arthropoda	Insecta	Ephemeroptera	Siphonuridae	<i>Siphonurus</i>	<i>aestivalis</i>		99.54	Private
Arthropoda	Insecta	Ephemeroptera	Siphonuridae	<i>Siphonurus</i>	<i>cf. armatus</i>		99.38	Published 🔗
Arthropoda	Insecta	Ephemeroptera	Siphonuridae	<i>Siphonurus</i>	<i>aestivalis</i>		99.38	Private
Arthropoda	Insecta	Ephemeroptera	Siphonuridae	<i>Siphonurus</i>	<i>aestivalis</i>		99.23	Private
Arthropoda	Insecta	Ephemeroptera	Siphonuridae	<i>Siphonurus</i>	<i>aestivalis</i>		99.23	Private



Es ist keine eindeutige Zuordnung auf Artniveau möglich, da der Abgleich der Sequenzdaten mit der Referenzdatenbank für drei Arten eine gleich hohe Übereinstimmung lieferte.

3.4.5 Gattung und Art weichen von morphologischer Bestimmung ab

Proben-Nr. (LfU-73)	G17096
Auftraggeber:	WWA Deggendorf
Art morphologisch	<i>Hydropsyche exocellata</i>
Art genetisch	<i>Tanytarsus pallidicornis</i>
Ort der Probennahme	Isar - Plattling, km 8,0, Mst-Nr. 11444

Sequenzierungsergebnis:

Sequenzlänge: 576 bp

YNNNGTSATAACSACAGAYCAAACAATAAAGGTATNNNATSTAAAGTAATTCCWTTTGTATCGTAT
 ATTAATNNNTGTTGTAATAAAATTAAYKSAYCCTANGATKGAASAGAYACCTGCTAAWTGRAGAGA
 AAAAWTAGCTAARTCTACASAAGCGCCTCYATGAGCAACTCTTGAAGATAAMGGAGGATAMACR
 GYCCACCCTGTCCCTSCCCWKTTCWACAATTGAGCTAGAAAAGTARRAGAGTTAAAGAAGGSG
 GAAGAAGTCAAAGCTTATGTTATTTATTCGAGGGAAAGCTATATCAGGAGCTCCTAATRTTAATG
 GTAAAWGTCAGTWTCCAAATCCCCAATCAAGATAGGTATAACTATAAAAAAATTATAATAAATG
 CAKGAGCTGTGACAATAACATTGTAATTTGATCATCTCCAATTAAGTYCCAGGATGCCCTAGTT
 CTGCTCGAATTAATATTCTTAAAGAAGTCCCTACTATGCCGGACCAAGCTCCAMAAATAAAATATA
 AGGTACCAATATCYTNNNGATTTGTTGAAAATAATCGGATCGAGGCGGGGNN

Untersuchungsergebnis (BOLD):

Art genetisch: *Tanytarsus pallidicornis*: 99,8 % Übereinstimmung

Top 10 Matches (BOLD)

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Subspecies	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Insecta	Diptera	Chironomidae	<i>Tanytarsus</i>	<i>pallidicornis</i>		99.79	Early-Release
Arthropoda	Insecta	Diptera	Chironomidae	<i>Tanytarsus</i>	<i>pallidicornis</i>		99.79	Private
Arthropoda	Insecta	Diptera	Chironomidae	<i>Tanytarsus</i>	<i>pallidicornis</i>		99.78	Private
Arthropoda	Insecta	Diptera	Chironomidae	<i>Tanytarsus</i>	<i>pallidicornis</i>		99.78	Private
Arthropoda	Insecta	Diptera	Chironomidae	<i>Tanytarsus</i>	<i>pallidicornis</i>		99.78	Private
Arthropoda	Insecta	Diptera	Chironomidae	<i>Tanytarsus</i>	<i>pallidicornis</i>		99.78	Private
Arthropoda	Insecta	Diptera	Chironomidae	<i>Tanytarsus</i>	<i>pallidicornis</i>		99.78	Private
Arthropoda	Insecta	Diptera	Chironomidae	<i>Tanytarsus</i>	<i>pallidicornis</i>		99.78	Private
Arthropoda	Insecta	Diptera	Chironomidae	<i>Tanytarsus</i>	<i>pallidicornis</i>		99.78	Private
Arthropoda	Insecta	Diptera	Chironomidae	<i>Tanytarsus</i>	<i>pallidicornis</i>		99.78	Private

In dieser Probe wurde keine DNA von *Hydropsyche* nachgewiesen. Die Sequenzierung der amplifizierten DNA ergab *Tanytarsus pallidicornis* (Zuckmücke). Die Ergebnisse von morphologischer und genetischer Identifizierung liegen hier so weit auseinander, dass ein Irrtum bei der morphologischen Bestimmung unwahrscheinlich ist. Eine mögliche Erklärung für die Abweichung wäre, dass es sich bei der genetischen Bestimmung um Beifang handelt, der zusammen mit dem eigentlich zu bestimmenden Organismus eingesammelt wurde. Viele Zuckmückenlarven leben auf anderen im Wasser vorkommenden Insektenlarven, beispielsweise Steinfliegen, Köcherfliegen, Zweiflüglern (Burmeister und Reiss 2003). Eine weitere Möglichkeit wäre, dass es sich um Beute des Zielorganismus handelt. Besonders bei Köcherfliegen ist bekannt, dass sie beim Konservieren in Alkohol ihren Mageninhalt erbrechen. Die darin enthaltene DNA eines Beutetiers kann bei der PCR amplifiziert und im Anschluss sequenziert worden sein.

Weiteres Beispiel: In acht der untersuchten Proben war das Ergebnis *Homo sapiens*. Hier lagen höchstwahrscheinlich Verunreinigungen durch den Probenehmer vor.

3.4.6 Gattung und Art bestimmt

Proben-Nr. (LfU-73)	G19223
Auftraggeber:	Regierung von Niederbayern
Art morphologisch	<i>Trichoptera</i>
Art genetisch	<i>Rhyacophila albardana</i>
Ort der Probennahme	Rißbach, Fischmesstelle

Fotodokumentation:



Sequenzierergebnis:

Sequenzlänge: 460 bp

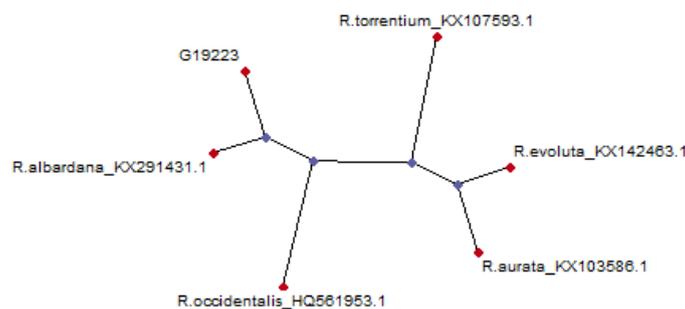
ATANNNTTAATTGCTCCTAAAATTGATGATACGCCTGCKARATGCAGAGAAAAAATAGYTAAATCT
 ACAGAGSTCCCRKTATGACCGATMYTAGATGATARGGGRRGGATATACTGTTCCARCCAGTTCAGC
 TCCGTTTTCTACAATTATTCTTATAGTTAATATAGTTAACGAWGGTGGAGAASTCAAATCTTATA
 TWATTTATTCGTGGAAAASYTATATCAGGGGCTCCTAGTATTAARGGTACTAATCAATTTCAAAC
 CCTCAATTATAATAGGTATAACTATAAAAAAATTATTACAAACGCATGGGCTGTTACAATCAYAT
 TATAAATTTGMTCAATCCCKATTARYGACCCAGGTATCCCAAGTTCAGTTCGAATGATTAATCTTAA
 AGAAGATCCACCATTCCAGCTCRAATTCCAAAAATAAAATATAAAGTTCCGATRTCCNTRN

Untersuchungsergebnis (BOLD):

Art genetisch: *Rhyacophila albardana*: 100 % Übereinstimmung

Top 10 Matches (BOLD)

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Subspecies	Similarity (%)	Status
Arthropoda	Insecta	Trichoptera	Rhyacophilidae	<i>Rhyacophila</i>	<i>albardana</i>		100	Published ↗
Arthropoda	Insecta	Trichoptera	Rhyacophilidae	<i>Rhyacophila</i>	<i>occidentalis</i>		92.2	Published ↗
Arthropoda	Insecta	Trichoptera	Rhyacophilidae	<i>Rhyacophila</i>	<i>evoluta</i>		92.2	Private
Arthropoda	Insecta	Trichoptera	Rhyacophilidae	<i>Rhyacophila</i>	<i>evoluta</i>		91.95	Published ↗
Arthropoda	Insecta	Trichoptera	Rhyacophilidae	<i>Rhyacophila</i>	<i>occidentalis</i>		91.95	Published ↗
Arthropoda	Insecta	Trichoptera	Rhyacophilidae	<i>Rhyacophila</i>	<i>occidentalis</i>		91.71	Published ↗
Arthropoda	Insecta	Trichoptera	Rhyacophilidae	<i>Rhyacophila</i>	<i>occidentalis</i>		91.71	Private
Arthropoda	Insecta	Trichoptera	Rhyacophilidae	<i>Rhyacophila</i>	<i>occidentalis</i>		91.71	Private
Arthropoda	Insecta	Trichoptera	Rhyacophilidae	<i>Rhyacophila</i>	<i>occidentalis</i>		91.46	Published ↗
Arthropoda	Insecta	Trichoptera	Rhyacophilidae	<i>Rhyacophila</i>	<i>occidentalis</i>		91.44	Published ↗



3.5 Publikationen

Analysenergebnisse aus dem Projekt gingen in folgende Publikationen ein:

- Hirschfelder, H.-J., Rahl, K. und Hirschfelder, A. (2018). *Theodoxus danubialis* in Bayern – das letzte Vorkommen in der Donau verschollen und eine überraschende Neuentdeckung (Gastropoda: Neritidae). *Mitt. dtsh. makroool. Gesellschaft* 98, 9-14
- Weinzierl, A., Malicky, H., Waringer, J. (2021): The larva of *Rhyacophila albardana* McLachlan 1879, including a discriminatory matrix to the *Rhyacophila* larvae with comb-shaped gills of Austria, Germany and Switzerland (Rhyacophilidae, Trichoptera). *Zootaxa*. 2021 Jan 13;4908(1):zootaxa.4908.1.9. doi: 10.11646/zootaxa.4908.1.9. PMID: 33756637.

4 Fazit

Im Rahmen des Projekts wurde eine Methodik zur genetischen Identifizierung von Organismen des Makrozoobenthos entwickelt. Bereits in der Vergangenheit wurden erfolgreich Methoden zur Bestimmung von Wirbeltieren (Fledermäuse), Pflanzen (*Vaucheria*) und Bakterien etabliert und eingesetzt.

Es zeigte sich, dass für die Konservierung der Makrozoobenthos-Organismen unbedingt unvergällter Alkohol verwendet werden muss, da das Vergällungsmittel Methylethylketon die DNA bereits nach wenigen Stunden irreversibel schädigt. Das kann dazu führen, dass keine oder nur eine sehr viel schlechtere Amplifikation der DNA bei der PCR möglich ist.

Die Bestimmung der Organismen mittels DNA-Sequenzierung erfordert eine differenzierte Auswahl der eingesetzten Primer, da nicht alle Arten mit den standardmäßig verwendeten Primern identifizierbar waren. So zeigte das häufig verwendete, von Folmer et al. (1994) publizierte Primerpaar LCO1490/HCO2198 in der vorliegenden Studie keinen ausreichenden Erfolg, so dass eigene Primer zur Amplifikation des COI-Markergens entwickelt wurden. Bei einigen Proben war zudem die Verwendung verschiedener Primer-Paare erforderlich, um möglichst vollständige Sequenzdaten zu ermitteln. Nicht immer konnte anhand der DNA-Sequenz eine Bestimmung auf Art-Niveau erfolgen. In diesen Fällen unterschieden sich die Sequenzen des verwendeten Barcoding-Abschnitts des COI-Gens nicht stark genug, um eine eindeutige Zuordnung auf Spezies-Ebene vornehmen zu können. Hier müssen evtl. andere Gene herangezogen werden, die eine bessere Differenzierung ermöglichen.

Des Weiteren zeigte sich, dass die Referenzdatenbanken noch lückenhaft sind und es einheimische Arten gibt, deren Barcoding-Region nicht publiziert ist. Außerdem können die öffentlich zugänglichen Datenbanken – selbst wenn Qualitätssicherungsmaßnahmen durchlaufen werden – Fehler enthalten. Dies können unzureichende Sequenzdaten sein wie beispielsweise eine schlechte Qualität der Sequenz, Kreuzkontaminationen oder Sequenzierfehler, aber auch eine fehlerhafte Zuordnung des hinterlegten Organismus (Pentinsaari et al. 2020, Grant et al 2021). All das kann dazu führen, dass sich beim Abgleich mit den Referenzdatenbanken nicht plausible Ergebnisse ergeben. Dies verdeutlicht wie wichtig es ist, die Datenbanken nicht nur mit weiteren Sequenzdaten zu füllen, sondern diese Daten auch einer sorgfältigen Qualitätskontrolle zu unterziehen (Pawlowski et al. 2020).

Ein weiterer Punkt, der zu fehlerhaften Ergebnissen führen kann, ist die Co-Amplifikation von Nicht-Zielorganismen. Das kann beispielsweise durch die DNA von Beutetieren aus dem Mageninhalt der Ziel-Organismen, aber auch durch Verunreinigungen mit DNA des Probennehmers beim Sammeln der Organismen verursacht werden.

Insgesamt zeigen die Ergebnisse des Projekts, dass das DNA-Barcoding zur Artbestimmung von Einzelorganismen des Makrozoobenthos geeignet ist. Während für zahlreiche Proben eine Übereinstimmung zwischen morphologischer und genetischer Bestimmung vorlag, wurden nur für einen geringen Teil der Proben Abweichungen festgestellt. Die Gründe hierfür müssen jeweils im Einzelfall geklärt

werden (fehlerhafte Amplifikation; fehlerhafte Datengrundlage der Referenzdatenbank; Fehler bei der morphologischen Bestimmung, etc.). Einige Proben, die mittels morphologischer Bestimmung nicht eindeutig identifizierbar waren, konnten mit Hilfe des DNA-Barcoding exakt bestimmt werden. DNA-Barcoding erwies sich somit als wichtiges Instrument im Rahmen der biologischen Qualitätskontrolle. Es wurde mittlerweile als Baustein der biologischen Qualitätssicherung in Teil B 1.1 „Monitoring WRRL Makrozoobenthos des HB tGewA aufgenommen: Kap. 3.10 (Entnahme von Organismen) und Kap 4.3 (Genetische Analysen).

5 Literatur

Burmeister, E.-G., Reiss, F. (2003). *Rheotanytarsus reissi*, eine zweite tuffbildende Wasserinsektenart (Diptera, Chironomidae). *Lauterbornia* 48, 77-88.

Elbrecht, V., Leese, F. (2017a). PrimerMiner: an R package for development and in silico validation of DNA metabarcoding primers. *Methods Ecol. Evol.* 8 (5), 622-626

Elbrecht, V., Leese, F. (2017b). Validation and development of COI metabarcoding primers for freshwater macroinvertebrate bioassessment. *Front. Environ. Sci.* 5, Article 11

Folmer, O., Black, M., Wr, H., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294–299.

Grant, D.M., Brodnicke, O.B., Evankow, A.M., Ferreira, A.O., Fontes, J.T., Hansen, A.K., Jensen, M.R., Kalaycı, T.E., Leeper, A., Patil, S.K., Prati, S., Reunamo, A., Roberts, A.J., Shigdel, R., Tyukosova, V., Bendiksby, M., Blaaid, R., Costa, F.O., Hollingsworth, P.M., Stur, E., Ekrem, T. (2021). The Future of DNA Barcoding: Reflections from Early Career Researchers. *Diversity* 2021, 13, 313.

Pawlowski J., Apothéloz-Perret-Gentil L., Mächler E., Altermatt F. (2020). Anwendung von eDNA-Methoden in biologischen Untersuchungen und bei der biologischen Bewertung von aquatischen Ökosystemen. Richtlinien. Bundesamt für Umwelt, Bern. Umwelt-Wissen Nr. 2010

Pentinsaari, M., Ratnasingham, S., Miller, S.E., Hebert, P.D.N. (2020). BOLD and GenBank revisited – Do identification errors arise in the lab or in the sequence libraries? *PLoS ONE* 15(4) : e0231814. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231814>

Russell, P.J. (2005). *iGenetics. A molecular approach*. Pearson 2nd edition.

Schmid-Egger, C., Schmidt, S. (2012): DNA-Barcoding – Revolution in der Taxonomie? *Ampulex* 5, 19-35.