



Was kann DNA-Barcoding?

Eine Literatarbeit

Autor: Dennis Tobias Tomanek

Matrikelnummer: 2856184

Erstgutachter: Professor Dr. Werner Kunz

Zweitgutachter: Professor Dr. Sebastian Fraune

Bachelorarbeit im Studiengang Biologie der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

ABSTRACT	3
EINLEITUNG	4
THEORIE DES DNA-BARCODING	6
Artidentifikation und Abgrenzung	9
Akkumulation von Mutationen.....	11
Incomplete Lineage Sorting	11
Introgressive Hybridisierung.....	13
CICHLIDEN	15
Edwardsee	15
Tanganjikasee	18
Fazit der Beiden Studien.....	20
Weitere Cichliden.....	20
WOLBACHIA UND ANDERE ENDOSYMBIONTEN/PARASITEN	23
Wolbachia und Arthropoden.....	23
Auswirkungen von Wolbachia auf den Wirt	24
Auswirkungen auf die Verteilung von mitochondrialen Haplotypen	25
Andere Endosymbionten/Parasiten	29
DISKUSSION	30
Valide Arten	30
Eine Frage der Definition	31
Artkonzepte und das Artproblem.....	31
Schlussfolgerung	33
QUELLENVERZEICHNIS	36

Abstract

DNA-Barcoding ist eine Methode zur Artbestimmung, oder Identifikation, basierend auf einem Markergen, dessen Sequenz als Barcode genutzt und einer Art zugewiesen wird. Dies geschieht meist basierend auf Sequenzunterschieden im mitochondrialen Gen COI. Die Artidentifikation basierend auf solchen Sequenzen bietet viele sinnvolle Anwendungsmöglichkeiten. Viele Limitationen in der praktischen Anwendbarkeit zur Artbeschreibung sind vor allem bei jungen und nahe verwandten Arten bekannt. Eine Artbeschreibung basierend auf Barcode-Sequenzen findet trotzdem statt. Häufig wird eine integrative Anwendung im Zusammenspiel mit anderen Merkmalen, die der Artbestimmung dienen können, wie beispielsweise der Morphologie als Lösung für die Probleme des Barcodings genannt. Zunächst wird erläutert, warum sich COI in der Theorie gut für eine Identifikation und Abgrenzung zwischen verschiedenen Arten eignet und wie sich eine Artabgrenzung basierend auf diesem Gen gestaltet. Danach werden einige Situationen erläutert, in denen eine Anwendung von Barcoding zu anderen Arten führt, als durch eine Abgrenzung basierend auf klassischen diagnostischen Merkmalen zu erwarten wäre. Dies ist beispielsweise bei Buntbarschen der großen ostafrikanischen Seen und Arthropoden häufig der Fall. Am Ende werden die gewonnenen Erkenntnisse in Bezug auf Artkonzepte diskutiert.

Einleitung

Was ist eigentlich eine Art und wie definiert man sie? Während des Bachelorstudiums dachte ich, dass sich diese Frage sehr einfach beantworten lässt. Eine Art war für mich eine Gemeinschaft von Tieren, die sich sexuell fortpflanzen und dabei fruchtbare Nachkommen zeugen können, ganz wie es das biologische Artkonzept vorgibt. Als ich dann zum Ende des Studiums auf eine Ausschreibung für eine Bachelorarbeit zum Thema DNA-Barcoding, ausgeschrieben von Herrn Professor Dr. Kunz stieß, auf die mich freundlicherweise ein Kommilitone aufmerksam gemacht hatte, war es dann notwendig über diese Fragen etwas genauer nachzudenken. Interessanterweise war in der Ausschreibung auch die Rede von der Möglichkeit das Thema anhand von ostafrikanischen Cichliden zu untersuchen und da mir diese aufgrund meines Hobbys der Aquaristik durchaus bekannt waren, stieß das Thema bei mir auf besonders großes Interesse. Da sich das Thema der ausgeschriebenen Bachelorarbeit mit dem ebenfalls vom Herrn Professor Kunz angebotenen V-Modul V446 "Grundlagen der Biodiversität und Evolution" thematisch teilweise überschneidet, entschied ich mich dafür, mich auf die Bachelorarbeit und um einen Platz für das V-Modul zu bewerben. Im Rahmen des in Ungarn stattfindenden Moduls setzten wir uns dann im Rahmen verschiedener Seminarvorträge mit unterschiedlichen Fragen rund um Artkonzepte und Artentstehung auseinander und ich bemerkte, dass sich diese Frage wahrscheinlich auch für das Dna-Barcoding gar nicht so einfach beantworten lässt.

Im Anbetracht des aktuellen Artensterbens (Ceballos et al. 2015) bringt die Anwendung der von Hebert et al. vorgeschlagenen Methode des DNA-Barcodings, einer Methode zu Artbestimmung basierend auf der Akkumulation von Punktmutationen im mitochondrialen Cytochrom-C-Oxidase Gen (COI) zur Bestimmung der Biodiversität viele Vorteile mit sich (Hebert et al. 2003b; Hebert et al. 2004). **DNA-Barcoding erweist sich zum Beispiel bei der Aufklärung der Artzugehörigkeit von schwer identifizierbaren Larvenstadien als hilfreich (Ward et al. 2009; Köhler et al. 2022) und ermöglicht so eine schnelle Erfassung der Biodiversität, ohne auf die Erfahrung von klassische Taxonomen angewiesen zu sein (Hebert et al. 2003a). Dabei wird DNA-Barcoding heute sowohl zur Identifikation von Arten basierend auf ihrer COI-Sequenz, als auch als Methode zur**

Abgrenzung zwischen Arten und sogar für die Beschreibung und Entdeckung von neuen Arten ohne, oder nur mit minimaler Rücksichtnahme auf weitere diagnostische Merkmale genutzt (Meierotto et al. 2019; Sharkey et al. 2021). Eine Beschreibung von Arten basierend auf mitochondrialen Markern wird aufgrund des Fehlens von diagnostischen Merkmalen kritisiert, wobei oft eine integrative Anwendung, also eine Kombination von DNA-Barcoding mit anderen Merkmalen wie beispielsweise der Morphologie als Lösung dieses Problems der Artbestimmung dargestellt wird (Breman et al. 2016; Ahrens et al. 2021). Die genaue Kommunikation der Art ist für die wissenschaftliche Arbeit wichtig und notwendig. Basierend auf mitochondrialen Markern werden viele verschiedene Methoden unter der Bezeichnung DNA-Barcoding angewendet. Dies betrifft sowohl genetischen Marker (Trivedi 2020), als auch das genaue Vorgehen zur Artabgrenzung (Yeo et al. 2020; DeSalle und Goldstein 2019). Zu beachten ist, dass in dieser Arbeit vor allem auf die Nutzung des Markers COI und nicht auf die einzelnen Methoden eingegangen wird, auch wenn die Grundprinzipien erläutert werden. Vor- und Nachteile der einzelnen Methoden abzudecken würden den Rahmen dieser Arbeit sprengen und sind Thema anderer Übersichtsarbeiten (Meier et al. 2005; DeSalle und Goldstein 2019; Yeo et al. 2020). Ziel dieser Arbeit ist es am Ende eine Diskussionsgrundlage darüber zu schaffen, ob es sinnvoll ist DNA-Barcodes zur Beschreibung von Arten anzuwenden, oder ob Barcoding im Endeffekt als ein weiteres Artkonzept betrachtet werden sollte, dessen Nutzung kontextabhängig sinnvoll sein kann und, ob die Artbeschreibung durch Barcoding eine Lösung für das Speziesproblem sein kann. Dabei konnte ich herausfinden, dass auch DNA-Barcoding nicht in jedem Kontext zur sinnvollen Artabgrenzung führt.

Theorie des DNA-Barcoding

Prinzipiell basiert die Abgrenzung zwischen zwei Arten beim Barcoding auf Sequenzunterschieden in der Sequenz des Gens COI. Dabei wird zwischen Arten unterschieden, sobald eine ausreichende genetische Distanz erreicht wird. Dies basiert auf der Annahme einer konstanten Mutationsrate, welche zur Akkumulation von Punktmutationen in COI führt (Hebert et al. 2003a). Als Beispiele sind hier eine Abweichung von 3 % zur Speziesdiagnose bei den Lepidoptera (Hebert et al. 2003a), oder 10x der durchschnittlichen intraspezifischen Abweichung anzuführen (Hebert et al. 2004), wobei davon ausgegangen wird, dass diese intraspezifische Distanz selten 2 % übersteigt (Ratnasingham und Hebert 2013). Verschiedene mitochondriale Marker werden für die Abgrenzung zwischen Arten verwendet, wobei beim Barcoding meist die Rede von COI ist. Die Verwendung mitochondrialer Markergene hat viele Vorteile. Mutationen können sich zum Beispiel schnell fixieren (Kunz 2018). Normalerweise liegt in jeder Zelle eine große Zahl an Mitochondrien und somit auch eine große Zahl mitochondrialer Genome vor. Wenn Mutationen innerhalb eines der mitochondrialen Genome auftreten, wäre diese Zelle heteroplasmisch, da innerhalb der Zelle verschiedene mitochondriale Genome vorliegen. Allerdings liegen innerhalb eines Tieres eine große Anzahl von Zellen, mit einer großen Zahl von Mitochondrien vor. Mutationen müssen also fixiert werden, um diese zur Artabgrenzung nutzen zu können. Mutationen werden schnell im mitochondrialen Genom fixiert, da sich die Anzahl der Mitochondrien in den Urkeimzellen, noch bevor sie sich zu Ureizellen differenzieren, auf ca. 40 Mitochondrien pro Zelle reduziert. Somit werden durch genetischen Drift Mutationen fixiert (Avice et al. 1987; Aretz und Ganten 2008; Kunz 2018). Weitere Vorteile liegen darin, dass keine Rekombination stattfindet, Introns fehlen und Insertionen und Deletionen selten vorkommen (Saccone et al. 1999; Trivedi 2020). Mitochondriale Marker mutieren im Vergleich zu den meisten nukleären Markergenen zudem schneller (DeSalle et al. 2017). Neben COI werden noch andere mitochondriale Gene wie Cytochrom b, ND1 oder ND2 genutzt, wobei diese unterschiedliche Mutationsraten aufweisen. Cytochrom b und ND1 mutieren beispielsweise schneller als COI (Lynch und Jarrell 1993). Mitochondriale Gene werden im haploiden Modus maternal zytoplasmatisch vererbt, also nur von der Mutter an die Nachkommen weitergegeben (Saccone et al. 1999). Die Anwendung von COI als Marker basiert genau genommen auf

der Nutzung der Folmer Region, einer ca. 650bp langen Region am 5' Ende des mitochondrialen Gens, welches die Untereinheit I des Cytochrom-C-Oxidase Gens (COI) codiert (Folmer et al. 1994). Sequenzen für COI sind über Datenbanken wie BOLD (Ratnasingham und Hebert 2007), oder GenBank (Benson et al. 2013) zu beziehen. Auch andere nicht mitochondriale Markergene werden unter der Bezeichnung DNA-Barcoding für ähnliche Zwecke genutzt, allerdings wird sich in dieser Arbeit nur mit COI oder anderen mitochondrialen Markergenen auseinandergesetzt, da diese ähnlichen Limitationen unterliegen. Zwischen der Verteilung der intraspezifischen und interspezifischen genetischen Distanz zur nächsten verwandten Art liegt häufig die sogenannte Barcode Gap (Abbildung 1), ein genetischer Distanzbereich, in dem keine, oder kaum Sequenzen zwischen zwei vermuteten Barcodearten liegen (Meyer und Paulay 2005). Die Barcodegap entspricht also einer Lücke zwischen der durchschnittlichen intraspezifischen und interspezifischen genetischen Distanz (Abbildung 1).

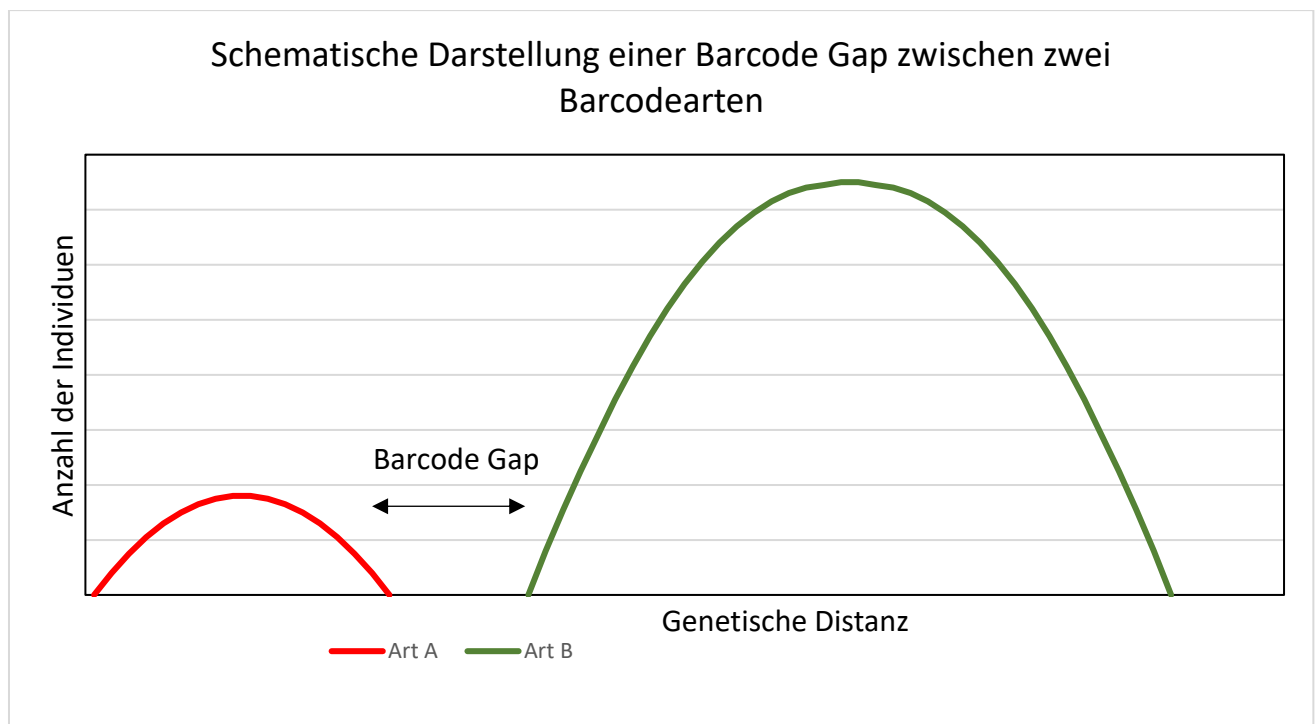


Abbildung 1: Schematische Darstellung der genetischen Distanz innerhalb und zwischen zwei Arten. Rot stellt die Verteilung der intraspezifischen COI-Sequenzen von Art A dar, grün entsprechend die der nächsten verwandten Art B. Dazwischen liegt die sogenannte Barcode Gap, in diesem Distanzbereich zwischen Art A und Art B befinden sich keine (oder nur kaum) Individuen. Eigene Darstellung. In Anlehnung an Meyer und Paulay (2005)

Die Existenz und Nutzung dieser Gap ist dabei nicht unumstritten (Wiemers und Fiedler 2007), sie wird aber dafür genutzt, um Arten abzugrenzen (Blagoev et al. 2016). Insgesamt werden eine große Anzahl an Methoden genutzt, um Spezies über COI abzugrenzen, wobei nicht alle Methoden auf einem Schwellenwert basieren (Meier et al. 2005; DeSalle und Goldstein 2019; Yeo et al. 2020). So finden auch Methoden Anwendung, welche auf der Rekonstruktion phylogenetischer Bäume basieren, wie zum Beispiel Maximum parsimony und Neighbor joining Algorithmen (DeSalle und Goldstein 2019). Die Nutzung unterschiedlicher Methoden zur Artabgrenzung durch Barcode-Sequenzen gewinnen dabei nicht immer dieselbe Zahl an Spezies (Ratnasingham und Hebert 2013; Breman et al. 2016). Zumeist werden jedoch distanzbasierte Methoden genutzt (DeSalle und Goldstein 2019). Insgesamt finden verschiedenen Methoden heute breite Anwendung (Meier et al. 2005; Breman et al. 2016; Klopstein et al. 2016; DeSalle und Goldstein 2019; Sucháčková Bartoňová et al. 2021; Decru et al. 2022). Innerhalb der von Hebert und Ratnasingham etablierten Plattform BOLD, über die auch COI-Sequenzen bezogen werden können, wird zum Beispiel ein algorithmusbasiertes Verfahren (Refined Single Linkage Analysis (RESL) Abbildung 2) genutzt, um basierend auf der genetischen Distanz mutmaßliche Spezies zu generieren, sogenannte „Operational Taxonomic Units“, welche sich aus vielen einzelnen mitochondrialen Barcode-Sequenzen einzelner Tiere zusammensetzen. Eine OTU entspricht also im Grunde einer Sammlung von Barcode-Sequenzen verschiedener Individuen einer vermuteten Art. Sind sich diese Sequenzen ähnlich genug, so werden sie zu einer hypothetischen Art zusammengefasst, welche dann einer OTU entspricht. OTUs können auch nach anderen Kriterien erstellt werden. Diese OTUs basierend auf Barcode-Sequenzen korrelieren häufig mit „tatsächlichen Arten“ (Ratnasingham und Hebert 2013). Andere Möglichkeiten sind unter anderem die ebenfalls auf einer Barcode Gap basierende Methode Automatic Barcode Gap Discovery (Puillandre et al. 2012), oder Methoden, welche auf der Erstellung phylogenetischer Bäume mithilfe von COI basieren (Meier et al. 2005; DeSalle und Goldstein 2019).

Artidentifikation und Abgrenzung

Zunächst können Sequenzen unbekannter Tiere mithilfe von Datenbanken solchen Arten zugeordnet werden, für die COI-Sequenzen hinterlegt sind. Dies geschieht in der Regel über drei verschiedene Verfahren Best Match, Best Close Match und All Species Barcode.

Unter Anwendung des **Best Match Verfahrens** werden Barcode-Sequenzen unbekannter Tiere zur ähnlichsten Sequenz innerhalb einer Bibliothek zugeordnet.

Beim **Best Close Match Verfahren (BCM)** werden Sequenzen, welche von unbekanntem Tieren gewonnen wurden, den nächstbesten innerhalb einer Sequenzbibliothek bei ausreichender Ähnlichkeit zugeordnet. Diese Ähnlichkeit muss dabei innerhalb eines Schwellenwerts liegen. Dieser kann zuvor auf einen festen Schwellenwert festgelegt werden, oder aber durch das Plotten der intraspezifischen gegen die interspezifische genetische Distanz ermittelt werden (Blagoev et al. 2009; Meier et al. 2005), wobei auch andere Verfahren angewendet werden, um eine mögliche Barcodegap zu ermitteln (Breman et al. 2016).

Unter Anwendung des All Species Barcode Verfahrens werden Barcode-Sequenzen, welche innerhalb eines Schwellenwertes liegen, der Ähnlichkeit nach zum Barcode des unbekanntem Tieres aufgelistet (Meier et al. 2005).

Auch bei der Artidentifikation sind jedoch viele verschiedene Verfahren in Nutzung (Tabelle 1).

Das andere Anwendungsgebiet ist die zuvor beschriebene Abgrenzung zwischen Arten basierend auf Sequenzunterschieden, welche auch als diagnostisches Merkmal für die Beschreibung neuer Arten genutzt wird (Sharkey et al. 2021)

Tabelle 1: Übersicht der verschiedenen Methoden, die zur Artabgrenzung genutzt werden (DeSalle und Goldstein 2019).

	Character-explicit	Distance-based
Tree-based	MP, ML, BPP BEAST ¹	NJ*, minimum evolution
Tree-independent	CAOS ² , PTP ³ and bPTP ³ GMYC ⁴	BCG ⁵ , BIN ⁶ , BLAST ⁷ STRUCTURE ⁸ ; PCA ⁹ (principal icomponents) ABGD ¹⁰ (automated BCG discovery), BAPS ¹¹

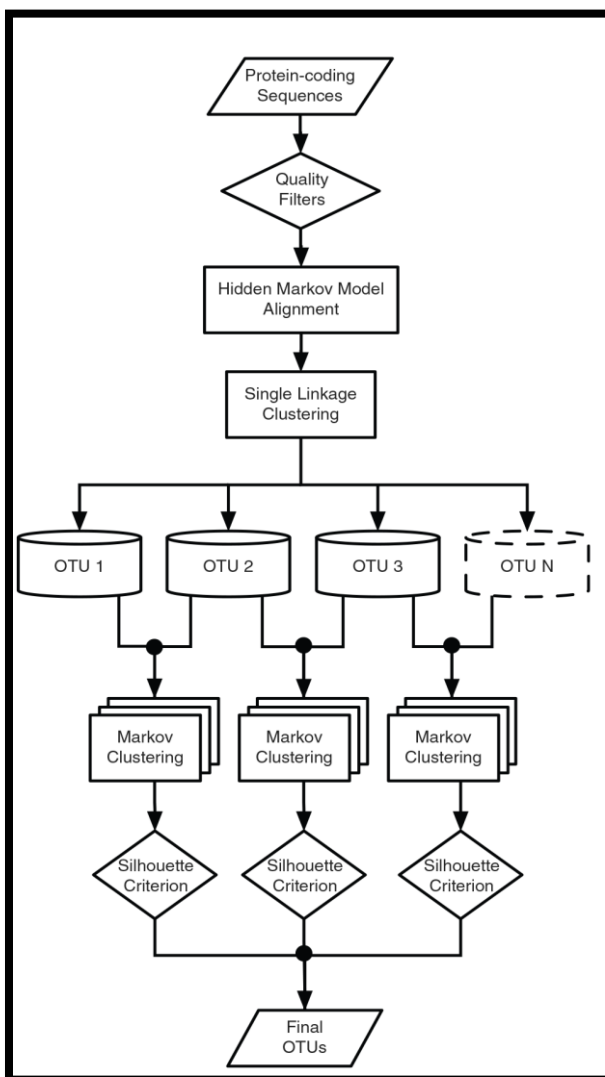


Abbildung 2: Schema des RESL Algorithmus Quelle (Ratnasingham und Hebert 2013)

Verschiedene Prozesse wie Incomplete Lineage Sorting und Hybridisierung können dazu führen, dass Barcodingarten nicht unbedingt, mit aktuell validen Spezies (Beispielsweise Morphospezies) übereinstimmen. Mit validen Spezies sind dabei Arten gemeint, bei denen ein allgemeiner Konsens über die Klassifizierung herrscht. Dabei ist zu beachten, dass unterschiedliche Artdefinitionen zu unterschiedlichen Arten führen.

Akkumulation von Mutationen

Ein Faktor, der für eine Nutzung von mitochondrialen Markergenen zur Entdeckung von Arten spricht, ist, dass Punktmutationen in diesen schnell fixiert werden. Mutationen haben verschiedene Ursachen wie Fehler bei der Replikation, mutagene Substanzen, oder Strahlung. Verschiedene genetische Marker haben dabei unterschiedliche Mutationsraten. Geht man davon aus, dass Arten anhand von Sequenzunterschieden in COI unterscheiden will, dann bedeutet dies, dass genügend Zeit vergangen sein muss, damit sich eine ausreichende Anzahl an Mutationen ansammeln kann. Bei evolutionär jungen Arten kann es dann vorkommen, dass diese anhand verschiedener Kriterien als unterschiedliche Arten identifiziert werden können, wobei kaum, oder nur geringe Unterschiede im Barcode vorliegen. Eine Artidentifikation, oder Abgrenzung ist dann in solchen Fällen anhand des Barcodes nicht möglich.

Incomplete Lineage Sorting

Incomplete Lineage Sorting (Abbildung 3 und 4) ist eine Bezeichnung für Fälle, bei denen die Aufspaltung einer Art nicht gleichzeitig mit einer Veränderung der Gene einhergeht. Ein Gen kann vor der Aufspaltung einer Art beispielsweise durch Mutationen in mehreren Varianten vorliegen. Solche Zustände werden als Polymorphismus bezeichnet. Ein Phylogenetischer Baum, welcher anhand von Genen wie COI aufgestellt werden kann, muss also nicht die tatsächlichen verwandtschaftlichen Verhältnisse der Arten widerspiegeln. Unterschiede in der in mitochondrialen Genen können sich also zu anderen Zeitpunkten in der evolutionären Geschichte der Arten etablieren als andere Merkmale. Incomplete Lineage Sorting wird häufig als eine

mögliche Limitation des DNA-Barcodings aufgeführt (Breman et al. 2016; Ahrens et al. 2021) und betrifft vor allem die Abgrenzung junger Arten, da **eine übereinstimmende Abgrenzung zwischen Reproduktionsgemeinschaften und Barcodingarten durch Lineage Sorting erst nach ca. 4 Millionen Generationen erreicht wird (Hickerson et al. 2006)**

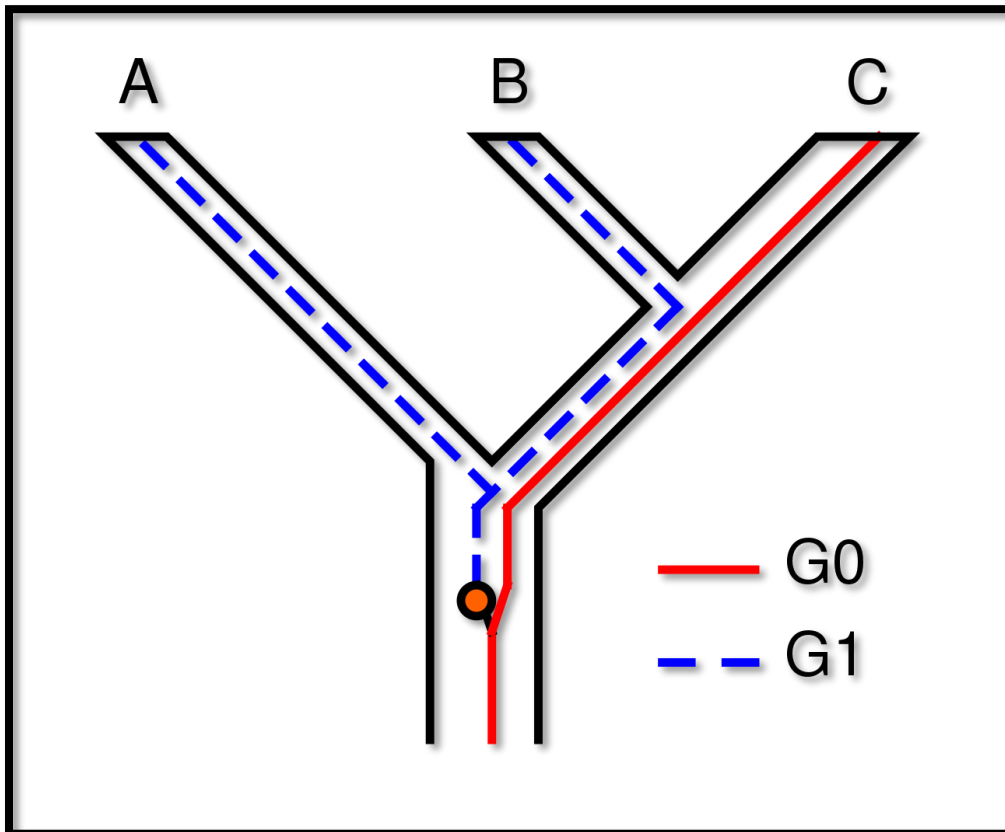


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Incomplete Lineage Sorting. Wenn G1 dem mitochondrialen Gen COI entsprechen würde, so würden sich in diesem Beispiel Art A und Art B, als näher verwandte Arten darstellen und evtl. sogar die gleichen mitochondrialen Gene teilen, wobei eigentlich Art B und Art C Schwestergruppen darstellen. G0 stellt hier die ursprüngliche Version des Gens dar, G1 die Version nach dem Auftreten von Mutationen Quelle (Peter Coxhead)

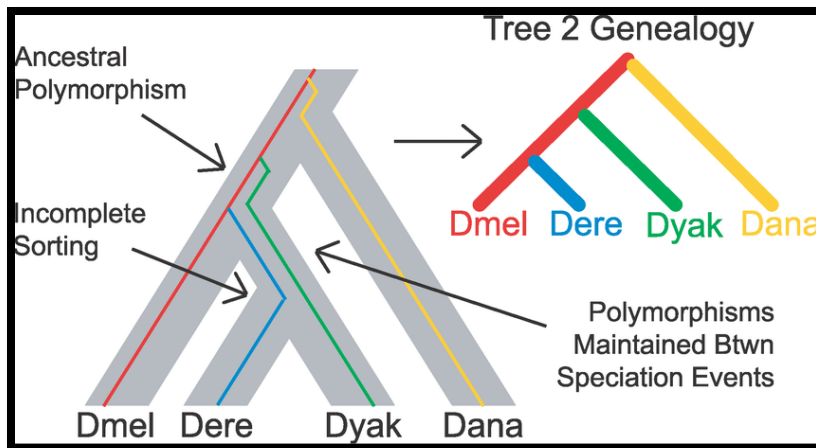


Abbildung 4: Unterschiede der tatsächlichen Verwandtschaft und der genealogischen Art.
Quelle (Pollard et al. 2006)

Introgressive Hybridisierung

Introgression bedingt durch introgressive Hybridisierung beschreibt den Prozess, bei dem Gene durch Hybridisierung und Rückkreuzung von einer Art auf eine andere Art übertragen werden. Introgression spielt in der evolutionären Geschichte vieler Arten eine Rolle (Breman et al. 2016) und kann für eine Steigerung der genetischen Diversität und Fitness sorgen. Dies ist zum Beispiel der Fall, wenn adaptive Introgression stattfindet. Ein bekanntes Beispiel hierfür sind die Schmetterlinge der Gattung *Heliconius*. Bei diesen handelt es sich um für Prädatoren übel-schmeckende Schmetterlinge. Das Verbreitungsgebiet einzelner Arten erstreckt sich von Mittelamerika bis in den Südwesten Südamerikas, wobei innerhalb einer Art standortabhängig verschiedene Farbvarianten vorzufinden sind. Mehrere *Heliconius*-arten mit den gleichen Farbmustern leben dabei sympatrisch nebeneinander und ahmen einander die Farbmuster nach, da diese Farbmuster eine abschreckende Wirkung auf diese Prädatoren haben. Sie bieten also selektive Vorteile. Die Farbmuster werden durch Gencluster gesteuert. Das Auftreten der gleichen Muster in verschiedenen Arten lässt sich durch einzelne Hybridisierungsereignisse zwischen den Arten erklären (Pardo-Diaz et al. 2012).

Auch die zytoplasmatische Vererbung von Endosymbionten, wie sie bei Arthropoden erfolgen kann, führt möglicherweise zu Fitnessvorteilen durch Hybridisierung und könnte eine Introgression mitochondrialer Gene ermöglichen (Hughes und Rasgon

2013; Cong et al. 2017). Daneben können auch räumliche Faktoren Hybridisierung und Introgression begünstigen (Salzburger 2018). Für die Anwendung von DNA-Barcoding zur Artabgrenzung sind all diese Prozesse deshalb problematisch, da mitochondriale Gene maternal zytoplasmatisch vererbt werden, somit **können Hybridisierung und Introgression von mitochondrialen Genen dazu führen, dass sich die gleichen Sequenzen in mehreren Arten nachweisen lassen** (Nevado et al. 2009; Sucháčková Bartoňová et al. 2021) (Abbildung 5), oder aber mehrere mitochondriale Linien in einer Art nachweisbar sind (Cong et al. 2017). Eine Unterscheidung zwischen diesen Arten ist dann basierend auf mitochondrialen Sequenzen **nicht sinnvoll möglich**. Mitochondriale Marker sind in diesen Fällen sowohl zur Identifikation, als auch zur Artabgrenzung ungeeignet.

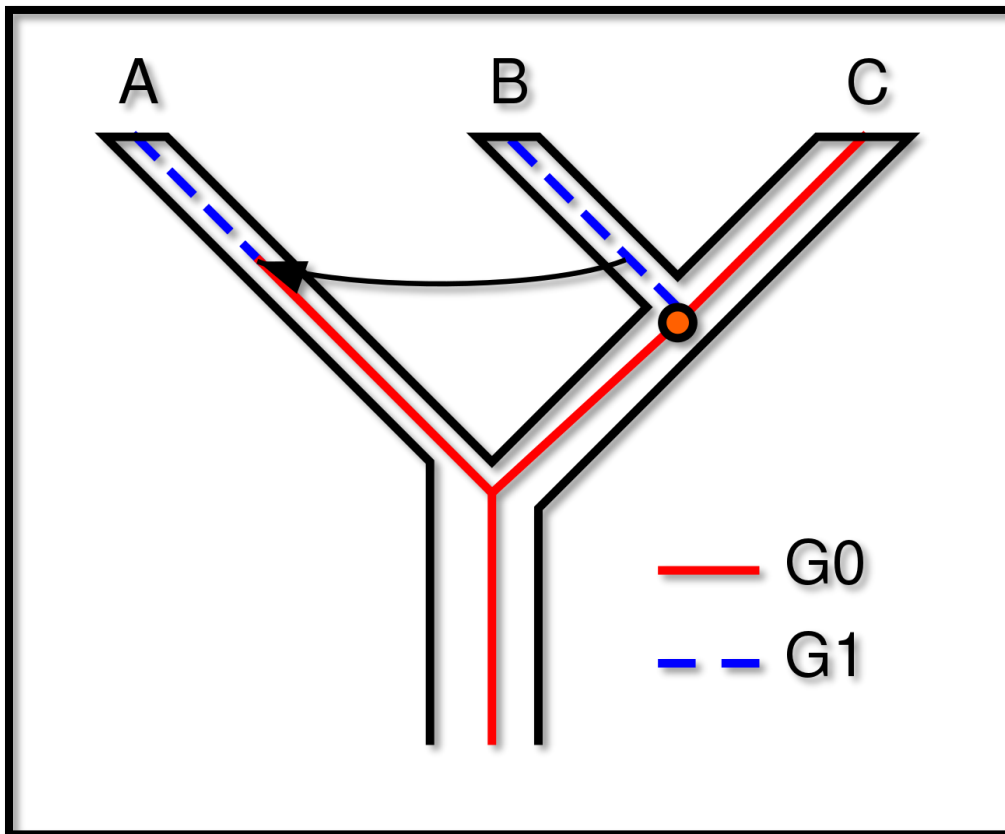


Abbildung 5: Eine Übertragung des Gens G1 hat hier bedingt durch Introgression von Art B auf Art A stattgefunden. Aufgrund des identischen Barcodes würde man diese Arten als konspezifisch deuten.
Quelle (Peter Coxhead)

Cichliden

Viele der Limitationen, welche eine sinnvolle Artabgrenzung und Identifikation anhand von mitochondrialen Markern erschweren, lassen sich anhand von Buntbarschen (Cichlidae) der großen ostafrikanischen Seen verdeutlichen. Dem Tanganjika, Malawi, Edward und Victoria -See ist gemein, dass Cichliden die Fauna dominieren, was auf **explosive adaptive Radiation** zurückzuführen ist (Turner 2007; Breman et al. 2016; Salzburger 2018; Konings 2019; Decru et al. 2022). Die Abgrenzung zwischen einzelnen Arten gestaltet sich aufgrund verschiedenster Faktoren schwierig, dies betrifft nicht nur eine Unterscheidung basierend auf genetischen Markern, sondern auch auf anderen Kriterien, wie der ökologischen Nischen, oder Reproduktionsgemeinschaften (Salzburger 2018). **Zwei Studien setzten sich direkt mit der Anwendung von DNA-Barcoding basierend auf der Nutzung von COI bei Cichliden der großen afrikanischen Seen auseinander (Breman et al. 2016; Decru et al. 2022).**

Edwardsee

Decru et al. (2022) setzten sich mit der Identifikation und Artabgrenzung von Fischen, bei denen es sich überwiegend um Cichliden aus dem Edwardsee handelt, auseinander. Insgesamt konnten sie **624 Barcodesequenzen von 31 Arten gewinnen**. Sie erzielten in ihrer Studie eine hohe Erfolgsquote bei der Artidentifikation von Fischarten mithilfe einer Referenzbibliothek und der drei Verfahren BM (98,2 %), BCM (97,9 %) und ASB (95,0 %). Allerdings wurden Spezies der Gattung Haplochromis aus den Daten zur Artidentifikation rausgerechnet, da bei Cichliden dieser Gattung eine sehr geringe intraspezifische genetische Distanz von durchschnittlich nur 0,8 % vorliegt.

Bei der Artabgrenzung wurde in dieser Studie das wahrscheinlichkeitsbasierte Maximum Likelihood Verfahren genutzt, wobei alle Sequenzen mit einer Barcodedifferenz unter 2 % zu einer Art zusammengefasst werden. Hier werden auch die Sequenzen der Haplochromini berücksichtigt und somit 696 Barcodes von 66 validen Arten ausgewertet. Dabei stimmten die durch das Barcoding gewonnenen Arten größtenteils mit den validen Arten überein, wobei 35 morphologisch unterscheidbare

Arten der Gattung *Haplochromis* in drei Kladen zusammengefasst wurden, was sich durch die geringen Unterschiede in der Barcode-Sequenz erklären lässt. Außerdem konnten Decru et al. (2022) feststellen, dass zwei Killifische *Micropanchax vitschumbaensis* (Abbildung 6) und *Laciris pelagicus* (Abbildung 7) die gleiche Barcode-Sequenz besitzen. Diese wurden im ML-Baum (Abbildung 8) ebenfalls zu einer Klade zusammengefasst. Als mögliche Ursache für die geringen Sequenzunterschiede machen Decru et al. (2022) für die Cichliden der Gattung *Haplochromis* das junge Alter der einzelnen Arten und bei *M. vitschumbaensis* und *L. pelagicus* entweder Hybridisierung und Introgression, oder eine ebenfalls erst kürzlich erfolgte Abspaltung der Arten verantwortlich.



Abbildung 6: *Micropanchax vitschumbaensis* (Syn. *Lacrusticola vitschumbaensis*) Quelle: (Martin Grimm/Fishbase.se)



Abbildung 7: *Laciris pelagica*

M. vitschumbaensis und *L. pelagica* sind morphologisch unterscheidbar, jedoch nicht anhand ihrer Barcodes (Decru et al. 2022). Quelle (Uganda freshwater biodiversity portal 2023)

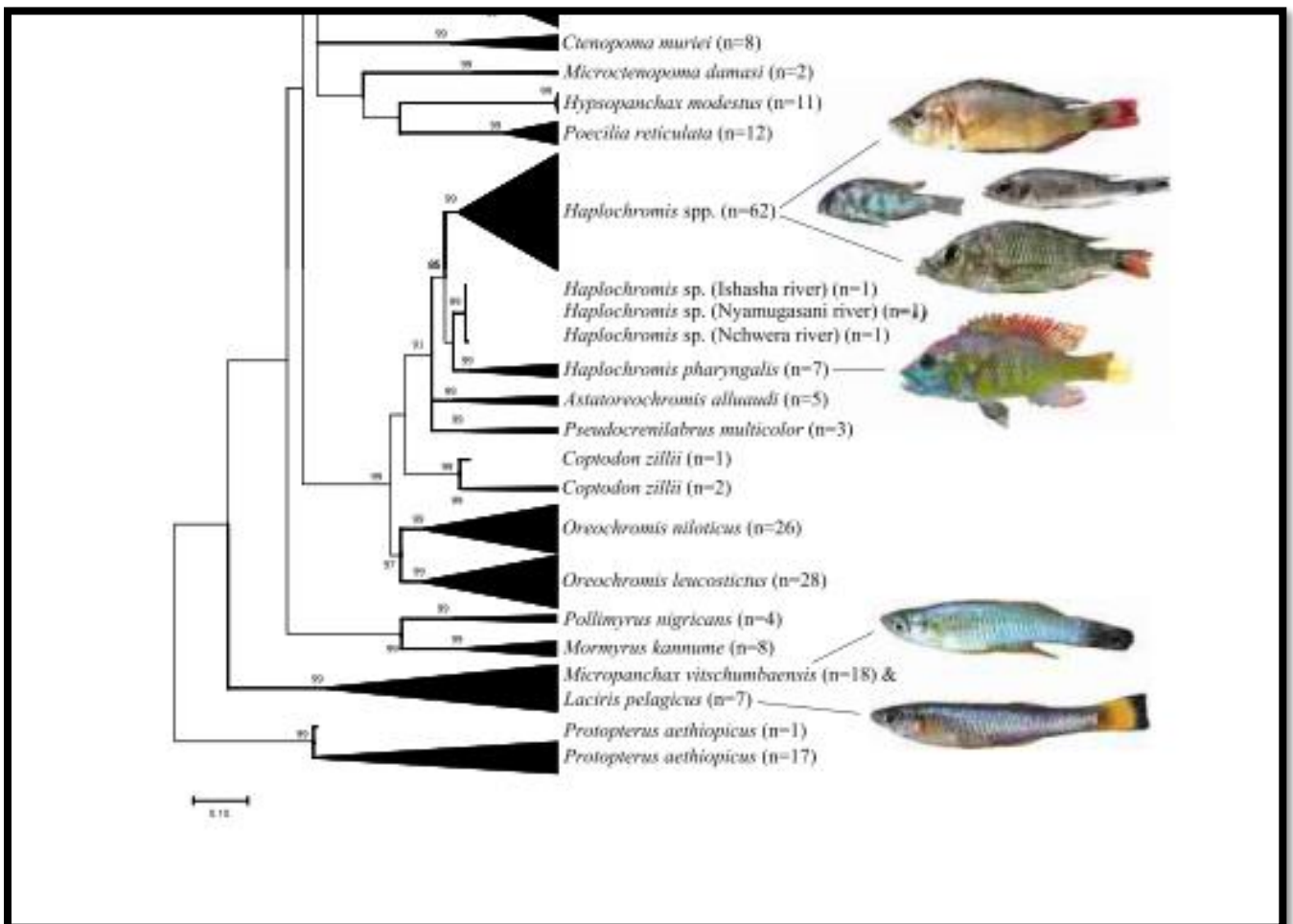


Abbildung 8: Ausschnitt des ML-Baums von Decru et al. (2022). Arten wurden als solche zusammengefasst, wenn die genetische Distanz geringer als 2 % ist. Zu erkennen ist, dass ein Großteil der Cichliden der Gattung *Haplochromis* zu einer Klade zusammengefasst werden. Innerhalb dieser liegt ein maximaler genetischer Unterschied von 0.8 % vor. Auch *M. vitschumbaensis* und *L. pelagicus* bilden eine Klade, da sie sich die Barcode-Sequenz teilen. Quelle (Decru et al. 2022)

Tanganjikasee

Breman et al. (2016) sortierten 398 Barcodes von 96 Morphospezies in drei Bibliotheken, wobei diese nachfolgenden Kriterien erstellt wurden:

A=Morphospezies, B=valide Arten und C=Komplexe morphologisch ähnlicher, oder nahe verwandter Arten.

Dies ergab für Bibliothek A = 96 OTUs, für Bibliothek B = 88 OTUs und für Bibliothek C = 64 OTUs.

Über ein Best Match Verfahren konnten sie 73,73 und 96% und über ein Best Close Match Verfahren zu 72,70 und 94% der jeweiligen OTUs den entsprechenden Arten zuordnen. Diese entsprechen der Übereinstimmung zwischen den gewonnenen OTUs und den Arten.

Daneben setzten sie sich in ihrer Studie mit den Methoden GMYC (Pons et al. 2006) und ABGD (Puillandre et al. 2012) zur Artabgrenzung auseinander und vergleichen die Anzahl gewonnener Spezies unter Anwendung der Methoden ABGD und GMYC mit der Anzahl valider Arten, wobei ABGD = 115 und GMYC = 70 hypothetische Spezies gewinnen konnten. Dies entspricht 119,7% und 72,9% der 96 Morphospezies. Zudem waren Breman et al (2016) in der Lage mithilfe von ABGD 72% der OTUs aus Bibliothek A zu gewinnen, während GMYC nur 36% der OTUs unterstützte.

Viele der validen Arten konnten aufgrund der zu Beginn der Arbeit erläuterten Gründe nicht gewonnen werden. Bei einigen Cichliden spielte Hybridisierung in der Geschichte der Artentstehung eine Rolle. Beispiele zeigen sich bei Cichliden verschiedener Gruppen. Durch genetische Analysen anhand verschiedener mitochondrialer Marker war zuvor bekannt, dass Hybridisierung und Introgression zwischen verschiedenen Gattungen stattgefunden hat. Ein solcher Fall der unidirektionalen Introgression Stellen die beiden Cichliden *Lamprologus callipterus* (Abbildung 9) und *Neolamprologus fasciatus* (Abbildung 10) (Nevado et al. 2009), dabei handelt es sich um morphologisch deutlich unterscheidbare Arten. *N. fasciatus* weist zwei mitochondriale Linien auf, wobei eine der Linien der von *L. callipterus* gleicht, was sich am wahrscheinlichsten mit unidirektionaler Introgression erklären lässt. Breman et al. (2016) konnten die beiden Arten weder über Best Match, noch über das Best Close Match Verfahren als

unterschiedliche Arten identifizieren. Auch Cichliden der Gattung *Tropheus*, welche viele der Felsbiotope des Tanganyikasees bewohnen, können hier als ein Beispiel fungieren. Bei diesen war Hybridisierung bereits bekannt, wobei an den Grenzen der Verbreitungsgebiete und bedingt durch Umwelteinflüsse zu verschiedenen Zeitpunkten in der Geschichte der Arten Hybridisierung stattgefunden hat und weiterhin stattfindet (Egger et al. 2007; Koblmüller et al. 2010; Koblmüller et al. 2011; Breman et al. 2016). Diese konnten von Breman et al. mithilfe der ABGD Methode nicht eindeutig aufgetrennt werden. Gleiches gilt für Cichliden der Gattungen *Cyathopharynx* und *Ophthalmotilapia*, *Petrochromis*, sowie *Perissodus* und *Plecodus*, bei all diesen Arten ist Hybridisierung bekannt (Breman et al. 2016).



Abbildung 9: *Lamprologus callipterus*

Populationen dieser Fische teilen sich ihre mitochondrialen Gene mit *Lamprologus fasciatus*. Die Tiere sind morphologisch eindeutig unterscheidbar, bedingt durch Introgression finden sich bei ihnen jedoch die gleichen Barcodesequenzen (Nevado et al. 2009; Breman et al. 2016).

Quelle (Paul Optenkamp/ Flickr.com)



Abbildung 10: *Neolamprologus fasciatus*

Populationen dieser Fische teilen sich ihre mitochondrialen Gene mit *Lamprologus callipterus*. Die Tiere sind morphologisch eindeutig unterscheidbar. Quelle (seriouslyfish.com)

Fazit der beiden Studien

In beiden Studien wird auf ähnliche Problematiken bei der Anwendung von Barcoding zur Identifikation und Artabgrenzung hingewiesen. Breman et al. (2016) weisen unter anderem auf Incomplete Lineage Sorting, junge Arten und Hybridisierung hin, Decru et al ebenfalls auf das junge Alter vieler Arten und Hybridisierung. Außerdem muss für die Speziesidentifikation eine ausreichende Menge an Referenzsequenzen, welche den entsprechenden Arten zugeordnet wurden, vorhanden sein, um über einen Abgleich neu gewonnene Sequenzen den entsprechenden Arten zuordnen zu können (Breman et al. 2016; Decru et al. 2022). Bei Breman et al. zeigt sich zudem, dass verschiedene Methoden der Artabgrenzung (ABGD und GMYC) nicht immer die gleiche Zahl an Arten abgrenzen. Hybridisierung stellt bei Cichliden, kein seltenes Ereignis dar (Salzburger 2018). Häufig finden sich bei Cichliden zudem Übergangsformen an den Grenzen der einzelnen Verbreitungsgebiete der jeweiligen Arten (Nevado et al. 2011; Salzburger 2018). Bei ostafrikanischen Cichliden gestaltet sich die Abgrenzung einzelner Arten basierend auf ganz verschiedenen Artkonzepten problematisch (Salzburger 2018).

Weitere Cichliden

Neben den im Kontext der beiden Studien erläuterten Fälle finden sich auch bei weiteren Cichliden, ähnliche, oder gleiche Barcode-Sequenzen. Beispielsweise würde sich auch bei Tanganjikaseecichliden der Gattung *Chalinochromis* (Abbildung 11 und 12) unter Anwendung eines fixen Schwellenwerts eine Unterscheidung anhand von Sequenzunterschiede schwierig gestalten, da dieser nur 1.8 % beträgt, obwohl auch hier deutliche morphologische Unterschiede zu beobachten sind (Kullander et al. 2014).

Bei den im Victoriasee lebenden Cichliden der Gattung *Pundamilia* sind sympatrisch vorkommende Populationen der Arten *P. pundamilia* und *P. nyererei* (Abbildung 13) sich genetisch sogar ähnlicher als geografisch getrennte Populationen der eigenen Art, was auf Genfluss zwischen den Arten zurückgeführt werden kann. Die beiden Arten hybridisieren in trüben Gewässern, da die Färbung der Cichliden eine wichtige Rolle bei der Partnerwahl spielt (Njiru et al. 2010; Maan und Sefc 2013; Meier et al. 2017).



Abbildung 11: *Chalinochromis cyanophelps*

C. cyanophelps und *C. popelini* stammen beide aus dem Tanganjikasee und weisen eine Barcode Differenz von nur 1.8 % für den Marker COI auf. Sie sind jedoch morphologisch gut zu unterscheiden. Verschiedene Ursachen wie Introgression, oder eine erst kürzlich erfolgte Abspaltung der Arten könnten dafür verantwortlich sein. Quelle (Kullander et al. 2014)



Abbildung 12: *Chalinochromis popelini*

C. cyanophelps und *C. popelini* weisen eine Differenz von nur 1.8 % für den Marker COI auf (Kullander et al. 2014). Quelle (Dr. David Midgley/Wikimedia.org)

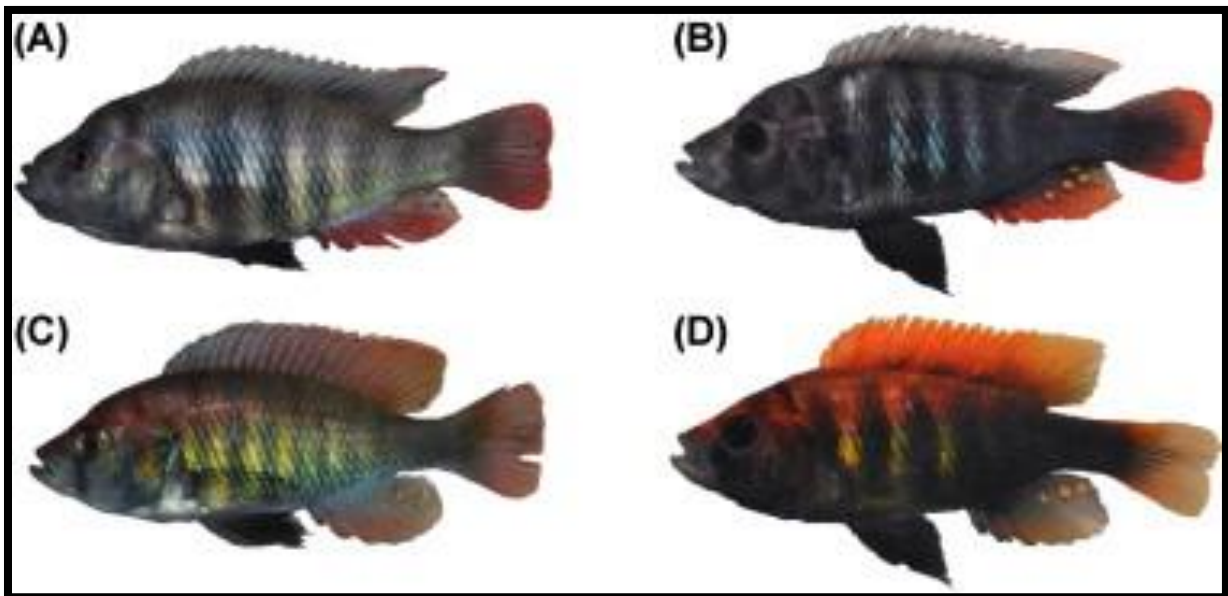


Abbildung 13: Populationen von *P. pundamilia* (A und B) *P. nyererei* (C und D). Die Tiere stammen aus Gebieten, in denen trübes Wasser zu Hybridisierung zwischen den Arten führt. Tiere, Tiere aus solchen Gewässern sind sich anhand von COI ähnlicher als zur eigenen Art in klaren Gewässern Quelle (Maan und Sefc 2013)

Wolbachia und andere Endosymbionten/Parasiten

Wolbachia und Arthropoden

Wolbachia spielt eine besondere Rolle, da hier eine Kombination mehrerer Faktoren zu Problemen bei der Artidentifikation und Abgrenzung führen können. Diese werden im Folgenden erläutert. Bei *Wolbachia pipientis* handelt es sich um ein gramnegatives Alphaproteobakterium, welches der Ordnung Rickettsiales angehört und innerhalb der Familie der Ehrlichiiaceae die einzige Art in der Gattung Wolbachia darstellt (Taxonomy 2022; Hughes und Rasgon 2013). Wolbachia lebt obligat entweder als Endosymbiont, oder aber parasitär **in somatischen und Keimbahnzellen** (Dobson et al. 1999; Resh und Cardé 2009; Hughes und Rasgon 2013; Vega et al. 2013). Trotz der häufig parasitischen Beziehungen wird bei Wolbachia meistens von einem Endosymbionten gesprochen. Arthropoden stellen mit ca. 80 % aller rezenten Tierarten und schätzungsweise insgesamt ca. 1,36-10 Millionen Arten den artenreichsten Tierstamm (Ødegaard 2000; Chapman 2009). Es handelt sich bei Wolbachia um den wahrscheinlich weltweit am weitesten verbreiteten Endosymbionten (Hilgenboecker et al. 2008). Je nach Quelle wird davon ausgegangen, dass **20 bis über 60% aller Arthropoden von Wolbachia besiedelt werden** (Werren und Windsor 2000; Hilgenboecker et al. 2008; Ros et al. 2009; Zug und Hammerstein 2012; Hughes und Rasgon 2013). Insgesamt sind vermutlich mindestens ein Drittel aller Arthropoden mit zytoplasmatisch vererbten Bakterien, welche wahrscheinlich Einfluss auf die Biologie des jeweiligen Wirtes haben, infiziert (Duron et al. 2008). An Arthropoden werden Insecta, Crustacea und Chelicerata besiedelt. (Ros et al. 2009). Auch bei Nematoden ist bekannt, dass sie von Wolbachia besiedelt werden, allerdings sind die Wechselwirkungen hier häufiger symbiotischer Natur (Hughes und Rasgon 2013) **Durch Hybridisierung kann Wolbachia zwischen nahe verwandten Arten verbreitet werden** (Jiggins 2003; Lorenzo-Carballa et al. 2019).

Auswirkungen von Wolbachia auf den Wirt

Die vielfältigen Wirkungen von Wolbachia auf seine Wirte oder Symbionten, werden schon länger im Kontext der Speziation diskutiert (Shoemaker et al. 1999; Rokas 2000).

Viele der Auswirkungen von Wolbachia führen zu einer erhöhten Anzahl weiblicher

Individuen in der Population.

Das Bakterium profitiert aufgrund seiner maternal zytoplasmatischen Vererbung von einer hohen Zahl weiblicher Individuen. Die

Auswirkungen hängen dabei auch von dem jeweiligen Wolbachienstamm ab. Aufgrund des Erbmodus von Wolbachia können Auswirkungen, welche selektive Vorteile für infizierte Tiere haben, auch auf deren mitochondriale-DNA wirken (Vega et al. 2013).

Ein bekannter vergleichbarer Effekt stellt das genetische Hitchhiking dar (Smith und Haigh 1974). Die entsprechenden Auswirkungen von Wolbachia auf seine Wirte, welche die Verteilung der mitochondrialen DNA innerhalb von Populationen durch positive Selektion infizierter Tiere bewirken könnten, werden im Folgenden kurz erläutert.

Durch den Male Killing Phänotyp bewirken Wolbachia und anderen zytoplasmatisch

vererbaren Bakterien eine Abtötung von Männchen früh in der Entwicklung.

Dies führt zu einer Erhöhung der weiblichen Individuenzahl, wodurch die Bakterien ihre Verbreitung sichern. Außerdem bewirkt Male Killing Fitnessvorteile bei infizierten Weibchen im Vergleich zu nicht infizierten Weibchen. Diese entstehen unter anderem durch eine Reduzierung von Geschwisterrivalität, Kannibalismus und Inzucht (Hughes und Rasgon 2013).

Zytoplasmatische Inkompatibilität stellt die häufigste Wirkung von Wolbachia auf seine Wirte dar (Hurst und Jiggins 2005). Diese führt zu einer Inkompatibilität zwischen Spermien und Eizellen, wenn ein unpassender Infektionszustand vorliegt (Resh und Cardé 2009), Zytoplasmatische Inkompatibilität kann unidirektional, oder bidirektional vorliegen. Im Falle einer unidirektionalen zytoplasmatischen Inkompatibilität ist eine erfolgreiche Paarung von nicht infizierten Männchen mit infizierten Weibchen noch möglich. Infizierte Männchen können sich jedoch nur mit ebenfalls infizierten Weibchen paaren. Dies bewirkt, dass infizierten Weibchen potenziell mehr Partner zur Verfügung stehen. Die bidirektionale zytoplasmatische Inkompatibilität hingegen bewirkt, dass sich infizierte Tiere nur dann untereinander erfolgreich fortpflanzen können, wenn sie durch kompatible Wolbachienstämme befallen werden. Tiere, welche von inkompatiblen

Stämmen besiedelt werden, können sich also nicht erfolgreich fortpflanzen (Rokas 2000). Wolbachia kann also zu reproduktiver Isolation führen (Shoemaker et al. 1999).

Weitere Auswirkungen von Wolbachia auf die Reproduktion seiner Wirte, wie die Induzierung von Parthenogenese, Einfluss auf die Oogenese und Feminisierung männlicher Tiere hin zu phänotypisch weiblichen Individuen sind bekannt (Hughes und Rasgon 2013).

Neben der Beeinflussung der Reproduktion konnten in einigen Arten auch Fitnessvorteile durch das Zuführen von Nährstoffen (Hosokawa et al. 2010), oder durch eine Steigerung der Resistenz gegenüber bestimmten Pathogenen wie Viren, welche durch Wolbachia verursacht wurden, nachgewiesen werden (Hedges et al. 2008).

Auswirkungen auf die Verteilung von mitochondrialen Haplotypen

Gerth et al. (2011) weisen in einer Studie eine hohe Wolbachiainfektionsrate bei deutschen Bienen und Grabwespen nach und diskutierten in ihrer Arbeit mögliche **Bedeutungen dieser hohen Wolbachiainfektionsrate in Bezug auf die Anwendbarkeit von DNA-Barcoding bei Arthropoden**. Unter anderem vermuten sie, dass Wolbachia zu einer Homogenisierung von mitochondrialen Haplotypen führen könnte, ausgelöst durch „Selective Sweeps“. Solche mitochondrialen Linien könnten dann über Hybridisierungen und Introgression auf andere Arten übertragen werden.

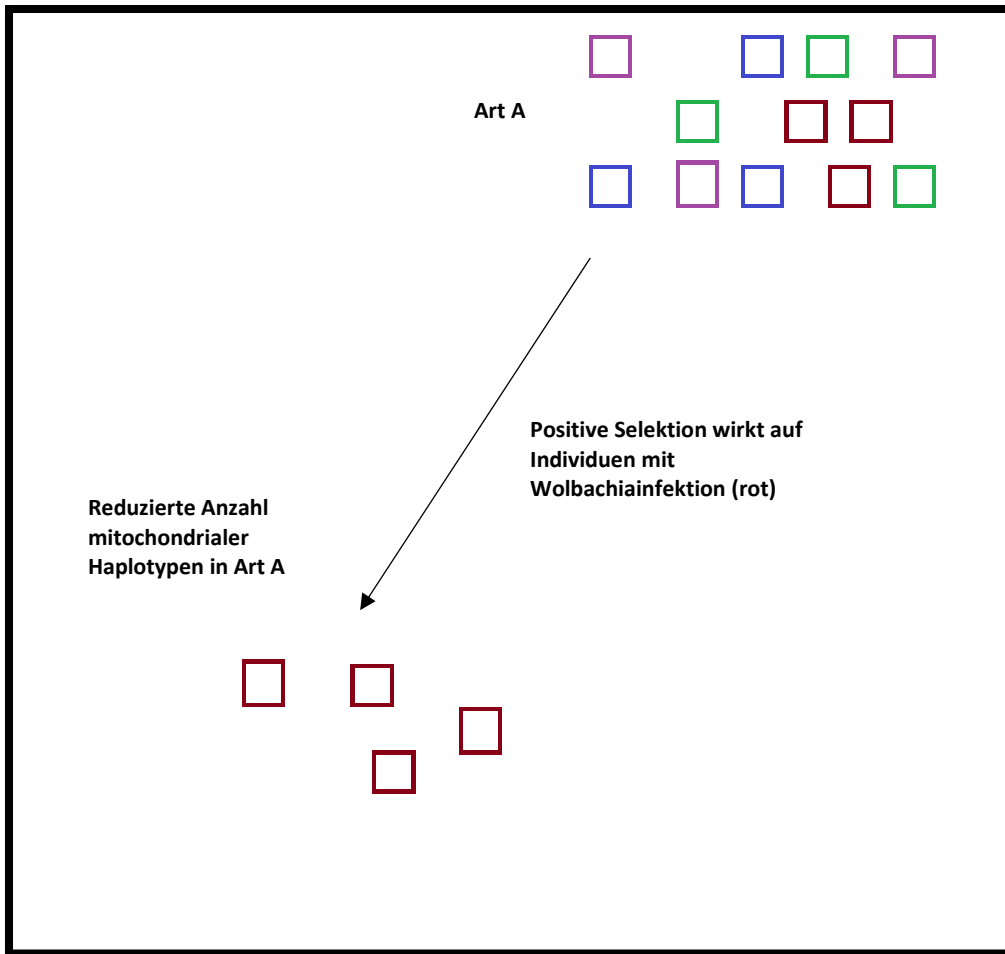


Abbildung 14: Schematische Darstellung eines „Selective Sweeps“ bedingt durch eine Wolbachiainfektion. Gleiche Farben stellen hier denselben mitochondrialen Haplotypen dar. Nur rote Individuen sind auch infiziert. Stehen infizierten Tieren nun mehr Partner zur Reproduktion zur Verfügung, bspw. durch zytoplasmatische Inkompatibilität, oder aber es bestehen selektive Vorteile bspw. durch Resistenzen gegenüber Pathogenen, so ist eine verhältnismäßig hohe Ausbreitung der mitochondrialen Gene infizierter Tiere vorstellbar. Dies kann dazu führen, dass die mitochondriale Haplotypdiversität reduziert wird (Gerth et al. 2011; Deng et al. 2021). Eigene Darstellung in Anlehnung an Gerth et al.(2011)

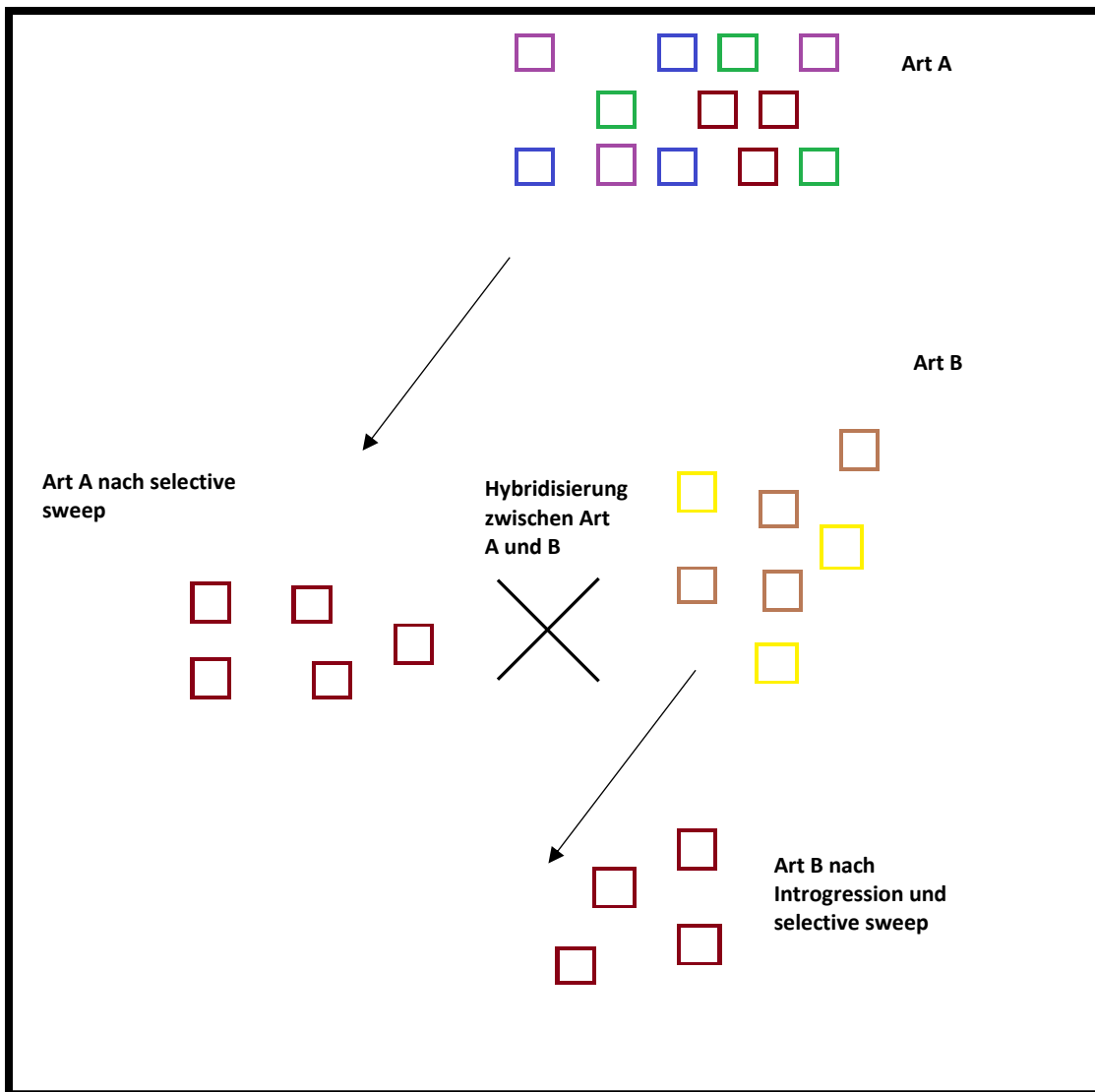


Abbildung 15: Schematische Darstellung eines „Selective Sweeps“ mit anschließender Introgression bedingt durch eine Wolbachiainfektion. Gleiche Farben stellen hier denselben mitochondrialen Haplotypen dar. Nur rote Individuen sind mit Wolbachia infiziert. Zu sehen ist die Reduktion der mitochondrialen Haplotypdiversität, wie sie in Abbildung 14 erläutert wurde. Findet nun Hybridisierung zwischen nahe verwandten Arten statt, so könnte der entsprechende Wolbachiastamm zusammen mit den entsprechenden mitochondrialen Genen von Art A auf Art B übertragen werden. Falls weiterhin Fitnessvorteile bestehen, könnte eine erneuter Selective Sweep dazu führen, dass sich auch in Art B die gleichen mitochondrialen Gene zusammen mit dem entsprechenden Wolbachiastamm ausbreiten. **Als Resultat wären in Art A und Art B die gleichen mitochondrialen Gene und die gleichen Wolbachiastämme nachweisebar** (Gerth et al. 2011; Klopstein et al. 2016; Deng et al. 2021). Eigene Darstellung in Anlehnung an (Gerth et al. 2011).

Tatsächlich lässt sich bei vielen Arthropoden mit hoher Infektionsrate eine reduzierte mitochondriale Haplotypdiversität nachweisen (Gompert et al. 2008; Sucháčková Bartoňová et al. 2021; Erasmus et al. 2022). So zeigt sich in einer Studie eine Reduktion der mitochondrialen Haplotypdiversität bedingt durch wahrscheinlich von Wolbachia

ausgelöste Selective Sweeps bei Populationen der infizierten Pechlibelle *Ischnura elegans*. Populationen in Nordeuropa, mit einer hohen Wolbachiainfektionsrate zeigen dabei eine reduzierte Haplotypdiversität im Vergleich zu Populationen mit einer geringeren Infektionsrate. Der mitochondriale Haplotyp Halplo1 korreliert dabei stark mit einem Wolbachiastamm. Die genaue Auswirkung des bei *I. elegans* nachgewiesenen Wolbachiastamms wEle1 sind dabei unbekannt. *I. elegans* und *I. genei* teilen sich zudem den gleichen mitochondrialen Haplotypen, welcher ebenfalls mit einer Infektion durch den gleichen Wolbachiastamm einhergeht. Dies spricht laut den Autoren wahrscheinlich entweder für Hybridisierung zwischen den Arten, oder aber für eine Infektion mit demselben Wolbachiastamm vor einer Abspaltung der beiden Arten (Deng et al. 2021).

Bei Schmetterlingen der Gattung *Pseudophilotes* zeigt sich ebenfalls ein Zusammenhang zwischen der Verteilung mitochondrialer Haplotypen und Wolbachiainfektionen, wobei sich sowohl *P. b. jacuticus* und *P. vicrama, yxc* sowie *P. sinicus* und *P. baton* die Barcodes teilen (Sucháčková Bartoňová et al. 2021). Bei Schlupfwespen der Gattung *Diplazon* fallen Wolbachiainfektion und identische mitochondriale Haplotypen, in diesem Fall der Gene ND2 und COI, bei den morphologisch und anhand nukleärer Marker unterscheidbaren Arten *Diplazon deletus* und *Diplazon flixi* zusammen (Klopfstein et al. 2016). Dabei halten Klopfstein et al. (2016) Wolbachia als Auslöser für die Introgression mitochondrialer Sequenzen zwischen den beiden Arten aufgrund von vier Punkten, die sie bei beiden Arten erfüllt sehen, für wahrscheinlich. Dabei geht es um die geringe Diversität mitochondrialer Gene, welche durch Selective Sweeps verursacht werden kann, die basierend auf Morphologie und anderen genetischen Markern nicht zu erwartende hohe Ähnlichkeit der mitochondrialen Sequenzen beider Arten, eine Infektion mit ähnlichen, oder gleichen Wolbachiastämmen und eine Möglichkeit zur Hybridisierung zwischen den Arten (Klopfstein et al. 2016).

Andere Endosymbionten/Parasiten

Calycopsis cecrops besitzt zwei verschiedene mitochondriale Linien mit einer Abweichung von 2,6 %, wobei eine der Barcode-Sequenzen der Art eher der von *C. isobea* ähnelt, während die Andere der von *C. quintana* ähnelt (Cong et al. 2017). Interessanterweise konnten bei *C. cecrops* Sequenzen eines Bakteriums aus der Familie der Lactobacillaceae nachgewiesen werden. Diese sind als Endosymbionten bekannt (Frese et al. 2011; Vásquez et al. 2012). Schmetterlinge der Gattung *Calycopsis* fressen Detritus und könnten auf diese Bakterien bei der Verdauung angewiesen sein (Cong et al. 2017). Eine Hybridisierung zwischen den Arten könnte somit selektive Vorteile liefern und somit auch eine Introgression der mitochondrialen DNA begünstigen (Cong et al. 2017). Sowohl von Bakterien der Gattung *Spiroplasma* (Schulenburg et al. 2000) und *Arsenophonus* ist bekannt, dass sie ähnlich wie Wolbachia Male Killing bei Arthropoden bewirken können (Hughes und Rasgon 2013). Bakterien der Gattung *Arsenophonus* und *Spiroplasma* befallen dabei ca. 4-7 % der Arthropoden. Insgesamt werden schätzungsweise ein Drittel aller Arthropoden von zytoplasmatisch vererbten Bakterien besiedelt (Duron et al. 2008).



Abbildung 16: *Ischnura genei* Quelle (Hartwig Stobbe/Naturgucker.de)



Abbildung 17: *Ischnura elegans*

Hybridisierung und Introgression zwischen *I. genei* und *I. elegans* konnte nachgewiesen werden (Deng et al. 2021). Quelle (Werner Kunz/Naturgucker.de)

Diskussion

Valide Arten

Im Kontext des DNA-Barcoding wird eine erfolgreiche Artabgrenzung häufig mit der Übereinstimmung von Barcodearten, also Arten, welche basierend auf der COI-Sequenz generiert wurden und „validen Arten“ begründet, oder es wird behauptet, dass Barcodearten häufig mit „valid species“, oder „actual species“ übereinstimmen (Ratnasingham und Hebert 2013; Breman et al. 2016). Im Anbetracht der Tatsache, dass verschiedene Artkonzepte unterschiedliche Grenzen aufweisen, stellt sich die Frage, inwiefern es solche validen Arten überhaupt geben kann (Kunz 2012a). Dies lässt sich anhand der Tatsache verdeutlichen, dass eine Kombination verschiedener Artbegriffe, welche unterschiedliche Kriterien zur Artabgrenzung nutzen, es nicht möglich macht, alle Arten in einem gemeinsamen Artbegriff unterzubringen, ohne eine subjektive Wertung der einzelnen Kriterien (Reydon und Kunz 2019).

Eine Frage der Definition

Neben den einzelnen Artkonzepten gibt es außerdem verschiedene Auffassungen darüber, ob es ein richtiges oder mehrere richtige, inkompatible Artkonzepte gibt und ob Arten real existierende, natürliche Einheiten sind, oder ob eine Gruppierung nach Arten nur ein Werkzeug darstellt, wobei die gewonnenen Arten nicht real als natürliche Einheit existieren (Reydon und Kunz 2019). Nach monistischer Ansicht existiert nur ein korrektes Artkonzept, welches entdeckt werden muss. Im Gegensatz dazu steht der Pluralismus. Nach pluralistischer Auffassung existieren mehrere korrekte Artbegriffe, welche abhängig von der Forschungsfrage unterschiedlich angewendet werden müssen. So wird beispielsweise zur Aufklärung der lokalen Biodiversität ein anderes Konzept genutzt werden, als zum Zwecke der Aufklärung von entwicklungsgeschichtlichen Verwandtschaftsverhältnissen (Kunz 2015; Reydon und Kunz 2019).

Artkonzepte und das Artproblem

Das Artproblem bezeichnet die Problematik rund um die Definition von Arten. Dabei werden neben der Diskussionen um die Artbegriffe auch solche geführt, welche sich mit der Existenz von Arten als natürliche Einheit, oder als Werkzeug (Realismus vs. Instrumentalismus) und der Frage, ob es einen Artbegriff gibt, mit dem sich alle Arten korrekt abgrenzen lassen, oder ob mehrere korrekte Artbegriffe existieren (Monismus vs. Pluralismus) befassen (Kornet 1993; Mayden 1997; Dayrat 2005; Kunz 2012a, 2012b; Reydon und Kunz 2019).

Die Problematik bei der Suche nach einem einheitlichen Artbegriff liegt darin, dass eine Artabgrenzung basierend auf unterschiedlichen Artkonzepten aufgrund der verschiedenen Kriterien unterschiedliche Arten ergibt. Artgrenzen werden also bei Anwendung unterschiedlicher Artkonzepte an unterschiedlichen Stellen gezogen. Aufgrund der unterschiedlichen Kriterien sind Artkonzepte zudem untereinander inkompatibel (Kornet 1993). Kryptische Spezies sind beispielsweise Arten, welche sich anhand ihrer Morphologie nicht unterscheiden lassen, aber durchaus reproduktiv isoliert voneinander sein können. Ein gegenteiliges Beispiel findet sich bei Ruderenten der Gattung *Oxyura*. Die in Europa beheimateten Weißkopfruderenten (*Oxyura*

leucocephala) hybridisieren mit den amerikanischen Schwarzkopfruderenten (*Oxyura jamaicensis*) und weisen offensichtlich kaum reproduktiven Barrieren auf, stellen also eine Reproduktionsgemeinschaft dar, obwohl sie morphologisch eindeutig unterscheidbar und seit langer Zeit getrennt sind (Kunz 2012a). Diese Hybridisierung gefährdet die Bestände der ohnehin vom Aussterben bedrohten Weißkopfruderente und Hybride können sich über mehrere Generationen hinweg erfolgreich fortpflanzen (Muñoz-Fuentes et al. 2007; Kunz 2012a). Auch bei sich uniparental fortpflanzenden Organismen gestaltet sich eine Abgrenzung der Arten in Abhängigkeit vom jeweiligen Artkonzept unmöglich. Solche Spezies werden beispielsweise durch das biologische Artkonzept einer gemeinsamen Fortpflanzungsgemeinschaft nicht abgedeckt (Kunz 2012a). Bei Barcodingarten liegen häufig ähnliche Probleme bei der Artabgrenzung vor. Durch Introgression der entsprechenden Markergene, wie beispielsweise COI, lassen sich morphologisch eindeutig identifizierbare Arten nicht anhand dieser unterscheiden (vgl. Tanganjikaseecichliden *L. callipterus* und *N. fasciatus*, oder die Arthropoden *D. flixi* und *D. deletus*). Ein weiteres Beispiel ist der **Gartenrotschwanz** *Phoenicurus phoenicurus*. Bei diesem weisen zwei sympatrisch lebende Populationen, welche weder reproduktiv noch anhand ihrer Morphologie zu unterscheiden sind, eine Differenz in ihrem Barcode von 5 % auf und würden sich bei einer Artabgrenzung anhand von COI als verschiedene Arten erweisen (Hogner et al. 2012). Arten lassen sich nach drei grundlegenden Kriterien abgrenzen (Kornet 1993) Dabei handelt es sich um die Konzepte der Reproduktionsgemeinschaft (Dobzhansky 1937; Mayr 1942), nach evolutionär relevanten morphologischen oder genetischen Merkmalen (Nixon und Wheeler 1990) und nach gemeinsamer monophyletischer Abstammung innerhalb eines genealogischen Netzwerks (Henning 1966), wobei eine Auftrennung nach weiteren Kriterien wie beispielsweise nach ökologischen Nischen, morphologischer Merkmale, genetischer Distanz und vielen anderen Kriterien erfolgen kann. **Über 30 verschiedene Artkonzepte werden genutzt (Mayden 1997; Zachos 2016)**. Der Erfolg von Barcoding wird häufig mit den hohen Erfolgsraten bei der Artidentifikation begründet. Dabei muss aber beachtet werden, dass mithilfe des Barcoding nur mitochondriale Linien erfasst werden, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit mit den entsprechenden validen Arten korrelieren. Was jedoch eine valide Art ist, hängt jedoch vom jeweiligen Artkonzept ab, häufig sind es Morphospezies. Trotzdem muss anerkannt werden, dass Barcodingarten häufig eine große Übereinstimmung zu den entsprechenden validen Arten aufweisen.

Schlussfolgerung

Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob eine Artabgrenzung basierend auch mitochondrialen Markern eine Lösung für das Artproblem sein kann und ob mitochondriale Barcodes ausreichend zur sinnvollen Speziesdiagnose sein können. Dafür wurden verschiedene Limitationen des Barcodings recherchiert und Beispiele für die jeweiligen Limitationen gesucht und erläutert. Es lässt sich feststellen, dass Barcodingarten nicht immer mit Arten übereinstimmen, auch wenn oft eine hohe Übereinstimmung zwischen Barcodingarten und Arten vorliegt. Dabei sind Gründe wie Hybridisierung und Introgression, Incomplete Lineage Sorting oder fehlende Mutationen bei jungen Arten und die Tatsache, dass unterschiedliche Artkonzepte zu verschiedenen Arten führen, zu nennen. Aus diesen Gründen lassen sich Arten nicht für jeden Zweck sinnvoll durch Barcoding abgrenzen. Diese können dazu führen, dass sich im Falle von Introgression entweder mehrere valide Arten die gleichen Barcode-Sequenzen teilen oder, dass mehrere Barcode-Linien in einer Art nachweisbar sind. Bei jungen Arten ist das Lineage Sorting noch nicht abgeschlossen, oder es fehlt eine ausreichende Anzahl an Mutationen, die eine Unterscheidung basierend auf COI als Markergen ermöglichen würden. Zudem können verschiedene Methoden, die zur Artabgrenzung durch Barcode-Sequenzen angewendet werden, eine unterschiedliche Zahl von Arten gewinnen. COI ist außerdem nicht immer ein neutraler Marker. **Viele Arthropoden werden von Bakterien besiedelt, welche genau wie COI zytoplasmatisch maternal vererbt werden, wenn diese Bakterien Fitnessvorteile für infizierte Tiere bewirken, dann findet auch Selektion in Richtung der Gene der infizierten Tiere statt, weshalb sich möglicherweise einzelne mitochondriale Linien innerhalb einer Art etablieren können und möglicherweise durch Hybridisierung und Introgression zusammen mit den Bakterien auf andere Arten verbreitet werden. In solchen Fällen widersprechen sich dann Barcodearten und Morphospezies.** Die vorangegangenen Erläuterungen zeigen also, dass eine Artabgrenzung basierend mitochondrialen Markern nicht in jedem Kontext sinnvoll ist. Im Endeffekt werden auf diese Weise nur mitochondriale Linien nachgewiesen. Diese korrelieren zwar häufig mit aktuell validen Arten (Ratnasingham und Hebert 2013), aber auch die Tatsache, dass eine Übereinstimmung mit valide Arten als Beleg für den Erfolg von Barcoding genutzt wird, ist nicht unproblematisch, da **eine Artabgrenzung abhängig von verschiedenen Kriterien erfolgen kann und verschiedene**


Artkonzepte nur selten exakt dieselben Individuen abdecken, anhand von Cichliden der großen afrikanischen Seen wurde zuvor erläutert, dass eine Abgrenzung verschiedener Arten auf Basis mehrerer Artkonzepte problematisch sein kann.

Auffällig ist außerdem die große Anzahl verschiedener Methoden, die unter der Bezeichnung DNA-Barcoding angewendet werden. Da diese zudem zu verschiedenen Ergebnissen in der Artabgrenzung kommen können, sollte unbedingt eine Standardisierung erfolgen, wenn Barcoding als Methode zur Artabgrenzung genutzt wird. Zudem sollte im Anbetracht der Tatsache, dass ein großer Teil der Arthropoden von symbiotisch/parasitär lebenden Bakterien besiedelt werden, welche wahrscheinlich Einfluss auf die Verteilung mitochondrialer Gene haben, erforscht werden, wie häufig Hybridisierung und Introgression mitochondrialer Gene bei solchen Arten tatsächlich vorkommt.

Eidesstaatliche Erklärung

Hiermit erkläre ich Dennis Tomanek, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe. Textpassagen, die wörtlich oder dem Sinn nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Neuss, den 30.01.2023



Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Kunz für die Betreuung meiner Bachelorarbeit und für die Möglichkeit, diese zu einem derart interessanten und vielseitigen Thema zu schreiben bedanken. Außerdem möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Fraune für die Übernahme der Zweitkorrektur bedanken. Weiterhin gilt meinen Freunden und Familie besonderer Dank für die Unterstützung während der gesamten Zeit der Bachelorarbeit.

Quellenverzeichnis

Ahrens, Dirk; Ah Yong, Shane T.; Ballerio, Alberto; Barclay, Maxwell V. L.; Eberle, Jonas; Espeland, Marianne et al. (2021): Is it time to describe new species without diagnoses? A comment on Sharkey et al. (2021). In: *Zootaxa* 5027 (2), S. 151–159. DOI: 10.11646/zootaxa.5027.2.1.

Aretz, Stefan; Ganten, Detlev (Hg.) (2008): Grundlagen der molekularen Medizin. 3., überarb. u. erweiterte Aufl. Heidelberg: Springer. Online verfügbar unter <http://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:bsz:31-epflicht-1623653>.

Avise, J. C.; Arnold, J.; Ball, R. M.; Bermingham, E.; Lamb, T.; Neigel, J. E. et al. (1987): INTRASPECIFIC PHYLOGEOGRAPHY: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. In: *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 18 (1), S. 489–522. DOI: 10.1146/annurev.es.18.110187.002421.

Benson, Dennis A.; Cavanaugh, Mark; Clark, Karen; Karsch-Mizrachi, Ilene; Lipman, David J.; Ostell, James; Sayers, Eric W. (2013): GenBank. In: *Nucleic Acids Research* 41 (Database issue), D36–42. DOI: 10.1093/nar/gks1195.

Blagoev, Gergin; Hebert, Paul; Adamowicz, Sarah; Robinson, Emily (2009): Prospects for using DNA barcoding to identify spiders in species-rich genera. In: *ZooKeys* 16, S. 27–46. DOI: 10.3897/zookeys.16.239.

Blagoev, Gergin A.; deWaard, Jeremy R.; Ratnasingham, Sujeevan; deWaard, Stephanie L.; Lu, Liuqiong; Robertson, James et al. (2016): Untangling taxonomy: a DNA barcode reference library for Canadian spiders. In: *Molecular ecology resources* 16 (1), S. 325–341. DOI: 10.1111/1755-0998.12444.

Breman, Floris C.; Loix, Sara; Jordaens, Kurt; Snoeks, Jos; van Steenberge, Maarten (2016): Testing the potential of DNA barcoding in vertebrate radiations: the case of the littoral cichlids (Pisces, Perciformes, Cichlidae) from Lake Tanganyika. In: *Molecular ecology resources* 16 (6), S. 1455–1464. DOI: 10.1111/1755-0998.12523.

Ceballos, Gerardo; Ehrlich, Paul R.; Barnosky, Anthony D.; García, Andrés; Pringle, Robert M.; Palmer, Todd M. (2015): Accelerated modern human-induced species losses: Entering the sixth mass extinction. In: *Science advances* 1 (5), e1400253. DOI: 10.1126/sciadv.1400253.

Chapman, Arthur D. (2009): Numbers of living species in Australia and the world. [Canberra, A.C.T.]: Department of the Environment, Water, Heritage and the Arts.

Cong, Qian; Shen, Jinhui; Borek, Dominika; Robbins, Robert K.; Opler, Paul A.; Otwinowski, Zbyszek; Grishin, Nick V. (2017): When COI barcodes deceive: complete genomes reveal introgression in hairstreaks. In: *Proceedings. Biological sciences* 284 (1848). DOI: 10.1098/rspb.2016.1735.

Dayrat, Benoît (2005): Towards integrative taxonomy. In: *Biological Journal of the Linnean Society* 85 (3), S. 407–415. DOI: 10.1111/j.1095-8312.2005.00503.x.

Decru, Eva; Vranken, Nathan; Maetens, Heleen; Mertens De Vry, Amber; Kayenbergh, Annelies; Snoeks, Jos; van Steenberge, Maarten (2022): DNA barcoding the Lake Edward basin: high taxonomic coverage of a tropical freshwater ichthyofauna. In: *Hydrobiologia* 849 (8), S. 1743–1762. DOI: 10.1007/s10750-022-04812-0.

Deng, Junchen; Assandri, Giacomo; Chauhan, Pallavi; Futahashi, Ryo; Galimberti, Andrea; Hansson, Bengt et al. (2021): Wolbachia-driven selective sweep in a range expanding insect species. In: *BMC ecology and evolution* 21 (1), S. 181. DOI: 10.1186/s12862-021-01906-6.

DeSalle, Rob; Goldstein, Paul (2019): Review and Interpretation of Trends in DNA Barcoding. In: *Front. Ecol. Evol.* 7, Artikel 302. DOI: 10.3389/fevo.2019.00302.

DeSalle, Rob; Schierwater, Bernd; Hadrys, Heike (2017): MtDNA: The small workhorse of evolutionary studies. In: *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* 22 (5), S. 873–887. DOI: 10.2741/4522.

Dobson, S. L.; Bourtzis, K.; Braig, H. R.; Jones, B. F.; Zhou, W.; Rousset, F.; O'Neill, S. L. (1999): Wolbachia infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. In: *Insect biochemistry and molecular biology* 29 (2), S. 153–160. DOI: 10.1016/s0965-1748(98)00119-2.

Dobzhansky, Theodosius (1937): Genetics and the Origin of Species. In: *American Midland Naturalist* 18 (6), S. 1105. DOI: 10.2307/2420611.

Duron, Olivier; Bouchon, Didier; Boutin, Sébastien; Bellamy, Lawrence; Zhou, Liqin; Engelstädter, Jan; Hurst, Gregory D. (2008): The diversity of reproductive parasites among arthropods: Wolbachia do not walk alone. In: *BMC biology* 6, S. 27. DOI: 10.1186/1741-7007-6-27.

Egger, Bernd; Koblmüller, Stephan; Sturmbauer, Christian; Sefc, Kristina M. (2007): Nuclear and mitochondrial data reveal different evolutionary processes in the Lake Tanganyika cichlid genus *Tropheus*. In: *BMC evolutionary biology* 7, S. 137. DOI: 10.1186/1471-2148-7-137.

Erasmus, Reynardt; van den Berg, Johnnie; Du Plessis, Hannalene (2022): Wolbachia strains associated with *Tuta absoluta* in South Africa: lack of genetic diversity and parthenogenesis. In: *entomologia* 42 (5), S. 835–838. DOI: 10.1127/entomologia/2022/1476.

Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R.; Vrijenhoek, R. (1994): DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. In: *Molecular marine biology and biotechnology* 3 (5), S. 294–299.

- Frese, Steven A.; Benson, Andrew K.; Tannock, Gerald W.; Loach, Diane M.; Kim, Jaehyoung; Zhang, Min et al. (2011): The evolution of host specialization in the vertebrate gut symbiont *Lactobacillus reuteri*. In: *PLoS genetics* 7 (2), e1001314. DOI: 10.1371/journal.pgen.1001314.
- Gerth, Michael; Geißler, Annemarie; Bleidorn, Christoph (2011): Wolbachia infections in bees (*Anthophila*) and possible implications for DNA barcoding. In: *Systematics and Biodiversity* 9 (4), S. 319–327. DOI: 10.1080/14772000.2011.627953.
- Gompert, Zachariah; Forister, Matthew L.; Fordyce, James A.; Nice, Chris C. (2008): Widespread mitochondrial nuclear discordance with evidence for introgressive hybridization and selective sweeps in *Lycaeides*. In: *Molecular ecology* 17 (24), S. 5231–5244. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2008.03988.x.
- Hebert, Paul D. N.; Cywinska, Alina; Ball, Shelley L.; deWaard, Jeremy R. (2003a): Biological identifications through DNA barcodes. In: *Proceedings. Biological sciences* 270 (1512), S. 313–321. DOI: 10.1098/rspb.2002.2218.
- Hebert, Paul D. N.; Ratnasingham, Sujeevan; deWaard, Jeremy R. (2003b): Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. In: *Proceedings. Biological sciences* 270 Suppl 1 (suppl_1), S96-9. DOI: 10.1098/rsbl.2003.0025.
- Hebert, Paul D. N.; Stoeckle, Mark Y.; Zemplak, Tyler S.; Francis, Charles M. (2004): Identification of Birds through DNA Barcodes. In: *PLoS biology* 2 (10), e312. DOI: 10.1371/journal.pbio.0020312.
- Hedges, Lauren M.; Brownlie, Jeremy C.; O'Neill, Scott L.; Johnson, Karyn N. (2008): Wolbachia and virus protection in insects. In: *Science (New York, N.Y.)* 322 (5902), S. 702. DOI: 10.1126/science.1162418.
- Henning, Willi (1966): Phylogenetic Systematics. Online verfügbar unter <https://philpapers.org/rec/henps-2>.
- Hickerson, Michael J.; Meyer, Christopher P.; Moritz, Craig (2006): DNA barcoding will often fail to discover new animal species over broad parameter space. In: *Syst Biol* 55 (5), S. 729–739. DOI: 10.1080/10635150600969898.
- Hilgenboecker, Kirsten; Hammerstein, Peter; Schlattmann, Peter; Telschow, Arndt; Werren, John H. (2008): How many species are infected with Wolbachia?--A statistical analysis of current data. In: *FEMS microbiology letters* 281 (2), S. 215–220. DOI: 10.1111/j.1574-6968.2008.01110.x.
- Hogner, Silje; Laskemoen, Terje; Lifjeld, Jan T.; Porkert, Jiri; Kleven, Oddmund; Albayrak, Tamer et al. (2012): Deep sympatric mitochondrial divergence without reproductive isolation in the common redstart *Phoenicurus phoenicurus*. In: *Ecology and evolution* 2 (12), S. 2974–2988. DOI: 10.1002/ece3.398.

Hosokawa, Takahiro; Koga, Ryuichi; Kikuchi, Yoshitomo; Meng, Xian-Ying; Fukatsu, Takema (2010): Wolbachia as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (2), S. 769–774. DOI: 10.1073/pnas.0911476107.

Hughes, Grant L.; Rasgon, Jason L. (2013): Chapter 9 - Wolbachia Infections in Arthropod Hosts. In: Fernando E. Vega, Harry K. Kaya und Yoshinori Tanada (Hg.): *Insect pathology*. 2nd edition, [Credo enhanced edition]. Amsterdam [Netherlands], Boston, Massachusetts: Elsevier/Academic Press; Credo Reference, S. 351–366. Online verfügbar unter <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123849847000099>.

Hurst, Gregory D. D.; Jiggins, Francis M. (2005): Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. In: *Proceedings. Biological sciences* 272 (1572), S. 1525–1534. DOI: 10.1098/rspb.2005.3056.

Jiggins, Francis M. (2003): Male-killing Wolbachia and mitochondrial DNA: selective sweeps, hybrid introgression and parasite population dynamics. In: *Genetics* 164 (1), S. 5–12. DOI: 10.1093/genetics/164.1.5.

Klopfstein, Seraina; Kropf, Christian; Baur, Hannes (2016): Wolbachia endosymbionts distort DNA barcoding in the parasitoid wasp genus *Diplazon* (Hymenoptera: Ichneumonidae). In: *Zool J Linn Soc* 177 (3), S. 541–557. DOI: 10.1111/zoj.12380.

Koblmüller, Stephan; Egger, Bernd; Sturmbauer, Christian; Sefc, Kristina M. (2010): Rapid radiation, ancient incomplete lineage sorting and ancient hybridization in the endemic Lake Tanganyika cichlid tribe Tropheini. In: *Molecular phylogenetics and evolution* 55 (1), S. 318–334. DOI: 10.1016/j.ympev.2009.09.032.

Koblmüller, Stephan; Salzburger, Walter; Obermüller, Beate; Eigner, Eva; Sturmbauer, Christian; Sefc, Kristina M. (2011): Separated by sand, fused by dropping water: habitat barriers and fluctuating water levels steer the evolution of rock-dwelling cichlid populations in Lake Tanganyika. In: *Molecular ecology* 20 (11), S. 2272–2290. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2011.05088.x.

Köhler, Jonas; Rulik, Björn; Eberle, Jonas; Thormann, Jana; Köhler, Frank; Ahrens, Dirk (2022): Does monitoring of saproxylic beetles benefit from inclusion of larvae? In: *Insect Conserv Diversity* 15 (5), S. 555–571. DOI: 10.1111/icad.12573.

Konings, Ad (2019): *Tanganyika cichlids in their natural habitat*. 4th edition. United States: Cichlid Press.

Kornet, D. J. (1993): Permanent Splits as Speciation Events: A Formal Reconstruction of the Internodal Species Concept. In: *Journal of Theoretical Biology* 164 (4), S. 407–435. DOI: 10.1006/jtbi.1993.1164.

Kullander, Sven O.; Karlsson, Mikael; Karlsson, Magnus; Norén, Michael (2014): *Chalinochromis cyanophleps*, a new species of cichlid fish (Teleostei: Cichlidae) from Lake Tanganyika. In: *Zootaxa* 3790, S. 425–438. DOI: 10.11646/zootaxa.3790.3.2.

Kunz, Werner (2012a): Do species exist? Principles of taxonomic classification. Online-ausg. Weinheim, Germany: Wiley-Blackwell. Online verfügbar unter <https://ebookcentral.proquest.com/lib/kxp/detail.action?docID=1184753>.

Kunz, Werner (2012b): Genetische Distanz und Artabgrenzung – die Barcode Taxonomie vertritt ihren eigenen Artbegriff. In: *Entomologie heute* 24, S. 277–286. Online verfügbar unter https://www.google.com/search?q=Kunz%2C+W.+%282012%29%3A+Genetische+Distanz+und+Artabgrenzung+-+die+Barcode-Taxonomie+vertritt+ihren+eigenen+Artbegriff.+In%3A+Entomologie+heute+24%2C+S.+277%E2%80%93286.&rlz=1C1ONGR_deDE979DE979&oq=Kunz%2C+W.+%282012%29%3A+Genetische+Distanz+und+Artabgrenzung+-+die+Barcode-Taxonomie+vertritt+ihren+eigenen+Artbegriff.+In%3A+Entomologie+heute+24%2C+S.+277%E2%80%93286.&aqs=chrome.0.69i59.694j0j9&sourceid=chrome&ie=UTF-8, zuletzt geprüft am 30.01.2023.

Kunz, Werner (2015): Integrative Art oder Barcode-Art – welche ist die richtige Art? In: *Entomologie heute* (27), S. 177–181.

Kunz, Werner (2018): Wohin steuert die Taxonomie? In: *Biol. Unserer Zeit* 48 (3), S. 170–178. DOI: 10.1002/biuz.201810647.

Kunz, Werner (2018): Wohin steuert die Taxonomie? In: *Biol. Unserer Zeit* 48 (3), S. 170–178. DOI: 10.1002/biuz.201810647.

Lorenzo-Carballa, M. O.; Torres-Cambas, Y.; Heaton, K.; Hurst, G. D. D.; Charlat, S.; Sherratt, T. N. et al. (2019): Widespread *Wolbachia* infection in an insular radiation of damselflies (Odonata, Coenagrionidae). In: *Scientific reports* 9 (1), S. 11933. DOI: 10.1038/s41598-019-47954-3.

Lynch, M.; Jarrell, P. E. (1993): A method for calibrating molecular clocks and its application to animal mitochondrial DNA. In: *Genetics* 135 (4), S. 1197–1208. DOI: 10.1093/genetics/135.4.1197.

Maan, Martine E.; Sefc, Kristina M. (2013): Colour variation in cichlid fish: developmental mechanisms, selective pressures and evolutionary consequences. In: *Seminars in cell & developmental biology* 24 (6-7), S. 516–528. DOI: 10.1016/j.semcd.2013.05.003.

Mayden, R. L. (1997): A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. Online verfügbar unter <https://philpapers.org/rec/mayaho-6>.

Mayr, Ernst (1942): Systematics and the origin of species from the viewpoint of a zoologist.

Meier, Joana I.; Sousa, Vitor C.; Marques, David A.; Selz, Oliver M.; Wagner, Catherine E.; Excoffier, Laurent; Seehausen, Ole (2017): Demographic modelling with whole-genome data reveals parallel origin of similar *Pundamilia* cichlid species after hybridization. In: *Molecular ecology* 26 (1), S. 123–141. DOI: 10.1111/mec.13838.

Meier, Rudolf; Shiyang, Kwong; Vaidya, Gaurav; K L Ng, Peter (2005): DNA Barcoding and Taxonomy in Diptera A Tale of High Intraspecific Variability and Low Identification Success. In: *Systematic biology* 55, S. 715–728. Online verfügbar unter <https://doi.org/10.1080/10635150600969864>.

Meierotto, Sarah; Sharkey, Michael J.; Janzen, Daniel H.; Hallwachs, Winnie; Hebert, Paul D. N.; Chapman, Eric G.; Smith, M. Alex (2019): A revolutionary protocol to describe understudied hyperdiverse taxa and overcome the taxonomic impediment. In: *DEZ* 66 (2), S. 119–145. DOI: 10.3897/dez.66.34683.

Meyer, Christopher P.; Paulay, Gustav (2005): DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. In: *PLoS biology* 3 (12), e422. DOI: 10.1371/journal.pbio.0030422.

Muñoz-Fuentes, V.; Vilà, C.; Green, A. J.; Negro, J. J.; Sorenson, M. D. (2007): Hybridization between white-headed ducks and introduced ruddy ducks in Spain. In: *Molecular ecology* 16 (3), S. 629–638. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2006.03170.x.

Nevado, B.; Koblmüller, S.; Sturmbauer, C.; Snoeks, J.; Usano-Alemany, J.; Verheyen, E. (2009): Complete mitochondrial DNA replacement in a Lake Tanganyika cichlid fish. In: *Molecular ecology* 18 (20), S. 4240–4255. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2009.04348.x.

Nevado, Bruno; Fazalova, Varvara; Backeljau, Thierry; Hanssens, Mark; Verheyen, Erik (2011): Repeated unidirectional introgression of nuclear and mitochondrial DNA between four congeneric Tanganyikan cichlids. In: *Molecular biology and evolution* 28 (8), S. 2253–2267. DOI: 10.1093/molbev/msr043.

Nixon, Kevin C.; Wheeler, Quentin D. (1990): AN AMPLIFICATION OF THE PHYLOGENETIC SPECIES CONCEPT. In: *Cladistics* 6 (3), S. 211–223. DOI: 10.1111/j.1096-0031.1990.tb00541.x.

Njiru, M.; Mkumbo, O. C.; van der Knaap, M. (2010): Some possible factors leading to decline in fish species in Lake Victoria. In: *Aquatic Ecosystem Health & Management* 13 (1), S. 3–10. DOI: 10.1080/14634980903566253.

Ødegaard, Frode (2000): How many species of arthropods? Erwin's estimate revised. In: *Biological Journal of the Linnean Society* 71 (4), S. 583–597. DOI: 10.1111/j.1095-8312.2000.tb01279.x.

- Pardo-Diaz, Carolina; Salazar, Camilo; Baxter, Simon W.; Merot, Claire; Figueiredo-Ready, Wilsea; Joron, Mathieu et al. (2012): Adaptive introgression across species boundaries in *Heliconius* butterflies. In: *PLoS genetics* 8 (6), e1002752. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002752.
- Pollard, Daniel A.; Iyer, Venky N.; Moses, Alan M.; Eisen, Michael B. (2006): Widespread discordance of gene trees with species tree in *Drosophila*: evidence for incomplete lineage sorting. In: *PLoS genetics* 2 (10), e173. DOI: 10.1371/journal.pgen.0020173.
- Pons, Joan; Barraclough, Timothy G.; Gomez-Zurita, Jesus; Cardoso, Anabela; Duran, Daniel P.; Hazell, Steaphan et al. (2006): Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. In: *Syst Biol* 55 (4), S. 595–609. DOI: 10.1080/10635150600852011.
- Puillandre, N.; Lambert, A.; Brouillet, S.; Achaz, G. (2012): ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. In: *Molecular ecology* 21 (8), S. 1864–1877. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x.
- Ratnasingham, Sujeevan; Hebert, Paul D. N. (2007): bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). In: *Molecular ecology notes* 7 (3), S. 355–364. DOI: 10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x.
- Ratnasingham, Sujeevan; Hebert, Paul D. N. (2013): A DNA-based registry for all animal species: the barcode index number (BIN) system. In: *PloS one* 8 (7), e66213. DOI: 10.1371/journal.pone.0066213.
- Resh, Vincent H.; Cardé, Ring T. (Hg.) (2009): Encyclopedia of insects. Unter Mitarbeit von Ring T. Cardé. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier/Academic Press. Online verfügbar unter <https://ebookcentral.proquest.com/lib/kxp/detail.action?docID=452854>.
- Reydon, Thomas A. C.; Kunz, Werner (2019): Species as natural entities, instrumental units and ranked taxa: new perspectives on the grouping and ranking problems. In: *Biological Journal of the Linnean Society* 126 (4), S. 623–636. DOI: 10.1093/biolinnean/blz013.
- Rokas, Antonis (2000): Wolbachia as a speciation agent. In: *Trends in Ecology & Evolution* 15 (2), S. 44–45. DOI: 10.1016/S0169-5347(99)01783-8.
- Ros, Vera I. D.; Fleming, Vicki M.; Feil, Edward J.; Breeuwer, Johannes A. J. (2009): How diverse is the genus *Wolbachia*? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae). In: *Applied and environmental microbiology* 75 (4), S. 1036–1043. DOI: 10.1128/AEM.01109-08.
- Saccone, Cecilia; Giorgi, Carla de; Gissi, Carmela; Pesole, Graziano; Reyes, Aurelio (1999): Evolutionary genomics in Metazoa: the mitochondrial DNA as a model system. In: *Gene* 238 (1), S. 195–209. DOI: 10.1016/S0378-1119(99)00270-X.

Salzburger, Walter (2018): Understanding explosive diversification through cichlid fish genomics. In: *Nature reviews. Genetics* 19 (11), S. 705–717. DOI: 10.1038/s41576-018-0043-9.

Schulenburg, Hinrich Graf von der; Majerus, Tamsin M. O.; Dorzhu, Chorduraa M.; Zakharov, Ilia A.; Hurst, Gregory D. D.; Majerus, Michael E. N. (2000): Evolution of male-killing *Spiroplasma* (Procaryotae: Mollicutes) inferred from ribosomal spacer sequences. In: *The Journal of general and applied microbiology* 46 (2), S. 95–98. DOI: 10.2323/jgam.46.95.

Sharkey, Michael J.; Janzen, Daniel H.; Hallwachs, Winnie; Chapman, Eric G.; Smith, M. Alex; Dapkey, Tanya et al. (2021): Minimalist revision and description of 403 new species in 11 subfamilies of Costa Rican braconid parasitoid wasps, including host records for 219 species. In: *ZooKeys* 1013, S. 1–665. DOI: 10.3897/zookeys.1013.55600.

Shoemaker, D. DeWayne; Katju, Vaishali; Jaenike, John (1999): WOLBACHIA AND THE EVOLUTION OF REPRODUCTIVE ISOLATION BETWEEN *DROSOPHILA RECENS* AND *DROSOPHILA SUBQUINARIA*. In: *Evolution; international journal of organic evolution* 53 (4), S. 1157–1164. DOI: 10.1111/j.1558-5646.1999.tb04529.x.

Smith, J. M.; Haigh, J. (1974): The hitch-hiking effect of a favourable gene. In: *Genetical research* 23 (1), S. 23–35.

Sucháčková Bartoňová, Alena; Konvička, Martin; Marešová, Jana; Wiemers, Martin; Ignatev, Nikolai; Wahlberg, Niklas et al. (2021): Wolbachia affects mitochondrial population structure in two systems of closely related Palaearctic blue butterflies. In: *Scientific reports* 11 (1), S. 3019. DOI: 10.1038/s41598-021-82433-8.

Taxonomy (2022): Taxonomy browser (*Wolbachia pipientis* wAlbB). Online verfügbar unter <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=1116230>, zuletzt aktualisiert am 03.12.2022, zuletzt geprüft am 03.12.2022.

Trivedi, Subrata (2020): DNA Barcoding and Molecular Phylogeny. Unter Mitarbeit von Hasibur Rehman, Shalini Saggi, Chellasamy Panneerselvam und Sankar K. Ghosh. 2nd ed. 2020. Cham: Springer International Publishing. Online verfügbar unter <https://ebookcentral.proquest.com/lib/kxp/detail.action?docID=6318128>.

Turner, George F. (2007): Adaptive radiation of cichlid fish. In: *Current Biology* 17 (19), R827-31. DOI: 10.1016/j.cub.2007.07.026.

Uganda freshwater biodiversity portal (2023). Online verfügbar unter <https://freshwaterbiodiversity.go.ug/species/?code=VQNTHK48>, zuletzt aktualisiert am 15.01.2023, zuletzt geprüft am 15.01.2023.

Vásquez, Alejandra; Forsgren, Eva; Fries, Ingemar; Paxton, Robert J.; Flaberg, Emilie; Szekely, Laszlo; Olofsson, Tobias C. (2012): Symbionts as major modulators of insect health: lactic acid bacteria and honeybees. In: *PloS one* 7 (3), e33188. DOI: 10.1371/journal.pone.0033188.

Vega, Fernando E.; Kaya, Harry K.; Tanada, Yoshinori (Hg.) (2013): Insect pathology. 2nd edition, [Credo enhanced edition]. Amsterdam [Netherlands], Boston, Massachusetts: Elsevier/Academic Press; Credo Reference.

Ward, R. D.; Hanner, R.; Hebert, P. D. N. (2009): The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL. In: *Journal of fish biology* 74 (2), S. 329–356. DOI: 10.1111/j.1095-8649.2008.02080.x.

Werren, J. H.; Windsor, D. M. (2000): Wolbachia infection frequencies in insects: evidence of a global equilibrium? In: *Proceedings. Biological sciences* 267 (1450), S. 1277–1285. DOI: 10.1098/rspb.2000.1139.

Wiemers, Martin; Fiedler, Konrad (2007): Does the DNA barcoding gap exist? - a case study in blue butterflies (Lepidoptera: Lycaenidae). In: *Frontiers in Zoology* 4 (1), S. 8. DOI: 10.1186/1742-9994-4-8.

Yeo, Darren; Srivathsan, Amrita; Meier, Rudolf (2020): Longer is Not Always Better: Optimizing Barcode Length for Large-Scale Species Discovery and Identification. In: *Systematic biology* 69 (5), S. 999–1015. DOI: 10.1093/sysbio/syaa014.

Zachos, Frank E. (2016): Species Concepts in Biology: Springer.

Zug, Roman; Hammerstein, Peter (2012): Still a host of hosts for Wolbachia: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. In: *PloS one* 7 (6), e38544. DOI: 10.1371/journal.pone.0038544.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der genetischen Distanz innerhalb und zwischen zwei Arten. Rot stellt die Verteilung der intraspezifischen COI-Sequenzen von Art A dar, grün entsprechend die der nächsten verwandten Art B. Dazwischen liegt die sogenannte Barcode Gap, in diesem Distanzbereich zwischen Art A und Art B befinden sich keine (oder nur kaum) Individuen. Eigene Darstellung. In Anlehnung an Meyer und Paulay (2005)	7
Abbildung 2: Schema des RESL Algorithmus Quelle (Ratnasingham und Hebert 2013)	10
Abbildung 3: Schematische Darstellung des Incomplete Lineage Sorting. Wenn G1 dem mitochondrialen Gen COI entsprechen würde, so würden sich in diesem Beispiel Art A und Art B, als näher verwandte Arten darstellen und evtl. sogar die gleichen mitochondrialen Gene teilen, wobei eigentlich Art B und Art C Schwestergruppen darstellen. G0 stellt hier die ursprüngliche Version des Gens dar, G1 die Version nach dem Auftreten von Mutationen Quelle (Peter Coxhead)	12
Abbildung 4: Unterschiede der tatsächlichen Verwandtschaft und der genealogischen Art. Quelle (Pollard et al. 2006).....	13
Abbildung 5: Eine Übertragung des Gens G1 hat hier bedingt durch Introgression von Art B auf Art A stattgefunden. Aufgrund des identischen Barcodes würde man diese Arten als konspezifisch deuten. Quelle (Peter Coxhead)	14
Abbildung 6: <i>Micropanchax vitschumbaensis</i> (Syn. <i>Lacrusticola vitschumbaensis</i>) Quelle: (Martin Grimm/Fishbase.se)	16
Abbildung 7: <i>Laciris pelagica</i> M. <i>vitschumbaensis</i> und <i>L. pelagica</i> sind morphologisch unterscheidbar, jedoch nicht anhand ihrer Barcodes (Decru et al. 2022). Quelle (Uganda freshwater biodiversity portal 2023).....	17
Abbildung 8: Ausschnitt des ML-Baums von Decru et al. (2022). Arten wurden als solche zusammengefasst, wenn die genetische Distanz geringer als 2 % ist. Zu erkennen ist, dass ein Großteil der Cichliden der Gattung <i>Haplochromis</i> zu einer Klade zusammengefasst werden. Innerhalb dieser liegt ein maximaler genetischer Unterschied von 0.8 % vor. Auch <i>M. vitschumbaensis</i> und <i>L. pelagicus</i> bilden eine Klade, da sie sich die Barcode Sequenz teilen. Quelle (Decru et al. 2022).....	17
Abbildung 9: <i>Lamprologus callipterus</i> Populationen dieser Fische teilen sich ihre mitochondrialen Gene mit <i>Lamprologus fasciatus</i> . Die Tiere sind morphologisch eindeutig unterscheidbar, bedingt durch Introgression finden sich bei ihnen jedoch die gleichen Barcode Sequenzen (Nevado et al. 2009; Breman et al. 2016). Quelle (Paul Optenkamp/ Flickr.com)	19
Abbildung 10: <i>Neolamprologus fasciatus</i> Populationen dieser Fische teilen sich ihre mitochondrialen Gene mit <i>Lamprologus callipterus</i> . Die Tiere sind morphologisch eindeutig unterscheidbar. Quelle (seriouslyfish.com)	20

Abbildung 11: *Chalinochromis cyanophelps*

C. cyanophelps und *C. popelini* stammen beide aus dem Tanganjikasee und weisen eine Barcode Differenz von nur 1.8 % für den Marker COI auf. Sie sind jedoch morphologisch gut zu unterscheiden. Verschiedene Ursachen wie Intogression, oder eine erst kürzlich erfolgte Abspaltung der Arten könnten dafür verantwortlich sein. Quelle (Kullander et al. 2014) 21

Abbildung 12: *Chalinochromis popelini*

C. cyanophelps und *C. popelini* weisen eine Differenz von nur 1.8 % für den Marker COI auf (Kullander et al. 2014). Quelle (Dr. David Midgley/Wikimedia.org) 22

Abbildung 13: Populationen von *P. pundamilia* (A und B) *P. nyererei* (C und D). Die Tiere stammen aus Gebieten, in denen trübes Wasser zu Hybridisierung zwischen den Arten führt. Tiere, Tiere aus solchen Gewässern sind sich anhand von COI ähnlicher als zur eigenen Art in klaren Gewässern Quelle (Maan und Sefc 2013)..... 22

Abbildung 14: Schematische Darstellung eines „Selective Sweeps“ bedingt durch eine Wolbachiainfektion. Gleiche Farben stellen hier denselben mitochondrialen Haplotypen dar. Nur rote Individuen sind auch infiziert. Stehen infizierten Tieren nun mehr Partner zur Reproduktion zur Verfügung, bspw. durch zytoplasmatische Inkompatibilität, oder aber es bestehen selektive Vorteile bspw. durch Resistenzen gegenüber Pathogenen, so ist eine verhältnismäßig hohe Ausbreitung der mitochondrialen Gene infizierter Tiere vorstellbar. Dies kann dazu führen, dass die mitochondriale Haplotypdiversität reduziert wird (Gerth et al. 2011; Deng et al. 2021). Eigene Darstellung in Anlehnung an Gerth et al.(2011)..... 26

Abbildung 15: Schematische Darstellung eines „Selective Sweeps“ mit anschließender Introgression bedingt durch eine Wolbachiainfektion. Gleiche Farben stellen hier denselben mitochondrialen Haplotypen dar. Nur rote Individuen sind mit Wolbachia infiziert. Zu sehen ist die Reduktion der mitochondrialen Haplotypdiversität, wie sie in Abbildung 14 erläutert wurde. Findet nun Hybridisierung zwischen nahe verwandten Arten statt, so könnte der entsprechende Wolbachienstamm zusammen mit den entsprechenden mitochondrialen Genen von Art A auf Art B übertragen werden. Falls weiterhin Fitnessvorteile bestehen, könnte eine erneuter Selective Sweep dazu führen, dass sich auch in Art B die gleichen mitochondrialen Gene zusammen mit dem entsprechenden Wolbachienstamm ausbreiten. Als Resultat wären in Art A und Art B die gleichen mitochondrialen Gene und die gleichen Wolbachiestämme nachweisebar (Gerth et al. 2011; Klopstein et al. 2016; Deng et al. 2021). Eigene Darstellung in Anlehnung an (Gerth et al. 2011). 27

Abbildung 16: *Ischnura genei* Quelle (Hartwig Stobbe/Naturgucker.de)..... 29

Abbildung 17: *Ischnura elegans*

Hybridisierung und Introgression zwischen *I. genei* und *I. elegans* konnte nachgewiesen werden (Deng et al. 2021). Quelle (Werner Kunz/Naturgucker.de) 30

