

## Abschließender Sachbericht

# „FREDIE“: Freshwater Diversity Identification for Europe (FREDIE)

**Leibniz-Einrichtung:** Stiftung Zoologisches Forschungsmuseum Alexander Koenig  
– Leibniz-Institut für Biodiversität der Tiere

**Aktenzeichen:** SAW-2011-ZFMK-3

**Projektlaufzeit:** 36 Monate (30.04.2012 – 30.04.2014)

**Ansprechpartner:** Dr. Fabian Herder, Sektionsleiter Ichthyologie, Stiftung  
Zoologisches Forschungsmuseum Alexander Koenig, Adenauerallee 160, 53113  
Bonn, E-Mail: f.herder@zfmk.de

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Beteiligte Kooperationspartner</b> .....	<b>3</b>
<b>2. Executive Summary – Zusammenfassung</b> .....	<b>4</b>
<b>3. Chronologie des Verbundprojektes</b> .....	<b>5</b>
<b>4. Teilprojekt Europäische Süßwasserfische</b>	
<b>4.1 Sammelaktivitäten</b> .....	<b>6</b>
<b>4.2 DNA Barcoding</b> .....	<b>7</b>
<b>4.3 Tagungsbeiträge</b> .....	<b>8</b>
<b>4.4 Publikationen</b> .....	<b>9</b>
<b>5. Teilprojekt Europäische Süßwassermollusken</b>	
<b>5.1 Sammelaktivitäten</b> .....	<b>11</b>
<b>5.2 DNA Barcoding</b> .....	<b>12</b>
<b>5.3 Tagungsbeiträge</b> .....	<b>14</b>
<b>5.4 Publikationen</b> .....	<b>14</b>
<b>6. Teilprojekt Europäische Eintagsfliegen</b>	
<b>6.1 Sammelaktivitäten</b> .....	<b>15</b>
<b>6.2 DNA Barcoding</b> .....	<b>17</b>
<b>6.3 Tagungsbeiträge</b> .....	<b>17</b>
<b>6.4 Publikationen</b> .....	<b>17</b>
<b>7. Identifizierung übergeordneter Diversitätsmuster</b> .....	<b>19</b>
<b>8. Methodische Teilprojekte</b>	
<b>8.1 Sequenzierverfahren vs. Schmelzpunktanalyse (HRM)</b> .....	<b>19</b>
<b>8.2 Alternative genetische Barcode Marker</b> .....	<b>21</b>

## **1. Kooperationspartner:**

Prof. Dr. Bernhard Misof  
Leiter Abteilung Molekulare Biodiversitätsforschung des ZFMK  
E-Mail: [b.misof@zfmk.de](mailto:b.misof@zfmk.de)  
Kategorie: Partner am antragstellenden Institut

Dr. Jörg Freyhof  
ehemals Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei  
Abteilung Biologie und Ökologie der Fische  
Müggelseedamm 310  
12587 Berlin  
E-Mail aktuell: [joerg.freyhof@idiv.de](mailto:joerg.freyhof@idiv.de)  
Kategorie: Vernetzungspartner

Dr. Michael T. Monaghan  
Leibniz-Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei  
Müggelseedamm 310  
12587 Berlin  
E-Mail: [monaghan@iqb.de](mailto:monaghan@iqb.de)  
Kategorie: Vernetzungspartner

Dr. Thomas von Rintelen  
Museum für Naturkunde  
Labor Koordinator Molekulargenetik & Leiter DNA-Sammlung  
Invalidenstraße 43  
10115 Berlin  
E-Mail: [thomas.rintelen@mfn-berlin.de](mailto:thomas.rintelen@mfn-berlin.de)  
Kategorie: Vernetzungspartner

Dr. Matthias Glaubrecht  
Museum für Naturkunde  
Abteilung Sammlung, Kurator Malakozologie  
Invalidenstraße 43  
10115 Berlin  
E-Mail: [matthias.glaubrecht@mfn-berlin.de](mailto:matthias.glaubrecht@mfn-berlin.de)  
Kategorie: Vernetzungspartner

## **2. Executive Summary:**

Das Projekt FREDIE diente der Erfassung molekularer Diversitätsmuster, sowie der Etablierung und exemplarischen Anwendung referenzierter DNA Barcodes dreier bedeutender Tiergruppen des Süßwassers. Primäres fachliches Ziel war die Erstellung von referenzierten DNA Barcodes für die innerhalb der geographischen Grenzen Europas vorkommenden bekannten Arten von Fischen, Mollusken und Eintagsfliegen, von Portugal bis an den Ural. Dieses Ziel sollte durch Vernetzung der Kapazitäten der drei Leibniz-Institute ZFMK (Projektleitung), IGB und MfN erreicht werden. In der Tat gelang es durch sehr produktive Zusammenarbeit der Partner untereinander, und durch intensive Zusammenarbeit mit Fachkollegen auf europäischer Ebene, für alle drei zu untersuchenden Organismengruppen eine einzigartige Materialbasis zusammenzutragen. Diese wird auch über die Projektlaufzeit hinaus intensiv für vergleichende Studien der Vernetzungspartner und ihrer externen Kollegen genutzt. Die Bedeutung der drei beteiligten Leibniz Institute innerhalb der europäischen Wissensgemeinschaft wurde dadurch deutlich gestärkt, und der Austausch von Wissen und Sammlungsmaterial angeregt. Der anhaltende Trend, molekulare Daten zur Biodiversitätserfassung heranzuziehen, wird durch neu anlaufende Barcoding Studien belegt, in der Regel allerdings mit nationalem Fokus: GBOL in Deutschland ([www.bolgermany.de](http://www.bolgermany.de)), NORBOL in Norwegen ([www.norbol.org](http://www.norbol.org)), oder SWISSBOL in der Schweiz ([www.swissbol.ch](http://www.swissbol.ch)) und andere. Für solche Projekte liefert FREDIE wichtige, weitergehende Einsichten in die molekulare Diversität von Arten über politische Grenzen hinweg, die beispielhaft für kommende Initiativen sind. Basierend auf von Experten bestimmten, und öffentlich zugänglich hinterlegten Belegexemplaren, wurden bisher im Projekt für über 1500 verschiedene, aquatisch lebende Tierarten DNA Barcodes generiert, die nun als zuverlässiges Identifikationsinstrument genutzt werden können. Der Großteil der generierten DNA Barcode Sequenzen ist neu, d.h. für diese Arten gab es vor Projektbeginn keine standardisierten molekularen Daten die zur Artidentifikation herangezogen werden konnten.

Ein weiterer Aspekt des Projektes war die Evaluierung alternativer genetischer Kernmarker, die benutzt werden können, wenn der mitochondriale Standardmarker (COI) zu keiner eindeutigen Identifizierung führt. Für Mollusken konnte dabei kein geeigneter, universell einsetzbarer Marker etabliert werden, was zum einen an generellen DNA-Qualitätsproblemen bei Weichtieren liegt, aber auch an dem mangelnden Grundlagenwissen in diesem Bereich. Für Eintagsfliegen wurden erstmals 50 nukleäre Kandidatengene für eine wichtige Familie (Baetidae) getestet, wovon in Zukunft einige für die standardisierte Generierung von Erkennungssequenzen genutzt werden können. Im Bereich der Fische wurden drei nukleäre Marker erfolgreich eingesetzt, und an verschiedenen Gruppen getestet. Einer dieser Marker (rho, Rhodopsin) wurde in der Zwischenzeit auch vom internationalen ‚Consortium for the Barcode of Life‘ als Standardmarker anerkannt. Abschließend wurde, basierend auf den generierten DNA Barcode Sequenzen, das Potential der DNA-Schmelzpunktanalytik (High Resolution Melting, HRM) erfolgreich als neue Methode zur Artidentifikation bei Fischen angewandt. HRM ist im Vergleich zum konventionellen DNA Barcoding sehr effizient, setzt allerdings das Vorhandensein entsprechender Referenzbibliotheken (Barcode Daten) voraus. Wir zeigen, dass dies unumgänglich ist, um geeignete variable Regionen in den Gensequenzen zu finden, die die einzelnen Arten konsistent trennen. Dafür wurden exemplarisch europäische Karpfenfische (Cypriniden) als artenreichste Gruppe ausgewählt, und es wurde in Kooperation mit Kollegen der Universität Warschau ein entsprechendes Protokoll erarbeitet.

### 3. Chronologie:

Im ersten Projektjahr wurden zunächst erfolgreich die im Rahmen des Projektes ausgeschriebenen Stellen mit jeweils einer Doktorandin (Katharina Kurzrock im Mai 2011 für die Mollusken am Museum für Naturkunde Berlin (MfN), und im Juli 2011 Sereina Rutschmann für die Eintagsfliegen am Institut für Gewässerökologie und Binnenfischerei Berlin (IGB)) besetzt. Die PostDoc Stelle am ZFMK in Bonn konnte, ebenfalls bereits im Mai 2011, mit Dr. Matthias Geiger sehr kompetent besetzt werden. Dr. Geiger brachte neben profunder Kenntnis der Europäischen Fischfauna sehr hilfreiche Expertise im Management komplexer Gewebe- und DNA-Sammlungen, sowie Erfahrung in der Analytik molekularer Datensätze mit in das Projekt ein. In Anbetracht der durch die Einstellung von Dr. Geiger im Projekt verfügbaren Expertise im Bereich der Süßwasserfische wurde die für die Bearbeitung Europäischer Süßwasserfische vorgesehene Doktorandenstelle aufgegeben, um mit den frei werdenden Mitteln Dr. Freyhof anstellen zu können. Dieser sehr felderfahrene Kollege fokussierte seine Kraft in der Folgezeit stark auf die Herausforderung der Probenbeschaffung, von Netzwerkarbeit mit Europäischen Kollegen bis zur Durchführung von Sammelreisen. Nach einem ersten konsolidierenden Treffen der Partner in Berlin starteten die Sammelaktivitäten bereits im Juni 2011, und wurden im ersten Jahr mit Ende der Feldsaison mit Ablauf des Oktobers beendet. Dabei wurden in fünf Feldkampagnen insgesamt in etwa 10.000 Individuen der drei Organismengruppen aus Italien, Slowenien, der Slowakei, Griechenland, Polen, Litauen, Lettland und Estland gesammelt, und für die molekulargenetischen Untersuchungen vorbereitet.

Die anfänglich geplante und durchgeführte Strategie gemeinsamer Sammeltätigkeit für alle drei Organismengruppen stellten sich in der ersten Sammelsaison als mäßig zielführend heraus, da die Habitat Ansprüche der Tiere sehr unterschiedlich sind. So finden sich zum Beispiel in höher gelegenen Gebirgsbächen, wo eine Vielzahl an Eintagsfliegenarten auftritt, kaum Mollusken; umgekehrt kommen in tiefer gelegenen Seen und Flüssen nur wenige Arten von Eintagsfliegen vor. Somit erfolgten die anschließenden Exkursionen getrennt und auf einzelne Organismengruppen fokussiert; wo sinnvoll wurde natürlich ergänzend Material für die anderen Kollegen mit aufgesammelt. Die relevanten Laborroutinen zur Durchführung des Projektes wurden jeweils in den beteiligten Instituten parallel etabliert, um einen sicheren und reibungslosen Einsatz der gegebenen Ressourcen zu gewährleisten. Durch Einbindung von studentischen Hilfskräften in die Routineabläufe konnte ein effizienter Probandendurchsatz gewährleistet werden. Das FREDIE Internetportal konnte im Oktober 2011 online gehen ([www.fredie.eu](http://www.fredie.eu)).

Im zweiten Projektjahr wurden planmäßig die weiteren Sammelaktivitäten zwischen Mai und Oktober durchgeführt. Dabei wurden in sieben verschiedenen Expeditionen insgesamt ca. 20.000 Individuen der drei Organismengruppen aus Dänemark, England, Frankreich, Kroatien, Norwegen, Portugal, Rumänien, Schweden, Slowenien, Spanien sowie Ungarn gesammelt und für molekulargenetische Untersuchungen vorbereitet. Dadurch konnte die avisierte geographische Abdeckung fast komplett gedeckt werden. Durch weitere externe Aufsammlungen in Finnland, Irland, dem Kaukasus, dem Ural, und dem nordrussischen Tiefland, wurde die Materialbasis komplementiert und eine einzigartige Grundlage für die späteren Analysen und Publikationen geschaffen. Parallel wurde das Projekt auf mehreren internationalen Tagungen präsentiert, auch um weitere Kooperationspartner besonders in solchen Ländern zu gewinnen, in denen die Einholung der relevanten Genehmigungen eine Herausforderung darstellt. Für die Erfüllung einzelner Projektziele konnten außerdem ein Master-

sowie ein Diplomstudent, und eine weitere Doktorandin gewonnen werden. Nach Auswertung der ersten Barcode-Daten wurde mit den zusätzlich zu evaluierenden Methoden (nukleäre Marker und Schmelzpunktanalytik, HRM) begonnen.

Im letzten Projektjahr fanden, entgegen der ursprünglichen Planung, ergänzende Aufsammlungen in Spanien und auf den Azoren statt. Dies wurde durch die kurze Sammelperiode 2011 notwendig, die sich aus dem in diesem Jahr stattgefundenen Projektstart ergab. Gerade für Eintagsfliegen ist jedoch die Zeit zwischen April und Juni die beste Sammelzeit, da in diesem Zeitfenster beides, weitentwickelte Larven und auch adulte Tiere gefangen werden können. Auch im letzten Jahr der Projektlaufzeit wurde FREDIE auf internationalen Tagungen vorgestellt und beworben, sowie erste Ergebnisse und neue Erkenntnisse zur molekularen Diversität präsentiert. Die Weiterentwicklung des Webportals hin zu einem funktionellen Instrument, um mittels DNA Barcodes zu einer eindeutigen Artidentifikation zu kommen, wurde weiter verfolgt. Durch parallel laufende Projekte wie GBOL (German Barcode of Life, BMBF-finanziert, [www.bolgermany.de](http://www.bolgermany.de)) kam es zwischenzeitlich zu Engpässen bei den im Bereich Bioinformatik zur Verfügung stehenden (personellen) Ressourcen des ZFMK. Die technische Fertigstellung der Funktionalität der Datenbankstruktur hat sich hierdurch nach hinten verschoben, wurde aber durch gemeinsam mit GBOL entwickelten Lösungen in der Summe gegenüber den ursprünglichen Plänen deutlich aufgewertet (u. A. Implementierung der im Rahmen von GBOL entwickelten Karten- und Darstellungsfunktionen). Wir gehen davon aus, diese Funktionen zeitnah freischalten zu können.

#### **4. Teilprojekt Europäische Süßwasserfische**

##### **4.1 Sammelaktivitäten:**

Aufbauend auf einem gegenüber den Invertebratengruppen guten taxonomischen Erfassungsstand der Süßwasserfische Europas, und der in FREDIE akkumulierten Expertise im Bereich Ichthyologie, konnte die Detailplanung der Feldarbeit mit Einstellung des Teams Dr. Geiger und Dr. Freyhof sehr zügig angegangen und umgesetzt werden. Die umfangreichen eigenen Aufsammlungen wurden durch sehr intensive Aktivitäten eines teils zum Projektstart schon bestehenden, teils im Laufe des Projektes ausgebauten Netzwerkes externer europäischer Ichthyologen erst ermöglicht, und durch weiteres Material ergänzt. Auf der Projektseite [www.fredie.eu](http://www.fredie.eu) werden über 40 Kollegen aus 16 Ländern aufgeführt, die aktiv am Erfolg des Fisch-Teilprojektes mitgewirkt haben. Die meisten davon konnten durch die Möglichkeit einer Koautorenschaft dazu motiviert werden, die jeweiligen Genehmigungen einzuholen und Unterstützung in der Sammellogistik zu bieten. Besonders erfolgreich waren eigene Aufsammlungen in Regionen mit sehr hoher Diversität, wie in Italien, Griechenland und Rumänien. Zahlreiche Kollegen aus Frankreich, Spanien, Irland, Polen, Litauen und Russland sammelten aktiv auf Anfrage für das Projekt, andere Kollegen stellten ihre Gewebesammlungen zur Verfügung. Nach Kontaktaufnahme auf internationalen Tagungen, und großem Interesse seitens Kollegen aus dem Nahen und Mittleren Osten, wurde beschlossen, dieses interessante aber ichthyologisch schlecht erschlossene Gebiet mit in die Analysen des FREDIE Projektes aufzunehmen. Dies half entscheidend, einige taxonomische Fragestellungen innerhalb des ursprünglichen Untersuchungsraumes lösen zu können. Die ichthyologische Referenzsammlung des ZFMK ist während der Projektlaufzeit allein durch eigens aufgesammeltes Material um weit über 10.000 Fischexemplare mit DNA-fähigem Gewebe angewachsen.



Abbildung 1: In FREDIE wurden Fischpopulationen von 1718 Fundpunkten untersucht.

## 4.2 DNA Barcoding:

Insgesamt konnte für 532 der 614 bekannten und beschriebenen Arten aus dem europäischen Untersuchungsgebiet Material frisch gesammelt bzw. akquiriert, und mit einem DNA Barcode versehen werden. Das entspricht einer Abdeckung von knapp 87% der beschriebenen Süßwasserfischfauna Europas, die nun auch über DNA Barcoding identifiziert werden kann. Zusätzlich zur bekannten Artendiversität wurden weitere 57 Populationen in Europa entdeckt, die keiner beschriebenen Art zugeordnet werden konnten, und die sich auch in ihren DNA Barcodes erheblich von den bekannten Arten unterscheiden. Mit der systematischen Aufarbeitung dieser gefundenen kryptischen Diversität wurde begonnen (siehe diverse Neubeschreibungen unten), die weitere Aufarbeitung wird aber noch einige Zeit in Anspruch nehmen.

Die größte taxonomische Lücke im bestehenden Datensatz verbleibt unter den Lachsartigen (Salmoniformes). Von diesen fehlen insgesamt 19 Saiblings-, 15 Renken-/Maraenen-, und neun Forellenarten, deren Verbreitungsschwerpunkte in Skandinavien und den Alpen liegen. Allen gemein ist eine hohe wirtschaftliche Bedeutung, die zum einen die Sammelaktivitäten beschränkte, aber auch einen hohen Anteil an durch Besatz anthropogen überformter Populationen zur Folge hat, deren Artzugehörigkeit heute oftmals nicht eindeutig bestimmbar ist. Da nach Literaturlage aber sowieso nur mit sehr begrenzter Auflösung mitochondrialer Marker innerhalb dieser Gruppen zu rechnen ist, und verschiedene nationale bzw. lokale Projekte sich diesen meist fischereilich bedeutenden Gruppen widmen, wurden die Ressourcen des FREDIE-Projektes nicht für den Versuch der weiteren Schließung der hier verbleibenden Lücke verwendet.

Durch die oben ausgeführte Ausweitung des Untersuchungsraumes (z.B. Irak, Iran, Oman) konnten insgesamt über 8000 DNA Barcodes für 900 der in der gesamten westlichen Paläarktis bekannten 1185 Süßwasserfischarten zusammengetragen werden, welche aktuell weiter analysiert werden. Wie nach Literaturlage zu erwarten, wurden für die überwiegende Mehrheit (ca. 70%) der Fälle klare

morphospezies-charakteristische Barcodes gefunden. In diesen Fällen dient die Methodik ohne weitere Probleme fortan als Werkzeug zur eindeutigen Identifizierung von unbekanntem Proben, mit Referenz zu durch Experten bestimmten Belegexemplaren (zumeist in der Sammlung des ZFMK). Je nach taxonomischem Fokus schwankt der Prozentsatz molekular-morphologisch kongruenter Gruppen erheblich, wobei sich Lachsartige (Forellen u.a.) wie oben erwähnt generell schlechter anhand ihres Barcodes bestimmen lassen als zum Beispiel Barsche oder Steinbeißer.

An einem komplexen Teildatensatz von Süßwasserfischarten aus den Einzugsgebieten des Biodiversitätshotspots „Mittelmeer“ (498 Fischarten, 98% taxonomische Abdeckung, über 3100 Individuen) konnte in einer umfangreichen Publikation (Geiger et al. 2014 in Molecular Ecology Resources) gezeigt werden, dass die Abschätzung der Artzahlen basierend auf DNA Barcodes besonders plausibel mit der nach morphologischer Bestimmung erwarteten Diversität übereinstimmen, wenn modellbasierte Analyseverfahren (hier GMYC) angewandt werden. Die Analysen ergaben darüber hinaus klare Hinweise, dass die Artenvielfalt der Süßwasserfische im Mittelmeerraum um bis zu 12% unterschätzt wird, belegt durch das Vorkommen von 64 potentiell neuen Arten, die eigene genetische Linien darstellen und morphologisch nicht einer bekannten Art zugeordnet werden konnten. Die andauernden Analysen des Gesamt-Fischdatensatzes deuten auf das Vorhandensein von weit über 100 neuen Fischarten in der Westpaläarktis hin. Hier liefern die in FREDIE erarbeiteten Barcode-Daten einzigartige Möglichkeiten, um auf Kontinentalmaßstab Populationen zu vergleichen und taxonomisch aufzuarbeiten.

#### 4.3 Tagungsbeiträge:

I.2014: Naturhistorischer Verein der Rheinlande und Westfalens e.V. - Wintertagung 2013/14 am ZFMK, Bonn: „Die aquatische Fauna des Mittelrheintals“

I.2014: GBOL1 Workshop am ZFMK, Bonn: „DNA-Barcoding der westpaläarktischen Fischfauna - überraschende Ergebnisse auch aus Deutschland“

X. 2013: 5th International Barcode of Life Conference (IBOL5) in Kunming, **China:** „A Review of the Freshwater Fish Diversity in the Mediterranean Biodiversity Hotspot using DNA Barcoding“.

IX. 2013: 10. Tagung der Gesellschaft für Ichthyologie (GfI) am ZFMK, Bonn: „A Review of the Freshwater Fish Diversity in the Mediterranean Biodiversity Hotspot using DNA Barcoding“.

II. 2013: BioSyst.EU 2013 Global Systematics in Wien, **Österreich:** „Introducing the FREDIE project with notes on the Mediterranean diversity hot-spot“.

XII. 2012: Gastredner bei SWISSBOL in Bern, **Schweiz:** „Lessons from a large-scale European DNA Barcoding initiative“.

IX. 2012: ECBOL3 in Brüssel, **Belgien:** „Introducing the FREDIE project with notes on the Mediterranean diversity hot-spot“.

VII. 2012: IVX ECI in Liège, **Belgien:** „Introducing the FREDIE project with notes on the Mediterranean diversity hot-spot“.

VI. 2012: FISHBOL in Yeosu, **Korea:** „Introducing the FREDIE project with notes on the Mediterranean diversity hot-spot“.

V. 2012: ECFF in Vila Nova de Cerveira, **Portugal:** „Introducing the FREDIE project, Freshwater Diversity Identification for Europe“.

II.2012: Poster GfBS am ZFMK, Bonn: Projektvorstellung „FREDIE – Freshwater Diversity Identification for Europe“.



#### 4.4 Publikationen:

M.F. Geiger. Schuppige Neuankömmlinge in der Europäischen Union. DATZ 8, 30-33 (2012).

J. Freyhof, H. Kärst, M.F. Geiger. *Valencia robertae*, a new killifish from southern Greece (Cyprinodontiformes: Valenciidae). Ichthyol. Explor. Freshwaters 24(4), 289-298 (2014).

H.R. Esmaili, G. Sayyadzadeh, M. Özulug, M.F. Geiger, J. Freyhof. Three new species of *Turcinoemacheilus* from Iran and Turkey (Teleostei: Nemacheilidae). Ichthyol. Explor. Freshwaters 24(3), 257-273 (2014).

Geiger, M.F., F. Herder, M. Monaghan, V. Almanda, R. Barbieri, M. Bariche, P. Berrebi, J. Bohlen, M. Casal-Lopez, G. Delmastro, G. Denys, A. Dettai, J.I. Doadrio, E. Kalogianni, H. Kärst, M. Kottelat, M. Kovacic, M. Laporte, M. Lorenzoni, Z. Marcic, M. Özulug, A. Perdices, S. Perea, H. Persat, S. Porcelotti, C. Puzzi, J. Robalo, R. Sanda, M. Schneider, V. Slechtova, M. Stoumboudi, S. Walter, J. Freyhof. Spatial Heterogeneity in the Mediterranean Biodiversity Hotspot affects Barcoding accuracy in Freshwater Fishes. Mol. Ecol. Res., (2014; doi: 10.1111/1755-0998.12257).

J. Freyhof, H.R. Esmaili, G. Sayyadzadeh, M.F. Geiger. Review of the crested loaches of the genus *Paracobitis* from Iran and Iraq with the description of four new species Teleostei: Nemacheilidae. Ichthyol. Explor. Freshwaters 25(1), 11-38 (2014).

T. Knebelberger, A.R. Dunz, D. Neumann, M.F. Geiger. Molecular Diversity of Germany's Freshwater Fishes and Lampreys assessed by DNA barcoding. Mol. Ecol. Res. *online in advance of print* (doi: 10.1111/1755-0998.12322).

N.A. Hamidan, M.F. Geiger, J.Freyhof. *Garra jordanica*, a new species from the Dead Sea basin with remarks on the relationship of *G. ghorensis*, *G. tibanica* and *G. rufa* (Teleostei: Cyprinidae). Ichthyol. Explor. Freshwaters 25(3), 223-236 (2014).

M.F. Geiger, C. Schreiner, G.B. Delmastro, F. Herder. Can morphology reflect genetic integrity? A case study with Italian barbels (Teleostei: Cyprinidae: *Barbus* spp.). Journal Fish Biology (under revision).

I.H. Segherloo, A. Abdoli, S. Eagderi, H.R. Esmaili, L. Bernatchez, M.F. Geiger, M. Özulug, J. Freyhof. Dressing down: Multiple reduction of the mental disc in the labeonine genus *Garra* (Teleostei: Cyprinidae) in the Middle East. PLoSONE (in review).

S.J. Pfeleiderer, M.F. Geiger, F. Herder. *Aphanius marassantensis*, a new killifish from the Kızılırmak drainage in Northern Anatolia (Cyprinodontiformes: Cyprinodontidae). Zootaxa 3887 (5): 569-582 (2014).

H. Mousavi-Sabet, S. Vatandoust, H.R. Esmaili, M.F. Geiger, J. Freyhof. *Cobitis avicennae*, a new species of spined loach from the Tigris River drainage (Teleostei: Cobitidae). Zootaxa 3914 (5): 558–568 (2015).

Esmaili H.R., Pirvar Z., Ebrahimi M., Geiger M.F. Karyological and molecular analysis of three endemic loaches (Actinopterygii: Cobitoidea) from Kor River basin, Iran. Molecular Biology Research Communications 4(1):1-13 (2015).

J. Freyhof, G. Sayyadzadeh, H.R. Esmaeili, M.F. Geiger. Review of the genus *Paraschistura* from Iran with the description of six new species (Teleostei: Nemacheilidae) Ichthyol. Explor. Freshwaters (under revision).

S. Chapuis, F. Herder, Esmaeili H.R., Freyhof J., Hamidan N.A., Özuluğ M., Šanda R., M.F. Geiger. Adding nuclear rhodopsin data where COI-based barcoding fails – from no benefit at all to the solution of a taxonomic conflict. DNA Barcodes (in review).

S. Chapuis, W. Bogdanowicz, T. Malewski, M.F. Geiger, F. Herder. Testing high resolution melting (HRM) as a novel tool for the increase of efficiency of DNA barcoding (in preparation).

M.F. Geiger, S. Brosse, J. Freyhof, V. Almada, M. Bariche, P. Berrebi, N. G. Bogutskaya, J. Bohlen, M. Casal-Lopez, G. B. Delmastro, G.P.J. Denys, A. Dettai, I. Doadrio, M. Kottelat, M. Kovačić, M. Laporte, M. Lorenzoni, B. A. Levin, Z. Marčić, L. Marszał, A. M. Naseka, N. Nika, M. Nowak, M. Özuluğ, A. Perdices, S. Perea, H. Persat, J. Robalo, R. Sanda, V. Šlechtová, G. Zięba, F. Herder. Status, Distribution and Threats to the Freshwater Fish Diversity of the Western Palaearctic (in preparation).

## **5. Teilprojekt Süßwassermollusken:**

Der Erfassungsstand der Arten süßwasserbewohnender Mollusken Europas war laut Literaturlage zu Projektstart als deutlich geringer zu bewerten als der der Süßwasserfische. Daher begann die Doktorandin Katharina Kurzrock ab Mai 2011 zunächst mit einer umfassenden Literaturanalyse. Sie erstellte eine Artenliste europäischer Mollusken mit Informationen zu Vorkommen, Typuslokalität, Synonymen, und den originalen Veröffentlichungen. Da es bislang kein einheitliches systematisches Werk zu europäischen Süßwassermollusken gibt, und die teils schwer zugänglichen Daten kombiniert und ergänzt werden mussten, war dies ein zeitaufwändiger, aber unabdingbarer erster Schritt. Aufgebaut wurde auf dem Buch „Die Süßwassergastropoden Nord- und Mitteleuropas“ (Peter Glöer), den Internetportalen [www.faunaeur.org](http://www.faunaeur.org), [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org), und [www.animalbase.de](http://www.animalbase.de). Vom Betreiber letzterer Seite gibt es seit 2012 auch eine gedruckte Version zu „European non-marine molluscs“ (Francisco Welter-Schultes). Um weitmöglichst Kongruenz der Barcode-Bibliotheken mit der bestehenden Taxonomie zu erzielen, wurden wo möglich Typuslokalitäten der Molluskenarten aufgesucht.

### **5.1 Sammelaktivitäten:**

Innerhalb der ersten beiden Projektjahre wurden über insgesamt 17 Wochen in verschiedenen Ländern Europas limnische Mollusken aufgesammelt. Von den neun Sammelreisen (Italien, Slowakei, Baltikum, Portugal, Skandinavien, Frankreich, Slowenien/Ungarn, Rumänien und Spanien) sind die meisten als sehr erfolgreich zu bezeichnen. Schwierigkeiten traten immer dann auf, wenn starke Regenfälle zu einem erhöhten Pegel der Flüsse und Seen geführt hatten. Dies ist bei der Suche nach Schnecken ein großes Problem, da sich viele von ihnen an Steinen aufhalten oder - im Fall von Muscheln - im Boden vergraben sind, und es bei hohen Wasserständen keine Möglichkeit mehr gibt, sie (gefahrlos) zu erreichen. In Spanien wiederum trat das Problem auf, dass viele Flüsse auf Grund des hohen Wasserverbrauchs der umliegenden Landwirtschaft völlig ausgetrocknet waren oder, wenn sie denn noch Wasser führten, durch Nährstoffeintrag stark eutrophiert waren. Ein allgemeines Problem war, dass durch Literaturrecherche ermittelte Fundorte teilweise nicht mehr in dieser Form existieren, nicht zugänglich waren, oder die entsprechenden Arten dort nicht mehr gefunden wurden. Generell ist zu sagen, dass zu Mollusken wenig detaillierte Fundortangaben in der Literatur zu finden sind, und leider der Befund der IUCN Expertenkommission für europäische Mollusken von 2011 bestätigt werden konnte, wonach 44% der bekannten Süßwasser Gastropoden als mindestens gefährdet einzuschätzen sind.



**Abbildung 2:** Süßwassermollusken konnten von 726 Fundpunkten untersucht werden.

Weiteres Mollusken-Material wurde durch Reisen der Projekt-Kollegen aus Griechenland, England und Süd-Italien beigesteuert. Einige Tagestouren in die Umgebung von Berlin, sowie für molekulargenetische Untersuchung geeignete Sammlungsmaterialien des Museum für Naturkunde kamen ergänzend hinzu. Auch durch externe Kollegen gesammeltes Material konnte der FREDIE Sammlung zugefügt werden, wie z.B. aus Russland durch A. Przhiboro und I. Pozdeev, aus Ungarn, dem Balkan und Griechenland durch Z. Feher, aus Italien durch G. Delmastro und E. Lori, aus Lettland von K. Greke, und aus Frankreich durch H. Persat. Einige fehlende Arten wurden durch Material aus der Privatsammlung von P. Glöer ergänzt.

Hier sei erwähnt, dass die Familie der Hydrobiide mit ihren geschätzten 500-1000 Arten schon im FREDIE-Projektantrag von dem zu erreichenden Ziel ausgeschlossen war. Bei diesen Tieren handelt es sich um kleinste aber höchst diverse Quellschnecken, die meist nur lokal begrenzt vorkommen und morphologisch nur sehr schwer bestimmt werden können. Dies kann in einem solchen Projekt nicht geleistet werden, und um es mit den Worten eines Kollegen zu sagen: „Allein das Auffinden und Bestimmen aller Hydrobiiden in den Alpen ist eine Lebensaufgabe“. So sind zwar einige Hydrobiiden, insbesondere die größeren und weitverbreiteten Vertreter wie *Lithoglyphus naticoides* und *Potamopyrgus antipodarum*, als Referenz mit gesammelt und, so denn sie bestimmt werden konnten, auch im Labor bearbeitet worden. Trotzdem bleiben sie eine Randerscheinung innerhalb des Projektes. Insgesamt wurden für die Gruppe der Mollusken über 10.000 Proben von rund 780 Fundpunkten aus 29 Ländern Europas (plus einige wenige Proben aus Georgien, dem Irak und der Türkei) zusammengetragen.

## 5.2 DNA Barcoding:

Im Museum für Naturkunde in Berlin erfolgte die Sortierung und Dokumentation des gesammelten Molluskenmaterials. Jeder Art wurde pro Fundpunkt eine einzigartige Sammelnummer zugeordnet und in der Datenbank hinterlegt. Die Einträge wurden mit den hinzu kommenden Informationen wie Fotos, DNA Extraktion und PCR, erfolgreiche Sequenzierung usw. ergänzt. Zusätzlich wurden die Fundorte in eine

Karte eingetragen und die Fundortbilder den jeweiligen Punkten zugeordnet. Die morphologische Bestimmung des in FREDIE gesammelten Materials erfolgte durch einen externen Experten, die Doktorandin, sowie eine darin bewanderte studentische Hilfskraft. Mit Fortschritt des Projektes wurde entschieden, aus praktischen Erwägungen die Gruppe der Pisidien (kleinste Muscheln von wenigen Millimetern Größe) nicht weiter zu bearbeiten, da dies nicht erfolgversprechend hätte zu Ende geführt werden können - es gibt weltweit nur einige wenige Experten die diese Muscheln morphologisch bestimmen können, welche jedoch leider (noch) nicht zur Mitarbeit bewegt werden konnten.

Die Anfertigung qualitativ hochwertiger Fotos zur Dokumentation der Schnecken im Labor (2-3 Individuen pro Art und Fundort mit jeweils 2-3 Fotos) war mit hohem zeitlichem Aufwand verbunden, erschien jedoch für den Zweck der dauerhaften Referenzierung der Barcodes unumgänglich. Meist bleibt es nicht aus, dass zur Gewebegewinnung die Schale der Tiere zerstört werden muss und, somit die äußeren Bestimmungsmerkmale nicht mehr zur fotografischen Dokumentation zur Verfügung stehen; somit musste die Fotografie zwingend der Laborphase vorangestellt werden. Obwohl hierfür ab Ende 2012 eine weitere Hilfskraft eingestellt wurde, führte die konsequente Fotodokumentation zu einem gegenüber den beiden anderen Gruppen verzögerten Beginn der Laborarbeiten. Nach der Gewebeentnahme erfolgten plattenweise (à 95 Proben) DNA-Extraktion, PCR und Sequenzierung. Nach einer ersten Testplatte mit verschiedenen Arten stellte sich schnell heraus, dass es nur Sinn macht, Tiere einer Gattung bzw. einer Familie auf einer Platte zu verwenden, da die PCR-Konditionen spezifisch angepasst werden müssen, um einen möglichst großen Erfolg zu erzielen. Innerhalb der Familien Lymnaeidae, Planorbidae, Neritidae, Valvatidae und Physidae wurden so relativ hohe Erfolgsquoten erreicht (im Durchschnitt 80% gute COI-Sequenzen pro Platte). Innerhalb der Viviparidae und Bithynidae ist es bisher trotz verschiedener Versuche mit alternativen Primern und PCR-Programmen nicht gelungen, Sequenzen zu generieren. Das Problem ist in der Literatur bekannt, und bisher haben auch Kollegen anderer Institute noch keine zufriedenstellende Lösung gefunden. Im Rahmen von FREDIE konnte dieses Problem leider auch noch nicht gelöst werden.

Bis Projektende wurden 30 Platten Mollusken à 95 Proben extrahiert. Bei allen erfolgte anschließend eine PCR (bei Misserfolg eine zweite; Ausnahme hierbei die jeweils zweiten Platten von Vivipariden bzw. Bythiniden). Insgesamt wurden 20 Platten nach erfolgreicher PCR für die Sequenzierung vorbereitet; aktuell sind davon 1463 komplette Sequenzen des COI-Abschnittes verfügbar. Derzeit sind noch einige Platten und Nachproben in Arbeit, und so wird sich die finale Anzahl der Sequenzen absehbar um mindestens 1000 erhöhen (u.a. sind die Familien Acroloxidae, Thiaridae und Melanopsidae bisher nur unvollständig bearbeitet). Die Gläser mit den Tieren (Alkoholsammlung), das restliche Gewebe (Cold Archive) und die DNA (DNA-Archiv) lagern im Museum für Naturkunde in Berlin.

Nach Kontrollen zum Abgleich der morphologischen Bestimmung mit der COI-Sequenz, und somit der Position des Tieres im Stammbaum, ist festzustellen, dass die Übereinstimmung stark von der Gattung abhängt. Während innerhalb von Gruppen wie *Theodoxus* und *Valvata*, *Physa*, *Aplexa*, sowie den Gattungen der Familie Planorbidae (mit Ausnahme von *Planorbis*) die „Fehlerquote“ (Nicht-Passung zwischen morphologischer Bestimmung und Sequenzidentität) bei unter 5% liegt, zeigt sich innerhalb der morphologisch stark variablen Gattungen *Radix* und *Stagnicola* ein „wildes Durcheinander“. Zu *Viviparus* und *Bithynia/Pseudobithynia* können aufgrund massiver PCR-Probleme keine Aussagen getroffen werden, die Auswertung zur Familie Melanopsidae erfolgt derzeit.

Die bislang durchgeführten Analysen der COI-Sequenzen lassen die Schlüsse zu, dass innerhalb der europäischen Süßwasserschnecken sowohl Fälle kryptischer Diversität auftreten, als auch umgekehrte Fälle, in denen anhand von Morphologie

sowie geographischem Vorkommen unterschiedene Arten sich in ihrem DNA Barcode nicht unterscheiden. In der Summe belegen die in FREDIE durchgeführten Analysen den enormen Forschungsbedarf zur Taxonomie europäischer Mollusken, und unterstreichen, dass weit über das aktuelle Projekt hinaus Anstrengungen notwendig sind, um finale und wirklich belastbare Abschätzungen zur Artenanzahlen treffen zu können.

Bemerkenswert ist außerdem der Befund sehr unterschiedlicher Längen des COI-Fragments in verschiedenen Gattungen, sowie die extrem unterschiedliche genetische Variabilität des COI-Abschnittes innerhalb von Arten und Gattungen. So tritt innerhalb der europaweit verbreiteten Art *Theodoxus fluviatilis* nur eine molekulare Kimura-2 Parameter Varianz von 1,7% auf, während diese im Fall von *Lymnaea stagnalis* dagegen 5,4% beträgt, trotz insgesamt nur vergleichsweise weniger Tiere und Fundorte. Geographische Muster lassen sich innerhalb der meisten Arten erkennen, die von mehreren Flusssystemen gesammelt werden konnten. Eine bisher unbekannte Besonderheit einer geographischen Region in Norditalien zeigt sich dabei in mehreren europaweit verbreiteten Arten unterschiedlicher Familien. Diese und weitere Phänomene sind Teil der aktuell in der finalen Phase befindlichen Dissertation von Frau Kurzrock.

### 5.3 Tagungsbeiträge:

VII.2013: World Congress of Malacology, Azoren: “Freshwater Diversity Identification for Europe – Following the Footsteps of Linnaeus into the 21st Century – The FREDIE Project on barcoding European Freshwater Molluscs”

II.2013: BioSyst.EU 2013 Global systematics! in Wien: “Freshwater Diversity Identification for Europe – 21st Century identification Technique for Europe’s freshwater biodiversity”

X.2012: Tagung zu Barcoding von Mollusken an der ZSM, München: „FREDIE – Freshwater Diversity Identification for Europe“

### 5.4 Publikationen in Vorbereitung:

Kurzrock et al. *Theodoxus* (Montfort, 1810) in Europe – a special genus with a complex distribution pattern.

Kurzrock et al. *Theodoxus* (Montfort, 1810) in Europe – Mediterranean Clade (Morphology – Barcode, 16S).

Kurzrock et al. A case study: How useful are sequences deposited in the NCBI Genbank for actual studies (e.g. *Theodoxus* - Bunje).

Kurzrock et al. The genus *Valvata* (Müller, 1773) – old and new ways to describe species.

Kurzrock et al. Distribution Patterns of European Freshwater Snails.

Kurzrock et al. Following the Footsteps of Linnaeus into the 21st Century – The FREDIE Project on Barcoding European Freshwater Molluscs.

## **6. Teilprojekt Eintagsfliegen:**

Wie für die Mollusken ist auch der taxonomische Erfassungsstand der Eintagsfliegen nicht mit dem der Süßwasserfische vergleichbar. Vor Projektbeginn stand DNA-fähiges Eintagsfliegen-Material aus nur wenigen Gebieten Europas zur Verfügung. Ein lange angekündigtes, überarbeitetes Standardwerk zur Eintagsfliegen-Fauna Europas, welches als aktuelle Referenz für die Artendiversität herangezogen werden sollte, erschien erst Mitte 2012. In Kombination mit der Wichtigkeit des Zeitfensters „Frühjahr-Frühsummer“ für die Feldarbeit in dieser Organismengruppe, das durch den vorgegebenen Projektbeginn in 2011 nicht wahrgenommen werden konnte, ergaben sich auch im Unterprojekt „Eintagsfliegen“ zeitliche Verzögerungen im Vergleich zum Teilprojekt „Fische“. Die Sammlungsaktivitäten für die beiden Invertebratengruppen wurden daher bis in das Frühjahr 2014 fortgesetzt, um eine möglichst gute Taxonabdeckung zu erreichen.

### **6.1 Sammelaktivitäten:**

Dank der sehr erfolgreichen Zusammenarbeit mit dem Museum in Lausanne (Jean-Luc Gattolliat und Michel Sartori) konnten fast alle Eintagsfliegen der Schweiz mit in das Projekt eingebracht und analysiert werden. In den Karpaten (Slowakei und Rumänien) konnten dank der Zusammenarbeit mit Peter Manko während zwei Feldkampagnen viele Arten ergänzt bzw. neu aufgesammelt werden. Eigene Feldarbeiten waren besonders erfolgreich in Spanien (Pyrenäen und Sierra Nevada, Zusammenarbeit mit Javier Alba-Tercedor und Maria Alp), Griechenland (Kostantinos C. Gritzalis), und Norwegen (John E. Brittain und Louis Bourmans). Zudem wurde wertvolles Material von Kooperationspartnern übernommen (Balkan: Dávid Murámyi; Spanien, Schweden, Frankreich: Cesc Múrria; Russland; Andrey Przhiboro; Lettland: Tomas Ruiginis). Von der Iberischen Halbinsel konnten hingegen nur vergleichsweise wenige der laut Literatur vorkommenden Arten gesammelt werden, was teils den Wetterbedingungen während der Feldphasen, teils aber auch der oben erwähnten Degradierung natürlicher Habitate in dieser Region zuzuschreiben ist. Im Gegensatz hierzu kann die für Diversität der Eintagsfliegen besonders wichtige alpine Region als sehr gut abgedeckt bezeichnet werden. Insgesamt wurden über 10.000 Eintagsfliegen-Individuen von 629 Fundstellen aus 31 Ländern gesammelt.



**Abbildung 3:** Eintagsfliegen wurden von 629 Fundpunkten zusammengetragen und analysiert.

Das gesammelte Material der Eintagsfliegen liegt zum Teil noch in Berlin am IGB, oder bei externen Experten, die dabei sind, morphologische Nachbestimmungen durchzuführen. Bis Ende 2014 sollen alle Exemplare wie im Antrag dargestellt an das Museum in Lausanne (Schweiz) verbracht werden. Generell wurden die Tiere aus dem Feld in Berlin am IGB vorsortiert, und so weit wie möglich bestimmt. Einige externe Experten haben bereits auf Artniveau bestimmtes Material zur Verfügung gestellt (Material aus der Schweiz von Jean-Luc Gattolliat, Michel Sartori & André Wagner; Material aus der Ukraine, Russland u.a. von Pavel Sroka; Material aus dem Balkan von Dávid Murámyi). Sämtliche Belegexemplare wurden nach der DNA-Extrahierung von Experten der jeweiligen Familie/Gattung bestimmt bzw. verifiziert (Michel Sartori: Ameletidae, Arthropleidae, Isonychiidae, Leptophlebiidae, Metretopodidae, Oligoneuriidae, Polymitarcyidae, Potamanthidae; Jean-Luc Gattolliat: Baetidae, Ephemeridae; Nicolás Ubero: Ephemerellidae; André Wagner: Rhithrogena; Peter Malzacher: Caenidae; Peter Manko & Tomas Soldán: Ecdyonurus, Epeorus, Heptagenia, Paracinygmula; Craig Macadam: Siphonuriidae; und Marek Polášek: Electrogena).

Es wurde versucht, an allen Fundstellen mindestens sieben Individuen pro Phänotyp zu sammeln. Demnach wurden weitaus mehr Proben gesammelt, als genetisch analysiert werden konnten; in der Summe wurden bisher ca. 25% der Individuen durch Barcodes charakterisiert. Eine Photodokumentation wurde für einige Gruppen von den jeweiligen Experten durchgeführt, allgemein ist dies wie oben ausgeführt aber ein sehr aufwändiges Unterfangen: Besonders die Dokumentation der für die Systematik relevanten Merkmale ist sehr zeitaufwendig. Somit wurde entschieden, einige Gruppen erst in eigenen, weiterführenden Projekten (z.B. Heptageniidae durch Marek Polášek) fotografisch zu erfassen, was sehr sinnvoll in die Erstellung morphologischer Kataloge der Familien eingebettet werden kann. Alle Familien, die erfolgreich gesammelt wurden, konnten auch molekular bearbeitet werden. Nicht behandelt wurden Familien, die sehr schwer zu finden, bzw. deren Vertreter im Fokusgebiet vermutlich schon ausgestorben sind. Die größten Herausforderungen beinhaltet die Familie der Baetidae. Sie ist die artenreichste Familie, und es gibt nur sehr wenige Experten für diese Gruppe. Das FREDIE Projekt hat hier einen ersten guten Einblick in bislang nur sehr unzureichend untersuchte Untergruppen gegeben, und hat damit eine



einmalige Datengrundlage geschaffen, auf der in naher Zukunft die jeweiligen Experten weiter aufbauen können.

## 6.2 DNA Barcoding:

Bis August 2014 wurden 2300 COI-Sequenzen für Eintagsfliegen in FREDIE generiert; dies umfasst bislang über 170 Arten. Die Anzahl der Arten wird absehbar noch steigen, da die Familie der Baetidae (artenreichste Familie) und die Gattung *Ecdyonurus* noch nicht ausgewertet sind. Basierend auf den ausgewerteten Daten stimmen 90% der Arten morphologisch und genetisch überein (hierbei sind die Baetidae ausgenommen). Die Methode des DNA-Barcoding stellt somit klar ein erstklassiges Werkzeug zur standardisierten und exakten Bestimmung von Eintagsfliegen dar. Die meisten kryptischen Arten sind aus der Familie der Baetidae bekannt, was im Rahmen von FREDIE bestätigt werden konnte.

Im Rahmen des Projektes wurden speziell für die Gattung *Cloeon* (Baetidae) mittels Next Generation Sequencing über 50 neue nukleäre Marker entwickelt. Da Eintagsfliegen als evolutiv alte Tiergruppe generell genomisch sehr divers zu sein scheinen, konnten bei kleineren Versuchsreihen keine neuen Marker für die ganze Ordnung Ephemeroptera entwickelt werden. Die zunehmende Verfügbarkeit von genomischen Daten in der Zukunft wird hierfür entscheidend sein.

Die Doktorandin Sereina Rutschmann hat ihre Dissertation am IGB erfolgreich abgeschlossen. Die Inhalte des ersten Kapitels der Dissertation wurden publiziert (Rutschmann et al. 2014), die der anderen beiden Kapitel folgen. Derzeit werden noch ergänzend rechenintensive Koaleszenz-basierten Analysen (GMYC) zur genetischen Artabgrenzung durchgeführt. Es gibt mehrere geplante Anschlussprojekte, die das in FREDIE zusammengetragenen Material weiter nutzen sollen (z.B. morphologische Analyse der Gattung *Electrogena* durch Marek Polásek, und Projekte in Kooperation mit dem Museum in Lausanne).

## 6.3 Tagungsbeiträge:

2013: SEFS Symposium for European Freshwater Sciences, Münster. Rutschmann S, Gattolliat J-L, Hughes SJ, Báez M, Sartori M, Monaghan MT. Complex colonization of oceanic islands by mayflies (Ephemeroptera: Baetidae).

2013: BeGenDiv Scientific Workshop, Berlin. Rutschmann S, Glöckner G, Allgaier M, Mazzoni C, Monaghan MT. Unraveling the origin of ancestral insects by using mitochondrial genome data.

2012: EMPSEB18, Finland. Rutschmann S, Glöckner G, Allgaier M, Monaghan MT. Using whole-genome data to study endemism and colonization history of mayflies (Ephemeroptera) on Atlantic Ocean islands.

## 6.4 Publikationen:

Rutschmann S, Gattolliat J-L, Hughes SJ, Báez M, Sartori M, Monaghan MT. Evolution and island endemism of morphologically cryptic *Baetis* and *Cloeon* species (Ephemeroptera, Baetidae) on the Canary Islands and Madeira. *Freshwater Biology* 59, 2516-2527 (2014)

Rutschmann S, Simon S, Báez M, Detering H, Gattolliat J-L, Hughes SJ, Raposeiro P, Sartori M, Monaghan MT (in preparation). Reconstruction of Atlantic island colonization by *Cloeon* dipterum s.l. (Ephemeroptera: Baetidae) using species tree inferences.

Rutschmann S, Detering H, Simon S, Monaghan MT (in preparation). DISCOMARK - Bioinformatics pipeline to design primers for DNA sequencing in non-model organisms.

Rutschmann S, Chen P, Zhou C, Monaghan MT (in preparation). Mitochondrial phylogenetics to reconstruct the onset of the oldest extant winged insects (Ephemeroptera & Odonata).

Rutschmann S, Gattolliat J-L, Sartori M, et al. (in preparation). European-wide barcoding project of mayflies (Ephemeroptera).

## **7. Identifizierung übergeordneter Diversitätsmuster**

Das im Projektantrag formulierte Ziel der gemeinsamen Analyse der Barcode-Daten der drei Organismengruppen konnte bisher noch nicht abgeschlossen werden. Primärer Grund hierfür sind die oben erläuterten heterogenen Fortschritte in der Beschaffung und Analyse des relevanten, eindeutig bestimmten Materials. Dies resultiert im Wesentlichen aus (i) dem im Vergleich zu Fischen grundsätzlich geringem taxonomischen Erfassungsstand der europäischen Süßwasserinvertebraten, (ii) den Problemen bei der Aktivierung des verstreuten Expertenwissens für die einzelnen Gruppen der bearbeiteten Invertebratengruppen, sowie (iii) den Herausforderungen bei der Sequenzierung einzelner Gruppen der Invertebraten. Während das Teilprojekt Süßwasserfische bereits in der ersten Hälfte des Projektes wesentliche Teile der avisierten Ziele in Bezug auf Arten- und räumliche Abdeckung erreicht hatte, und in Folge das Untersuchungsgebiet wie oben erläutert nochmals signifikant ausweiten konnte, waren durch die notwendigen Vorarbeiten, die spezifischen Anforderungen an die Feldarbeit, sowie die wesentlich geringere Unterstützung durch europäische Netzwerke langsamere Fortschritte zu verzeichnen. Aus diesen Gründen verschob sich der Fokus der an den Süßwasserfischen arbeitenden Gruppe weiter auf die Analyse der Muster innerhalb der Fische, sowie parallel auf die taxonomische Umsetzung der aus den FREDIE-Daten erwachsenen Erkenntnisse über die Artenvielfalt der Europäischen Fischfauna. Gleichsam liegt der primäre Fokus der beiden anderen Arbeitsgruppen zunächst auf der Vollendung der Analyse der taxonspezifischen Daten und deren Mustern. Durch FREDIE steht für jede einzelne der drei Organismengruppen nunmehr eine einzigartige Materialbasis für geplante anschließende Studien zur Verfügung. Die beteiligten Institute stellen weiterhin Ressourcen für deren Erschließung bereit, und die FREDIE-Partner arbeiten weiter mit den beiden Doktoranden und dem PostDoc am Ziel einer übergreifenden Publikation.

## **8. Methodische Teilprojekte:**

### **8.1 Sequenzierverfahren vs. Schmelzpunktanalyse (HRM)**

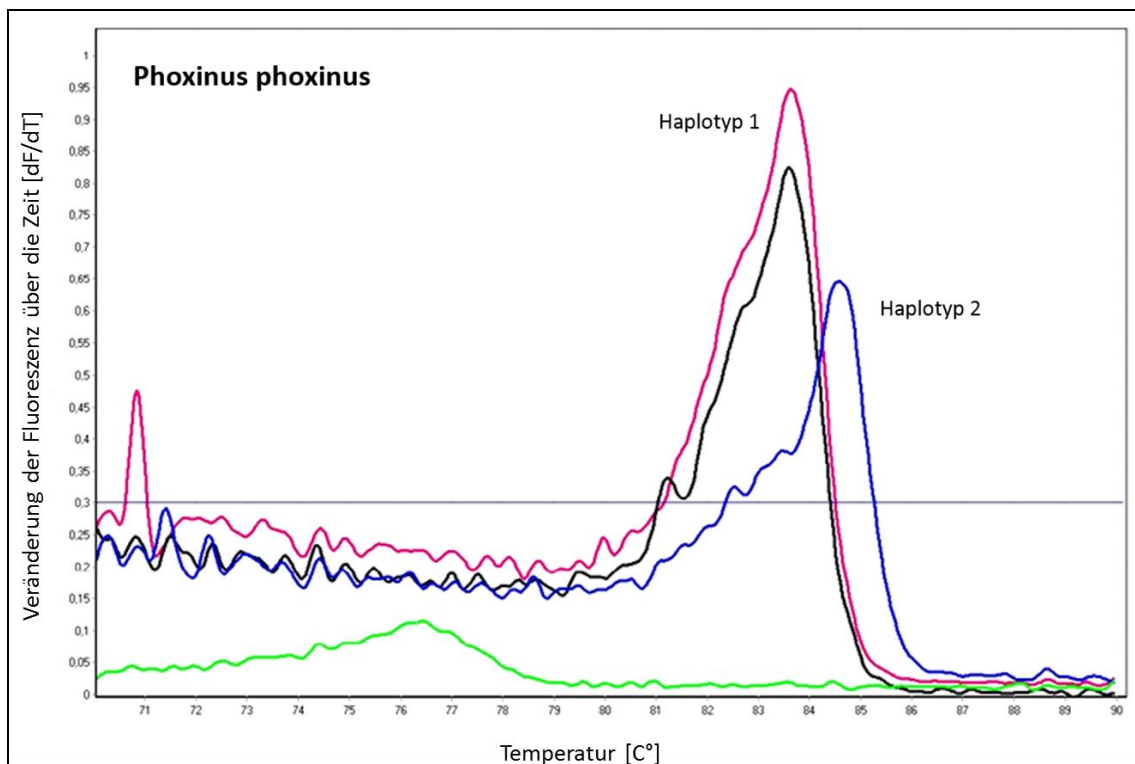
Basierend auf den molekularen Referenzdaten der Fische wurde abschließend explorativ ein alternatives Screening Verfahren (HRM - High Resolution Melting) herangezogen. HRM ist eine erst vor wenigen Jahren etablierte Technik, die eine effiziente und hoch auflösende Genotypisierung von Einzelproben ohne klassische Sequenzierung erlaubt. Das Verfahren basiert auf der unterschiedlichen Schmelztemperatur verschieden zusammengesetzter DNA-Moleküle, die direkt im Verlauf einer PCR-Reaktion ermittelt wird. Die erhaltenen Schmelzprofile erlauben somit – unter Umgehung von kosten- und zeitaufwändiger Sequenzierung – die Identifizierung von Proben, die in ihrer Nukleotidzusammensetzung von vorab analysierten Referenzproben abweichen. Voraussetzung für HRM Analysen ist die Amplifizierung kurzer diagnostischer Sequenzabschnitte, sogenannter Minibarcodes, für die spezifische Primer synthetisiert werden. Dank seiner Robustheit kann das Verfahren ohne weitere Reinigungsschritte oder Konzentrationseinstellung direkt an den DNA-Extraktionsschritt anschließen, wird in Reaktionsvolumina von nur 5-10µl durchgeführt, und liefert nach rund 2,5 Stunden die Schmelzprofile von bis zu 96 simultan analysierten DNA-Proben.

Exemplarisch für die größte und wichtigste europäische Gruppe der Süßwasserfische, die Karpfenfische (Cypriniden), konnte im Projekt überprüft werden, ob dieses innovative Verfahren als schnelle und kosteneffiziente Alternative zu konventionellem, sequenzbasierten DNA Barcoding geeignet ist. Die Basis dafür bildeten die im Verlauf des Projektes verfügbar gewordenen referenzierten Barcode-Daten. Die Cypriniden erscheinen aufgrund ihrer komplexen

Diversitätsmuster als hervorragende Modellgruppe für die Einschätzung der Eignung dieser Methode für die Identifizierung von Fischarten im Allgemeinen.

Für die Minibarcodes wurde zunächst ein spezifisches Primerpaar entwickelt, welches eine gewünschte Amplikon-Größe von 142bp erzeugt, und für eine Vielzahl von Arten verwendet werden kann. Anfang 2014 wurden die verschiedenen Schmelzkurven in Kooperation mit externen Experten (Prof. Dr. Wieslaw Bogdanowicz und Dr. hab. Tadeusz Malewski) der Polnischen Akademie der Wissenschaften (Polska Akademia Nauk, PAN) in Warschau generiert. Insgesamt wurden 220 Proben von 22 verschiedenen Cypriniden-Arten untersucht (10 Tiere pro Art). Nach der Amplifizierung der kurzen diagnostischen Sequenzabschnitte folgt unmittelbar eine Phase der präzisen Temperaturerhöhung von 70°C auf 90°C, mit einer Steigerung von 0,1°C pro Sekunde. Dabei wird der interkalierende DNA-Farbstoff EvaGreen in Gegenwart von doppelsträngiger DNA zum fluoreszieren gebracht. Allgemein bewirkt ein Temperaturanstieg die Trennung der beiden DNA Einzelstränge und somit die Freisetzung des Farbstoffes, was durch eine Abnahme der Fluoreszenz erkennbar ist. Unterschiede in der DNA-Sequenz bewirken Veränderungen der Duplex- Stabilität, und damit der Schmelzprofile der Fragmente.

Die Resultate unterstreichen der Erwartung hoher Auflösung diese „closed-tube“ Technik. Das wird unter anderem am Beispiel zweier genetischer Linien von Elritzen (*Phoxinus phoxinus*) in einem Rhein-Zufluss bei Bonn (Sieg) deutlich: Hier erzeugt der Austausch von nur vier Nucleotiden deutliche Unterschiede im Schmelzprofil der beiden Haplotypen, welche damit rasch und kosteneffizient unterschieden werden können. Dies zeigt, dass eine klare Unterscheidung der Fischarten anhand ihrer charakteristischen Schmelzkurven prinzipiell möglich ist. Im Anschluss an weitere detaillierte Analysen der Ergebnisse wird eine gemeinsame Publikation mit den Kollegen aus Warschau erfolgen.



**Abbildung 4:** Anhand ihrer verschiedenen Schmelzprofile lassen sich diese drei Individuen der Elritze *Phoxinus phoxinus* eindeutig unterscheiden. Zwei Individuen (schwarz und pink) können dem Haplotyp 1 zugeordnet werden, wohingegen das dritte Individuum (blau) dem Haplotyp 2 angehört.

## 8.2 Alternative genetische Barcode Marker

Nach Erstellung der Standard mitochondrialen COI Barcode Marker sollten im zweiten Analyseschritt weitere molekulare Marker aus dem Kerngenom getestet werden. Dies sollte besonders für die Untersuchung solcher Proben erfolgen, in denen keine eindeutige, zur morphologischen Bestimmung kongruente Identifikation über COI erzielt werden konnte. Zahlreiche Phänomene wie eine Einkreuzung populationsfremder Mitochondrien durch Hybridisierung, die Einlagerung von Kopien mitochondrialer Gene im Kerngenom, oder ein sehr junges Alter von Arten waren zwar bei einem Bruchteil der zu untersuchenden Arten zu erwarten, verlangen aber nach Klärung und Entwicklung von Lösungsansätzen für spätere Routineanwendungen.

Für verschiedene Fischarten, bei denen keine eindeutige Bestimmung über die COI-Sequenz erzielt wurde, konnten erfolgreich alternative Marker amplifiziert und sequenziert werden. Hier wurde untersucht, ob sich der Kernmarker Rhodopsin (*rho*) eignet, Diskrepanzen zwischen der morphologischen Artbestimmung und den erzeugten COI-Barcodes zu lösen. Exemplarisch für 73 europäische Cypriniden-Arten aus 14 verschiedenen Gattungen (195 Individuen) wurden die Sequenzen beider Marker vergleichend gegenübergestellt, um zu testen ob dadurch zwischen Introgression oder inadäquater Taxonomie unterschieden werden kann. Für jede Art wurde zunächst die kleinste interspezifische sowie die maximale intraspezifische Divergenz bestimmt. Anschließend wurde für COI sowie *rho* mittels dieser beiden Distanzen überprüft, ob ein sogenannter "barcode gap" existiert. In diesem Fall übersteigt die interspezifische Distanz die intraspezifische Variation in einem solchen Maß, dass eine klare Lücke besteht. Als Beispiel standen hier besonders die Arten der Gattungen *Crossocheilus*, *Hemigrammocapoeta*, *Tylognathus* und *Typhlogarra* im Fokus, welche sich anhand ihrer COI-Sequenzen nicht eindeutig von Arten der Gattung *Garra* abgrenzen ließen. Die Analyse der entsprechenden Rhodopsin-Sequenzen bestätigt dies. Betrachtet man die entsprechenden Stammbäume, wird bei beiden Markern deutlich, dass die Arten aus den verschiedenen Gattungen geringe Distanzen zueinander aufweisen, sich ihre Sequenzen also stark ähneln. Zusammen mit den Befunden der anderen Fischarten dieses direkten Marker-Vergleichs wurde deutlich, dass sich COI in den meisten Fällen besser zur Artidentifizierung eignet. Es zeigt sich, dass der mitochondriale Marker bei wesentlich mehr Arten einen „barcode gap“ aufweist, und damit eine klare Distanz zwischen den Sequenzen der Arten besteht. Weitere Tests mit den nukleären Markern S7, SH1, SH2, GH1, und GH2 weisen in die gleiche Richtung; der Standard-Marker COI sollte somit in der Regel immer zuerst amplifiziert werden. Der Nutzen der zusätzlichen Marker besteht in der Regel darin, einen Anfangsverdacht auf Hybridisierung zu testen. Die entsprechenden Ergebnisse wurden aufbereitet, und werden aktuell zur Publikation vorbereitet.

Zusammenfassend wurden im Projektzeitraum die wesentlichen der in den Projektzielen spezifizierten Herausforderungen gemeistert. Das FREDIE-Team war in der Lage, innerhalb von nur drei Jahren wesentliche Teile der Artenvielfalt dreier bedeutender Organismengruppen des Süßwassers zusammenzutragen, und für diese DNA-Barcodes zu erzeugen, die mit dauerhaft hinterlegten Belegexemplaren und durch Experten verifizierter Bestimmung verknüpft sind. Im Bereich der Fische waren größere Fortschritte zu verzeichnen als in den taxonomisch herausfordernderen Mollusken und Eintagsfliegen, woraufhin die Ziele jeweils angepasst wurden (Ausschluss in diesem Rahmen nicht auflösbarer Untergruppen, bzw. Ausweitung des Untersuchungsraumes für Fische auf die Westpaläarktis und den kompletten Mittelmeerraum). Die Analyse der Diversitätsmuster wurde für die Fische weit vorangetrieben (erfolgte Publikation für den gesamten Mittelmeerraum, sowie zur Taxonomie mehrerer Einzelgruppen; Fortschritt der Analysen zum

Gesamtdatensatz), die der beiden anderen Gruppen schließt zurzeit auf. Für das „stratifizierte Identifikationssystem“ wurde eine Website erstellt und die Grundlagen für eine Datenbank-Infrastruktur gelegt; im Laufe des Projektes wurde entschieden, Kräfte mit dem Projekt GBOL zusammenzuführen, um gemeinsam Add-Ons wie dynamische Karten einbinden zu können. Wie geplant wurden die Tests für vergleichende Schmelzpunktanalytik und die verschiedener Kernmarker erfolgreich durchgeführt. FREDIE hat damit den Bereich des einzelprobenbasierten DNA-Barcoding für Süßwassertiere Europas auf ein neues Niveau gehoben, und legt eine wichtige Grundlage für die Verknüpfung der Daten aus künftigen DNA-Erfassungsroutinen mit klassischer Artbestimmung.