

## Vergleich von Einzel-Gen DNA Barcoding und Multi-Gen Analysen in der Gattung *Sphingonotus* (Acrididae: Oedipodinae)

Lara-Sophie Dey, Axel Hochkirch & Martin Husemann

### Abstract

With more than 143 species and a wide distributional range, the genus *Sphingonotus* FIEBER, 1852 is the most species-rich genus within the subfamily Oedipodinae. Because of the high morphological similarity of many species, and a lack of comprehensive identification keys, it is not easy to distinguish many species of the genus. Molecular methods, specifically DNA barcoding (sequencing of the COI gene), promise to solve such problems, yet have shown to be problematic in many orthopteran groups. We used four different species delimitation tools (ABGD, *st*GMYC, *mt*GMYC und *b*GMYC) and two mitochondrial and one nuclear gene fragments to test for congruence with morphologically identified species. Our results show that using a single gene is not sufficient to delimit species. However, after concatenation of three gene fragments (COI, ND5, H3; total length of 1772 bp), most species of *Sphingonotus* could be separated in different species groups and in many cases to species. The use of additional mitochondrial genes (or whole mitogenomes) and nuclear loci will further help to understand the status of many *Sphingonotus* species and will facilitate a strongly needed revision of the entire genus.

### Zusammenfassung

Mit über 143 Arten und einer weiten Verbreitung stellt die Gattung *Sphingonotus* FIEBER, 1852, die größte Gattung innerhalb der Unterfamilie der Ödlandschrecken (Oedipodinae) dar. Durch die hohe morphologische Ähnlichkeit vieler Arten und das Fehlen aktueller Bestimmungsschlüssel, ist es schwer, viele Arten der Gattung sicher zu unterscheiden. In dieser Studie zeigen wir, dass molekulare Artabgrenzung ein hilfreiches Werkzeug zur objektiven Artbestimmung darstellen kann, aber demonstrieren auch die Schwächen der Methode. Während es nicht möglich war, die Arten der Gattung mit Hilfe von vier Artabgrenzungsmethoden (ABGD, *st*GMYC, *mt*GMYC und *b*GMYC) auf der Basis einzelner Genfragmente (COI, ND5 und H3) zu unterscheiden, konnte mit Hilfe einer kombinierten Analyse aller drei Genfragmente (1772 bp) eine Separierung in verschiedene Artgruppen und auch die korrekte Zuordnung vieler Arten erreicht werden. Zukünftige Studien könnten mit Hilfe weiterer mitochondrialer Genfragmente (oder ganzer Mitogenome) in Kombination mit zusätzlichen nuklearen Markern den Status weiterer Arten klären und eine Revision der Gattung unterstützen.

## Einleitung

Mit fast 28.000 rezenten Arten sind die Heuschrecken eine diverse Ordnung (CIGLIANO et al. 2019). Die Taxonomie innerhalb vieler Gruppen der Heuschrecken ist unklar und auch der Artstatus vieler Taxa muss überprüft werden. Dieses stellt sich oft als schwierig heraus, da Taxonomen mit dem Detailwissen zu den jeweiligen Gruppen fehlen (DREW 2011). Die Suche nach alternativen Methoden zur schnellen und objektiven Bestimmung und Beschreibung von Arten hat zur Entwicklung diverser molekularer und statistischer Werkzeuge geführt, die zumindest in der Theorie, die Mehrzahl der Arten identifizieren können.

Moderne Forschungsansätze, wie beispielsweise das DNA-Barcoding, ermöglichen die Untersuchung von Arten nicht nur mit morphologischen, sondern auch mit molekularen Methoden. Das Standardgen des DNA-Barcoding bei Tieren ist ein circa 650 Basenpaare (Bp) langes Fragment der Untereinheit 1 der Cytochrom Oxidase (COI) (HEBERT et al. 2003). Mit Hilfe des Informationsgehaltes dieses Gens können in der Theorie alle erwarteten Tierarten der Welt identifiziert werden (MOORE 1995, STOCKLE & HEBERT 2008). Die Nutzung des Gens hat sich auch in der Praxis in verschiedenen Taxa in der deutschen Fauna als sehr erfolgreich herausgestellt (SCHMID-EGGER et al. 2019, MORINIÉRE et al. 2017, RAUPACH et al. 2014). Diese Methode hat allerdings auch ihre Schwächen, wie am Beispiel einer Studie über mitteleuropäische Heuschreckenarten demonstriert wurde (HAWLITSCHKEK et al. 2017). Diese Studie zeigte, dass 100% der Ensifera-Arten aus dem mitteleuropäischen Raum unterschieden werden können, dagegen nur 59% der Caelifera-Arten molekular voneinander abgrenzbar sind. Hier stellen insbesondere die Grashüpfer (Gomphocerinae) ein Problem dar. Das Problem der mangelnden Abgrenzung innerhalb dieser Gruppe kann laut HAWLITSCHKEK et al. (2017) zahlreiche Ursachen haben. Zum einen sind viele Arten innerhalb dieser Gruppe evolutiv gesehen sehr jung, weshalb die Sequenzunterschiede zwischen den nah verwandten Arten zu gering für eine Unterscheidung sein können. Da bei der Verwendung von statistischen Artabgrenzungsmethoden häufig prozentuale Sequenzunterschiede oder der sogenannte Barcode-Gap zur Unterscheidung der Arten ermittelt wird, stellen die unterschiedlichen genetischen Distanzen eine schwer zu überwindende Hürde dar. Es kommt hierbei häufig dazu, dass Arten mit geringeren Sequenzunterschieden als eine Einheit (molecular operational taxonomic unit [mOTU]), oder bei der Barcode of Life Database (BOLD) zu einer Barcode Index Number [BIN]) zugeordnet werden. Das führt häufig dazu, dass morphologisch oder bioakustisch abgrenzbare Arten genetisch nicht unterschieden werden. Doch nicht nur das junge Alter einiger Arten, auch die mögliche Hybridisierung zwischen Arten kann ein Grund für Barcode Sharing, also das Teilen derselben COI-Sequenzinformation zwischen mehreren Arten sein. Weiterhin treten bei Heuschrecken sehr häufig Pseudogene (Numts) auf, also funktionslose Kopien von Genen, die frei evolvieren (HOCHKIRCH 2013, SONG et al. 2008, SHAW 2002). Schließlich kann auch die Infektion durch *Wolbachia*-Bakterien ein Grund für eine schlechte Auflösung sein, da diese Auswirkungen auf die Geschlechtsdeterminierung des Wirtes haben und dadurch auch die Vererbung der Mitochondrien beeinflussen (HAWLITSCHKEK et al. 2017).

Während HAWLITSCHKEK et al. (2017) die mitteleuropäischen Grashüpfer nicht auflösen konnten, waren die Oedipodinae gut mit Hilfe des COI-Gens zu trennen. Dies ist aber auch damit zu erklären, dass bei uns nur wenige und phylogenetisch gut getrennte Arten vorkommen. Schaut man sich aber eine größere Zahl von Arten innerhalb einer Gattung dieser Unterfamilie an, wandelt sich das Bild (z.B. HUSEMANN et al. 2014). So scheint die Möglichkeit der Art-Unterscheidung mit Hilfe von DNA-Barcoding mit zunehmender Diversität abzunehmen, wie DEY et al. (2018a) für die Biskra-Region in Algerien zeigten.

Aufgrund der hohen Diversität, der sehr ähnlichen Morphologie (Abb. 1) und des jungen Alters vieler Arten innerhalb der Gattung *Sphingonotus* (HUSEMANN et al. 2012), stellt diese ein interessantes Modellsystem für evolutionsbiologische und phylogenetische Fragestellungen dar. Mit über 143 Arten ist die Gattung die artenreichste innerhalb der Oedipodinae (CIGLIANO et al. 2019). Erste Studien von HOCHKIRCH & HUSEMANN (2008) und HUSEMANN et al. (2013, 2014) haben die Phylogenie und Diversität der Gattung *Sphingonotus* auf den Kanaren und der Iberischen Halbinsel untersucht und mit Hilfe der Sequenzierung von Fragmenten der NADH-Dehydrogenase-Untereinheit 5 (ND5), Teilen der 16S-rRNA, tRNA-Leu und der NADH-Dehydrogenase-Untereinheit 1 (NDS), Internal Transcribed Spacer 2 (ITS2), 12S-rRNA und 16S-rRNA, Arten unterscheiden und eine neue Art auf den Kanaren, sowie zwei neue Arten auf der Iberischen Halbinsel entdecken können. Diese Studien zeigen die Nützlichkeit molekularer Methoden zur Artabgrenzung. Hier testen wir nun das Auflösungsvermögen von COI, des beim DNA-Barcoding am häufigsten verwendeten Gens, sowie der Kombination mehrerer Gene an einer großen Anzahl von Arten verschiedenen Alters mit einer weiten Verbreitung und verschiedener Divergenz innerhalb der Gattung *Sphingonotus*.

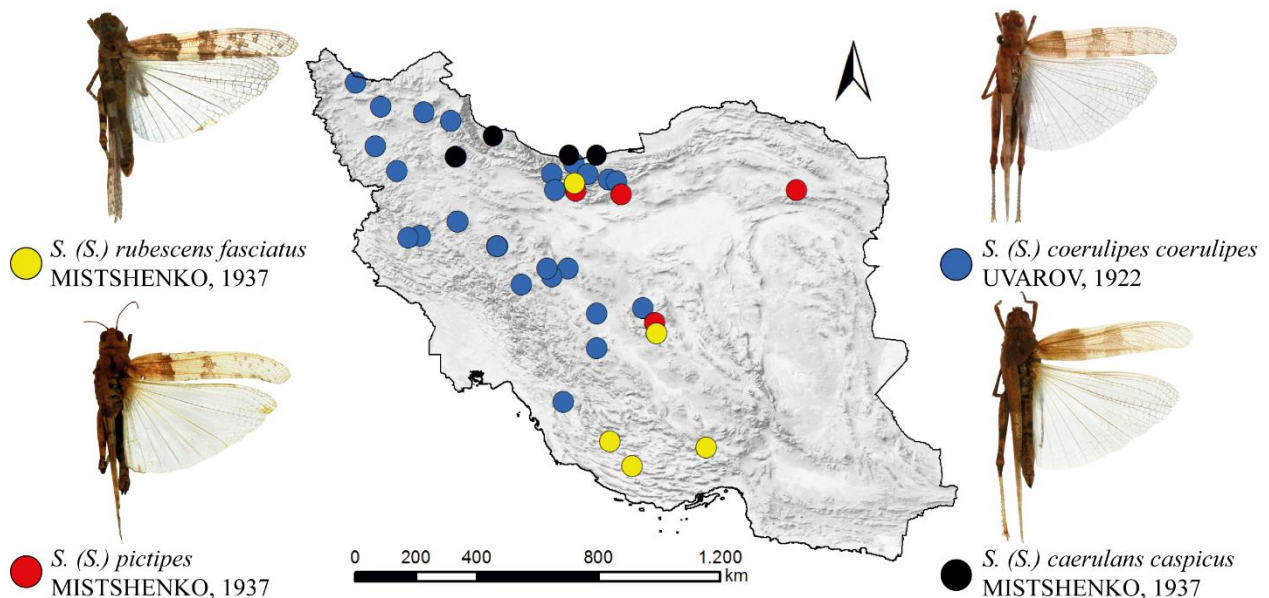


Abb. 1: Die Graphik verdeutlicht die Ähnlichkeit zwischen einigen Arten der Gattung *Sphingonotus* und ihre teils überlappende Verbreitung. Hier sind als Beispiel die vier im Iran vorkommenden (Unter-)Arten *S. rubescens fasciatus* Mistshenko, 1937; *S. pictipes* Uvarov, 1952; *S. coerulipes coerulipes* Uvarov, 1922 und *S. caerulans caspicus* Mistshenko, 1937 mit ihren bisherigen bekannten Fundorten im Iran dargestellt (verändert nach DEY et al. 2018).

## Methoden und Ergebnisse

Um die Erfolgsrate von DNA-Barcoding bei der Gattung *Sphingonotus* zu testen, stellten wir zunächst einen Datensatz mit einer möglichst großen Anzahl unterschiedlicher, durch morphologische Merkmale identifizierter Arten mit einer weiten geographischen Verbreitung zusammen (Abbildung 2). Hierbei wurde ein Fragment von COI für 84 Individuen aus 29 verschiedenen Arten amplifiziert und sequenziert (siehe Tabelle 1). Die Sequenzen wurden mit den Datenbanken NCBI und BOLD (RATNASINGHAM & HEBERT 2007, BENSON et al. 2012) abgeglichen. Ein Alignment aller Sequenzen, inklusive der Außengruppen *Trimerotropis ochraceipennis* (Blanchard, 1851) und *Thalpomena coerulea* Uvarov, 1923, wurde erstellt und Phylogenien mit Hilfe von Bayes'schen und Maximum-Likelihood-Verfahren berechnet (RONQUIST et al. 2012, TAMURA et al. 2013). Im Anschluss wurden vier verschiedene statistische Artabgrenzungsverfahren (ABGD, *st*GMYS, *mt*GMYS und *b*GMYS; PONS et al. 2006, MONGHAN et al. 2009, PULLANDRE et al. 2012, REID & CARSTENS 2012, FUJISAWA et al. 2013, TANG et al. 2014) auf den Datensatz angewandt. Während ABGD die mOTUs mit Hilfe der Barcode-Gap gruppiert, unterteilen die Methoden *st*GMYS und *mt*GMYS die Daten auf der Basis einer Maximum-Likelihood-Phylogenie in kategorische Cluster. Die *b*GMYS Methode hingegen nutzt eine Bayes'sche Phylogenie. Die jeweilig berechneten mOTUs wurden im Anschluss auf Kongruenz verglichen. Während *b*GMYS die Individuen in 21 und *mt*GMYS in 25 Gruppen unterteilten, was der Anzahl von 29 morphologisch bestimmter Arten am nächsten kam, definierten die Methoden ABGD 16 und *st*GMYS 18 mOTUs. Keine der Methoden gruppierte mehr als 24% (*b*GMYS) aller analysierten Individuen in die korrekten morphologisch definierten Gruppen.

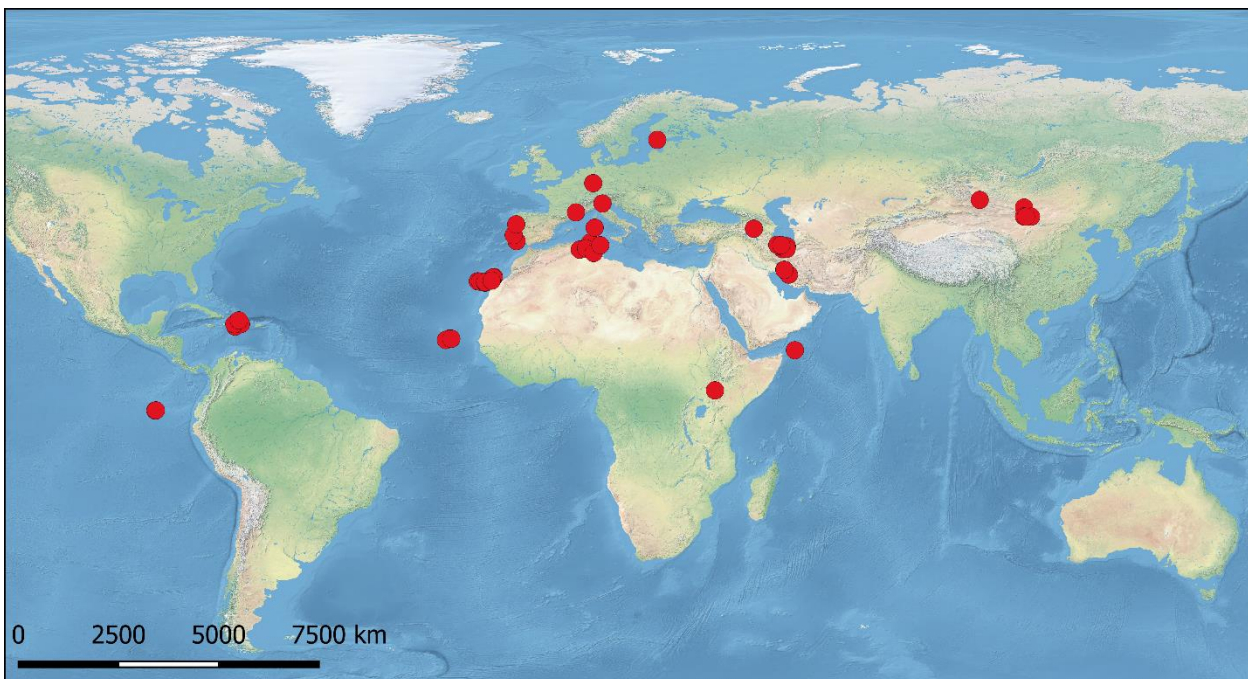


Abb. 2: Diese Karte zeigt die Herkunft der in dieser Studie genutzten Proben.

Tab. 1: Übersicht über die in dieser Studie einbezogenen morphologisch determinierten Arten mit Individuenzahl.

Gattung	Art	Individuenanzahl
<i>Sphingonotus</i>	<i>caerulans</i>	5
<i>Sphingonotus</i>	<i>canariensis</i>	2
<i>Sphingonotus</i>	<i>candidus</i>	1
<i>Sphingonotus</i>	<i>coerulipes</i>	6
<i>Sphingonotus</i>	<i>eurasius</i>	3
<i>Sphingonotus</i>	<i>finotianus</i>	5
<i>Sphingonotus</i>	<i>fuerteventurae</i>	2
<i>Sphingonotus</i>	<i>fuscoirroratus</i>	5
<i>Sphingonotus</i>	<i>fuscus</i>	4
<i>Sphingonotus</i>	<i>beybienkoi</i>	2
<i>Sphingonotus</i>	<i>haitensis</i>	5
<i>Sphingonotus</i>	<i>lucasii</i>	4
<i>Sphingonotus</i>	<i>obscuratus</i>	2
<i>Sphingonotus</i>	<i>octofasciatus</i>	1
<i>Sphingonotus</i>	<i>pachecoi</i>	2
<i>Sphingonotus</i>	<i>pilosus</i>	2
<i>Sphingonotus</i>	<i>rubescens</i>	6
<i>Sphingonotus</i>	<i>satrapes</i>	1
<i>Sphingonotus</i>	<i>savignyi</i>	8
<i>Sphingonotus</i>	<i>sublaevis</i>	1
<i>Sphingonotus</i>	<i>theodori</i>	3
<i>Sphingonotus</i>	<i>vosseleri</i>	3
<i>Sphingonotus</i>	<i>azurescens</i>	3
<i>Thalpomena</i>	<i>coerulescens</i>	1
<i>Trimerotropis</i>	<i>ochraceipennis</i>	1
<i>Sphingoderus</i>	<i>carinatus</i>	1
<i>Sphingonotus</i>	<i>sp 1</i>	2
<i>Sphingonotus</i>	<i>cf. lucidus</i>	2
<i>Sphingonotus</i>	<i>sp 2</i>	1

Im nächsten Schritt wurden für die gleichen Individuen für die COI sequenziert wurde, auch das mitochondriale Gen ND5, welches in vorherigen Analysen bereits für die Rekonstruktion von Phylogenien der Gattung verwendet wurde (HOCHKIRCH & HUSEMANN 2008), sowie das Kerngen Histon 3 (H3) (COLGAN et al. 1998) analysiert. Die beiden zusätzlichen Genfragmente wurden einzeln mit Hilfe der bereits für den COI-Datensatz genutzten Artabgrenzungs-Methoden (ABGD, stGMYC, mtGMYC, bGMYC) untersucht. Hierbei konnte gezeigt werden, dass auch die beiden zusätzlich genutzten Fragmente in der Einzelanalyse keine ausreichende Auflösung darboten. Der analysierte ND5-Datensatz trennte maximal vier Arten der Gattung korrekt auf (ABGD), dabei entsprach die errechnete Anzahl an mOTUs



nahezu der morphologisch abgegrenzten Artanzahl (21 mOTUs berechnet auf 29 morphologische Arten). Der H3-Datensatz wies in keiner Analyseverfahren eine annähernd korrekte Trennung auf. Die Anzahl der mOTUs wurde entweder stark unter- oder überschätzt. Die Ergebnisse aller Analysen für die einzelnen Genfragmente sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tab. 2: Ergebnisse der verschiedenen statistischen Artabgrenzungsmethoden: Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD), Single Threshold General Mixed Yule Coalescent (*st*GMYC), Multi Threshold General Mixed Yule Coalescent (*mt*GMYC) und Bayesian General Mixed Yule Coalescent (*b*GMYC) für jedes der analysierten Gene. Die jeweilige Anzahl an berechneten Gruppen ist unter # zu finden, während % die prozentuale Anzahl an korrekt zugeordneten Arten nach morphologischer Artbestimmung angibt.

	ABGD		<i>st</i> GMYC		<i>mt</i> GMYC		<i>b</i> GMYC	
	#	%	#	%	#	%	#	%
<b>COI</b>	16	20	18	17	25	13	21	24
<b>ND5</b>	21	13	19	17	24	13	17	21
<b>H3</b>	38	13	2	0	2	0	3	0

Zusätzlich wurden die drei amplifizierten Genabschnitte gemeinsam analysiert. Die Gesamtlänge des neuen Datensatzes betrug 1772 bp. Für jedes genutzte Individuum wurden alle drei Genfragmente amplifiziert und in die Analysen einbezogen. Auch hier wurden Phylogenien mit Hilfe von Bayes'schen und Maximum-Likelihood-Verfahren berechnet und die resultierenden Topologien im Anschluss verglichen. Für die Multi-Gen Bäume wurden keine Artabgrenzungsmethoden verwendet, da bisher nur wenige Algorithmen zur Analyse kombinierter Multi-Gen Datensätze entwickelt wurden. Allerdings wiesen die phylogenetischen Bäume des kombinierten Datensatzes eine bessere Auflösung als alle einzeln genutzten Fragmente auf. Die meisten Knotenpunkte des Baums waren statistisch gut gestützt (> 95% posteriore Wahrscheinlichkeit). Es ist zwar immer noch nicht möglich, alle analysierten Arten voneinander zu trennen, jedoch lassen sich zumindest Artgruppen definieren. Im Stammbaum konnten vier große, gut voneinander abgetrennte Cluster identifiziert werden (Abbildung 3). Innerhalb dieser Cluster konnten manche Arten nicht eindeutig genetisch voneinander unterschieden werden und tauchen an mehreren Stellen auf (z.B. *S. caeruleans*, *S. coeruleipes*). Einige Arten waren allerdings klar abtrennbar (z.B. *S. [S.] fuerteventurae*, *S. beybienko*, *S. haitensis*). Basierend auf dem konkatenierten phylogenetischen Stammbaum, lassen sich somit theoretisch circa 50% der Arten abgrenzen. Hierbei muss aber klar gesagt werden, dass diese Beurteilung nicht mit Hilfe eines Artabgrenzungsalgorithmus erstellt wurde.

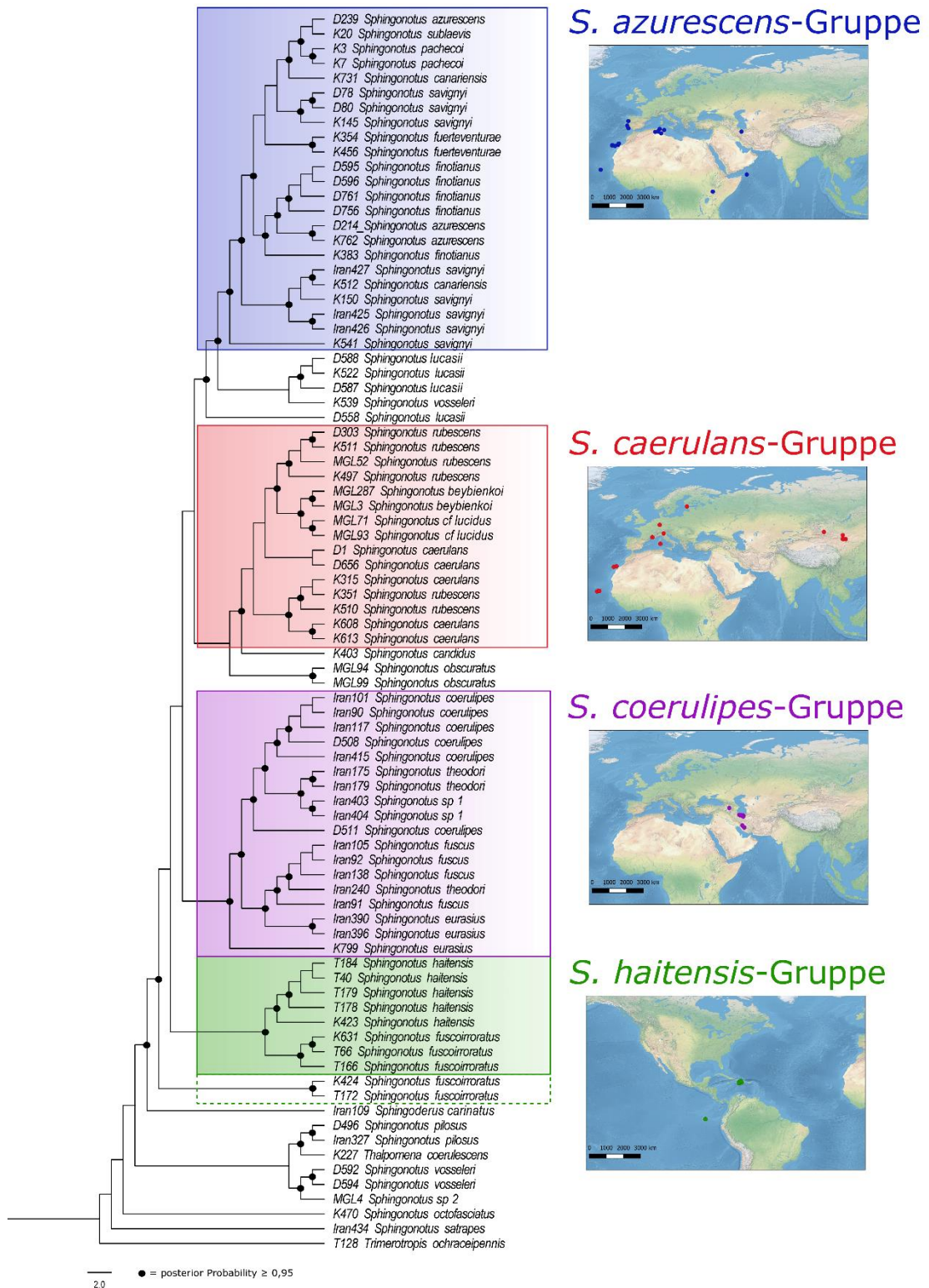


Abb. 3: Diese Bayes'sche Phylogenie wurde auf Basis des Multi-Gen Datensatzes berechnet. Schwarze Knotenpunkte repräsentieren posteriore Wahrscheinlichkeiten über 95%. Die in dieser Studie definierten Kladen der *S. azurescens*-Gruppe (blau), der *S. caerulans*-Gruppe (rot), der *S. coerulipes*-Gruppe (violett) und der *S. haitensis*-Gruppe (grün) sind farblich markiert. Die gestrichelte grüne Line zeigt zwei weitere Individuen die zur *S. haitensis*-Gruppe gehören, allerdings innerhalb des Baums nicht direkt in die Klade fallen. Die jeweiligen Fundorte der Individuen sind auf den nebenstehenden Verbreitungskarten aufgezeigt.

## Diskussion

Im vorliegenden Projekt haben wir vier verschiedene Methoden zur molekularen Artunterscheidung auf der Basis von COI, ND5 und H3 Einzelgenfragmenten und des kombinierten Multi-Gen Datensatzes verwendet, um *Sphingonotus*-Arten molekular zu unterscheiden. Um die Auflösung der genutzten Genfragmente untersuchen zu können, wurden alle verwendeten Marker mit den vier Artabgrenzungsmethoden einzeln untersucht. Der COI-Datensatz erbrachte unabhängig von der statistischen Methode nur eine geringe Auflösung. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass auch die Fragmente ND5 und H3 einzeln keine, oder eine nur geringfügig bessere Auflösung als COI aufweisen. Während bei einigen Artabgrenzungsmethoden die Anzahl der mOTUs im Vergleich zur morphologischen Einschätzung relativ ähnlich war, verfehlten alle Methoden die korrekte Zuordnung von Individuen zu den morphologisch bestimmten Arten. Die Mehrzahl der mOTUs bestand aus mehr als einer morphologisch identifizierten Art. Zudem kamen teilweise Individuen einer Art in verschiedenen mOTUs vor. Dieses Muster weist auf intensives Teilen von identischen oder nahe verwandten Barcodes hin, wie es zum Beispiel auch in der Studie von HAWLITSCHK et al. (2017) für Gomphocerinae, in der Arbeit von TREWICK (2008) für die neuseeländischen Heuschrecken oder auch in ZHOU et al. (2019) für die chinesischen Laubheuschrecken beobachtet wurde. Doch nicht nur in den Orthopteren, auch in anderen Taxa beispielsweise in den nord-west-pazifischen Mollusca (LI et al. 2016) oder europäischen Lepidoptera (HUEMER et al. 2014) traten die bereits erläuterten Probleme beim Barcoding auf. In vielen anderen Insektengruppen, wie beispielsweise der hoch diversen Biengattung *Lasioglossum*, lassen sich die einzelnen, meist sogar kryptischen, Arten über DNA-Barcoding trennen (LANDAVERDE-GONZÁLEZ et al. 2017). Auch in den tropischen Lepidoptera konnten mit Hilfe von Barcoding 97,9% der 521 untersuchten Arten unterschieden werden (HAJIBABAEI et al. 2006). Des Weiteren konnten in einer Studie von FOOTIT et al. (2008) mehr als 96% aller kanadischen Blattläuse differenziert werden.

Innerhalb der Gattung *Sphingonotus* scheint der Informationsgehalt des COI-Fragments, sowie der anderen genutzten Fragmente ND5 und H3 allerdings nicht auszureichen, um die Arten zu differenzieren. In den Analysen der einzelnen Genfragmente konnte keine der statistischen Artabgrenzungsmethoden mehr als 24% der Individuen den morphologisch bestimmten Arten zuordnen. Die Analyse des Multi-Gen Datensatzes über Bayes'sche und Maximum-Likelihood Phylogenien war erfolgreicher, grenzte aber auch nur Artgruppen korrekt voneinander ab, die jeweils mehrere nicht oder nur teilweise voneinander trennbare Arten beinhalteten. Einige andere Arten innerhalb der Cluster konnten allerdings gut von anderen unterschieden werden. Dies traf besonders für die basalen Arten innerhalb der Cluster zu.

Auf Grund des jungen Alters vieler Arten der Gattung, der weiten Verbreitung und auch der morphologischen Ähnlichkeit, können mehrere Aspekte eine Rolle für die mangelnde Auflösung des COI-Datensatzes spielen. Der potentiell wichtigste Faktor für das intensive BIN-Sharing (Teilen der gleichen COI-Sequenz zwischen verschiedenen Arten) ist das junge Alter und das vermeintlich hohe Potential für Hybridisierung in jungen Radiationen.



Zudem könnte die unterschiedliche Evolutionsgeschwindigkeit in einzelnen Linien eine Rolle spielen, mit denen einige der statistischen Methoden nicht umgehen können (LUNT et al. 1996, LIN et al. 2004). Dies gilt vor allem für ABGD, einer Methode die auf der Berechnung eines Barcode-Gap basiert. Hier besteht das Problem darin, dass in evolutionär heterogenen Gruppen mehrere Gaps ausgebildet sein können (MEYER & PAULAY 2005).

Die Hinzunahme zusätzlicher Genfragente führt zu einer besseren Auflösung der Phylogenie. Verglichen mit den Ergebnissen aus der Analyse der COI-Sequenzen allein, wurde es bei der Multi-Gen Analyse möglich, die Arten in vier Cluster zu separieren (*S. azurescens*-Gruppe; *S. caerulans*-Gruppe; *S. coerulipes*-Gruppe; *S. haitensis*-Gruppe [Abb. 3]). Vorherige Studien hatten bereits drei dieser Gruppen identifiziert (*S. azurescens*-Gruppe; *S. caerulans*-Gruppe, *S. haitensis*-Gruppe; HUSEMANN et al. 2014, 2015) und zeigten bereits die Schwierigkeit die Gruppen mit wenigen Genfragmenten aufzulösen. Eine bisher unbekannte Gruppierung stellt die *S. coerulipes*-Gruppe dar. In diesem Teil des Baumes befanden sich ausschließlich Proben, die aus Südwest-Asien stammten. Diese geographische Separierung einzelner, zum Teil für diese Region endemischer Arten (z.B. *S. theodori*, *S. fuscus*), lässt darauf schließen, dass die Gruppe sich vor längerer Zeit abgespalten hat und eine eigene unabhängige Radiation in dem Gebiet durchlaufen hat, ähnlich der beiden anderen Gruppen im mediterranen Raum. Des Weiteren war es uns möglich mit Hilfe dieser Studie eine potentiell neue Art aus der Region zu finden. Diese ist morphologisch recht ähnlich zu der weit verbreiteten Art *Sphingonotus (Sphingonotus) rubescens* Walker, 1870, von welcher mehrere Unterarten bekannt sind, die vor allem in Zentral- und Westasien verbreitet sind (*S. r. afghanicus*, *S. r. fallax*, *S. r. fasciatus*, *S. r. subfasciatus*). Da *S. rubescens* allerdings genetisch innerhalb der *S. caerulans*-Gruppe clustert, war es uns möglich die potentiell neue Art von der weit verbreiteten zu unterscheiden. In einer zukünftigen Studie wollen wir die potentiell neue Art genauer untersuchen und beschreiben.

## Ausblick

Um die Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Gattung *Sphingonotus* klären zu können, wird es in Zukunft notwendig sein, mehr Individuen einer möglichst großen Anzahl von Arten und vor allem aus allen Verbreitungsgebieten zu untersuchen. Hierbei hat sich bereits herausgestellt, dass Datensätze, die ausschließlich COI-Sequenzen enthalten, keine klare Separierung gewährleisten. Die bisher verwendeten drei Genfragmente COI, H3 und ND5 scheinen in Kombination variabel genug zu sein, um Artengruppen (und zum Teil Arten) zu unterscheiden, aber bieten nicht in allen Fällen eine Auflösung auf Art Ebene. Demnach ist es notwendig, die bisherige Datenbasis zu erweitern und zusätzliche nukleare, sowie mitochondriale Genfragmente zu analysieren. Die Nutzung genomischer Daten wird, wie in anderen rezenten Radiationen vermutlich eine bessere Auflösung der Verwandtschaftsbeziehungen ermöglichen. Eine weitere Möglichkeit stellt auch die Nutzung von Mitogenomen in Kombination mit nuklearen Markern dar (SONG et al. 2015, 2018). Diese können heutzutage relativ kostengünstig über Next-Generation-Sequencing-Plattformen generiert werden.

## Danksagung

Wir möchten all unseren Unterstützern und Kooperationspartnern für die Hilfe an diesem Projekt danken. Wir danken unseren Kollegen R. Felix, C. Hemp, A. Moussi, F. Buzzetti, A. Soro, S. Lötters, Y. Görzig, S.H. Hodjat, L. Darimont, H. Seeboth, H. Takizawa, D. Perez, B. Hierro, R. Bastardo, A. Hilario, D.E. Perez, D. Otte und H. Rowell für die Bereitstellung von Proben. Ganz besonders bedanken wir uns bei der Deutschen Gesellschaft für Orthopterologie (DGfO) für die finanzielle Unterstützung, durch welche diese Studie ermöglicht werden konnte.

Verfasser:

Lara-Sophie Dey, Martin Husemann  
Universität Hamburg  
Centrum für Naturkunde  
Martin-Luther-King Platz 3  
20146 Hamburg  
E-Mail: Lara-Sophie.Dey@uni-hamburg.de

Axel Hochkirch  
Universität Trier  
Biogeographie  
Universitätsring 15  
54296 Trier

## Literatur

- BENSON, D.A., CAVANAUGH, M., CLARK, K., KARSCH-MIZRACHI, I., LIPMAN, D.J., OSTELL, J. & SAYERS, E.W. (2012): GenBank. - *Nucleic Acids Research*, 41(D1), D36-D42.
- BEY-BIENKO, G.J. & MISTSHENKO, L.L. (1951): Locusts and grasshoppers of the USSR and adjacent countries. Vol.2. - Israel Program for Scientific Translations, Jerusalem: 381-667.
- CIGLIANO, M.M., BRAUN, H., EADES, D.C. & OTTE, D. (2019): Orthoptera Species File. Version 5.0/5.0. [retrieval date]. <<http://Orthoptera.SpeciesFile.org>>.
- COLGAN, D.J., MCLAUCHLAN, A., WILSON, G.D.F., LIVINGSTON, S.P., EDGEcombe, G.D., MACARANAS, J. & GRAY, M.R. (1998): Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. - *Australian Journal of Zoology*, 46 (5): 419-437.
- DEY, L.-S., MOUSSI, A., PETIT, D., ABBA, A., KLESSER, R. & HUSEMANN, M. (2018a): First genetic data for band-winged grasshoppers (Orthoptera: Acrididae: Oedipodinae) of the Biskra region of Algeria with new records for the country. - *African Zoology*, 53 (1): 31-40.
- DEY, L.-S., SABOORI, A., HODJAT, S.H., TORK, M., PAHLOW, F. & HUSEMANN, M. (2018b): A faunistic review of the Iranian species of *Sphingonotus* (Orthoptera, Oedipodinae) with an online key to species. - *Zootaxa*, 4379 (2): 151-176.
- DREW, L.W. (2011). Are We Losing the Science of Taxonomy? As need grows, numbers and training are failing to keep up. - *BioScience*, 61 (12): 942-946.

- FOOTTIT, R.G., MAW, H.E.L., VON DOHLEN, C.D. & HEBERT, P.D.N. (2008): Species identification of aphids (Insecta: Hemiptera: Aphididae) through DNA barcodes. *Molecular Ecology Resources*, 8 (6): 1189-1201.
- FUJITSAWA, T. & BARRACLOUGH, T.G. (2013): Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. - *Systematic Biology*, 62 (5): 707-724.
- HAJIBABAEI, M., JANZEN, D.H., BURNS, J.M., HALLWACHS, W. & HEBERT, P.D. (2006): DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera. - *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103 (4): 968-971.
- HAWLITSCHKE, O., MORINIERE, J., LEHMANN, G.U.C., LEHMANN, A.W., KROPF, M., DUNZ, A. & SZUCSICH, N.U. (2017): DNA barcoding of crickets, katydids and grasshoppers (Orthoptera) from Central Europe with focus on Austria, Germany and Switzerland. - *Molecular Ecology Resources*, 17 (5): 1037-1053.
- HEBERT, P.D., CYWINSKA, A., BALL, S.L. & DEWAARD, J.R. (2003): Biological identifications through DNA barcodes. - *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270 (1512): 313-321.
- HOCHKIRCH, A. & HUSEMANN, M. (2008): A review of the Canarian Sphingonotini with description of a new species from Fuerteventura (Orthoptera: Acrididae: Oedipodinae). - *Zoological Studies*, 47 (4): 495-506.
- HOCHKIRCH, A. (2013): Hybridization and the origin of species. - *Journal of evolutionary biology*, 26 (2): 247-251.
- HUEMER, P., MUTANEN, M., SEFC, K.M., & HEBERT, P.D. (2014): Testing DNA barcode performance in 1000 species of European Lepidoptera: large geographic distances have small genetic impacts. - *PLoS One*, 9 (12), e115774.
- HUSEMANN, M., DEPPERMAN, J., & HOCHKIRCH, A. (2014). Multiple independent colonization of the Canary Islands by the winged grasshopper genus *Sphingonotus* Fieber, 1852. - *Molecular phylogenetics and evolution*, 81: 174-181.
- HUSEMANN, M., HABEL, J.C., NAMKUNG, S., HOCHKIRCH, A., OTTE, D. & DANLEY, P.D. (2015): Molecular evidence for an old world origin of Galapagos and Caribbean band-winged grasshoppers (Acrididae: Oedipodinae: Sphingonotus). - *PloS one*, 10 (2), e0118208.
- HUSEMANN, M., LLUCIÀ-POMARES & D. HOCHKIRCH, A. (2013): A review of the Iberian Sphingonotini with description of two novel species (Orthoptera: Acrididae: Oedipodinae). - *Zoological Journal of the Linnean Society*, 168 (1): 29–60.
- HUSEMANN, M., NAMKUNG, S., HABEL, J.C., DANLEY, P.D. & HOCHKIRCH, A. (2012): Phylogenetic analyses of band-winged grasshoppers (Orthoptera, Acrididae, Oedipodinae) reveal convergence of wing morphology. - *Zoologica Scripta*, 41: 515-526.
- HUSEMANN, M., RAY, J. & HOCHKIRCH, A. (2011): A revision of the subgenus *Parasphingonotus* Benediktov & Husemann, 2009 (Orthoptera: Oedipodinae: Sphingonotini). - *Zootaxa*, 2916 (1): 51-61.
- LANDAVERDE-GONZÁLEZ, P., MOO-VALLE, H., MURRAY, T.E., PAXTON, R.J., QUEZADA-EUÁN, J.J. G. & HUSEMANN, M. (2017): Sympatric lineage divergence in cryptic Neotropical sweat bees (Hymenoptera: Halictidae: *Lasioglossum*). - *Organisms Diversity & Evolution*, 17 (1): 251-265.
- LANFEAR, R., CALCOTT, B., HO, S.Y. & GUINDON, S. (2012): PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. - *Molecular Biology and Evolution*, 29 (6): 1695-1701.
- LI, Q., KONG, L., YU, H., ZHENG, X., YU, R., DAI, L. & FENG, Y. (2016): DNA barcoding reveal patterns of species diversity among northwestern Pacific molluscs. - *Scientific reports*, 6, 33367.

- LIN, C.P., & DANFORTH, B.N. (2004): How do insect nuclear and mitochondrial gene substitution patterns differ? Insights from Bayesian analyses of combined datasets. - *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30 (3): 686-702.
- LUNT, D.H., ZHANG, D.X., SZYMURA, J.M., & HEWLTT, O.M. (1996): The insect cytochrome oxidase I gene: evolutionary patterns and conserved primers for phylogenetic studies. - *Insect Molecular Biology*, 5 (3): 153-165.
- MADDEN, T. (2013): The NCBI Handbook [Internet]. 2<sup>nd</sup> edition. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US). Tools.
- MEYER, C.P., & PAULAY, G. (2005): DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling. - *PLoS biology*, 3 (12), e422.
- MISTSHENKO, L. (1936): Revision of palearctic species of the genus *Sphingonotus* Fieb. (Orthoptera, Acrididae). - *Eos*, 12: 65-282.
- MONAGHAN, M.T., WILD, R., ELLIOT, M., FUJISAWA, T., BALKE, M., INWARD, D.J. & VOGLER, A.P. (2009): Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. - *Systematic Biology*, 58 (3): 298-311.
- MOORE, W.S. (1995): Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. - *Evolution*, 49 (4): 718-726.
- MORINIÉRE, J., HENDRICH, L., BALKE, M., BEERMANN, A.J., KÖNIG, T., HESS, M. & HAUSMANN, A. (2017): A DNA barcode library for Germany's mayflies, stoneflies and caddisflies (Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera). - *Molecular Ecology Resources*, 17 (6): 1293-1307.
- PONS, J., BARRACLOUGH, T.G., GOMEZ-ZURITA, J., CARDOSO, A., DURAN, D.P., HAZELL, S. & VOGLER, A.P. (2006): Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. - *Systematic Biology*, 55 (4): 595-609.
- PULLANDRE, N., LAMBERT, A., BROUILLET, S. & ACHAZ, G. (2012): ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. - *Molecular Ecology*, 21 (8): 1864-1877.
- RATNASINGHAM, S. & HEBERT, P.D. (2007): BOLD: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). - *Molecular Ecology Notes*, 7 (3): 355-364.
- RAUPACH, M.J., HENDRICH, L., KÜCHLER, S.M., DEISTER, F., MORINIÉRE, J. & GOSSNER, M.M. (2014): Building-up of a DNA barcode library for true bugs (Insecta: Hemiptera: Heteroptera) of Germany reveals taxonomic uncertainties and surprises. - *PLoS One*, 9 (9), e106940.
- REID, N.M. & CARSTENS, B.C. (2012): Phylogenetic estimation error can decrease the accuracy of species delimitation: a Bayesian implementation of the general mixed Yule-coalescent model. - *BMC Evolutionary Biology*, 12 (1): 196.
- RONQUIST, F., TESLENKO, M., VAN DER MARK, P., AYRES, D.L., DARLING, A., HÖHNA, S. & HUELSENBECK, J.P. (2012): MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. - *Systematic Biology*, 61 (3): 539-542.
- SCHMID-EGGER, C., STRAKA, J., LIUBOMIROV, T., BLAGOEV, G.A., MORINIÉRE, J., & SCHMIDT, S. (2019): DNA barcodes identify 99 per cent of apoid wasp species (Hymenoptera: Ampulicidae, Crabronidae, Sphecidae) from the Western Palearctic. - *Molecular ecology resources*, 19 (2): 476-484.
- SHAW, K.L. (2002): Conflict between nuclear and mitochondrial DNA phylogenies of a recent species radiation: what mtDNA reveals and conceals about modes of speciation in Hawaiian crickets. - *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (25): 16122-16127.

- SONG, H., AMEDEGNATO, C., CIGLIANO, M.M., DESUTTER-GRANDCOLAS, L., HEADS, S.W., HUANG, Y. & WHITING, M.F. (2015): 300 million years of diversification: elucidating the patterns of orthopteran evolution based on comprehensive taxon and gene sampling. - *Cladistics*, 31 (6): 621-651.
- SONG, H., BUHAY, J. E., WHITING, M. F., & CRANDALL, K. A. (2008): Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. - *Proceedings of the national academy of sciences*, 105 (36): 13486-13491.
- SONG, H., MARINO-PEREZ, R., WOLLER, D.A. & CIGLIANO, M.M. (2018): Evolution, Diversification, and Biogeography of Grasshoppers (Orthoptera: Acrididae). - *Insect Systematics and Diversity*, 2 (4): 3.
- STOCKLE, M.Y., & HEBERT, P.D. (2008): Barcode of life. - *Scientific American*, 299 (4): 82-88.
- SU, Z.H., TOMINAGA, O., OKAMOTO, M. & OSAWA, S. (1998): Origin and diversification of hind-wingless *Damaster* ground beetles within the Japanese islands as deduced from mitochondrial ND5 gene sequences (Coleoptera, Carabidae). - *Molecular Biology and Evolution*, 15 (8): 1026-1039.
- TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., FILIPSKI, A. & KUMAR, S. (2013): MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. - *Molecular Biology and Evolution*, 30 (12): 2725-2729.9.
- TANG, C.Q., HUMPHREYS, A.M., FONTANETO, D. & BARRACLOUGH, T.G. (2014): Effects of phylogenetic reconstruction method on the robustness of species delimitation using single-locus data. - *Methods in Ecology and Evolution*, 5 (10): 1086-1094.
- TREWICK, S.A. (2008): DNA Barcoding is not enough: mismatch of taxonomy and genealogy in New Zealand grasshoppers (Orthoptera: Acrididae). - *Cladistics*, 24 (2): 240-254.
- ZHOU, Z., GUO, H., HAN, L., CHAI, J., CHE, X., & SHI, F. (2019): Singleton molecular species delimitation based on COI-5P barcode sequences revealed high cryptic/undescribed diversity for Chinese katydids (Orthoptera: Tettigoniidae). - *BMC evolutionary biology*, 19 (1): 79.



