

INTERPRETATIONSHILFE AMPHIBIENNACHWEIS MITTELS eDNA



STAND: DEZEMBER 2018

Inhalt

1. Akkreditierte Büros 2019	2
2. Kontaktadressen	2
3. Einleitung	3
4. Wie weise ich eine Art in einem Gewässer nach?	3
5. Was ist ein sicherer Artnachweis?.....	4
6. Grenzen der Methode	4
7. Beispiel-Datensatz für die eDNA Analyse	6

Zitiervorschlag: Microsynth et al. (Stand: Dezember 2018). Interpretationshilfe Amphibien-nachweis mittels eDNA.

1. Akkreditierte Büros 2019

ARNAL, Büro für Natur und Landschaft AG	Herisau, Salzburg
IC Infraconsult AG	Bern
Info fauna / karch	Neuchâtel
Kaden & Partner AG	Frauenfeld
Naturschutz und Feldherpetologie Peyer	Ottenbach
Quadra GmbH	Zürich
UMG Umweltbüro Grabher	Bregenz (A)

2. Kontaktadressen

Allgemeine Informationen:

ARNAL, Büro für Natur und Landschaft AG
Kasernenstrasse 37
9100 Herisau
assistentz@arnal.ch (Betreff: eDNA)
071 366 00 50

Informationen zu Laborarbeiten:

Ecogenics GmbH
Christoph Grünig | eDNA
Schützenstrasse 15
9436 Balgach
info@ecogenics.ch

3. Einleitung

eDNA hat in den letzten Jahren stark an Popularität gewonnen, ist aber dennoch für die Praxis nach wie vor eine neue Methode. Erst wenige Nutzer und Nutzerinnen haben bereits Erfahrung mit der Methode gemacht. Daher beschreiben wir in dieser Interpretationshilfe, wie die Daten aus dem Labor interpretiert werden sollen.

Diese Interpretationshilfe beschränkt sich auf die Interpretation der eDNA-Resultate. Die naturschutzfachliche Interpretation – also: was ist die naturschutzbiologische Interpretation der Ergebnisse? – hängt von der ursprünglichen Fragestellung und der Datenerhebung ab.

- Beispiel 1: Wenn man Wasserproben mehrerer Gewässer aus einem Amphibienlaichgebiet gemischt hat, so hat man eine Aussage für das Amphibienlaichgebiet als Ganzes. Hat man jedoch Proben für einzelne Gewässer im Amphibienlaichgebiet gesammelt, so kann man über jedes dieser Gewässer eine Aussage machen.
- Beispiel 2: Wenn man die Proben im März sammelt, sind gewisse „späte“ Arten wie die Gelbbauchunke oder der Laubfrosch noch nicht aktiv und deshalb wird man sie bei einer Bestandserfassung (unabhängig von der Methode) nicht erfassen können. Das Resultat „nicht nachgewiesen“ muss dann richtig interpretiert werden. Das kann nur die Person, welche die Analyse in Auftrag gegeben hat.

Für eine vertiefte Einführung in die eDNA-Methodik verweisen wir die Leserin und den Leser auf diese beiden deutschsprachigen Artikel:

- Schmidt, B.R., Grünig, C.R. 2017. Einsatz von eDNA im Amphibien-Monitoring. - WSL-Berichte (Forum des Wissens) 60: 57-62.
- Schmidt, B.R., Ursenbacher, S. 2015. Umwelt-DNA als neue Methode zum Artnachweis in Gewässern. - Zeitschrift für Feldherpetologie 22: 1-10.

Eine allgemeine Einführung in die Theorie des Artnachweises findet sich in dieser Arbeit:

- Kéry, M. 2008. Grundlagen der Bestandserfassung am Beispiel von Vorkommen und Verbreitung. – Der Ornithologische Beobachter 105: 353-386.

4. Wie weise ich eine Art in einem Gewässer nach?

Wenn man eine Art mit eDNA in einem Gewässer nachweisen will, so werden in der Regel mehrere, zu verschiedenen Zeiten gesammelte Wasserproben ins Labor geschickt. Dies ist analog zur klassischen Kartierungsarbeit, wo zumeist ein Amphibienlaichgebiet ebenfalls mehrfach besucht wird. Bei herkömmlicher Kartierungsarbeit und eDNA gilt dieselbe Regel, die jedem Naturfreund gut bekannt ist: Man findet Arten nicht immer. Das ist normal und keine Besonderheit von eDNA. Dies kann aber zur Folge haben, dass eine Art in keiner, einer, zwei oder drei Wasserproben nachgewiesen wird. Wir schlagen hier die „gefunden ist gefunden“-Regel vor: Wenn die Art in einer Wasserprobe nachgewiesen wurde, so gilt sie als sicher nachgewiesen.

5. Was ist ein sicherer Artnachweis?

Im Rahmen der Laboranalyse wird die Menge der DNA einer Art, die sich in der Wasserprobe befindet, quantifiziert. Im Fachjargon nennt sich das die Anzahl „reads“. Diese Anzahl kann stark unterschiedlich sein. Gründe dafür sind primär in der Qualität der Wasserprobe zu suchen (Menge eDNA, Gewässertyp, Lagerung nach Probennahme etc.). Wir haben deshalb eine Formel (Algorithmus) entwickelt, welche die Anzahl „reads“ in eine von drei Kategorien einteilt (siehe Praxisbeispiel in Kapitel 7): 0 = kein Nachweis, 1 = unsicherer Nachweis und 2 = sicherer Nachweis. Alle Nachweise der Kategorie „2“ gelten als sichere Nachweise. Dies auch dann, wenn eine Art nur in einer von drei Wasserproben sicher nachgewiesen wurde. Wenn es für eine Art sowohl sichere als auch unsichere Nachweise gilt, dann gilt der Artnachweis als sicher.

Wenn eine Art nur mit „1“ nachgewiesen wurde, dann ist der Nachweis unsicher und die Feldarbeit sollte wiederholt werden (entweder mit eDNA oder herkömmlichen Methoden). Ob dies notwendig ist, hängt von der Fragestellung ab. Beispiel 1: Wenn der Artnachweis für ein Artenförderungsprojekt erfolgt, dann kann man den Entscheid treffen, die Art nur dort zu fördern, wo sie sicher nachgewiesen wurde. Beispiel 2: Der Artnachweis erfolgt für eine Umweltverträglichkeitsprüfung. Es muss entschieden werden (z.B. wegen Ersatzmassnahmen nach NHG), ob eine Art vorkommt oder nicht. In diesem Fall muss der Artnachweis sicher sein.

6. Grenzen der Methode

Jede Methode des Artnachweises hat ihre Grenzen. Dies gilt auch für eDNA.

- Es ist möglich, dass eine Art trotz mehrerer Wasserproben nicht gefunden wird. Wenn das Ergebnis drei Mal „0“ ist, so bedeutet dies nicht zwingend, dass die Art nicht im Amphibienlaichgebiet vorkommt. Drei Mal „0“ bedeutet, dass die Art nicht gefunden wurde (dies gilt nicht nur für eDNA, sondern für jede Methode der Arterfassung). Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Art nicht gefunden wird, kann man aus den Ergebnissen grob abschätzen. Nehmen wir an, dass eine Art im Datensatz in 2 von 3 Wasserproben gefunden wurde. Was ist die Wahrscheinlichkeit, dass die Art in drei Wasserproben nicht gefunden wird? Wenn die drei Proben zum gleichen Zeitpunkt am gleichen Ort gesammelt wurden, dann kommt die Art vor oder sie kommt nicht vor. Daraus lässt sich ableiten, dass die Chance, eine Art in einer Wasserprobe nicht zu finden, $1/3$ ist. Die Chance nach drei Besuchen (bzw. Proben) ist $(1 - (1/3))^3 = 0.29$ (für eine Herleitung siehe die Arbeit von Kéry 2008). Man kann dann davon ausgehen, dass die Art in 29% der Gewässer, in denen sie vorkommt, nicht gefunden wurde.
- Die eDNA-Mengen im Wasser sinken schnell, wenn eine Art das Gewässer verlässt. eDNA bleibt im Wasser etwa zwei Wochen lang nachweisbar. Eine Art kann also nur dann im Gewässer nachgewiesen werden, wenn sie darin aktuell präsent ist oder dies gerade noch war. Umgekehrt ist es so, dass sich die eDNA-Konzentration rasch aufbaut, wenn eine Art ins Gewässer kommt. Dies bedeutet einerseits, dass ein

Nachweis zeigt, dass eine Art zum Zeitpunkt der Probennahme im Gewässer vorkommt. Andererseits verlangt diese Beobachtung, dass Wasserproben zwingend während der Aktivitätsperiode der Arten gesammelt werden. Wenn man Wasserproben im Juni sammelt, dann sind Grasfrösche vielleicht nicht mehr nachweisbar. Proben, die anfangs April gesammelt werden, vermögen beispielsweise kaum Unken oder Laubfrösche nachzuweisen.

- eDNA weist Arten im Gewässer nach. Dies bedeutet, dass Arten, die nur wenig im Wasser sind, schlecht nachweisbar sind. Ein Beispiel ist der Laubfrosch. Die Adulttiere sind nur zum Rufen und zur Paarung im Gewässer. Deshalb dürften die eDNA-Konzentrationen gering sein. Der Laubfrosch, aber beispielsweise auch die Kreuzkröte, werden mit eDNA besser nachweisbar, sobald Kaulquappen im Gewässer sind.
- Die Nachweisbarkeit einer Art dürfte auch im Fall von eDNA von der Populationsgrösse abhängen; dazu gibt es aber noch kaum wissenschaftliche Studien. Dies bedeutet, dass kleine Populationen schlechter nachgewiesen werden als grosse.
- Ein Amphibium gibt DNA ins Wasser ab und diese breitet sich dann als eDNA im Gewässer aus. Dieser Diffusionsprozess ist noch nicht untersucht. In den meisten Gewässertypen sollte dies keine Rolle spielen. Bei Wasserstellen in Flachmooren oder Gewässern mit ausgedehnten seichten Flachwasserzonen kann es sein, dass eDNA sich nur langsam ausbreitet und in diesen Bereichen schlecht nachweisbar ist. Dies sollte bei der Probennahme im Feld berücksichtigt werden, d.h. die Proben sollten dort genommen werden, wo man Adulttiere erwarten kann.

7. Beispiel-Datensatz für die eDNA Analyse

Im Folgenden wird anhand eines Beispiel-Datensatzes erläutert, wie die Resultate von eDNA Analysen an die Auftraggeber zugesellt werden.

Tabelle 1: Beispiel der Resultate einer eDNA Analyse zum Amphibiennachweis. Für die Umschreibung der mit 1-5 annotierten Bereiche siehe Text.

1

Ordnung	Art	Probe_01	Probe_02	Probe_03	Probe_04	Probe_05	Probe_06	Probe_07
		110301	110302	110303	110304	110305	110306	110307
Anura	Alytes_obstetricans	0	0	0	0	0	0	0
Anura	Bombina_bombina	0	0	0	0	0	0	0
Anura	Bombina_variegata	0	0	0	0	0	0	0
Anura	Bufo_bufo	0	0	2	2	2	0	0
Anura	Epidalea_calamita	0	0	0	0	0	0	0
Anura	Hyla_arborea	0	0	0	0	0	0	0
Anura	Hyla_intermedia	0	0	0	0	0	0	0
Anura	Pelophylax_bedrigae	0	0	0	0	0	0	0
Anura	Pelophylax_bergeri	0	0	0	3	0	0	2
Anura	Pelophylax_esculentus_lessonae	0	0	0	0	0	0	1
Anura	Pelophylax_kurtmuelleri_ridibundus_complex	2	0	0	0	0	0	0
Anura	Rana_dalmatina	2	2	2	0	0	0	1
Anura	Rana_latastei	0	0	0	0	0	0	0
Anura	Rana_temporaria	2	2	2	2	2	2	1
Caudata	Ichthyosaura_alpestris	0	0	1	2	1	0	0
Caudata	Lissotriton_helveticus	0	0	0	0	0	0	0
Caudata	Lissotriton_vulgaris	0	0	0	0	0	0	0
Caudata	Salamandra_salamandra	0	0	0	0	0	0	0
Caudata	Triturus_carnifex	0	0	0	0	0	0	0
Caudata	Triturus_cristatus	0	0	0	0	0	0	0

2

3

4

Amphibien-DNA-Gehalt	hoch	hoch	hoch	mittel	tief	mittel	tief
-----------------------------	------	------	------	--------	------	--------	------

Weitere detektierte Arten

5

Anseriformes	Anas_platyrhynchos	0	2	0	0	0	0	0
Galliformes	Gallus_gallus	1	2	0	0	2	2	1
Passeriformes	Turdus_merula	2	0	0	0	0	0	0
Primates	Homo_sapiens	0	0	0	0	1	2	0
Salmoniformes	Salmo_salar	0	0	2	1	2	2	0

1

Jede eDNA-Probe entspricht einer Spalte in der Tabelle. Die Probenbezeichnung erfolgt mittels der Barcodenummer sowie, wenn im Sample Submission Form angegeben, mit dem dazugehörigen Probennamen.

2

In einem ersten Block werden alle Amphibien-Arten, welche mittels des Barcoding-Verfahrens detektiert werden können, gelistet. Im Falle, dass gewisse Arten nicht eindeutig bestimmt werden können, werden alle Arten in diesem Komplex zusammengefasst (z.B. *Pelophylax esculentus* und *Pelophylax lessonae*). Der Unterschied in der DNA-Sequenz zwischen *Pelophylax bergeri* und dem *Pelophylax esculentus lessonae* Komplex ist besonders klein. Aus diesem Grund müssen diese beiden taxonomischen Einheiten besonders vorsichtig interpretiert werden. Im Gegensatz dazu sind die anderen *Pelophylax*-Arten resp. -Artengruppen klar unterscheidbar. Wenn kein Nachweis einer Art vorliegt, wird dies mit einer 0 ausgewiesen.

3

Der Nachweis einer Art wird abgestuft wiedergegeben. Dabei sind alle Nachweise, welche mit einer 2 ausgewiesen werden, sicher. Dagegen sind Nachweise, welche mit einer 1 ausgewiesen werden, nahe der Detektionslimite und müssten, falls der entsprechende Artnachweis wichtig für die Fragestellung des Auftraggebers ist, verifiziert werden.

4

Die Menge an Amphibien-DNA in einer Wasserprobe kann den Nachweis der Amphibien beeinflussen. Bei sehr geringen Amphibien-DNA Konzentrationen wird erwartet, dass zunehmend Zufallsprozesse beim Nachweis involviert sind. Diese Klassifizierung basiert einerseits auf der Anzahl Reads, welche für eine spezifische Probe generiert wurde, und andererseits auf dem Nachweis einer künstlichen DNA (IPC) mit einer bekannten und sehr tiefen Anzahl an Molekülen, welche jeder Probe beigemischt wird. Proben mit tiefen Amphibien-DNA Konzentrationen müssen vorsichtig interpretiert werden.

5

Neben den Amphibien-Arten werden auch weitere Arten ausgewiesen, welche ermittelt wurden. Die taxonomische Zuordnung ist dabei, im Vergleich zu den Amphibien, wenig präzise und die Daten sollten nur als Hinweis auf das Vorkommen einer Art oder Gattung interpretiert werden. So ist zum Beispiel nicht zu erwarten, dass der Lachs (*Salmo salar*) in Laichgewässern von Amphibien vorkommt. Allerdings könnte eDNA von nahe verwandten Fischarten (z.B. Forellen) vorliegen.