

# INTERPRETATIONSHILFE AMPHIBIENNACHWEIS MITTELS eDNA



**STAND: APRIL 2024**

# Inhalt

Akkreditierte Büros 2024.....	2
Kontaktadressen.....	2
1. Einleitung.....	3
2. Artnachweis im Gewässer.....	4
3. Was ist ein sicherer Artnachweis?.....	4
5. eDNA-Analyse: Beispiel-Datensatz.....	7

**Zitiervorschlag:** Microsynth et al. (Stand: April 2024). Interpretationshilfe Amphibiennachweis mittels eDNA.

## Akkreditierte Büros 2024

ARNAL, Büro für Natur und Landschaft AG  
Info fauna karch  
Naturschutz und Feldherpetologie Peyer

Herisau, Salzburg  
Neuchâtel  
Ottenbach

## Kontaktadressen

Allgemeine Informationen:	Informationen zu Laborarbeiten:
ARNAL, Büro für Natur und Landschaft AG Kasernenstrasse 37 9100 Herisau assistenz@arnal.ch (Betreff: eDNA) 071 366 00 50	Ecogenics GmbH / Microsynth AG Schützenstrasse 15 9436 Balgach myproject@microsynth.ch

# 1. Einleitung

eDNA hat in den letzten Jahren stark an Popularität gewonnen, ist aber dennoch in der praktischen Anwendung nach wie vor eine neue Methode. Die Planung von eDNA-Erhebungen sowie das Vorgehen im Feld wird im Dokument «Methodik eDNA Amphibien – Feldprobenahme» (ARNAL et al., April 2024) beschrieben. Als Ergänzung dazu wird mit vorliegender Interpretationshilfe der Umgang mit den Laborresultaten erläutert. Nicht eingegangen wird auf die naturschutzfachliche Interpretation.

Für eine vertiefte Einführung in die Naturschutzgenetik und das Thema eDNA eignet sich folgende Literatur:

- Holderegger, R., Schmidt, B.R., Grünig, C., Meier, R., Csencsics, D., Gassner, M., Rellstab, C., & Stapfer, A. (2020) Ready-to-use workflows for the implementation of genetic tools in conservation management. *Conservation Genet Resour* **12**, 691–700.
- Holderegger, R., Stapfer, A., Schmidt, B., Grünig, C., Meier, R., Csencsics, D., Gassner, M. (2019) Werkzeugkasten Naturschutzgenetik: eDNA Amphibien und Verbund. WSL Ber. 81. 56 S.
- 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.

## 2. Artnachweis im Gewässer

Für den Nachweis einer Art oder mehrerer Arten in einem Gewässer mittels eDNA werden eine bis mehrere Wasserproben gesammelt und im Labor analysiert. Als Standard gelten 3 Laborproben, welche analysiert werden. Der Nachweis (oder Nichtnachweis) erfolgt für jede Wasserprobe. Dies kann zur Folge haben, dass eine Art in keiner, einer, zwei oder drei Laborproben nachgewiesen wird. Für einen Artnachweis (sicher oder unsicher) reicht das Vorkommen von DNA in einer Wasserprobe.

## 3. Was ist ein sicherer Artnachweis?

Im Zuge der Laboranalyse wird die Menge der DNA einer Art, die sich in der Wasserprobe befindet, quantifiziert. Dies ergibt eine bestimmte Anzahl «reads», also eine bestimmte Anzahl des gesuchten DNA-Abschnittes einer Art (z.B. 500 reads für die Art «Grasfrosch»). Die Anzahl reads kann von Probe zu Probe stark variieren. Gründe dafür sind primär in der Qualität der Wasserprobe zu suchen (Menge eDNA, Gewässertyp, Lagerung nach Probennahme etc.).

Um die Nachweise kategorisieren zu können, wurde eine Formel (Algorithmus) entwickelt, welche die Anzahl „reads“ einer Probe in eine von drei Kategorien einteilt (vgl. Praxisbeispiel in Kapitel 5):

- 0 = kein Nachweis
- 1 = unsicherer Nachweis
- 2 = wahrscheinlicher Nachweis.

Die Sicherheit der Nachweise wird über alle drei Teilproben analysiert, um eine «falsch positive» Probe relativieren zu können. Die Wahrscheinlichkeit eines Nachweises wird tabellarisch zusammengefasst (vgl. Tabelle 1):

**Tabelle 1: Bewertungstabelle über die drei Teilproben. Rot markierte Bewertungen gelten als keine oder sehr unsichere Nachweise; Gelb markierte Bewertungen gelten als unsichere, aber mögliche Nachweise; Grün markierte Bewertungen gelten als sichere Nachweise.**

Anzahl Teilproben mit Kategorie 1-Nachweisen	Anzahl Teilproben mit Kategorie 2-Nachweisen	Bewertung
0	0	Kein Nachweis
1	0	Kein Nachweis
0	1	Unwahrscheinlicher Nachweis
2	0	Unsicherer Nachweis
1	1	Unsicherer Nachweis
0	2	Sicherer Nachweis
3	0	Sicherer Nachweis
2	1	Sicherer Nachweis
1	2	Sicherer Nachweis
0	3	Sicherer Nachweis

Alle Bewertungen über 3 Teilproben, welche in der Tabelle grün markiert sind, gelten als sichere Nachweise. Dies gilt beispielsweise auch, wenn in allen 3 Teilproben nur unsichere Nachweise gemacht wurden.

Gelb markierte Bewertungen über 3 Teilproben gelten als unsicher und müssen fachgutachterlich genau interpretiert werden. Abhängig von der Fragestellung ist zu prüfen, ob ergänzende Erhebungen nötig sind (eDNA oder klassische Felderhebungen), um den unsicheren Nachweis zu bestätigen oder zu widerlegen.

## 4. 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 aus drei Laborproben 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 aus den Ergebnissen grob abgeschätzt werden. Dazu folgendes Rechenbeispiel: Unter der Annahme, dass eine Art in 2 von 3 Laborproben gefunden wurde, wird die Wahrscheinlichkeit für einen Nichtnachweis wie folgt berechnet: 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). Es kann davon ausgegangen werden, dass die Art in 29% der Gewässer, in denen sie vorkommt, nicht gefunden wurde.
- DNA im Wasser wird schnell abgebaut, 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 kurz vorher 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 Anfang 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, allenfalls schlechter nachweisbar sind. Ein Beispiel ist die Geburtshelferkröte, welche überwiegend Landlebensräume nutzt, sich auch an Land paart und erst die reifen Eier ins Wasser abgibt. Deshalb dürften die DNA-Konzentrationen bis zum Schlüpfen der Larven gering bzw. gar nicht vorhanden sein. Die Geburtshelferkröte, aber beispielsweise auch der Laubfrosch, 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. Es ist davon auszugehen, dass kleine Populationen schlechter nachgewiesen werden als grosse.
- Amphibien geben DNA ins Wasser ab, welche sich dann im Gewässer ausbreitet. 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 gewissen Bereichen schlecht nachweisbar ist. Dies sollte bei der Probennahme im Feld berücksichtigt werden, d.h. die Proben sollten dort genommen werden, wo man Adulttiere oder Larven erwarten kann.

## 5. eDNA-Analyse: Beispiel-Datensatz

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

**Tabelle 2: Beispiel der Resultate einer eDNA-Analyse zum Amphibiennachweis. Für die Umschreibung der mit 1-5 annotierten Bereiche siehe Text.**

		1						
		Probe_01	Probe_02	Probe_03	Probe_04	Probe_05	Probe_06	Probe_07
<b>Ordnung</b>	<b>Art</b>	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	3	0	0	0
Anura	Pelophylax_bergeri	0	0	0	0	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
<b>4 Amphibien-DNA-Gehalt</b>		hoch	hoch	hoch	mittel	tief	mittel	tief
<b>5 Weitere detektierte Arten</b>								
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 Probenamen.

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.

3

Der Nachweis einer Art wird abgestuft wiedergegeben. Dabei sind alle Nachweise, welche mit einer 2 ausgewiesen werden, wahrscheinlich. Dagegen sind Nachweise, welche mit einer 1 ausgewiesen werden, nahe der Detektionslimite und gelten als unsicher. Nachweise, welche mit einer 0 ausgewiesen sind, gelten als kein Artnachweis. Für eine Interpretation des Artnachweises müssen alle 3 Teilproben analysiert werden.

Falls der entsprechende Artnachweis mit dem Bewertungsraster als «unsicherer Nachweis» bewertet wurde und wichtig für die Fragestellung des Auftraggebers ist, sollte er 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 vorsichtiger 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 nah verwandten Fischarten (z.B. Forellen) vorliegen.