

METHODIK VERBUND

PROBENAHMEDESIGN, ANALYSEN UND RESULTATINTERPRETATION



STAND: MAI 2021



KASERNENSTRASSE 37, CH-9100 HERISAU
TEL. +41 (0)71 366 00 50, FAX +41 (0)71 366 00 51
SANDOR VEGH STRASSE 9, A-5020 SALZBURG
TEL. +43 (0)662 823 440, FAX +43 (0)662 823 690

www.arnal.ch | www.arnal.at

Inhalt

1. Einleitung	3
2. Zusammenarbeitskette «Verbund»	4
3. Mögliche Fragestellungen	5
4. Probenahmedesign	6
5. Sammelbewilligungen	7
6. Probenahmemethodik	8
7. Mögliche zu untersuchende Arten	12
8. Laboranalysen, statistische Auswertung und Resultataufbereitung	16
9. Praxisbeispiel.....	17
10. Glossar.....	22
11. Kosten	23
12. Bestellung.....	24

Zitiervorschlag: ARNAL et al. (Stand: Mai 2021). Methodik Verbund – Probenahmedesign, Analysen und Resultatinterpretation.

Akkreditierte Büros 2021

ARNAL, Büro für Natur und Landschaft AG	Herisau, Salzburg
IC Infraconsult AG	Bern
Info fauna / karch	Neuchâtel
Naturschutz und Feldherpetologie Peyer	Ottenbach
Quadra GmbH	Zürich
ProNatura Thurgau	Bischofszell
UMG Umweltbüro Grabher	Dornbirn

Kontaktadressen

Allg. Informationen:	Einsendung Proben für Laboranalysen:
ARNAL, Büro für Natur und Landschaft AG Kasernenstrasse 37 9100 Herisau assistenz@arnal.ch (Betreff: Verbund) 071 366 00 50	ecogenics GmbH Jeannette Kast Verbund Schützenstrasse 15 9436 Balgach info@ecogenics.ch

1. Einleitung

Zerschnittene Lebensräume und ihre Populationen miteinander zu vernetzen und in einen Verbund (vgl. Abbildung 1) zu integrieren ist ein wichtiges Naturschutzziel (ökologische Infrastruktur). Allerdings ist es notorisch schwierig festzustellen, ob Populationen miteinander in Verbindung stehen und sich Individuen, und damit auch Gene, austauschen. Meist werden im Naturschutz strukturelle Massnahmen geplant, also Vernetzungselemente (z.B. Trittsteinhabitats, Hecken, Biodiversitätsförderflächen). Die Frage, ob diese tatsächlich auch zu funktioneller Vernetzung führen, bleibt aber oft unbeantwortet, da entsprechende Untersuchungen aufwendig sind. Zur Klärung der Frage, ob Populationen miteinander vernetzt und dadurch in einen Verbund integriert sind, liefert die Naturschutzgenetik einen wesentlichen Beitrag. Zurzeit ist dies die einzige Methode, die allgemein und für (fast) alle Organismengruppen mit vertretbarem Aufwand anwendbar ist, um Vernetzung oder Isolation festzustellen (auch auf Landschaftsebene).



Abbildung 1: Vernetzungsmassnahmen im Wildtierkorridor Suret (Kanton AG; Fotos Martin C. Fischer).

Ziel des Produktes Verbund ist es deshalb, für die Naturschutzpraxis (Behörden, Planungsbüros, NGOs etc.) eine einfache Anleitung für den standardmässigen Einsatz von genetischen Methoden zur Beurteilung bestehender Vernetzungen oder Zerschneidungen bzw. von bereits getroffenen Vernetzungsmassnahmen anzubieten. Weiterführende Infos zum KTI-Projekt sind auf www.naturschutzgenetik.ch und www.naturschutzgenetik.at verfügbar.

2. Zusammenarbeitskette «Verbund»

In vorliegender Methodenanleitung werden die Arbeitsschritte, die benötigten Materialien, die Handhabung bei der Probenahme, sowie die Analysemöglichkeiten aufgezeigt. Abbildung 2 zeigt schematisch den Ablauf und die beteiligten Projektpartner in der Zusammenarbeitskette Verbund.

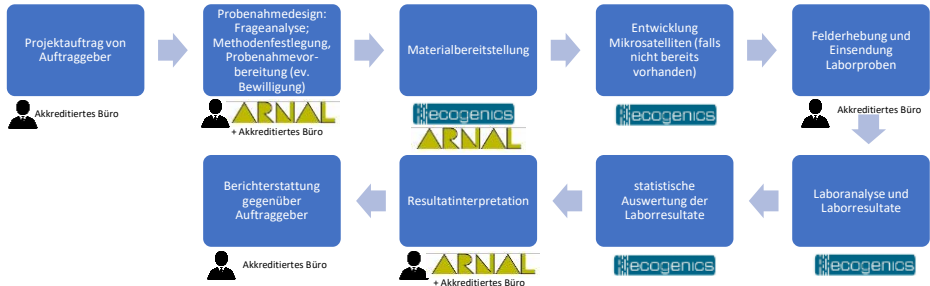


Abbildung 2: Zusammenarbeitskette Verbund.

Nach dem Entgegennehmen eines Projektauftrags durch ein akkreditiertes Büro muss das Probenahmedesign für die entsprechende Fragestellung ausgearbeitet werden (vgl. Kapitel 3 & 4). Das Probenahmedesign beinhaltet die Prinzipien, die es bei der Auswahl der zu untersuchen und zu beprobenden Populationen zu beachten gilt, sowie von wie vielen Individuen genetische Proben genommen werden müssen. Eine Liste von sinnvollen Zielarten aus verschiedenen Organismengruppen und für verschiedene relevante Lebensräume, die sich für die Untersuchung von Verbund eignen, liegt in Kapitel 7 vor. Die ARNAL, Büro für Natur und Landschaft AG, bietet den akkreditierten Büros Hilfestellung bei der Erarbeitung des Probenahmedesigns.

Die Entwicklung der Mikrosatelliten, die Analyse, sowie die statistische Auswertung der Laborresultate (vgl. Kapitel 8) werden von der ecogenics GmbH übernommen.

Die Resultatinterpretation für das Projekt wird durch das akkreditierte Büro in Zusammenarbeit mit der ARNAL AG durchgeführt (Kapitel 8). Dabei werden die statistischen Auswertungen in Zusammenhang mit den realen Umweltbedingungen und der geografischen Lage gebracht. Ein Praxisbeispiel zeigt die Interpretation an einem realen Projekt auf (vgl. Kapitel 9).

Berichterstattung und Kommunikation gegenüber dem Auftraggeber werden während des gesamten Prozesses vom akkreditierten Büro übernommen.

3. Mögliche Fragestellungen

Mit der Zusammenbaukette Verbund können wichtige, häufig gestellte Fragen in der Umsetzung von Vernetzungsmassnahmen beantwortet werden. Diese können folgendermassen lauten:

- Sind die Populationen einer für den Naturschutz wichtigen Art vernetzt (**Artenschutz**)?
- Sind die Populationen einer typischen Art eines im Fokus des Naturschutzes stehenden Lebensraumes (z.B. Trockenstandorte, Siedlungsflächen etc.) verbunden (**Lebensraumverbund**)?
- Sind räumlich getrennte Populationen isoliert oder in einen Verbund integriert (**Metapopulation**)?
- Welche Populationen sind Quell-, welche Empfängerpopulationen (**Bedeutung von Populationen im Verbund**)?
- Welche Landschaftselemente fördern oder hindern den Austausch von Individuen zwischen Populationen (**ökologische Infrastruktur**)?
- Ist die Anlage zusätzlicher Vernetzungselemente angezeigt (**Vernetzungsprojekte**)?
- Führen neu geschaffene Vernetzungs- bzw. Verbundelemente, wie Trittsteine, zu einem Verbund von Populationen einer für den Naturschutz wichtigen Art (**Erfolgskontrolle**)?

4. Probenahmedesign

Für jede zu untersuchende Art in einer bestimmten Landschaft muss das Probenahmedesign gezielt festgelegt werden. Es gibt hierfür kein allgemein gültiges Probenahmedesign, aber es gibt allgemein anwendbare Prinzipien, um zu bestimmen, wie viele Populationen an welchen Orten für genetische Analysen untersucht werden sollen.

Eine **Population** umfasst alle Individuen einer Art in einem räumlich klar umrissenen Lebensraum (also alle Individuen einer Art an einem Ort). So zum Beispiel alle Kammmolche in einem Teich oder in einer Gruppe von nebeneinanderliegenden Teichen, oder alle Pyramidenorchideen einer Trockenwiese.

Zur Festlegung, welche Populationen einer Art in einer Landschaft untersucht werden sollen, sind Kenntnisse zu deren Verbreitung und Vorkommen im Untersuchungsgebiet nötig. Die folgenden Punkte sind dabei zu beachten:

- Richtige räumliche Skala (abhängig von der Lebensweise der zu untersuchenden Art)
- Einbezug von Barrieren oder Vernetzungselementen
- Vergleichspopulationen
- Geografische Distanz
- Anzahl zu untersuchender Populationen

Abbildung 3 zeigt Beispiele möglicher Probenahmedesigns. Die ARNAL AG bietet Hilfestellung bei der Erarbeitung des Probenahmedesigns an.

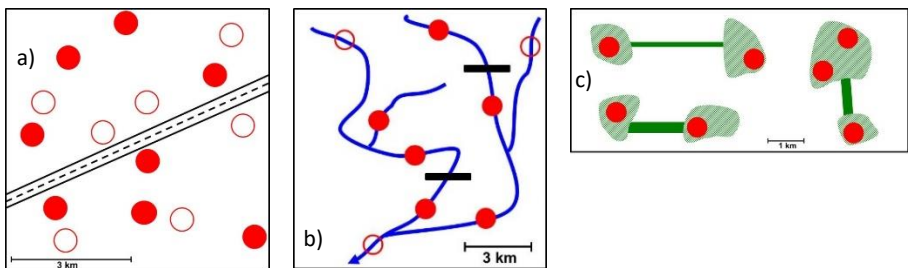


Abbildung 3: Beispiele für mögliche Probenahmedesigns: a) Einbezug eines zerschneidenden Landschaftselements ins Probenahmedesign. b) Einbezug eines zerschneidenden Landschaftselements in einem Fließgewässersystem. c) Einbezug von Vernetzungskorridoren ins Probenahmedesign (rote Punkte: beprobte Populationen; weiße Punkte: nicht beprobte Populationen).

Wie viele Individuen pro Population werden beprobt?

Für den Naturschutz ist es wichtig, möglichst wenige Individuen pro Population zu beproben, da es sich oft um seltene oder gefährdete Arten handelt, welche durch die genetische Beprobung möglicherweise beeinträchtigt oder sogar getötet werden. Simulationen mit realen genetischen Datensätzen verschiedener Arten zeigten, dass die Anzahl der verwendeten Mikrosatelliten in den Laboranalysen entscheidender ist als die Anzahl der untersuchten Individuen pro Population. Bei 15 Mikrosatelliten sind die Ergebnisse bei etwa 15 untersuchten Individuen pro Population bereits stabil. **Pro Population sollen also rund 15 Individuen beprobt werden.** Ist die Anzahl zu beprobender Individuen nicht eingeschränkt, sind 20 Individuen pro Population besser. In Fällen, wo möglichst wenige Individuen beprobt werden sollen, reichen 12 Individuen pro Population knapp aus.

Die Anzahl beprobter Individuen sollte in allen Populationen gleich gross sein; dies sowohl in grossen wie auch in kleinen Populationen. Die Individuen werden, soweit möglich, verstreut über die von einer Population eingenommene Fläche beprobt (vgl. Abbildung 4). So wird insbesondere bei sich vegetativ vermehrenden Arten (z.B. Pflanzen mit Ausläufern), die Möglichkeit minimiert, dass mehrmals das gleiche Individuum beprobt wird.

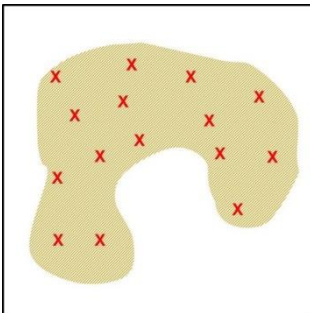


Abbildung 4: Die beprobten Individuen (rote Kreuze) werden möglichst verstreut über die von einer Population eingenommene Fläche (braun schraffiert) gesammelt.

5. Sammelbewilligungen

Bevor die Sammel-Kampagne durchgeführt wird, müssen die nötigen Sammelbewilligungen und tierschutzrechtlichen Bewilligungen durch das akkreditierte Büro eingeholt werden. Wichtig dabei ist auch die 2018 publizierte Vollzugshilfe «Fang, Markierung und Beprobung von freilebenden Wildtieren» des BAFU¹.

¹ Gerner T. (2018). Fang, Markierung und Beprobung von freilebenden Wildtieren. Vollzugshilfe zur Überwachung der Bestände und bei Erfolgskontrollen. Bundesamt für Umwelt, Bern. Umwelt-Vollzug Nr. 1829. 52 S.

6. Probenahmemethodik

Im Folgenden wird die Probenahmemethodik für verschiedene Organismengruppen kurz beschrieben. Die genauen Anweisungen können je nach Art variieren und sind vor dem Durchführen der Feldarbeit zu verifizieren. Die Festlegung der Samplingmethode ist ein zentrales Element für eine erfolgreiche Untersuchung und birgt ein grosses Fehlerpotential. Die ARNAL AG bietet mit den Erfahrungen aus dem KTI-Projekt entsprechenden Support.

Pflanzen

- Sammeln von frischen bzw. möglichst frisch entfalteten Blättern. Es werden mindestens 100 mg Frischgewicht pro Individuum benötigt (mindestens Grösse eines Daumennagels; vgl. Abbildung 5).
- Material jedes Individuums einzeln in Papierbeutelchen geben. Aufbewahrung pro Population in beschriftetem Zip-Beutel mit Silica-Gel.
- Lagerung bei Raumtemperatur im Dunkeln.
- Je nach Pflanzenart kann in Absprache mit der ecogenics GmbH auch anderes Material verwendet werden (z.B. Bohrkern bei Bäumen, falls das Sammeln von Blättern zu aufwändig ist).

Insekten, Spinnen und Krebse (Arthropoden)

Grosse Tiere:

- Je nach Grösse der Tiere genügt für die DNA-Gewinnung ein Bein (inkl. Oberschenkel), z.B. bei Tagfaltern oder Heuschrecken. Bei grösseren Tieren kann ein Teil eines Beines ausreichend sein.
- Bein sorgfältig mit einer Pinzette abtrennen und in kleines Tube geben (mit oder ohne Alkohol; vgl. Abbildung 6).

Kleine Tiere:

- Kleine und sehr kleine Insekten müssen getötet werden, um genügend DNA zu erhalten.
- Einlegen des gesamten Tieres in Tube mit Alkohol.

Larven, Raupen oder Eier:

- Sammeln von Larven, Raupen oder Eiern (es ist u. U. einfacher, diese Lebensstadien zu sammeln)
- Einlegen des gesamten Tieres in Tube mit Alkohol.

Exuvien

- Manchmal ist es nicht möglich, Material von lebenden Tieren zu sammeln. Als Alternative können z.B. bei Libellen frische Exuvien gesammelt werden (nicht-invasives Sammeln).
- Einlegen der Exuvie in Tube mit Alkohol.
- Laboranalysen für solche nicht-invasiven Proben sind aufwendiger und daher teurer und sollten nur in Ausnahmefällen angewendet werden (etwa bei sehr seltenen und stark gefährdeten Arten). In jedem Falle ist es sinnvoll, bei einer nicht-invasiven Probenentnahme Rücksprache mit der ecogenics GmbH zu halten.

Weichtiere (Mollusken)

- Mollusken müssen getötet werden, da Schleimabstriche auch bei grossen Mollusken nicht genügend DNA enthalten.
- Die Tiere werden als Ganzes (mitsamt allfälliger Schale) in Tubes entsprechender Grösse in Alkohol eingelegt und möglichst rasch tiefgekühlt. Anschliessend werden sie tiefgefroren ans Labor versandt bzw. eingereicht.

Amphibien

- Die nötige Anzahl Individuen soll zuerst gesammelt und in einen Eimer gegeben werden. Erst danach wird mit der Beprobung begonnen. So wird sichergestellt, dass keine Individuen doppelt beprobt werden.
- Mundschleimhautabstriche werden mit Wattestäbchen in speziellen Tubes entnommen. Dabei wird mit einem Wattestäbchen die Mundschleimhaut eines Tieres einige Male abgefahren (vgl. Abbildung 7). Zum Öffnen von kleinen Mäulern (z.B. bei Molchen) haben sich Gitarren-Plektrien (erhältlich im Instrumentenhandel) bewährt.
- Die Wattestäbchen müssen direkt nach der Probenahme gekühlt werden.
- Alternativ können auch junge Amphibienlarven gesammelt werden. Die Larven müssen sicher bestimmt und anschliessend tierschutzkonform getötet werden. Die Proben werden in Tubes mit Alkohol eingelegt.

Reptilien

- Bei Reptilien wird standardmässig ein Mundschleimhautabstrich mit Wattestäbchen in speziellen Tubes, wie oben für Amphibien beschrieben, genommen. Auch bei den Reptilien muss sichergestellt werden, dass keine Individuen doppelt beprobt werden.

Fische

- Entnahme von drei bis vier Schuppen oder einem kleinen Stück der Rücken- oder Schwanzflosse pro Individuum. Lagerung in Tubes mit Alkohol in Dunkelheit und bei Raumtemperatur.
- Alternativ wird auch bei Fischen mit Mundschleimhautabstrichen mit Wattestäbchen in speziellen Tubes gearbeitet (Vorgehen analog zur Beprobung bei Amphibien).

Vögel

- Das Einfangen und Handling der Vögel gilt von erfahrenen Ornithologen durchzuführen, um den Stress für die Tiere so gering wie möglich zu halten. Blutproben dürfen in der Schweiz nur von Veterinären oder Personen mit entsprechender Ausbildung entnommen werden.

Blutprobe

- Blutproben (0.2-0.5 ml), in Tubes mit 1 ml Alkohol gemischt oder Trocknung von 2-4 Blutstropfen auf einem Filterpapier. Lagerung bei Raumtemperatur.

Mundschleimhautabstrich

- Mundschleimhautabstrich analog zum Vorgehen bei den Amphibien mit Wattestäbchen in speziellen Tubes. Grösse der Wattestäbchen auf Grösse der Tierart anpassen.
- Gewebe- oder Blutproben liefern generell mehr DNA als Mundschleimhautabstriche.

Federn, Eierschalen oder Kot

- Nicht-invasives Sammeln (Material muss so frisch wie möglich sein). Genetische Laboranalysen aus solchen nicht-invasiven Proben sind aufwändiger und deshalb auch teurer. Ihr Einsatz muss deshalb gut überlegt sein. Bei Kotproben ist es ausserdem oft unumgänglich, die Artzugehörigkeit zuerst mit genetischem Barcoding zu bestimmen, was die Kosten erhöht.

Säugetiere

- Das Einfangen und Handling von Säugetieren gilt von erfahrenen Wildtierspezialisten durchzuführen, um den Stress für die Tiere so gering wie möglich zu halten. Blutproben dürfen in der Schweiz nur von Veterinären oder Personen mit entsprechender Ausbildung entnommen werden.

Blutprobe

- Blutprobe (ca. 0.5 ml) pro Individuum, in einem Tube mit Alkohol oder Trocknung von 2-4 Blutstropfen auf einem Filterpapier. Lagerung bei Raumtemperatur.

Mundschleimhautabstrich

- Mundschleimhautabstrich (analog zum Vorgehen bei den Amphibien) mit Wattestäbchen in speziellen Tubes. Grösse der Wattestäbchen auf Grösse der Tierart anpassen.

Gewebeprobe

- Gewebeprobe (ca. 50-100 mg oder rund 8 mm³) in einem Tube mit Alkohol. Solche Gewebeprobe können von Tieren aus Verkehrsunfällen oder aus der Jagd gewonnen werden (vgl. Abbildung 8).

Haare, Kot

- Nicht-invasives Sammeln (Material muss so frisch wie möglich sein). Proben sofort kühlen und am gleichen Tag ins Labor schicken (vgl. Abbildung 9). Genetische Laboranalysen aus solchen nicht-invasiven Proben sind aufwändiger und deshalb auch teurer. Ihr Einsatz muss deshalb gut überlegt sein. Bei Kotproben ist es ausserdem oft unumgänglich, die Artzugehörigkeit zuerst mit genetischen Barcoding zu bestimmen, was die Kosten erhöht.

Einreichung der Proben an die ecogenics GmbH

Sämtliche Proben werden direkt nach der Probenahme oder am Ende der Probenahmekampagne an die ecogenics GmbH versandt bzw. eingereicht.



Abbildung 5: Probenahme Pflanzenmaterial. (Foto: ARNAL AG)



Abbildung 6: Beine von Arthropoden können in Tubes mit oder ohne Alkohol gesammelt werden. (Foto: ARNAL AG)



Abbildung 7: Mundschleimhautabstrich bei der Gelbbauchunke; dabei muss die Grösse der Wattestäbchen der Tierart angepasst werden. (Foto: ARNAL AG)



Abbildung 8: Gewebeprobe eines Säugetiers (z.B. Schneehase: Ohr von einem gejagten Tier; Foto: Sabine Brodbeck).



Abbildung 9: Säugetier-Kot in Tubes. (Foto: Sabine Brodbeck)

7. Mögliche zu untersuchende Arten

Grundsätzlich sind genetische Untersuchungen zum Verbund mit **allen Arten** möglich. Die für den Verbund untersuchten Arten sollten möglichst in ihrem Vorkommen auf einen Lebensraumtyp beschränkt sein, nicht zu häufig, aber auch nicht zu selten, nicht allzu mobil (Vögel, aber auch Säugetiere, eignen sich in der Regel deshalb weniger), im Feld einfach zu bestimmen sein und verschiedene Höhenstufen der Schweiz abdecken. Tabelle 1 enthält eine Liste mit einigen Vorschlägen für solche Arten, die für Untersuchungen zum Lebensraumverbund geeignet sind.

Tabelle 1: Lebensräume und Vorschläge für mögliche Arten für eine genetische Untersuchung des Lebensraumverbunds. MS: Mikrosatelliten: 0 = nicht vorhanden; 1 = in der Literatur vorhanden; 2 = vorhanden und für die Schweiz getestet.

Lebensraum	Gruppe	Art	MS
Seen, Weiher, Ufer	Libellen	Frühe Adonislibelle (<i>Pyrrhosoma nymphula</i>)	0
		Winterlibelle (<i>Sympecma fusca</i>)	0
	Heuschrecken	Grosse Goldschrecke (<i>Chrysochraon dispar</i>)	0
	Amphibien	Erdkröte (<i>Bufo bufo</i>)	1
	Reptilien	Ringelnatter (<i>Natrix natrix</i>)	1
	Pflanzen	Gelbe Schwertlilie (<i>Iris pseudocorus</i>)*	1
Schnabelsegge (<i>Carex rostrata</i>)*		1	
Kleingewässer, Tümpel	Libellen	Südlicher Blaupfeil (<i>Orthetrum brunneum</i>)	0
	Heuschrecken	Langflügelige Schwertschrecke (<i>Conocephalus fuscus</i>)	2
	Amphibien	Kreuzkröte (<i>Bufo calamita</i>)	1
		Gelbbauchunke (<i>Bombina variegata</i>)	2
	Pflanzen	Kröten-Binse (<i>Juncus bufonius</i>)*	0
Ufer Flüsse und Bäche	Libellen	Gebänderte Prachtlibelle (<i>Calopteryx splendens</i>)	1
	Heuschrecken	Grosse Goldschrecke (<i>Chrysochraon dispar</i>)	0
	Amphibien	Feuersalamander (<i>Salamandra salamandra</i>)	1
	Krebse	Dohlenkrebs (<i>Austropotamobius pallipes</i>)	1
Flachmoore, Rieder	Tagfalter	Mädesüss-Perlmutterfalter (<i>Brenthis ino</i>)	1
		Silberschreckenfaller (<i>Melitaea diamina</i>)	0
	Libellen	Sumpf-Heidelibelle (<i>Sympetrum depressiusculum</i>)	0
	Heuschrecken	Sumpfgrippe (<i>Pteronemobius heydenii</i>)	0
		Langflügelige Schwertschrecke (<i>Conocephalus fuscus</i>)	2

Lebensraum	Gruppe	Art	MS	
		Grosse Goldschrecke (<i>Chrysochraon dispar</i>)	0	
		Sumpfschrecke (<i>Stethophyma grossum</i>)	2	
		Sumpfgrashüpfer (<i>Chorthippus montanus</i>)	1	
	Pflanzen	Schwalbenwurzenzian (<i>Gentiana asclepiadea</i>)	0	
		Grosser Wiesenknopf (<i>Sanguisorba officinalis</i>)*	1	
		Davalls-Segge (<i>Carex davalliana</i>)*	0	
		Teufelsabbiss (<i>Succisa pratensis</i>)	1	
Hochmoore	Tagfalter	Hochmoor-Perlmutterfalter (<i>Boloria aquilonaris</i>)	1	
	Reptilien	Waldeidechse (<i>Zootoca vivipara</i>)	1	
	Pflanzen	Scheidiges Wollgras (<i>Eriophorum vaginatum</i>)	0	
		Rundblättriger Sonnentau (<i>Drosera rotundifolia</i>)	0	
		Gemeine Moosbeere (<i>Vaccinium oxycoccos</i>)	1	
		Rauschbeere (<i>Vaccinium uliginosum</i>)	1	
	Trockenwiesen und -weiden	Tagfalter	Schachbrettfalter (<i>Melanargia galathea</i>)	1
Sechsfleck-Widderchen (<i>Zygaena filipendulae</i>)			0	
Malvendickkopffalter (<i>Carcharodus alceae</i>)			0	
Kleines Fünffleck-Widderchen (<i>Zygaena viciae</i>)			0	
Heuschrecken		Feldgrille (<i>Gryllus campestris</i>)	1	
		Heidegrashüpfer (<i>Stenobothrus lineatus</i>)	0	
Wildbienen		Veränderliche Hummel (<i>Bombus humilis</i>)	1	
Reptilien		Zauneidechse (<i>Lacerta agilis</i>)	1	
Pflanzen		Esparette (<i>Onobrychis viciifolia</i>)	1	
		Kleiner Wiesenknopf (<i>Sanguisorba minor</i>)	0	
		Pyramiden-Orchidee (<i>Anacamptis pyramidalis</i>)	0	
Schnecken		Zebraschnecke (<i>Zebrina detrita</i>)	3	
Alpine Hochstauden		Pflanzen	Rundblättriger Steinbrech (<i>Saxifraga rotundifolia</i>)	0
			Hoher Rittersporn (<i>Delphinium elatum</i>)	0
		Tagfalter	Schwarzer Apollo (<i>Parnassius mnemosyne</i>)	1
Gebirgs-Magerrasen	Tagfalter	Silbergrüner Bläuling (<i>Polyommatus coridon</i>)	1	
		Grosser Perlmutterfalter (<i>Argynnis aglaja</i>)	0	
		Graubindiger Mohrenfalter (<i>Erebia aethiops</i>)	0	

Lebensraum	Gruppe	Art	MS
	Wildbienen	Distelhummel (<i>Bombus soroeensis</i>)	0
	Pflanzen	Schwarzes Männertreu (<i>Nigritella nigra</i>)*	0
		Alpenaster (<i>Aster alpinus</i>)*	0
Extensive Fettwiesen und -weiden	Tagfalter	Schachbrettfalter (<i>Melanargia galathea</i>)	1
	Heuschrecken	Feldgrille (<i>Gryllus campestris</i>)	1
	Pflanzen	Wiesensalbei (<i>Salvia pratensis</i>)	0
Wiesen-Glockenblume (<i>Campanula patula</i>)		0	
Krautsäume	Tagfalter	Aurora (<i>Anthocharis cardamines</i>)	0
	Heuschrecken	Gemeine Sichelschrecke (<i>Phaneroptera falcata</i>)	0
	Reptilien	Blindschleiche (<i>Anguis fragilis fragilis</i>)	1
Hecken, Feldgehölze	Tagfalter	Aurora (<i>Anthocharis cardamines</i>)	0
	Heuschrecken	Gemeine Sichelschrecke (<i>Phaneroptera falcata</i>)	0
	Käfer	Gefleckter Schmalbockkäfer (<i>Leptura maculata</i>)	0
	Wildbienen	Gewöhnliche Löcherbiene (<i>Heriades truncorum</i>)	0
		Veränderliche Hummel (<i>Bombus humilis</i>)	1
	Reptilien	Blindschleiche (<i>Anguis fragilis fragilis</i>)	1
Waldränder	Heuschrecken	Gemeine Sichelschrecke (<i>Phaneroptera falcata</i>)	0
	Käfer	Gemeiner Schmalbockkäfer (<i>Leptura maculata</i>)	0
	Wildbienen	Gewöhnliche Löcherbiene (<i>Heriades truncorum</i>)	0
		Veränderliche Hummel (<i>Bombus humilis</i>)	1
	Reptilien	Blindschleiche (<i>Anguis fragilis fragilis</i>)	1
		Waldeidechse (<i>Zootoca vivipara</i>)	1
	Pflanzen	Ästige Graslilie (<i>Anthericum ramosum</i>)*	0
Orchideen-Buchenwald	Reptilien	Waldeidechse (<i>Zootoca vivipara</i>)	1
		Zauneidechse (<i>Lacerta agilis</i>)	1
	Pflanzen	Schmalblättriges Waldvögelein (<i>Cephalanthera longifolia</i>)	0
Pfeifengras-Föhrenwald	Tagfalter	Graubindiger Mohrenfalter (<i>Erebia aethiops</i>)	0
	Reptilien	Waldeidechse (<i>Zootoca vivipara</i>)	1
		Zauneidechse (<i>Lacerta agilis</i>)	1
	Pflanzen	Bergaster (<i>Aster amellus</i>)*	1
Niedrige Segge (<i>Carex humilis</i>)		0	

Lebensraum	Gruppe	Art	MS
		Türkenbund (<i>Lilium martagon</i>)	0
		Immenblatt (<i>Melittis melissophyllum</i>)	2
Rebberge, Obstgärten	Heuschrecken	Feldgrille (<i>Gryllus campestris</i>)	1
	Pflanzen	Weinberglauch (<i>Allium vineale</i>)*	0
	Wildbienen	Gewöhnliche Löcherbiene (<i>Heriades truncorum</i>)	0
		Gemeine Holzbiene (<i>Xylocopa violacea</i>)	0
		Veränderliche Hummel (<i>Bombus humilis</i>)	1
Siedlungs- raum	Tagfalter	Malvendickkopffalter (<i>Carcharodus alceae</i>)	0
	Wildbienen	Glänzende Natterkopf-Mauerbiene (<i>Osmia adunca</i>)	0
		Gewöhnliche Löcherbiene (<i>Heriades truncorum</i>)	0
	Reptilien	Blindschleiche (<i>Anguis fragilis fragilis</i>)	1
		Zauneidechse (<i>Lacerta agilis</i>)	1
Bunt- und Rotations- brachen	Wildbienen	Glänzende Natterkopf-Mauerbiene (<i>Osmia adunca</i>)	0
		Gewöhnliche Löcherbiene (<i>Heriades truncorum</i>)	0
	Spinne	Wespenpinne (<i>Argiope bruennichi</i>)	1
Kiesgruben	Wildbienen	Glänzende Natterkopf-Mauerbiene (<i>Osmia adunca</i>)	0
	Amphibien	Kreuzkröte (<i>Bufo calamita</i>)	1

*Pflanzenarten, welche polyploide Chromosomensätze aufweisen. Mikrosatelliten-Entwicklung ist fallweise zu prüfen.

8. Laboranalysen, statistische Auswertung und Resultataufbereitung

Im Labor werden für die ausgewählten Arten - falls nicht bereits vorhanden – artspezifische Mikrosatelliten-Marker entwickelt. Pro Art werden 12-16 Marker ausgewählt und ein PCR-Ansatz entwickelt, welcher es erlaubt, mehrere Loci (bis zu 5) pro Art in einem Schritt zu amplifizieren.

Das gesammelte Gewebematerial wird mit den entwickelten Mikrosatelliten-Markern analysiert. Für die Analysen zeigt sich die ecogenics GmbH verantwortlich.

Folgende statistische Standardauswertungen genetischer Daten werden analysiert und interpretiert:

- Genetische Gruppen
- Austausch über viele Generationen hinweg und Isolation durch die Distanz
- Austauschraten über die letzten Generationen hinweg
- Aktuelle Wanderer
- Barrierewirkung

Die ARNAL AG zeigt sich für die Datenaufbereitung und -interpretation verantwortlich.

9. Praxisbeispiel

Beprobung von 11-14 Individuen der Gelbbauchunke an sechs Standorten im Rahmen des KTI-Projekts (vgl. Abbildung 10).

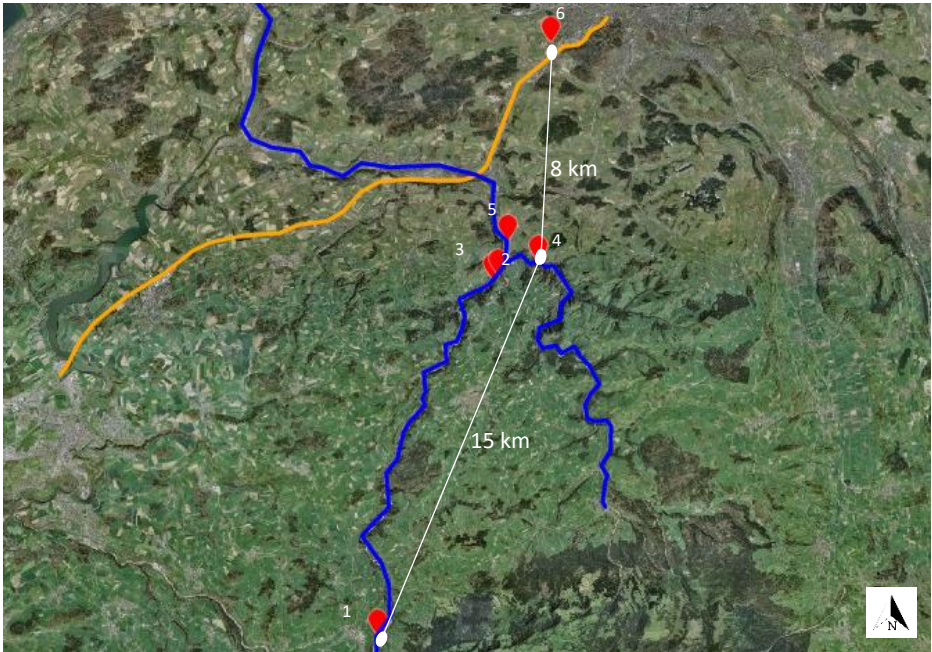


Abbildung 10: Orte für die Beprobung der Gelbbauchunken-Populationen (rot); Flüsse (blau); Autobahn (orange). (Quelle Orthofoto: map.geo.admin.ch)

Fragestellung: *Besteht zwischen den bekannten Gelbbauchunken-Populationen der Region ein Lebensraumverbund?*

Materialliste:

- Probenahme-Wattestäbchen mit Aufbewahrungsbehälter
- QR-Codes zum Aufkleben (zur eindeutigen Beschriftung der Proben)
- Einweg-Handschuhe
- Kühlbox
- Eimer mit Deckel (ausgekleidet mit Plastiksack) zum Sammeln der Tiere
- Fangnetz / Kescher
- Gitarren-Plektren
- Alkohol (70 %) oder Virkon zur Desinfektion des Materials
- Stirnlampe

Für die Probenahme war ausserdem eine Bewilligung der Fachstelle für Natur- und Landschaftsschutz des entsprechenden Kantons nötig.

Vorgehen:

- Fang der benötigten Anzahl Individuen (11-14) von Hand mit Handschuhen oder Kesch
- Aufbewahrung in mit Plastiksack ausgekleidetem Eimer mit Deckel
- Entnahme der Speichelprobe (2 Wattestäbchen pro Individuum); Mund öffnen mit Gitarrenplektrum, Entnahme Speichelprobe mit Wattestäbchen (idealerweise von zwei Personen gemeinsam durchgeführt)
- Aufbewahrung der Individuen in zweitem Eimer bis die Beprobung abgeschlossen ist, um Doppelbeprobung auszuschliessen auch wenn nochmals Individuen gesucht werden müssen
- Wechseln des Plektrums nach jedem Individuum
- Aufbewahrung Proben in Kühlbox/Tiefkühltruhe und Versand ans Labor
- Desinfektion von sämtlichem Werkzeug und Material (inkl. Stiefel) mit Alkohol (70%) oder Virkon nach jedem Objekt, um eine Verbreitung des Chytridpilzes (und ggf. anderer möglicher Krankheitserreger) durch Stiefel und Werkzeug / Material zu verhindern
- Durchführung der genetischen Analysen mit 19 Mikrosatelliten-Markern.

Nachfolgende Fotos (vgl. Abbildung 11) zeigen die wichtigsten Werkzeuge für die Probenahmen im Einsatz.



Abbildung 11: Öffnen des Mundes mit Hilfe des Gitarren-Plektrums und Entnahme der Speichelprobe mit Wattstäbchen. (Foto: ARNAL AG, 2017)

Resultate:

Genetische Gruppen

Die untersuchten Populationen (vgl. Abbildung 12) bestehen aus drei unterschiedlichen genetischen Gruppen und können in zwei genetische Einheiten eingeteilt werden (genetische Zusammengehörigkeit). Die am nördlichsten gelegene Population 6 ist hauptsächlich durch einen hohen «Blau-Anteil» gekennzeichnet. Die restlichen fünf Populationen (1-5) haben eine untereinander ähnliche genetische Zusammensetzung, die sich deutlich von der Population 6 unterscheidet.

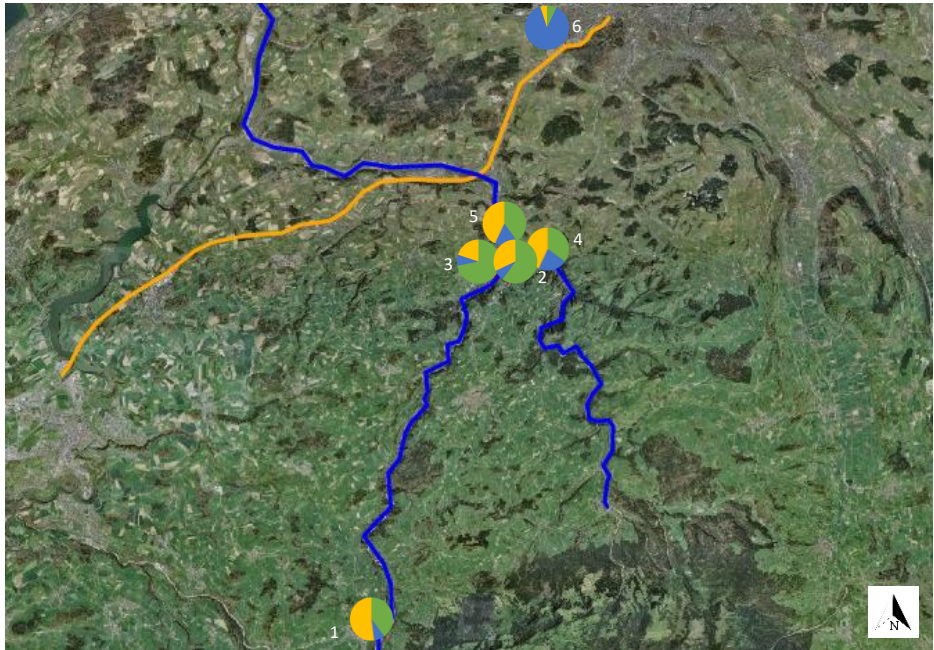


Abbildung 12: Genetische Gruppen der untersuchten Gelbbauchunken-Populationen. Die Farben im Kuchendiagramm geben die genetische Zusammensetzung einer Population an (STRUCTURE, $k=3$). Flüsse (blau); Autobahn (orange). (Quelle Orthofoto: map.geo.admin.ch)

Isolation durch die Distanz und Austausch über viele Generationen hinweg

Gemäss einfachem Mantel-Test ($r=0.36$, $p=0.41$) gibt es keine Isolation durch die Distanz (vgl. Abbildung 13). Das bedeutet, dass die reine geographische Distanz zwischen den Populationen nicht deren Ähnlichkeit bzw. Verschiedenheit erklärt: Andere Landschaftsfaktoren sind dafür verantwortlich.

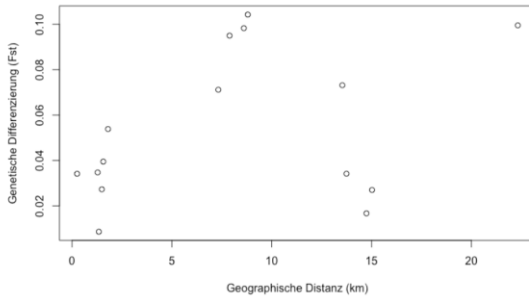


Abbildung 13: Genetische Differenzierung (Fst) als Funktion der geographischen Distanz (km).

Tabelle 2: Paarweise Fst-Werte (genetische Differenzierung).

Population	6	5	4	3	2	1
6						
5	0.071***					
4	0.095***	0.009 ^{ns}				
3	0.104***	0.027*	0.054**			
2	0.098***	0.034*	0.039**	0.034**		
1	0.099***	0.027*	0.016 ^{ns}	0.073***	0.034*	

ns: nicht signifikant; *: statistisch signifikant, $p \leq 0.05$; **: statistisch mittel signifikant, $p \leq 0.01$; ***: statistisch hoch signifikant, $p \leq 0.001$

Es gibt eine mittelhohe genetische Differenzierung zwischen der Population 6 und allen anderen Populationen (vgl. Tabelle 2). Diese ist nicht auf Isolation durch die geographische Distanz zurückzuführen (vgl. Abbildung 13). Zwischen den anderen Populationen ist die genetische Differenzierung in fast allen Fällen gering. Dies gilt auch für die weit abgelegene Population 1 (vgl. Abbildung 12).

Migration über die letzten Generationen hinweg

Auffällig sind die grossen Migrationsraten der Population 1 zu allen anderen Populationen (vgl. Tabelle 3). Eine Erklärung könnte sein, dass es sich hier um die Ursprungspopulation der anderen Populationen handelt. Alle anderen Populationen sind durch eher kleine Migrationsraten gekennzeichnet.

Tabelle 3: Migrationsraten während der letzten Generationen. Die Quellpopulationen stehen in der Spalte ganz links, die Empfängerpopulationen stehen in der Titelzeile.

Quell-/Empfängerpopulation	6	5	4	3	2	1
6		0.02	0.02	0.02	0.02	0.03
5	0.02		0.02	0.02	0.02	0.02
4	0.02	0.03		0.02	0.02	0.02
3	0.02	0.02	0.02		0.02	0.02
2	0.02	0.02	0.02	0.02		0.02
1	0.14	0.23	0.25	0.25	0.24	

Aktuelle Wanderer

In der aktuellen Generation gibt es keine detektierten Wanderer von einer Population zu einer anderen. Dies ist ein häufiges Ergebnis, da es schwierig ist mit kleiner Anzahl von Proben (wie hier verwendet), aktuelle Wanderer genetisch nachzuweisen.

Barrierewirkung

Falls die Wirkung einer Barriere statistisch getestet werden soll, muss das Beprobungsdesign entsprechend geplant werden. Die Barrierewirkung der südlich von Population 6 verlaufenden Autobahn war in dieser Untersuchung nicht die zentrale Frage. Rechnet man ein statistisches Modell, so ist die Autobahn eine Barriere für den Austausch zwischen den Populationen (vgl. Tabelle 4). Aufgrund des Beprobungsdesigns gibt es jedoch eine sehr grosse Korrelation zwischen den Variablen «durch Autobahn getrennt» und «an Flussverlauf liegend» und es kann nicht bestimmt werden, ob die Trennung durch die Autobahn oder die fehlende Vernetzung durch die Lage am Fluss für die Barrierewirkung verantwortlich ist. Falls gezielt die Barrierewirkung der Autobahn hätte untersucht werden sollen, hätten mehrere Populationen auf jeder Seite der Autobahn beprobt werden müssen.

Die geografische Distanz (vgl. Tabelle 4) zeigt genau wie der Isolation durch den Distanz-Test (vgl. Abbildung 13) keinen Effekt.

Tabelle 4: Statistische Auswertungen der Barrierewirkung (B-Werte).

Geografische Distanz	>0.001 ^{ns}
Barriere (Autobahn)	0.056 ^{**}

ns: nicht signifikant; *: statistisch signifikant, $p \leq 0.05$; **: statistisch mittel signifikant, $p \leq 0.01$; ***: statistisch hoch signifikant, $p \leq 0.001$

Schlussfolgerungen

Die Populationen 1, 2, 3, 4 und 5 haben eine ähnliche genetische Struktur, ihre genetische Differenzierung ist gering und es fand in den letzten Generationen genetischer Austausch statt, wobei von der Population 1 am meisten Individuen in andere Populationen wanderten. Der Population 1 kommt somit eine zentrale Bedeutung zu. Diese Wanderung erfolgte eventuell entlang des Flusses flussabwärts.

Die am nördlichsten gelegene Population 6 hat mit den anderen Populationen gesamthaft wenig genetischen Austausch, obwohl sie näher an den Populationen 2, 3, 4 und 5 liegt als Population 1. Der genetische Austausch ist somit nicht von der geografischen Distanz der Populationen, sondern vor allem von den Strukturen und Hindernissen zwischen den Populationen abhängig. Population 6 gehört zu einer anderen genetischen Gruppe als die restlichen Populationen und die genetische Differenzierung ist beträchtlich. Die Autobahn stellt eine mögliche Barriere für den Austausch zwischen der Population 6 und den restlichen Populationen dar. Für eine tiefergehende Analyse dieser Barrierewirkung müssten zusätzliche Untersuchungen mit mehreren Populationen auf beiden Seiten der Autobahn gemacht werden.

10. Glossar

Aktuelle Wanderer	Aktuelle Wanderer sind Individuen, die innerhalb der aktuellen Generation von einer Population zu einer anderen Population gewandert sind.
Austausch über die letzten Generationen	Austauschraten (Migrationsraten) über die letzten paar Generationen hinweg (≤ 5 Generationen) zeigen an, welcher Prozentsatz einer Population zu einer anderen Population gewandert ist. Hierbei können Quell- und Empfängerpopulationen detektiert werden.
Austausch über viele Generationen	Hierbei wird die genetische Verschiedenheit zwischen zwei Populationen über viele Generationen hinweg (zusammengefasst in beide Richtungen) bestimmt. Diese sogenannten F_{st} -Werte dürfen nicht als konkrete Austauschraten interpretiert werden. Anhand eines F_{st} -Wertes wird ersichtlich, ob zwei Populationen genetisch divergiert sind (z.B. aufgrund eines vor 20 Jahren gebauten Autobahnabschnitts zwischen den beiden Populationen). Kleine Populationen werden sich nach kurzer Zeit unterscheiden, bei grossen Populationen dauert es länger.
Begehung	Feldbegehung mit der Entnahme von Laborproben.
Genetische Einheit	Eine genetische Einheit fasst Populationen zusammen, welche gleiche oder ähnliche genetische Gruppen aufweisen. Je ähnlicher die genetischen Gruppen von unterschiedlichen Populationen sind, desto eher können sie einer genetischen Einheit zugeordnet werden und desto eher sind die Populationen miteinander verbunden.
Genetische Gruppe	Bei der Feststellung genetischer Gruppen wird nur die genetische Zusammensetzung der Individuen berücksichtigt, deren Herkunft (Koordinaten) wird nicht in die Berechnung einbezogen. Auch die Anzahl der genetischen Gruppen wird nur aus den genetischen Daten selbst bestimmt und (in der Regel) nicht vorher festgelegt. Die Resultate zeigen als Kuchendiagramme, wie gross der genetische Anteil einer Population an jeder festgestellten genetischen Gruppe ist.
Isolation durch die Distanz	Wird anhand der genetischen Auswertungen aller untersuchten Populationen eines Untersuchungsgebiets eine Isolation durch die Distanz ersichtlich, muss die geografische Distanz bei der Interpretation der Verwandtschaftsverhältnisse berücksichtigt werden. Falls keine Isolation durch die Distanz festgestellt wird, sind andere Landschaftsfaktoren für die genetischen Unterschiede verantwortlich.
Laborprobe	DNA-Probe in Tube mit QR-Code.
Mikrosatelliten	Kurze Abschnitte der DNA, auf welchen eine bestimmte Abfolge von DNA-Bausteinen (Basen) mehrfach wiederholt wird. Durch die Kombination von mehreren Mikrosatelliten erhält jedes Individuum einen einzigartigen genetischen Fingerabdruck.

11. Kosten

Kosten für das Probenahmedesign (ARNAL AG)

Für die Festlegung des Probenahmedesigns sind je nach Komplexität Aufwendungen von einem halben bis zu einem ganzen Arbeitstag einzuplanen (CHF 600.-- bis CHF 1'200.--).

Kosten Laboranalyse bei vorhandenen Mikrosatelliten (ecogenics GmbH)

In Tabelle 5 sind verschiedene Preisbeispiele aufgeführt. Diese gelten für Proben aus Gewebe, Blut, Mundschleimhautabstriche oder Blattmaterial. Dagegen ist die Analyse von komplexeren Ausgangsproben (z.B. Kot oder sonstige nicht-invasiv gesammelten Proben) aufwändiger. Die Preisbeispiele gelten für die Analyse von 13-16 Mikrosatelliten. Bei mehr Mikrosatelliten sind die Kosten höher. Allgemein gilt, dass die Preise für die Analysen pro Individuum mit zunehmender Anzahl untersuchter Individuen kleiner werden. Es handelt sich bei den in Tabelle 5 gegebenen Werten nur um ungefähre Angaben. Je nach Projekt können die Preise abweichen. Zudem enthalten die Preise bereits die statistischen Standardauswertungen der Daten.

Tabelle 5: Beispiele für die Kosten der Laboranalyse mit vorhandenen Mikrosatelliten Markern inkl. statistische Standardauswertungen. (Quelle: ecogenics GmbH)

Anzahl Populationen	Anzahl Individuen pro Population	total Anzahl Individuen	Anzahl Mikrosatelliten	Kosten mit Datenanalyse [exkl. MwSt.]	Preis pro Probe [exkl. MwSt.]
6	15	90	13-16	6'500.00	72.22
6	20	120	13-16	7'850.00	65.42
6	25	150	13-16	9'100.00	60.67
10	15	150	13-16	9'100.00	60.67
10	20	200	13-16	11'500.00	57.50
10	25	250	13-16	13'500.00	54.00

Die aufgeführten Preise sind exkl. MwSt. und als Richtpreise zu verstehen.

Zusätzliche Laborkosten bei fehlenden Mikrosatelliten (ecogenics GmbH)

Falls für eine zu untersuchende Art noch keine Mikrosatelliten vorliegen oder in der vorhandenen Literatur publiziert wurden, ist mit zusätzlichen Aufwendungen von ca. CHF 12'000.- (exkl. MwSt.) für die Mikrosatelliten-Entwicklung zu rechnen. Dies beinhaltet die Identifizierung von Mikrosatelliten, ein Screening um Mikrosatelliten mit genügend genetischer Vielfalt zu identifizieren und die Etablierung der entsprechenden Labor-Methoden (multiplex PCRs). Ziel ist es, 13-16 Mikrosatelliten pro Art zu kennen (wobei dies je nach Variabilität der Mikrosatelliten pro Art unterschiedlich sein kann).

Kosten für die Dateninterpretation (ARNAL AG)

Die ARNAL AG, zeigt sich für die Datenaufbereitung und -interpretation verantwortlich (pro Analyse rund 2 Arbeitstage bzw. CHF 2'400.--). Dies geschieht in Zusammenarbeit mit dem akkreditierten Büro. Die ARNAL AG bietet zum Lebensraumverbund weitere Hilfestellung bei spezifischen Interpretationen der Resultate an (Kosten: 150.- CHF/Stunde Beratung) oder leitet diese im Bedarfsfall an spezialisierte Genetik-Spezialisten partnerschaftlicher Forschungsinstitutionen weiter.

12. Bestellung

Bitte wenden Sie sich mit der Anfrage für eine Untersuchung, unter Angabe der Fragestellung, zur Ausarbeitung des Probenahmedesigns an die ARNAL AG.

Die benötigte Menge an Verbrauchsmaterial wird aus dem Probenahmedesign abgeleitet und von der ecogenics GmbH bzw. der ARNAL AG bereitgestellt.

Kontaktangaben:

Mail: assistenz@arnal.ch (Betreff: Verbund)

071 366 00 50

ARNAL AG, Kasernenstrasse 37, 9100 Herisau