

Analyse der Biodiversität in Berner Kleinseen mittels Umwelt-DNA



Diversitätsanalyse von aquatischen Organismen in zehn Berner Kleinseen

Bearbeitet durch Simplex DNA AG

Version 2

1. INHALTSVERZEICHNIS

1. INHALTSVERZEICHNIS	1
2. ZIELSETZUNG	4
3. MATERIAL & METHODEN	4
Feldarbeit und Probenahme	4
Molekulare Analysen	6
DNA Extraktion	6
Amplifikation der DNA und Indexing mittels PCR	6
Clean-up, DNA Quantifizierung & Sequenzierung	7
Bioinformatische Auswertung	7
4. RESULTATE	8
Anzahl Reads und ESVs	8
Betrachtung der Biodiversität	10
Alpha-Diversität $\approx$ Anzahl Arten in einem See	10
Eukaryoten	12
Fische	19
Mollusken	19
Amphibien	22
Beta-Diversität $\approx$ Unterschiede zwischen Lebensgemeinschaften	23
5. SYNTHESE	25
6. QUELLEN	28
1. ANHANG	29
Protokolle für Molekulararbeit	29
Extraktionen	29
PCR	30
Indexing der Sequenzen	30
Zusätzliche Darstellungen der Rohdaten	31

2. ZIELSETZUNG

Seen sind charakteristisch für Schweizer Landschaften, so gibt es im Kanton Bern über 110 grössere, stehende Gewässer. Die Kantone sind gesetzlich dazu verpflichtet, die Öffentlichkeit über deren Zustand zu informieren. Allerdings beschränkt sich dieses Monitoring oft auf grössere Gewässer, wobei auch Kleingewässer wichtige Funktionen in der Landschaftsökologie einnehmen. Mit einer spezifischen Artfauna tragen sie massgeblich zu Biodiversität einer Landschaft bei und schaffen ökologische Verbindungen zwischen Lebensräumen. Kleingewässer erhöhen die Heterogenität von Habitaten, beeinflussen auch terrestrische Ökosysteme - und umgekehrt. Gerade in landwirtschaftlich geprägten Flächen sind die Gewässer durch Nährstoffeinträge belastet, was deren ökologische Wertigkeit beeinträchtigen kann.

Der Kanton Bern beprobt alle zehn Jahre spezifisch zehn Kleinseen, um deren Zustand zu überwachen (1993/4, 2003, zuletzt 2013). Als Referenzgewässer für deren Beurteilungen dient dabei der Oeschinensee. Die Kleinseen wurden im Untersuchungsjahr viermal beprobt, um damit saisonale Schwankungen abzudecken. Im Jahre 2023 wurden zum ersten Mal zusätzlich Umwelt-DNA-Proben gesammelt, um die gängigen Erhebungen zu ergänzen. Im Sommer 2023 wurde dazu Wasserfilter wurden in Zusammenarbeit mit SimplexDNA AG in Winterthur analysiert. Dieser Bericht präsentiert die Ergebnisse der Umwelt-DNA Analysen und fokussiert auf eine grobe Bestandsaufnahme von vier Artengruppen: Eukaryoten/Insekten, Fischen, Amphibien und Mollusken. Dabei wird die Biodiversität der Seen auf zwei Weisen betrachtet: (1) die Anzahl unterschiedlicher Arten pro See, alpha-Diversität und (2) die Unterschiedlichkeit der Lebensgemeinschaften zweier Seen zueinander, beta-Diversität. Die Einordnung und Interpretation der Ergebnisse im ökologischen Kontext pro See erfolgt in einem separaten Bericht, siehe www.be.ch/gewaesserqualitaet.

3. MATERIAL & METHODEN

Feldarbeit und Probenahme

Das Monitoring-Konzept des Gewässer- und Bodenschutzlabor des Kantons Bern umfasst zehn Kleinseen, die periodisch (alle zehn Jahre) mittels chemischen und biologischen Parametern - wie Planktonvorkommen, Tiefenprofile und Nährstoffe - evaluiert werden.

Im Jahre 2023 wurden erstmals auch Umwelt-DNA-Daten erhoben (Tabelle 1). Die Umwelt-DNA Probenahmen wurden im Juni mit Untersuchungskits der SimplexDNA durchgeführt. Dazu wurden an jedem See in Ufernähe (meist vom Boot aus) zwischen einem und vier, abhängig von der Seegrösse, Wasserfilterproben genommen. Insgesamt wurden drei Negativkontrollen mit deionisiertem Wasser genommen, eine vor und zwei nach der Probenahme. Bis zur Analyse wurden die in Puffer konservierten Filterproben bei -20°C gelagert.

Tabelle 1: Übersicht der beprobten Seen für die Analyse in Bern (Koordinaten werden in LV95).

Probestelle	Abkürzung	Maximale Seetiefe [m]	Filtriertes Volumen gesamt [L]	Anzahl Filter	Koordinaten Probenahme
Amsoldingersee	AMS	13.9	5.02	4	610147 / 175175 610397 / 174868 610535 / 175043 610814 / 174501
Burgäschisee	BAE	30	4.6	3	617538 / 224595 617253 / 224184 617689 / 224141
Burgseeli	BUR	19.11	0.9	1	634093 / 171821
Dittligsee	DIT	16.36	1.22	1	607158 / 178193
Inkwilersee	INK	5	0.9	2	617140 / 227599 616912 / 227619
Lobsigensee	LOB	2.5	0.3	1	2589367 / 1208804
Moossee	MOG	21.13	5.6	4	603045 / 207771 603569 / 207731 603222 / 207987 602755 / 208229
Oeschinensee	OES	2.8	4.9	4	2621315 / 1149660 2621413 / 1149713 2621391 / 1149954 2621586 / 1150056
la Noz	NOZ	56	1	1	578681 / 234204
Sängeliweiher	SAW	2	0.24	1	624768 / 227435

Molekulare Analysen

DNA Extraktion

Die in Puffer konservierten Filter wurden nach dem Protokoll des 'Blood & Tissue Kit' (Qiagen) extrahiert. Die Proben wurden zufällig angeordnet und in Chargen von 12-16 Filtern extrahiert. Bei jeder Charge wurde eine Negativkontrolle inkludiert, um mögliche Kontaminationen der Extraktion nachweisen zu können. Für die weitere Analyse wurden Teile der DNA-Extraktion der verschiedenen Filter-Replikate eines Sees zu jeweils einer Mischprobe vereint (jeweils 15 µl einer Probe wurden in einem neuen Röhrchen vereint und als DNA-Extrakt für die PCR verwendet). Dasselbe Vorgehen wurde für die beiden Replikate der Negativkontrollen (vor und nach der Probenahme) gewählt.

Amplifikation der DNA und Indexing mittels PCR

Um eine möglichst breite Diversität in den Seen abzudecken, wurden verschiedene genetische Barcodes verwendet mit einem Fokus auf Fischen, Amphibien, Mollusken und Mehrzeller (als Teil dieser auch Insekten) (Tabelle 2). Eine PCR-Reaktion bestand aus dem Qiagen Multiplex Mastermix, BSA (Konzentration 10 mg/µl), dem Artengruppen-spezifischen Forward- und Reverse-Primer in der entsprechenden Konzentration (optimiert für die Artengruppe) und 3 µl DNA-freiem Wasser. In dieser Reaktion wird die DNA der Probe hinzugefügt und gezielt die DNA der Artgruppen amplifiziert (ein detaillierter Beschrieb befindet sich im Anhang).

Für jedes Amplikon testeten wir jede Probe zuerst auf eine positive Amplifikation durch ein Agarosegel (1,2 %). Die Proben aus dem Inkwilersee und dem Oeschinensee waren stark inhibiert (im Feldprotokoll wurde im Oeschinensee eine Trübung bemerkt) und wurden mit demselben PCR-Protokoll aber einer anderen Polymerase wiederholt, welche speziell für inhibierte Umweltproben entwickelt wurde. Für jede Probe führten wir drei Replikate der PCR durch, welche dann für den nächsten Schritt gepoolt (zusammengefügt) wurden. In der zweiten PCR wurde bei jeder Probe ein Index hinzugefügt, damit die detektierten Sequenzen später der jeweiligen Probe zugeordnet werden können. Dazu verwendeten wir die einzigartigen dualen Indizes (UDIs, Integrated DNA Technologies).

Tabelle 2: Verwendete Primer und ihre spezifische Genregion. Für die Amphibien testeten wir 2 unterschiedliche Primer, um eine bessere taxonomische Abdeckung zu erreichen.

Marker	Zielgruppe	Primer	Sequenz (5'-3')
16S	Mollusken	MOL16S_F	RAA AGA CRA GAA GAC CCT
		MOL16S_R	ART CCA ACA TCG AGG T
COI	Eukaryoten / (Insekten)	miCOLintF	GGD ACW GGW TGA ACW GTW TAY CCH CC
		jgHCOI2198	GTR ATW GCH CCD GCT ARW ACW GG
12S	Fische	MiFish-U-F	GTC GGT AAA ACT CGT GCC AGC
		MiFish-U-R	CAT AGT GGG GTA TCT AAT CCC AGT TTG
16S	Amphibien	BA-4445-F	RAC CGT GCR AAG GTA GCR
		BA-178-R	CCA TRG GGT CYT CTC GTC T
12S	Amphibien II	Ams248-F	AGC CAC CGC GGT TAT ACG
		Ams248-R	CAA GTC CTT TGG GTT TTA AGC

Clean-up, DNA Quantifizierung & Sequenzierung

Die Library (gepoolte Proben) wurden an magnetische Beads gebunden, mit 75% ETOH gewaschen und schließlich in DNA-freiem Wasser eluiert. Für die Sequenzierung wurden die erhaltenen Amplicons (vervielfältigte DNA-Sequenzen) für Mollusken, Eukaryoten/Insekten und Amphibien (16S) vereint in einer Library und mittels MiSeq Plattform am Genetic Diversity Center (GDC, ETH Zürich) geladen (inklusive 10% PhiX, v3 Kit mit 14 pM,) die Fisch-Library wurde mit einem v2 Kit für Fische mit 6pM sequenziert). Der zweite Amphibien-Primer (12S) wurde zu einem späteren Zeitpunkt sequenziert, nachdem der erste Primer eine geringe Diversität erfasste.

Bioinformatische Auswertung

Bei den resultierenden Rohdaten handelt es sich um “Reads” von DNA-Sequenzen, die in den Proben gefunden wurden. Die MiSeq-Maschine liest dabei auch die Basenfolge, die als Identifikation der Proben, sodass jede gefundene Sequenz der Probe zugeordnet wird (“demultiplexing”). Der jeweilige Forward (R1) und Reverse (R2) Read einer Probe wurden gepaart (“paired-end reads”) und mit einer bioinformatischen Pipeline die von modifizierte Version von Apscale v1.6.3 (Buchner et al., 2022) verarbeitet.

Eine Modifikation war die Aufreinigung ("denoising") mittels des Swarm-Algorithmus (Mahé et al., 2022). Die Reads wurden nach Qualität und Länge gefiltert und anschliessend wurden mit microDecon (McKnight et al., 2019) Sequenzen, die in negativen Kontrollen (negative Extraktions- und Filtrationsproben, sowie PCR-Kontrollen) gefunden wurden, aus den echten Proben entfernt. Die resultierenden Sequenzen stellen sogenannte Exact Sequence Variants (ESVs) dar, also jeweils alle einzigartigen Sequenzen, die detektiert wurden. Den ESVs wurde dann mittels dem SINTAX classifier eine jeweilige taxonomische Zuordnung beigefügt - durch einen Vergleich der Sequenzen mit Referenzdatenbanken. Als Datenbank wurde die MIDORI 2 srRNA-Datenbank (Leray et al., 2022) v256 (MIDORI2_UNIQ_NUC_GB256_srRNA_BLAST) genutzt. Für die 12S-Sequenzen der Fische wurde eine eigene Datenbank verwendet, die alle schweizweit bekannten Arten mit Standort getreuen Sequenzen repräsentiert (Blackman & Walser et al., 2021), was die Zuordnung der Arten optimierte.

Die so erhaltenen Rohdaten wurden in das Statistikprogramm R importiert und alle folgenden Analysen wurden mit RStudio (R Core Team, 2021) durchgeführt. Da die generierten Datensätze jeweils ein breites Spektrum an Organismen abdecken, werden die Daten aus den verschiedenen Amplikons jeweils für alle Artengruppen kombiniert, um möglichst viele Arten nachweisen zu können. Je nach Amplicon und Referenzdatenbank war die taxonomische Zuordnung bis auf Art oder nur zu einem tieferen taxonomischen Level möglich, so dass nicht alle Ergebnisse auf Artniveau dargestellt sind. Als zusätzliche Quelle wurde teilweise das CSCF Datenzentrum beigezogen.

4. RESULTATE

Anzahl Reads und ESVs

Die Rohdaten generierten jeweils eine unterschiedliche Anzahl Reads und ESVs (einzigartige DNA-Sequenzen) pro Primerpaar (Tabelle 3).

Tabelle 3: Aufstellung zu den Sequenzier Resultaten der verschiedenen Artengruppen.

Primer	Anzahl Reads [M]	Anzahl ESVs
Fische	1.21	25
Amphibien 12S	0.1 M	87
Amphibien 16S	1.47 M	213
Mollusken	1.1 M	291
Eukaryoten	1.34 M	236

Die Anzahl Reads, die mindestens einem Phyla oder einem höheren taxonomischen Rang zugeordnet werden können, variiert stark zwischen den unterschiedlichen Primern. Da die Primer jeweils auch andere, unspezifische Artengruppen amplifizieren, wurden in den Datensätzen auch Reads von anderen Artengruppen berücksichtigt, welche von Interesse für die Analyse sind. Für die Analyse wurden also aus allen generierten Datensätzen jeweils alle Sequenzen berücksichtigt, die eine Zuordnung zu den folgenden taxonomischen Gruppen hatten und im Folgenden auch so benannt sind:

Unter die Kategorie **Eukaryoten** fallen eine Vielzahl an Organismen, so dass die Referenzdatenbanken weniger vollständig sind und eine Vielzahl der ESVs nicht taxonomisch zugeordnet werden können oder nur auf dem Niveau der Gattung. Für **Fische** beschränkten wir die ESVs zur Klasse "Actinopterygii" (Strahlenflosser), für die **Mollusken** (Weichtiere) zum Phylum "Mollusca", für die **Amphibien** zu Klasse "Amphibia". ESVs, die dem Menschen, dem Huhn oder der Kuh zugeordnet sind, können aus Reagenzien hervorgehen. Trotz einer Aufreinigung der Proben anhand von Negativkontrollen, enthalten Proben Sequenzen dieser Arten, die aber mit Vorsicht interpretiert werden sollten. Das Vorkommen solcher Sequenzen war aber auch zu erwarten, da Nutztiere teilweise in Seenähe gehalten wurden und / oder die Seen auch zum Baden genutzt werden. Zum Beispiel wird das Burgseeli auch als Badensee genutzt und wir detektieren tatsächlich menschliche DNA. Die Abbildungen im Hauptteil dienen als Gesamtübersicht der Artgruppen über alle fünf Primer-Datensätze.

Betrachtung der Biodiversität

Alpha-Diversität $\approx$ Anzahl Arten in einem See

Die Alpha-Diversität bezieht sich auf die Biodiversität von Arten innerhalb eines bestimmten Lebensraums. Sie ist ein Mass für die Gesamtzahl der in einem bestimmten Gebiet vorkommenden Arten und gibt Aufschluss über den Artenreichtum. Im Wesentlichen quantifiziert die Alpha-Diversität die Biodiversität auf lokaler Ebene, etwa innerhalb einer einzelnen Gemeinschaft oder – wie in diesem Fall – in einem einzelnen See im Kanton Bern.

Alpha-Diversität kann auf verschiedenen Ebenen gemessen werden: Eine der häufigsten biologischen Einheiten ist wohl die Artenvielfalt (d.h. wie viele Arten es in einem Gebiet gibt), aber insbesondere bei eDNA-Biodiversitätsdaten kann nicht jede Sequenz einer Art zugeordnet werden, beziehungsweise vielleicht nur auf ein höheres taxonomisches Level, wie zum Beispiel Familie zugeordnet werden. Daher wird das Konzept der Exakten Sequenz-Varianten (**ESVs**) verwendet, um numerische Vergleiche zu machen. In der Abbildung 1 ist eine Übersicht über die Anzahl ESVs pro See gegeben, wobei die Darstellung auch nach Artgruppen aufgeteilt ist.

ESVs werden in der Biologie verwendet, um verschiedene Organismen basierend auf ihrer Ähnlichkeit in DNA-Sequenzen zu klassifizieren. Im Wesentlichen ist ein ESV eine Sequenz, die basierend auf ihrer Nukleotidsequenz einzigartig in dem Datensatz ist. Dieser Ansatz ermöglicht die Klassifizierung von Organismen basierend auf genetischer Verwandtschaft, ohne eine präzise Artidentifikation zu erfordern. Es ist wichtig zu beachten, dass diese taxonomische Einheit auf einem vordefinierten Niveau der Sequenzähnlichkeit basiert und nicht auf strikter Einhaltung traditioneller taxonomischer Prinzipien. Dementsprechend können einer Art mehrere ESVs zugeordnet werden.

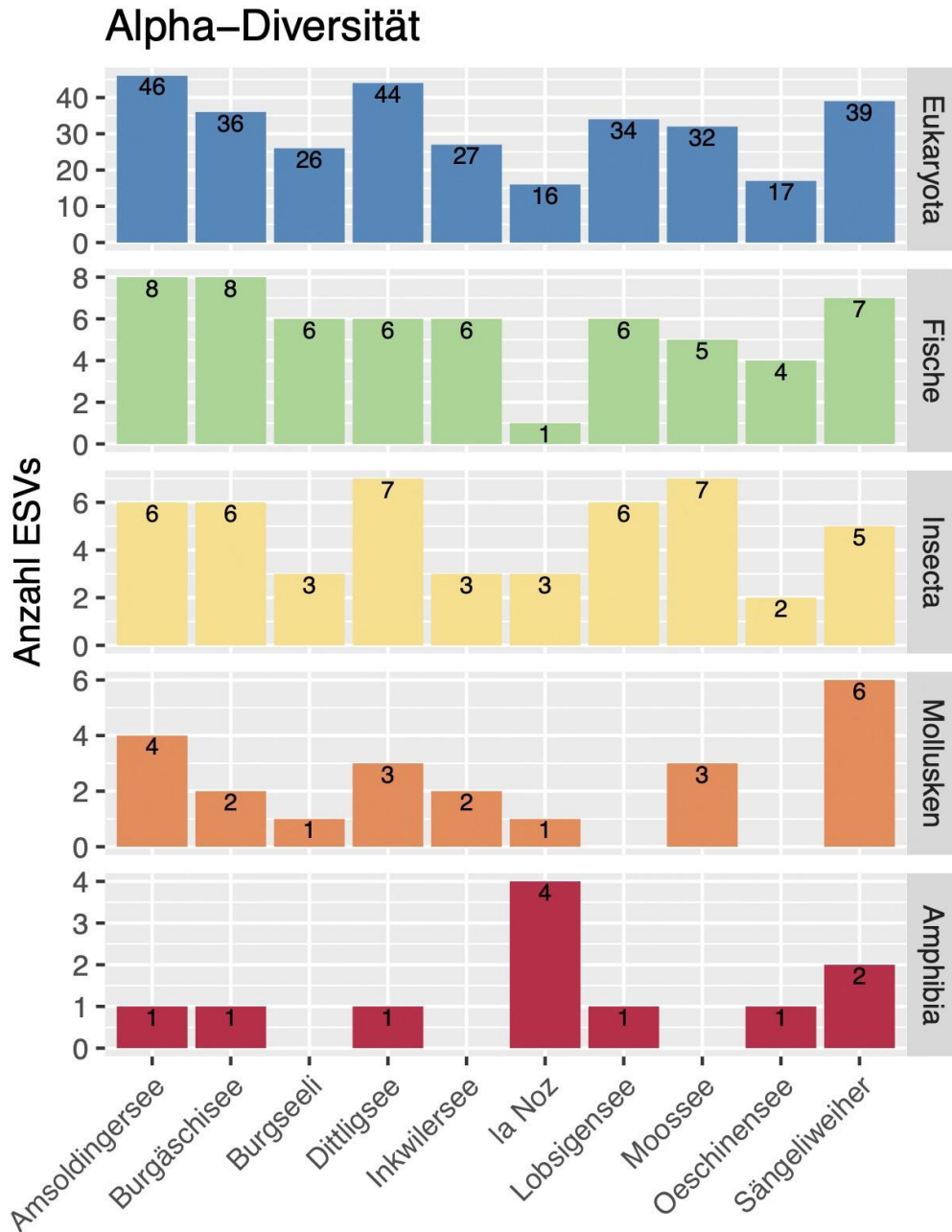


Abbildung 1: Die Diversität wird als Anzahl ESVs (vertikale Achse) angezeigt für die zehn untersuchten Kleinseen (horizontale Achse). ESVs repräsentieren einzigartige Sequenzen und können Arten zugeordnet werden (eine Art kann mehrere ESVs haben). Die fünf Reihen und Farben repräsentieren die verschiedenen Artengruppen, die im Fokus dieses Berichtes stehen. Die Insekten sind innerhalb der Eukaryoten und noch einmal einzeln dargestellt.

Der Amsoldingersee zeigt insgesamt die grösste Diversität der zehn untersuchten Kleinseen, gefolgt von Dittligsee und Sängeliweiher. Die niedrigste Diversität wurde im Oeschinensee festgestellt (allerdings waren hier die Proben stark inhibiert). In den folgenden Unterkapitel wird die Diversität pro Artengruppe näher betrachtet.

Eukaryoten

Die Eukaryoten umfassen ein sehr breites taxonomisches Spektrum zellkernbesitzender Organismen von kleinsten mehrzelligen Rädertierchen (Rotifera) bis hin zu Säugetieren (Biber). Der Datensatz generierte in allen Kleinseen die grösste Anzahl ESVs und gibt somit einen breiten Einblick in die Diversität. Die nachgewiesenen Eukaryoten wurden den folgenden Stämmen zugeordnet: Arthropoda (Gliederfüssler), Bryozoa (Moostierchen), Gastrotricha (Bauchhärlinge), Chordata (Wirbeltiere), Cryptophyta (Schlundgeissler, Algen) und Rotifera (Rädertierchen).

Unter den **Arthropoda** (Gliederfüsslern) gab es eine Art der Süsswassermilben (*Arrenurus albator*) im Dittligsee (Abbildung 2). Bezüglich der Moostierchen (Bryozoa), Schlundgeissler (Cryptophyta) und Gastrotricha (Bauchhärlinge) gab es nur wenige ESV und diese waren je nach Primer unterschiedlich gut aufgelöst (Zuordnungen zwischen Familien- bis Artniveau, Abbildung im Anhang). Bei den Gastrotricha wurde nur ein Genus detektiert (*Chaetonotus* sp.) und zwar im Amsoldingersee und dem Inkwilensee (Anhang Abbildung 1).

Eine grosse Zahl an Taxa innerhalb der Arthropoden wurden den Klassen der Copepoda (Ruderfusskrebse inklusive der Klade "Hexanaupila" mit einem ESV (*Ergasilus* sp.)) und Branchiopoda (Kiemenfusskrebse) zugewiesen (insgesamt 21 ESVs, je nach genetischem Marker auf Art- oder bis Familienniveau). Einige Zooplankton-Arten haben mehrere Genkopien pro Zelle, so dass ihre DNA in hohen Mengen vorkommt. So ist z.B. *Brachionus* sp. in allen Seen in einer fast konstanten Proportion vertreten. Unter der Klasse der Insekten (insgesamt 17 ESVs auf Art bis Familienniveau, Anhang Abbildung 2), gab es Nachweise der Ordnungen (A) Coleoptera (Käfer, eventuell terrestrische Art *Brassicogethes* sp.), (B) Diptera (Zweiflügler, vor allem Chironomiden aber nur im Amsoldingersee), (C) drei Ephemeroptera-Taxa (Eintagsfliegen, *Cloeon dipterum*, *Cloeon* sp., (vier Arten gemäss CSCF im Kanton Bern nachgewiesen) und *Caenis* sp. (vier Arten gemäss CSCF im Kanton Bern) und (D) mehrere Libellenarten (Klasse Odonata).

Eintagsfliegen wurden in allen Seen ausser dem Amsoldingersee, Inkwiler- und Oeschinensee nachgewiesen. Unter den Libellen fanden sich ein Taxon der Segellibellen (*Orthetrum* sp.), von denen vier verschiedene Arten im Kanton Bern im 2023 nachgewiesen wurden (Quelle: CSCF) und welche einer der artenreichsten Gruppen der Libellen darstellt. Sie wurden am Amsoldingersee, Burgseeli, Lobsigensee, Moossee und Sängeliweiher nachgewiesen.

Ein weiteres Taxon wurde den Falkenlibellen zugeordnet, von denen die Art *Cordulia aeana* im Jahre 2023 in Bern nachgewiesen wurde (Quelle: CSCF). Die DNA wurde im Dittligsee, Lobsigensee und Sängeliweiher detektiert. Von der Gattung *Anax* wurde ein Taxon im Amsoldingersee, Burgäschisee und Moossee nachgewiesen, wobei laut CSCF drei Arten dieser Gattung im Kanton Bern nachgewiesen sind. Folglich wurde in allen untersuchten Seen DNA von Libellen nachgewiesen, abgesehen von Inkwilersee, la Noz und Oeschinensee. Im Dittligsee wurde zudem ein ESV (*Limothrips denticornis*) der Klasse Thysanoptera (Fransenflügler, Thripse) zugeordnet, und im Burgäschisee, Burgseeli, Lobsigensee und Moossee ein ESV der Klasse Ostracoda (Muschelkrebse, Cypridopsis sp.).

Insgesamt wurden im Oeschinensee mit zwei Taxa die wenigsten Arthropoden nachgewiesen. Hingegen wurden die meisten Taxa im Amsoldingersee (19) gefunden, gefolgt von Dittligsee und Moossee (je 17).

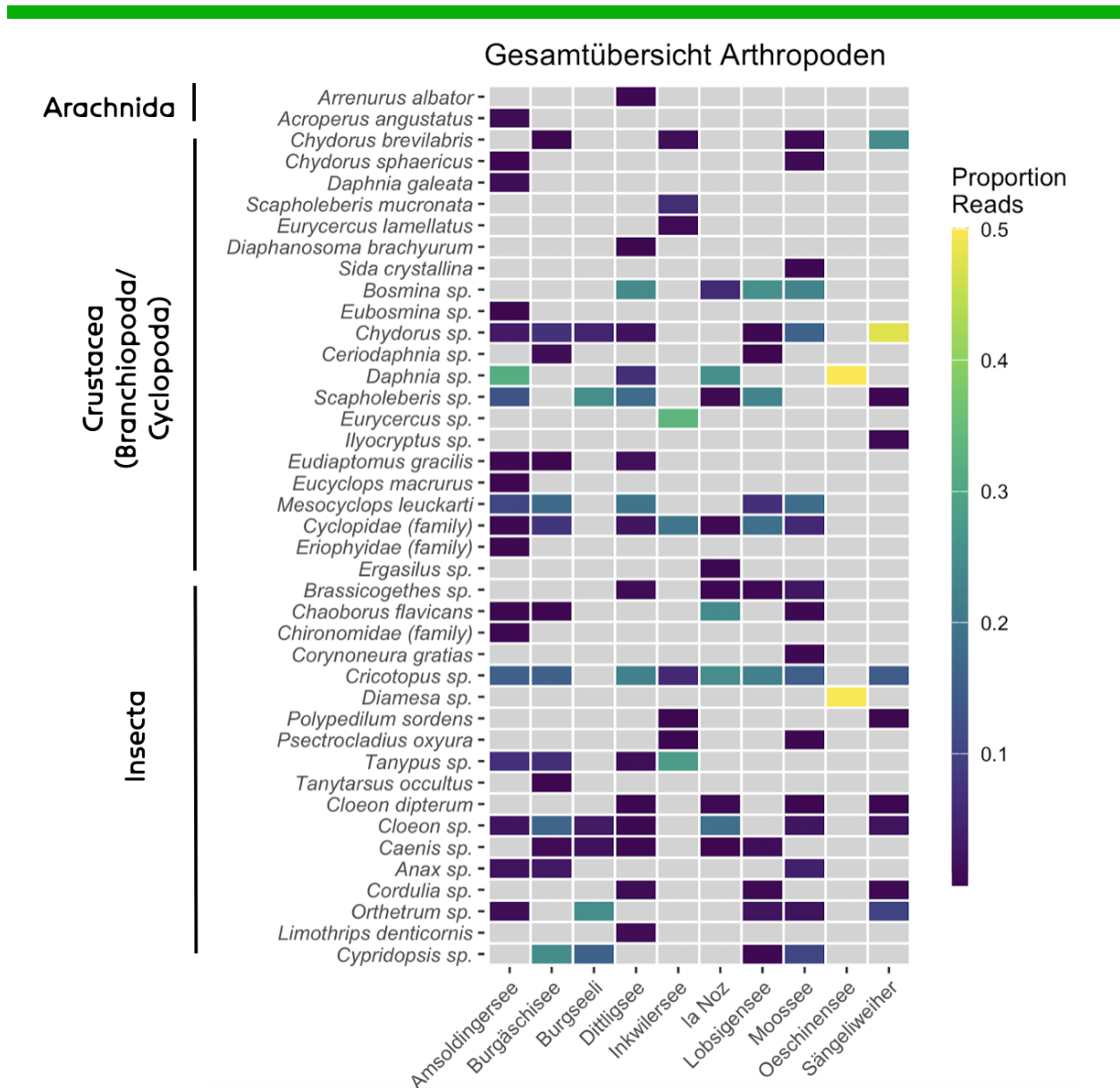


Abbildung 2: Gesamtübersicht aller nachgewiesenen Arthropoden auf Art- oder Gattungsniveau. Auf der horizontalen Achse sind die Kleinseen angeordnet, auf der vertikalen Achse sind die Taxa aufgelistet. Die Farbskala gibt die proportionale Anzahl Reads des Taxons an, d.h. die Anzahl Reads des Taxons im Verhältnis zur Gesamtzahl an Reads der Artengruppe im entsprechenden See.

Ein weiterer Stamm innerhalb der Eukaryoten sind die **Chordata** (Wirbeltiere, Abbildung 3). Es wurden DNA-Fragmente von mehreren Wirbeltieren gefunden, darunter an Gewässer gebundene Vögel: *Fulica atra*, das Blässhuhn, *Silvia* sp im Moossee, die Grasmücke; *Aythya* sp. im Inkwilersee, die Reiherente; *Ardea* sp. den Grossreihern angehörend und *Anas* sp. den Eigentlichen Enten angehörend, *Phalacrocorax* sp. den Kormoranen angehörend.

Es wurden auch Säugetiere nachgewiesen, darunter Nagetiere wie der Biber (*Castor fiber*) im Inkwilersee, Dittligsee Sängeliweiher und eine Osterschermas-Art (*Schermas*) der Gattung *Arvicula* im Amsoldingersee (zuvor in Bern nachgewiesen wurde die Osterschermas *Arvicula amphibius*).

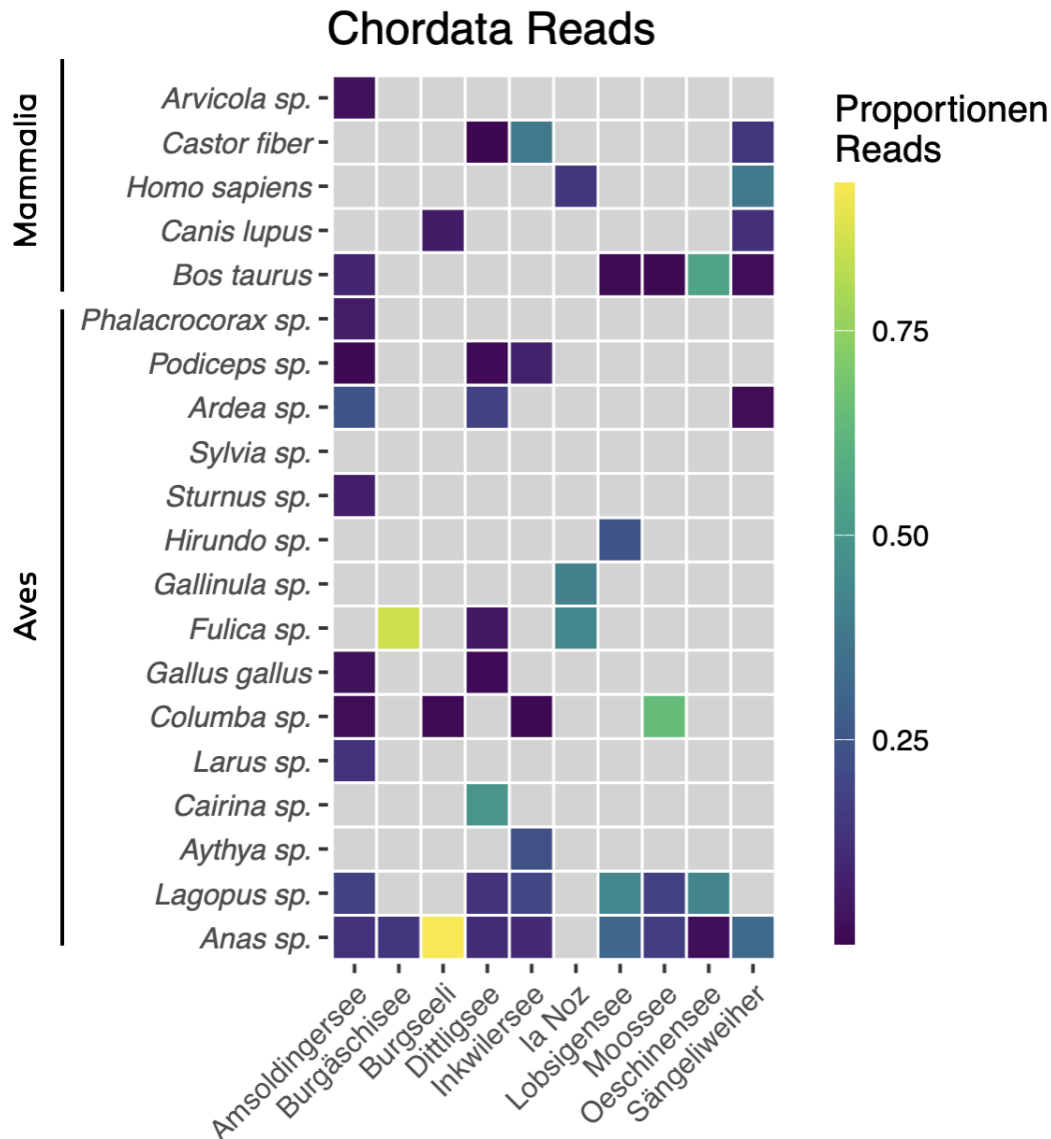


Abbildung 3: Gesamtübersicht aller nachgewiesenen Chordata (ausser den Fischen und Amphibien, die einzeln dargestellt sind) auf Art- oder Gattungsniveau in den Bernern Kleinseen. Auf der horizontalen Achse sind die Kleinseen angeordnet, auf der vertikalen Achse sind die Taxa aufgelistet. Die Farbskala gibt die proportionale Anzahl Reads des Taxons an, d.h. die Anzahl Reads des Taxons im Verhältnis zur Gesamtzahl an Reads der Artengruppe im entsprechenden See, so können verschiedene Arten also semiquantitativ innerhalb eines Sees beurteilt werden.

Ein weiterer grosser Stamm innerhalb der Eukaryoten ist jener der **Rotifera** (Rädertierchen) - welche einen Anteil am Zooplankton der Seen stellen (Abbildung 4). Insgesamt wurden in den Datensätzen mit den Primer für Eukaryoten, Mollusken und Vertebraten zwar auch Taxa der Rotifera nachgewiesen (jeweils 54, 36 und 48 ESVs mindestens auf Gattungsniveau). Allerdings wurden die Anzahl an ESVs in nur zehn Gattungen kollabiert, viele davon in die vier Gattungen *Asplanchna* sp., *Brachionus* sp., *Euchlanis* sp., *Keratella* sp., welche in der Abbildung 4 als erste vier Reihen dargestellt sind. *Brachionus* sp. ist dabei das einzige Taxon, welches in allen Seen nachgewiesen wurde. Insgesamt wurden die meisten Taxa im Amsoldingensee (10) sowie Dittlig- und Moossee (je 9) gefunden. Im la Noz wurden hingegen mit nur zwei Taxa die wenigsten Rädertierchen detektiert.

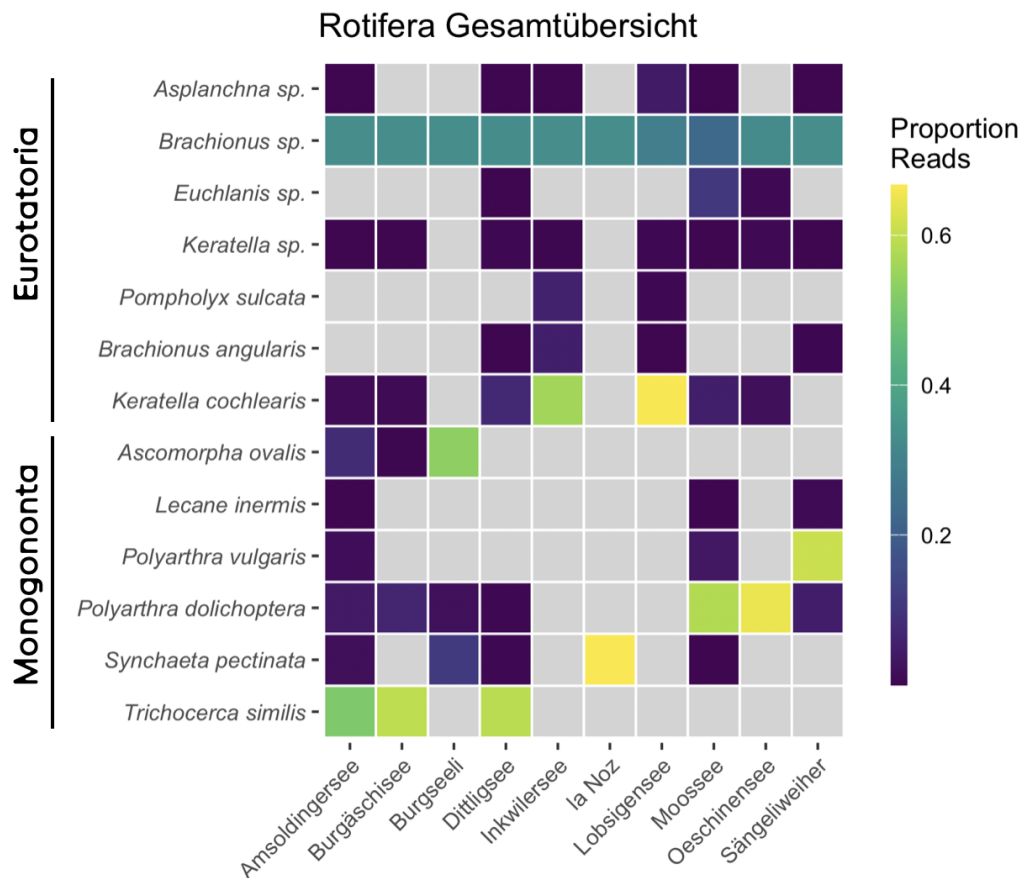


Abbildung 4: Gesamtübersicht aller nachgewiesenen Rädertierchen auf Art- oder Gattungsniveau (n = 13) in den Bernern Kleinseen. Auf der horizontalen Achse sind die Kleinseen angeordnet, auf der vertikalen Achse die Taxa (ersten vier Reihen auf Gattungsniveau). Die Farbskala gibt die proportionale Anzahl Reads des Taxons an im Verhältnis zur Anzahl aller Arten in dem entsprechenden See, so können verschiedene Arten also semiquantitativ innerhalb eines Sees beurteilt werden.

Fische

Obwohl die Fische in der Schweiz nicht zu den artenreichsten Familien gehören, sind sie insbesondere in Kleinseen ein wichtiger Bestandteil der Nahrungskette. Ein Teil der untersuchten Seen wird künstlich mit Fischen besetzt, so dass sie ein Standort untypisches Artspektrum zeigen. Auch DNA von Speisefischen können in Gewässer eingetragen werden. Insgesamt wurden zehn Fisch-Taxa in den untersuchten Kleinseen nachgewiesen (Abbildung 5) mit unterschiedlichen Detektion zwischen Primern (Anhang Abbildung 3). In den kleineren Seen wurden generell mehr Arten nachgewiesen. Der Flussbarsch (*Perca fluviatilis*) wurde in allen Seen nachgewiesen ausser dem la Noz nachgewiesen. Ebenfalls weit verbreitet waren DNA-Spuren des Hechts (*Esox lucius*, alle Seen ausser la Noz und Oeschinensee), jedoch oft mit sehr wenigen Reads. Die Elritze (*Phoxinus phoxinus*) und die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) waren die Arten, die insgesamt am seltensten nachgewiesen wurden (nur im Oeschinensee). Die Regenbogenforelle kommt natürlicherweise nicht in der Schweiz vor, sondern ist meistens eingewandert oder besetzt worden, da sie bei Fischern beliebt ist.

Weit verbreitet ist auch die Rotfeder (*Scardinius erythrophthalmus*), die nah verwandte Schwarzfeder (*Scardinius heperidicus*) kommt südlich des Alpenbogens vor (Tessin und Po-Ebene), wurde allerdings in nördliche Seen verschleppt bzw. dort nachgewiesen (Alexander & Seehausen, 2021). Da sich die beiden Arten hybridisieren können, wurden ESVs hier nur auf der Gattungsebene zugewiesen. Sie wurde in allen Seen nachgewiesen. Diese Arten sind generell weit verbreitet und tolerieren auch eutrophe Bedingungen, sind aber durch die kleine Körpergrösse und unauffällige Färbung oft durch andere Fangmethoden schwierig nachweisbar. Der konstante Nachweis mit Umwelt-DNA könnte auf eine hohe Affinität dieser Sequenzen zum Primer hindeuten.

Interessant ist auch das Vorkommen des Sonnenbarschs (*Lepomis gibbosus*) in vier der Kleinseen (Amsoldingensee, Burgäschisee, Inkwilensee, Sängeliweiher), da er nicht heimisch ist. Der Burgäschisee und der Amsoldingensee sind die artenreichsten Seen (n=8). Der Bitterling (*Rhodeus amarus*) wurde relativ selten nachgewiesen: nur im Amsoldingensee, Burgäschisee und Sängeliweiher. Gar nicht nachgewiesen wurden Welse oder Karpfen, obwohl diese durchaus in den Bernern Gewässern vorkommen. Dies könnte aufgrund tiefer Aktivität/DNA-Konzentration dieser Arten sein oder dass die Amplifikation der DNA Sequenzen weniger effizient ist als für andere Arten (sogenannte "Primer-Penalty").



Abbildung 5: Gesamtübersicht aller nachgewiesenen Fisch-Taxa (n= 10) in den Bernern Kleinseen. Auf der horizontalen Achse sind die Kleinseen angeordnet, auf der vertikalen Achse sind die Fischtaxa zu sehen, die taxonomisch geordnet sind. Die Farbskala gibt die proportionale Anzahl Reads des Taxons an im Verhältnis zur Anzahl aller Arten in dem entsprechenden See, so können verschiedene Arten also semiquantitativ innerhalb eines Sees beurteilt werden.

Mollusken

Insgesamt wurden nur wenige Reads aus dem Datensatz den Mollusken zugeordnet, allerdings wurden hier trotzdem mehrere ESVs detektiert ($n = 13$), eines davon wurde einer terrestrischen Gattung (Wegschnecke, *Arion* sp.) zugewiesen und ist in Abbildung 6 dementsprechend nicht dargestellt.

Insgesamt wurden die ESVs neun verschiedenen Gattungen zugewiesen, die meisten davon den Gastropoden (Schnecken). In allen Kleinseen, ausser dem Lobsigensee, konnten Schnecken nachgewiesen werden. Es wurde DNA von Mützenschnecken (*Ferrissia* sp.), Schlammschnecken (*Lymnaea* sp., *Radix* sp.), Sumpfschnecken (*Stagnicola* sp.), Blasenschnecken (*Physella* sp.) und Tellerschnecken (*Hippeutis* sp.) detektiert. Die DNA von *Physella* sp. (Blasenschnecken) war in den meisten Seen nachzuweisen (Amsoldingersee, Burgäschisee, Inkwilersee, Moossee und Sängeliweiher). Die Art *Ferrissia clessiniana* (die flache Mützenschnecke), als einzige Art der Gattung *Ferrissia* zuvor im Jahre 2019 in Bern nachgewiesen, wurde im Amsoldingersee, Burgseeli und Sängeliweiher detektiert. Bei den Bivalvia (Muscheln) wurden drei verschiedene Taxa nachgewiesen, eine davon nur auf dem Level der Ordnung (Cardiida), wozu die Familie der Corbiculidae (Körbchenmuscheln) gehört, von denen die gebietsfremde Art *Corbicula fluminea* im Jahre 2023 im Kanton Bern nachgewiesen wurde (CSCF, Stand 2024).

Die Ordnung wurde nur im Moossee detektiert. Die anderen beiden Taxa gehören den Gattungen *Dreissena* sp. und *Euglesa* sp. (auch *Pisidium*, Erbsenmuscheln) an. Letztere wurde nur im Sängeliweiher nachgewiesen. *Dreissena* sp. umfasst die beiden nicht-einheimischen Arten *Dreissena polymorpha* (Zebrauschel) und *Dreissena rostriformis bugensis* (Quaggamuschel), wobei *Dreissena polymorpha* in der Schweiz weiter verbreitet ist. Sequenzen von *Dreissena* sp. wurde im Moossee und Sängeliweiher (in letzterem allerdings in sehr tiefer Konzentration) detektiert. Für einen genaueren Nachweis und eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Arten empfiehlt sich ein artspezifischer Nachweis mittels einer qPCR mit den Umwelt-DNA-Proben, da dies eine eindeutige taxonomische Zuordnungen ermöglicht. Folglich wurden nur im Moossee und Sängeliweiher Muschel-DNA detektiert.

Insgesamt wurden im Sängeliweiher die meisten Mollusken gefunden, gefolgt von Amsoldingersee. Die wenigsten Funde wurden im Burgseeli und la Noz mit nur einer Art gemacht, im Oeschinensee und Lobsigensee konnten wir keine Mollusken nachweisen.

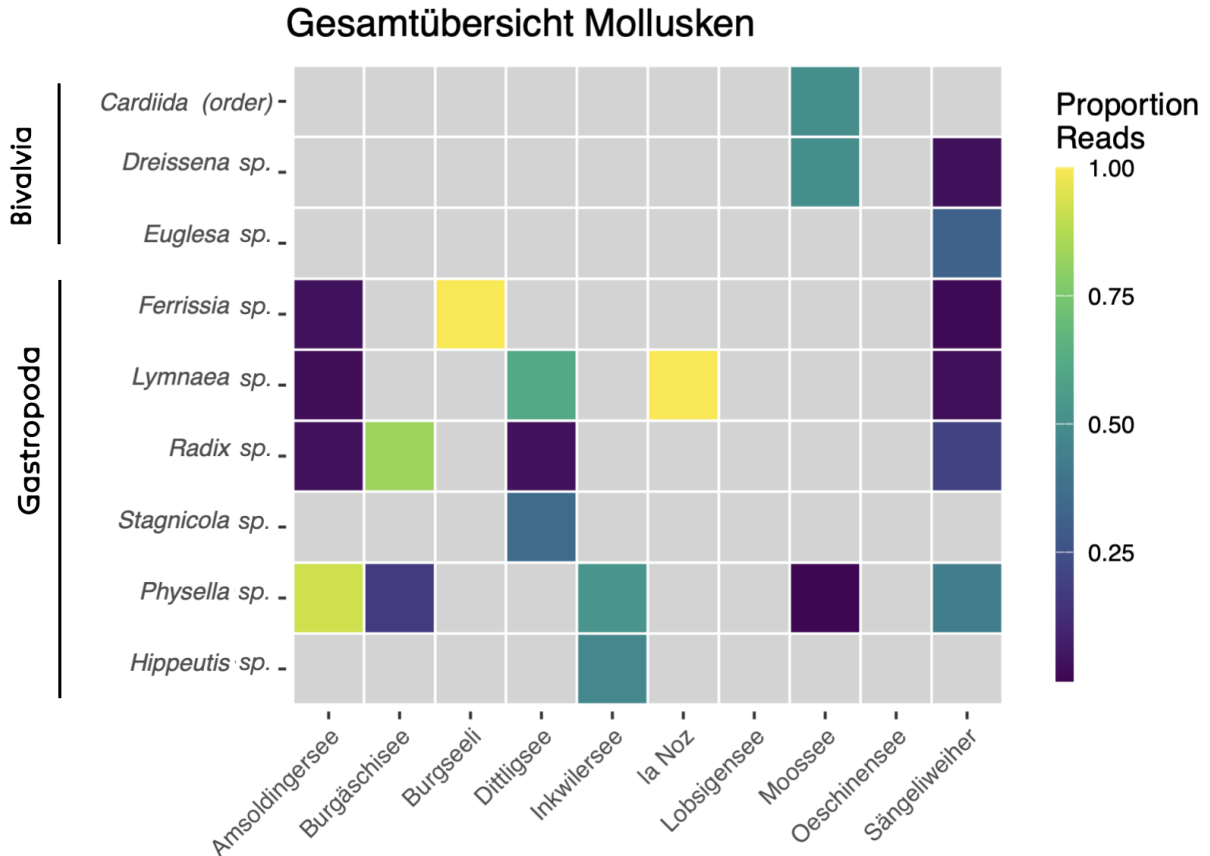


Abbildung 6: Übersicht der Bivalvia (Muscheln) und Gastropoden (Schnecken); insgesamt 12 ESVs welche 9 Gattungen repräsentieren in den Bernern Kleinseen. Die Farbskala gibt die proportionale Anzahl Reads des Taxons an im Verhältnis zur Anzahl aller Arten in dem entsprechenden See, so können verschiedene Arten semiquantitativ innerhalb eines Sees beurteilt werden.

Amphibien

Die Abbildung 7 zeigt eine Gesamtübersicht zu allen nachgewiesenen Amphibien. Die meiste DNA von Amphibien wurde im Oeschinensee, dem Referenzgewässer, gefunden. Mit dem ersten getesteten spezifischen Amphibien-Primer (Balint et al., 2016) wurden nur zwei ESVs nachgewiesen: Einerseits gelang ein Artnachweis der Erdkröte (*Bufo bufo*), bei der anderen Sequenz handelt es sich um die Familie der Echten Frösche (Gattung der Wasserfrösche *Pelophylax sp.*). Erdkröten sind in der Schweiz weit verbreitet und wurden in sechs der zehn Kleinseen nachgewiesen. Da Erdkröten im Frühjahr ihre Laichschnüre in Gewässern ablegen und sich dann als Kaulquappen in stehenden Gewässern aufhalten bis zum Landgang ca. im Juni (abhängig von der Höhenlage), könnte dies die Menge an DNA-Nachweisen erklären.

Zur Familie der Ranidae gehört die Gattung der Wasserfrösche (*Pelophylax* sp.), deren Arten untereinander hybridisieren können und die einheimische wie auch eingeschleppte Arten umfasst. Das ESV aus der Gattung *Pelophylax* sp. konnte daher nicht eindeutig einer Art zugeordnet werden und wurde im Dittligsee, la Noz, Lobsigensee und im Sängeliweiher nachgewiesen. Dies deckt sich mit den Feldbeobachtungen: Bei den drei letzteren Seen wurden Frösche während der Probenahme gehört - zusätzlich auch beim Inkwiler- und Amsoldingersee.

Grundsätzlich amplifizieren die Amphibien-spezifischen Marker eine Vielzahl anderer Arten mit, so dass Artengruppen deren DNA wahrscheinlich häufiger vorkam einen grossen Teil der Amphibien-Daten ausmachten (z.B. Fische oder Rotiferen). Zusätzliche Amphibienarten konnten aber mit dem Fischprimer-Paar erfasst werden, die zu der Familie der Salamandridae (Echte Salamander), wobei ein ESV dem Bergmolch (*Ichthyosaura alpestris*) und eines den Fadenmolchen (*Lissotriton* sp.) zugeordnet wurde (Anhang Abbildung 4). Die zusätzlich erfassten Salamandridae wurden nur im la Noz detektiert.

Die Amphibien-Primer wurden entwickelt von Balint et al., 2016 für die Detektion von Amphibien aus Umwelt-DNA Proben. In der Literatur finden sich Studien aus verschiedenen europäischen Ländern, die diese Primer erfolgreich für die Amplifikation von Amphibien-DNA verwendet haben. Dass die Primer in der Studie der Kleinseen nicht mehr Diversität detektieren konnten, könnte daran liegen, dass nur wenig Amphibien-DNA in den Gewässern präsent war. Die Probenahme fand zu einem Zeitpunkt statt, wo Amphibien oft schon ihr Adult-Stadium erreicht hatten und sich deshalb weniger häufig im Gewässer aufhalten.

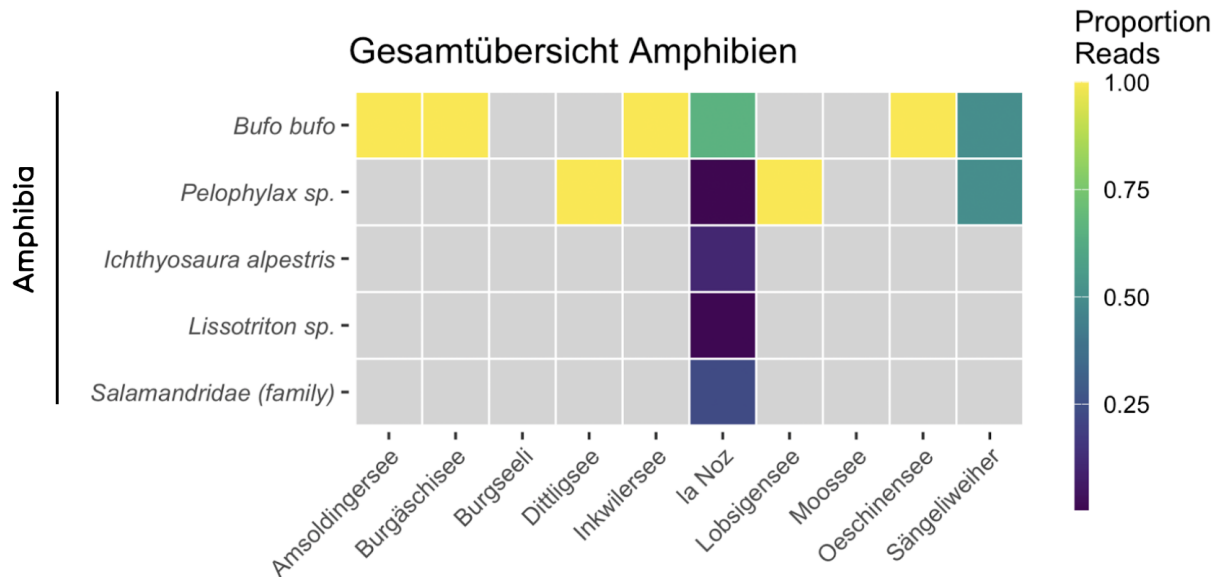


Abbildung 7: Übersicht der Amphibien (insgesamt 5 Taxa auf unterschiedlichem Niveau nachgewiesen). Am häufigsten wurde die Erdkröte nachgewiesen. Die Farbskala gibt die proportionale Anzahl Reads des Taxons an im Verhältnis zur Anzahl aller Arten in dem entsprechenden See, so können verschiedene Arten also semiquantitativ innerhalb eines Sees beurteilt werden.

Beta-Diversität ≈ Unterschiede zwischen Lebensgemeinschaften

Wenn wir an Diversität denken, denken wir meist an die Anzahl der Arten, die wir an einem Ort oder in einem See beobachten können (Alpha-Diversität). Biodiversität kann jedoch auf verschiedene Arten erfasst werden: In zwei Kleinseen kann beispielsweise dieselbe Anzahl Arten erfasst werden, aber es handelt sich nicht unbedingt um die gleichen Arten. Betrachten wir einen See, der eine einzigartige Artengemeinschaft beherbergt (seltene oder endemische Organismen), so wird dies möglicherweise nicht deutlich, wenn man nur die Anzahl der Arten betrachtet.

Beta-Diversität beschreibt hingegen die Vielfalt zwischen zwei Gemeinschaften. Faktisch gesehen beschreibt sie den Unterschied zwischen regionaler Vielfalt und lokaler Vielfalt. Indices der Beta-Diversität entstehen aus einem Vergleich zwischen Gemeinschaften (hier zwischen jeweils zwei verschiedenen Kleinseen) und zeigen an, wie unterschiedlich die Artenzusammensetzungen dieser Seen zueinander sind (Dissimilarität).

Für die hier gemachte Auswertung wird der Sorensen-Beta-Diversitätsindex verwendet. Er ergibt einen niedrigen Wert, wenn die beiden Gemeinschaften ähnlich sind. Zum Beispiel bedeutet ein Beta-Diversitätswert von 0 in einem Vergleich zwischen zwei Proben, dass deren Gemeinschaften identisch sind. Wenn der Index einen hohen Wert für die Beta-Diversität ergibt, bedeutet dies, dass sich die beiden Gemeinschaften stark unterscheiden. Ein Wert von 1 zeigt beispielsweise einen vollständigen Wechsel zwischen zwei Gemeinschaften, d.h. keine Art, die an beiden Stellen vorkommt.

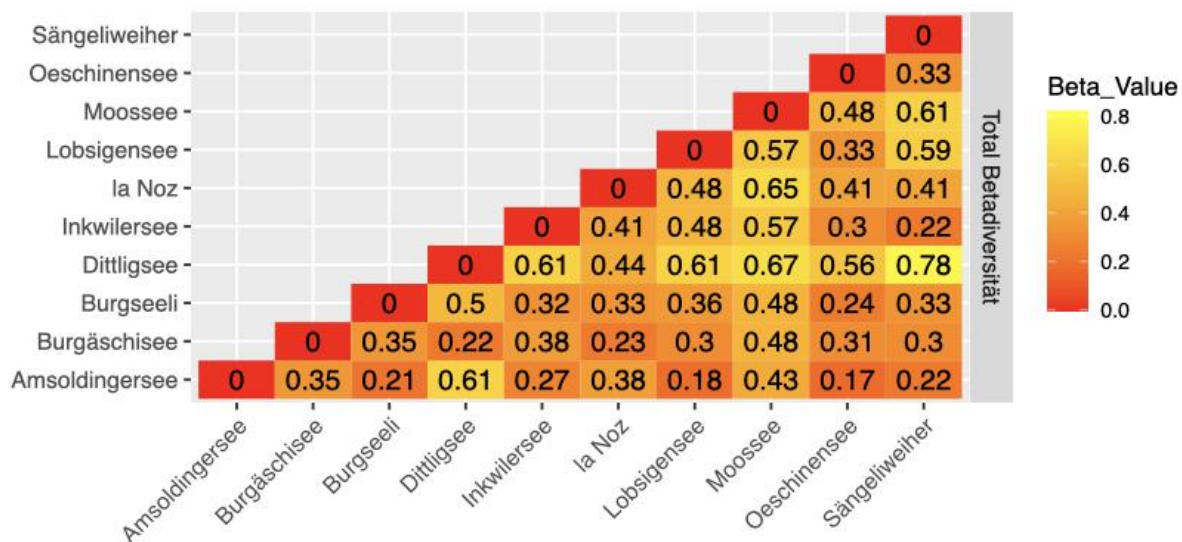


Abbildung 8: Die Dissimilarität („Unähnlichkeit“) zwischen den Seen dargestellt als ein paarweise Vergleich der Lebensgemeinschaft. Das Mass für die Betadiversität ist der Sørensen-Index, je höher der Wert, desto unterschiedlicher sind die Lebensgemeinschaften der beiden Seen. Die Diagonale gefüllt mit dem Wert 0 entspricht dem Vergleich einer Probe mit sich selbst.

Die Werte der Beta-Diversität (Abbildung 8) basieren auf allen vorkommenden Artengruppen der vorherigen Analysen und sind vor allem durch die artenreichste Gruppe der Eukaryoten bestimmt, deren Verteilung sich zwischen den Seen stark unterscheidet. Der Moossee ist relativ einzigartig in der totalen Zusammensetzung, da er mit sieben Seen eine Betadiversität zwischen 0.43 bis 0.67 aufweist. Am ähnlichsten ist er dem Amoldingensee (Werte von 0.43), besonders unterschiedlich zum Dittligsee. Insgesamt am unterschiedlichsten ist der Sängeliweiher vom Dittligsee mit einer Betadiversität von 0.78. Der See mit den tiefsten Betadiversitätswerten ist der Amsoldingensee mit 0.17 als Tiefstwert und ist relativ ähnlich zum Burgseeli, Lobsigensee, Sängeliweiher und Oeschinensee.

Die hier abgebildeten Betadiversitätswerte sind die totale Biodiversität, die sich aufteilen lässt in “Turnover” (Austausch von Arten) und in “Verschachtelung” (Arten kommen hinzu oder fallen weg) (Anhang Abbildung 5).

5. SYNTHESE

Beurteilung der Methodik

Die Auswertung anhand der Umwelt-DNA-Proben zeigt, wie vielfältig die Artengemeinschaften in den Berner Kleinseen sind. Die genommenen Proben und Auswertungen geben einen guten Überblick über die Biodiversitäten. Die Erhebung hat jedoch keinen Anspruch, vollumfassend zu sein. Denn im Verhältnis zum Seevolumen konnte nur ein geringer Anteil Wasser für die DNA-Analysen gefiltert werden. Auch musste bei Probenahmeort und Probezeitpunkt ein Kompromiss für die unterschiedlichen Artengruppen gemacht werden. Die Verwendung von verschiedenen Primer hat zudem gezeigt, dass die jeweilige Zielgruppe nicht zwingend immer diejenige ist, die am besten von den Primern erfasst wird (je nach Konzentration der DNA der Zielgruppe).

Wenn die DNA nur in sehr tiefen Konzentrationen in den Gewässern vorkommt oder/und das Gewässer nicht einheitlich durchmischt ist, erschwert dies den Nachweis. Zudem sind die See-Eigenschaften und die Zusammensetzung der Arten in jedem System einzigartig und so kommt es bei der Umwelt-DNA-Analyse zur Amplifikation einer Vielzahl an DNA-Sequenzen, die der Zielgruppe ähnlich sind. Insbesondere Proben, die gehemmt sind (wie hier Inkwilersee und Oeschinensee) können die Analyse jedoch erschweren, da deren Diversität wahrscheinlich als zu tief eingestuft wird.

Ein Ansatz mit verschiedenen Primern ein gutes Vorgehen, um eine möglichst breite Abdeckung von Arten zu erzielen. Dies kann zwar einerseits die Nachweise von seltenen Arten erschweren, andererseits aber auch einen Einblick in komplementäre Artgruppen zu traditionell erfassten Artengruppen geben. So konnten mittels einer Umwelt-DNA Probenahme unterschiedlichste Tiergruppen erfasst werden, für die es diverser traditioneller Methoden bedarf oder auch Organismen wie z.B. Dipteren (Zweiflügler), die generell schwierig zu bestimmen sind, zugeordnet werden.

Taxonomische Zuordnung

Insgesamt wurde eine Vielzahl an ESVs (Exact Sequence Variants) nachgewiesen, allerdings ist die taxonomische je nach Zielgruppe schwierig. Besonders für die **Fische**, bei denen es eine schweizweite etablierte Referenzdatenbank und eine beschränkte Anzahl Arten gibt, funktioniert der Artnachweis gut. Denn die Referenzdatenbank der Schweizer Fische ist nicht nur vollständig für alle derzeit in der Schweiz nachgewiesenen Arten, sondern wurde in einem Grossprojekt in Zusammenarbeit mit dem BAFU auch für den genetischen Marker 12S ergänzt, so dass die Referenzsequenzen das gesamte geographische Spektrum abdecken (Blackman, Walser 2023). Das zeigt die Bedeutung der Datenbanken für die Interpretation der eDNA-Daten. Trotzdem können nahverwandte Arten auf dem kurzen genetischen Fragment für Fische nicht eindeutig einer Art zugeordnet werden. Die beiden Arten der Gattung *Scardinius* sp. (die Rotfeder und Schwarzfeder), wurden z.B. häufig nachgewiesen. Auch wurde im Bericht der Schneider nachgewiesen (*Alburnoides bilineata*), der eher in schnell fliessenden Bächen angesiedelt ist. Einerseits könnte dieses Signal durchaus durch DNA-Transport in die Seen entstehen, allerdings könnte es sich lohnen, nahverwandte Arten in der Referenzdatenbank zu überprüfen.

Für andere sehr diverse Gruppen wie die **Eukaryoten**, insbesondere in Kombination mit universellen Primern, führt zu einer hohen Anzahl ESVs, deren taxonomische Zuordnung teilweise schwierig bleibt. So sind die Sequenzen für Rädertierchen in den Datenbanken limitiert und mit einer konservativen taxonomischen Zuordnung werden Sequenzen deshalb nur grob taxonomische Rängen zugeordnet. Ausserdem haben wir in diesem Bericht die Ergebnisse mehrerer Marker kombiniert und die Annotation dann jeweils auf die gröbere Klassifizierung angepasst, um Redundanzen zu vermeiden. Dementsprechend sind viele ESVs nur auf Gattung annotiert, vor allem wenn sie in mehreren Markern nachgewiesen wurden.

Für eine bessere Aufschlüsselung gewisser Artengruppen (z.B. aquatischer Insekten) würde es sich empfehlen, gruppen-spezifische Primer zu verwenden. Im Falle der aquatischen Insekten, die unter anderem wichtige Bioindikatoren sind, könnten andere Primer in derselben COI Genregion (zum Beispiel fwh1/2 und EPTDrn-Primern von Elbrecht, Vamos et al. 2017, Leese et al. 2021) den Nachweis dieser Arten zu optimieren.

In Jahren zuvor lag der Fokus vor allem auf Plankton und universale Primer (wie hier für Eukaryoten) können auch Informationen über Kleinstlebewesen generieren. Wenn man spezifische Primer verwendet, würde man weniger Informationen über andere Invertebraten, Chordaten und Kleinstlebewesen (wie Plankton) erwarten. In Seen ist das Verhältnis von Insekten-DNA und anderen mehrzelligen Organismen, die teilweise mehrere Zellkerne enthalten, eher ungünstig. Gerade beim Stamm der Rädertierchen wurden zwar viele ESVs nachgewiesen, aber letztlich in wenige Gattungen kollabiert. Die Referenz-Sequenzen sind limitiert und mit einer konservativen taxonomischen Zuordnung werden Sequenzen deshalb nur grob taxonomische Rängen zugeordnet. Die beiden kleineren Artgruppen der **Mollusken** und **Amphibien** weisen einige invasive und seltene Arten auf, die mit klassischen Methoden häufig schwierig zu erfassen sind. Bei den Mollusken waren die Bestimmungen leider nur auf Gattungs-Niveau bestimmt, was an einem relativ konservativen Ansatz zur Zuordnung und der Verfügbarkeit von guten Referenzen in den öffentlichen globalen Datenbanken liegen kann. Andernfalls würde sich zur Unterscheidung gewisser invasiver Arten (z.B. *Dreissena* sp.) auch ein artspezifisches Assay anbieten. In anderen Fällen genügt die Information der Gattung jedoch, um die Zuordnung zu gebietsfremden Arten machen zu können.

Hinweis: Der vorliegende Fachbericht fokussiert auf die methodische und taxonomische Auswertung der eDNA Ergebnisse. Eine Darstellung der Ergebnisse pro See erfolgt in separaten Berichten, siehe www.be.ch/gewaesserqualitaet.

Empfehlung

Insgesamt wurde eine Vielzahl an ESVs (Exact Sequence Variants) nachgewiesen, allerdings ist die taxonomische je nach Zielgruppe schwierig. Besonders für die Fische, bei denen es eine schweizweite etablierte Referenzdatenbank und eine beschränkte Anzahl Arten gibt, funktioniert der Artnachweis gut. Für sehr diverse Gruppen, wie die Eukaryoten (mit universellen Primern), führt zu einer hohen Zahl ESVs, deren taxonomische Zuordnung teilweise schwierig bleibt. Für eine bessere Aufschlüsselung gewisser Artengruppen (z.B. aquatischer Insekten) würde es sich empfehlen, gruppen-spezifische Primer zu verwenden. Die beiden kleineren Artgruppen der Mollusken und Amphibien weisen einige invasive und seltene Arten auf, die mit klassischen Methoden häufig schwierig zu erfassen sind. Mit einer Optimierung der Primer und der Referenzdatenbanken könnte der Nachweis und die Artzuweisung bei diesen Gruppen verbessert werden.

6. QUELLEN

- Alexander, Timothy; Seehausen, Ole (2021). *Diversity, distribution and community composition of fish in perialpine lakes*. Eawag: Das Wasserforschungsinstitut des ETH-Bereichs. ISBN: 978-3-906484-76-1. <https://boris.unibe.ch/id/eprint/162144>
- Bálint M, Nowak C, Márton O, et al. Accuracy, limitations and cost efficiency of eDNA-based community survey in tropical frogs. *Mol Ecol Resour.* 2018; 18: 1415–1426. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12934>
- Blackman, R. C., Walser, J.-C., Rüber, L., Brantschen, J., Villalba, S., Brodersen, J., Seehausen, O., & Altermatt, F. (2023). General principles for assignments of communities from eDNA: Open versus closed taxonomic databases. *Environmental DNA*, 5, 326–342. <https://doi.org/10.1002/edn3.382>
- Buchner D, Macher TH, Leese F. APSCALE: advanced pipeline for simple yet comprehensive analyses of DNA metabarcoding data. *Bioinformatics.* 2022 Oct 14;38(20):4817-4819. doi: 10.1093/bioinformatics/btac588. PMID: 36029248; PMCID: PMC9563694.
- Elbrecht, V., Vamos, E.E., Meissner, K., Aroviita, J. and Leese, F. (2017), Assessing strengths and weaknesses of DNA metabarcoding-based macroinvertebrate identification for routine stream monitoring. *Methods Ecol Evol*, 8: 1265-1275. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12789>
- Leese F, Sander M, Buchner D, Elbrecht V, Haase P, Zizka VMA. Improved freshwater macroinvertebrate detection from environmental DNA through minimized nontarget amplification. *Environmental DNA*. 2021;3:261–276. <https://doi.org/10.1002/edn3.177>
- Leray, M., Knowlton, N., & Machida, R. J. (2022). MIDORI2: A collection of quality controlled, preformatted, and regularly updated reference databases for taxonomic assignment of eukaryotic mitochondrial sequences. *Environmental DNA*, 4, 894–907. <https://doi.org/10.1002/edn3.303>
- Mahé F, Rognes T, Quince C, de Vargas C, Dunthorn M. Swarm v2: highly-scalable and high-resolution amplicon clustering. *PeerJ.* 2015 Dec 10;3:e1420. doi: 10.7717/peerj.1420. PMID: 26713226; PMCID: PMC4690345.
- Schweizerisches Zentrum für die Kartographie der Fauna, info fauna - CSCF. <https://www.infofauna.ch/de/daten/daten-beziehen#gsc.tab=0>. Stand Mai 2024.

1. ANHANG

Protokolle für Molekulararbeiten

Extraktionen

Als erster Schritt wurde zu jedem der Röhrchen Proteinase K hinzugegeben und anschliessend über Nacht bei 56 °C inkubiert. Dieser Schritt diente dazu, Zellwände aufzubrechen und DNA in Lösung zu bringen. Am nächsten Tag wurde das Lysat vom Filter durch Zentrifugation zurückgewonnen. Anschliessend wurde AL-Puffer als weiterer Lysis-Puffer in das Eppendorf-Röhrchen mit der Pufferlösung hinzugefügt. Nach der Zugabe von gekühltem hundertprozentigen Ethanol fällt die DNA aus und wurde mit Pufferlösung in mehreren Schritten auf eine DNA-bindende Matrix (DNeasy Mini spin column) geladen. Während die DNA an die Matrix gebunden war, wurde sie in zwei Waschschritten (AW1 und AW2-Puffer) durch Zugabe und anschliessende Abzentrifugation der Puffer gereinigt. Mit einem zusätzlichen Zentrifugationsschritt wurden die Puffer vollständig von der Matrix entfernt und die Matrix getrocknet. Im letzten Schritt der Extraktion wurde die gereinigte DNA von der Matrix der DNeasy-Mini-Spin column durch die Zugabe von EA-Buffer (100 µl) in ein Eppendorf-Röhrchen eluiert. Der DNA-Extrakt wurde im Anschluss in einem zusätzlichen Schritt mit dem 'PCR Inhibitor Removal Kit' (Zymo Research) aufgereinigt, um Hemmstoffe für die folgenden Polymerase-Kettenreaktionen (PCR) zu entfernen.

PCR

Eine PCR-Reaktion bestand aus dem Qiagen Multiplex Mastermix, BSA (Konzentration 10 mg/µl), dem Artengruppen-spezifischen Forward- und Reverse-Primer in der entsprechenden Konzentration (optimiert für die Artengruppe) und 3 µl DNA-freiem Wasser. Der Mastermix für die PCR wurde im DNA-freien Bereich hergestellt und jeweils 9 µl des Mastermix in jedes PCR-Röhrchen zugegeben. Als Negativkontrolle wurde 1 µl DNA-freies Wasser in eines der PCR-Röhrchen hinzugefügt. Die PCR-Röhrchen wurden dann in den DNA-Bereich des Labors transferiert, wo jeweils 1 µl des DNA-Extrakts hinzugefügt wurde und die Röhrchen dann verschlossen wurden. Für die Reaktion mit dem Mollusken-Primer wurde gemäss der Originalpublikation ein Blocking-Primer verwendet, der die Amplifikation von DNA-Fragmenten der Fische minimieren soll. Die PCR wurde in einem Thermocycler

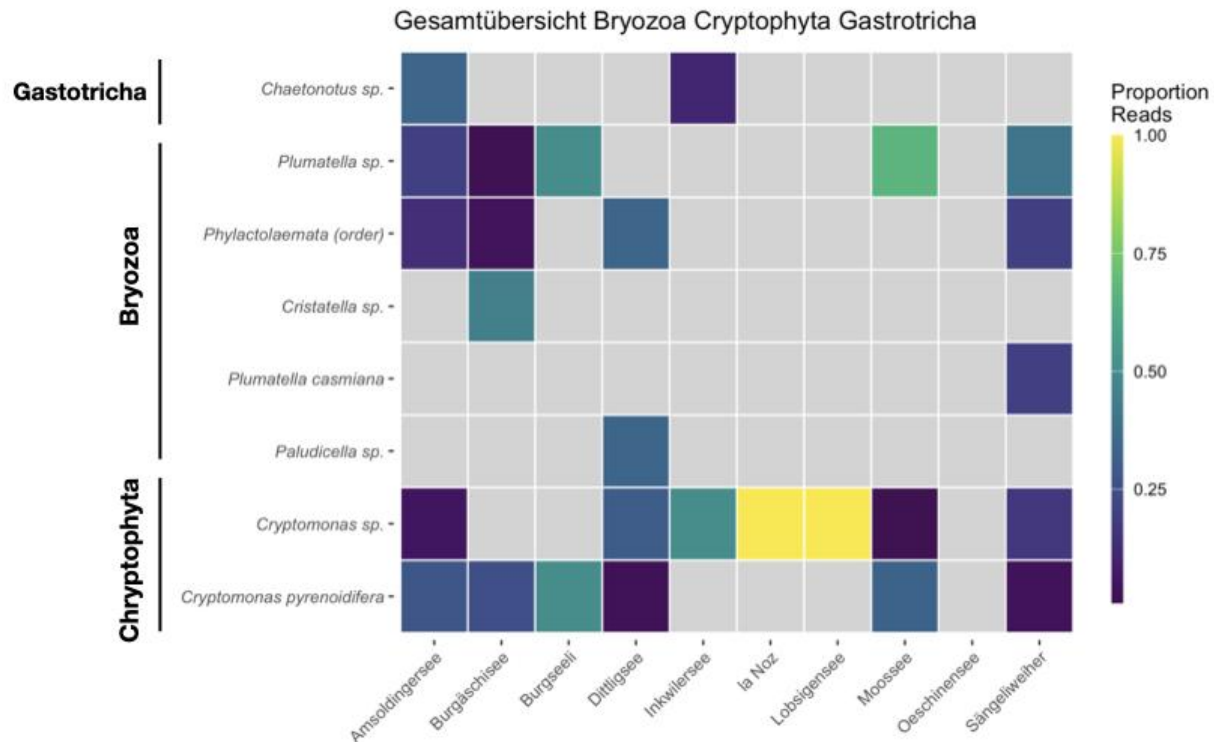
(Eppendorf Mastercycler X50s) gemäss folgendem Protokoll durchgeführt: Die Aktivierung der Polymerase begann bei 95°, gefolgt von einem Annealing-Schritt bei einer Temperatur, die abhängig von dem Gen-spezifischen Primer war, und endete mit einer Extension bei 72 °C. Die Anzahl Zyklen und die jeweilige Zeit der Temperatur waren abhängig vom Gen-spezifischen Protokoll. Die PCR endete mit einer Extension-Phase bei 72 °C für 5 Minuten und die Produkte wurden anschliessend auf 10 °C gekühlt.

Indexing der Sequenzen

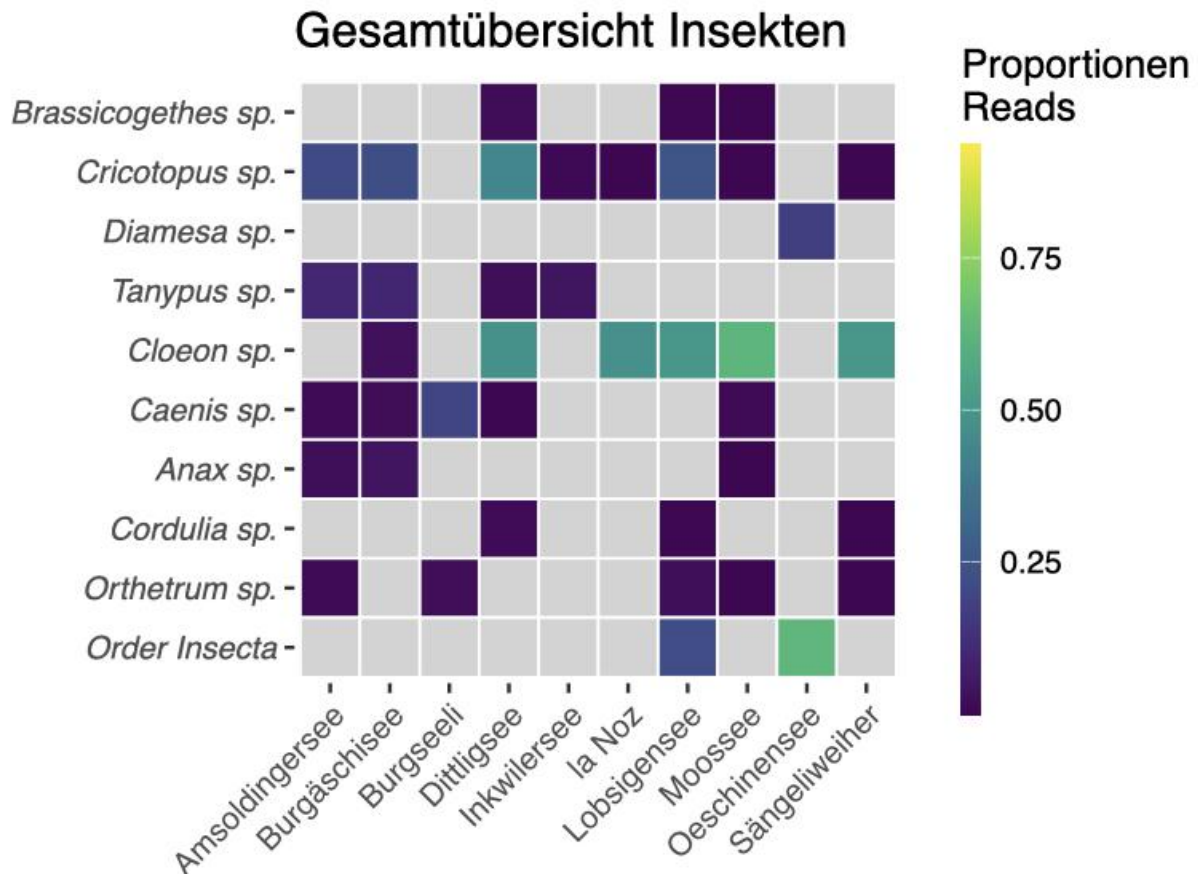
Jede Probe wurde in einer PCR-Reaktion mit einem Index markiert, um am Schluss die Sequenzen anhand von diesem Index nach Proben sortieren zu können. Diese zweite Index-PCR Reaktion bestand aus 6 µl DNA-freiem Wasser, 12 µl KAPA HIFI MM (1x), 2 µl des PCR-Produkts Pools und 2 µl der einzigartigen Index-Kombination (i5 und i7), was ein Gesamtvolumen von 20 µl ergab. Die PCR-Bedingungen waren wie folgt: Die Reaktion startete bei 95 °C für 3 Minuten, gefolgt von einem thermischen Zyklus (8 Zyklen) mit 95 °C für 30 s; 64 °C für 30 s; 72 °C für 45 s; und eine abschliessende Extension bei 72 °C für 5 Minuten, bevor die Proben auf 10 °C abgekühlt wurden.

Zusätzliche Darstellungen der Rohdaten

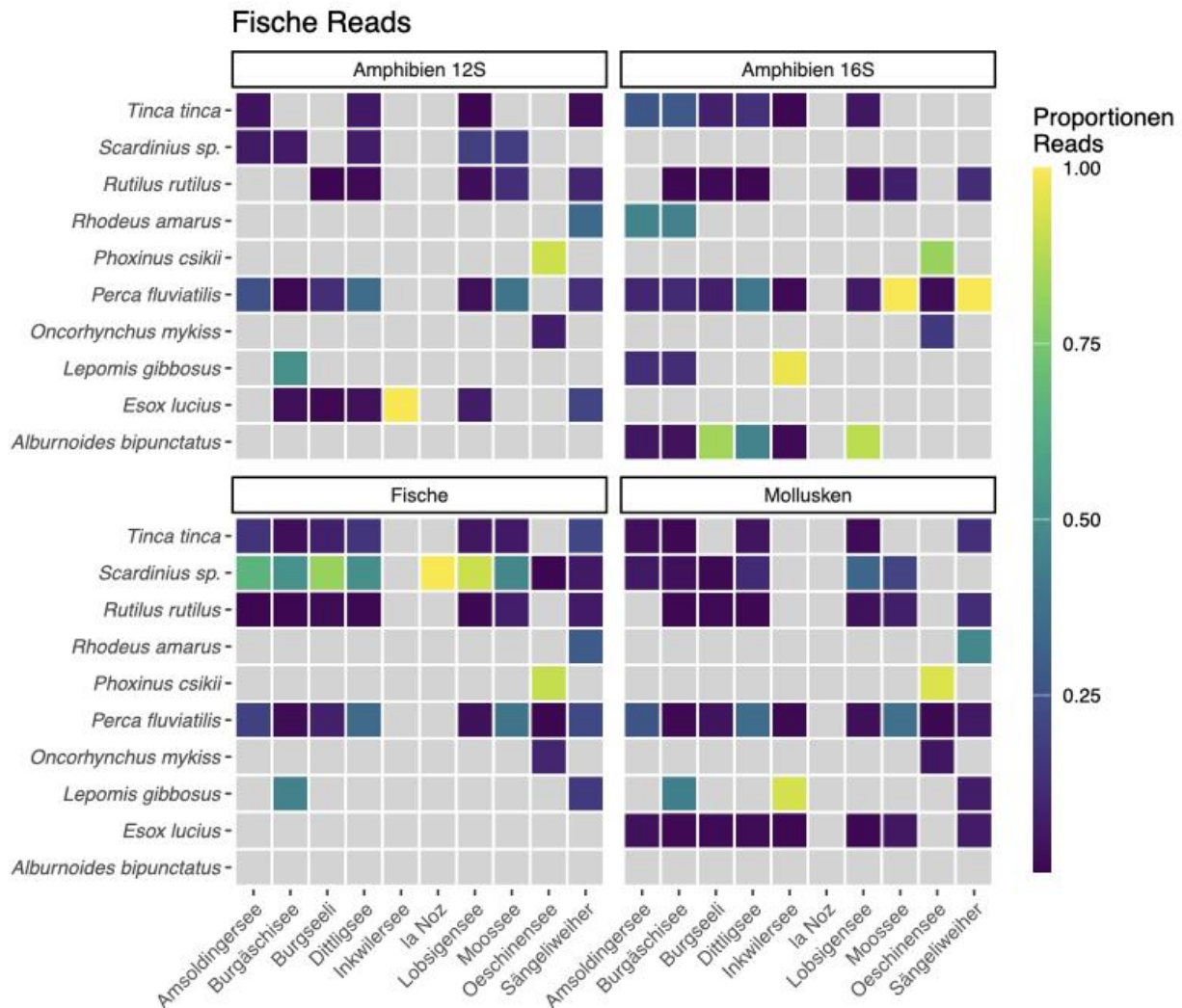
Hier im Anhang werden die Abbildungen 2 bis 6 nochmals mit der Anzahl Reads dargestellt. Während die Abbildungen im Hauptteil als Gesamtübersicht aller fünf Datensätze dienen, sind in einigen der folgenden Abbildungen die genetischen Marker einzeln dargestellt (für Fische und Amphibien). In dieser Form der Darstellung kann man sehen, welche Art mit welchem Primer nachgewiesen werden konnte. Für Eukaryoten wurden sehr viele Taxa gefunden, weshalb auf eine Darstellung in der Form verzichtet wurde. Ausserdem wurden zusätzliche Abbildung zur Beta diversität und zur Gruppe der Bryozoa, Cryptophyta,



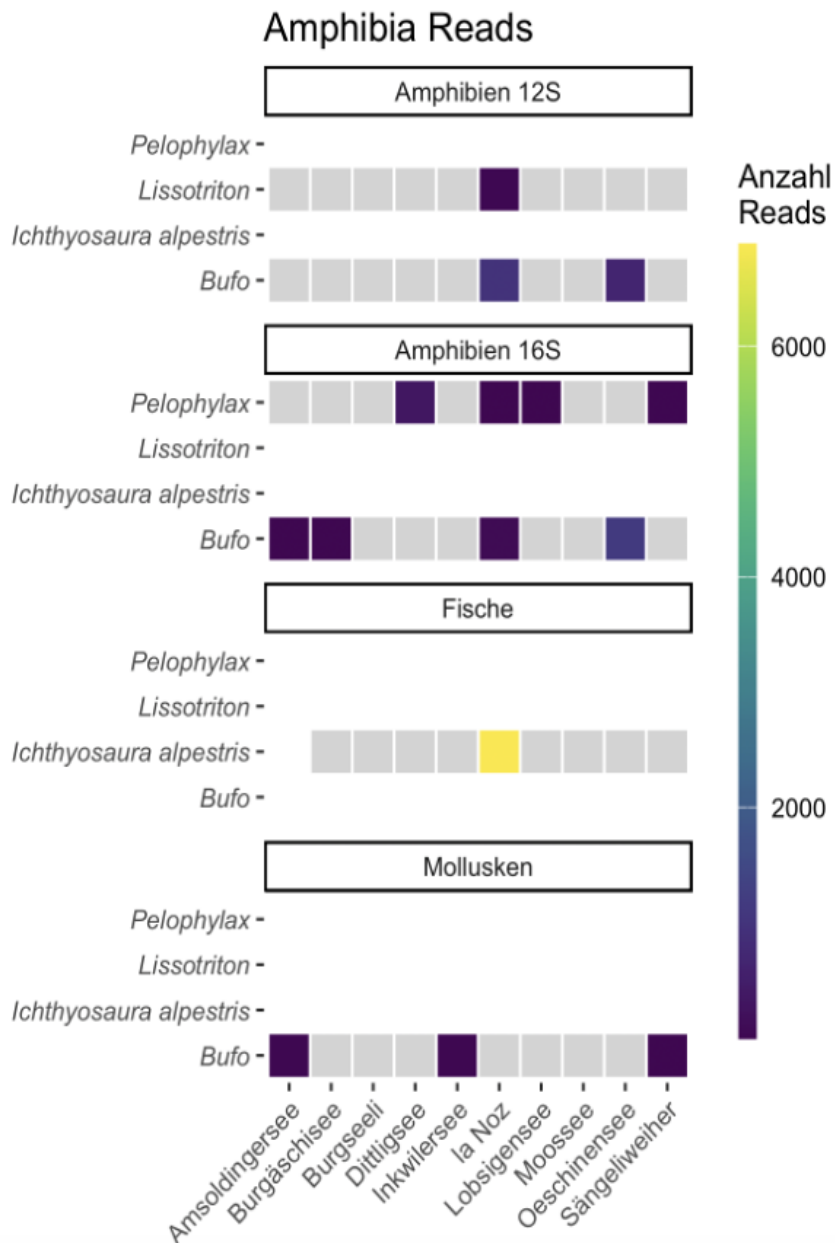
Anhang Abbildung 1: Übersicht der Bryozoa (Moostierchen), Cryptophyta (Schlundgeissler) und Gastrottricha (Bauchhärlinge), die mit insgesamt 8 taxonomischen Einheiten nachgewiesen wurden. Die Farbskala gibt die proportionale Anzahl Reads des Taxons an im Verhältnis zur Anzahl aller Arten in dem entsprechenden See, so können verschiedene Arten also semiquantitativ innerhalb eines Sees beurteilt werden.



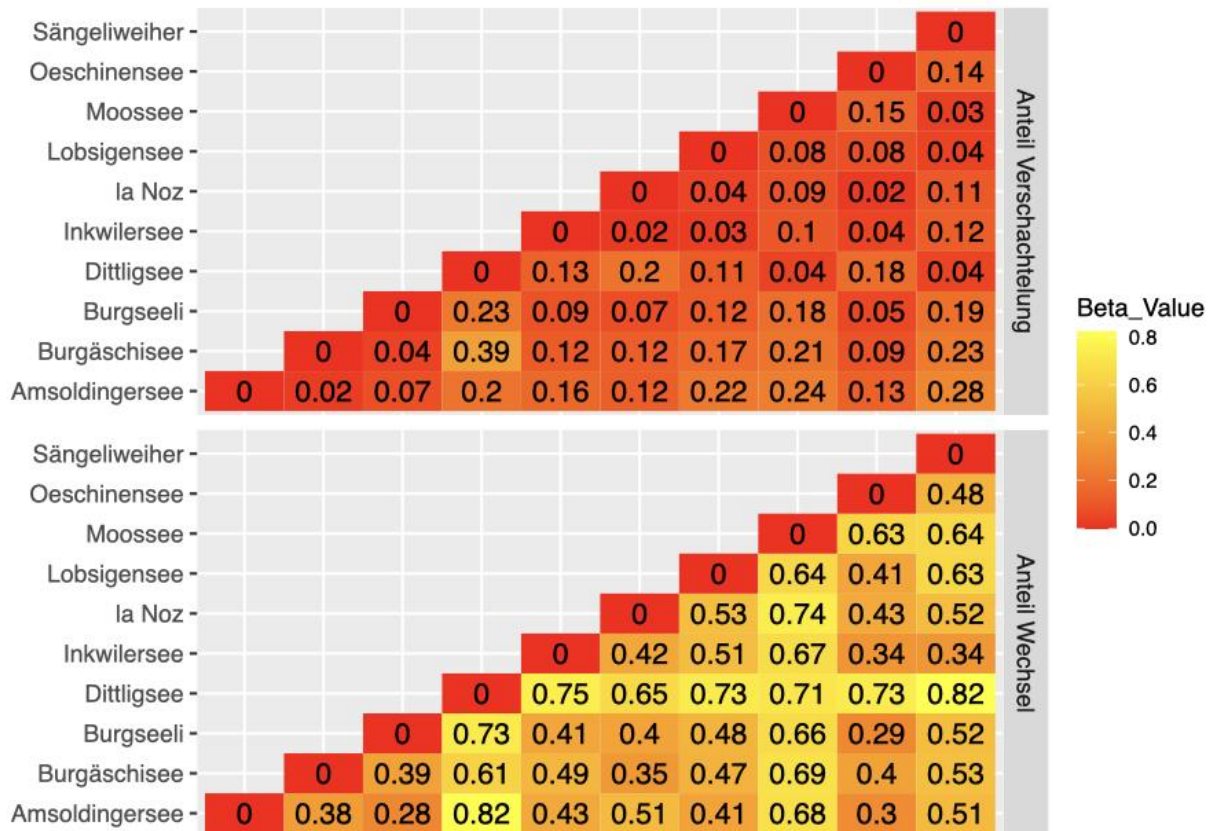
Anhang Abbildung 2: Übersicht der Insekten als Untergruppe der Eukaryoten (Abbildung 2 im Hauptteil) über alle genetischen Markern. Die Farbskala gibt die proportionale Anzahl Reads des Taxons an im Verhältnis zur Anzahl aller Arten in dem entsprechenden See, so können verschiedene Arten also semiquantitativ innerhalb eines Sees beurteilt werden.



Anhang Abbildung 3: Übersicht der Fische mit den einzelnen genetischen Markern. Die Farbskala gibt die proportionale Anzahl Reads des Taxons an im Verhältnis zur Anzahl aller Arten in dem entsprechenden See, so können verschiedene Arten also semiquantitativ innerhalb eines Sees beurteilt werden.



Anhang Abbildung 4: Übersicht der Amphibien mit den einzelnen genetischen Marker. Die Farbskala gibt die proportionale Anzahl Reads des Taxons an im Verhältnis zur Anzahl aller Arten in dem entsprechenden See, so können verschiedene Arten also semiquantitativ innerhalb eines Sees beurteilt werden. Weisse Zeilen repräsentieren keine Werte für diese Kombination im Datensatz.



Anhang Abbildung 5: Die Dissimilarität ("Unähnlichkeit") zwischen den Seen dargestellt als ein paarweise Vergleich der Lebensgemeinschaft. Hier dargestellt sind die beiden Komponenten "Wechsel" und "Verschachtelung". Der Austausch von Arten zwischen zwei Seen ("Wechsel") ist bei allen Vergleichen zwischen Kleinseen der dominante Anteil, mehr als das reine Hinzufügen oder Wegfallen von Arten.