

Neobiota eDNA-Monitoring Aare 2022



ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen der koordinierten biologischen Untersuchung an der Aare, zwischen dem Bielersee und Rhein, führen die Kantone Aargau, Bern und Solothurn ein Monitoring mittels Umwelt-DNA (eDNA) zur Überwachung von aquatischen invasiven Organismen (Neobiota) aus. 2022 wurden entlang der Aare an sieben Stellen eDNA-Proben getätigt, welche anschliessend mittels Metabarcoding von verschiedenen Primern auf DNA-Spuren untersucht wurden. 18 Arten der Neobiota-Beobachtungsliste und drei weitere, nicht-einheimische Arten wurden detektiert, was einen der Vorteile des Metabarcoding-Ansatzes hervorhebt. Für Nachweise von Fischen bzw. Mollusken sind die beiden spezifischen Primer MiFish bzw. MOL16S unabdingbar. Die etwas breiteren COI-Primer fwh2 und Leray/Geller überschneiden sich stark in der Abdeckung, wobei mit fwh2 die Crustaceen besser erfasst werden, während Leray/Geller einzelne Arten aus verschiedenen taxonomischen Gruppen findet. Mit den gewählten Metabarcoding-Primern konnten nicht alle Arten gefunden werden, daher sind für diesen Ansatz in zukünftigen Untersuchungen prioritäre Arten zu definieren.


1. ZIELSETZUNG

Im Rahmen der koordinierten biologischen Untersuchung an der Aare, zwischen dem Bielersee und Rhein, führen die Kantone Aargau, Bern und Solothurn ein Monitoring mittels Umwelt-DNA (eDNA) zur Überwachung von aquatischen invasiven Organismen (Neobiota) aus. 2022 wurden entlang der Aare an sieben Stellen eDNA-Proben getätigt, welche anschliessend mittels Metabarcoding auf DNA-Spuren untersucht wurden.

Grundsätzlich macht ein Metabarcoding-Ansatz immer dann Sinn, wenn mehrere Arten aus der gleichen Artgruppe gesucht werden. Die Beobachtungsliste der Aare umfasst neun unterschiedliche Phyla, welche zu drei verschiedenen Reichen gehören. Die Arten umspannen also eine grosse evolutionäre bzw. genetische Distanz. Daher ist es unmöglich, mit einem einzigen Primer alle Taxa abzudecken und eine Kombination von verschiedenen Primern wurde getestet. Zur gleichen Zeit wurden Makrozoobenthos-Aufnahmen an den verschiedenen Stellen getätigt, was als aktuelle Artenliste zur Referenz hinzugezogen werden kann.

2. MATERIAL & METHODEN

2.1 Probenahme

Entlang der Aare wurden an sieben Stellen eDNA-Proben  getätigt (Tabelle 1). Die Probenahmen fanden zwischen dem 7. und 18. März 2022 statt. An jeder Probestelle wurden das linke sowie das rechte Ufer der Aare mit jeweils zwei Replikaten beprobt, insgesamt stehen also vier Replikate pro Stelle zur Verfügung. Die Probenahmen fanden vom Ufer aus statt und wurden durch die HYDRA AG ausgeführt.

2.2 Filtration

Die Filtration der eDNA-Proben fand vor Ort im Feld statt und wurde ebenfalls von der HYDRA AG durchgeführt. Pro Probestelle wurde 1 L Flusswasser mittels steriler Spritze von Hand durch einen Sterivex-Filter filtriert. Danach wurde der Sterivex-Filter auf beiden Seiten mit einer Luer-Lock-Kappe verschlossen und zusammen mit dem Filter-Replikat derselben

Uferseite in einen Ziplock gegeben. Die eDNA-Proben wurden bis zum Ende des Feldtages in einer Kühlbox und anschliessend bei -20° C bis zur Extraktion aufbewahrt.

Tabelle 1: Liste der Probestellen, deren Koordinaten (LV95) und Datum der Probenahme.

Probestelle	Uferseite	Kürzel	Koordinaten (E)	Koordinaten (N)	Datum
Felsenau	Links	AN_Fel_L	2658806	1272548	18.03.22
Felsenau	Rechts	AN_Fel_R	2658921	1272336	18.03.22
Brugg	Links	AN_Bru_L	2658790	1259668	17.03.22
Brugg	Rechts	AN_Bru_R	2658668	1259586	17.03.22
Olten	Links	AN_Olt_L	2635995	1246417	11.03.22
Olten	Rechts	AN_Olt_R	2636003	1246286	11.03.22
Wangen	Links	AN_Wan_L	2615204	1231714	09.03.22
Wangen	Rechts	AN_Wan_R	2615456	1231717	09.03.22
Flumenthal	Links	AN_Flu_L	2612871	1231204	07.03.22
Flumenthal	Rechts	AN_Flu_R	2612848	1231127	07.03.22
Arch	Links	AN_Arc_L	2598324	1224343	08.03.22
Arch	Rechts	AN_Arc_R	2598658	1224512	08.03.22
Nidau	Links	AN_Nid_L	2584392	1219219	08.03.22
Nidau	Rechts	AN_Nid_R	2584385	1219142	08.03.22

Filter-Kontrollen wurden ebenfalls im Feld generiert. Am Anfang (07.03.22, Prä-Filter-Kontrolle) und am Ende des Projektes (18.03.22, Post-Filter-Kontrolle) wurde jeweils ein Replikat bestehend aus 1 L destilliertem Wasser mit ins Feld genommen und vor Ort filtriert. Die Filter-Kontrollen wurden gleich wie alle anderen eDNA-Proben behandelt.

2.3 Molekulare Analyse

Die molekulare Analyse fand in den Laboren der SimplexDNA AG in Winterthur und im Genetic Diversity Center (GDC) an der ETH Zürich statt. Prä- und Post-PCR Arbeiten wurden räumlich getrennt durchgeführt. Detaillierte Angaben zur molekularen Analyse können im Anhang 5.1 entnommen werden.

Die Proben wurden randomisiert und in zwei unterschiedlichen Batches mit jeweils einer Extraktions-Kontrolle extrahiert. Für die Extraktionen wurde das 'Blood & Tissue Kit' (Qiagen)

verwendet, nach dem Protokoll von Spens *et al.*¹. Für die Herstellung der Libraries wurde ein 2-Schritt PCR-Protokoll verwendet. Im ersten Schritt wurde eine PCR mit Tails durchgeführt (Tabelle 2). Bei den MOL16S-Primern wurde dabei gemäss der originalen Publikation ein Blocking-Primer für Fische verwendet. Im zweiten Schritt wurde jede eDNA-Probe mit einem einzigartigen Index versehen. Die Libraries für MiFish und MOL16S wurden gepoolt und im selben 500 Zyklus Standard Kit v2 sequenziert. Die Libraries für fwh2 wurden ebenfalls mit einem 500 Zyklus Standard Kit v2 sequenziert, während die Libraries für Crust 16S und Leray/Geller gepoolt wurden und das 600 Zyklus Standard Kit v3 verwendet wurde.

Tabell 2: Verwendete Primer, deren verwendete Abkürzungen im Bericht und ihre spezifische Genregion. Modifizierte Basen gegenüber den originalen Publikationen sind unterstrichen.

Gen	Abkürzung	Primer	Sequenz (5'-3')
12S	MiFish	MiFish-U-F ²	<u>G</u> T <u>C</u> GGT AAA ACT CGT GCC AGC
		MiFish-U-R ²	CAT AGT GGG GTA TCT AAT CCC AGT TTG
16S	MOL16S	MOL16S_F ³	<u>R</u> <u>A</u> <u>A</u> <u>A</u> GA CRA GAA GAC CCT
		MOL16S_R ³	ART CCA ACA TCG AGG T
16S	Crust16S	Crust16S_F(short) ⁴	GGG ACG ATA AGA CCC TAW A
		Crust16S_F(short) ⁴	ATT ACG CTG TTA TCC CTA AAG
COI	fwh2	fwhF2 ^b	GGD ACW GGW TGA ACW GTW TAY CCH CC
		fwhR2n ^b	GTR ATW GCH CCD GCT ARW ACW GG
COI	Leray/Geller	mICOLintF ⁶	GGW ACW GGW TGA ACW GTW TAY CCY CC
		jgHCO2198 ⁷	TAI ACY TCI GGR TGI CCR AAR AAY CA

2.4 Bioinformatische Analyse

Detaillierte Angaben und Resultate zur bioinformatischen Analyse können im Anhang 5.2 entnommen werden. Die Sequenzdatenanalyse bestand aus den folgenden Schritten: (A) die Zuordnung der Sequenzen zu den jeweiligen Proben, (B) dem Filtern von Reads mit niedriger Qualität, (C) das Entfernen der Primersequenzen, (D) dem Trimmen der Reads auf die

spezifischen Längen und Qualität pro Marker (E) dem Korrigieren von Sequenzierfehlern mit einem statistischen Modell.

Die fehlerbereinigten und gefilterten Sequenzen wurden anschliessend zu ZOTUs (Zero-radiated Operational Taxonomic Units) gruppiert. Dabei wurde ein Cluster-Wert von 99% gewählt, d.h. Sequenzen innerhalb des gleichen Clusters unterscheiden sich weniger als 1% in der Abfolge der Basen. Die taxonomische Annotation erfolgte je nach Genregion unterschiedlich. Für die beiden Datensätze fwh2 und Leray/Geller (COI) wurden die Sequenzen mit einem Algorithmus den Referenzsequenzen der publizierten Datenbank MIDORI2 (www.reference-midori.info) zugeordnet. Für MiFish wurde eine manuell kuriierte Datenbank erstellt, welche mit 12S-Referenzen basierend auf NCBI Blast-Hits, MIDORI2 und zusätzlichen Sequenzen aus einer kürzlich publizierten Fisch-Studie⁸. Für die 16S-Genregion (MOL16S und Crust16S), gibt es keine gute Referenzdatenbank und ist daher etwas schwieriger, eine gute Annotationen zu bekommen. Aus der NCBI Nucleotide Datenbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) wurden alle Sequenzen heruntergeladen, welche mit 16S und Eukaryoten assoziiert sind.

In der weiteren Datenanalyse wurden in einem ersten Schritt potentielle Kontaminationen im Labor entfernt. Dabei werden die gefundenen ZOTUs in den Negativkontrollen und deren Anzahl Reads von allen eDNA-Proben abgezogen. Danach wurden die Anteile der Reads eines ZOTUs innerhalb der Probe berechnet. Anschliessend wurden alle ZOTUs mit demselben Artnamen zusammengefasst bzw. deren Anteile Reads aufsummiert. Der Artname wurde mittels der Global Biodiversity Information Facility (www.gbif.org) auf Aktualität und allfällige Basionyme überprüft.

3. RESULTATE & DISKUSSION

3.1 Generell

Die verschiedenen Runs erzielten gute Qualität und die folgende Anzahl Reads: fwh2 12.07 M, MiFish und MOL16S 15.63 M, Crust 16S und Leray/Geller 24.47 M. In der Tabelle 3 sind die spezifischen Datensätze, deren Anzahl ZOTUs und die verbleibende Anzahl Reads nach der

bioinformatischen Analyse zu finden. Die etwas breiteren Primer fwh2 und Leray/Geller erzeugten wesentlich mehr ZOTUs als zum Beispiel der Fisch-spezifische Primer MiFish. Spezifische Primer-Sets für Zielgruppen sind meist besser, da vor allem viel mehr Reads für die Zielgruppe generiert werden, was meistens zu einer besseren Detektion führt. Bei MiFish konnten so ca. 99% der Reads Fischen zugeordnet werden, bei dem Leray/Geller etwa 0.2%. Trotzdem wurden auch einige Fischarten mit dem letzteren Primer gefunden. Nebenbefunde sind mit anderen Primern möglich, jedoch geben sie oft ein weniger vollständiges Bild ab.

Tabelle 3: Datensätze, deren Anzahl ZOTUs und die verbleibende Anzahl Reads (in Millionen) nach der bioinformatischen Analyse.

Datensatz	Anzahl ZOTUs	Reads (M)
MiFish	91	4.97
MOL16S	1480	5.58
Crust16S	785	15.92
fwh2	7774	7.44
Leray/Geller	3092	2.48

Für die folgenden Abbildungen wurden jeweils die Resultate der vier Filterreplikate an einer Probestelle übereinander abgebildet. Ausnahme ist dabei der Datensatz für Leray/Geller, da die Filter-Replikate einer Probestelle jeweils schon vor dem Sequenzieren zusammengelegt wurden. Sofern die Art gemäss CSCF als eingeführt (NEO) bezeichnet wird, ist deren Namen in Rot dargestellt. Graue Artnamen weisen entweder auf eine unklare taxonomische Annotation und/oder unklare Verbreitung der Art hin. Im jeweiligen Text werden dazu genauere Informationen gegeben. Für die Verbreitung einer Art wurde wo möglich der Kartenserver des CSCF oder als Alternative der Atlas des GBIF verwendet.

3.2 Fische

Für die Fische wurden mit dem MiFish Primer am meisten Arten und Reads für Fische gefunden (Abb. 1). Mittels Leray/Geller und MOL16S konnten auch einige Arten detektiert werden, jedoch deutlich weniger verschiedene Arten und viel weniger Reads.

Aus der Beobachtungsliste der Neobiota wurden *Lepomis gibbosus* (Sonnenbarsch) und *Sander lucioperca* (Zander) gefunden. Der Sonnenbarsch wurde bis auf Nidau an allen Stellen gefunden, der Zander jedoch nur in Flumenthal. *Ponticola kessleri* und *Neogobius melanostomus* wurden nicht detektiert. Andere Grundeln, wie zum Beispiel *Gobio gobio* (Gründling), waren jedoch nachweisbar. In Rot sind noch einige weitere, nicht einheimische Arten detektiert worden, deren Verbreitung dürfte allenfalls bereits bekannt sein auf Grund von fischereilichen Aktivitäten (z.B. *Oncorhynchus mykiss* (Regenbogenforelle), *Salvelinus fontinalis* (Bachsaibling) oder *Gasterosteus gymnurus* (Stichling)). Weniger oft wurden die nicht-einheimischen Arten *Carassius gibelio* (Gibel), *Pseudorasbora parva* (Blaubandbärbling), *Ctenopharyngodon idella* (Weisser Amur) oder *Gymnocephalus cernua* (Kaulbarsch) gefunden.

Bei einigen Arten gibt es auch etwas unsichere Nachweise. So handelt es sich bei *Acipenser ruthenus* (Sterlet) möglicherweise um einen Eintrag aus einer Aquaristik-Anlage, eine Anwesenheit des Sterlets in der Aare ist sehr unwahrscheinlich. Ebenso ist die DNA von *Sardina pilchardus* (Sardine) wohl als Eintrag durch ARA zu erklären, da dies ein beliebter Speisefisch ist. Einige Arten sind anhand der DNA-Sequenz oft nicht genau von nah-verwandten Arten zu unterscheiden. So handelt es sich z.B. bei *Cyprinus multitaeniata* vermutlich um *C. carpio*, *Gobio obtusirostris* um *G. gobio*, *Barbatula quignardi* um *B. barbatula*. *Rhodeus sericeus* ist wohl der Bitterling, da *R. sericeus subsp. amarus* ein altes Synonym für den akzeptierten Speziesnamen *Rhodeus amarus* ist. Bei *Scardinius hesperdicus*, *Squalius squalus* und *Misgurnus anguillicaudatus* sind die erhaltenen Sequenzen jedoch mehr als 98% unterschiedlich zu den nahverwandten Arten. Hier kann es sich entweder um Fehler in der Datenbank oder um bisher übersehene Arten handeln.

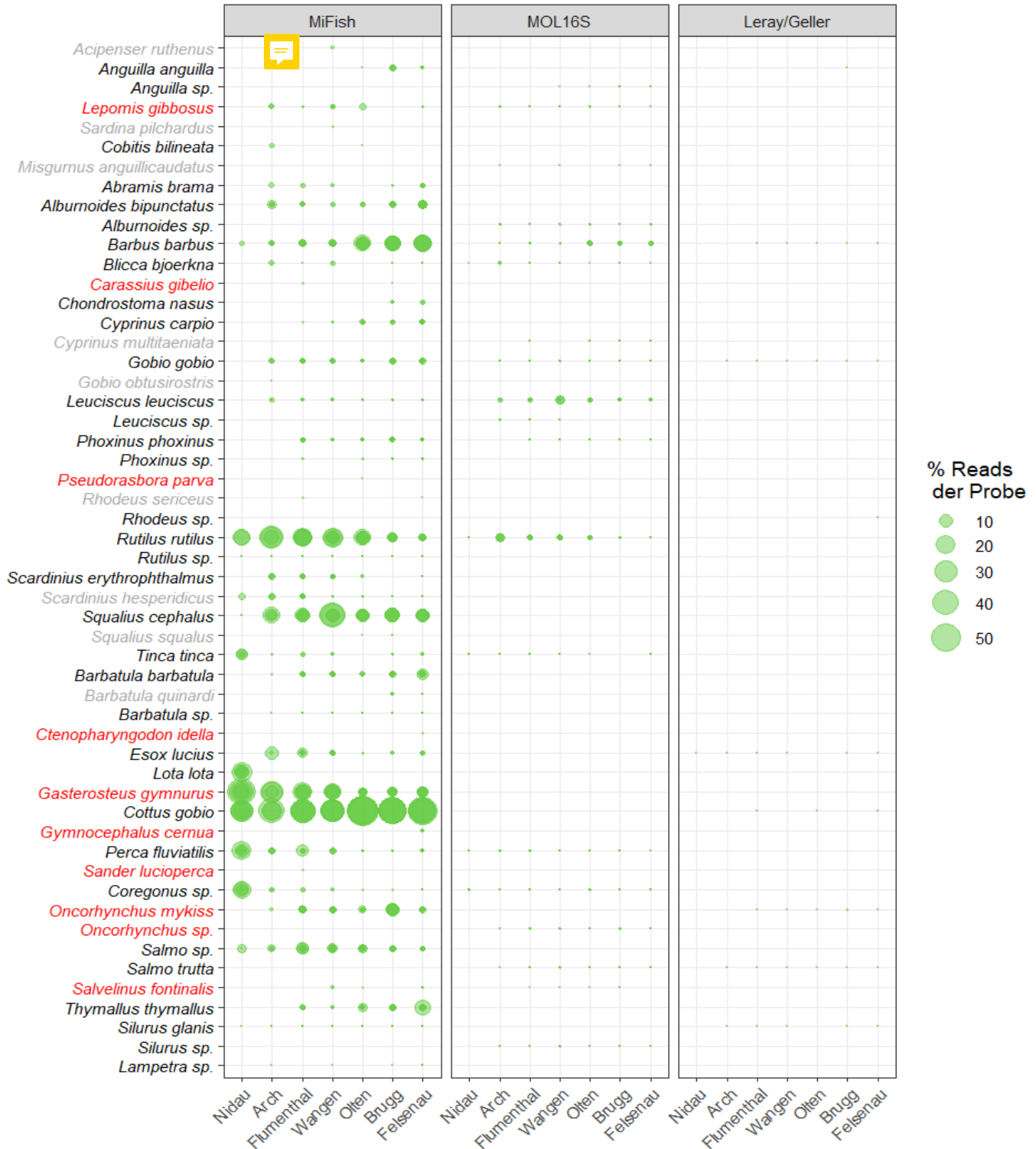


Abb. 1: Detektierte Fischarten und deren Anteil (Prozent DNA-Reads) innerhalb einer Probe. Rote Arten sind nicht einheimisch und Nachweise von grauen Arten sind mit Vorsicht zu betrachten, spezifische Erklärungen sind im begleitenden Text zu finden.

3.3 Mollusken

Auch bei den Mollusken wurden mit dem spezifischen Primer MOL16S deutlich mehr Arten und Reads für Mollusken gefunden (Abb. 2) als mittels fwh2 oder Leray/Geller. Für die Abbildung wurden alle terrestrischen Arten entfernt.

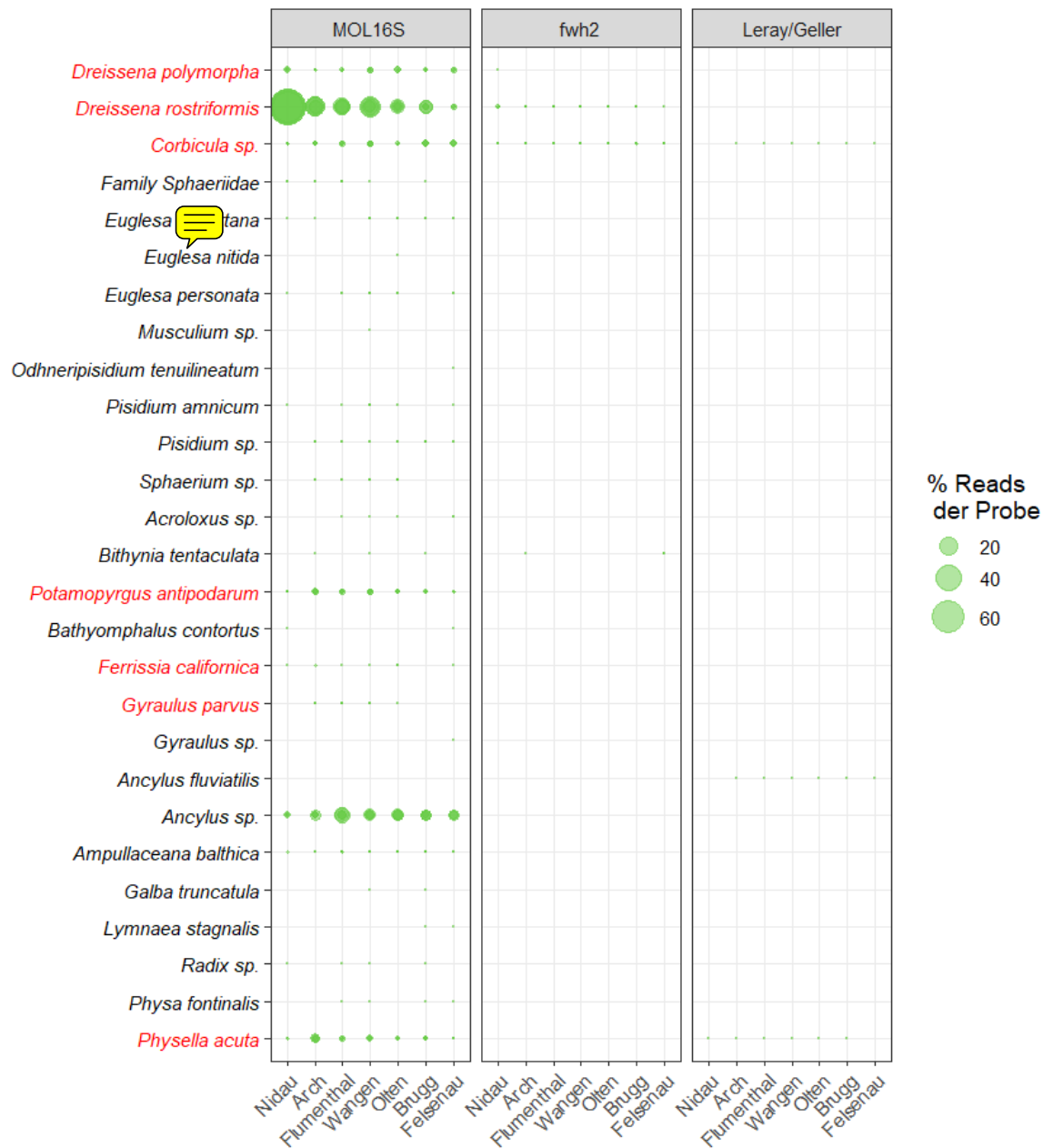


Abb. 2: Detektierte Arten und deren Anteil (Prozent DNA-Reads) innerhalb einer Probe. Rote Arten sind nicht einheimisch.

Bei den Bivalvia wurde aus der Beobachtungsliste der Neobiota *Dreissena polymorpha* (Wandermuschel), *D. bugensis* (Quaggamuschel), sowie *Corbicula sp.* gefunden. Nur mit dem MOL16S Datensatz wurden alle drei Arten relativ konstant beobachtet, während mit dem mit fwh2 an den meisten Stellen nur *D. bugensis* und *Corbicula sp.* und mit Leray/Geller sogar nur *Corbicula sp.* entdeckt wurde. Interessanterweise lässt sich im MOL16S-Datensatz eine Abnahme der proportionalen DNA-Reads für die Quaggamuschel entlang der Fließrichtung der Aare erkennen, während die DNA Reads für die Wandermuschel und *Corbicula* in etwa gleich bleiben.

Bei den Gastropoden wurde aus der Beobachtungsliste der Neobiota *Potamopyrgus antipodarum* (Neuseeländische Deckelschnecke), *Gyraulus parvus* (Kleines Posthörnchen), sowie *Physa acuta* (Spitze Blasenschnecke) gefunden. Als weitere, nicht-einheimische Art wurde *Ferrissia californica* (auch *Ferrissia wautieri*) an fast allen Stellen gefunden.

3.4 Crustaceae

Bei den Crustaceen hatte der spezifische Primer Crust16S nicht zum erwünschten Ergebnis geführt und nur zwei Decapoden-Arten detektiert, während mit Leray/Geller und fwh2 eher Amphipoden und Isopoden detektiert wurden (Abb. 3, für die Abbildung wurden alle terrestrischen Arten entfernt).

Aus der Neobiota-Beobachtungsliste wurden folgende Amphipoden-Arten gefunden: *Crangonyx pseudogracilis* (nur mit fwh2 in Arch), *Dikerogammarus villosus* (nur Leray/Geller, sehr häufig), *Gammarus roeselii* (nur mit fwh2), *Echinogammarus ischnus* (nur fwh2). Zusätzlich wurden die beiden nicht-einheimischen Arten *Dikerogammarus haemobaphes* (nur fwh2 in Nidau, Arch, Flumenthal und Wangen) und *Echinogammarus trichiatus* (mit fwh2 und Leray/Geller in Wangen, Brugg, Olten und Felsenau) gefunden. Bei beiden Arten sind Verwechslungen in der DNA-Sequenz mit *D. villosus* bzw. *E. ischnus* auszuschliessen.

Bei den Decapoden wurde ausschliesslich *Pacifastacus leniusculus* (Signalkrebs) aus der Neobiota-Beobachtungsliste in Arch, Flumenthal, Wangen und Olten entdeckt. Jedoch nicht der ebenfalls anwesende Kamberkrebs (*Faxonius limosus*). Der Nachweis von *Penaeus*

vannamei (Weissbeingarnele) ist mit Vorsicht zu betrachten. Dies ist eine beliebte Zuchtgarnele und so könnte es sich wiederum um einen Eintrag aus einer Aquaristikanlage oder einer ARA handeln.

Bei den Isopoden konnte mit dem Leray/Geller Primer *Jaera sp.* an nahezu allen Probestellen, ausser Nidau, nachgewiesen werden. Diese DNA-Sequenz liess sich nicht genau der Art zuweisen, da es eine 100% Übereinstimmung mit *J. sarsi* sowohl als auch *J. istri* gibt. Da es sich bei beiden Spezies um nicht-einheimische Arten handelt, ist die genaue Differenzierung weniger schwer zu gewichten.

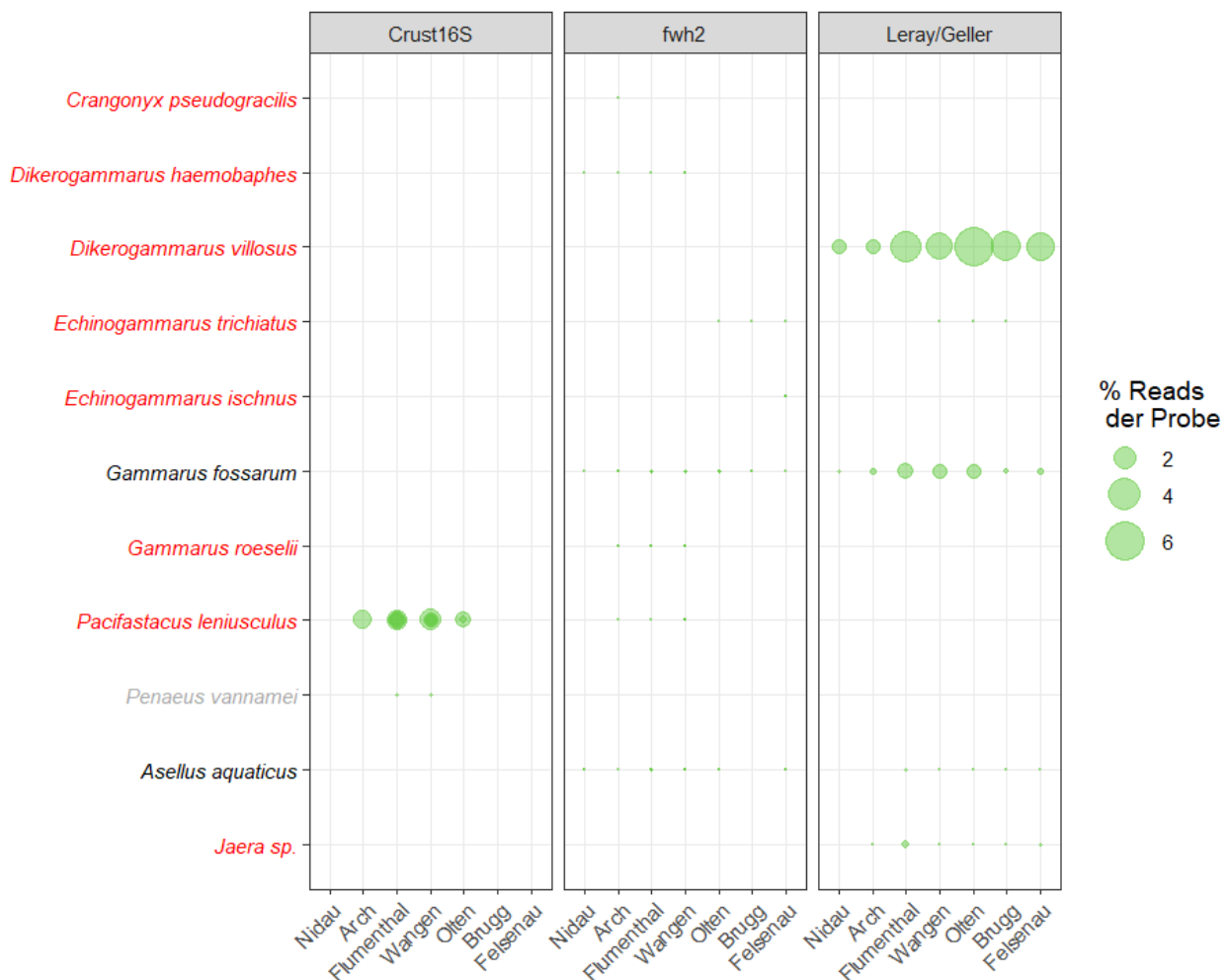


Abb. 3: Detektierte Crustaceen-Arten und deren Anteil (Prozent DNA-Reads) innerhalb einer Probe.

3.5 Annelida & Platyhelminthes



Abb. 4: Detektierte Annelida-Arten und deren Anteil (Prozent DNA-Reads) innerhalb einer Probe.

Annelida und Platyhelminthes wurden einzig mit den beiden COI-Primern detektiert (Abb. 4, terrestrische Arten wurden für die Abbildung weggelassen). *Hypania invalida* (Süßwasser-Borstenwurm) und *Branchiura sowerbyi* (Kiemenwurm, nur mit fwh2) sind Arten der Neobiota-Beobachtungsliste, welche mittels eDNA gefunden wurden. Daneben wurden einige wenige Reads der Familie Glossiphoniidae (wozu *Alboglossiphonia hyalina* gehört) detektiert, jedoch gibt es nur wenig Informationen zu der Verbreitung dieser Familie in der Schweiz.

Viele Arten wurden als unklar eingestuft, da Wissen über ihr Verbreitungsgebiet sehr gering ist und z.B. im Kartenserver des CSCFs gänzlich fehlen. Die meisten Arten sind auch laut GBIF nicht in der Schweiz verbreitet, jedoch gibt es für folgende Arten immer eine Referenzsequenz aus der Schweiz^{9,10} mit sehr guter Übereinstimmung der eDNA-Sequenz: *Cernosvittiella minor* (100%), *Henlea perpusilla* (98%), *Lumbricillus rivalis* (100%), *Lumbricillus sp.*, *Nais alpina* (100%), *N. christinae* (100%), *N. stolci* (100%), *Potamothrix bavaricus* (100%), *Pristina jenkiniae* (100%) und *Tubifex montaneum* (100%). *Sparganophilus tamesis* hat viele gute Referenz-Sequenzen, die aus dem nahen Ausland (z.B. Frankreich) stammen. Die restlichen grau-gefärbten Arten haben auf Grund der gefundenen DNA-Sequenzen zwar keine Verwechslungsgefahr mit anderen Arten, jedoch sind oft nur einzelne Referenz-Sequenzen vorhanden, welche nicht lokal sind (*Allonais paraguayensis*, *Amphichaeta raptiase*, *Paranais frici*, *Propappus volki* und *Stenostonium leucops*).

3.6 Bryozoa & Cnidaria

Die beiden Phyla Bryozoa und Cnidaria wurden hier zusammengefasst, da es sich bei beiden Phyla um relativ wenige Arten handelt. Ein Blick auf die Primer zeigt, dass Cnidaria nur mit den COI-Primern fwh2 und Leray/Geller detektiert wird, jedoch nicht mit dem MOL16S (Abb. 5).

Craspedacusta sowerbii wurde mit dem Leray/Geller an allen Probestellen nachgewiesen, mit den anderen Primern konnte diese Art der Beobachtungsliste nicht gefunden werden. Neben den Hydra-Spezies sind die meisten gefundenen Arten eher kritisch zu betrachten. Die gefundene Sequenz für *Cordylophora caspia* scheint nicht mit anderen Arten zu Verwechseln sein, jedoch sind wiederum nur wenige Referenzen vorhanden. Bryozoen wurden mit den Primern generell schlecht abgedeckt. Die Nachweise für die beiden Arten *Lophopus*

crystallinus und *Plumatella emigrata* sollen als kritisch betrachtet werden, da deren Verbreitungsgebiet nicht die Schweiz umfasst.

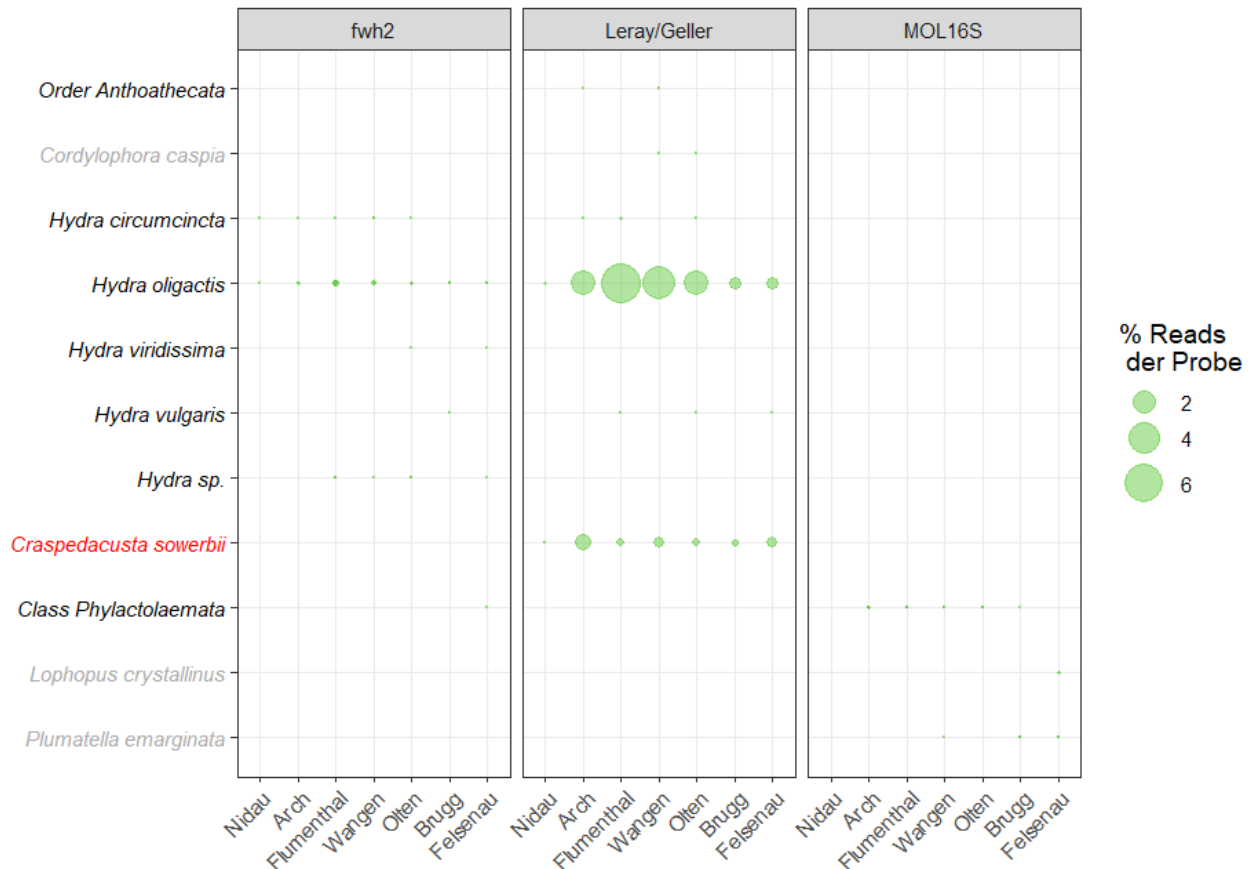


Abb. 5: Detektierte Arten und deren Anteil (Prozent DNA-Reads) innerhalb einer Probe.

3.7 Oomycota & Chytridiomycota

Die beiden Phyla Oomycota und Chytridiomycota werden ebenfalls zusammengefasst, da es sich bei diesen Phyla um relativ wenige Arten, jedoch um potentielle Krankheitserreger handelt. Als Krankheitserreger von Interesse wurden *Saprolegnia parasitica* (und *Saprolegnia* sp.), sowie *Aphanomyces* sp. mit dem Leray/Geller Datensatz gefunden (Abb. 6, Pflanzenpathogene wurden für die Abbildung entfernt).

Das Phyla Chytridiomycota, welche den Erreger *Batrachochytrium* der *Amphibien* beinhaltet, wird nur sehr schwach erfasst (fwh2). Jedoch sind hier auch Informationen zu möglichen anderen Arten aus diesem Phyla kaum vorhanden, was die Interpretation der Daten sehr erschwert.

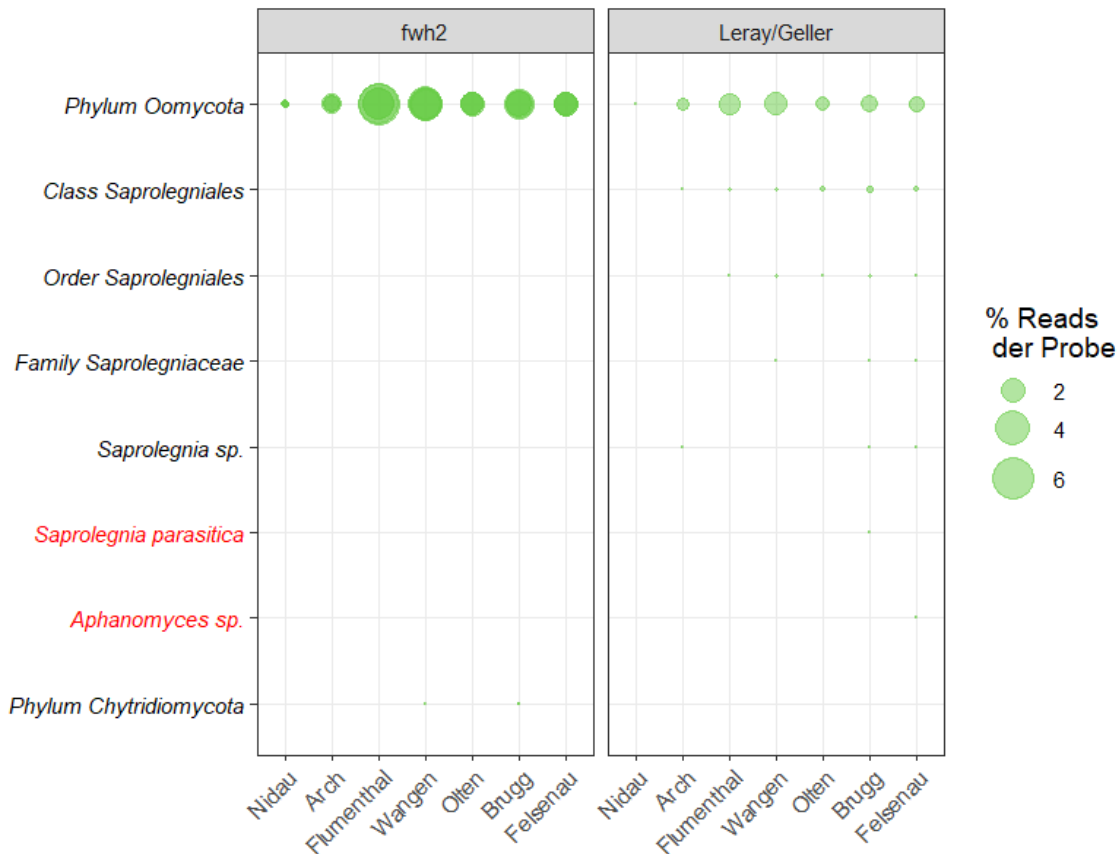




Abb. 6: Detektierte Arten und deren Anteil (Prozent DNA-Reads) innerhalb einer Probe.

4. EMPFEHLUNG


Im Vergleich zur Erhebung des Makrozoobenthos (MZB), welche zur selben Zeit wie die eDNA-Beprobung stattfand, sind beide Methoden in grosser Übereinstimmung (Abb. 7). Mittels der MZB wurden *Caspiobdella fadejewi*, *Synurella albulans* und *Limnomysis benedeni* gefunden, welche mit der Umwelt-DNA nicht nachgewiesen werden konnte. In allen drei Fällen wurden jeweils nicht mehr als zwei Individuen an einer einzigen Probestelle gefunden. Daher kann

möglicherweise eine geringe Menge an vorhandener eDNA eine Erklärung für die Nicht-Nachweisbarkeit sein. Auf der anderen Seite wurde mittels eDNA *Craspedacusta sowerbyi* und einige weitere Arten detektiert, die nicht mittels MZB  gefunden wurden und vielleicht nicht zu erwarten waren: *Dikerogammarus haemobaphes*, *Echinogammarus trichiatus* und *Ferrissia californica*. Diese Arten sind möglicherweise nicht von Interesse für die Neobiota-Beobachtungsliste, wurden aber auch im MBZ nicht erhoben. Dabei könnte es sich um Schwierigkeiten bei der morphologischen Identifikation handeln, im Speziellen, wenn nah verwandte Arten in der Region vorhanden sind (z.B. *D. villosus*). In den folgenden Abschnitten werden jeweils auf die Resultate der verschiedenen Artengruppen eingegangen und spezifische Empfehlungen dafür abgegeben.

Bei den Fischen bildet die eDNA generell ein sehr gutes Bild ab. Hier sind Vergleichsdaten und Kenntnisse der Verbreitung vorhanden und gut zugänglich. Mittels dem MiFisch-Primer wurden zusätzliche, nicht-einheimische Arten detektiert, was  den Vorteil des Metabarcoding-Ansatzes unterstreicht. Unter Umständen sind diese Arten aber nicht so von Interesse, da sie entweder aus fischereilichen Gründen bereits dokumentiert werden (e.g. Besatzungen, Fischfang) oder sie ein tieferes Invasionspotential aufweisen. Wenn der zukünftige Fokus auf den vier Arten der Beobachtungsliste bestehen bleibt, ist der Metabarcoding-Ansatz möglicherweise nicht ideal.

Ebenfalls eine sehr gute Übereinstimmung konnte bei den Mollusken festgestellt werden. Auch hier sind gute Daten zur Verbreitung vorhanden. Die Verwendung von MOL16S-Primern ist hier unumgänglich, um das ganze Spektrum an Arten abzudecken. Vor allem für die Gastropoden ist dies sehr wichtig, da diese Arten mit den beiden COI-Primern (fwh2, Leray/Geller) nicht so häufig gefunden wurden. Auch hier entdeckte die eDNA eine zusätzliche nicht-einheimische Art, deren Aufnahme in die Beobachtungsliste diskutiert werden sollte.


Alle Primerpaare haben einzelne Crustaceen-Arten entdeckt, die nicht mit anderen Primern gefunden wurden. Bei den Decapoden wurden vermutlich ein bis zwei anwesende Arten verpasst. Hier hatte ein Einsatz des Crust16S-Primer nicht zum erhofften Erfolg geführt. Ein Problem scheint daher zu reichen, dass es für die Genregion des 16S bisher keine gute Datenbank gibt, da diese oft nicht als Barcoding-Region verwendet wird. Bei den COI-Primern zeigt sich, dass fwh2 tendenziell geeigneter ist, da Leray/Geller nur *D. villosus* und *Jaera sp.*

zusätzlich gefunden hat. Besonders im Fall von *D. villosus* ist es allenfalls gar nicht mehr so interessant, da dessen Verbreitung bereits sehr bekannt ist. 

Bei Annelida und Platyhelminthes ist der Vergleich etwas erschwert, da die Datengrundlage selten analog (viele Individuen werden nicht auf Artniveau bestimmt) und Angaben zur Herkunft und Status eher selten bekannt sind. Der Abgleich der eDNA-Sequenzen mit der Datenbank, welche viele Referenzsequenzen aus der Schweiz enthält, scheint aber ein sehr plausibles Bild zu liefern. Wie umfassend dieses Abbild jedoch ist, kann mit der vorhandenen Datengrundlage nicht gesagt werden. Nur mit dem fwh2 Primer wurden beide Arten der Beobachtungsliste detektiert, Leray/Geller konnte *B. sowerbyi* nicht nachweisen.

Falls die Überwachung der Bryozoa-Art *Fredericella sultana* von prioritär Bedeutung ist, ist ein qPCR-Ansatz zu verfolgen, da keiner der verwendeten Primer die Bryozoa gut abdecken konnte. Auch die Cnidarien umfassen nur zwei Arten der Beobachtungsliste, wobei *Craspedacusta sowerbii* nur im Datensatz Leray/Geller gefunden wurde.

Bei den beiden Phyla der Oomycota und Chytridiomycota ist der Abgleich ebenfalls etwas schwerer, da Verbreitung und Herkunft der Arten kaum bekannt sind. Daher wurde diese Analyse strikt auf die gesuchten Arten und ihre taxonomischen Ränge beschränkt. Bei diesen Arten war nur der Leray/Geller-Primer erfolgreich im Nachweis.

Schlussendlich können mittels einer Wasserprobe und verschiedenen Primern Nachweise für sehr viele verschiedene Artengruppen erstellt werden, dafür müsste mit einem klassischen Ansatz auf sehr viele verschiedene Techniken zurückgegriffen werden. Jedoch sind auch mit der Umwelt-DNA nicht alle Lücken geschlossen, daher stellt sich abschliessend die Frage, bei welchen Arten der Neobiota-Liste die Prioritäten liegen. Für Nachweise von Fischen bzw. Mollusken sind die beiden spezifischen Primer MiFish bzw. MOL16S unabdingbar. Die etwas breiteren COI-Primer fwh2 und Leray/Geller überschneiden sich stark in der Abdeckung, wobei fwh2 Crustaceen und vermutlich Anneliden besser erfasst, während Leray/Geller einzelne Arten aus verschiedenen taxonomischen Gruppen erfasst (z.B. *Saprolegnia parasitica*, *Jaera sp.*, *C. sowerbii*, oder *D. villosus*). Bei einem finanziellen Kompromiss sollte daher je nach den entsprechenden Prioritäten fwh2 oder Leray/Geller gewählt werden. 

Artname	MZB	MiFish	MOL16s	Crust16S	fwH2	Leray/Geller
<i>Girardia tigrina</i>						
<i>Barbronia weberi</i>						
<i>Alboglossiphonia hyalina</i>						
<i>Caspiobdella fadejewi</i>	■					
<i>Branchiura sowerbyi</i>					■	
<i>Quistadrilus multisetosus</i>						
<i>Hypania invalida</i>	■					■
<i>Chelicorophium curvispinum</i>						
<i>Crangonyx pseudogracilis</i>	■				■	
<i>Synurella ambulans</i>	■					
<i>Dikerogammarus villosus</i>						■
<i>Gammarus roeselii</i>					■	
<i>Echinogammarus ischnus</i>	■				■	
<i>Dikerogammarus haemobaphes</i>					■	
<i>Echinogammarus trichiatus</i>					■	■
<i>Pacifastacus leniusculus</i>				■	■	
<i>Faxonius limosus</i>						
<i>Procambarus clarkii</i>						
<i>Eriocheir sinensis</i>						
<i>Jaera istri</i>	■					G
<i>Katamysis warpachowskyi</i>						
<i>Limnomysis benedeni</i>	■					
<i>Fredericella sultana</i>						
<i>Lepomis gibbosus</i>		■	■			
<i>Ponticola kessleri</i>						
<i>Neogobius melanostomus</i>		■				
<i>Sander lucioperca</i>						
<i>Craspedacusta sowerbyi</i>						■
<i>Tetracapsuloides bryosalmonae</i>						
<i>Dreissena polymorpha</i>	■					
<i>Dreissena rostriformis bugensis</i>						
<i>Corbicula fluminea</i>	■		G		G	G
<i>Viviparus ater</i>						
<i>Theodoxus fuviatilis</i>						
<i>Lithoglyphus naticoides</i>						
<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	■		■			
<i>Physella acuta</i>						■
<i>Gyraulus parvus</i>	■					
<i>Ferrissia californica</i>			■			
<i>Aphanomyces astaci</i>						G
<i>Saproglenia parasitica</i>						■
<i>Batrachochytrium dendrobatidis</i>						

■ Detektion
 G Detektion auf Gattungsebene
 ■ Nicht zu [Icon] rten

Abb. 7: Vergleich der detektierten Arten mittels Makrozoobenthos-Erhebung (MZB), welche zur selben Zeit wie das eDNA-Monitoring stattfand, und den fünf verschiedenen eDNA-Primern. Orange Arten wurden nur mittels MZB detektiert und gelbe Arten nur mittels eDNA.

5. ANHANG

5.1 Details Molekulare Analyse

Die molekulare Analyse fand in den Laboren der SimplexDNA AG in Winterthur und im Genetic Diversity Center (GDC) an der ETH Zürich statt. Prä- und Post-PCR Arbeiten wurden räumlich getrennt durchgeführt.

Die Proben wurden randomisiert und in zwei unterschiedlichen Batches mit jeweils einer Extraktions-Kontrolle extrahiert. Für die Extraktionen wurde das 'Blood & Tissue Kit' (Qiagen) verwendet, nach dem Protokoll von Spens *et al.*¹. Alle eDNA-Proben wurden zusätzlich mit dem 'PCR Inhibitor Removal Kit' (Zymo) gemäss Protokoll des Herstellers aufgereinigt.

Für die Herstellung der Libraries wurde ein 2-Schritt PCR-Protokoll verwendet. Im ersten Schritt wurde eine PCR mit Tails durchgeführt (Tabelle 2). Bei den MOL16S-Primern wurde dabei gemäss der originalen Publikation ein Blocking-Primer für Fische verwendet. Für die Negativ-PCR Kontrolle wurde PCR-Wasser verwendet. Pro eDNA-Probe und Negativ-Kontrolle wurden vier PCR-Replikate erstellt, welche anschliessend gepoolt und mit Ampure Beads (Beckerman & Coulter) aufgereinigt wurden. Im zweiten Schritt wurde jede eDNA-Probe mit einem einzigartigen Index versehen und anschliessend wiederum mit Ampure Beads aufgereinigt. Mittels dem Tecan Plate Reader wurde die Konzentration der einzelnen Libraries gemessen. Die Libraries für MiFish und MOL16S wurden equimolar gepoolt und im selben 500 Zyklus Standard Kit v2 sequenziert. Die Libraries für fwh2 wurden ebenfalls equimolar gepoolt und mit einem 500 Zyklus Standard Kit v2 sequenziert, während die Libraries für Crust 16S und Learay/Geller equimolar gepoolt wurden und das 600 Zyklus Standard Kit v3 verwendet wurde.

5.2 Details Bioinformatische Analyse

Für die Sequenzdatenanalyse wurde usearch (v11.0.667) und dessen Algorithmen verwendet. Die Analyse bestand aus den folgenden Schritten:

- (A) Zuordnung der Sequenzen zu den jeweiligen Proben, basierend auf der einzigartigen Index-Kombinationen, mit denen die Sequenzen für jede Probe markiert wurden.

-
- (B) Entfernung von Sequenzen mit geringer Komplexität, Trimmen von Sequenz-Ende und Zusammenführen von Sequenzen.
- (C) Trimmen von Primern, zusätzliche Filterung von PCR-Hits mit Mismatches am Primer-Ende und Sequenzen in falscher Orientierung. Spezifische Einstellungen:
- (a) MiFish: Sequenzgrößen-Umfang: 100-600; Diskrepanz im Primer: 1
 - (b) MOL16S: Sequenzgrößen-Umfang: 100-600; Diskrepanz im Primer: 1
 - (c) Crust16S: Sequenzgrößen-Umfang: 100-600; Diskrepanz im Primer: 2
 - (d) fwh2: Sequenzgrößen-Umfang: 100-500; Diskrepanz im Primer: 1
 - (e) Leray/Geller: Sequenzgrößen-Umfang: 100-500; Diskrepanz im Primer: 2
- (D) Auswahl von Sequenzlänge und Qualitätsfilterung (PRINSEQ-lite 0.20.4). Spezifische Einstellungen:
- (a) MiFish: Sequenzgrößen-Umfang: 150-250; GC-Umfang: 20-80
 - (b) MOL16S: Sequenzgrößen-Umfang: 100-500; GC-Umfang: 10-90
 - (c) Crust16S: Sequenzgrößen-Umfang: 100-500; GC-Umfang: 5-95
 - (d) fwh2: Sequenzgrößen-Umfang: 180-280; GC-Umfang: 20-80
 - (e) Leray/Geller: Sequenzgrößen-Umfang: 200-400; GC-Umfang: 20-80
- (E) De-replizieren der Sequenzen (um eindeutige Amplikons zu erhalten) und Clustern von OTUs (97%, mittels UPARSE-OTU-Algorithmus). Anschliessende Fehlerkorrektur der Amplikon-Sequenzvarianten (ZOTUs, mittels UNOISE-Algorithmus). Darauf folgt ein zusätzliches Clustering (c99, ausser bei fwh2 Datenset) und abschliessende Rückverknüpfung von Amplikons mit gewähltem Clustering.
- (F) Vorhersagen von taxonomischen Zuordnungen mittels SINTAX. Spezifische Referenzdatenbanken:
- (a) MiFish: NCBI Fish 12S und manuell kurierte Datenbank aus Blackman et al.⁸
 - (b) MOL16S: NCBI 16S
 - (c) Crust16S: NCBI 16S
 - (d) fwh2: MIDORI CO1 (GB242)
 - (e) Leray/Geller: MIDORI2 CO1 (GB253)

In der weiteren Datenanalyse wurden in einem ersten Schritt potentielle Kontaminationen im Labor entfernt. Dabei werden die ZOTUs in den Negativkontrollen und deren Anzahl Reads von allen eDNA-Proben abgezogen. Bei dem Datensatz fwh2 und Crust16S wurden ZOTUs

mit weniger als 5 Reads/Probe entfernt. Danach wurden die Anteile der Reads eines ZOTUs innerhalb der Probe berechnet.

6. REFERENZEN

- ¹ Spens, J., Evans, A. R., Halfmaerten, D., Knudsen, S. W., Sengupta, M. E., Mak, S. S., ... & Hellström, M. (2017). Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(5), 635-645.
- ² Miya M, Sato Y, Fukunaga T, Sado T, Poulsen JY, Sato K, ... & Iwasaki W. 2015. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society open science*, 2(7), 150088.
- ³ Klymus, K. E., Marshall, N. T., & Stepien, C. A. (2017). Environmental DNA (eDNA) metabarcoding assays to detect invasive invertebrate species in the Great Lakes. *PloS one*, 12(5), e0177643.
- ⁴ Berry, T. E., Osterrieder, S. K., Murray, D. C., Coghlan, M. L., Richardson, A. J., Greal, A. K., ... & Bunce, M. (2017). DNA metabarcoding for diet analysis and biodiversity: A case study using the endangered Australian sea lion (*Neophoca cinerea*). *Ecology and Evolution*, 7(14), 5435-5453..
- ⁵ Vamos, E. E., Elbrecht, V., & Leese, F. (2017). Short COI markers for freshwater macroinvertebrate metabarcoding (No. e3037v2). *PeerJ Preprints*.
- ⁶ Leray, M., Yang, J. Y., Meyer, C. P., Mills, S. C., Agudelo, N., Ranwez, V., ... & Machida, R. J. (2013). A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in zoology*, 10(1), 1-14.

⁷ Geller, J., Meyer, C., Parker, M., & Hawk, H. (2013). Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. *Molecular ecology resources*, 13(5), 851-861.

⁸ Blackman, R. C., Walser, J. C., Rüber, L., Brantschen, J., Villalba, S., Brodersen, J., ... & Altermatt, F. (2022). General principles for assignments of communities from eDNA: Open versus closed taxonomic databases. *Environmental DNA*.

⁹ Vivien, R., Holzmann, M., Werner, I., Pawlowski, J., Lafont, M., & Ferrari, B. J. (2017). Cytochrome c oxidase barcodes for aquatic oligochaete identification: development of a Swiss reference database. *PeerJ*, 5, e4122.

¹⁰ Vivien, R., Wyler, S., Lafont, M., & Pawlowski, J. (2015). Molecular barcoding of aquatic oligochaetes: implications for biomonitoring. *PloS one*, 10(4), e0125485.