

Auf den Spuren der Äsche im Gesäuse: Nachweis und Kartierung von *Thymallus thymallus* in der Enns und dem Johnsbach mittels eDNA

TAMARA SCHENEKAR | SARAH STURM | STEVEN J. WEISS
*Institut für Biologie; Karl-Franzens-Universität Graz,
Universitätsplatz 2, A-8010 Graz*

Abstract

Tracing European grayling in the Gesäuse National Park: Assessing *Thymallus thymallus* presence in the Enns and Johnsbach river using eDNA

The Enns River runs through the Gesäuse National Park and is generally characterized by relatively pristine morphological features. During the late 1990s the fish densities of this stretch collapsed, including the dominant species of this river zone, the European grayling. River restoration efforts have been undertaken to improve habitat quality and connectivity of the Enns River but also its largest tributary in the Gesäuse, the Johnsbach River, which had been heavily altered for flood protection. However, due to intense sediment transport in the Johnsbach River, the newly built ground sills might still pose barriers for fish migrating from the Enns into the Johnsbach River. To check whether grayling enter the Johnsbach for spawning and whether these sills are passable for grayling during their migrations, we took environmental DNA samples from both the Enns River and the Johnsbach River and applied a qPCR protocol originally developed for Arctic grayling. We received positive signals of European grayling in the Enns River, as well as the Johnsbach River but only during the spring spawning season. This suggests that at least a few grayling individuals manage to pass the sills and migrate into the Johnsbach River to attempt to spawn.

Einleitung

Fischökologische Aspekte des Gesäuses

Der Nationalpark Gesäuse, benannt nach dem ohrenbetäubenden Brausen des »Wilden Wassers« der Enns, erstreckt sich entlang etwa 16 Flusskilometer eben dieser, wobei sich die Enns hierbei in einer engen Felsschlucht ihren Weg durch die Ennstaler Alpen bahnt. Der Großteil ihres Flussverlaufes zeichnet sich dabei durch einen hohen Grad an Natürlichkeit aus, mit mehreren Wechsell zwischen rasch fließenden Wildwasserstrecken über große Blockwürfe, wie dem bei Kajakfahrern berühmt-berüchtigten Ennskatarakt am Gesäuseeingang, und strömungsberuhigten Abschnitten über sandigem Grund wie am Johnsbachsteg, welcher im Sommer Nationalparkbesucher zum Abkühlen einlädt. Diese Abschnitte werden begleitet von abwechslungsreichen Uferstrukturen inklusive Prallhängen, Gleituferebereichen und Schotterbänken (NP Gesäuse 2019). Die letzten beiden Flusskilometer der Enns innerhalb des Nationalparks sind allerdings durch

Aufstauungen des Laufkraftwerks Gstatterboden beeinflusst, was mit einer Verlangsamung der Fließgeschwindigkeit bzw. allgemeinen Potamalisierungseffekten in diesem Abschnitt einhergeht. Des Weiteren erfährt die Enns einen starken Schwall-Sunk Einfluss des Laufkraftwerkes Sölk, welches etwa 50 Flusskilometer flussaufwärts des Gesäuseeinganges liegt. Dessen Sunk-/Schwallbetrieb lässt den Wasserspiegel der Enns bei Admont bis zu zweimal täglich um bis zu 40 cm schwanken (Hydrografischer Dienst Steiermark 2019). Dies kann sich besonders drastisch auf die Leitfischart dieses Ennsabschnittes, die Äsche (*Thymallus thymallus*), sowie deren häufigste Begleitart, die Bachforelle, auswirken, da zu deren Laichzeiten die Enns Niedrigwasser führt und sich somit die Wasserspiegelschwankungen besonders stark bemerkbar machen. Während starke Schwallereignisse zu erhöhter Fließgeschwindigkeit des Gewässers und zum möglichen Verdriften des Laichs oder der Jungfische führen kann, verursachen Sunkereignisse das mögliche Trockenfallen der Laichplätze bzw. eventuell auch des Jungfischhabitats. Außerhalb des Nationalparks erfuhr die Enns im Allgemeinen wie die meisten (großen) Flüsse in Österreich seit dem 19. Jahrhundert drastische hydromorphologische Eingriffe durch Verbauungen und Regulierungen und für die Energiegewinnung, wodurch einerseits wertvolle Uferstrukturen als Lebensräume vieler Fischarten verloren gingen, sicher aber auch durch ein Absenken des Grundwasserspiegels bemerkbar machte (Haas 2010).

Im Rahmen einer umfassenden gewässermorphologischen und fischökologischen Erhebung entlang der gesamten steirischen Enns in den Jahren 1994 und 1995 (Jungwirth et al. 1996) wurde der Gesäuse-Abschnitt der Enns morphologisch als sehr natürlich beschrieben und es konnten im Abschnitt von Liezen bis in das Gesäuse neun Arten nachgewiesen werden, wobei hier bei nur vier als bestandsbildend klassifiziert wurden. Von diesen vier Arten (Bachforelle, Regenbogenforelle, Äsche und Koppe) bildete die Äsche im Gesäuseabschnitt mit 60 % der gefangenen Fische mit Abstand die häufigste Fischart, gefolgt von der Bachforelle (30 %). Die Gesamtfischbiomasse der Gesäuse-Enns wurde damals mit 200 kg/ha beziffert, wovon die Äsche ca. 140 kg/ha ausmachte. Das erhaltene Längenfrequenzdiagramm aller gefangenen Äschen zeigte Präsenz aller Altersklassen. Jungfische wurden als etwas unterrepräsentiert beschrieben, was jedoch auf die größenpezifische Selektivität der benutzten Elektrofangmethode zurückgeführt wurde. Des Weiteren zeigte sich in weniger anthropogen beeinflussten Strecken wie der Enns zwischen Liezen und Weng ein größerer Jungfischanteil. Für den Gesäuseabschnitt selbst wurde keine Altersstruktur berichtet (Jungwirth et al. 1996).

In den Jahren 1997/1998 wurde ein massiver Einbruch der Fischbestände an der Enns beobachtet. Im Vergleich zu 1994 konnten 1998 nur mehr 20 % der Fischdichten und 9% der Biomasse festgestellt werden. Diese starken Fischbestandsrückgänge wurden zu einem Großteil dem starken Raubdruck durch den Kormoran (*Phalacrocorax carbo*) zugeschrieben. Vor allem der starke Rückgang der Äsche führte zu dem Entschluss, dass die Äschenpopulation der Enns nur mehr mit Besatzmaßnahmen zu retten sei (Zauner 1999). Zusätzlich stieg neben dem Raubdruck durch natürliche Beutegreifer wie den Kormoran zwischen 1960 und 1990 die Intensität durch die Sportfischerei an der Enns erheblich an. Um deren Erwartungen gerecht zu werden, wurden großräumig Besatzmaßnahmen, leider teilweise auch mit nicht-ansässigen Arten wie der Regenbogenforelle oder billigem Zuchtmaterial aus nicht-ansässigen genetische Stämmen verwendet. Im Gegensatz hierzu wurde in der Gesäuse-Enns vornehmlich mit ökologisch orientierten Konzepten gearbeitet, bei denen vornehmlich auf den Erhalt und die Bevorzugung natürlicher Reproduktion heimischer Bestände geachtet wurde, vor allem durch die Schaffung optimaler Lebensraumverhältnisse (Jungwirth et al. 1996; Grollitsch 2005).

Die Revitalisierung des Johnsbaches

Der Johnsbach ist der größte Zubringer der Enns im Nationalpark Gesäuse. Er entspringt auf etwa 1300 m Seehöhe in den Eisenerzer Alpen und mündet nach einer Länge von ca. 15 km beim Puchsteg in die Enns. Im Gegensatz zur Enns war er innerhalb der heutigen Nationalparkgrenzen Mitte des 20. Jahrhunderts stark von Regulierungsmaßnahmen betroffen. Ab Mitte der 1950er wurde die Strecke zwischen dem Ort Johnsbach und der Flussmündung für Hochwasserschutzmaßnahmen kanalartig und hart verbaut. Das dadurch entstandene technische Gerinne lieferte kaum benötigtes Habitat für Äsche, Bachforelle oder Koppe (Kreiner et al. 2008). Ebenso wurde die Fischpassierbarkeit des Mündungsbereiches Johnsbach von Jungwirth et al. (1996) für Jungfische und Cypriniden als »nicht gegeben« und für adulte Äschen als »kritisch« klassifiziert. Im Oktober 2002 wurde das Gesäuse zum Nationalpark erklärt. Für die Erfüllung seiner Aufgabenbereiche als Nationalpark ist das Gesäuse seither um den Erhalt sowie die Rückführung naturbelassener Zustände seiner terrestrischen sowie aquatischen Lebensräume bemüht. Im Jahre 2005 wurde das LIFE Projekt »Management von Wald und Wildfluss im Gesäuse« ins Leben gerufen. Das Projekt wurde vom Nationalpark Gesäuse gemeinsam mit dem Forsttechnischen Dienst für Wildbach- und Lawinenverbauung und dem Amt der Steiermärkischen Landesregierung, FA 19b Schutzwasserwirtschaft und Bodenwasserhaushalt durchgeführt. Einer der beiden Schwerpunkte befasste sich mit der Revitalisierung des Johnsbaches in den letzten fünf Flusskilometern. Hierbei wurden die alten Verbauungen des Johnsbaches entfernt, der Bach nur mehr punktuell an das Bett gebunden, hohe Abstürze vermieden, und neue, niedrigere Grundschnellen zur Angleichung des Gefälles eingearbeitet. Im gesamten Verlauf erfuhr der Johnsbach zudem eine Auflockerung und Aufweitung der Ufergrenzen, wodurch sich natürliche Verzweigungen und Schotterbänke bilden konnten. Eine starke Herausforderung für die neu eingesetzten Schnellen stellte die starke Geschiebeführung des Johnsbaches dar. Immer wieder entwickelten sie die neu installierten Schnellen durch nachsackenden Schotter, Auskolkung und fehlendes Geröll zu Hindernissen für den Fischaufstieg wie beispielsweise für Laichwanderungen der Äschen. Trotz zahlreicher Nachbesserungen einiger Schnellen wurde die Fischgängigkeit des Johnsbaches zu Projektende nicht als völlig zufriedenstellend bewertet (Haseke 2011).

Zwei fischökologische Befischungen in der Enns vor und nach den Umsetzungen des LIFE Projektes zeigen die Äsche zusammen mit der Bachforelle als die beiden häufigsten Fischarten, jedoch ergaben in beiden Fällen die geringen Individuendichten und Fischbiomassen eine klare Verfehlung des gewünschten »Guten Ökologischen Zustandes« (Wiesner et al. 2008, 2010). Im Johnsbach selbst konnten bei einer Postmonitoring-Befischung nur im Mündungsbereich des Johnsbaches Äschen nachgewiesen werden (mit einem zusätzlichen Einzelindividuum ca. 1 km flussaufwärts) (Gumpinger und Fischer 2015). Somit ist die Frage gegeben, ob der Johnsbach mit den bestehenden Sohlschnellen für die Äsche für deren Laichaufstieg in den Johnsbach heute problemlos passierbar ist.

Laichwanderungen der Äsche

Das grundlegende Habitat der Äsche sind kühle Mittelgebirgsflüsse in der nach ihr benannten Äschenregion (Hyporhithral). Dabei ist sie in Österreich in größeren Flüssen wie der Drau, Enns oder Mur anzutreffen. Zum Laichen suchen Äschen im Frühjahr kleinere Zubringer der Hauptflüsse auf und legen hierbei Strecken bis zu 15 km zurück. Der Start der Laichwanderungen ist stark von der Wassertemperatur abhängig, wobei diese schon bei 4 – 6 °C beginnen können. Bei den Wanderungen selbst zeigen Äschen

wie alle lachsartigen Fische ein starkes »homing« Verhalten, kehren also zum Laichen in Gewässer zurück, in denen sie selbst geschlüpft sind (Jungwirth et al. 2003).

Unabhängig von der Passierbarkeit bleibt die Frage bestehen, ob der Johnsbach ein geeignetes Laichhabitat für die Äschen darstellt. Seine Geschiebetätigkeit könnte zu stark für ein stabiles Laich- und Jungfischhabitat sein. Jedoch, da geeignetes Laichhabitat wahrscheinlich grundsätzlich in dieser Region ein limitierender Faktor ist, könnte jegliche Nutzung des Johnsbaches zum Abbläuen einen wertvollen Beitrag für die Erholung und den längerfristigen Erhalt der Äschenpopulation in der Gesäuse-Enns liefern. Im Jahre 2003 wurden vom Nationalpark Hohe Tauern mehrere Äschenlaichplätze in der Gesäuse-Enns kartiert, jedoch liegen keine Daten über den Johnsbach vor.

Umwelt DNA – eDNA als neues Werkzeug für das Fischmonitoring

Umwelt DNA (oder kurz eDNA, aus dem Englischen von »environmental DNA«) bezeichnet jede Art von Genmaterial (DNA), welches von Lebewesen an ihre Umwelt abgegeben wird. Diese stammt von Absonderungen wie abgestreifteten Hautzellen, Schuppen, Speichel, Kot oder ähnlichem (Taberlet et al. 2012). Diese DNA kann aus einer Vielzahl von Substraten (Wasser, Bodenproben, Sedimenten, Luft etc.) isoliert und analysiert werden. Ein weit verbreiteter Ansatz ist hierbei das sogenannte »Metabarcoding«. Hierbei werden bestimmte Abschnitte (»Barcode Marker«) aus einer eDNA Probe, wie gefiltertes Wasser aus einem Fluss, amplifiziert und anschließend sequenziert. Die erhaltenen Gensequenzen dieser Barcodes werden mit einer genetischen Referenzdatenbank aller in der unmittelbaren Umgebung vorkommenden Zielarten abgeglichen. Durch die Detektion der Barcode-DNA-Sequenzen einzelner Arten in der eDNA Probe kann somit die Artzusammensetzung im Untersuchungsgebiet bestimmt werden.

Alternativ zum Metabarcoding gibt es auch artspezifische Ansätze, z. B. für Untersuchungen auf Anwesenheit einer bestimmten Fischart in einem Gewässer. Die Methoden für solch gezielte Fragestellungen sind im Vergleich zum Metabarcoding günstiger und können eine bessere Detektionsrate als Metabarcoding haben (Harper et al. 2018; Tsuji et al. 2018). Das Ausgangsmaterial ist erneut eine eDNA Probe. Jedoch kommen dann sogenannte »qPCRs«, zum Einsatz, bei denen bereits während des Amplifikationsschrittes, ohne Sequenzierung, auf die An-/oder Abwesenheit z. B. einer bestimmten Fischart geschlossen werden kann.

Die verschiedenen eDNA-Ansätze haben sich bereits in einer Vielzahl von Studien im direkten Vergleich zu konventionellen Methoden wie Elektrofischen bewährt und werden in Großbritannien und Frankreich derzeit auch in behördliche ökologische Erhebungen im Rahmen der Wasserrahmenrichtlinie integriert (Hering et al. 2018; Harper et al. 2019). Vorteile von eDNA Ansätzen gegenüber den konventionellen Methoden beinhalten eine bessere Kosten-Nutzen Effizienz, höhere Detektionsraten von seltenen Arten, eine höhere taxonomische Auflösung bei komplexen Artengruppen (wie Makrozoobenthos oder Kieselalgen in Fließgewässern) und nicht zuletzt auch die Nichtinvasivität (Goldberg et al. 2016; Deiner et al. 2017; Pawlowski et al. 2018; Ruppert et al. 2019). Letzteres ist vor allem für geschützte Arten oder in geschützten Regionen wie Nationalparks von großem Vorteil, da man in diesen Fällen aus naturschutzrechtlichen Gründen den Eingriff in das Ökosystem so gering wie möglich halten möchte. Allerdings sind die eDNA Methoden allgemein auch noch stark in der Entwicklungsphase und besitzen auch methodische Grenzen. So sind beispielsweise Abundanz- oder Biomasseberechnungen basierend auf eDNA noch sehr umstritten, wenngleich es auch gute Fortschritte hierbei gibt (Harper et al. 2019).



Abbildung 1: Der Johnsbach vor (links) und nach (rechts) den Revitalisierungsmaßnahmen.
Fotos © NP Gesäuse

Ziel dieser Studie war die Erhebung der Anwesenheit der Europäischen Äsche (*Thymallus thymallus*) in der Gesäuse-Enns sowie im untersten Abschnitt des Johnsbaches mittels eDNA Methodik. Es sollte ein qPCR-Protokoll getestet werden, welches ursprünglich für die Arktische Äsche (*Thymallus arcticus*) entwickelt wurde. Wir wollten überprüfen, ob dieses Protokoll auch geringe Äschendichten in einem größeren Fluss wie der Enns detektieren kann bzw. auch die vermutlich extrem niedrigen Äschendichten im Johnsbach, falls Äschen tatsächlich während der Laichzeit in diesen migrieren und sich im Herbst eventuell sogar Jungfische nachweisen lassen. Eine Anwesenheit der Äsche im Johnsbach würde weiters die Fischpassierbarkeit der untersten Schwellstufen des Johnsbaches belegen. Die Untersuchungen wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Frau Mag. Sarah Sturm durchgeführt.

Untersuchungsgebiet

Das Beprobungsgebiet lag zur Gänze im Nationalpark Gesäuse. Es wurden einerseits drei Beprobungsstellen an der Enns beprobt, andererseits zwei Stellen am Johnsbach (*Abbildung 2*).

Die erste Beprobungsstelle an der Enns (E1), befand sich ca. 50 m flussaufwärts der dortigen Eisenbahnbrücke. Diese Beprobungsstelle befand sich direkt flussabwärts des Gesäusekatarakts und ist durch eine starke Strömungsgeschwindigkeit über einem Untergrund mit groben Blockwürfen (Megalithal) gekennzeichnet. Die zweite Beprobungsstelle an der Enns (E2) lag direkt an der Fußgängerbrücke Johnsbachsteg, ca. 100 m flussabwärts der Mündung des Johnsbaches in die Enns. Die Probennahme fand hier in einem strömungsberuhigten Bereich mit Grobkies (Mikrolithal bis Akal) statt. Die dritte Stelle befand sich an der Autobrücke am Gstatterboden (E3). Hier macht sich bereits der Einflussbereich der Aufstauung durch das Kraftwerk Gstatterboden bemerkbar, sodass die allgemeine Fließgeschwindigkeit der Enns verlangsamt war (*Abbildung 3*).

Der erste Beprobungspunkt am Johnsbach (J1) wurde direkt über der Straßenbrücke beim Gasthof zum Bachwirt gewählt, ca. 200 m flussaufwärts der Johnsbachmündung in die Enns. Aufgrund der zeitgleichen Brutsaison des Flussuferläufers (*Actitis hypoleucos*), war es nicht möglich, den direkten Mündungsbereich des Johnsbaches zu begehen. Der zweite Beprobungspunkt am Johnsbach (J2) befand sich weitere 500 m flussaufwärts am Johnsbach (*Abbildung 4*). Zum Zeitpunkt der Probennahmen (April/Mai 2019) führte

Abbildung 2:

Lage der
Beprobungspunkte an
der Enns und dem
Johnsbach.

E1: Enns –
Gesäuseeingang;

E2: Enns –
Johnsbachsteg;

E3: Enns –
Gstatterboden;

J1: Johnsbach
Bachbrücke;

J2: Johnsbach –

Hellichter Stein. Grüne Diamanten zeigen die 2003 vom
NP Gesäuse kartierten Äschenlaichplätze an.

(Datenquellen: Digitaler Atlas Steiermark; Open Street Map,

Open Data Österreich). * Natürliche Barriere, sehr dynamisch bei Hochwasserereignissen



der Johnsbach aufgrund der Schneeschmelze viel Wasser und es konnten keine vor-
handenen Sohlschwellen kartiert werden. Jedoch wurden mithilfe von aktuellen Orthofotos
des Digitalen Atlas Steiermark gut erkennbare Schwellen nachverortet. Diesen zufolge
befand sich mindestens ein Hindernis zwischen Johnsbachmündung und J1, sowie
mindestens vier Hindernisse zwischen Johnsbachmündung und J2.

Material und Methoden

Probennahme

Sämtliche für die Beprobung benötigten Materialien wurden jeweils vor Verwendung
von DNA gereinigt, indem sie für eine Stunde in 10%iger Bleiche eingelegt und
anschließend mit destilliertem Wasser gespült wurden. An den fünf Beprobungspunkten
wurde jeweils mit einer HDPE Flasche je 1 Liter Wasser für die Analysen entnommen
(Abbildung 5a). Dieses Wasser wurde danach mithilfe einer 50 ml Omnifix® Einmalspitze
durch einen sterilen Glasfaserfilter (Whatman®; 25 mm Durchmesser, nominale Porengröße
0,7 µm) gedrückt (Abbildung 5b). Je nach Festpartikelgehalt des Wassers wurden hierfür



Abbildung 3: Beprobungspunkte an der Enns. E1: Gesäuseeingang; E2: Johnsbachsteg;
E3: Gstatterboden. Fotos © I. Karner



Abbildung 4: *Beprobungspunkte Johnsbach. J1: Brücke; J2: Hellichter Stein. Fotos © I. Karner*

2 bis 10 Einzelfilter verwendet. Die Filter wurden einzeln in Proberöhrchen mit 700 μ l Longmire Lysis Puffer überführt (*Abbildung 5c*).

An jeder Probenstelle wurde vor der ersten Wasserentnahme eine Negativkontrolle, bestehend aus destilliertem Wasser, mit den zur Probennahme verwendeten Materialien filtriert, um eventuelle Materialkontaminationen erkennen zu können. An jeder Probennahmestelle wurde zusätzlich die Wassertemperatur bestimmt (Ausnahme: letzte beiden Beprobungszeitpunkte). Die gefilterten Proben wurden an demselben Tag an das Institut für Biologie, Universität Graz transportiert, wo sie bis zur weiteren Bearbeitung bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren wurden. Insgesamt wurden fünf Beprobungsdurchgänge durchgeführt, vier davon im Frühjahr (Mai/ April), an denen jeweils alle fünf Untersuchungsstellen beprobt wurden und eine im Herbst (Oktober), an welchem die beiden Johnsbachstellen sowie die Ennsstelle E2 beprobt wurden (Tabelle 1).



Abbildung 5: *eDNA Probennahme. (a) Ein definiertes Volumen an Wasser wird aus dem Fluss entnommen (b) das Wasser wird mithilfe einer 50 ml Spritze durch einen Glasfaserfilter gedrückt (c) Der Filter, hier deutlich durch Schwebstoffe des Wassers bräunlich gefärbt, wird mithilfe von Pinzetten in ein Proberöhrchen überführt. Fotos © Sarah Sturm & I. Karner*

Tabelle 1: Details zu den eDNA Beprobungen. Angegeben sind für jeden Beprobungszeitpunkt das Datum der Probennahme, die Anzahl der verwendeten Glasfaserfilter je 1 L Wasserprobe und die gemessene Wassertemperatur. k.A.: Keine Angabe da Gerät defekt

Beprobungszeitpunkt	Datum	# verwendete Filter je Probe					Wassertemperatur [°C]				
		E1	E2	E3	J1	J2	E1	E2	E3	J1	J2
1	25. 4. 2019	10	10	10	3	2	6,5	6,9	7,1	6,0	6,3
2	6. 5. 2019	2	2	2	3	2	5,0	5,0	5,0	4,8	5,0
3	20. 5. 2019	2	3	2	2	2	7,5	7,5	7,5	6,5	6,5
4	27. 5. 2019	4	4	4	2	2			k.A.		
5	6. 10. 2019	–	2	–	2	2			k.A.		

eDNA Extraktion & PCR Amplifikationen

Um Kontaminationen der DNA Proben mit fremd-DNA zu vermeiden, fanden sowohl die DNA Extraktion, als auch das Ansetzen der qPCR Reaktionen am Institut für Biologie in einem gesonderten Reinraum statt, welcher ausschließlich der Bearbeitung von Nicht-invasiven oder gering-konzentrierten DNA Proben gewidmet ist. Für die Extraktion der eDNA aus den gefilterten Wasserproben wurde ein Protokoll nach der Phenol-Chloroform-Isoamyl Alkohol Methode gewählt (Sambrook et al. 1989; Renshaw et al. 2015). Nach ersten DNA-Extraktionen wurden Inhibitoren in den DNA-Extrakten festgestellt. Hiernach wurden zwei zusätzliche Ethanol-Waschschritte eingebaut, sowie die finalen DNA-Extrakte mit dem DNA Clean & Concentrator™ – 5" Kit (Zymo Research) aufgereinigt. Die Einzel-extrakte der Filter einer Probestelle eines Beprobungsdatums wurden hierbei im letzten Eluationschritt gepoolt, sodass sich pro Probestelle eines Beprobungsdatums ein Extrakt mit einem Volumen von 100 µl ergab. Die Extrakte der Negativkontrollen wurden getrennt gehalten (und jeweils auch in 100 µl eluiert).

Das getestete qPCR Protokoll wurde ursprünglich für die Arktische Äsche (*Thymallus arcticus*) entwickelt (Carim et al. 2016). Um seine Anwendbarkeit auch für die Europäische Äsche (*Thymallus thymallus*) zu überprüfen, wurde es vorab an Gewebeproben der Europäischen Äsche durchgeführt. Hierbei wurden zwei Varianten des Forward Primers, welche sich durch einen Einzelpolymorphismus (A/G SNP) in der DNA Sequenz unterscheiden, ausgetestet. Hierfür wurde zuerst für beide Primervarianten eine konventionelle PCR nach dem Protokoll von Carim et al. 2016, jedoch ohne die TaqMan Probe in folgender Zusammensetzung angesetzt: 7,5 µl Environmental MasterMix 2.0 (Thermo Fisher Scientific), 600 nM Forward-Primer 5'-CCTTTCCCCGAATAAATAACAT(A/G)AG-3'; 600 nM Reverse Primer 5'-ATACTGTCCACCCTGTCCCG-3'; 2 µl DNA Extrakt *Thymallus thymallus* (ca. 20 ng/ µl) und ddH₂O aufgefüllt auf 15 µl. Das Zyklusprofil der PCR Reaktion begann mit einer Initial-Denaturierung von 10 min bei 95 °C, gefolgt von 50 Zyklen von 15 sec bei 95 °C und 60 sec bei 60 °C. Die PCR Produkte wurden per Gel-Elektrophorese auf korrekte Amplifikation überprüft. Nachdem die korrekte Amplifikation bestätigt war, wurde eine Verdünnungsreihe angefertigt. Nachdem die Primervariante »G« zu leicht besseren Amplifikation geführt hatte, wurde ab diesem Zeitpunkt nur mit dieser weitergearbeitet. Es wurde anhand von aufgereinigten und quantifizierten PCR Produkten eine Verdünnungsreihe für die qPCR Untersuchungen erstellt. Hierfür wurde dasselbe Protokoll verwendet, welche später auch für die eDNA Proben angewandt wurde. Die

PCR Reaktionen bestanden aus: 7,5 µl Environmental MasterMix 2.0 (Thermo Fisher Scientific), 600 nM Forward-Primer 5'-CCTTTCCCGAATAAATAACATGAG-3', 600 nM Reverse Primer 5'-ATACTGTCCACCCTGTCCCG-3', 250 nM TaqMan Probe 5'-FAM-GAGAGGTACAGCTCTCTTG-MGB-Q500-3', 2 µl DNA Template DNA (PCR Produkte in den Konzentrationen $4,84 \cdot 10^{-5}$, 10^{-6} , 10^{-7} und ng je µl) und ddH₂O aufgefüllt auf 15 µl. Das PCR Profil entsprach dem bereits oben genannten. Alle qPCR wurden auf einem Corbett-RotorGene (Qiagen) durchgeführt. Die Fluoreszenzmessung fand am Ende der Elongationsphase statt. Je Verdünnungsstufe wurden drei qPCR Replikate durchgeführt und es wurden vier PCR-Negativkontrollen (ddH₂O anstelle von Template DNA) inkludiert.

Die qPCRs der eDNA Proben, sowie deren Negativkontrollen wurden analog zu den qPCR Reaktionen der Verdünnungsreihe durchgeführt. Allerdings wurden hier je acht Replikate je Probe durchgeführt. Pro PCR Durchlauf (bis zu 72 PCR Reaktionen) wurden zwei PCR-Positivkontrollen (Äschen-Gewebeextrakt), sowie vier PCR-Negativkontrollen (ddH₂O) mitgeführt. Des Weiteren wurde jede Probe auf eventuell enthaltene PCR-Inhibitoren getestet, indem 1 µl Gewebeextrakt mit 1 µl eDNA-Extrakt der Probe »gespiked« wurde. Es wurde für jede Probe der mittlere C_T-Wert berechnet, welcher jenen Zeitpunkt während der PCR bezeichnet, bei dem die Amplifikation der Probe den gesetzten Threshold überschreitet. Dieser spiegelt die DNA Konzentration in der Probe wider, wobei ein hoher C_T-Wert einer niedrigen DNA-Konzentration entspricht (und vice-versa).

Ergebnisse

Die Gel-Elektrophorese der konventionellen PCR der Äschen-Gewebeextrakte zeigte saubere Banden im erwarteten Größenbereich, worauf auf eine korrekte Amplifikation geschlossen wurde. Die Erstellung der Standardkurve aus der Verdünnungsreihe der aufgereinigten PCR Produkte lieferte deutliche Amplifikationen für alle vier Verdünnungsstufen (Abbildung 6). Die Effizienz der PCR wurde mit 1,09 und R² mit 0,99897 berechnet, womit sich auf eine effiziente und reproduzierbare Amplifikation von Äschen-DNA durch dieses Protokoll schließen lässt.

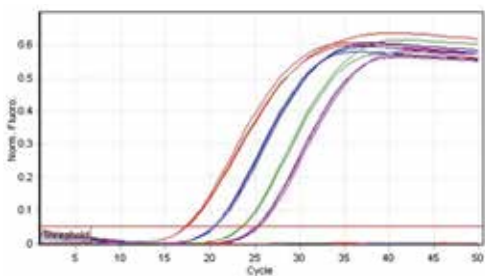


Abbildung 6: Amplifikationen der Verdünnungsreihe aus PCR Produkten von Äschengewebeproben. Es wurden jeweils drei Replikate für jede der vier Verdünnungsstufen (Konzentrationen $4,84 \cdot 10^{-5}$ bis 10^{-8} ng / µl) durchgeführt. Eine sigmoide Amplifikationskurve, welche die »Threshold«-Linie überschreitet, wird als positiv gewertet. Je weiter links die Threshold-Linie überschritten wird, desto höher ist die Ziel-DNA Konzentration in der Probe.

	E1	E2	E3	J1	J2
25. 4. 2019	8	7	8	1	3
06. 5. 2019	4	8	7	1	0
20. 5. 2019	8	7	7	0	0
27. 5. 2019	8	8	8	2	2
6. 10. 2019	N/A	8	N/A	0	0

Abbildung 7: Heatmap der positiv-Amplifikationen an den einzelnen Probestellen (Spalten) und Beprobungszeitpunkten (Zeilen). Rein negative Amplifikation sind weiß, höhere Amplifikationsraten durch Rotintensität dargestellt. E1: Enns – Gesäuseeingang; E2: Enns – Johnsbachsteg; E3: Enns – Gstatterboden; J1: Johnsbach Bachbrücke; J2: Johnsbach – Hellichter Stein. N/A: bei dem Beprobungsdurchgang nicht beprobt.

Tabelle 2: Ergebnisse der qPCR Analysen. Gelistet sind Beprobungszeitpunkt und -stelle, die Anzahl der positiven qPCR Replikate (aus insgesamt acht Replikaten), sowie der Mittlere CT-Wert der acht Replikate.

Datum	Probestelle (Code)	Probestelle (Name)	# positive qPCRs	Mittlerer C _T -Wert
25. 04. 2019	J1	Johnsbach Bachbrücke	1	37,79
25. 04. 2019	J2	Johnsbach Hellichter Stein	3	37,44
25. 04. 2019	E1	Enns Gesäuseeingang	8	34,39
25. 04. 2019	E2	Enns Johnsbachsteg	7	35,96
25. 04. 2019	E3	Enns Gstatterboden	8	35,9
06. 05. 2019	J1	Johnsbach Bachbrücke	1	39,07
06. 05. 2019	J2	Johnsbach Hellichter Stein	0	N/A
06. 05. 2019	E1	Enns Gesäuseeingang	4	37,81
06. 05. 2019	E2	Enns Johnsbachsteg	8	36,55
06. 05. 2019	E3	Enns Gstatterboden	7	37,58
20. 05. 2019	J1	Johnsbach Bachbrücke	0	N/A
20. 05. 2019	J2	Johnsbach Hellichter Stein	0	N/A
20. 05. 2019	E1	Enns Gesäuseeingang	8	37,12
20. 05. 2019	E2	Enns Johnsbachsteg	7	37,2
20. 05. 2019	E3	Enns Gstatterboden	7	36,88
27. 05. 2019	J1	Johnsbach Bachbrücke	2	37,29
27. 05. 2019	J2	Johnsbach Hellichter Stein	2	43,18
27. 05. 2019	E1	Enns Gesäuseeingang	8	34,77
27. 05. 2019	E2	Enns Johnsbachsteg	8	35,96
27. 05. 2019	E3	Enns Gstatterboden	8	34,96
06. 10. 2019	J1	Johnsbach Bachbrücke	0	N/A
06. 10. 2019	J2	Johnsbach Hellichter Stein	0	N/A
06. 10. 2019	E2	Enns Johnsbachsteg	8	N/A*

* mittlerer C_T-Wert wurde nicht berechnet, da ein anderer Standard als bei den Frühjahrsproben verwendet wurde

Keine der Negativkontrollen (Feld-Negativkontrollen sowie auch PCR- Negativkontrollen) zeigte Amplifikationen, wodurch Kontaminationen ausgeschlossen werden können. Es gab keinen Hinweis auf die Anwesenheit von Inhibitoren nach Einführung der zusätzlichen Ethanol-Waschschritte und Kit-Aufreinigung der Proben. Von den 23 eDNA Extrakten, welche von den fünf Beprobungsstellen an den fünf Beprobungszeitpunkten genommen wurden, ließ sich in 18 Extrakten zumindest eine Amplifikation in den acht qPCR Replikaten beobachten (Tabelle 2, *Abbildung 7*). Jene fünf Extrakte, welche keine Amplifikation zeigten, stammen alle vom Johnsbach. Eine davon wurde am 6. 5. 2019 an J2 – Johnsbach Hellichter Stein entnommen, die beiden anderen am 20. 5. 2019 bzw. 6. 10. 2019 an den beiden Johnsbachstellen. Die eDNA Proben aus der Enns zeigten alle zumindest vier positive Amplifikation, bei den Proben aus dem Johnsbach zeigten fünf von 10 zumindest eine Amplifikation. Ein konservativerer Ansatz zählt erst dann eine Probe als positiv,



Abbildung 8: Potentielle Hindernisse durch Sohlschwellen zwischen den Beprobungsstellen J1 »Bachbrücke« und J2 »Hellichter Stein«. Aufgenommen am 6. Oktober 2019.
Fotos © T. Schenekar

wenn eine Amplifikation in mindestens zwei unabhängigen PCRs beobachtet wird. In diesem Fall wären auch die Proben von J1 – Johnsbach- Bachbrücke als negativ zu werten, womit sich an nur drei Proben des Johnsbaches Positivnachweise auf die Äsche ergeben würden. Insgesamt hatten die Proben aus dem Johnsbach einen höheren mittleren C_T -Wert (Mittelwert 38,95; Standardabweichung 2,46), als Proben aus der Enns (Mittelwert 36,26; Standardabweichung 1,09).

Diskussion

Anwendung des eDNA Protokolls im Gesäuse

Das Protokoll von Carim et al. (2016) erwies sich als sehr geeignet, auch die Europäische Äsche (*Thymallus thymallus*) nachzuweisen. Es wurden erfolgreich insgesamt 13 eDNA Proben aus der Enns entnommen, welche alle eindeutig positiv auf Äschen getestet wurden. Hierbei ergaben sehr hohe Amplifikationsraten, nämlich in allen bis auf einen Fall sieben oder acht positive von acht PCR-Replikaten je Probe. Selbst bei den sehr niedrigen Dichten der Äsche in der Enns (zuletzt erhoben 2009 mit 8,8 kg Biomasse/ha und 77,7 Individuen/ha; Wiesner et al. 2010) konnte das angewandte eDNA – qPCR Protokoll mit der Entnahme von nur einem Liter Wasser Äschen in diesem Dichtebereich eindeutig detektieren. Etwas überraschend zeigten insgesamt fünf der 10 Proben aus dem Johnsbach ebenfalls Hinweise auf Äschenanwesenheit. Diese verteilten sich sowohl auf die untere Beprobungsstelle (Bachbrücke), als auch die 500 m flussauf gelegene Stelle (Hellichter Stein). Die Amplifikationsraten waren hierbei jedoch deutlich niedriger als jene der Enns. Legt man den Detektionsschwellenwert auf mindestens zwei positive PCRs je Probe, zählen nur drei der 10 Proben als positiv, allerdings stammen auch diese sowohl von der Bachbrücke als auch vom Hellichten Stein. Die niedrigeren Amplifikationsraten sind mit hoher Wahrscheinlichkeit auf geringere Äschen-DNA Konzentrationen in den eDNA Proben zurückzuführen. Dieses spiegeln auch die allgemein höheren C_T -Werte der PCR Amplifikate aus dem Johnsbach wider. Ursache hierfür sind die sehr geringen Individuendichten im Johnsbach. Die exakte Quantifizierung von Biomasse- und/oder Individuendichten durch eDNA Erhebungen sind derzeit noch stark umstritten, da sehr viele Faktoren die Detektionswahrscheinlichkeit beeinflussen können (wie Durchfluss des Gewässers, entnommenes Wasservolumen, Positionierung der Probennahme, Primer-Effizienzen im Labor etc.) (Harper et al. 2019), jedoch werden auch hierfür ständig neue Methoden und Ansätze entwickelt, um auch dies zukünftig ermöglichen zu können. Für unsere Studie im Gesäuse haben wir uns rein auf die Testung auf Anwesenheit der Äsche

in den beiden untersuchten Flüssen beschränkt. Diese beurteilen wir für die Enns während aller fünf Beprobungszeitpunkte als gegeben, für den Johnsbach als definitiv positiv für den 25. 4. 2019 und auch den 27. 5. 2019. Mit nur einer Amplifikation ist der Nachweis der Äsche am 6. 5. 2019 als eher schwach zu interpretieren und die Beprobungen am 20. 5. 2019 sowie 6. 10. 2019 waren rein negativ.

Rückschlüsse auf potentielle Laichaufstiege der Äsche in den Johnsbach

Die Ergebnisse der eDNA Erhebungen decken sich sehr gut mit jenen der Befischungen von Gumpinger und Fischer (2015). Hierbei wurden nur Äschen im Mündungsbereich beobachtet, mit einem einzelnen Tier weiter flussaufwärts des Johnsbaches. Leider war es uns während der Beprobungen nicht möglich, direkt den Mündungsbereich selbst zu beproben. Jedoch können wir darauf schließen, dass für einige Individuen der Aufstieg in den Johnsbach über mehrere Sohlenschwellen hinweg möglich war und dieser eventuell durch Laichwanderungen verursacht wurde. Die Beprobungszeit und die gemessene Wassertemperatur fielen genau in die bevorzugten Laichwanderbedingungen der Äsche, sodass die Anwesenheit der Äsche im Johnsbach durchaus durch Laichwanderungen bedingt sein können. Ob diese Tiere tatsächlich erfolgreich im Johnsbach ablaichen, lässt sich rein durch ihre Anwesenheit jedoch nicht beurteilen. Hierfür könnten die Ergebnisse der Herbstbeprobung einen Hinweis geben, welche jedoch rein negativ ausfielen, was daher nicht auf die Anwesenheit von Jungfischen im Johnsbach im Oktober hindeutet. Dies könnte durch die hohe Dynamik des Johnsbaches und seinen hohen Geschiebetransport bedingt sein, sodass die aufsteigenden Äschen tatsächlich nicht ablaichen können, oder aber der Laich oder die Jungfische sich nicht entwickeln können. Alternativ wäre es sehr wohl möglich, dass Äschen im Johnsbach im Frühjahr ablaichen, die Jungfische jedoch im Laufe des Sommers aus dem Johnsbach flussabwärts in die Enns migrieren, da Jungäschen während des Sommers weite Wanderungen (über 7 km und mehr) zurücklegen können (Bentley et al. 2015). Des Weiteren stellen die Sohlenschwellen im Johnsbach bei niedrigem Wasserstand im Herbst leider teilweise noch immer nicht-passierbare Hindernisse dar, sodass Jungfische nach eventuellem Abdriften oder Wanderungen flussabwärts diese nicht mehr flussaufwärts passieren können (*Abbildung 8*). Natürlich kann eine einzelne Beprobung im Herbst keine umfangreiche Datengrundlage für einen vollkommenen Ausschluss von Jungäschen in dem Gewässer liefern. Wie die Ergebnisse vom 20. 5. 2019 zeigen, können Einzelbeprobungen auch trotz Äschenpräsenz negativ ausfallen. Um eine präzisere Aussage über die Dauer der Anwesenheit von Äschen im Johnsbach im Laufe des Jahres treffen zu können, wäre eine längere Beprobungsdauer vom Frühjahr bis in den Herbst vonnöten. In jedem Fall bietet der renaturierte Johnsbach, vor allem dessen Mündungsbereich, wertvollen Lebensraum, sowohl als potentielles Jungfischhabitat als auch für adulte Fische als Rückzugsgebiet z. B. bei Hochwasserereignissen in der Enns.

DANKSAGUNG

Wir bedanken uns beim Nationalpark Gesäuse, allen voran bei Mag. Alexander Maringer, für die Projekt-ermöglichung und die Unterstützung während der Durchführung. Großer Dank gilt auch MSc. Gernot Englmaier, Julia Sturm, Mag. Charlotte Klinger und Verena Pevny für die Unterstützung bei den Probennahmen und bei MSc. Jacqueline Grimm für die Hilfe im Labor.

REFERENZEN

- Bentley KT, Schindler DE, Armstrong JB, et al (2015) Inter-Tributary Movements by Resident Salmonids across a Boreal Riverscape. *PLoS One* 10:e0136985
- Carim KJ, Dysthe JCS, Young MK, et al (2016) An environmental DNA assay for detecting Arctic grayling in the upper Missouri River basin, North America. *Conserv Genet Resour* 8:197–199. doi: 10.1007/s12686-016-0531-1
- Deiner K, Bik HM, Mächler E, et al (2017) Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Mol Ecol* 26:5872–5895. doi: 10.1111/mec.14350

- Goldberg CS, Turner CR, Deiner K, et al (2016) Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods Ecol Evol* 7:1299–1307. doi: 10.1111/2041-210X.12595
- Grollitsch U (2005) Die Fische der Gesäuse-Enns. Im Gseis – Das Natl Gesäuse Mag Frühjahr '06:6–7
- Gumpinger C, Fischer A (2015) Johnsbach Post-Monitoring Fischökologie – Untersuchung der Wirkung von umgesetzten flussbaulichen Maßnahmen – Im Auftrag der Wildbach- und Lawinenverbauung, Gebietsbauleitung Steiermark Nord, Wels, 32 S.
- Haas A (2010) Vergleich der Habitatausstattungen unterschiedlicher Abschnitte der Enns, im Raum Liezen und Gesäuse, aus Sicht der Fischökologie. Diplomarbeit / Masterarbeit - Institut für Hydrobiologie, Gewässermanagement (IHG), BOKU-Universität für Bodenkultur, pp 113
- Harper LR, Buxton AS, Rees HC, et al (2019) Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. *Hydrobiologia* 826:25–41. doi: 10.1007/s10750-018-3750-5
- Harper LR, Lawson Handley L, Hahn C, et al (2018) Needle in a haystack? A comparison of eDNA metabarcoding and targeted qPCR for detection of the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Ecol Evol* 8:6330–6341. doi: 10.1002/ece3.4013
- Haseke H (2011) LIFE05 NAT/A/000078 Naturschutzstrategien für Wald und Wildfluss im Gesäuse – Final Report – Abschlussbericht. Weng im Gesäuse
- Hering D, Borja A, Jones JJ, et al (2018) Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive. *Water Res* 138:192–205. doi: 10.1016/j.watres.2018.03.003
- Hydrografischer Dienst Steiermark (2019) Hydrographie Steiermark. http://app.hydrographie.steiermark.at/bilder/Hochwasserzentrale/Source/SteiermarkOverview_Pub.htm. Accessed 18 Oct 2019
- Jungwirth M, Haidvogel G, Moog O, et al (2003) Angewandte Fischökologie an Fließgewässern. Facultas Universitätsverlag, Wien
- Jungwirth M, Muhar S, Zauner G, et al (1996) Die steirische Enns; Fischfauna und Gewässermorphologie
- Kreiner D, Sterl P, Haseke H (2008) LIFE-Fest am Johnsbach: Ein Wochenende mit Spaß und Ernst! Im Gseis – Das Natl Gesäuse Mag Herbst/Win:8–10
- NP Gesäuse (2019) Die Enns. <https://www.nationalpark.co.at/de/naturraum/gewaesser/30-enns>. Accessed 23 Sep 2019
- Pawlowski J, Kelly-Quinn M, Altermatt F, et al (2018) The future of biotic indices in the ecogenomic era: Integrating (e)DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems. *Sci Total Environ* 637–638:1295–1310. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.05.002
- Renshaw MA, Olds BP, Jerde CL, et al (2015) The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol-chloroform-isoamyl alcohol DNA extraction. *Mol Ecol Resour* 15:168–176
- Ruppert KM, Kline RJ, Rahman MS (2019) Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Glob Ecol Conserv* 17:1–29. doi: 10.1016/j.gecco.2019.e00547
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) Molecular cloning. A laboratory manual, 2nd Editio. Cold Spring Harbor Laboratory Press, NewYork
- Taberlet P, Coissac E, Hajibabaei M, Rieseberg LH (2012) Environmental DNA. *Mol ...* 21:1789–1793. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x
- Tsuji S, Iguchi Y, Shibata N, et al (2018) Real-time multiplex PCR for simultaneous detection of multiple species from environmental DNA: An application on two Japanese medaka species. *Sci Rep* 8:1–5. doi: 10.1038/s41598-018-27434-w
- Wiesner C, Unfer G, Foramatti A, Jungwirth M (2008) Naturschutzstrategien für Wald und Wildfluss im Gesäuse – Prämonitoring Fischökologie
- Wiesner C, Unfer G, Foramatti A, Jungwirth M (2010) Naturschutzstrategien für Wald und Wildfluss im Gesäuse – Postmonitoring Fischökologie
- Zauner G (1999) Einfluß des Kormorans auf die fischökologischen Verhältnisse der steirischen Enns zwischen Liezen und Johnsbach

Zertifizierter Forellenzuchtbetrieb – attestiert frei von allen Forellenseuchen – Kategorie 1

Regenbogen- u. Bachforellen

Bachsaiblinge . Eier . Brut

Setzlinge . Speisefische

Lachsforellen

Martin & Christa . Ebner

A-5261 Helpfau-Uttendorf . St. Florian 20 . Tel./Fax +43 7724.2078 . +43 676.91 55 672

office@forellen-ebner.at . www.forellen-ebner.at



ZOBODAT - www.zobodat.at

Zoologisch-Botanische Datenbank/Zoological-Botanical Database

Digitale Literatur/Digital Literature

Zeitschrift/Journal: [Österreichs Fischerei](#)

Jahr/Year: 2019

Band/Volume: [72](#)

Autor(en)/Author(s): Schenekar Tamara, Sturm Sarah, Weiss Steven

Artikel/Article: [Wissenschaft. Auf den Spuren der Äsche im Gesäuse: Nachweis und Kartierung von *Thymallus thymallus* in der Enns und dem Johnsbach mittels eDNA 297-309](#)