

UNIVERSITÄT GRAZ
UNIVERSITY OF GRAZ



Nachweis und Kartierung von
Thymallus thymallus
im Nationalpark Gesäuse

Diplomarbeit

zur Erlangung des akademischen Grades
der Magistra der Naturwissenschaften

an der Karl – Franzens – Universität Graz

vorgelegt von

Sarah STURM

Begutachter

Assoz. Univ.- Prof. Dr. Steven Weiss

Institut für Biologie

Graz, 2019

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die angegebenen Quellen nicht benutzt und die den Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen inländischen oder ausländischen Prüfungsbehörde vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht. Die vorgelegte Fassung entspricht der eingereichten elektronischen Version.

Juli, 2019

Sarah STURM

Danksagung

Ich möchte mich herzlich bei meinem Diplomarbeitsbetreuer Assoz. Univ.- Prof. Dr. Steven Weiss bedanken, dass er mir ermöglicht hat, meine Diplomarbeit in Form von Feld- und Laborarbeit zu absolvieren und dass er mich in dieser Zeit unterstützt hat.

Großen Dank möchte ich Dr. rer. nat. Tamara Schenekar für die hilfreiche Unterstützung sowohl während der Laborarbeit, als auch beim Verfassen meiner Diplomarbeit aussprechen. Auch für die hilfreichen und schnellen Antworten bei allen anstehenden Fragen und Unklarheiten möchte ich mich sehr bedanken.

Außerdem möchte ich mich bei MSc. Jacqueline Grimm für die tolle Laboreinschulung bedanken. Großer Dank gilt auch MSc. Gernot Englmaier, Julia Sturm, Mag. Charlotte Klinger und Verena Pevny für die Unterstützung bei den Probennahmen im Nationalpark Gesäuse. Ohne euch wäre mir die Probennahme nicht möglich gewesen.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meinen Eltern und Großeltern für die finanzielle Unterstützung und die nötige Motivation das ganze Studium hinweg bedanken. Ohne euch wäre ich nie so weit gekommen.

Kurzfassung

Das primäre Ziel der Diplomarbeit ist gewesen, das eDNA qPCR Protokoll zu testen. Dafür sind die Enns und der Johnsbach im Bereich des Nationalparks Gesäuse für die Beprobung ausgewählt worden. Es ist getestet worden, ob Äschen (*Thymallus thymallus*) in den Johnsbach aufsteigen oder nicht.

Die eDNA - Probennahme hat im Zeitraum von Ende April bis Ende Mai 2019 fünf Mal an 3 Stellen der Enns und an 2 Stellen des Johnsbaches stattgefunden. Es ist an jeder Probenstelle insgesamt 1 Liter Wasser durch Filter gedrückt worden, um die eDNA darin zu sammeln. Die Proben sind dann im Labor extrahiert und anhand einer qPCR getestet worden, ob sich darin Äschen – DNA befindet.

Das Protokoll hat sowohl in der Enns als auch im Johnsbach funktioniert, da an jeder Stelle mindestens ein Replikat amplifiziert hat. Somit ist festgestellt worden, dass das Protokoll auch in größeren Flüssen wie der Enns, in welcher in Relation zur Größe des Flusses die Äschen – Populationsdichte gering ist, funktioniert. Auch im Johnsbach, wo keine Äschen erwartet worden sind, sind wenige Replikate amplifiziert, wodurch anzunehmen ist, dass Äschen zumindest bis zur Probenstelle „Hellichter Stein“ aufsteigen.

Abstract

The main goal of the thesis was to test out the eDNA qPCR protocol. The Enns and the Johnsbach in the Gesäuse National Park were chosen to do that. Samples were taken from two spots in the Johnsbach and three spots in the Enns five times between the end of April and the end of May 2019. At every sample position 1 Liter of water was put through filters to collect the eDNA. The samples were extracted in the laboratory and the DNA extracts were used to perform the qPCR to detect grayling.

The protocol worked in both rivers, because at least one replicate of each sample amplified. Most of the replicates detected grayling in the three sites of the Enns, which confirms that the test works in a large river. It is known that there is grayling in the Enns but the population is relatively small, so the test is certainly sensitive. There were also some positive detections in the Johnsbach, so apparently grayling do go up the Johnsbach.

Inhaltsverzeichnis

1. Allgemeine Grundlagen	6
1.1. Die europäische Äsche (<i>Thymallus thymallus</i>)	6
1.1.1. Merkmale.....	6
1.1.2. Wachstum und Reproduktion.....	7
1.1.3. Habitat	8
1.1.4. Verbreitung und Gefährdung der Äsche in Österreich mit Fokus auf die steirische Enns im Nationalpark Gesäuse.....	8
1.2. Environmental DNA	11
1.3. Echtzeit Polymerase – Kettenreaktion (qPCR)	11
2. Hintergrund und Zielsetzung.....	13
3. Material und Methoden	15
3.1. Feldarbeit	15
3.1.1. Protokoll für die Probennahme.....	18
3.2. DNA – Extraktion	19
3.3. qPCR Protokoll	21
3.4. Verdünnungsreihe	22
4. Ergebnisse und Diskussion	23
4.1. Ergebnis der Verdünnungsreihe.....	23
4.2. eDNA 030 – 063	26
4.3. eDNA 073 – 087	28
4.4. eDNA 095 – 109	29
4.5. eDNA 111 – 129	31
4.6. Allgemeine Diskussion	33
5. Zusammenfassung.....	34
6. Fachdidaktischer Teil	35

6.1.	<i>Molekulare Grundlagen der Genetik – Was ist DNA?</i>	35
6.2.	<i>Was ist ein Gen?</i>	36
6.3.	<i>DNA – Replikation</i>	36
6.4.	<i>Vom Gen zum Merkmal</i>	37
6.4.1.	Transkription	37
6.4.2.	Translation.....	37
6.5.	<i>Der genetische Code</i>	38
6.6.	<i>Moderne Gentechnische Verfahren</i>	38
6.6.1.	Gelelektrophorese.....	38
6.6.2.	Polymerase – Ketten – Reaktion (PCR).....	39
6.7.	<i>Stundenplanungen</i>	41
6.7.1.	DNA – Aufbau und Bedeutung.....	42
6.7.2.	DNA - Replikation	50
6.7.3.	Proteinbiosynthese	55
6.7.4.	Moderne gentechnische Verfahren.....	57
7.	Anhang:	64

1. Allgemeine Grundlagen

1.1. Die europäische Äsche (*Thymallus thymallus*)

Die europäische Äsche (*Thymallus thymallus*) ist eine zur Unterfamilie der Thymallinae gehörige heimische Fischart (Kottelat & Freyhof, 2007). Die Verbreitung beruht grundsätzlich auf Gebiete in Ost-, Mittel und Westeuropa, ist jedoch sehr unregelmäßig. Die Äsche reagiert sehr empfindlich auf Temperatur- und Wasserstandsschwankungen, weshalb Populationen in einigen Gebieten sehr stark zurückgegangen sind (Terofal, 1984).

1.1.1. Merkmale

Der Körperbau der Äsche ist eher langgestreckt und seitlich abgeflacht. Die große Rückenflosse ist das auffälligste Merkmal der Äsche und wird auch dementsprechend als „Äschen-Fahne“ bezeichnet. Die längsten Strahlen der Fahne können bei Milchnern bis zur Fettflosse reichen. Die Rückenflosse ist bei der Unterscheidung der Geschlechter sehr hilfreich, da diese beim Rogner nämlich relativ kurz und im Vergleich zum Milchner auch eher niedrig ist. Beim Milchner hingegen ist die Fahne auffallend lang und hoch. Die letzten Flossenstrahlen sind beim Milchner die längsten und beim Rogner die kürzesten (Hauer, 2011). Ein weiteres auffälliges Merkmal ist die tropfenförmige Pupille, deren Spitze nach vorne zeigt. Jedoch ist dieses Merkmal auch bei anderen Salmoniden zu finden und somit nicht, wie die Äschen-Fahne, artspezifisch (KIS, 2016)

Beide Kiefer des leicht unterständigen Mauls sind mit Zähnchen besetzt. Das unterständige Kiefer ist für die europäische Äsche spezifisch und unterscheidet sie somit von allen anderen Äschen (Terofal, 1987). Die Schuppen- und Flossenfarbe der Äsche kann je nach Gewässer variieren. So ist zum Beispiel die Rückenfarbe grundsätzlich grau, die Flanken zeigen jedoch je nach Gewässer farbliche Unterschiede. In der Mur weisen sie zum Beispiel auch einen grünlichen Schimmer auf, in anderen Gewässern können sie gelbliche, bläuliche oder rötliche Farbtöne haben (Hauer, 2011; Hanfland, et al. 2012).

Laut Hauer (2011) ist die auffälligste Färbung jene der Rückenflosse, da diese in „allen Farben des Regenbogens“ schimmern kann. Die Schwanzflosse ist deutlich eingebuchtet und besitzt oft einen orangefarbenen oder rötlichen Farbstich.

Die Brust-, Bauch- und Afterflossen haben eine gelblich-grünliche Färbung. Die Färbung ist also sehr variabel, zum Beispiel verfärben sich ältere Milchner während der Laichzeit manchmal ganz dunkel (Hauer, 2011).

Nicht nur die Färbung kann von Individuum zu Individuum unterschiedlich aussehen, sondern auch die Anzahl der schwarzen Punkte ist verschieden. In manchen Gewässern sind Äschen

von vielen schwarzen Punkten übersät, in anderen jedoch können sie auch nur wenige oder gar keine Punkte besitzen (Hauer, 2011).

Die Äsche ist außerdem ein bekannter Speisefisch, deren Fleisch nach Thymian schmeckt.

Als Hauptnahrungsquelle dienen Wasserinsekten und deren Larven, aber auch Bachflohkrebse spielen eine große Rolle. Größere Äschen ernähren sich jedoch gelegentlich auch räuberisch und fressen Jungfische beziehungsweise den Laich anderer Fische. Der Fisch besitzt 74 - 96 Schuppen entlang der Seitenlinie (SL 74 - 96). Die Rückenflosse (RF) hat 4 - 7 Hartstrahlen und 13 - 18 gefiederte Weichstrahlen. Die Afterflosse besteht aus 2 - 4 Hartstrahlen und 8 gefiederten Weichstrahlen (Hauer, 2011).

1.1.2. Wachstum und Reproduktion

Im Durchschnitt misst eine adulte Äsche rund 35 cm, in großen Flüssen können jedoch sogar Größen von 60 cm oder darüber erreicht werden. Äschen einer solchen Größe werden als „kapital“ bezeichnet und sind bereits relativ selten. In manchen Gewässern können auch Exemplare vorkommen, die kaum größer als 30 cm sind (Hauer, 2011). Für größere Äschen ist ein Gewicht von 1,5 kg nicht unüblich, jedoch hängt dieses stark von der Größe des Fisches ab (Terofal, 1987).

Die Laichzeit und -wanderung der Äschen liegt je nach geographischer Breite und klimatischen Bedingungen zwischen den Monaten März und Juni (Hanfland, et al., 2012). Das Ablaichen erfolgt bei Wassertemperaturen zwischen 3,9 und 9°C (M. Jungwirth, 2003).

„Witkowski & Kowalewski (1988) beschreiben Laichwanderungen, die einige Tage nach der Schneeschmelze bei 4 - 6°C beginnen und deren Intensität von der Wassertemperatur abhängt“ (Jungwirth et. al, 2003).

Wie von Jungwirth et. al (2003) beschrieben, kehren Äschen in die exakte Furch-Lokation zurück, was von Parkinson et. al. (1999) mittels Telemetrie beobachtet worden ist. Dieses Phänomen wird als „homing“ bezeichnet und ist ein typisches Merkmal aller lachsartigen Fische (Jungwirth et. al, 2003).

Zum Laichen werden überströmte Kiesbänke aufgesucht, da durch den Kies Sauerstoff gedrückt wird und dieser somit als optimaler Laichplatz für Äschen gilt. Die Laichgruben werden von den Rognern geschlagen, damit die Eier darin abgelegt werden können. Dadurch, dass die Eier im Sediment eingebettet sind, müssen diese mit sauerstoffreichem Wasser versorgt werden, um ein Überleben zu gewährleisten. Nach ca. 220 Tagen ist das Tier geschlüpft und beginnt nach ca. 260 Tagen mit der Nahrungsaufnahme (Hanfland et. al 2012, Hauer 2011).

1.1.3. Habitat

Die Äsche ist ein strömungsliebender Fisch und kommt meist in Schwärmen oder kleineren Gruppen vor. Die Äsche gilt als typische Leitart der nach ihr benannten Äschenregion (Hyporhithral), jedoch ist sie in der GZÜ – Periode 2007 – 2009 in 49% der Gewässer, in denen sie als Leitart anerkannt ist, nicht nachgewiesen worden. Außerdem wird der Art in nur 10 % jener Gewässer, in denen sie nachgewiesen worden ist, ein „sehr guter“ oder „guter“ Altersstrukturaufbau beigemessen (Hundritsch et. al, 2013).

Mögliche Begleitarten wären unter anderem Bachforelle (*Salmo trutta*), Nase (*Chondrostoma nasus*), Barbe (*Barbus barbus*), Bachneunauge (*Lampetra planeri*), Aitel (*Squalius cephalus*) und Huchen (*Hucho hucho*). Als Äschenregion bezeichnet man einen großen Bach bis mittelgroßen Fluss mit geringem bis zu mäßigem Gefälle und starker bis zu wechselhafter Strömung. Die Tiefen des Bereichs sind wechselhaft und können von flach bis zu 2 m tief sein. Die optimalen Bedingungen des Wassers sollten eine Sauerstoffsättigung von 70 - 80% aufzeigen und es sollte nicht wärmer als 18°C sein. Laut Jungwirth et. al (2003) werden Äschen aufgrund der Temperaturpräferenz als oligo-stenotherm bezeichnet, was bedeutet, dass kühlere Bäche und Flüsse bevorzugt als Habitat genutzt werden. Das Flussbett beziehungsweise Sediment ist grobkiesig bis sandig und an Ruhestellen oft sogar schlammig und zeitweise trüb (Hanfland et. al, 2012).

Die Strömungsgeschwindigkeit einer Äschenregion beträgt 60 – 90 cm/s. Dadurch bleibt grober Kies liegen, feinerer Kies und Sand jedoch noch nicht. Unter guten Nährstoffvoraussetzungen wäre dieser Bereich ein sehr beliebter für Äschen, aber auch Forellen (Jungwirth et. al, 2003).

1.1.4. Verbreitung und Gefährdung der Äsche in Österreich mit Fokus auf die steirische Enns im Nationalpark Gesäuse

Es herrscht eine große genetische Vielfalt der Äschen in Österreich. Es sind mindestens 3 genetische Abstammungen vertreten. Der sogenannte nördliche Stamm ist in Populationen nördlich der Alpen vorherrschend und mit mittelmäßiger Frequenz in Populationen südlich der Alpen vertreten. Der südliche Stamm ist südlich der Alpen vorherrschend und nördlich der Alpen nur selten vertreten. Der Slowenien – Donau – Stamm ist in Populationen der Lafnitz, östlich der Alpen, festgesetzt (Weiss et. al, 2012).

Wie in Kapitel 3.1.3 bereits besprochen, ist die Äsche ein in kühlen Mittelgebirgsflüssen vorkommender Fisch. Somit besiedelt die Äsche alle Flüsse Österreichs, in denen die sogenannte Äschenregion existiert. Sie ist in größeren Flüssen wie Drau, Enns oder Mur vertreten. Die Besiedelung in Österreich hat historisch gesehen über die Donau begonnen, da die meisten Flüsse in Österreich in die Donau münden, weshalb der Fisch die Zubringer der

Donau nach und nach besiedeln hat können. Da zum Laichen auch kleinere Zubringer aufgesucht werden, kann es natürlich vorkommen, dass Äschen im Frühjahr auch in kleineren Flüssen zu finden sind (Jungwirth et. al, 2003; Hanfland et. al, 2012). Die Äsche reagiert sehr empfindlich auf Wassertemperaturunterschiede, Schwankungen des Wasserstandes und generelle Veränderungen der Umwelt. Der menschliche Einfluss wirkt sich enorm auf das Fließgewässersystem und somit auch auf die aquatische Fauna aus. So schreibt ZAUNER, dass „hoher Geschiebeeintrag der Seitenbäche zu Gerinneaufzweigungen führe und durch die Mittelwasserregulierungen zahlreiche Durchstiche und Absenkungen der Sohle eine weitgehende Änderung des Flusstyps der Enns stattgefunden habe. Eine besonders gravierende Veränderung hat es aufgrund der Mäanderdurchstiche der Enns zwischen Irnding und Weng, also im Bereich vor dem Nationalpark Gesäuse, gegeben. Die Flusslänge ist laut Klappf (1989) zitiert nach Zauner (1999) aufgrund der Flussregulierung von rund 106 km auf rund 87 km geschrumpft. Dies entspricht einer Reduktion der Flussfläche von 330 ha.

Das Gesäuse ist ein rund 15 km langes Kerbtal, welches etwas unter der Ortschaft Weng beginnt und bis nach Hieflau reicht. Die Enns hat sich tief in das Tal eingeschnitten und verändert ab Enns - km 133,7 ihren Flusslauf. Die zuvor relativ ruhig dahinfließende Enns wird im Gesäuse zu einem reißenden Fluss (Gefälle über 1%), der auch durch Stromschnellen und hohe Turbulenzen gekennzeichnet ist (Zauner, 1999). Die Enns im Bereich des Nationalparks ist für Kajak-Fahrer und Rafter eine gern gesehene Strecke.

Jedoch ändert sich nicht nur die Fließgeschwindigkeit der Enns, sondern das gesamte Tal verengt sich schlagartig zu einer Schlucht mit steil emporragenden Felswänden (Zauner, 1999). Im Bereich Gstatterboden ist die Enns circa 2 km aufgestaut worden, damit das Wasser zur Energienutzung verwendet werden kann. Der Stauraum weist eintönige Uferbereiche auf, die aber auch zum Teil dem Bau von Verkehrswegen geschuldet sind (Zauner, 1999).

Ein großes Problem im Zusammenhang mit den Wasserstandsschwankungen der Enns stellt das Wasserkraftwerk in einem Zubringer, nämlich der Sölk, vor dem Nationalpark Gesäuse dar (Mündliche Überlieferung, Alexander Maringer, 2019).

Das Kraftwerk Sölk hat eine sehr unregelmäßige Betriebsweise, da es als Laufkraftwerk mit Tages- und Wochenspeicherung entworfen worden ist. Zeitpunkt und Dauer der abzuarbeitenden Wassermenge kann variieren, was auch die Schwankungen des Wasserstandes in der Enns bewirkt. Die aquatische Biozönose in der Enns wird durch den Schwellbetrieb gestört. Die beiden Hauptfischarten (Bachforelle und Äsche) sind von den Auswirkungen des Schwellbetriebs besonders stark betroffen, da deren Laichzeit in den Zeitraum fällt, in welchem die Enns wenig Wasser führt, wodurch sich die Schwall- und Sunkerscheinungen deutlich bemerkbar machen (Zauner, 1999).

Zusätzlich zu den Einflüssen anthropogener Nutzung der Enns spielt auch der Kormoran eine große Rolle bei der Dezimierung der Populationen (Zauner, 1999).

Ende der 70er Jahre hat der Kormoran Gebiete der Donau als Überwinterungsgast aufgesucht, jedoch hat sich sein Gebiet über die letzten Jahrzehnte auch auf die Zubringer der Donau und deren Quellregionen verbreitet. Somit ist auch die Enns als Donauzubringer zunehmend angeflogen und befischt worden (Zauner, 1999).

Wiesner, Unfer, Kammerhofer und Jungwirth haben 2009 eine Studie durchgeführt, bei welcher Fischbestandserhebungen an der Enns ausgeführt worden sind. Wie zuvor erwähnt weist die Enns im Bereich Nationalpark Gesäuse rhithrale Bedingungen auf und ist somit Habitat für Äschen und deren Begleitart, die Bachforelle.

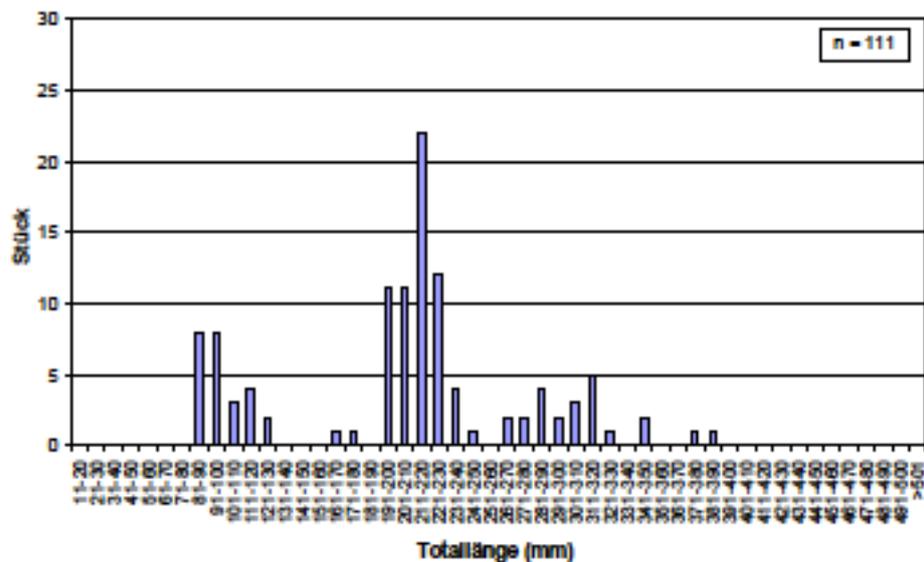


Abbildung 1: Längenfrequenzdiagramm [mm] der Äsche im Bereich Nationalpark Gesäuse (Wiesner et. al, 2010)

Die durchschnittliche Länge der Äschen im Bereich Gesäuse 111 mm. Die durchschnittliche Länge im Bereich „oberhalb Gesäuse“ beträgt 119 mm.

Auf S. 15 der Prämonitoring – Fischökologie der BOKU (2008) wird erwähnt, dass im Bereich Gesäuse die Fischpopulation zum Großteil aus Jungfischen besteht.

In Abbildung 2 sind die vom Nationalpark Gesäuse kartierten Äschen – Laichplätze graphisch dargestellt.

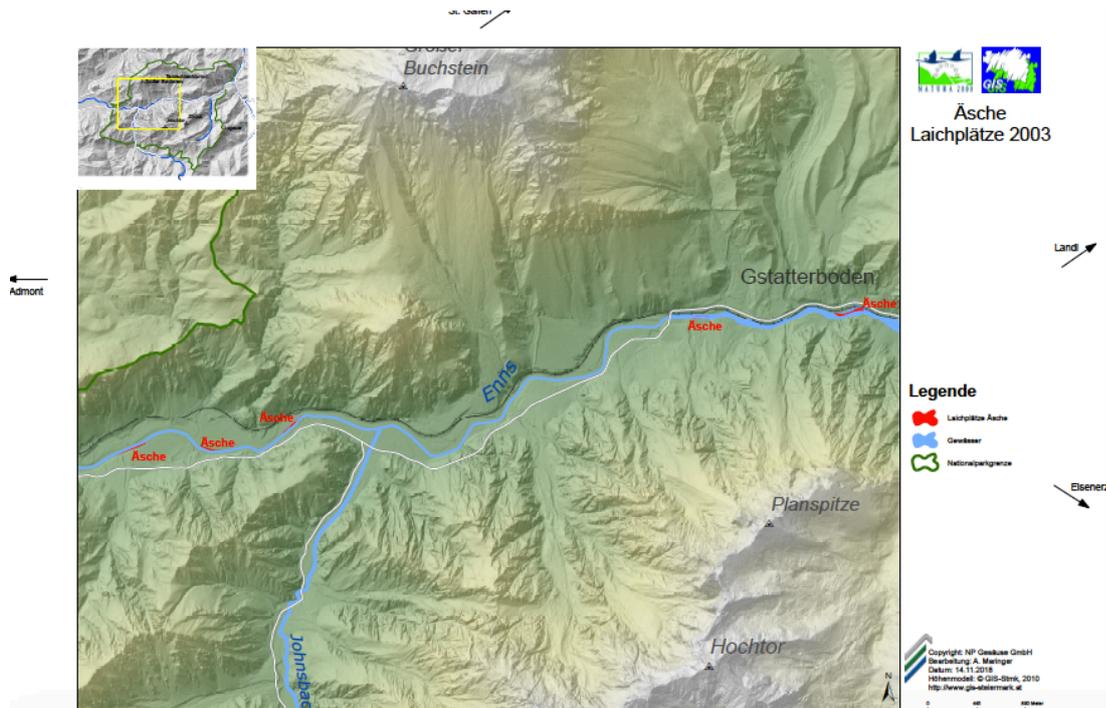


Abbildung 2 Laichplätze der Äsche im NP Gesäuse (NP Gesäuse GmbH, 2003)

1.2. Environmental DNA

Umwelt DNA (eDNA für environmental DNA) ist DNA, die von Organismen in ihre Umwelt abgegeben wird. Da sich bei Tieren in allen Körperzellen DNA befindet, kann diese in Form von Kot, Urin, Haut oder Haaren in die Umwelt abgegeben werden. Diese eDNA befindet sich dann in Wasser, Sediment oder Boden. Dadurch können mit einem Verfahren, dem sogenannten eDNA – Metabarcoding, Arten anhand der sich in der Umwelt befindenden DNA nachgewiesen werden. Man kann jedoch nur Arten nachweisen, die bereits sequenziert worden sind und sich in einer Referenzdatenbank befinden (J. Zimmermann, 2017).

1.3. Echtzeit Polymerase – Kettenreaktion (qPCR)

Bei der Polymerase – Kettenreaktion wird ein bestimmter DNA Abschnitt von der DNA Polymerase vervielfältigt. Es werden beim Standardprotokoll zwei Primer verwendet, die das vordere und hintere Ende des zu amplifizierenden DNA – Fragments markieren (Schmid, 2016).

Die Reaktion erfolgt in 3 Schritten. Der erste Schritt wird als Denaturierung bezeichnet, da sich bei 94°C die Wasserstoffbrückenbindungen lösen und der DNA-Doppelstrang somit aufgeschmolzen wird. Beim zweiten Schritt (Annealing) wird die Temperatur auf 40 - 60°C runtergekühlt und die Primer lagern sich an. Beim dritten Schritt (Extension) wird die Temperatur auf 72°C erhöht und es kommt zur Synthese von zwei neuen

Komplementärsträngen des DNA – Abschnitts (Schmid, 2016(B. Alberts, 2011)). Dieser Zyklus wird dann je nach Protokoll und Methode einige Male wiederholt.

Die quantitative PCR (qPCR) ist eine Methode, bei welcher die Menge eine Zielsequenz oder eines Gens bestimmt wird. Man kann den Fortschritt während des Prozesses beobachten.

Bei TaqMan wird zusätzlich zu den spezifischen Primern noch eine dritte Sequenz benötigt, die als „probe“ bezeichnet wird. Diese „probe“ besitzt am 5‘ Ende ein fluoreszierendes Reporter – Molekül und ein Quencher – Molekül am 3‘ Ende. Das Quencher – Molekül löscht das fluoreszierende Signal des Reporter – Moleküls unter bestimmten Bedingungen. Damit das Reporter Molekül fluoreszieren kann, muss es vom Quencher – Molekül getrennt sein. Bei der qPCR werden Bedingungen geschaffen, dass die zwei Moleküle dauerhaft voneinander getrennt sind, wodurch Fluoreszenz proportional mit dem Produkt zunimmt. Dadurch kann man den Fortschritt während des Prozesses beobachten. Zuerst werden bei hoher Temperatur die DNA – Stränge voneinander gelöst. Nach deren Abkühlung binden die Primer und die „probe“ an die DNA – Einzelstränge. Taq Polymerase findet nun die Primer und beginnt, die Komplementärstränge zu verlängern. Die Taq Polymerase hat Exonukleaseaktivität und „frisst“ die „probe“, wenn sie auf eine stößt. Dadurch werden Reporter und Quencher voneinander getrennt, wodurch die Fluoreszenz ansteigt. Diese Fluoreszenz kann man anhand einer Kurve am Bildschirm beobachten (AskTaqMan; Vandesompele).

2. Hintergrund und Zielsetzung

1997 ist die Äsche (*Thymallus thymallus*) erstmals zum Fisch des Jahres gekürt worden. Um erneut auf die Gefährdung der Äschen-Bestände und deren Rückgang in den heimischen Gewässern aufmerksam zu machen, ist die Äsche 2011 ein weiteres Mal zum Fisch des Jahres gewählt worden (S. Hanfland, 2012).

Die Äsche befindet sich in Österreich laut Umweltbundesamt (Stand 2007) auf der roten Liste und wird laut Hauer (2011) als „gefährdet“ eingestuft (Hauer, 2011; Woschitz, 2006).

Gründe für den drastischen Rückgang von Äschen-Beständen in heimischen Gewässern sind vor allem hydromorphologische Eingriffe und der Ausbau der Wasserkraft, insbesondere Kraftwerke mit Schwallbetrieb. Auch der erhöhte Räuberdruck durch den Kormoran (*Phalacrocorax carbo sinensis*) und den Fischotter (*Lutra lutra*) spielen eine Rolle beim Rückgang einiger Populationen (M. Baars, 2001). Die Regenbogenforelle (*Oncorhynchus mykiss*) stellt ebenfalls einen möglichen Grund für den Rückgang der Äschen – Bestände dar, da die Populationen möglicherweise in interspezifischer Konkurrenz stehen (Uiblein et al., 2001).

Hanfland (2012) zeigt, dass man in den Jahren 1994 – 1998 einen drastischen Rückgang des Fischbestandes in der Enns (Abschnitt Gesäuse) erkennen kann, welcher auf das Erscheinen des Kormorans zurückzuführen ist. Vor dem Erscheinen des Kormorans im Gesäuse 1994 hat die Biomasse aller Fische der Enns circa 220 kg/ha betragen. Drei Jahre später hat es einen drastischen Rückgang der Fischpopulationen gegeben. Die Biomasse hat im Jahre 1997 circa 25 – 30 kg/ha betragen. Das Erscheinen des Kormorans hat angeblich die Fischbestände um fast 90% dezimiert.

Ziel des Projektes ist gewesen, das eDNA qPCR Protokoll für Äschen zu entwickeln und zu testen. Es sind dafür die Enns und der Johnsbach im Bereich Nationalpark Gesäuse gewählt worden. In einem Zeitraum von Ende April bis Ende Mai sind während der Laichzeit fünf Stellen in der Enns und im Johnsbach beprobt beziehungsweise untersucht worden. Die drei zu untersuchenden Bereiche befinden sich in der Enns zwischen dem Kraftwerk Gstatterboden und der Rafting – Einstiegs – Stelle. Im Johnsbach ist die erste Untersuchungsstelle beim Gasthof „Bachbrücke“ und die zweite beim Besucherbereich „Hellichter Stein“. Da zeitgleich mit der Laichwanderung der Äsche der gefährdete und seltene Flussuferläufer brütet und sich das Brutgebiet rund um das Laichgebiet befindet, haben die Beobachtungen der Äschen-Laichplätze nicht durchgeführt werden können (mündliche Überlieferung Alexander Maringer, April 2019).

Jedoch sind die fünf Stellen in Enns und Johnsbach auf eDNA beprobt und anhand einer für Äschen spezifischen qPCR auf Äschen – DNA, also auf das Vorkommen von Äschen in den jeweiligen Bereichen, untersucht worden.

3. Material und Methoden

3.1. Feldarbeit

Die Probennahme ist an fünf Stellen erfolgt, drei davon sind in der Enns und zwei im Johnsbach vorgenommen worden. Ursprünglich ist geplant gewesen, dass die Laichplätze der Äsche in der Enns beobachtet werden und dass die erste Sohlschwelle im Johnsbach beobachtet wird, um festzustellen, ob diese als Barriere für Äschen gilt, den Johnsbach nicht weiter hinaufwandern zu können. Da der Flussuferläufer (*Actitis hypoleucos*) zur gleichen Zeit und im gleichen Gebiet brütet und es nur 5 Pärchen im Nationalpark Gesäuse gibt (mündl. Überlieferung Alexander Maringer), ist es nicht möglich gewesen, dass die Kiesbänke zu begehen und die Laichaktivität der Äschen beobachten. Somit sind für die Untersuchung 5 leicht zugängliche Plätze zugewiesen worden, an denen ohne Komplikationen Proben gesammelt werden konnten.



Abbildung 3 A) Probenstelle „Gasthof Bachbrücke“ ca. 200-300m flussaufwärts des Mündungsbereichs Johnsbach/Enns (digitaler Atlas Steiermark, links) B) Foto der Probenstelle (rechts)

In Abbildung 3 A) ist die erste Probenstelle mithilfe des digitalen Steiermark Atlas illustriert. Die Probenstelle befindet sich direkt neben dem Parkplatz des Gasthofes „Bachbrücke“. Die Koordinaten sind anhand eines GPS – Gerätes (Garmin GPS MAP® 64) ermittelt und auf dem digitalen Steiermark – Atlas überprüft worden. Diese lauten N47°34'49.5“ und E14°35'30.5“ (GIS - Steiermark, 2006). Abbildung 4 B) ist ein Foto der Probenstelle.

Wie in Abbildung 4 A) und B) dargestellt, befindet sich die zweite Probenstelle ebenfalls im Johnsbach, beim Besucherplatz „Hellichter Stein“. Die Koordinaten lauten N47°34'32.8" und E14°35'18.7" (GIS-Steiermark, 2006).

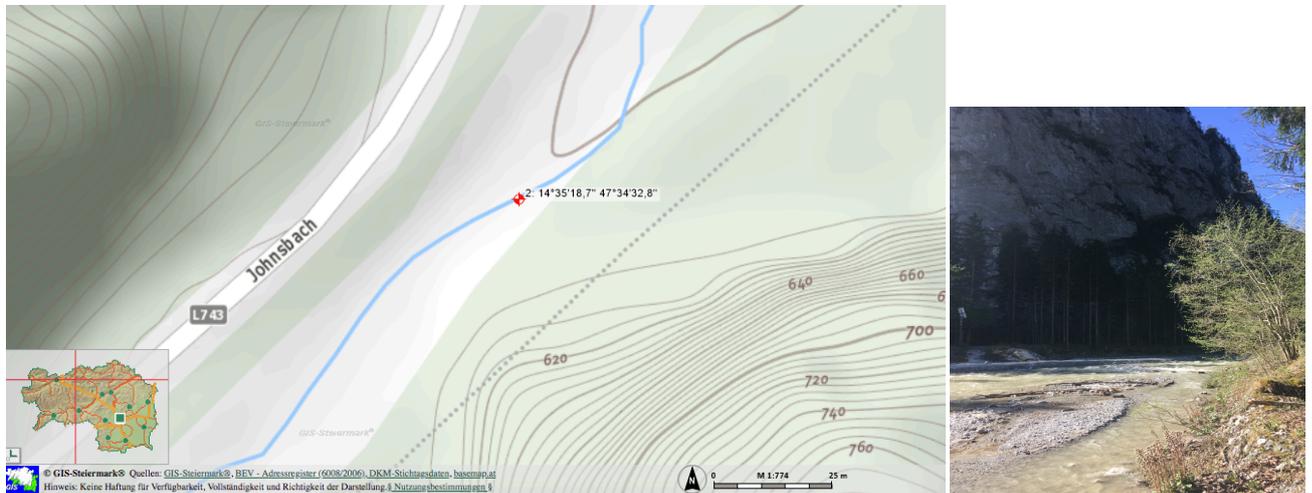


Abbildung 4 A) Probenstelle "Hellichter Stein" ca. 300-400m flussaufwärts der Probenstelle "Gasthof Bachbrücke" (digitaler Atlas Steiermark; links) B) Foto der Probenstelle (rechts)



Abbildung 5 A) Probenstelle "Johnsbach - Steg" ca. 400-500m flussabwärts des Mündungsbereichs Johnsbach/Enns (digitaler Atlas Steiermark; links) B) Foto der Probenstelle (rechts)

Die erste Probenstelle der Enns befindet sich, wie in Abbildung 5 A) und B) aufgezeigt, am rechten Flussufer vor dem „Johnsbach – Steg“ und nach dem Mündungsbereich Enns / Johnsbach. Die GPS – Daten lauten N47°34'55.1" und E14°35'41.6" (GIS – Steiermark, 2006).

Die zweite Enns – Probenstelle ist in Abbildung 6 A) und B) dargestellt und befindet sich beim Eingang der Wildwasser – Rafting – Strecke. Die Koordinaten sind wie folgt N47°34'50.5" und E14°33'13.5" (GIS - Steiermark, 2006).



Abbildung 6 A) Probenstelle "Rafting – Einstieg" ca. 3-4km flussaufwärts des Mündungsbereichs Johnsbach/Enns, ca. 100m flussaufwärts der Eisenbahnbrücke (digitaler Atlas Steiermark; links) B) Foto der Probenstelle (rechts)

Die dritte Probenstelle befindet sich beim Campingplatz „Gstatterboden“ kurz nach der Brücke und ist in Abbildung 8 A) und B) dargestellt. Die Koordinaten lauten N47°35'26.3“ und E14°37'38.5“ (GIS – Steiermark, 2006). Die Stelle befindet sich am rechten Flussufer.



Abbildung 8 Probenstelle "Gstatterboden" ca. 3-4km flussabwärts des Mündungsbereichs Johnsbach/Enns, ca 50m flussabwärts der Brücke (digitaler Atlas Steiermark; links) B) Foto der Probenstelle (rechts)

3.1.1. Protokoll für die Probenahme

Tabelle 1 Material für die Beprobungen

Material	Verwendungszweck
Große Kiste mit Deckel	zur Aufbewahrung von Proben und Geräten
Handschuhe	für steriles Arbeiten
Filter	zum Filtern der DNA aus den Wasserproben
Zentrifugenröhrchen (2 ml)	mit Pufferlösung, zur Aufbewahrung der Filter mit DNA
Pufferlösung	Longmire Lysis Buffer, Lösen der DNA aus dem Filter
Gefrierbeutel	zur sterilen Aufbewahrung der Probensets
Spritze (50 ml)	Wasserprobe wird durch Filter gedrückt
Pinzette	um Filter anzugreifen
Filtergehäuse	Vorrichtung wird mit Filter auf die Spritze geschraubt
Plastikflasche (500 ml)	für die Probenahme
Wathose	Schutz vor Kälte und Nässe
GPS – Gerät	Koordinaten der Probenstellen (Garmin GPS MAP® 64)
Protokollblätter	um die Probenstellen zu dokumentieren
Bleistift	zum Schreiben
Fotoapparat	zur Veranschaulichung der Probenstellen
Thermometer	Messung der Wassertemperatur

In Tabelle 1 sind die Materialien für die Beprobungen aufgelistet.

Die Probenahme ist laut einem Protokoll für eDNA – Probenahmen durchgeführt worden. Ein Probenset hat aus 50 ml Spritze, 500 ml Plastikflasche mit Schraubverschluss, Filtergehäuse und 2 Pinzetten bestanden. Die Bestandteile sind mit Bleiche sterilisiert und in frische Gefrierbeutel gepackt worden. Zum Sterilisieren sind die Bestandteile für 30 min in Bleiche (1:10 verdünnt), dann 30 min in destilliertes Wasser eingelegt und anschließend mit destilliertem Wasser abgespült worden. Die sterilisierten Teile sind 1 - 2 Tage im Reinraum zum Trocknen auf Tücher gelegt worden, bevor sie in die Gefrierbeutel gepackt worden sind.

Die Filter (25 mm Durchmesser und 0,7 µm Porengröße) sind im Reinraum beidseitig mit UV – Licht bestrahlt und separat in Plastikhüllen verpackt worden.

Für jede Probenstelle ist ein Set verwendet worden. Bevor die Einzelteile aus dem Gefrierbeutel genommen worden sind, sind Latex Handschuhe angezogen worden. Ein Filter ist mit der Pinzette in das Filtergehäuse gelegt worden. Für die Negativ – Kontrolle sind 250 ml destilliertes Wasser (claro, dm) durch den Filter gedrückt worden. Um überschüssige Flüssigkeit vom Filter zu entfernen, sind 2 Spritzen – Ladungen Luft durch den Filter gedrückt

worden. Anschließend ist der Filter mit zwei Pinzetten zusammengerollt und in ein vorbereitetes 2 ml Eppendorf Röhrchen mit 700 µl „Longmire – Lysis – Buffer“ (Longmire, et. al 1997) gegeben worden.

Bei jeder Probenstelle ist insgesamt 1 Liter Wasser entnommen worden. Je nach Verschmutzungsgrad des Baches beziehungsweise Flusses ist der Filter nach 100 – 500 ml gewechselt worden. Jeder Filter ist separat in ein beschriftetes Eppendorf Röhrchen mit der Pufferlösung gegeben worden, damit sich die DNA vom Filter lösen kann.

Die Proben sind ohne Kühlbehälter ins Labor transportiert worden und dort bis zur DNA – Extraktion eingefroren worden.

An jeder Probenstelle ist die Temperatur mit einem Quecksilber – Glasthermometer gemessen worden.

Jede Probenstelle ist mithilfe eines Protokollblattes dokumentiert worden. Darauf sind Probenname, Datum, Fluss, Ort, Stelle der Probennahme (Ufer, Flussbett, usw.), gefiltertes Wasservolumen, GPS Koordinaten, Name des/der Kollektor/in und Kommentar eingetragen worden. Zusätzlich sind noch für die darauffolgende Laborarbeit Datum der Extraktion, Name der Person, die extrahiert hat, und der Ort, an dem das Extrakt gelagert worden ist eingetragen (siehe Anhang).

3.2. DNA – Extraktion

Die DNA – Extraktion hat im Reinraum des Instituts für Biologie der Karl - Franzens - Universität Graz stattgefunden.

Die einzelnen Probenröhrchen sind mit Bleiche und destilliertem Wasser abgewischt worden, bevor sie im Reinraum extrahiert worden sind.

Die DNA – Extraktion ist laut Protokoll (Renshaw, Olds, Jerde, McVeigh, & Lodge, 2015; Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989) vorgenommen worden. Am ersten Tag sind die Proben 10 min bei 65°C inkubiert worden. Anschließend sind unter dem Abzug jedem Eppendorf - Röhrchen 900 µl Phenol – Chloroform – Isoamyl Alcohol zugefügt worden. Die Eppendorf Röhrchen sind für 5 sec gevortext und dann 5 min bei 15.000 g zentrifugiert worden. 700 µl der wässrigen Schicht sind in neue 2 ml Eppendorf - Röhrchen überführt worden. 700 µl Chloroform – Isoamyl Alcohol sind jedem Eppendorf - Röhrchen zugefügt worden. Die Eppendorf Röhrchen sind 5 sec gevortext und danach für 5 min bei 15.000 g zentrifugiert worden. Es sind anschließend 500 µl der wässrigen Schicht in neue 2 ml Eppendorf - Röhrchen überführt worden. Anschließend sind 1.25 ml 100 % eiskaltes Ethanol und 20 µl 5M NaCl zugefügt worden. Die Röhrchen werden sanft durch Schwenken gemischt und über Nacht bei -20°C ausgelöst.

Am zweiten Tag sind die Röhren aus dem Gefrierschrank genommen und für 10 min bei 15.000 g zentrifugiert worden, um ein Pellet zu erzeugen. Das Ethanol ist entfernt worden, ohne das Pellet zu verlieren. Für den ersten Waschschrift sind dem Pellet 600 µl 70 % Ethanol zugefügt worden. Durch sanftes Schwenken hat sich das Pellet im Ethanol gelöst. Die Proben sind für 10 min bei 15.000 g zentrifugiert worden. Anschließend ist das Ethanol entfernt worden ohne das Pellet zu verlieren. Für den zweiten Waschschrift sind den Röhren 600 µl 100% Ethanol zugefügt und anschließend geschwenkt worden. Nach 10 min bei 15.000 g in der Zentrifuge ist das Ethanol entfernt worden, ohne das Pellet zu verlieren. Überschüssiges Ethanol ist abpipettiert worden, ohne das Pellet zu zerstören. Die Röhren sind anschließend unter dem Abzug getrocknet worden, bis keine Flüssigkeit mehr sichtbar gewesen ist. Abschließend sind je nach Probe 50-100 µl TE Buffer 1X – low EDTA zugefügt worden. Die Proben sind im Gefrierschrank des Reinraumes bei circa -20°C eingefroren worden.

Zur weiteren Aufreinigung der DNA aufgrund von Inhibitoren ist mit dem „DNA Clean & Concentrator™ – 5“ – Kit von „Zymo Research“ gearbeitet worden. Dazu wird in die bereits gepoolten Probenröhren „DNA binding buffer“ im Verhältnis 1:2 zugefügt, da es sich um genomische DNA handelt. Die Mischung ist in die im Kit enthaltenen „Zymo – Spin™ Column“ in ein „Collection Tube“ gegeben und anschließend für 30 sec bei 10.000 g zentrifugiert worden. Danach sind 200 µl „DNA Wash Buffer“ zugefügt und für 30 sec bei 10.000 g zentrifugiert worden. Dieser Waschschrift ist wiederholt worden.

Anschließend sind ≥ 6 µl „DNA Elution Buffer“ direkt auf die Säulen – Matrix pipettiert und bei Raumtemperatur für eine Minute inkubiert worden. Es sind bei jeder Probe 10 µl „DNA Elution Buffer“ verwendet worden. Die Säulchen sind in neue 1.5 ml Mikrozentrifugen – Röhren transferiert und für 30 sec bei 10.000 g zentrifugiert worden, um die DNA zu eluieren. Jene Proben derselben Probenstelle sind zusammengefügt worden.

3.3. qPCR Protokoll

Um Kontaminationen zu vermeiden, ist weiterhin im Reinraum gearbeitet worden. Die qPCR ist laut dem Protokoll von Carim et al (2016) erfolgt. Der Mastermix hat aus 7,5 µl Taqman Environmental MasterMix 2.0, 0,9 µl forward primer, 0,9 µl reverse primer, 0,375 µl probe und 3,325 µl ddH₂O bestanden.

Mastermix:

7,5 µl	Environmental MasterMix 2.0
0,9 µl	forward primer 5'-CCTTTCCCCGAATAAATAACATGAG-3'
0,9 µl	reverse primer 5'-ATACTGTCCACCCTGTCCCG-3'
0,375 µl	probe
3,325 µl	Wasser

Bei der Herstellung des Mastermixes sind immer zwei extra Proben berechnet worden, damit der MasterMix ausreicht, da meistens etwas in der Pipettenspitze hängen bleibt.

In qPCR spezifische Probenröhrchen, welche in ein spezifisches Coolrack gegeben worden sind, sind jeweils 13 µl MasterMix und 2 µl DNA Probe gegeben worden. Die Zyklusbedingungen laut Carim et al haben wie folgt gelautet:

hold	95°C / 15 sec	
cycling	$\left[\begin{array}{l} 95^\circ\text{C} / 15 \text{ sec} \\ 60^\circ\text{C} / 60 \text{ sec} \end{array} \right]$	x 45

Tabelle 2 Zyklusbedingungen (Corbett Research, 2005)

Cycle	Cycle Point
Hold @ 95°C, 10 min 0 secs	
Cycling (50 repeats)	Step 1 @ 95°C, hold 15 secs
	Step 2 @ 60°C, hold 60 secs, acquiring to Cycling A(FAM)

Die Zykluszahl ist jedoch auf 50 Zyklen erhöht worden, um die Amplifikation der DNA zu maximieren. Tabelle 2 zeigt die Zyklusbedingungen, mit denen schlussendlich gearbeitet worden ist.

Für die Auswertung der Daten ist die Software „Rotor-Gene 6.1.93“ verwendet worden. Dieses Programm hat dann auch die Ergebnisse in eine Word – Datei formatiert. Die Grafiken der Amplifikation sind dieser Software entnommen (Corbett Research, 2005).

3.4. Verdünnungsreihe

Es sind 2 „forward primer“ (Carim FG, Carim FA) vorhanden gewesen, entweder mit einem A(denin) an der 3. Stelle vom 3' Ende der Sequenz oder mit einem G(uanin) an der 3. Stelle vom 3' Ende der Sequenz. Von allen 58 in der Genbank verfügbaren Äschen – Sequenzen zu dieser Zeit haben 8 ein Adenin an der 3. Position und 50 ein Guanin. Das Protokoll von Carim et al. (2016) ist an Gewebeproben ein Mal mit Carim FG und ein Mal mit Carim FA getestet worden. Der „forward primer“ Carim FG ist für die weiteren qPCR und die Verdünnungsreihe verwendet worden.

Um eine Positiv – Kontrolle der eDNA Proben zu haben, ist eine Verdünnungsreihe von bereits extrahierten *Thymallus thymallus* Gewebeproben erstellt worden. Dafür ist mit der Probe (JOH 100) eine PCR mit 50 µl Volumen nach dem Protokoll von Carim et al. (siehe oben) gemacht worden. Nach Beendigung der PCR ist ein Gel für eine Gelelektrophorese gegossen worden. Dazu sind 40-50 ml der 2 % igen Agarose und 1,8 µl PeqGreen vermischt und in eine Mini - Gel – Form gegossen und 20 min zum Trocknen stehen gelassen worden. Die Proben des PCR – Produkts sind mit einem Ladepuffer versehen und in die Geltaschen pipettiert worden. Die Gelelektrophorese ist für 35 min bei 400 mA und 110 Volt abgelaufen.

Die Gelelektrophorese ist unter UV – Licht mittels einem Transilluminator und einer Digitalkamera visualisiert und die zwei PCR – Produkte sind mit UV – Schutz ausgeschnitten und separat in Zentrifugenröhrchen (1 ml) gegeben worden. Die ausgeschnittenen Produkte sind abgewogen worden. Probe 1 hat 130 mg und Probe 2 hat 100 mg gewogen. Das PCR – Produkt ist mit dem „Wizard SV Gel und Clean – Up Kit“ aufgereinigt und mit „Qubit 4“ (Protokoll siehe Anhang) vermessen worden. Probe 1 hat 4,84 ng / µl gemessen und die 2. Probe 2,34 ng / µl. Die Verdünnungsreihe ist mit Probe 1 angesetzt worden, da diese stärker konzentriert gewesen ist.

Die Probe ist 1:10 verdünnt worden. Danach ist mit der Verdünnungsreihe eine qPCR (nach Carim et al) angesetzt worden mit je drei Replikaten der verdünnten Proben plus vier Negativ – Kontrollen.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. Ergebnis der Verdünnungsreihe

Die Verdünnungsreihe ist laut Protokoll nach Carim et. al (2016) durchgeführt worden. Nachdem der „forward Primer Carim FG“ zu besseren Amplifikations – Ergebnissen geführt hat, ist dieser für die Verdünnungsreihe verwendet worden.

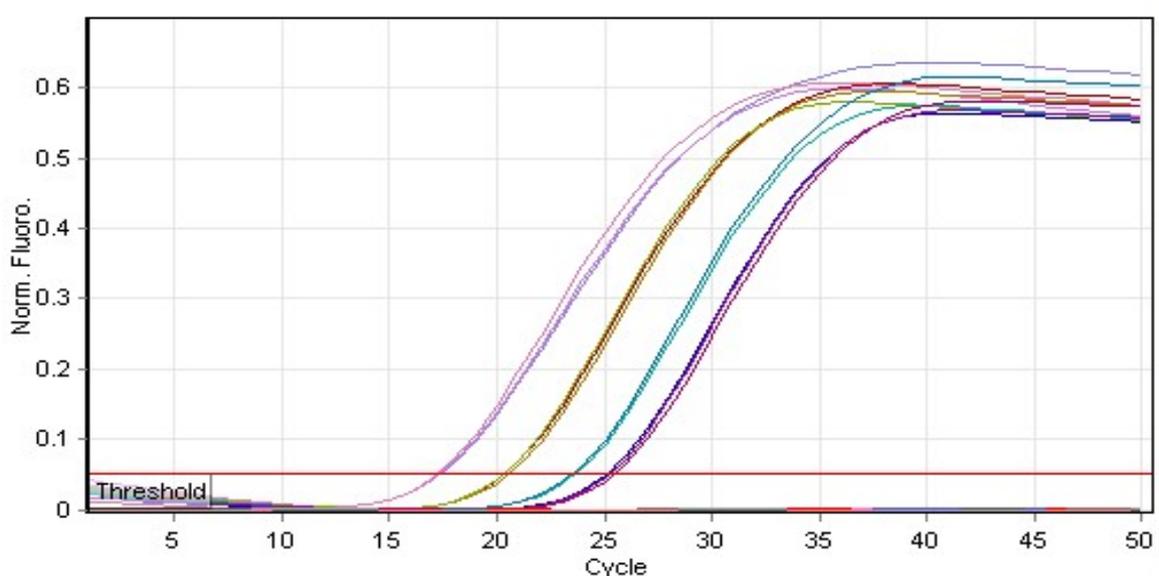


Abbildung 7 Ergebnisse der Verdünnungsreihe (Corbett Research, 2005 – Quantitation data for cycling A.FAM)

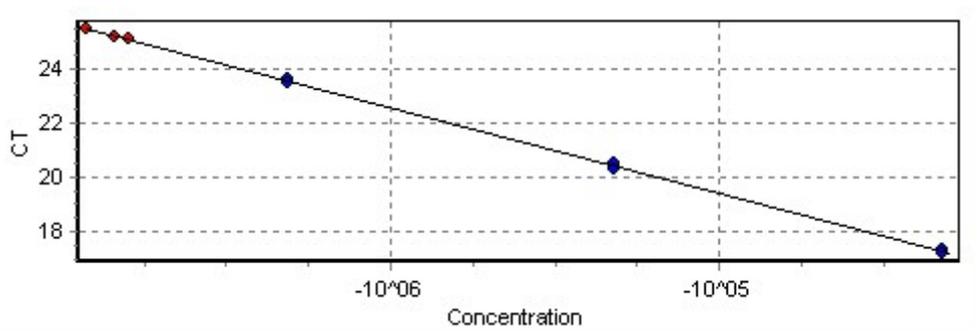


Abbildung 8 Standard Kurve der Verdünnungsreihe

Der Ct – Wert ist der Schnittpunkt zwischen Amplifikationskurve und der „threshold“ – Linie (Abbildung 7). Die DNA – Konzentration und die Effizienz sind unter anderem wichtige Einflussfaktoren des Ct – Wertes. Eine Verdünnungsreihe, die unter niedrigen Effizienz – Bedingungen amplifiziert hat, könnte eine Standardkurve mit einer anderen Steigung hervorrufen, als unter hohen Effizienz – Bedingungen. Die Effizienz ist abhängig vom Mastermix, der Probenqualität, der Leistung und der Probe. Im Allgemeinen ist eine Effizienz zwischen 90 und 110 % akzeptabel. Die Effizienz sagt aus, ob die Primer bei den gegebenen Bedingungen gut arbeiten. Ein absoluter Vergleich der Ct – Werte ist nur unter gleichen Reaktionsbedingungen zu gewährleisten (Thermofischer).

Der R^2 – Wert sagt aus, wie gut ein Wert einen anderen voraussagen kann. Wenn $R^2 = 1$, kann der Wert Y verwendet werden, um den Wert X vorherzusagen. Ist der R^2 – Wert $> 0,99$, kann man mit ziemlicher Sicherheit die Werte X und Y aufeinander beziehen (Thermofischer).

Der R^2 – Wert der qPCR der Verdünnungsreihe beträgt 0,99897 (Corbett Research, 2005), wodurch die X und Y Werte aufeinander bezogen werden können. Basierend darauf ist eine „threshold“ – Linie zur Berechnung der Ct – Werte gelegt worden und eine Standardkurve (Abbildung 8) mit den berechneten Ct – Werten und der DNA Konzentration bestimmt worden. Die „threshold“ – Linie ist für alle weiteren qPCR Ergebnisse als Standard hergenommen worden.

Die erste Probenreihe vom 12.04.2019 ist aufgrund einer Kontamination im Labor nicht weiterverwendet worden, da sowohl alle Proben wie auch die Steril – Proben und „no template control“ – Proben amplifiziert haben. Jedoch sind ein paar dieser Proben sequenziert worden, um zu erkennen, ob es sich um Äschen – DNA handelt. Die Ergebnisse sind mit einer Online - Datenbank abgeglichen worden und es hat sich zu 99% um Äschen – DNA gehandelt, was bedeutet, dass die Methode der qPCR grundsätzlich gut funktioniert hat.

Es ist in keiner der Probenreihen die genaue DNA – Konzentration berechnet worden, da es zu viele Ungenauigkeiten gegeben hat.

Tabelle 3 Zusammenfassung der positiven Amplifikationen der Detektion von Äschen in Wasserproben der Enns und des Johnsbaches an vier Tagen

Datum	Probe	Location	Zahl der Amplifikationen (8 Replikate gesamt)	Ct-Wert (Mittelwert)
25.04.2019	eDNA 031	Johnsbach 1	1	37,79
25.04.2019	eDNA 036	Johnsbach 2	3	37,44
25.04.2019	eDNA 041	Enns 1	alle	34,39
25.04.2019	eDNA 052	Enns 2	7	35,96
25.04.2019	eDNA 063	Enns 3	alle	35,90
25.04.2019	Negativ - Kontrolle	/	0	0
06.05.2019	eDNA 074	Johnsbach 1	1	39,07
06.05.2019	eDNA 078	Johnsbach 2	0	/
06.05.2019	eDNA 081	Enns 1	4	37,81
06.05.2019	eDNA 084	Enns 2	alle	36,55
06.05.2019	eDNA 087	Enns 3	7	37,58
06.05.2019	Negativ - Kontrolle	/	0	0
20.05.2019	eDNA 096	Johnsbach 1	0	/
20.05.2019	eDNA 099	Johnsbach 2	0	/
20.05.2019	eDNA 102	Enns 1	alle	37,12
20.05.2019	eDNA 105	Enns 2	7	37,2
20.05.2019	eDNA 109	Enns 3	7	36,88
20.05.2019	Negativ - Kontrolle	/	0	0
27.05.2019	eDNA 112	Johnsbach 1	2	37,29
27.05.2019	eDNA 115	Johnsbach 2	2	43,18
27.05.2019	eDNA 118	Enns 1	alle	34,77
27.05.2019	eDNA 123	Enns 2	alle	35,96
27.05.2019	eDNA 129	Enns 3	alle	34,96
27.05.2019	Negativ - Kontrolle	/	0	0

4.2. eDNA 030 – 063

Die eDNA Proben 031 – 063 sind am 25.04.2019 gesammelt worden. Aufgrund des Schmelzwassers ist der Wasserstand von Enns und Johnsbach sehr hoch und trüb gewesen. Im Johnsbach sind bei beiden Probenstellen 4 x 250 ml Wasser durch 4 Filter gedrückt worden. In der Enns ist dies jedoch aufgrund des trüben Wassers nicht möglich gewesen, weshalb 10 x 100 ml Wasser durch 10 Filter gedrückt haben, um die gleiche Menge Wasser zu entnehmen und somit ein vergleichbares Ergebnis gewährleisten zu können.

Im Johnsbach ist an diesem Tag bei der Probenstelle „Gasthof Bachbrücke“ eine Temperatur von $(6 \pm 0,1)$ °C gemessen worden. Bei der Probenstelle „Hellichter Stein“ hat diese $(6,3 \pm 0,1)$ °C betragen. Die Enns hat bei der Stelle „Rafting Einstieg“ eine Temperatur von $(6,5 \pm 0,1)$ °C, bei der Stelle „Johnsbachbrücke“ $(6,9 \pm 0,1)$ °C und bei der Stelle „Gstatterbodenbrücke“ $(7,1 \pm 0,1)$ °C gehabt.

Die Proben sind mit dem zuvor erwähnten *Phenol – Chloroform – Isoamyl Alkohol eDNA Extraktions Protokoll* extrahiert worden. Da das Pellet eine schleimig – nasse Konsistenz gehabt hat und die qPCR nicht funktioniert hat, ist mit dem DNA – Aufreinigungskit versucht worden, die möglichen Inhibitoren zu beseitigen. Zuvor sind die Proben derselben Probenstelle gepoolt worden. Die Verunreinigung der Pellets kann durch den hohen Sedimentgehalt im Wasser zustande gekommen sein, oder auch durch ungenaues Pipettieren beim Übertragen der wässrigen Schicht in neue Zentrifugenröhrchen, da eventuell Teile der unteren Schicht mit pipettiert worden sein könnten.

Den Proben sind je 50 µl des TE – buffers (low EDTA) zugefügt worden, bevor diese gepoolt worden sind, damit sich das Pellet im Puffer lösen hat können.

Nach der Aufreinigung ist erneut eine qPCR angesetzt worden, um zu sehen, ob die Inhibitoren beseitigt worden sind. Dazu sind je 1 µl Probe und 1 µl Verdünnungsreihe (10^5) dem MasterMix beigegeben worden. Die PCR hat funktioniert, weshalb anschließend eine weitere qPCR mit fünf „no template control“ Proben, jeweils zwei der „negative control“ Proben mit destilliertem Wasser bei den Probenstellen und je acht Replikaten der gepoolten Proben angesetzt worden sind.

In Tabelle 3 ist die Zahl der Amplifikationen der einzelnen Proben dargestellt. Die Ct – Werte sind jene Werte, die einen groben Hinweis auf die DNA Konzentration geben. Ist dieser hoch, ist die Ausgangskonzentration niedrig. Die Ct – Werte in Tabelle 3 sind die Mittelwerte der 8 Replikate jeder Probe. Die erste Probe des Johnsbachs beim Gasthof Bachbrücke ist ein Mal amplifiziert und weist einen Ct – Wert von 37,79 auf. Die zweite Johnsbach – Probe beim Besucherplatz „Hellichter Stein“ ist drei Mal amplifiziert und hat einen Ct – Wert von 37,44.

Bei der ersten Enns – Probe (Einstieg Rafting Strecke) sind alle acht Replikate amplifiziert und der mittlere Ct – Wert ist 34, 39. Bei der zweiten Enns Probe (Johnsbachbrücke) sind sieben Replikate amplifiziert, und haben einen Ct – Wert von 35,96. Die letzte Enns Probe (Gstatterbodenbrücke) weist einen Ct – Wert von 35,90 auf, und es haben alle Replikate amplifiziert.

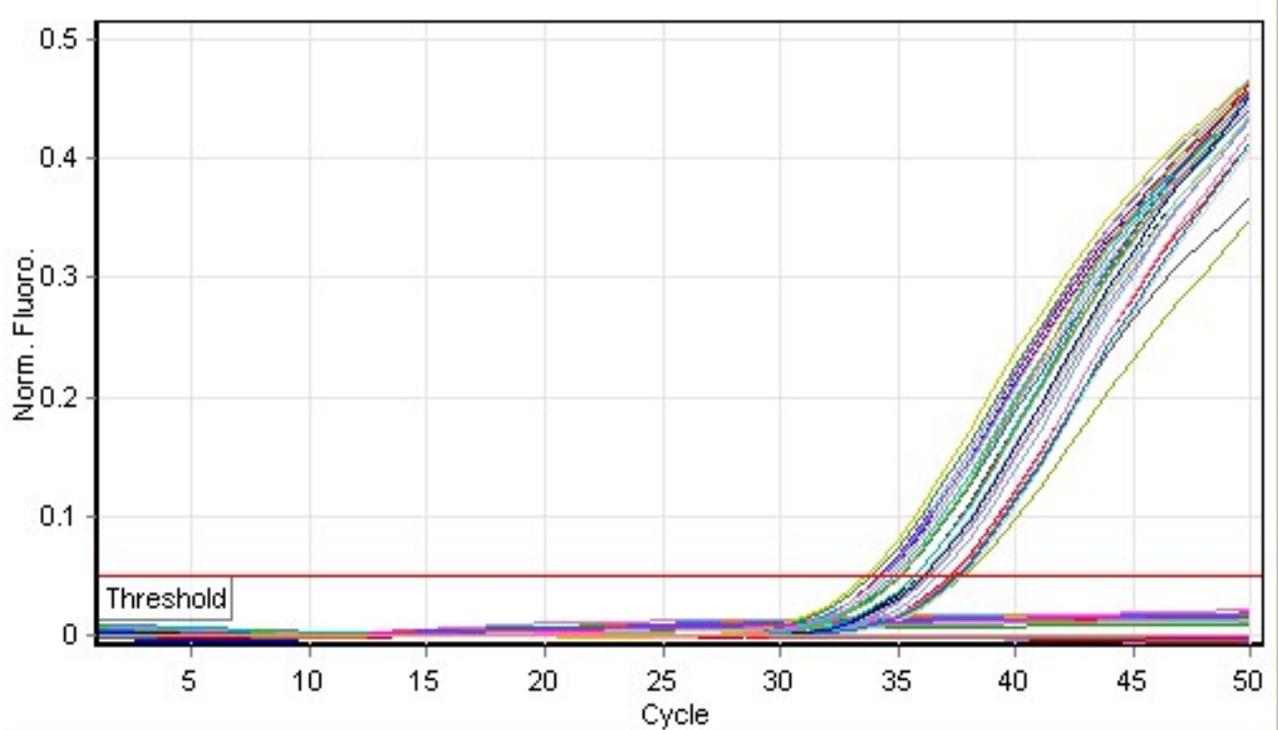


Abbildung 9 Ergebnisse der qPCR der Proben 030 – 063 (Corbett Research, 2005 – Quantitation Data for Cycling A. FAM)

In Abbildung 9 sind die Ergebnisse der qPCR grafisch dargestellt (Corbett Research). Eine Amplifikation ist dadurch zu erkennen, dass die Kurve ansteigt. Dies ist bei den oben genannten eDNA Proben und Replikaten der Fall. Man kann erkennen, dass die Proben zwischen dem 30. und 35. Zyklus zu amplifizieren begonnen haben. Die Negativ – Kontrollen eDNA 030, eDNA 035, eDNA 040, eDNA 051 und eDNA 062 sind nicht amplifiziert, was bedeutet, dass steril gearbeitet worden ist und die Gerätschaften nicht mit Äschen – DNA kontaminiert gewesen sind. Bei der DNA Extraktion sind zwei Puffer (700 µl Longmire Lysis buffer) als Extraktions – Leerwert bei allen Extraktionsschritten und der Aufreinigung mitgemacht worden, welche bei der qPCR nicht amplifiziert haben und die somit ebenfalls während den Extraktionsschritten nicht kontaminiert worden sind.

4.3. eDNA 073 – 087

Die eDNA Proben 074 – 087 sind am 06.05.2019 gesammelt worden. Sowohl Enns als auch Johnsbach sind wesentlich klarer gewesen, weshalb bei der ersten Johnsbachstelle 4 x 250 ml Wasser durch 4 Filter gedrückt worden ist, ab Probenstelle Johnsbach 2 jedoch 2 x 500 ml durch 2 Filter. Auch bei der Enns sind 2 x 500 ml Wasser durchgebracht worden.

Am 05. Mai hat es erneut ein paar Zentimeter geschneit, weshalb die Flüsse wieder kühler geworden sind. Der Johnsbach hat eine Temperatur von $(4,8 \pm 0,1)$ °C aufgewiesen. Die Enns hat eine Temperatur von $(5 \pm 0,1)$ °C gehabt.

Bei der Extraktion sind zwei weitere Alkohol – Wasch – Schritte eingebaut worden, damit das Pellet nicht schleimig-wässriger Konsistenz ist, sondern an der Röhrenwand kleben bleibt. Hierfür ist ein Schritt mit 70 % Ethanol und einer mit 100 % Ethanol eingebaut worden (siehe Methoden, eDNA Extraktions Protokoll im Anhang). Jeder Probe sind 100 µl TE – buffer (low EDTA) zugefügt und anschließend sind die Proben der gleichen Stelle gepoolt worden.

Nach der Extraktion ist eine qPCR mit je zwei Replikaten pro Probe durchgeführt worden, um diese auf Inhibitoren zu testen. Es sind keine Inhibitoren in den Proben gewesen, weshalb eine qPCR mit acht Replikaten, 5 ntc – Proben, 2 Replikaten des Extraktions – Wertes und jeweils zwei der negativ Kontrollen eDNA 073, eDNA 077, eDNA 080, eDNA 083 und eDNA 086 angesetzt worden ist.

In Abbildung 10 sind die Ergebnisse grafisch dargestellt und in Tabelle 3 ist ersichtlich, welche Proben amplifiziert haben. Von den Proben der ersten Johnsbach – Stelle hat eine amplifiziert, bei der zweiten keine. Bei der ersten Enns – Stelle sind 4 von den 8 Replikaten amplifiziert. In der zweiten Enns Stelle alle und in der dritten 7 von 8. Die Ct – Werte sind etwas höher als bei den eDNA Proben 031-063. Dies deutet auf eine geringere DNA – Konzentration hin, was auch die schlechtere Amplifikationsrate von Johnsbach 2 und Enns 1 erklären würde.

Einer der eDNA 083 Negativ – Kontrollen hat leicht amplifiziert, da sich die Kurve minimal dem Threshold annähert. Da nur eine der Negativkontrollen amplifiziert hat, ist dies auf einen Pipettierfehler zurückzuführen. Beim Ansetzen der qPCR sind die Negativkontrollen in der Reihenfolge der Probennahme angesetzt worden, weshalb diese nicht gleich zugemacht worden sind und möglicherweise mit Äschen – DNA der anderen Proben in Kontakt gekommen sind. Da die geringe Amplifikation jedoch nur bei einer der Negativkontrollen vorkommt, deutet es nicht auf eine allgemeine Kontamination der Proben hin.

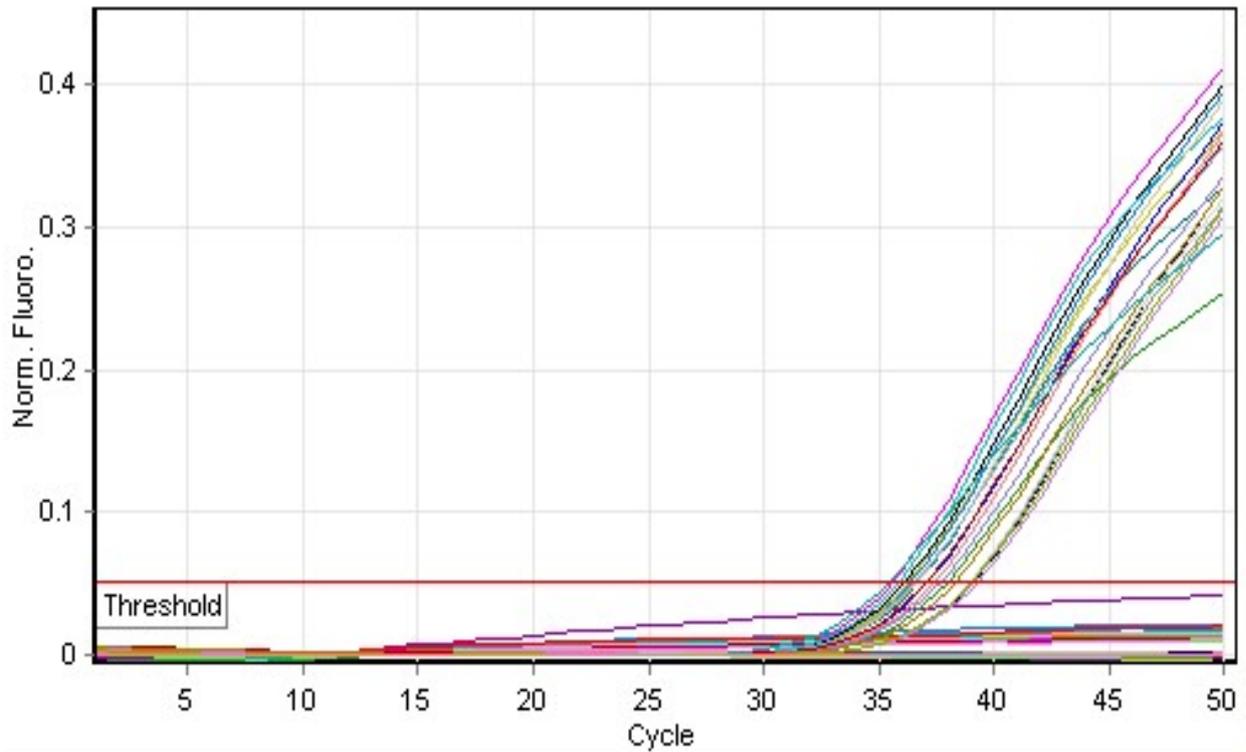


Abbildung 10 Ergebnisse der qPCR der Proben 073 – 087 (Corbett Research, 2005 – Quantitation Data for Cycling A. FAM)

4.4. eDNA 095 – 109

Die eDNA – Proben 095 – 109 sind am 20.05.2019 gesammelt worden. Bei den beiden Johnsbach – Proben sind pro Stelle 2 x 500 ml Wasser durch die Filter gedrückt worden. Bei Ennsproben 1 und 3 ebenfalls. Bei Ennsprobe 2 sind 2 x 300 ml und 1 x 400 ml durch die Filter gedrückt worden, da das Wasser im Bereich des Kehrwassers sehr trüb gewesen ist, weil relativ viel aufgewirbeltes Sediment vorhanden gewesen ist und der Bereich generell schlammig – sandig ist.

Durch den Temperatursturz und den Schneefall Anfang Mai ist erneut Schmelzwasser in den Flüssen zu bemerken gewesen. Die Temperatur ist jedoch wieder angestiegen. Im Johnsbach ist eine Temperatur von $(6,5 \text{ °C} \pm 0,1) \text{ °C}$ und in der Enns $(7,5 \pm 0,1) \text{ °C}$ gemessen worden.

Wie in Tabelle 3 zu sehen, ist im Johnsbach keine Probe amplifiziert, was auf das Fehlen von Äschen – DNA zurückzuführen ist. Bei der ersten Probenstelle der Enns ist ein Ct – Mittelwert von 37,12 aller acht amplifizierten Proben errechnet worden. Bei der Probenstelle 2 der Enns sind sieben Replikate amplifiziert, wodurch sich ein Ct – Wert von 37,2 ergeben hat. Bei der dritten Enns Stelle sind ebenfalls sieben Replikate amplifiziert, und es hat sich ein Ct – Wert von 36,88 ergeben. Somit kann man sagen, dass die DNA Konzentration von *Thymallus thymallus* in der dritten Probenstelle der Enns an diesem Tag am höchsten gewesen ist.

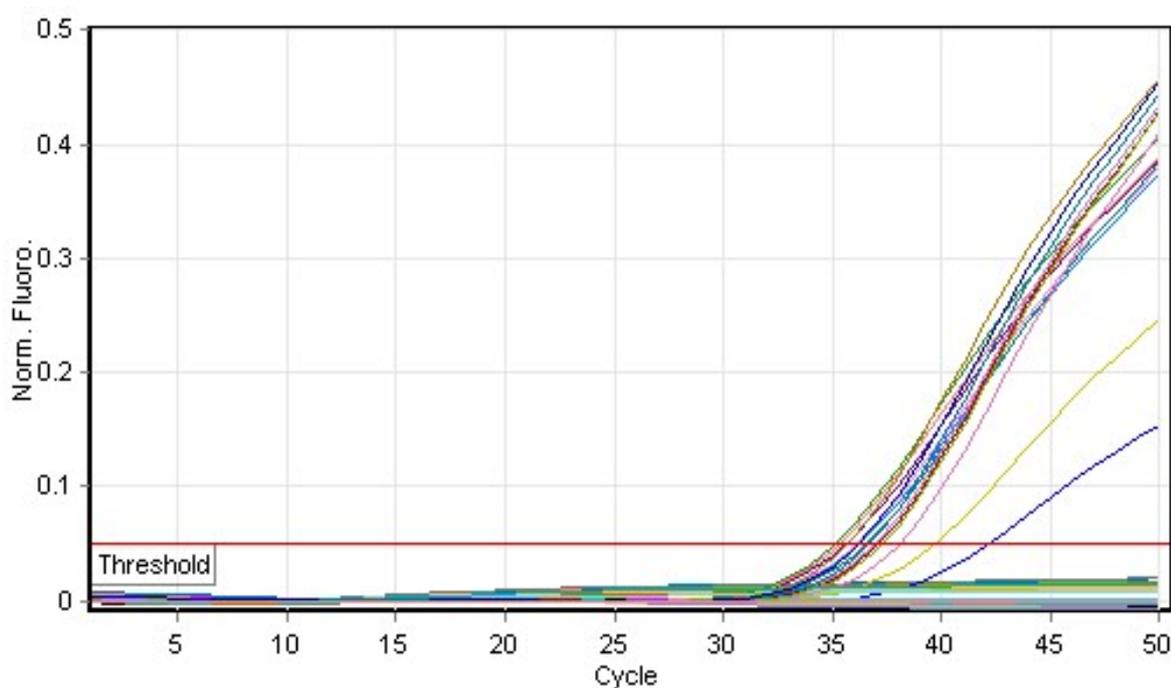


Abbildung 11 Ergebnisse der qPCR der Proben 095 – 109 (Corbett Research, 2005 – Quantitation Data for Cycling A. FAM)

In Abbildung 11 sind die Proben 105 – 109 dargestellt. Wie auch in der Tabelle 3 protokolliert, sind allgemein weniger Replikate der Proben amplifiziert. Bei Probe eDNA 105 ist jedoch ein Pipettier – Fehler aufgetreten, da zuerst keine der acht Replikate amplifiziert hat. Diese Probe ist dann auf Inhibitoren getestet worden, indem eine qPCR (laut Protokoll) mit vier Replikaten mit je 1 µl der Probe und 1 µl der Verdünnungsreihe (Verdünnung 10^5) angesetzt worden ist. Da alle vier Replikate amplifiziert haben, ist bestätigt worden, dass es sich nicht um Inhibitoren in der Probe handelt, wodurch sich der Verdacht auf einen Pipettier – Fehler bestätigt hat. Wahrscheinlich ist keine Probe in die PCR – Röhren mit dem Mastermix gegeben worden.

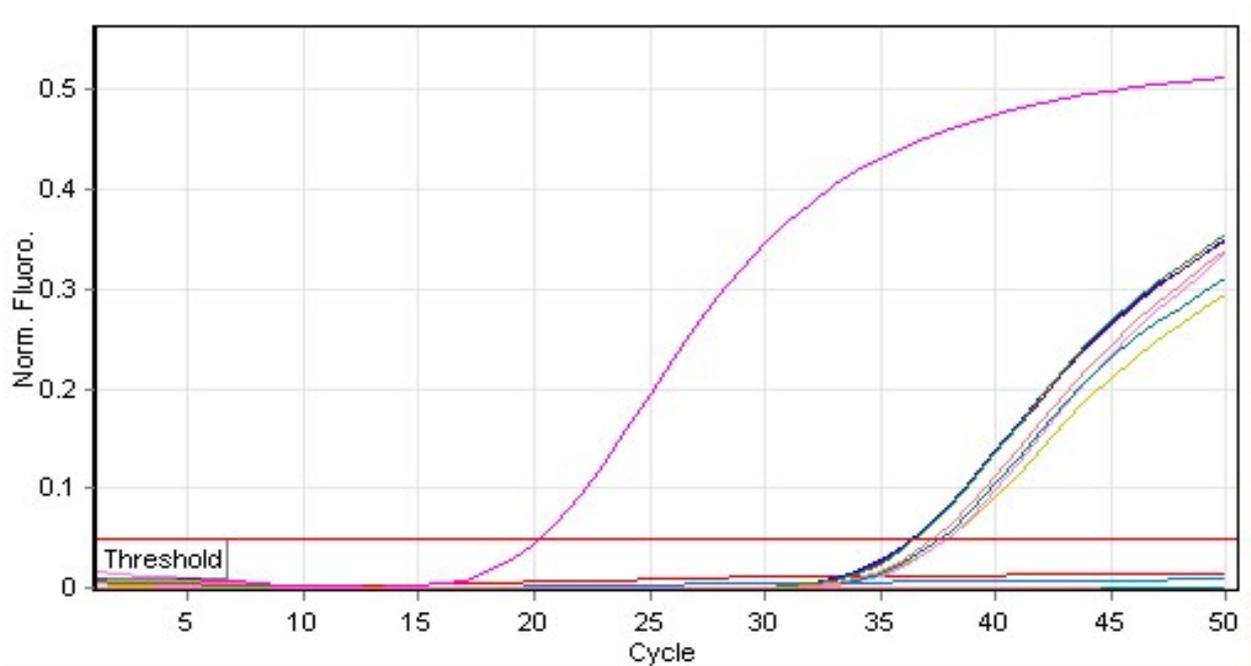


Abbildung 12 Probe eDNA 105 (Corbett Research, 2005 – Quantitaion Data for Cycling A. FAM)

In Abbildung 12 ist die Kurve der sieben Amplifikationen zu erkennen. Die violette Kurve, welche am stärksten und schnellsten amplifiziert hat, ist die positive Kontrolle der Probe plus Verdünnung.

4.5. eDNA 111 – 129

Die eDNA Proben 111 – 129 sind am 27.05.2019 gesammelt worden. Die Enns hat relativ viel Wasser geführt, was am Schmelzwasser gelegen haben könnte. Das destillierte Wasser für die Steril – Proben ist im Reinraum in den leeren Kanister der anderen Probennahmen gefüllt worden. Bei der ersten Negativ - Kontrolle ist der Filter gelblich geworden (siehe Abbildung 13). Diese Färbung ist wahrscheinlich durch rostige / verkalkte Rohre des Instituts zustande gekommen.



Abbildung 13 Filter der Negativ – Kontrolle am 27.05.2019

Es sind bei jeder Probenstelle der Enns und des Johnsbachs 4 x 250 ml Wasser durch die Filter gedrückt worden. Die Temperatur der Flüsse ist nicht gemessen worden, da das Thermometer

kaputt geworden ist. In Tabelle 3 ist ersichtlich, dass die beiden Johnsbachproben zwei Mal amplifiziert haben, wobei die zweite Probe einen relativ hohen Ct – Mittelwert aufweist (43,18) was auf die geringste DNA – Konzentration der Probenreihe hindeutet. In den drei Enns – Stellen sind alle 8 Replikate der Proben amplifiziert.

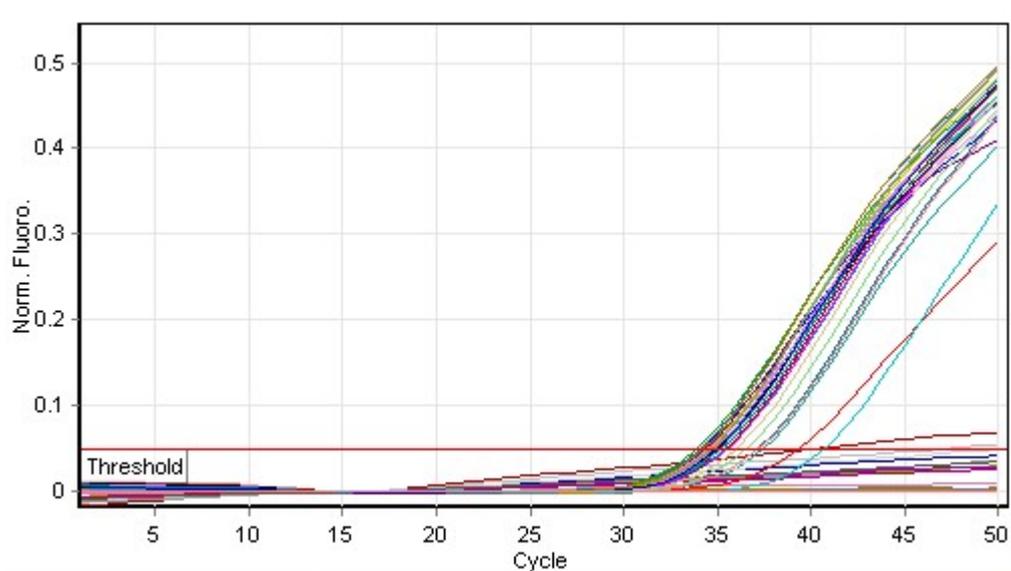


Abbildung 14 Ergebnisse der qPCR der Proben 111-129 (Corbett Research, 2005 – *Quantitaion Data for Cycling A. FAM*)

In Abbildung 14 sind die Ergebnisse der qPCR der Proben 111-129 dargestellt. Die Steril - Kontrollen sind leicht amplifiziert, was aufgrund des destillierten Wassers passiert sein könnte, jedoch sind diese nicht vom Programm als „amplifiziert“ erfasst worden, da kein Ct – Wert errechnet worden ist. Der lineare leichte Anstieg mehrere Proben kann durch undicht verschlossene Proben und einer folglichen Evaporation zustande gekommen sein.

4.6. Allgemeine Diskussion

Die Ergebnisse haben gezeigt, dass das eDNA qPCR Protokoll funktioniert, da sowohl in der Enns als auch im Johnsbach Replikate amplifiziert haben. Somit ist bestätigt, dass auch in großen Flüssen wie der Enns mit einer in Relation zur Flussgröße, kleinen Äschen – Populationsdichte, mit dem sensitiven Test Äschen detektiert werden haben können. Im Johnsbach sind nur wenige Replikate amplifiziert, was auf eine geringe Populationsdichte beziehungsweise wenige Individuen hindeutet, da nicht so viel DNA im Wasser schwimmt, wie zum Beispiel in der Enns. Man kann jedoch anhand der eDNA nicht sagen, ob Äschen in dem Moment anwesend gewesen sind, da die DNA einige Kilometer mit dem Flussverlauf mitschwimmen und trotzdem detektiert werden kann. Jedoch ist Äschen – DNA zumindest bis zur Probenstelle „Hellichter Stein“ detektiert worden, was bedeutet, dass Äschen zumindest bis zu diesem Punkt den Johnsbach aufsteigen, möglicherweise auch noch weiter.

Wenn man die Ergebnisse mit der Fischbestandserhebung der Universität für Bodenkultur (2009) vergleicht, sind Äschen auch damals in den Bereichen der Enns vorgekommen. Auf S. 15 des Prämonitoring – Berichts wird erwähnt, dass im Bereich Gesäuse die Äschen – Population großteils aus Jungfischen besteht (BOKU, 2009). Dies lässt sich wiederum mit den kartierten Laichplätzen aus dem Jahr 2003 des Nationalparks Gesäuse vergleichen (Abbildung 3), da im Bereich Gesäuse Äschen - Laichplätze detektiert und protokolliert worden sind. Bei der Fischbestandserhebung (November 2005) sind im Johnsbach keine Äschen protokolliert worden. Möglicherweise steigen die Äschen nur während der Laichzeit in den Johnsbach auf. Es könnte aber auch abhängig vom Wasserstand eine mögliche Barriere geben, welche die Wanderung flussaufwärts verhindern würde.

Anhand der qPCR kann man weder erkennen, ob es sich um Jungfische oder adulte Exemplare handelt, noch ob Äschen zu diesem Zeitpunkt im Wasser gewesen sind, da eDNA einige Kilometer wandern kann. Um mit Sicherheit sagen zu können, dass sich zu besagtem Zeitpunkt Exemplare in der Probenstelle befinden, muss man welche gesehen haben.

Da im Johnsbach nur eine geringe Probenanzahl amplifiziert hat, weist dies eventuell auf eine niedrige Individuendichte hin. Jedoch kann man keinen absoluten Wert angeben, da eDNA dafür nicht geeignet ist.

Da die ersten eDNA – Extraktionen laut Protokoll nicht funktioniert haben, sind verschiedene Methoden ausprobiert worden, um das Protokoll zu verbessern. Die zwei zusätzlichen Alkohol – Waschgänge haben sich als geeignet erwiesen, um das Pellet von den Inhibitoren freizumachen. Sollte der Schritt trotzdem nicht funktioniert haben, aufgrund von Pipettierfehlern oder auch aufgrund des gefilterten Sediments, ist zusätzlich das Aufreinigungs – Kit verwendet worden, welches bei allen Proben funktioniert hat.

5. Zusammenfassung

Das eDNA qPCR Protokoll ist an zwei Flüssen im „Nationalpark Gesäuse“ getestet worden. Es sollte herausgefunden werden, ob man in einem großen Fluss wie der Enns mit einer relativ geringen Äschen – Populationsdichte anhand von Wasser – Proben Äschen – DNA detektiert werden kann. Außerdem ist untersucht worden, ob Äschen den Johnsbach zumindest bis zum Besucherparkplatz „Hellichter Stein“ (ca. 500 – 600 m flussaufwärts vom Mündungsbereich Johnsbach / Enns) aufsteigen, und diesen eventuell als Laichplatz in Erwägung ziehen.

Der Johnsbach und die Enns sind im Bereich „Nationalpark Gesäuse“ im Zeitraum Ende April bis Ende Mai an fünf Tagen beprobt worden. Hierzu sind pro Probenstelle 1 Liter Wasser entnommen und im Labor des Biologie Instituts der Karl – Franzens – Universität Graz mithilfe einer qPCR auf Äschen (*Thymallus thymallus*) – DNA untersucht worden.

Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Aufgabenstellung erfolgreich absolviert worden ist, da Äschen anhand der qPCR in der Enns und im Johnsbach im Bereich Nationalpark Gesäuse detektiert worden sind. Aufgrund der Ungenauigkeiten der Ergebnisse ist jedoch keine DNA Konzentration berechnet worden. Es ist nur bestimmt worden, ob Äschen an den 5 Probenstellen detektiert worden sind oder nicht.

Es sind zwischen 7 und 8 / 8 Replikaten aller Enns – Proben amplifiziert, jedoch maximal 3 Replikate der Johnsbach – Proben, was auf eine geringere Individuendichte hindeutet. Jedoch ist der Fakt, dass im Johnsbach Proben amplifiziert haben spannend, da die Fischbestandserhebung der Universität für Bodenkultur (2005) im Johnsbach keine Äschen aufzeigt (BOKU 2006).

Des Weiteren ist im Labor das eDNA – Extraktions – Protokoll „verbessert“ worden, indem zwei weitere Alkohol – Waschschrte beziehungsweise eine Aufreinigung mit dem „DNA Clean & Concentrator™ – 5“ – Kit von „Zymo Research“ zusätzlich gemacht worden ist, um die DNA Pellets von Inhibitoren zu befreien. Aufgrund des lang andauernden Schmelzwassers sind sowohl im Johnsbach, als auch in der Enns Sedimente geführt worden, was die Wasserprobennahme deutlich erschwert und zusätzliche Waschschrte erfordert hat.

6. Fachdidaktischer Teil

Im Zuge der Diplomarbeit des Lehramtsstudiums Biologie und Umweltkunde wird folgender Teil fachdidaktisch strukturiert und beinhaltet Stundenplanungen zum Thema „DNA“, die für ein Wahlpflichtfach der 11. Schulstufe (7. Klasse AHS) oder die 12. Schulstufe (8. Klasse AHS) gestaltet sind.

Im Bereich „Weltverständnis und Naturerkenntnis“ der 8. Klasse sieht der Lehrplan des Bundesministeriums folgendes vor:

„Genetik

Verstehen der biochemischen Vorgänge bei der Proteinsynthese (Transkription, Translation, Regulation der Genaktivität); Kennen der Vererbungsregeln; Einblick in die Humangenetik; Wissen um gentechnische Verfahren und deren mögliche Auswirkungen (Landwirtschaft, Medizin, Gesellschaft ua.) erwerben; Entwicklung einer verantwortungsbewussten Haltung gegenüber gentechnischen Eingriffen (Wissenschaftsethik, Bioethik) fördern (Bundesministerium für Bildung, 2018).“

6.1. Molekulare Grundlagen der Genetik – Was ist DNA?

James Dewey Watson und Francis Crick haben um 1950 die Struktur der DNA entschlüsselt und bestätigten somit die Theorie, dass die DNA als Träger der Erbinformation gilt und für die Weitergabe und Verdopplung dieses Erbmaterials verantwortlich ist. Für diese Entdeckung ist ihnen der Nobelpreis zugestanden worden (Begegnungen mit der Natur 8, 2015).

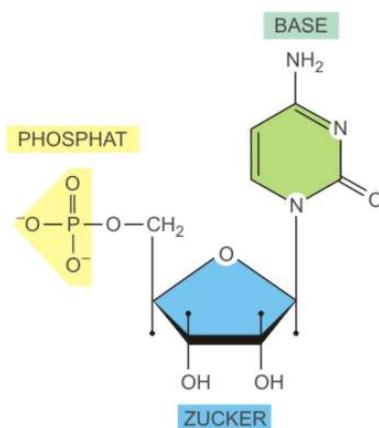


Abbildung 15 Aufbau eines Nucleotids, bestehend aus Phosphat, Base und Zucker. Quelle: www.google.at/bilder/nucleotid

Nucleotide bestehen aus einer Base (Adenin, Guanin, Thymin oder Cytosin), einer Phosphatgruppe und einem Zucker, der Pentose Desoxyribose. Die Desoxyribonucleinsäure (DNA) besteht aus vielen Nucleotiden. Die Base hängt am ersten Kohlenstoffatom des Zuckers (C₁), die Phosphatgruppe am 5. Kohlenstoffatom des Zuckers (C₅). Die einzelnen Nucleotide

sind über die Phosphatgruppe und die OH – Gruppe am C₃ – Atom des Zuckers zu Ketten verknüpft. Die Nukleotidkette weist somit ein Ende mit einer OH – Gruppe (3' – Ende), und eines mit einem Phosphatrest (5' – Ende) auf. Diese DNA – Einzelstränge sind über Wasserstoffbrückenbindungen der jeweiligen Basen (A und T; G und C) miteinander verknüpft und so bilden zwei Einzelstränge die Struktur einer Doppelhelix. Adenin und Thymin sind mit zwei Wasserstoffbrücken miteinander verbunden, und Guanin und Cytosin mit drei. Die gegenüberliegenden DNA – Einzelstränge werden deshalb auch als komplementär bezeichnet (bio@school 8, 2018; Begegnungen mit der Natur 8, 2015). In der RNA (die Transportform der DNA) kommt Thymin in leicht abgewandelter Form vor, und zwar als Uracil. Zwei Doppelhelix – Stränge sind über ein Centromer verbunden und werden als Chromosome bezeichnet. (Lamm, 2018).

DNA kommt also in allen eukaryotischen Lebewesen vor, aber auch in Prokaryonten und Archaeen. Wenn DNA Stückchen in Form von Urin, Haut, Schuppen usw. an die Umwelt abgegeben werden, spricht man von eDNA (englisch *environmental DNA*), was auf Deutsch Umwelt – DNA bedeutet.

DNA kommt also nicht nur in den Lebewesen, sondern auch in deren angrenzender Umwelt vor, weshalb man anhand von Sediment- oder Wasserproben feststellen kann, welche Organismen in diesem Bereich leben. Dazu müssen jedoch Sequenzen der Organismen bereits bekannt sein.

6.2. Was ist ein Gen?

Ein Gen beinhaltet die Erbinformation eines Organismus. Das Gen weist die kleinste funktionelle Einheit in einem Genom auf. Gemeinsam mit Umwelteinflüssen bestimmen die Gene die Merkmalsausprägung. Es gibt zwei Kopien eines Gens auf jedem Chromosom, diese werden als Allele bezeichnet. Die Allele werden bei der Zellteilung an die Tochterzellen weitergegeben. Wenn ein Merkmal eines Gens die Ausprägung eines anderen Merkmals überdeckt, spricht man dabei von einem dominanten bzw. einem rezessiven Allel. Das dominante Allel bestimmt die Ausprägung. Es gibt Bereiche auf den Chromosomen, die keine Erbinformation tragen, diese werden als Start-, bzw. Stopp – Codons bezeichnet. Als Genotyp eines Organismus wird die Gesamtheit der Gene in einem Genom bezeichnet (Lamm, 2018).

6.3. DNA – Replikation

Die DNA muss sich bei jeder Zellteilung verdoppeln, damit auch das Erbmateriale verdoppelt ist. Das Enzym „Helicase“ trennt die doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge, durch

Auflösung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen. Damit sich die beiden Einzelstränge nicht wieder verbinden, werden „Einzelstrang – Bildungsproteine“ eingesetzt (bio@school 8, 2018).

Die DNA – Replikation erfolgt in 5‘ – 3‘ Richtung, da die DNA – Polymerase die neuen Stränge nur in diese Richtung verlängern kann. Der Leitstrang wird also kontinuierlich repliziert. Hierfür sind die Enzyme „DNA – Polymerasen“ verantwortlich. Diese Bausteine, die dafür verwendet werden sind Nucleosid – Triphosphate (Adenosin – Triphosphat, Guanin – Triphosphat, Cytosin – Triphosphat und Thymin – Triphosphat).

Der Folgestrang wird diskontinuierlich verlängert, was bedeutet, dass dieser „stückchenweise“ verlängert wird. Diese Stücke werden als „Okazaki – Fragmente“ bezeichnet. Zur Bildung dieser muss immer wieder ein neues RNA – Startermolekül verfügbar sein. Die Nukleotide werden also zu einem Primer verknüpft. Die DNA – Polymerase III synthetisiert das erste Okazaki – Fragment und löst sich, sobald ein RNA – Primer erreicht wird. Wenn der Primer für das 2. Fragment fertiggestellt ist, wird die entstandene Lücke zum ersten Okazaki Fragment in 5‘ – 3‘ Richtung aufgefüllt. Die DNA – Polymerase I die RNA – Primer durch DNA – Stränge. Die DNA Ligase verknüpft die einzelnen Fragmente, wodurch der Folgestrang vervollständigt wird (Reece, et al. 2014).

6.4. Vom Gen zum Merkmal

6.4.1. Transkription

Die genetische Information ist in den Zellkernen gespeichert. Die Herstellung von Proteinen (= Proteinbiosynthese) findet jedoch in den Ribosomen statt. Durch die Transkription (= Kopie) wird die Erbinformation kopiert und transportfähig gemacht. Als Vorlage dient ein DNA – Strang des Zellkerns. Dieser Doppelstrang wird durch die DNA – Polymerase aufgespalten. Nun sind zwei Einzelstränge vorhanden, an welchen die Basen komplementär ergänzt werden. Achtung: an die Adenin – Base wird nun nicht Thymin, sondern Uracil angelagert. Diese Abschnitte werden als mRNA (messenger RNA) Moleküle bezeichnet und transportieren die genetische Botschaft zu den Ribosomen (bio@school 8, 2018; Lamm, 2018).

DNA → *Transkription* → **RNA** → *Translation* → **Proteine**

6.4.2. Translation

Die Translation findet an den Ribosomen statt, welche aus einer kleineren und einer größeren Untereinheit bestehen. Ein mRNA – Molekül wird durch ein Ribosom geführt und die Codons werden in Aminosäuren übersetzt. Nicht alle Abschnitte kodieren für Aminosäuren, es gibt auch

sogenannte Start- und Stopp – Codone. Die Anlagerung des Codons beginnt erst, wenn die mRNA durch das Ribosom und dieses ein Start – Codon abliest. Diese Aminosäuren werden dann als Triplet – Code vom Ribosom abgelesen, an die tRNA angelagert und bilden Polypeptidketten, bis das Ribosom ein Stopp – Codon erkennt. Mit dem Stopp – Codon ist das Protein fertig. Ein Protein besteht also aus vervielfältigter, übersetzter genetischer Information welche in Form von Aminosäuren aneinander gereiht wird (bio@school 8, 2018; Lamm, 2018).

6.5. Der genetische Code

Wie bereits erwähnt sind alle Proteine aus einer Abfolge von verschiedenen Aminosäuren hergestellt. Die Proteinbiosynthese (siehe Punkt 7.4. und 7.5.) läuft in allen eukaryotischen Zellen ab. Es gibt 20 natürlich vorkommende Aminosäuren, die mit den 4 in der mRNA existierenden Basen (A, U, G, C) kodiert werden. Die meisten Aminosäuren werden durch Basen – Tripletts – Codes kodiert. Diese Codes werden als sogenannte „Wörter“ mit drei Buchstaben bezeichnet. Zum Ablesen wird die sogenannte Gen – Sonne mit allen möglichen Basentripletts verwendet. Die Leserichtung erfolgt von innen nach außen. AUG wäre zum Beispiel ein Start – Codon, UAA ein Stopp – Codon und GCC codiert für die Aminosäure Alanin (bio@school 8, 2018; Lamm, 2018).

6.6. Moderne Gentechnische Verfahren

6.6.1. Gelelektrophorese

Darunter versteht man eine Methode, bei welcher eine Mischung aus Molekülen nach ihrer Größe aufgetrennt wird. Dies passiert aufgrund eines elektrischen Feldes. Die Bestandteile wandern je nach Ladung / Größe / Gewicht unterschiedlich weit. Am schnellsten und weitesten wandern die kleinen, negativ geladenen Moleküle in Richtung der positiven Anode. Dies ist durch Banden sichtbar, welche dann nebeneinander liegen und einen Vergleich bieten. Dafür wird auch eine Standardprobe mitlaufen gelassen, welche dann einen Vergleichswert bietet. Um die Banden sehen zu können werden sie mit einem Fluoreszenzfarbstoff angereichert (Lamm, 2018). Man kann das Gel dann unter UV – Licht mittels eines Transilluminators und einer Digitalkamera visualisiert werden.

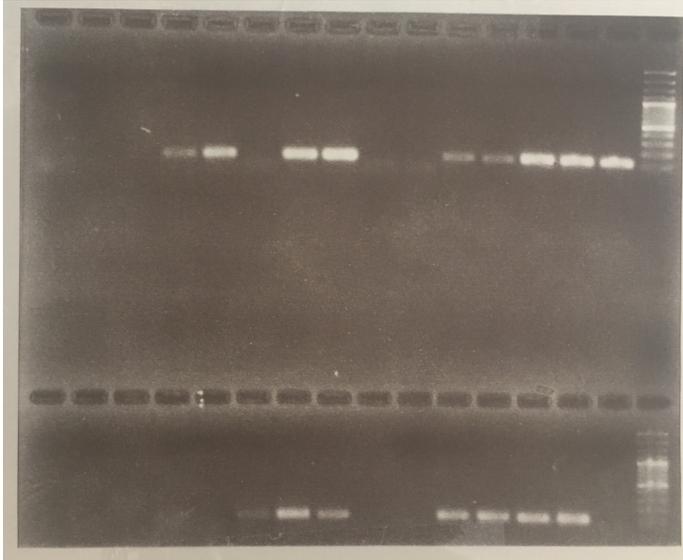


Abbildung 16 Gelelektrophorese von PCR - Produkten (*Thymallus thymallus*, *Salmo trutta*, *Coregonus*) zur Veranschaulichung wie die DNA Banden durch das Gel laufen

6.6.2. Polymerase – Ketten – Reaktion (PCR)

Die Abkürzung „PCR“ kommt vom englischen Wort „Polymerase Chain Reaction“ und bedeutet Polymerase – Ketten – Reaktion. Diese Methode dient zur Vervielfältigung von DNA Spuren. Dies geschieht mithilfe des Enzyms DNA – Polymerase. Nach jedem Zyklus stehen die entstandenen Produkte für die weiteren Durchgänge zur Verfügung, was auch den Begriff „Kettenreaktion“ ausmacht. Das Verfahren ist 1983 von *Kary Mullis* erfunden worden, wofür er auch 1993 einen Nobelpreis verliehen bekommen hat. Es werden beim Prozess kurze, bekannte DNA – Sequenzen vervielfältigt. Hierfür werden originale DNA mit den zu kopierenden Abschnitten, zwei Primer die den Start – Punkt der Sequenz angeben, eine hitzebeständige DNA – Polymerase (oft aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, daher auch *Taq* – Polymerase), Desoxyribonucleosidtriphosphate als Bausteine für die neuen DNA – Stränge, Mg^{2+} - Ionen und eine Pufferlösung benötigt. Die Polymerase – Ketten – Reaktion findet in einem Thermocycler statt, welche auf festgelegte Temperaturen erwärmen und abkühlen kann. Die Zyklen (20 – 30) laufen in 3 Phasen ab (Lamm, 2018):

- 1.) Denaturierung:** Durch Erhitzung auf ca. 95°C werden die Wasserstoffbrücken aufgelöst und die DNA – Stränge werden getrennt. Anschließend wird auf ca. 65°C abgekühlt, um eine Rückbildung der Doppelhelixstruktur zu verhindern.
- 2.) Primerhybridisierung:** Die Primer des MasterMix heften sich an den Enden der zu vervielfältigenden Abschnitte an.

3.) **Elongation:** Die DNA – Polymerase füllt die freien Basen bis zum Ende komplementär auf. Der Primer meldet eine Startsequenz, was die Polymerase ihre Arbeit direkt wiederholen lässt.

6.7. Stundenplanungen

Schulform: AHS

Klasse/Schulstufe: 7./8. Klasse, 11./12. Schulstufe

Unterrichtsfach: Biologie und Umweltkunde

Dauer: 4 Doppelstunden und eine Einzelstunde

Thema der Unterrichtssequenz: Genetik

Unterrichtsziele:

Die Schüler/innen...

... kennen die wichtigsten Begriffe der Genetik und der modernen Gentechnik,

... wissen, wie ein Protein hergestellt wird,

... wissen, wie eine DNA Doppelhelix aufgebaut ist und sie können diese auch schematisch darstellen.

Lehrplanbezug / Bezug zu Bildungsstandards:

- „Die Schülerinnen und Schüler sollen – im Sinne biologischer Grundbildung – zentrale biologische Erkenntnisse gewinnen, Prinzipien, Zusammenhänge, Kreisläufe und Abhängigkeiten in lebenden Systemen sehen lernen und damit Grundzüge eines biologischen bzw. naturwissenschaftlichen Weltverständnisses erwerben.
- Die Schülerinnen und Schüler sollen Einblicke in ausgewählte Forschungsschwerpunkte der modernen Biowissenschaften erhalten und damit auch Verständnis für biologische bzw. naturwissenschaftliche Denk- und Arbeitsweisen erwerben. Sie sollen – auch im Sinne einer Studienvorbereitung für naturwissenschaftliche Fachrichtungen – verstehen, welche Aussagekraft biologische bzw. naturwissenschaftliche Experimente besitzen und wo deren Grenzen liegen.
- Die Schülerinnen und Schüler sollen ihr Verständnis und die Wahrnehmung für den eigenen Körper vertiefen und damit zu einem verantwortungsvollen Umgang mit sich selbst und anderen befähigt werden (Akzeptanz des eigenen Körpers, der eigenen Sexualität; Gesundheitsförderung, Suchtprophylaxe, Umgang mit behinderten Menschen, Humangenetik)“ (Bundesministerium für Bildung, 2018).

„8. Klasse:

Mensch und Gesundheit

Prinzipien moderner Gesundheitsförderung am Beispiel Stress darstellen und ausgehend von den Erfahrungen der Schülerinnen und Schüler bearbeiten (Ursachen, Auswirkungen, Stressbewältigung); Einblicke in

Forschungsschwerpunkte der modernen Biowissenschaften (Stammzellenforschung, neue Reproduktionsmethoden usw.)

Weltverständnis und Naturerkenntnis

Zelle

Vertiefung des Wissens über die zytologischen und molekularen Grundlagen der Vererbung

Genetik

Verstehen der biochemischen Vorgänge bei der Proteinsynthese (Transkription, Translation, Regulation der Genaktivität); Kennen der Vererbungsregeln; Einblick in die Humangenetik; Wissen um gentechnische Verfahren und deren mögliche Auswirkungen (Landwirtschaft, Medizin, Gesellschaft ua.) erwerben; Entwicklung einer verantwortungsbewussten Haltung gegenüber gentechnischen Eingriffen (Wissenschaftsethik, Bioethik) fördern“ (Bundesministerium für Bildung, 2018).

6.7.1. DNA – Aufbau und Bedeutung

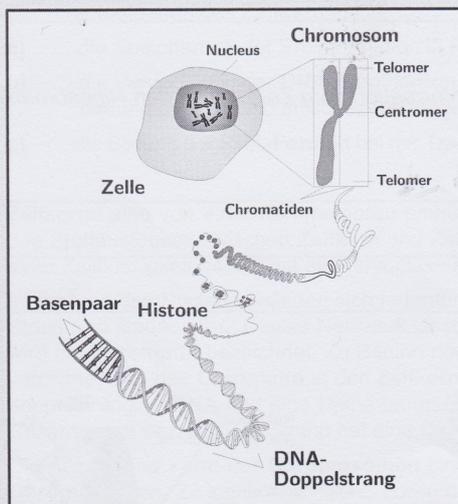
Dauer	Unterrichtsschritte und Sachaspekte	Materialien	Sozialform
	Vorbereitung		
5-10'	Anschließend an eine kurze Wiederholung zum Thema „Zelle“ wird der Verlauf der nächsten Doppelstunde erklärt		Vortrag der Lehrperson
50'	Das Arbeitsblatt wird von den SuS erledigt, beziehungsweise kann bei Fragen die Lehrperson aufgesucht werden. Der Text enthält alle nötigen Informationen.	Arbeitsblatt 1, Text „DNA Aufbau & Bedeutung“	Einzelarbeit und Partnerarbeit
35-40'	Das Arbeitsblatt wird gemeinsam verbessert. Anschließend wird mit den DNA Bausteinen eine doppelsträngige DNA ins Heft geklebt, es wird dabei auf die richtige Basenpaarung geachtet; am Ende werden die Schüler kurz auf die nächste Doppelstunde (Praktikum) vorbereitet und es wird ein Informationsblatt für die Eltern ausgeteilt, welches unterschrieben in der nächsten Stunde mitzubringen ist.	Heft, Arbeitsblatt 2, Uhu, Schere, Mitteilung für die Eltern	Plenum und Partnerarbeit, Vortrag der Lehrperson
	PRAKTIKUM DNA EXTRAKTION		
90'	Praktikum: „DNA – Gewinnung aus Mundschleimhautzellen“ (siehe Protokoll, Praktikum 1)	Isotonische Lösung, Spülmittel, Salz, Wasser, Reaktionsgefäß, Pipette, Petrischale, Zahnstocher, Ethanol	Partnerarbeit im Labor
	Nachbereitung		
10'	Das Experiment wird gemeinsam im Heft protokolliert.	Heft	Vortrag durch die Lehrperson, Plenum

I. Wichtige Grundlagen der Gentechnik

1.5 DNA Aufbau & Bedeutung

Bereits 1869 konnte ein Biologe aus der Schweiz **DNA** erstmalig isolieren. Aber erst im Jahre 1944 gelingt es **DNA** als Träger der Erbinformation zu erkennen. 1953 erkennen die britischen Biologen *Watson* und *Crick* die Regeln der Anlagerung einzelner **Basen** zu **Basenpaaren** und werden mit dem Nobel-Preis für ihre Arbeit geehrt.

Desoxyribonukleinsäure (kurz **DNS** oder engl. **DNA**) ist ein **Molekül**, das sich aus vielen Bauteilen, den **Nukleotiden**, zusammensetzt. Diese **Nukleotide** bestehen aus dem Zucker Desoxyribose, einer Phosphatgruppe, sowie einer angehängten Nukleinsäurebase. Als **Basen** kommen **Adenin (A)**, **Guanin (G)**, **Cytosin (C)** und **Thymin (T)** vor. **Thymin** wird in leicht abgewandelter Form bei der **RNA** (Transportform) eingebaut und dann als **Uracil (U)** bezeichnet. Viele dieser **Nukleotide** lagern sich zu einem langen Strang aneinander. Zwei solcher Stränge bilden zusammen wiederum einen Doppelstrang. Zwei solcher Doppelstränge sind über einen Centromer miteinander verknüpft und werden als Chromosom bezeichnet. Die freien Enden der **Chromosome** werden als **Telomere** bezeichnet. Bei der räumlichen Anordnung der **Chromosome** spielen spezielle Proteine eine wichtige Rolle. So sind beispielsweise die **Histone** für die aufgewundene Form der DNA verantwortlich.

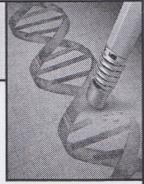


Auf Grund chemischer Reaktionen zwischen den beteiligten **Nukleotiden** liegen **Chromosome** in gewundener Form vor, welche man sich als Wendeltreppe gut vorstellen kann. Man spricht von einer **Doppelhelix-Struktur**. Die Verbindung der beiden Einzelstränge erfolgt über einander gegenüberliegende **Basen**. Diese **Basenpaare** können sich auf Grund ihrer Molekülstruktur miteinander **komplementär** verbinden, wobei sich immer **Adenin** mit **Thymin** (bzw. **Uracil**) und **Guanin** mit **Cytosin** verbinden. Diese Verbindung kann getrennt und wieder verbunden werden. Diese Eigenschaft ist die Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche Verdopplung der **DNA** in der **Interphase** jeder Zellteilung (**Mitose**). Dabei wird der Doppelstrang durch **Enzyme** wie die **DNA-Polymerase** an der Bindungsstelle

zwischen den **Basen** aufgetrennt. An jeden freigewordenen Einzelstrang lagern sich nun neue **Nukleotide** passend zur Vorlage an. Am Ende des Vorgangs liegen zwei genetisch identische **DNA-Doppelstränge** vor.

Die Entzifferung des **Genoms** eines Organismus ist äußerst schwierig und teilweise nicht realisierbar. Der Bakteriophage $\Phi X174$ konnte als erste Lebensform komplett, **Nukleotid** für **Nukleotid**, entziffert werden. Sein **Genom** besteht aus 5375 **Nukleotiden** in ganz bestimmter Abfolge der **Basen** A, G, C und T. Wenn man diese 5375 Buchstaben auf ein Blatt schreibt, so ergibt dies etwa die Größe dieser Heftseite. Auf dieser Basenfolge sind die Informationen für insgesamt 12 verschiedene **Proteine** gespeichert. Das **Genom** gewöhnlicher Bakterien würde bereits ein Buch von etwa 400 Seiten füllen. Der Text der menschlichen **DNA** ist etwa 3 Milliarden **Nucleotide** lang, was in schriftlicher Form, wäre sie denn bekannt, bereits eine Enzyklopädie von 750 Büchern zu jeweils 400 Seiten füllen würde. Schon in Anbetracht dieser immensen Kettenlänge erscheint die Kapazität der **DNA** zur Speicherung von genetischen Informationen als praktisch unbegrenzt.

I. Wichtige Grundlagen der Gentechnik



Aufgabe 1: Vervollständige den Lückentext

Die DNA ist Träger der _____ und liegt innerhalb der Zelle eukaryoter Zellen im _____.

Im Gegensatz dazu liegt die DNA bei Bakterien frei im _____.

Die beiden britischen Biologen _____ und _____ analysierten als erste den Aufbau der DNA und bekamen dafür den Nobelpreis.

Die DNA ist ein Molekül, das aus den Bauteilen

_____, einer Phosphatgruppe, sowie einer _____ aufgebaut ist. Dabei

kommen vier unterschiedliche Basen vor. Die Basen paaren sich immer _____ zueinander, es paart sich Adenin

mit _____ und Guanin mit _____.

Zusammenhängend bilden diese Bauteile eine Kette. Immer zwei solcher Ketten lagern sich aneinander. Man spricht von einer DNA-

_____. Die Reihenfolge der einzelnen Basen ist bei jedem Lebewesen _____.



Aufgabe 2: Erkläre den Begriff "komplementär".



Arbeitsblatt 2:

Aufgabe:

Erstelle einen DNA – Doppelstrang! Schneide dafür die einzelnen Basen, Zucker und Phosphate aus den vorgefertigten Schablonen aus und klebe sie in der richtigen Anordnung auf die DNA – Struktur! Beachte dabei, dass du die richtigen Basenpaare verwendest!

Zeichne außerdem ein, an welcher Seite sich das 3' – und an welcher sich das 5' – Ende befindet!

T _h ymin	T _h ymin	T _h ymin	T _h ymin
T _h ymin	T _h ymin	T _h ymin	T _h ymin

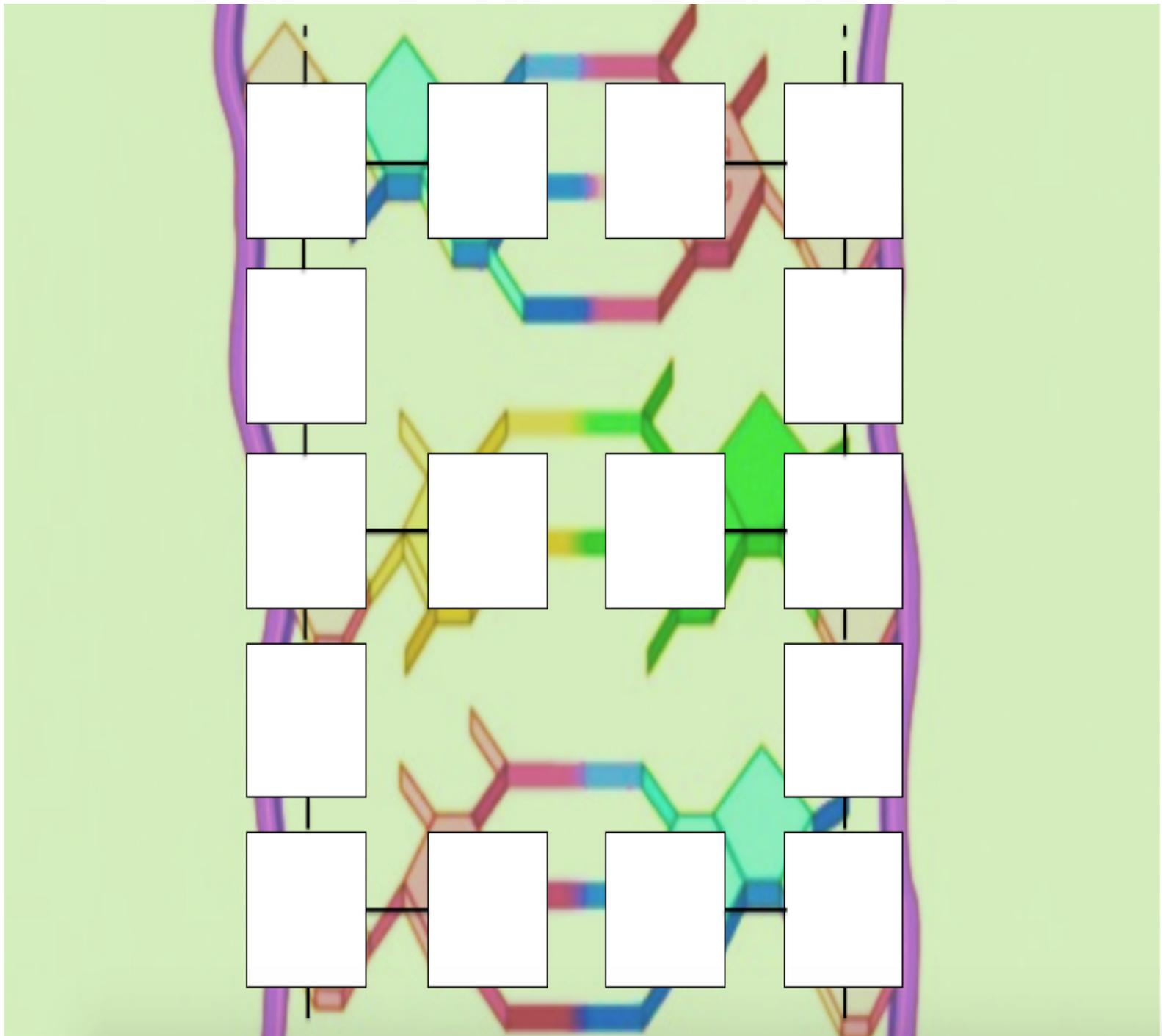
C _y tosin	C _y tosin	C _y tosin	C _y tosin
C _y tosin	C _y tosin	C _y tosin	C _y tosin

A _{denin}	A _{denin}	A _{denin}	A _{denin}
A _{denin}	A _{denin}	A _{denin}	A _{denin}

Zucker	Zucker	Zucker	Zucker
Zucker	Zucker	Zucker	Zucker
Zucker	Zucker	Zucker	Zucker
Zucker	Zucker	Zucker	Zucker
Zucker	Zucker	Zucker	Zucker
Zucker	Zucker	Zucker	Zucker

G uanin	G uanin	G uanin	G uanin
G uanin	G uanin	G uanin	G uanin

Phosphat	Phosphat	Phosphat	Phosphat
Phosphat	Phosphat	Phosphat	Phosphat
Phosphat	Phosphat	Phosphat	Phosphat
Phosphat	Phosphat	Phosphat	Phosphat
Phosphat	Phosphat	Phosphat	Phosphat
Phosphat	Phosphat	Phosphat	Phosphat



Quelle: www.4teachers.de

Ziel: chemischer Aufschluss von Mundschleimhautzellen, Isolierung der DNA mittels Präzipitation und Färbung mit Methylblau.

Durchführung:

1. Spüle deinen Mund mit einem isotonischen Sportgetränk (oder Salzlösung)!
2. Spucke die Lösung in den Plastikbecher zurück!
3. Stelle 50 ml Extraktionspuffer her, indem du folgende Zutaten in dem vorbereiteten Reaktionsgefäß mischst:
 - 5 ml Spülmittel
 - 5 g Salz (ca. 1 Teelöffel)
 - Mit Wasser auf 50 ml auffüllen
4. Schlie das Gefäß und mische die Zutaten durch kräftiges Schütteln (Vortex)!
5. Pipettiere 2 ml des Extraktionspuffers mit der Kolbenhubpipette zu deinen Mundschleimhautzellen in der Salzlösung und schwenke vorsichtig deinen Becher!
6. Gieße oder pipettiere vorsichtig 4 ml eiskalten Ethanol zu deinen extrahierten Zellen!
7. Transferiere die ausgefallene DNA mithilfe eines Zahnstochers oder einer Pipette in den Deckel einer Petrischale!
8. Tropfe einige μl Methylblau auf die DNA und lasse die Lösung ca. 5 Minuten einwirken!
9. Wasche die DNA 1 – 2 Mal mit 1 ml Wasser!
10. Überführe die gefärbte DNA in ein sauberes Eppendorf-Röhrchen!

(Fachdidaktisches Seminar Mikrobiologie und Genetik, Wintersemester 2018)

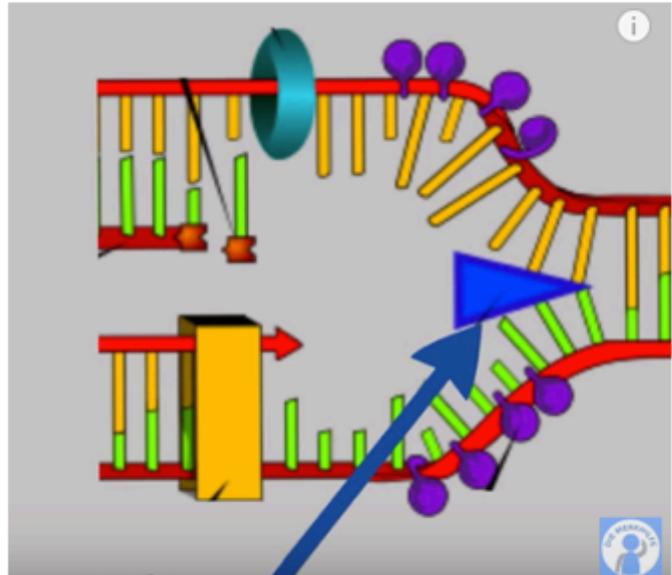
6.7.2. DNA - Replikation

Dauer	Unterrichtsschritte und Sachaspekte	Materialien	Sozialform
	Vorbereitung		
5‘	Wiederholung der Grundlagen der Genetik (DNA, Chromosome)		Vortrag der Lehrperson
35‘	Anhand einer Power – Point Präsentation wird den SuS die DNA Replikation nähergebracht. Die SuS notieren sich wichtige Informationen in ihr Heft. Anschließend wird ihnen ein Text ausgeteilt, auf dem die DNA Replikation noch einmal beschrieben ist.	Beamer, PP, Heft,	Vortrag der Lehrperson, Power – Point,
10‘	Die SuS tauschen sich nun mit dem/der Nachbarn/in aus und versuchen mit Hilfe des Textes den Ablauf der DNA – Replikation noch einmal zu wiederholen	Heft, Text	Partnerarbeit, Plenum

Power – Point – Folien:

DNA - Replikation

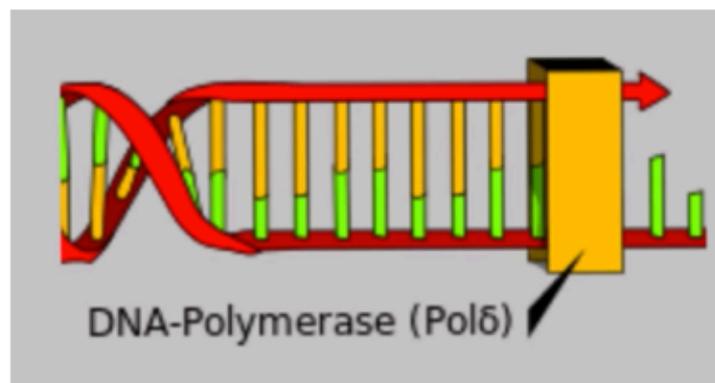
- HELICASE spaltet den DNA - Doppelstrang



Quelle: <https://www.youtube.com/watch?v=BlvcgsJh8ZM>

DNA - Polymerase

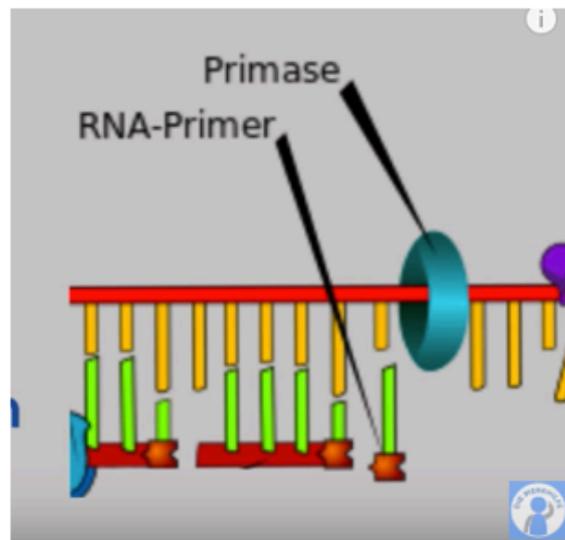
- Synthetisiert die neuen DNA - Stränge in 5' - 3' - Richtung
- Benötigt Startermolekül
→ Primer



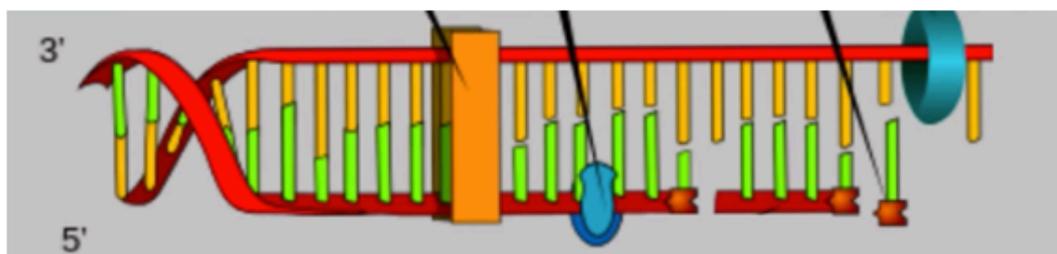
Quelle: <https://www.youtube.com/watch?v=BlvcgsJh8ZM>

PRIMASE

- Bringt Primer an beiden Strängen der Replikationsgabel an



Quelle: <https://www.youtube.com/watch?v=8lvqslh8ZM>



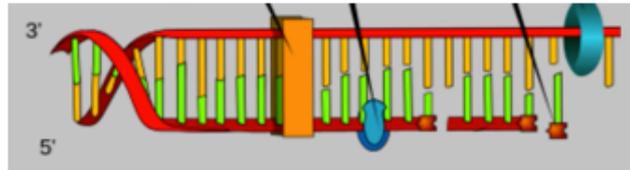
Diskontinuierlicher
Strang

- DNA - Polymerase arbeitet in die entgegengesetzte Richtung, weshalb DNA - Stücke (Okazaki - Fragmente) entstehen.

Quelle: <https://www.youtube.com/watch?v=8lvqslh8ZM>

DNA - LIGASE

- Verbindet die einzelnen Okazaki - Fragmente in 3' – 5' – Richtung



Quelle: <https://www.youtube.com/watch?v=Blvcgsh8ZM>

Text zur DNA – Replikation:

Die DNA muss sich bei jeder Zellteilung verdoppeln, damit auch das Erbmateriale verdoppelt ist. Das Enzym „Helicase“ trennt die doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge, durch Auflösung der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen. Damit sich die beiden Einzelstränge nicht wieder verbinden, werden „Einzelstrang – Bildungsproteine“ eingesetzt (bio@school 8, 2018).

Die DNA – Replikation erfolgt in 5' – 3' Richtung, da die DNA – Polymerase die neuen Stränge nur in diese Richtung verlängern kann. Der Leitstrang wird also kontinuierlich repliziert. Hierfür sind die Enzyme „DNA – Polymerasen“ verantwortlich. Diese Bausteine, die dafür verwendet werden sind Nucleosid – Triphosphate (Adenosin – Triphosphat, Guanin – Triphosphat, Cytosin – Triphosphat und Thymin – Triphosphat).

Der Folgestrang wird diskontinuierlich verlängert, was bedeutet, dass dieser „stückchenweise“ verlängert wird. Diese Stücke werden als „Okazaki – Fragmente“ bezeichnet. Zur Bildung dieser muss immer wieder ein neues RNA – Startermolekül verfügbar sein. Die Nukleotide werden also zu einem Primer verknüpft. Die DNA – Polymerase III synthetisiert das erste Okazaki – Fragment und löst sich, sobald ein RNA – Primer erreicht wird. Wenn der Primer für das 2. Fragment fertiggestellt ist, wird die entstandene Lücke zum ersten Okazaki Fragment in 5' – 3' Richtung aufgefüllt. Die DNA – Polymerase I die RNA – Primer durch DNA – Stränge. Die DNA Ligase verknüpft die einzelnen Fragmente, wodurch der Folgestrang vervollständigt wird (Reece, et al. 2014).

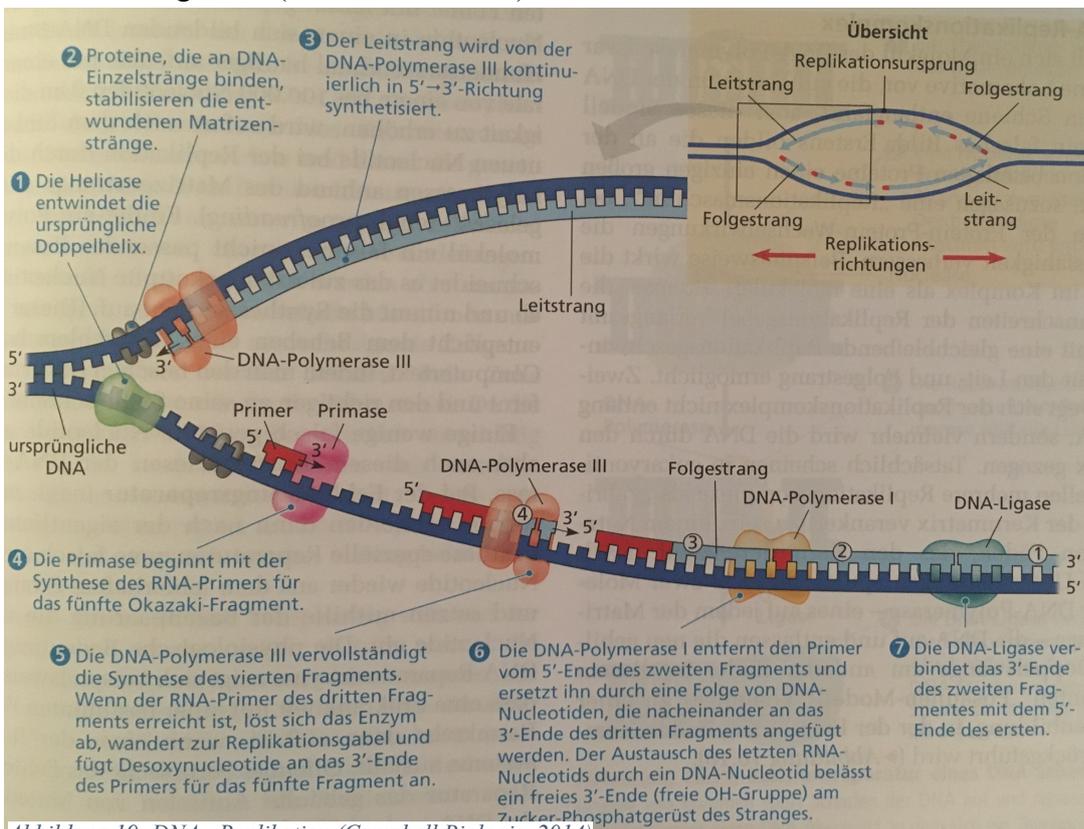


Abbildung 19: DNA - Replikation (Campbell Biologie, 2014)

6.7.3. Proteinbiosynthese

Dauer	Unterrichtsschritte und Sachaspekte	Materialien	Sozialform
5-10'	Wiederholung DNA Replikation		Vortrag der Lehrperson
60'	Mit dem Buch (bio@school 8, S. 40/41) wird gemeinsam das Thema Proteinbiosynthese (Transkription / Translation) besprochen. Dazu wird zuerst ein Einstiegsvideo gezeigt wie die DNA in mRNA übersetzt wird (https://www.youtube.com/watch?v=Fy_3gpIkoNs) Die SuS sollen wichtige Informationen ins Heft notieren. Anhand eines Bildes (siehe Abbildung 26) wird die Translation erklärt. Den SuS wird dann der Umgang mit der Gen – Sonne (Abbildung 27) erklärt.	Beamer, Heft, Tafel	Vortrag der Lehrperson, Video
30-35'	Die SuS versuchen nun mit den gesammelten Informationen in 4er Gruppen das Arbeitsblatt 4 zu lösen. Dieses wird anschließend besprochen.	Heft, Arbeitsblatt 4,	Gruppenarbeit, Plenum

Erklärung der Translation anhand des Bildes:

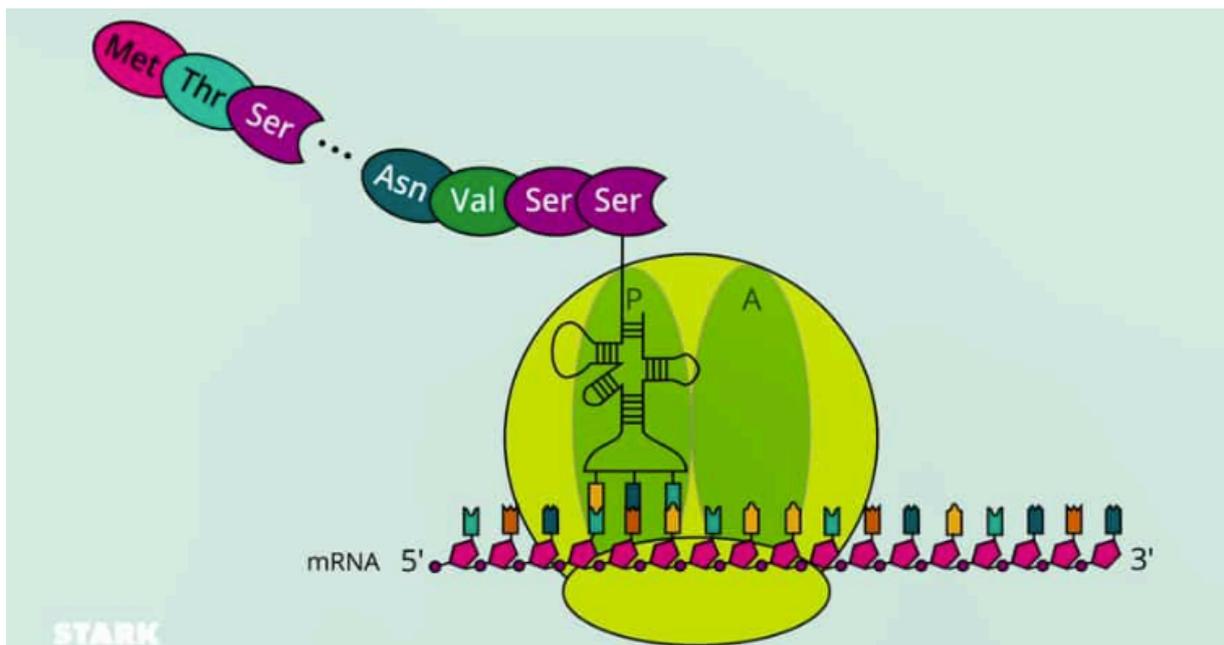


Abbildung 20: Translation (schultrainer.de)

Arbeitsblatt 4:

1.) Was ist ein Codon/Triplet?

2.) Welche Aufgabe haben Start- bzw. Stopp - Codone?

3.) „Übersetze“ mit Hilfe der Gensonne (Buch S. 40) die mRNA in eine Aminosäurekette

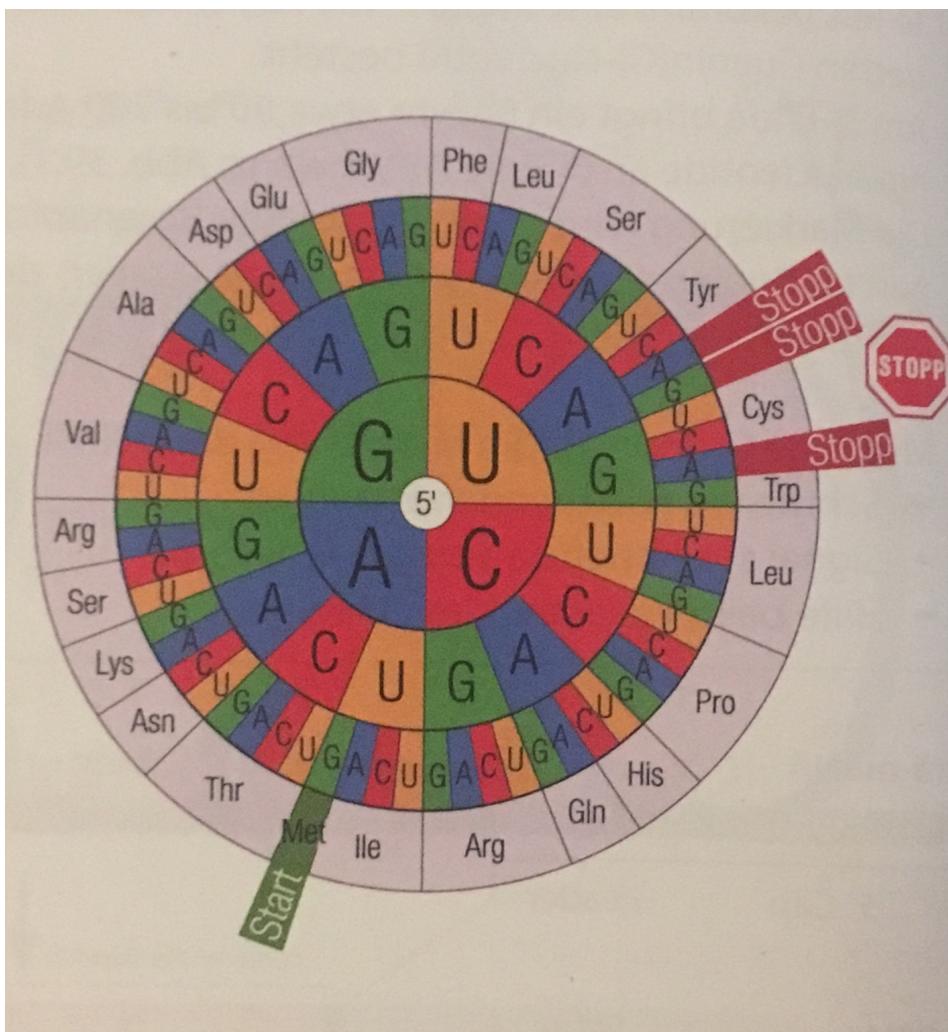


Abbildung 21 Gensonne, bio@school 8, S. 40

- A-U-G-C-G-C-U-U-G-G-G-A-U-C-U-A-A-
- G-A-U-G-C-A-U-G-U-A-C-C-C-U-A-G-C-U-

6.7.4. Moderne gentechnische Verfahren

Dauer	Unterrichtsschritte und Sachaspekte	Materialien	Sozialform
5-10'	Wiederholung Proteinbiosynthese		Plenum
80'	Die SuS sollen mithilfe des Internets zu den Themenbereichen „Genelektrophorese“ und „PCR“ recherchieren und dadurch fähig sein, die Arbeitsaufgaben des 5. Arbeitsblattes zu lösen.	Heft, Arbeitsblatt, Computer	Einzelarbeit, Partnerarbeit
10'	Die SuS versuchen nun mit den gesammelten Informationen in 4er Gruppen das Arbeitsblatt 5 zu lösen. Dieses wird anschließend besprochen.	Heft, Arbeitsblatt 5,	Gruppenarbeit, Plenum

Arbeitsblatt 5:

Beantworte mithilfe seriöser Internetseiten folgende Fragen:

1.) Was ist eine Gelelektrophorese und welche Einsatzgebiete kennst du dafür?

2.) Welche Aufgabe hat das Gel bei der Gelelektrophorese?

3.) Verbinde die richtigen Punkte miteinander:

(A) Die Gelelektrophorese ...

(1) ... am schnellsten und weitesten.

(B) Zur Trennung läuft die Probe ...

(3) ... gleichweit und werden als Bande sichtbar

(5) ... dient ein Standardgemisch, das bekannte Molekülgrößen enthält.

(E) Zur Identifizierung der einzelnen Banden ...

(4) ist ein Verfahren zur Trennung von Stoffgemischen nach der Größe ihrer Bestandteile

(D) Gleich schwere Moleküle wandern ...

(2) ... durch ein elektrisches Feld.

(C) Kleine und leichte Moleküle wandern...

Abbildung 22 Lernwerkstatt Gentechnik, 2018

4.) Was ist das Grundprinzip der PCR? Warum spricht man von einer Kettenreaktion?

5.) Nenne die sechs Parameter, die zur Durchführung einer PCR benötigt werden?

6.) Nenne Beispiele für die Anwendung einer PCR:

7.) Die PCR läuft in einem Thermocycler ab. Erkläre die drei Phasen mit eigenen Worten:

Denaturierung:

Primerhybridisierung:

Elongation:

Literaturverzeichnis

- AskTaqMan. How TaqMan Assays Work. Retrieved from <https://www.thermofisher.com/at/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/how-taqman-assays-work.html>
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. . (2011). Molekularbiologie der Zelle (Vol. 5. Auflage). Weinheim: Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA.
- Baars, M., Mathes, E., Stein H. & Steinhörster, U. (2001). Die Äsche. Hohenwarsleben: Verlagsgesellschaft mbH.
- Biegl, C.-E. (2015). Begegnungen mit der Natur 8 (Vol. 1). Wien: Österreichischer Bundesverlag Schulbuch GmbH & Co. KG.
- Bundesministerium für Bildung (2018). Lehrpläne der allgemein bildenden höheren Schulen. Retrieved from https://bildung.bmbwf.gv.at/schulen/unterricht/lp/lp_ahs.html
- Carim, K. J., Dysthe, J. C., Young, M. K. McKelvey, K. S. & Schwartz, M. K. (2016). An environmental DNA assay for detecting Arctic grayling in the upper Missouri River basin, North America. Conservation Genetics Resources, 4. doi:DOI 10.1007/s12686-016-0531-1
- GIS-Steiermark. (2006). Digitaler Atlas Steiermark. Retrieved from [https://gis.stmk.gv.at/atlas/\(S\(kwukgcecy1oe04g3xoqc4jxe\)\)/init.aspx?Karte=gdistartkarte&cms=da&gdi=&gdiservices=orient_adr%2ckat&layout=gisstmk](https://gis.stmk.gv.at/atlas/(S(kwukgcecy1oe04g3xoqc4jxe))/init.aspx?Karte=gdistartkarte&cms=da&gdi=&gdiservices=orient_adr%2ckat&layout=gisstmk)
- Hanfland, S., Schubert, M., Belanyecz, H., Lukowicz, M. v. . (2012). Die Äsche, Fisch des Jahres 2011. Offenbach: Verband Deutscher Sportfischer.
- Hauer, W. (2011). *Fische, Krebse, Muscheln in heimischen Seen und Flüssen* (Vol. 2. Auflage). Graz: Leopold Stocker Verlag.
- Hundritsch L., Keil F., Prinz H., Sasano B., Hauer W., Bammer V. & R. Haunschmid: Verbreitungskarten, beruhend auf GZÜ-Daten von 2007 bis 2009; Teil I: Leitarten des

Rhithrals: Epirhithral, Metarhithral, Hyporhithral groß und klein sowie Schmerlen- und Gründlingsbäche. Österreichs Fischerei 66 Heft 10, 256-270.

Institut für molekulare Biowissenschaften (2018). Fachdidaktisches Seminar Mikrobiologie und Genetik. *Institut für Molekulare Biowissenschaften*.

Jungwirth, M., Haidvogel, G., Moog, O., Muhar, S., Schmutz, S. . (2003). *Angewandte Fischökologie an Fließgewässern*. Wien: Facultas Verlags- und Buchhandels AG.

KIS. (2016). Fische Kärntens. Retrieved from http://www.kis.ktn.gv.at/212722_DE-Fische_Kaerntens-Aesche

Kottelat, M. & J. Freyhof (2007). *Handbook of European freshwater fishes*. Japan: The Ichthyological Society of Japan.

Lamm, S. (2018). *Lernwerkstatt Gentechnik - dem genetischen Fingerabdruck auf der Spur* (Vol. 4). Kerpen: Kohlverlag.

Longmire, J., Maltbie, M., & Baker, R. (1997). Use of 'lysis buffer' in DNA isolation and its implication for museum collections. *Museum of Texas Tech University*, 163, 1–3. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.143318>

Maringer, A. (2018). Äsche Laichplätze 2003. In: Nationalpark Gesäuse GmbH.

Promega Corporation (2002-2005). Wizard SV Gel and PCR Clean - Up System. Retrieved from www.promega.com

Reece, J., Urry, L., Cain, M., Wasserman, S., Minorsky, P. & R. Jackson (2016). *Campbell Biologie* (Vol. 10): Pearson Deutschland GmbH.

Renshaw, M. A., Olds, B. P., Jerde, C. L., McVeigh, M. M., & Lodge, D. M. (2015). The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol-chloroform-isoamyl alcohol DNA extraction. *Molecular Ecology Resources*, 15, 168–176.

- Sambrook, J., Fritsch, E., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual* (2nd Edition). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schermaier, A. & H. Weisl (2019). *bio@school 8* (Vol. 1). Linz: Veritas-Verlag.
- Schmid, R. D. (2016). *Taschenatlas der Biotechnologie und Gentechnik* (Vol. dritte Auflage). Deutschland: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Schultrainer. (2018). *der Ablauf der Proteinbiosynthese*. Retrieved from <https://www.schultrainer.de/lernen-und-wissen/biologie/translation-wie-der-koerper-proteine-herstellt/>
- Terofal, F. (1984). *Süßwasserfische in europäischen Gewässern*. München: Mosaik Verlag GmbH.
- ThermoFisher Scientific (2016). *Real-time PCR: understanding Ct*. *appliedbiosystems*.
- ThermoFisher Scientific (2017). *Qubit 4 Fluorometer*. Retrieved from [thermofisher.com/qubit](https://www.thermofisher.com/qubit)
- Thomsen, P. F. & E. Willerslev (2015). *Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity*. *Biological Conservation*, 183(Environmental DNA).
- Uiblein, F., Jagsch, A., Honsig-Erlenburg, W. & S. Weiss (2001). *Status, habitat use, and vulnerability of the European grayling in Austrian waters*. *Journal of Fish Biology*, 223-247. doi: 10.1006/jfbi.2001.1762
- Vandesompele, J. *qPCR guide*. Eurogentec. Retrieved from <https://www.gene-quantification.de/eurogentec-qPCR-guide.pdf>
- Weiss, S., Kopun, T. & S. Susnik Bajec (2012). *Assesing natural and disturbed population structure in European grayling *Thymallus thymallus*: melding phylogeographic, population genetic and jurisdictional perspectives for conservation planning*. *Journal of Fish Biology* (2013) 82, 505-521. doi: 10.1111/jfb.12007

Wiesner, C., Unfer, G. & M. Jungwirth. (2006). Fischbestandserhebung im Johnsbach. Institut für Hydrobiologie und Gewässermanagement, Universität für Bodenkultur.

Wiesner, C., Unfer, G., Foramitti, A. & M. Jungwirth. (2008). Naturschutzstrategien für Wald und Wildfluss im Gesäuse. Institut für Hydrobiologie und Gewässermanagement.

Wiesner, C., Unfer, G., Kammerhofer, A. & Jungwirth, M. (2010). Naturschutz für Wald und Wildfluss im Gesäuse - Postmonitoring Fischökologie. Institut für Hydrobiologie und Gewässermanagement.

Woschitz, G. (2006). Rote Liste gefährdeter Fische (Pisces) in der Steiermark. *Amt der Steiermärkischen Landesregierung*.

Zauner, G. (1999). *Einfluss des Kormorans auf die fischökologischen Verhältnisse der steirischen Enns zwischen Liezen und Johnsbach*. Universität für Bodenkultur, Wien.

Zimmermann, J. H., J. (2017). Umwelt - DNA (eDNA) - Molekularbiologie erobert Arten-, Gewässer- und Naturschutz. Research Gate.

Zymo Research. DNA Clean & Concentrator - 5. Retrieved from <http://www.zymoresearch.com/m/D4003>

4teachers. Spiel zum Thema DNA. Retrieved from <https://www.4teachers.de/?action=download&downloadtype=material&downloadid=68667&oldaction=show&id=4109>

7. Anhang:

Im Anhang befinden sich die Protokolle der Feldarbeit und der DNA – Extraktion, sowie das Protokoll der Probennahme.

TIWAG field collection protocol

Sample box will include:

12 independent bags including:

- 2 pairs of Gloves
- 1 syringe (50 mL)
- 1 filter housing with filter preassembled (plus extra filters in case water does not pass through one filter)
- 1 plastic wide mouth bottle (250 mL)
- 1 pair of plastic tweezers

Additional equipment provided but not in each bag:

- Two freezer boxes containing a total of 160 2ml tubes with Longmire's buffer (60 more will come from Steve's group)
- Extra bag containing decontaminated filters (60 more filters will come from Steve's group)
- sampling sheet

Required from sample collector:

- Enough distilled water for making one negative control (250 mL) per site, or bottled water from source outside of sampling location can also be used when no distilled water is available.
- One 5-10 L buck filled with 10% bleach for decontaminating bottles, syringes and filter housings between sample locations.
- instruments needed to collect information about latitude and longitude, water temperature, turbidity, time of day and other descriptors for sites that may be of interest or relevant.
- Paper towels that can be used for decontaminating surfaces as needed

Protocol for collection and filtering in the field:

1. Avoid sampling after moderate-heavy rains if possible and sample before any other field assessments are conducted. This will reduce any possible contamination that may occur due to the transfer of un-sterilized equipment between sampling locations (e.g., electrofishing equipment, boats, waders, etc.)
2. Chose four sites from which to take 250 mL. One should be above the stretch where you will electrofish and one should be below the last point electrofished. The other two should be distributed within the electrofishing area. These can be from the shore or a transect across the water's surface. You can also take small amounts of water (50mL) from many locations and pool this before filtration. The goal is to sample 1 L total for each of the 31 sties.
3. To collect a sample, wear new gloves for each river (i.e., no need to change within site) and use the sterile plastic bottle to collected 250mL of surface water. All

equipment require for one sample are included in a single bag. The bottle, syringe and filter housing can be reused within a general sampling location, but must be decontaminated between new rivers or locations. See decontamination description below.

4. Insert syringe into top of bottle (be careful not to push syringe in too far because this will cause the water to overflow. Pull up 50 mL of water with syringe by pulling on plunger, attached filter housing, press plunger until water is passed, repeat a total of five times until 250 mL of water is filtered.**
5. Remove filter housing from syringe, pull plunger out (sucking in air), reattach syringe to filter housing and press air through to expel any remaining water out of the filter. Repeat twice or more as necessary. No water should continue to come out of the filter when air is passed through. Remove filter housing from syringe.
6. Unscrew filter housing and with tweezers remove filter and place inside 2 mL microtube filled with Longmire's buffer by slightly rolling or pushing filter in with one side of the tweezers. *Be very careful on windy days as the filter can easily fly away. To avoid this, when unscrewing hold the bottom of the filter housing between your thumb and middle finger. As you remove the top of the filter housing touch you index finger to the filter just on the outside and enough to hold down the filter without touching the filter too much as to compromise the sample.*

**If water is not passing through with the most pressure you can apply by hand, then change filter. Make sure to complete step 7 and then change filter. Change filter by unscrewing the filter housing, place new filter in center and screw tight shut. Place filter in a separate tube labeled with a unique identification code and a, b, c, etc. On the sample sheet record the volume pushed through each filter.

7. Just after sampling record latitude, longitude, turbidity, conductivity and any other descriptive notes for the general sampling location.
8. Label tubes with unique identifications and record the information on the sample sheet. Place tubes with filters in freezer box.
9. Create a filter negative control with a new set of sampling equipment for every general sampling location (i.e., 31 sites so should make 31 filter negative controls) by pouring distilled water into 250 mL sampling bottle and repeating filtration steps 5-8 above.
10. Return sample box and sample sheet in a package for shipping at room temperature. To ensure that the tubes do not shift much during transport, please add a few paper towels in the top of the box and then close the lid and tape the box shut. Include a statement inside the shipping box that "These are filtered water samples in a non-toxic, non-flammable buffer to be used for research", the recipe for Longmire's solution (number 12 below), your name and contact info, and David Lodge's contact information in the package.

11. Mail to: Lodge Lab
University of Notre Dame
180 Galvin Life Sciences Building
Notre Dame, Indiana 46556-0369
USA

12. Buffer contents: Tris Hydrochloride ($C_4H_{12}ClNO_3$) pH 8.0, Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA: $C_{10}H_{16}N_2O_8$) pH8.0, Sodium chloride (NaCl), Sodium dodecyl sulfate (SDS: $C_{12}H_{25}NaO_4S$) and distilled water.

13. Decontamination procedure:

- a. Between each sampling location you must decontaminate sample bottle, syringe, tweezers and filter housing. Best if done in the laboratory, but if needed between locations can be done in the back of a car.
- b. Make sure all parts are disassembled and placed in bucket. Be careful not to lose the little white rubber gasket on the filter housing. Should be kept in bleach for minimum of ten minutes.
- c. Use a new pair of gloves to remove equipment from bleach and rinse with distilled water (or if you have a second bucket with distilled water can place them in this bucket). Bleach is an irritant and can stain clothes. Be careful not to spill it on yourself or other materials.
- d. Let air dry or use paper towels to dry.
- e. Before reuse, for a sample, rinse with water from site. **HOWEVER**, do not do this for any equipment that will be used for making the negative control for that site. For the negative control equipment, please make sure it is rinsed and dried well.
- f. Load new filter into filter housing in a wind controlled area if possible. Use fresh gloves for loading filters in filter housings.

Phenol-Chloroform-Isoamyl Alcohol - eDNA Extraction Protocol

Filtered eDNA Samples

DAY 1

- Incubate the 2 ml tubes (containing filters & preservation buffer) at **65°C** for **10 min**
 - Add **900 µl** of Phenol-Chloroform-Isoamyl Alcohol to each tubes
→ Vortex the tubes for 5 sec
 - Centrifuge the tubes at **15.000 g** for **5 min**
 - Transfer **700 µl** of the aqueous layer to new 2 ml tubes
 - Add **700 µl** of Chloroform-Isoamyl Alcohol to each tubes
→ Vortex the tubes for 5 sec
 - Centrifuge the tubes at **15.000 g** for **5 min**
 - Transfer **500 µl** of the aqueous layer to new 2ml tubes
 - Add **1.25 ml** of 100% ice-cold Ethanol + **20 µl** of 5M NaCl to each tubes
 - Mix the tubes gently
 - Precipitate overnight at **-20°C**
-

DAY 2

- Centrifuge at **15.000 g** for **10 min** to produce a pellet from the precipitation
- Remove carefully the liquid from each tube without disturbing the pellet
- Dry the tubes in the Concentrator at **45°C** for **15 min**
- Dry further (if necessary) under the hood until no liquid is visible
- Add **200 µl** of TE Buffer 1X - Low EDTA

optional, if necessary:

- **Remove potential PCR inhibitors with the OneStep PCR Inhibitor Removal Kit**
 - Mount the Zymo Spin Columns on a Collection Tube & add 600 µl of solution
 - Centrifuge at 8000 g for 3 min
 - Transfer the DNA extraction (diluted in TE) to ready Zymo Spin Columns mounted on a clean & labelled 1.5 ml Eppendorf tube (Discard Collection Tube)
 - Centrifuge at 8000 g for 1 min

Sample name	Date	River	Location	sampling position	volume	GPS coordinates (WGS84)	name of collector	Comments
eDNA005	12.04.19	/	Johnsbach Bachbrücke	/	500ml	N47°34'49.8" E14°35'29.728"	Tamara, Immi, Steve, Sarah	negative control for eDNA006-009
eDNA006	12.04.19	Johnsbach	Johnsbach Bachbrücke	50cm linkes Flusssufer	250ml	N47°34'49.8" E14°35'29.728"	Tamara, Immi, Steve, Sarah	
eDNA007	12.04.19	Johnsbach	Johnsbach Bachbrücke	150cm linkes Flusssufer	250ml	N47°34'49.8" E14°35'29.728"	Tamara, Immi, Steve, Sarah	
eDNA008	12.04.19	Johnsbach	Johnsbach Bachbrücke	50cm rechtes Flusssufer	250ml	N47°34'49.8" E14°35'29.728"	Tamara, Immi, Steve, Sarah	
eDNA009	12.04.19	Johnsbach	Johnsbach Bachbrücke	150cm rechtes Flusssufer	250ml	N47°34'49.8" E14°35'29.728"	Tamara, Immi, Steve, Sarah	
eDNA010	12.04.19	/	Hellichter Stein	/	250ml	N47°34'35.234" E14°35'18.834"	Tamara, Immi, Steve, Sarah	negative control for eDNA011-0014
eDNA011	12.04.19	Johnsbach	Hellichter Stein	linke Gabelung	250ml	N47°34'35.234" E14°35'18.834"	Tamara, Immi, Steve, Sarah	
eDNA012	12.04.19	Johnsbach	Hellichter Stein	150cm linkes Ufer	250ml	N47°34'35.234" E14°35'18.834"	Tamara, Immi, Steve, Sarah	
eDNA013	12.04.19	Johnsbach	Hellichter Stein	mittig - vor Gabelung	250ml	N47°34'35.234" E14°35'18.834"	Tamara, Immi, Steve, Sarah	
eDNA014	12.04.19	Johnsbach	Hellichter Stein	rechte Gabelung	250ml	N47°34'35.234" E14°35'18.834"	Tamara, Immi, Steve, Sarah	
eDNA015	12.04.19	/	Johnsbach Steg	/	250ml	N47°34'53.911" E14°35'43.465"	Tamara, Immi, Steve, Sarah	negative control for eDNA016-019
eDNA016	12.04.19	Enns	Johnsbach Steg	150cm rechtes Flusssufer	250ml	N47°34'53.911" E14°35'43.465"	Tamara, Immi, Steve, Sarah	
eDNA017	12.04.19	Enns	Johnsbach Steg	150cm rechtes Flusssufer	250ml	N47°34'53.911" E14°35'43.465"	Tamara, Immi, Steve, Sarah	
eDNA018	12.04.19	Enns	Johnsbach Steg	150cm rechtes Flusssufer	250ml	N47°34'53.911" E14°35'43.465"	Tamara, Immi, Steve, Sarah	
eDNA019	12.04.19	Enns	Johnsbach Steg	150cm rechtes Flusssufer	250ml	N47°34'53.911" E14°35'43.465"	Tamara, Immi, Steve, Sarah	Sandbank
eDNA020	12.04.19	/	Gstatterbodenbrücke	/	250ml	N47°35'25.044" E14°37'43.525"	Tamara, Immi, Steve, Sarah	negative control for eDNA021-024
eDNA021	12.04.19	Enns	Gstatterbodenbrücke	5 Meter rechtes Flusssufer	250ml	N47°35'25.044" E14°37'43.525"	Tamara, Immi, Steve, Sarah	Sandbank (Kehrwasser)
eDNA022	12.04.19	Enns	Gstatterbodenbrücke	5 Meter rechtes Flusssufer	250ml	N47°35'25.044" E14°37'43.525"	Tamara, Immi, Steve, Sarah	Sandbank (Kehrwasser)
eDNA023	12.04.19	Enns	Gstatterbodenbrücke	5 Meter rechtes Flusssufer	250ml	N47°35'25.044" E14°37'43.525"	Tamara, Immi, Steve, Sarah	Sandbank (Kehrwasser)
eDNA024	12.04.19	Enns	Gstatterbodenbrücke	2m rechtes Flusssufer	250ml	N47°35'25.044" E14°37'43.525"	Tamara, Immi, Steve, Sarah	steiniger Untergrund
eDNA025	12.04.19	/	Rafting Strecke	/	250ml	N47°34'50.369" E14°33'13.867"	Tamara, Immi, Steve, Sarah	negative control for eDNA026-029
eDNA026	12.04.19	Enns	Rafting Strecke	rechtes Flusssufer	250ml	N47°34'50.369" E14°33'13.867"	Tamara, Immi, Steve, Sarah	Kehrwasser
eDNA027	12.04.19	Enns	Rafting Strecke	rechtes Flusssufer	250ml	N47°34'50.369" E14°33'13.867"	Tamara, Immi, Steve, Sarah	Kehrwasserbereich mit Strömung
eDNA028	12.04.19	Enns	Rafting Strecke	rechtes Flusssufer	250ml	N47°34'50.369" E14°33'13.867"	Tamara, Immi, Steve, Sarah	direkt am Ufer starke Strömung
eDNA029	12.04.19	Enns	Rafting Strecke	rechtes Flusssufer	250ml	N47°34'50.369" E14°33'13.867"	Tamara, Immi, Steve, Sarah	direkt am Ufer starke Strömung

Sample name	Date	River	Location	sampling position	volume	GPS coordinates (WGS84)	name of collector	Comments
eDNA030	25.04.19	/	Bachbrück	/	250ml	N47°34'49.8" E14°35'29.728"	Julia, Sarah	n.c für eDNA031-034
eDNA031	25.04.19	Johnsbach	Bachbrück	50cm linkes Flusssufer	250ml	N47°34'49.8" E14°35'29.728"	Julia, Sarah	6°C (+0,1) ; viel dreckiges Wasser weg
eDNA032	25.04.19	Johnsbach	Bachbrück	150cm linkes Flusssufer	250ml	N47°34'49.8" E14°35'29.728"	Julia, Sarah	6°C (+0,1)
eDNA033	25.04.19	Johnsbach	Bachbrück	50cm rechtes Flusssufer	250ml	N47°34'49.8" E14°35'29.728"	Julia, Sarah	6°C (+0,1)
eDNA034	25.04.19	Johnsbach	Bachbrück	150cm rechtes Flusssufer	250ml	N47°34'49.8" E14°35'29.728"	Julia, Sarah	6°C (+0,1)
eDNA035	25.04.19	/	Hellichter Stein	/	250ml	N47°34'35.234" E14°35'18.834"	Julia, Sarah	n.c für eDNA036-039
eDNA036	25.04.19	Johnsbach	Hellichter Stein	linke Gabelung	250ml	N47°34'35.234" E14°35'18.834"	Julia, Sarah	(6,3 + 0,1)°C
eDNA037	25.04.19	Johnsbach	Hellichter Stein	rechte Gabelung	250ml	N47°34'35.234" E14°35'18.834"	Julia, Sarah	(6,3 + 0,1)°C
eDNA038	25.04.19	Johnsbach	Hellichter Stein	vor der Gabelung, Bachmittl	250ml	N47°34'35.234" E14°35'18.834"	Julia, Sarah	(6,3 + 0,1)°C
eDNA039	25.04.19	Johnsbach	Hellichter Stein	linkes Ufer, Kehrwasser	250ml	N47°34'35.234" E14°35'18.834"	Julia, Sarah	(6,3 + 0,1)°C
eDNA040	25.04.19	/	Park Eingang Rafting Str	/	250ml	N47°34'50.369" E14°33'13.867"	Julia, Sarah	n.c für eDNA041-050
eDNA041	25.04.19	Enns	Park Eingang Rafting Str	2m gerade, Kehrwasser	100ml	N47°34'50.369" E14°33'13.867"	Julia, Sarah	(6,5 + 0,1)°C
eDNA042	25.04.19	Enns	Park Eingang Rafting Str	hinter Stein, strömung	100ml	N47°34'50.369" E14°33'13.867"	Julia, Sarah	(6,5 + 0,1)°C
eDNA043	25.04.19	Enns	Park Eingang Rafting Str	vor Stein (Strömung)	100ml	N47°34'50.369" E14°33'13.867"	Julia, Sarah	(6,5 + 0,1)°C
eDNA044	25.04.19	Enns	Park Eingang Rafting Str	re Flusssufer, 5m von Einstie	100ml	N47°34'50.369" E14°33'13.867"	Julia, Sarah	(6,5 + 0,1)°C
eDNA045	25.04.19	Enns	Park Eingang Rafting Str	5m gerade aus, mittig von E	100ml	N47°34'50.369" E14°33'13.867"	Julia, Sarah	(6,5 + 0,1)°C
eDNA046	25.04.19	Enns	Park Eingang Rafting Str	2m gerade, Kehrwasser	100ml	N47°34'50.369" E14°33'13.867"	Julia, Sarah	(6,5 + 0,1)°C
eDNA047	25.04.19	Enns	Park Eingang Rafting Str	hinter Stein, strömung	100ml	N47°34'50.369" E14°33'13.867"	Julia, Sarah	(6,5 + 0,1)°C
eDNA048	25.04.19	Enns	Park Eingang Rafting Str	vor Stein (Strömung)	100ml	N47°34'50.369" E14°33'13.867"	Julia, Sarah	(6,5 + 0,1)°C
eDNA049	25.04.19	Enns	Park Eingang Rafting Str	re Flusssufer, 5m von Einstie	100ml	N47°34'50.369" E14°33'13.867"	Julia, Sarah	(6,5 + 0,1)°C
eDNA050	25.04.19	Enns	Park Eingang Rafting Str	5m gerade aus, mittig von E	100ml	N47°34'50.369" E14°33'13.867"	Julia, Sarah	(6,5 + 0,1)°C
eDNA051	25.04.19	/	Johnsbach Steg	/	250ml	N47°34'53.911" E14°35'43.465"	Julia, Sarah	n.c für eDNA052-061
eDNA052	25.04.19	Enns	Johnsbach Steg	linkes Flusssufer	100ml	N47°34'53.911" E14°35'43.465"	Julia, Sarah	(6,9 + 0,1)°C
eDNA053	25.04.19	Enns	Johnsbach Steg	linkes Flusssufer	100ml	N47°34'53.911" E14°35'43.465"	Julia, Sarah	(6,9 + 0,1)°C
eDNA054	25.04.19	Enns	Johnsbach Steg	linkes Flusssufer	100ml	N47°34'53.911" E14°35'43.465"	Julia, Sarah	(6,9 + 0,1)°C
eDNA055	25.04.19	Enns	Johnsbach Steg	linkes Flusssufer	100ml	N47°34'53.911" E14°35'43.465"	Julia, Sarah	(6,9 + 0,1)°C
eDNA056	25.04.19	Enns	Johnsbach Steg	linkes Flusssufer	100ml	N47°34'53.911" E14°35'43.465"	Julia, Sarah	(6,9 + 0,1)°C
eDNA057	25.04.19	Enns	Johnsbach Steg	linkes Flusssufer	100ml	N47°34'53.911" E14°35'43.465"	Julia, Sarah	(6,9 + 0,1)°C
eDNA058	25.04.19	Enns	Johnsbach Steg	linkes Flusssufer	100ml	N47°34'53.911" E14°35'43.465"	Julia, Sarah	(6,9 + 0,1)°C
eDNA059	25.04.19	Enns	Johnsbach Steg	linkes Flusssufer	100ml	N47°34'53.911" E14°35'43.465"	Julia, Sarah	(6,9 + 0,1)°C
eDNA060	25.04.19	Enns	Johnsbach Steg	linkes Flusssufer	100ml	N47°34'53.911" E14°35'43.465"	Julia, Sarah	(6,9 + 0,1)°C
eDNA061	25.04.19	Enns	Johnsbach Steg	linkes Flusssufer	100ml	N47°34'53.911" E14°35'43.465"	Julia, Sarah	(6,9 + 0,1)°C
eDNA062	25.04.19	/	Gstatterbodenbrücke	/	250ml	N47°35'25.044" E14°37'43.525"	Julia, Sarah	n.c für eDNA063-072
eDNA063	25.04.19	Enns	Gstatterbodenbrücke	linkes Flusssufer, 1m vom Ei	100ml	N47°35'25.044" E14°37'43.525"	Julia, Sarah	(7,1 + 0,1)°C, schlammig, gleich tief
eDNA064	25.04.19	Enns	Gstatterbodenbrücke	linkes Flusssufer, 1m vom Ei	100ml	N47°35'25.044" E14°37'43.525"	Julia, Sarah	(7,1 + 0,1)°C, schlammig, gleich tief
eDNA065	25.04.19	Enns	Gstatterbodenbrücke	linkes Flusssufer, 1m vom Ei	100ml	N47°35'25.044" E14°37'43.525"	Julia, Sarah	(7,1 + 0,1)°C, schlammig, gleich tief
eDNA066	25.04.19	Enns	Gstatterbodenbrücke	linkes Flusssufer, 1m vom Ei	100ml	N47°35'25.044" E14°37'43.525"	Julia, Sarah	(7,1 + 0,1)°C, schlammig, gleich tief
eDNA067	25.04.19	Enns	Gstatterbodenbrücke	linkes Flusssufer, 1m vom Ei	100ml	N47°35'25.044" E14°37'43.525"	Julia, Sarah	(7,1 + 0,1)°C, schlammig, gleich tief
eDNA068	25.04.19	Enns	Gstatterbodenbrücke	linkes Flusssufer, 1m vom Ei	100ml	N47°35'25.044" E14°37'43.525"	Julia, Sarah	(7,1 + 0,1)°C, schlammig, gleich tief
eDNA069	25.04.19	Enns	Gstatterbodenbrücke	linkes Flusssufer, 1m vom Ei	100ml	N47°35'25.044" E14°37'43.525"	Julia, Sarah	(7,1 + 0,1)°C, schlammig, gleich tief
eDNA070	25.04.19	Enns	Gstatterbodenbrücke	linkes Flusssufer, 1m vom Ei	100ml	N47°35'25.044" E14°37'43.525"	Julia, Sarah	(7,1 + 0,1)°C, schlammig, gleich tief
eDNA071	25.04.19	Enns	Gstatterbodenbrücke	linkes Flusssufer, 1m vom Ei	100ml	N47°35'25.044" E14°37'43.525"	Julia, Sarah	(7,1 + 0,1)°C, schlammig, gleich tief
eDNA072	25.04.19	Enns	Gstatterbodenbrücke	linkes Flusssufer, 1m vom Ei	100ml	N47°35'25.044" E14°37'43.525"	Julia, Sarah	(7,1 + 0,1)°C, schlammig, gleich tief

Sample name	Date	River	Location	sampling position	volume	GPS coordinates (WGS84)	name of collector	Comments
eDNA073	06.05.19	/	Bachbrücke	/	250ml	N47°34'49.8" E14°35'29.728"	Gernot, Sarah	negative control für eDNA074-076
eDNA074	06.05.19	Johnsbach	Bachbrücke	50cm li Flussufer	250ml	N47°34'49.8" E14°35'29.728"	Gernot, Sarah	(4,8 ±0,1)°C
eDNA075	06.05.19	Johnsbach	Bachbrücke	100cm li Flussufer	250ml	N47°34'49.8" E14°35'29.728"	Gernot, Sarah	(4,8 ±0,1)°C
eDNA076	06.05.19	Johnsbach	Bachbrücke	Fluss - Mitte	500ml	N47°34'49.8" E14°35'29.728"	Gernot, Sarah	(4,8 ±0,1)°C
eDNA077	06.05.19	/	Hellichter Stein	/	250ml	N47°34'35.234" E14°35'18.834"	Gernot, Sarah	n.c für eDNA078-079
eDNA078	06.05.19	Johnsbach	Hellichter Stein	re Gabelung	500ml	N47°34'35.234" E14°35'18.834"	Gernot, Sarah	(4,8 ±0,1)°C
eDNA079	06.05.19	Johnsbach	Hellichter Stein	linkes Flussufer Kehrwasser	500ml	N47°34'35.234" E14°35'18.834"	Gernot, Sarah	(4,8 ±0,1)°C
eDNA080	06.05.19	/	Rafting Strecke	/	250ml	N47°34'50.369" E14°33'13.867"	Gernot, Sarah	n.c. für eDNA081-082
eDNA081	06.05.19	Enns	Rafting Strecke	Kehrwasser re Flussufer, 1m	500ml	N47°34'50.369" E14°33'13.867"	Gernot, Sarah	(5 ±0,1)°C
eDNA082	06.05.19	Enns	Rafting Strecke	rechtes Flussufer, Strömung	500ml	N47°34'50.369" E14°33'13.867"	Gernot, Sarah	(5 ±0,1)°C
eDNA083	06.05.19	/	Johnsbach Steg	/	250ml	N47°34'53.911" E14°35'43.465"	Gernot, Sarah	n.c für eDNA084-085
eDNA084	06.05.19	Enns	Johnsbach Steg	re Flussufer, 5m in Wasser	500ml	N47°34'53.911" E14°35'43.465"	Gernot, Sarah	(5 ±0,1)°C
eDNA085	06.05.19	Enns	Johnsbach Steg	hinter Böschung 2m in Was	500ml	N47°34'53.911" E14°35'43.465"	Gernot, Sarah	(5 ±0,1)°C
eDNA086	06.05.19	/	Gstatterbodenbrücke	/	250ml	N47°35'25.044" E14°37'43.525"	Gernot, Sarah	n.c für eDNA087-088
eDNA087	06.05.19	Enns	Gstatterbodenbrücke	re Flussufer hinter Baum	500ml	N47°35'25.044" E14°37'43.525"	Gernot, Sarah	(5 ±0,1)°C
eDNA088	06.05.19	Enns	Gstatterbodenbrücke	re Flussufer unter Brücke, k	500ml	N47°35'25.044" E14°37'43.525"	Gernot, Sarah	(5 ±0,1)°C
eDNA095	20.05.19	/	Bachbrücke	/	250ml	N47°34'49.8" E14°35'29.728"	Charly, Sarah	nc für eDNA096-097
eDNA096	20.05.19	Johnsbach	Bachbrücke	50cm linkes Flussufer	500ml	N47°34'49.8" E14°35'29.728"	Charly, Sarah	(6,5 ±0,1)°C
eDNA097	20.05.19	Johnsbach	Bachbrücke	200cm linkes Flussufer	500ml	N47°34'49.8" E14°35'29.728"	Charly, Sarah	(6,5 ±0,1)°C
eDNA098	20.05.19	/	Hellichter Stein	/	250ml	N47°34'35.234" E14°35'18.834"	Charly, Sarah	nc für eDNA099-100
eDNA099	20.05.19	Johnsbach	Hellichter Stein	vor Gabelung, Flussmitte	500ml	N47°34'35.234" E14°35'18.834"	Charly, Sarah	(6,5 ±0,1)°C
eDNA100	20.05.19	Johnsbach	Hellichter Stein	Kehrwasser linkes Flussufer	500ml	N47°34'35.234" E14°35'18.834"	Charly, Sarah	(6,5 ±0,1)°C; unter Sohlschwelle
eDNA101	20.05.19	/	Rafting Strecke	/	250ml	N47°34'50.369" E14°33'13.867"	Charly, Sarah	nc für eDNA102-103
eDNA102	20.05.19	Enns	Rafting Strecke	re Flussufer, Kehrwasser	500ml	N47°34'50.369" E14°33'13.867"	Charly, Sarah	(7,5 ±0,1)°C
eDNA103	20.05.19	Enns	Rafting Strecke	re Flussufer, Strömung	500ml	N47°34'50.369" E14°33'13.867"	Charly, Sarah	(7,5 ±0,1)°C
eDNA104	20.05.19	/	Johnsbach Steg	/	250ml	N47°34'53.911" E14°35'43.465"	Charly, Sarah	nc für eDNA105-107
eDNA105	20.05.19	Enns	Johnsbach Steg	150cm re Flussufer	400ml	N47°34'53.911" E14°35'43.465"	Charly, Sarah	(7,5 ±0,1)°C
eDNA106	20.05.19	Enns	Johnsbach Steg	1m re Flussufer	300ml	N47°34'53.911" E14°35'43.465"	Charly, Sarah	(7,5 ±0,1)°C
eDNA107	20.05.19	Enns	Johnsbach Steg	1m re Flussufer	300ml	N47°34'53.911" E14°35'43.465"	Charly, Sarah	(7,5 ±0,1)°C
eDNA108	20.05.19	/	Gstatterbodenbrücke	/	250ml	N47°35'25.044" E14°37'43.525"	Charly, Sarah	nc für eDNA109-110
eDNA109	20.05.19	Enns	Gstatterbodenbrücke	2m re Flussufer	500ml	N47°35'25.044" E14°37'43.525"	Charly, Sarah	(7,5 ±0,1)°C ; Kehrwasser mit Gegen:
eDNA110	20.05.19	Enns	Gstatterbodenbrücke	2m re Flussufer	500ml	N47°35'25.044" E14°37'43.525"	Charly, Sarah	(7,5 ±0,1)°C ; Kehrwasser mit Gegen:

Sample name	Date	River	Location	sampling position	volume	GPS coordinates (WGS84)	name of collector	Comments
eDNA111	27.05.19	/	Bachbrücke	/	250ml	N47°34'49.8" E14°35'29.728"	Verena, Miriam, Sarah	negative control für eDNA112-113 (F
eDNA112	27.05.19	Johnsbach	Bachbrücke	linkes Flussufer 1m	500ml	N47°34'49.8" E14°35'29.728"	Verena, Miriam, Sarah	
eDNA113	27.05.19	Johnsbach	Bachbrücke	linkes Flussufer 150cm	500ml	N47°34'49.8" E14°35'29.728"	Verena, Miriam, Sarah	
eDNA114	27.05.19	/	Hellichter Stein	/	250ml	N47°34'35.234" E14°35'18.834"	Verena, Miriam, Sarah	negative control für eDNA115-116
eDNA115	27.05.19	Johnsbach	Hellichter Stein	rechtes Flussufer, höhe Gab	500ml	N47°34'35.234" E14°35'18.834"	Verena, Miriam, Sarah	
eDNA116	27.05.19	Johnsbach	Hellichter Stein	Strömungsbereich, Kehrwa	500ml	N47°34'35.234" E14°35'18.834"	Verena, Miriam, Sarah	
eDNA117	27.05.19	/	Rafting Strecke	/	250ml	N47°34'50.369" E14°33'13.867"	Verena, Miriam, Sarah	negative control für eDNA118-121
eDNA118	27.05.19	Enns	Rafting Strecke	Kehrwasser 5m gerade	250ml	N47°34'50.369" E14°33'13.867"	Verena, Miriam, Sarah	
eDNA119	27.05.19	Enns	Rafting Strecke	Kehrwasser 5m gerade	250ml	N47°34'50.369" E14°33'13.867"	Verena, Miriam, Sarah	
eDNA120	27.05.19	Enns	Rafting Strecke	rechtes Flussufer, Strömung	250ml	N47°34'50.369" E14°33'13.867"	Verena, Miriam, Sarah	
eDNA121	27.05.19	Enns	Rafting Strecke	rechtes Flussufer, Strömung	250ml	N47°34'50.369" E14°33'13.867"	Verena, Miriam, Sarah	
eDNA122	27.05.19	/	Johnsbach Steg	/	250ml	N47°34'53.911" E14°35'43.465"	Verena, Miriam, Sarah	negative control für eDNA123-126
eDNA123	27.05.19	Enns	Johnsbach Steg	rechtes Flussufer, 150cm	250ml	N47°34'53.911" E14°35'43.465"	Verena, Miriam, Sarah	
eDNA124	27.05.19	Enns	Johnsbach Steg	rechtes Flussufer, 150cm	250ml	N47°34'53.911" E14°35'43.465"	Verena, Miriam, Sarah	
eDNA125	27.05.19	Enns	Johnsbach Steg	rechtes Flussufer, 2m	250ml	N47°34'53.911" E14°35'43.465"	Verena, Miriam, Sarah	
eDNA126	27.05.19	Enns	Johnsbach Steg	rechtes Flussufer, 2m	250ml	N47°34'53.911" E14°35'43.465"	Verena, Miriam, Sarah	
eDNA127	27.05.19	/	Gstatterbodenbrücke	/	250ml	N47°35'25.044" E14°37'43.525"	Verena, Miriam, Sarah	negative control für eDNA128-131
eDNA128	27.05.19	Enns	Gstatterbodenbrücke	Kehrwasser	250ml	N47°35'25.044" E14°37'43.525"	Verena, Miriam, Sarah	
eDNA129	27.05.19	Enns	Gstatterbodenbrücke	Kehrwasser	250ml	N47°35'25.044" E14°37'43.525"	Verena, Miriam, Sarah	
eDNA130	27.05.19	Enns	Gstatterbodenbrücke	hinters Baum, rechtes Fluss	250ml	N47°35'25.044" E14°37'43.525"	Verena, Miriam, Sarah	
eDNA131	27.05.19	Enns	Gstatterbodenbrücke	hinters Baum, rechtes Fluss	250ml	N47°35'25.044" E14°37'43.525"	Verena, Miriam, Sarah	