Birmensdorf, 28. Mai 2020 5231.00711.001.01 (WSL)

Entwicklung einer kosten- und zeiteffizienten Methode zur Erhebung von Pilzen hinsichtlich einer geplanten Teilrevision der Roten Liste der gefährdeten Grosspilze der Schweiz

Schlussbericht des Projekts

Dr. Andrin Gross (Eidg. Forschungsanstalt WSL, 8903 Birmensdorf)
Dr. Markus Schlegel (Eidg. Forschungsanstalt WSL, 8903 Birmensdorf)

Mithilfe bei den Fruchtkörperaufnahmen und Betreuung der Sporenfallen:

Jenny Panziera (Praktikantin WSL Birmensdorf)
Jonas Brännhage (WSL Birmensdorf)
Luca Luethi (Bachelor Student Universität Bern)
Jolanda Klaver (Praktikantin WSL Birmensdorf)

Mithilfe bei den Laborarbeiten:

Veronika Zengerer (WSL Birmensdorf)

BAFU Koordinaten
Bestellnummer: 110008819
Kreditnummer: A200.001 Globalkredit / Forschung
Vertrags-Nummer 16.0100.PJ / R203-0209
Abteilung: Arten, Ökosysteme, Landschaften
Kontaktperson: Danielle Hofmann (Francis Cordillot)

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung 4
2 Einleitung 5
3 Methoden 6
3.1 Auswahl der Fallenstandorte 6
3.2 Pilzerhebungen und Sporensammlung 6
3.3 Handling der Sporenfallen 8
3.4 Wetter-Monitoring 9
3.5 Pilzbestimmung und Molekularbiologische Analysen 9
3.6 Auswertung der Metabarcoding-Daten 9
3.6.1 Gruppierung und taxonomische Zuordnung 9
3.6.2 Statistische Auswertung 10
3.6.3 Modellierung der Sporenausbreitung 10
3.7 Barcoding von Grosspilzen 10
4 Resultate 13
4.1 Fruchtkörperaufnahmen von Wiesenpilzen 13
4.2 Barcoding von Grosspilzen 13
4.3 Pilzdiversität in Sporenfallen 15
4.3.1 Allgemeine Pilzdiversität 15
4.3.2 Wiesenpilze 18
4.3.3 Arten der Roten Liste 18
4.4 Modellierung des Sporenflugs 19
5 Diskussion 21
5.1 Auswahl des Standortes 21
5.2 Bemerkungen zu den Fruchtkörperaufnahmen 21
5.3 Wie gut werden mit Sporenfallen seltene Arten gefunden? 22
5.4 Vergleich der Sporenfallentypen 22
5.5 Wie weit fliegen Pilzsporen? 23
5.6 Möglicher Einsatz von Sporenfallen für die Revision der Roten Liste der Schweiz 23
6 Literatur 25
7 Anhang 27

1 Zusammenfassung

Ausgangslage: Die Verbreitung von Pilzen zu erfassen ist schwierig, da deren Fruchtkörper oft nur für kurze Zeit erscheinen, ansonsten bleibt das Myzel für den Beobachter unsichtbar. Bei vielen Arten werden die Sporen jedoch über den Wind verbreitet, weshalb sie mit Sporenfallen erfasst werden können. Durch die Anwendung moderner Analysetechnik (Metabarcoding) kann aus der Sporen-DNA die Artenzusammensetzung ermittelt werden.

Methoden: Die vorliegende Studie vergleicht zwei passive Sporenfallentypen (Filterpapier für Trockensammlung und Regenwassersammler) sowie eine aktive Sporenfalle, welche die Luft aktiv einsaugt. Sie wurden in den Jahren 2018 und 2019 auf einer Alpwiese oberhalb Altendorf (SZ) aufgestellt, und die Proben mittels Metabarcoding analysiert. Gleichzeitig wurden dort systematisch die Fruchtkörper bestimmter Gruppen von Wiesenpilzen (Saftlinge, Ellerlinge, Keulenartige Pilze) aufgenommen, viele von diesen Arten stehen auch auf der Roten Liste. Das Sammeln der Sporen und die Aufnahmen wurden über mehrere Wochen hinweg wiederholt. Es wurden zudem auch noch Referenzsequenzen aus vorhandenen Herbarbelegen und gesammelten Wiesenpilzen mittels DNA-Barcoding generiert. Diese Sequenzen halfen bei der Identifikation der im Metabarcoding gefundenen Pilz-Sequenzen.

Ergebnisse: Mit den Sporenfallen wurde mit > 3'300 Arten und > 15'000 Sequenzvarianten (OTUs) eine sehr hohe Diversität an Pilzen erfasst. Die Zusammensetzung der Arten unterschied sich je nach Woche. Der hohe Anteil an Mykorrhizapilzen und anderen typischen Wald-Arten legt nahe, dass viele Pilze aus den umliegenden Wäldern erfasst wurden.

Wiesenpilze: Bei den Fruchtkörperaufnahmen wurden insgesamt 30 Wiesenpilzarten identifiziert, zwölf davon sind als gefährdet gelistet. 17 dieser Pilzarten konnten auch in den Sporenfallen wiedergefunden werden, meist war der relative Anteil in den Sequenzen gering (0.001 - 0.01 %). Besonders seltene Saftlinge mit < 20 Fruchtkörperfunden auf der gesamten Wiese wurden mit den Sporenfallen teilweise nicht entdeckt. Dafür detektierten die Fallen 15 weitere Arten, hauptsächlich nicht näher identifizierbare Schwesterarten der auf dem Feld gefundenen Keulenartigen Pilze. An Standorten mit mehr Fruchtkörpern einer bestimmten Art erfassten die Fallen generell auch mehr von deren Sporen. Auch wenn genauere Analysen noch nicht abgeschlossen sind, lassen die Daten annehmen, dass nur ein sehr geringer Anteil von Sporen dieser Pilze weiter als 100 m flog.

Rote Liste-Arten: Insgesamt wurden 148 der 932 als gefährdet gelisteten Arten gefunden, darunter auch viele stark gefährdete. In einer durchschnittlichen Sequenzprobe waren grob geschätzt 5 - 10 % der gefährdeten Arten zu finden, je nach Fallentyp. Bei den nicht gefährdeten Arten lag der von den Sporenfallen registrierte Art-Anteil in etwa doppelt so hoch.

Sporenfallentypen: Im Regenwasser konnte generell die höchste Artenzahl gefunden werden, ausser bei den lokalen Wiesenpilzen, wo die Regenwasserfalle am schlechtesten abschnitt. Dies lässt sich damit erklären, dass sie potentiell mehr Arten aus höheren Luftschichten enthält, und damit weniger lokale Arten detektiert werden. Die Filterpapiere wiesen im Laufe einer Woche eine fast gleich hohe Diversität an Sporen auf, auch aus der Umgebung. Filterfallen sind aber im Handling wesentlich einfacher als die Regenwasserfallen. Die aktiven Sporenfallen sammelten jeweils 3-4 Tage lang, zusammengenommen war die Diversität am geringsten, ausser bei lokalen Wiesenpilzen.

Diskussion: Die Studie konnte zeigen, dass Sporenmonitorings ein grosses Potential haben, Fruchtkörperaufnahmen zu ergänzen und teilweise zu ersetzen. Ein derart grosses Artenspektrum kann von Feldmykologen nur sehr schwer erfasst werden. Auf der anderen Seite könnten die Fallen Mühe haben, Sporen von besonders seltenen Arten zu erfassen, wenn sie nicht unmittelbar in der Nähe sporulieren. Hier müssen weitere Untersuchungen zeigen, ob solche Pilze durch gezieltere, sensitivere Analysemethoden doch häufiger detektiert werden könnten. Für die Untersuchung der lokalen Pilzflora scheinen besonders aktive Sporenfallen, sowie passive Filterfallen geeignet. In Bezug auf die Identifikation der Pilze anhand von DNA-Sequenzen hat sich gezeigt, dass verlässliche Datenbanken sehr wichtig sind, und hier bei den im Fokus stehenden Grosspilzen noch weitere Arbeiten notwendig sind.

2 Einleitung

Pilze kommen in praktisch allen Lebensräumen vor und sind für ein funktionierendes Ökosystem essentiell. Sie verbringen die meiste Zeit ihres Lebens unsichtbar im Boden. Nur wenn die Bedingungen optimal sind, erscheinen die Fruchtkörper, und dies oft nur für kurze Zeit. Um möglichst viele Arten zu erfassen, sind darum mehrere Begehungen notwendig und auch dann werden immer gewisse Arten (vor allem seltene) übersehen oder verpasst. Neue molekulare Techniken bieten vielversprechende Möglichkeiten für zeit- und kosteneffizienteres Sammeln und Bestimmen von Pilzen. Mit dem sogenannten „Metabarcoding" können heute hunderte von Pilzen in einer einzelnen Probe (z.B. Sporenprobe, Bodenprobe, Totholzprobe) molekular identifiziert werden. Eine wichtige Voraussetzung für die Bestimmung solcher Proben auf Art-Ebene ist das Vorliegen von Barcode-Sequenzen der einzelnen Arten, damit die Metabarcoding-Sequenzen präzise einer Art zugeordnet werden können.

Dieses Projekt hatte zum Ziel, Vorarbeit zu leisten, um die Erhebung und Bestimmung von Pilzen in Zukunft effizienter und kostengünstiger durchführen zu können, auch im Hinblick auf die geplante Revision der Roten Liste der gefährdeten Grosspilze der Schweiz. Hierzu wurden einerseits die Barcode-Sequenzen von ca. 1600 Herbarbelgen von über 700 Arten ermittelt, mit Schwerpunkt auf seltenen Arten und Arten ohne sichere DNA Barcode Sequenz (Referenzsequenz). Andererseits wurde untersucht, ob sich typische Wiesenpilze in Sporenfallen molekulargenetisch nachweisen lassen. Dazu wurden Daten aus passiven (2018 und 2019) und zusätzlich aktiven Sporenfallen (2019) mit Fruchtkörperaufnahmen im Feld um die Sporenfallen herum verglichen. Der Schwerpunkt der Feldaufnahmen lag in der Erfassung von Saftlingen, Ellerlingen und einigen Gruppen der Keulenartigen Pilze, welche hauptsächlich auf mageren, extensiv beweideten Wiesen vorkommen (sogenannte Saftlingswiesen) und aufgrund zunehmendem Habitatverlust in der Schweiz stark bedroht sind.

Folgende Forschungsfragen sollten beantwortet werden:

1. Wie viele Arten können wir mittels Sporenfallen nachweisen?
2. Wie setzen sich die Artgemeinschaften in Sporenfallen zusammen?
3. Welche Sporenfallentypen eignen sich am besten für die Detektion von seltenen Arten?
4. Wie viele seltene (Rote Liste-)Arten finden sich in Sporenfallen und wie häufig?
5. Wie hängt die Sporenzusammensetzung in der Luft mit der Verbreitung von Fruchtkörpern von Wiesenpilzen zusammen?

3 Methoden

3.1 Auswahl der Fallenstandorte

Um einen geeigneten Standort zu finden, wurden verschiedene Orte in Betracht gezogen, an welchen typische Saftlingswiesen existieren könnten. Dazu wurden auch Funddaten von Saftlingen in der Datenbank von SwissFungi ausgewertet. Im September 2018 wurden Standorte bei Merishausen (SH), Oetwil an der Limmat (ZH) und Altendorf (SZ) vor Ort inspiziert. Auf der Alp Schilligsrüti 2'704'296 / 1'225'369, CH1903+ / LV95) oberhalb von Altendorf konnte eine zum Teil erhebliche Diversität an Saftlingen und anderen Grosspilzen beobachtet werden, weshalb dieser Standort ausgewählt wurde.

3.2 Pilzerhebungen und Sporensammlung

Für die Feldaufnahmen wurden Pilze gewählt, die typischerweise auf Saftlingswiesen vorkommen, darunter die namengebenden Saftlinge, sowie Ellerlinge und Keulenartige Pilze. Diese Wiesenpilze sind besonders gefährdet, weil ihr Lebensraum wegen der stetigen Intensivierung der Landwirtschaft und Stickstoffeinträgen aus der Luft stark unter Druck steht. Prozentual viele dieser Wiesenpilze sind denn auch sehr selten und stehen auf der Roten Liste der Grosspilze der Schweiz (Senn-Irlet, Bieri, und Egli 2007). Die Fruchtkörperaufnahmen beinhaltete Saftlinge der Gattungen *(Neo-)Hygrocybe*, *Gliophorus, Porpoloma, Porpolomopsis,* Ellerlinge (*Cuphophyllus*, *Camarophyllus*), sowie Wiesenkeulen (*Clavulinopsis, Ramariopsis*) und Korallenpilze (*Clavaria*) (siehe auch Abbildung 2 für eine Auswahl der gefundenen Pilze).

2018 wurde nur mit passiven Sporenfallen gearbeitet. Diese wurden an sieben Standorten entlang eines Waldrandes gewählt, wo eine sehr hohe Dichte an Saftlings-Fruchtkörpern festgestellt werden konnte (Abbildung 5). Zum Einsatz kamen selbst konstruierte Sporenfallen, die einerseits mit regengeschützten Filterpapieren (Borosilikatglasfasern, Whatman Artikel-Nr. 1820-060, 60 mm Durchmesser) für das Sammeln der Trockendeposition bestückt waren und andererseits wurde Regenwasser über einen Trichter gesammelt (Abbildung 1c). Die Sporenfallen wurden jeweils wöchentlich geleert (siehe unten, Tabelle 1). Parallel dazu wurden die Pilzfruchtkörper wöchentlich in einem definierten Perimeter um die Sporenfallen herum aufgenommen (Abbildung 5). Die Aufnahmen dauerten jeweils einen Tag und wurden an fünf aufeinanderfolgenden Wochen im Oktober und November durchgeführt. Die Positionen von Fruchtkörper-Gruppen (1-4 m Durchmesser) wurden per GPS bestimmt (Leica GPS1200 mit RTK über swipos-GIS/GEO), wobei besonders im Bereich von 50 m um Sporenfallen herum auch kleinere Gruppen genau lokalisiert wurden (max. 1 m Durchmesser).

Tabelle 1: Daten der Felderhebungen

Jahr	Woche	Sporensammlung		Fruchtkörperaufnahmen
		passiv	aktiv (volumetrisch)	
2018	1	05. - 12.10.		10.10.
	2	12. - 19.10.		19.10.
	3	19. - 26.10.		26.10.
	4	26.10. - 02.11.		02.11.
	5	02. - 09.11.		09.11.20
2019	1	30.09. - 07.10.	02. - 04.10.	01. - 05.10.
	2	14. - 21.10.	16. - 18.10.	15. - 19.10.
	3	28.10. - 04.11.	30.10. - 01.11., 03.11.	29.10. - 02.11.
	(4*)			07. - 12.11.

* Untersuchung umliegender Gebiete

Abbildung 1: Ansicht der Wiese und Sporenfallen: **(a)** Blick gegen Norden, im Hintergrund ist einer der Windsensoren zu erkennen. **(b)** Nähere Ansicht einer aktiven Sporenfalle. Der Kopf der Falle dreht sich dank Windsegel so, dass die Öffnung (rechts im Bild) immer gegen den Wind zeigt. Die Sporen werden mittels eines erzeugten Luftwirbels («Cyclone») eingesaugt und im Sammelgefäss deponiert. **(c)** Passive Sporenfalle. Das Regenwasser wird durch einen Trichter eingefangen und in einer Flasche gesammelt. Ein Stahlgitter über dem Trichter und ein Nylonnetz beim Übergang zur Flasche sollten zudem verhindern, dass Insekten und grössere Partikel in die Flasche gelangen. Am Trichter ist eine Kunststoffplatte mit vier Filterpapieren befestigt, durch eine grössere Platte darüber vom Regen geschützt

Für die Feldsaison 2019 standen SwissFungi zusätzlich elf elektrisch, mit Solarenergie betriebene volumetrische Sporenfallen («cyclone sampler») vom Burkard Manufacturing Co Ltd. (Rickmansworth, England; Emberlin und Baboonian 1995) zur Verfügung (Abbildung 1b). Von den sieben Fallenstandorten 2018, wurden nur noch vier mit passiven Sporenfallen bestückt. Dafür wurden daneben noch je eine aktive Sporenfallen aufgestellt. Sechs weitere aktive Fallen wurden über die ganze Alp verteilt aufgestellt (Abbildung 5). Eine aktive Falle wurde zudem als Vergleich im Wald aufgestellt (siehe Abbildung 4). Die Fruchtkörperaufnahmen 2019 wurden ebenfalls auf die ganze Wiese ausgedehnt.

Aufgrund des viel grösseren Untersuchungsgebietes wurden die Aufnahmen 2019 nur alle zwei Wochen durchgeführt, insgesamt dreimal. Sie dauerten jeweils sechs Tage, von Montag bis Samstag. Die aktiven Sporenfallen liefen während drei Tagen (jeweils Dienstag bis Freitag) in Intervallen von 20 Minuten (20 Min. an / 20 Min aus, um Batterie zu sparen), wobei sie jeden Tag in ein neues Gefäss sammelten. Die passiven Sporenfallen wurden wie zuvor je eine Woche (Montag bis Montag) betrieben (Tabelle 1).

Um eine Übersicht über das Vorkommen von Wiesenpilzen in der ganzen Region zu erhalten, wurde zusätzlich zu den Fruchtkörperaufnahmen in der Schilligsrüti vom 7.-12. November 2019 auch noch umliegende Gebiete kartiert. Eine grobe Übersicht über weitere Saftlingsvorkommen in der Region kann für die Interpretation der Sporenfallendaten von grossem Nutzen sein. Konkret geht es um die Frage, ob die Sporenfallen auch Pilze, die weiter weg sporulieren, detektieren oder ob sie nur lokal sporulierende Pilze finden werden. Die Suchmethode war hier weniger genau und konzentrierte sich auf Flächen, wo aufgrund der ökologischen Bedingungen das Vorkommen von Saftlingen als für möglich erachtet wurde. Fruchtkörperpositionen wurden mittels Smartphone GPS (Genauigkeit von ca. +/- 10 m) bestimmt. Kleinere Wiesenkeulen (*Ramariopsis laeticolor/helvola*) wurden nicht aufgenommen.

Stumpfer Saftling (LC) *Hygrocybe chlorophana*
Weisser Ellerling (VU) *Cuphophyllus virgineus*
Papageigrüner Saftling (LC) *Gliophorus psittacinus*
Wiesenellerling (LC) *Cuphophyllus pratensis*
Schleimfuss-Saftling (LC) *Hygrocybe glutinipes*
Kirschroter Saftling (LC) *Hygrocybe coccinea*
Zäher Saftling (VU) *Gliophorus laetus*
Rosenroter Saftling (CR) *Porpolomopsis calyptriformis*
Kegeliger Saftling (LC) *Hygrocybe conica*
Kleinhütiger Saftling (NT) *Hygrocybe citrinovirens*
Prächtiger Saftling (LC) *Hygrocybe splendidissima*
Honig-Saftling (VU) *Hygrocybe reidii*
Spindelförmige Wiesenkeule (VU) *Clavulinopsis fusiformis*
Schöne/Goldgelbe Wiesenkeule (LC/NT) *Ramariopsis laeticolor / helvola*
Amethystfarbene Koralle (EN) *Clavaria zollingeri*

Abbildung 2: Bilder von gefundenen Wiesenpilzarten, jeweils mit Angabe des Rote Liste-Status (LC, VU, CR, EN). Oben sind Saftlings- und Ellerlingsarten zu sehen, geordnet nach Fundhäufigkeit. Die drei letzten Bilder zeigen Keulenartige Pilze. Fotos: J. Panziera, M. Schlegel, L. Lüthi

3.3 Handling der Sporenfallen

Die passiven Sporenfallen wurden vor der Installation komplett mit Javelwasser (NaOCl, 1 % freies Chlor) sterilisiert und danach mehrmals mit Reinstwasser (Milli-Q) gespült. Danach wurden einmal wöchentlich die Luftfilter ausgetauscht und das Regenwasser mitgenommen. Dabei wurde jeweils der Trichter mit 0.5 L Reinstwasser gespült, um abgelagerte Sporen im Wasser zu sammeln. In vier der fünf Feldwochen 2018 gab es keinen Regen (Abbildung 3), deshalb bestanden die analysierten Proben nur aus abgewaschener Trockendeposition. Die Sammelflaschen wurden durch frische, ebenfalls mit NaOCl sterilisierte Flaschen ersetzt und am gleichen Tag an die WSL transportiert. Das Wasser wurde innerhalb von 24 Stunden durch sterile Einwegfilter mit einer Porengrösse von 0.45 µM gefiltert (MicroFunnel™ von Pall Laboratory mit Membran aus Cellulosemischester, GN-6 Metricel®), und diese bei -20 °C eingefroren. Die vier Luftfilter wurden steril abgepackt und an der WSL ebenfalls gefroren gelagert.

Die aktiven Sporenfallen wurden wöchentlich geleert, die drei Sammelgefässe mit einem sterilen Deckel verschlossen, und frische sterile Gefässe eingesetzt. Die Proben wurden am gleichen Tag eingefroren. Dies geschah wie bei den passiven Fallen montags. Nach der Sporensammlung blieben die Gefässe demnach noch zweieinhalb Tage bis zur Leerung in der Falle. In der dritten Sammelwoche 2019 liefen mehrere Gefässe aufgrund des dichten Nebels mit Wasser voll. Dieses wurde durch Gefriertrocknung entfernt.

3.4 Wetter-Monitoring

Da die Windverhältnisse einen entscheidenden Einfluss auf die Verbreitung von Pilzsporen haben, wurden im Herbst 2019 zusätzlich drei Anemometer (Windsensoren) auf der Fläche installiert (Abbildung 1; ATMOS-22 von METER, München). Es wurden zudem bei jeder aktiven Sporenfalle Temperatur- und Feuchtigkeitslogger platziert.

Die Regenmenge konnte mit Regenwasserfallen direkt gemessen werden, zusätzlich stellte uns das Amt für Wald und Naturgefahren des Kantons Schwyz für 2019 die Daten von einem Niederschlagssensor des Flutwarnsystems ganz in der Nähe zur Verfügung (Altendorf-Brunnenlöcher, 2'704'296 / 1'225'369). Für die Daten 2018 wurde der Mittelwert aus den Messdaten der Meteostationen Einsiedeln, Wädenswil und Lachen verwendet (Abbildung 3).

3.5 Pilzbestimmung und Molekularbiologische Analysen

Wenn Pilze gefunden wurden, die nicht sicher bestimmt werden konnten, wurden sie an der WSL getrocknet und weiter mikroskopisch bestimmt. Für einige wurde die Sequenz der ITS-Region mittels Sanger-Sequenzierung ermittelt, zusammen mit anderen Proben des Barcoding-Projektes (Kapitel 3.7). Das Ziel der Sequenzierung war einerseits, nicht bestimmbare Pilze genetisch zu identifizieren, und andererseits von jeder typischen Wiesenpilzart mindestens eine Referenzsequenz zu generieren.

Die Sporen-DNA wurde in Glasfaser- und Wasserfiltern mittels des Kits PowerPlant Pro (Qiagen, Hombrechtikon, Schweiz) mit einem angepassten Protokoll extrahiert. Für die Proben der aktiven Sporenfallen wurde das UltraClean Microbial Kit (Qiagen) verwendet, ebenfalls mit einem aufgrund von Vortests angepassten Protokoll. Danach wurde die Zusammensetzung der Pilzgemeinschaften mittels Metabarcoding analysiert. Als Marker diente die ITS2-Region, amplifiziert mittels der Primer ITS3-KYO2 (Toju u. a. 2012) und ITS4 (White u. a. 1990). Um sicherzustellen, dass die Pilzzusammensetzung möglichst vollständig ermittelt werden konnte, wurden die Primer mit zusätzlichen selbst entwickelten Sequenz-Varianten für spezielle Pilzgruppen vervollständigt. Die Sequenzierung mittels Illumina MiSeq (2 x 300bp) (Illumina Inc. San Diego, USA) wurde an der Universität Bern durchgeführt (NGS Platform). Da die Proben der passiven Sporenfallen mehr DNA aufwiesen, wurden für sie mehr Sequenzen pro Probe generiert.

3.6 Auswertung der Metabarcoding-Daten

3.6.1 Gruppierung und taxonomische Zuordnung

Die Gruppierung der Sequenzen anhand von Ähnlichkeit wurde mit Hilfe von UNOISE3 (Edgar 2016) durchgeführt. Der Algorithmus versucht, möglichst alle einzigartigen DNA-Sequenzen in der ITS2-Region zu ermitteln, wobei potentielle Sequenzierfehler korrigiert werden (Denoising). In der Literatur ist oft von ASVs (amplicon sequence variants) die Rede. In der Folge werden diese Sequenzvarianten jedoch operational taxonomic units (OTUs) genannt. Meist gibt es mehrere Sequenzvarianten (OTUs) pro Art. Die taxonomischen Zuordnungen wurden mittels des SINTAX-Algorithmus (Robert Edgar 2016) mithilfe von UNITE, einer speziellen Referenzdatenbank für Pilze (Abarenkov u. a. 2020) ermittelt. Obwohl diese zum Teil manuell validiert wurde, enthält sie wie andere Datenbanken falsch zugewiesene Referenzsequenzen, und für einen Teil der Arten gibt es gar keine. Deshalb wurde für die im Feld untersuchten Wiesenpilze eine manuell erstellte Sequenzdatenbank benutzt, welche sich aus ITS-Sequenzen von im Feld gesammelten Pilzen und Sequenzen aus dem Barcoding-Projekt, sowie GenBank und UNITE zusammensetzte. OTUs mit mindestens

97 % Sequenz-Ähnlichkeit wurden den entsprechenden Arten zugeordnet. Eine ähnliche Datenbank wurde für Pilze der Roten Liste der gefährdeten Grosspilze in der Schweiz (Senn-Irlet, Bieri, und Egli 2007) anhand der UNITE-Datenbank (Abarenkov u. a. 2020) erstellt, einschliesslich aller in der Roten Liste evaluierten Arten (Stati LC, DD). Für 49 % der 4835 evaluierten Arten konnte in UNITE Referenzsequenzen gefunden werden.

3.6.2 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde in R (R Core Team 2020) mit Hilfe von Phyloseq (McMurdie und Holmes 2013) durchgeführt. Die Non-metrische Multidimensionale Skalierung (NMDS) und die Artenakkumulationskurven wurden mit Hilfe des Pakets *vegan* (Oksanen u. a. 2019) berechnet. Für NMDS mit dem Bray-Curtis-Distanzmass wurden die Sequenzzahlen zuerst normalisiert, um so genau wie möglich der Menge an Sporen in der Probe zu entsprechen. Bei den passiven Sporenfallen konnten dazu Quantifizierungen der DNA-Menge mittels qPCR benutzt werden, bei den Proben der aktiven Sporenfallen war das aufgrund einer Kontamination des Extraktionskits durch eine Pilzart (*Penicillium* sp.), deren Ursprung nicht ermittelt werden konnte, nicht möglich. Die Kontamination konnte jedoch umgekehrt für die Quantifizierung benutzt werden, da deren Anteil in den Sequenzen umgekehrt proportional zur Menge der zu analysierenden Pilz-DNA ist. Obwohl ursprünglich nicht beabsichtigt, wurde so eine Quantifizierung mittels «Spiking» (siehe z.B. Palmer u. a. 2018; Ovaskainen u. a. 2020) möglich.

3.6.3 Modellierung der Sporenausbreitung

Die so normalisierten Pilzmengen wurden zudem mit den aufgrund der Feldaufnahmen am Ort der jeweiligen Sporenfallen erwarteten Pilzmenge verglichen. Dazu wurde ein für die Samenausbreitung über weite Distanzen entwickeltes mechanistisches Modell verwendet, welches einer inversen Normalverteilung entspricht (Katul u. a. 2005). Um die erwartete Pilzzusammensetzung bei einer Sporenfalle zu berechnen, wurde die Modellfunktion für jede Gruppe von Pilzfruchtkörpern anhand der Distanz zur Falle angewendet, das Ergebnis mit der Anzahl an Fruchtkörpern multipliziert, und die so berechneten Mengen über alle Pilzfunde aufsummiert. Die optimalen Werte für die beiden Parameter λ' und μ' der Modellfunktion wurden ermittelt, indem die modellierten und in den Fallen gefundenen Werte (logarithmiert) mit linearer Regression verglichen wurden und diejenigen ausgewählt wurden, bei denen am meisten Variabilität durch das Modell erklärt wurde.

3.7 Barcoding von Grosspilzen

Von ca. 1600 Herbarbelegen und gesammelten Fruchtkörper aus diesem Projekt wurde wenig Pilzmaterial entnommen, um daraus die genomische DNA extrahieren zu können. Wir konnten dabei auf das sehr umfangreiche private Fungarium von Beatrice Senn-Irlet zurückgreifen, aber auch andere Mykologen wie Stefan Blaser, Andrin Gross, Romano de Marchi, Markus Wilhelm, etc. stellten Herbarmaterial zur Verfügung. Um die innerartliche Variation besser abschätzen zu können, wurden wenn möglich drei verschiedene Belege pro Art, möglichst aus unterschiedlichen geografischen Regionen der Schweiz ausgewählt. Typische Wiesenpilze wurden bei der Artauswahl zuerst berücksichtigt. Als Barcoding-Region wurde wie bei Pilzen üblich die ITS1 und ITS2 Region der ribosomalen DNA gewählt. Diese wurden mit den beiden Primern ITS1-F (Gardes und Bruns 1993) und ITS4 (White u. a. 1990) amplifiziert. Die Sequenzierung mittels Sanger-Sequenzierung wurde mit beiden Primern durchgeführt (vorwärts- und Gegenstrang), um die Qualität der Sequenzen mittels Sequenz-Alignments zu erhöhen. Für die Sequenz-Alignments wurde die Software Geneious Prime verwendet.

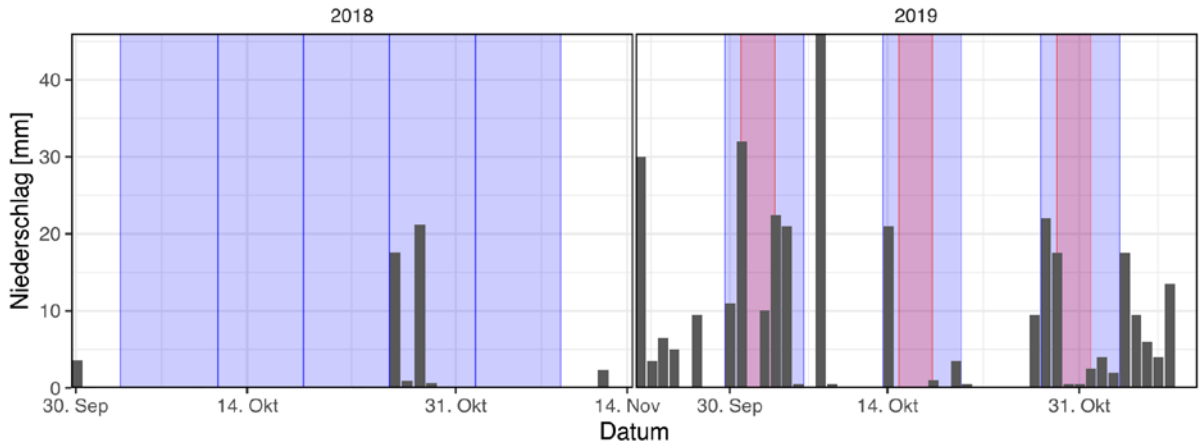

Abbildung 3: Täglicher Niederschlag während der Untersuchungsperioden in der Schilligsrüti [mm]. Der blaue und rote Hintergrund zeigt die Messintervalle der passiven und aktiven Sporenfallen.

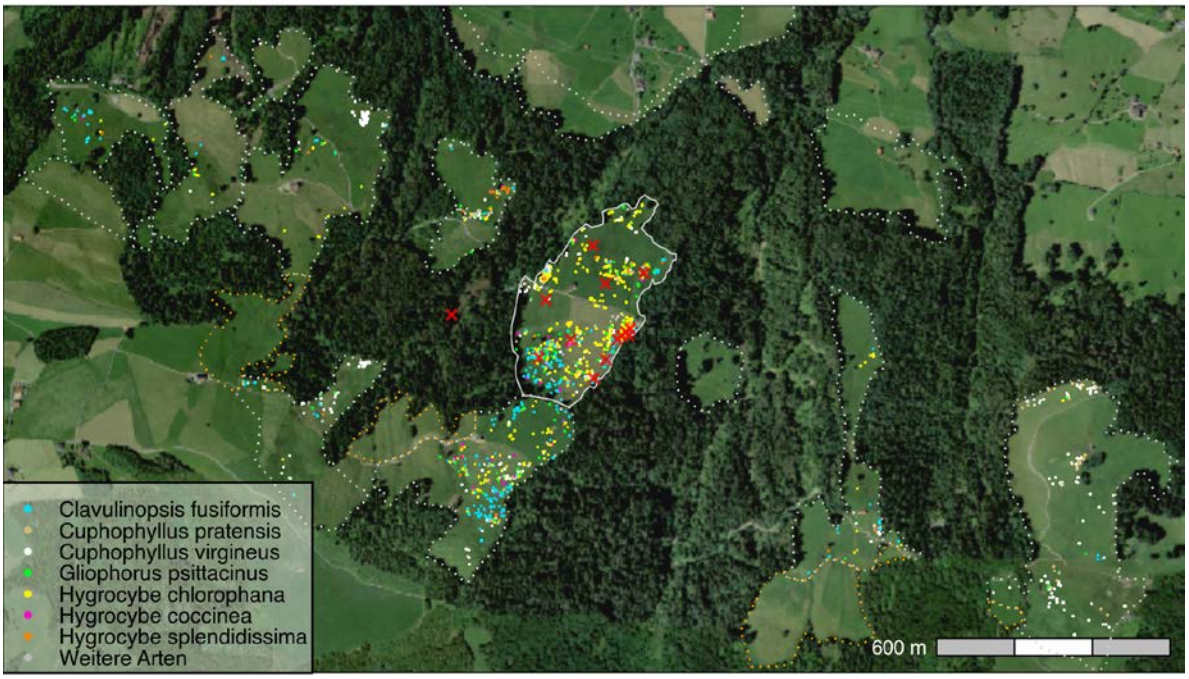

Abbildung 4: Übersicht der erweiterten Untersuchungsregion um die Alp Schilligsrüti (weiss umrandete Wiese in der Mitte). Die farbigen Punkte zeigen die Positionen der Pilzfruchtkörper an (zufällig um GPS-Punkt gestreut). Für die Schilligsrüti sind die Fruchtkörper der Woche vom 29. Oktober - 2. November 2019 gezeigt, für die umliegende Region wurden die Aufnahmen vom 7. - 12. November durchgeführt (mit weiss gestrichelten Linien umrandet). Kleine Wiesenkeulen (*R. laeticolor/helvola*) wurden dabei nicht aufgenommen. Gewisse höhergelegene Gebieten konnten wegen Schneefalls nicht mehr untersucht werden. Regionen, in denen die untersuchten Wiesenpilze potentiell vorkommen könnten, sind mit orange-gestrichelten Linien umrandet.
Luftbild: SwissImage 25

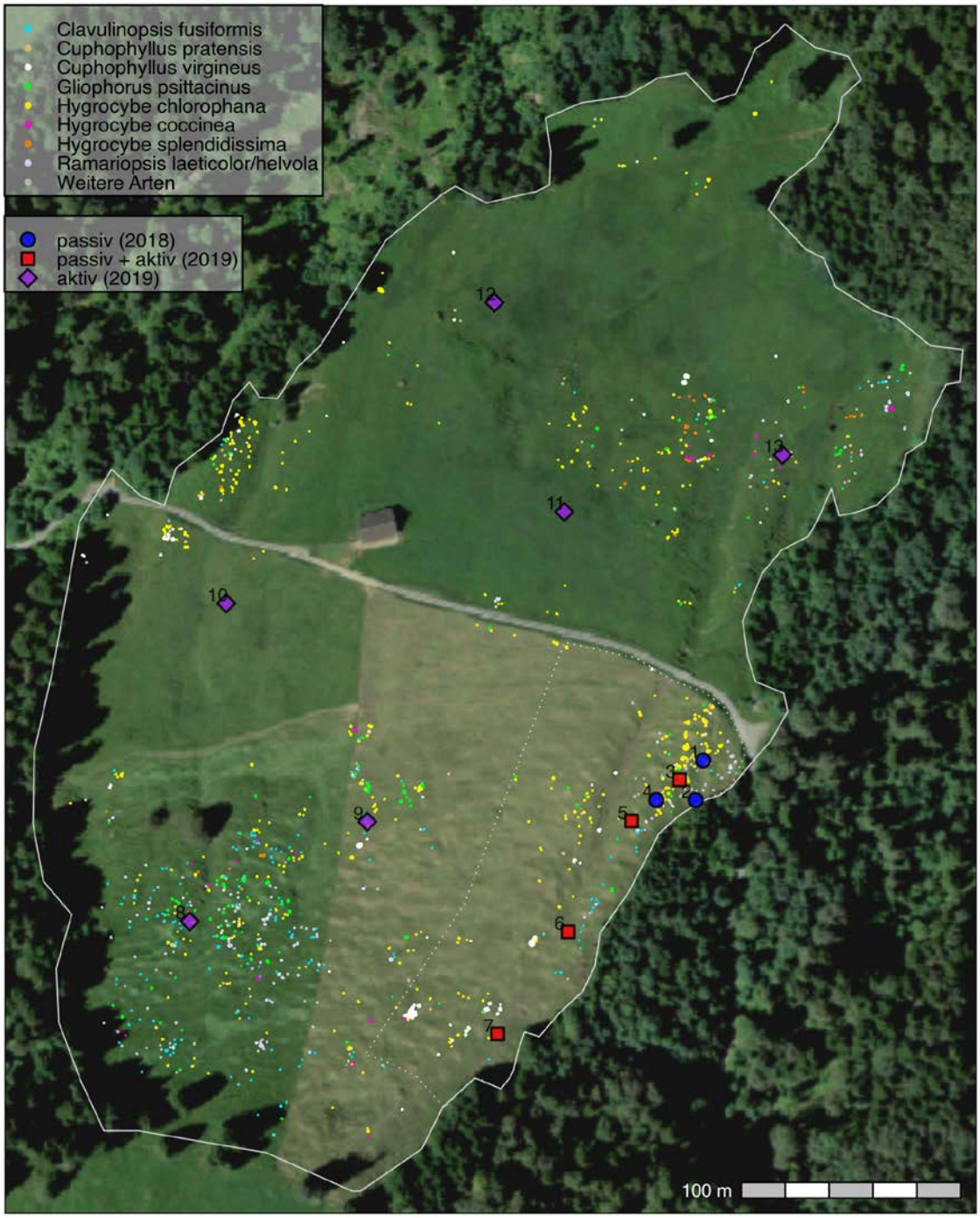

Abbildung 5: Übersicht der Wiese der Alp Schilligsrüti oberhalb von Altendorf SZ. Der Hang ist nach Norden geneigt, der höchste Punkt der Wiese befindet sich also im unteren Teil der Karte. Die Fruchtkörpervorkommen in der Woche vom 15. - 19. Oktober 2019 sind mit farbigen Punkten dargestellt. Gruppen von Fruchtkörpern wurden zur Illustration zufällig um die mit GPS ermittelte Position gestreut. Die mit 1-13 bezeichneten Symbole zeigen die Positionen der Sporenfallen. 2018 wurden passive Sporenfallen entlang des Waldrandes aufgestellt (1-7). Im folgenden Jahr wurden bei den Punkten 3 und 5-7 sowohl passive als auch aktive Sporenfallen aufgestellt, und zusätzlich noch aktive Fallen auf der ganzen Wiese verteilt (8-13). Die gestrichelte weisse Linie markiert die Umrisse der Untersuchungsregion für Fruchtkörper 2018. 2019 wurde auf der ganzen Wiese gesucht (Umrisse mit ausgezogener weisser Linie).
Luftbild: SwissImage 25

4 Resultate

4.1 Fruchtkörperaufnahmen von Wiesenpilzen

Insgesamt wurden 30 Arten der ausgewählten Wiesenpilzgruppen gefunden, 22 davon waren Saftlinge und Ellerlinge und acht waren Keulenartige Pilze. Die mit Abstand am häufigsten gefundene Art war in beiden Jahren der stumpfe Saftling (*Hygrocybe chlorophana*, LC). 2018 waren es in jeder Sammelwoche durchschnittlich 187 Funde, 2019 waren es 1121 Funde, wobei in diesem Jahr auf der ganzen Alp gesucht wurde, nicht nur auf einem Teil der Wiese (siehe Abbildung 5 für eine Übersicht, bzw. Tabelle 3 im Anhang für eine detaillierte Liste). Weitere häufige Arten waren der Weisse Ellerling (*Cuphophyllus virgineus*, LC) mit 150/465 Funden im Mittel pro Woche 2018/2019, sowie der Papageigrüne Saftling (*Gliophorus psittacinus*, LC) (26/275 Funde), die Schöne oder die Goldgelbe Wiesenkeule (*Ramariopsis laeticolor*, LC*/helvola*, NT), welche ohne Mikroskop nicht unterscheidbar sind (8.4/216 Funde).

Von den 22 Saftlings- und Ellerlingsarten sind acht in der Roten Liste als verletzlich (VU) und zwei als stark gefährdet (EN, *Hygrocybe ingrata*) bzw. vom Aussterben bedroht (CR, *Porpolomopsis calyptriformis*) eingestuft (Tabelle 3). Zudem gab es einen Erstfund von *Hygrocybe phaeococcinea* (siehe Kapitel 4.2). Bei den untersuchten Gruppen der Keulenartigen Pilze (*Clavaria, Clavulinopsis, Ramariopsis* spp.) ist die Spindelförmige Wiesenkeule (*Clavulinopsis fusiformis*) als verletzlich eingestuft. Sie war interessanterweise mit durchschnittlich 221 Funden in jeder Woche 2019 auf dieser Wiese trotzdem ziemlich häufig anzutreffen. Von der sehr seltenen Amethystfarbenen Koralle (*Clavaria zollingeri*, EN; Abbildung 2) konnten in der ersten Feldwoche 2019 fünf Fruchtkörper an verschiedenen Standorten gefunden werden. Die Arten *Ramariopsis laeticolor* und *R. helvola* sowie *Clavaria acuta* und *C. falcata* werden hier als eine Art behandelt, da ihre Unterscheidung auf dem Feld nicht möglich war.

Zwei weitere als verletzlich eingestufte Arten (*Hygrocybe punicea, Cuphophyllus lacmus*) wurden Anfang November 2019 gefunden, als das umliegende Gebiet auf Wiesenpilze untersucht wurde (Tabelle 3). Sie wuchsen beide am Hang einer Feuchtwiese westlich der Alp Schilligsrüti, wo auf kleinem Raum eine hohe Diversität an Saftlingen und Ellerlingen zu beobachten war. Die Weide oberhalb (südlich) der Schilligsrüti wies ebenfalls eine hohe Anzahl an Arten auf (Abbildung 4). Einige der umliegenden Gebiete konnten aufgrund eines Schneeeinbruchs leider nicht mehr untersucht werden.

Die Häufigkeit der Arten war generell stark von den Standort-Bedingungen abhängig. an intensiver genutzten (gedüngten) Standorten wuchsen fast keine der untersuchten Wiesenpilze. Die Zusammensetzung der Arten war auch lokal verschieden, wie in Abbildung 4 und Abbildung 5 gut zu sehen ist. Keulenartige schienen feuchtere, moosige Standorte zu bevorzugen.

4.2 Barcoding von Grosspilzen

Von den 1'600 sequenzierten Herbarbelegen wurden noch nicht alle ausgewertet, hauptsächlich die Wiesenpilzsequenzen wurden angeschaut. Dies war vielfach sehr hilfreich, da viele falsch bestimmte Sequenzen in den öffentlichen Datenbanken (GenBank, UNITE) vorhanden sind. Zum Beispiel konnte nur so *Hygrocybe splendidissima* von *H. punicea* abgegrenzt werden. Es kamen auch Arten ohne Ähnlichkeit zu publizierten Sequenzen zum Vorschein, ein unbekannter Saftling aus dem Herbar (*Hygrocybe* sp. 2) sowie eine unbekannte Wiesenkoralle (*Clavulinopsis* sp. w1.38) (Tabelle 3). Zudem erwies sich eine morphologisch nicht identifizierbare Art nach der genetischen Analyse als *Hygrocybe phaeococcinea*, ein Erstfund für die Schweiz. *Hygrocybe phaeococcinea* ist auf der provisorischen, globalen Roten Liste der Pilze als VU „verletzlich“ eingestuft.

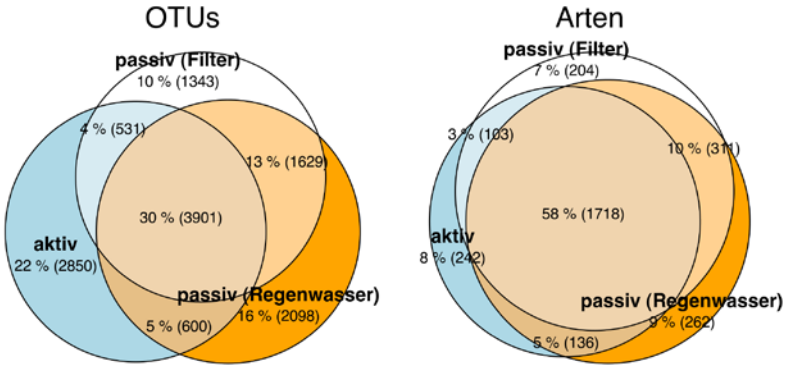

Abbildung 6: Venn-Diagramm, welches die Anteile der gemeinsamen / einzigartigen Pilz-OTUs (links) bzw. Arten (rechts) in den verschiedenen Sporenfallentypen zeigt. Es wurden nur OTUs und Arten mit mindestens 10 Sequenzen gezählt, die Zahlen wurden für alle Proben zusammen berechnet. Ausserdem wurden alle Datensätze auf 3.3 Millionen Reads reduziert, um vergleichbar zu sein.

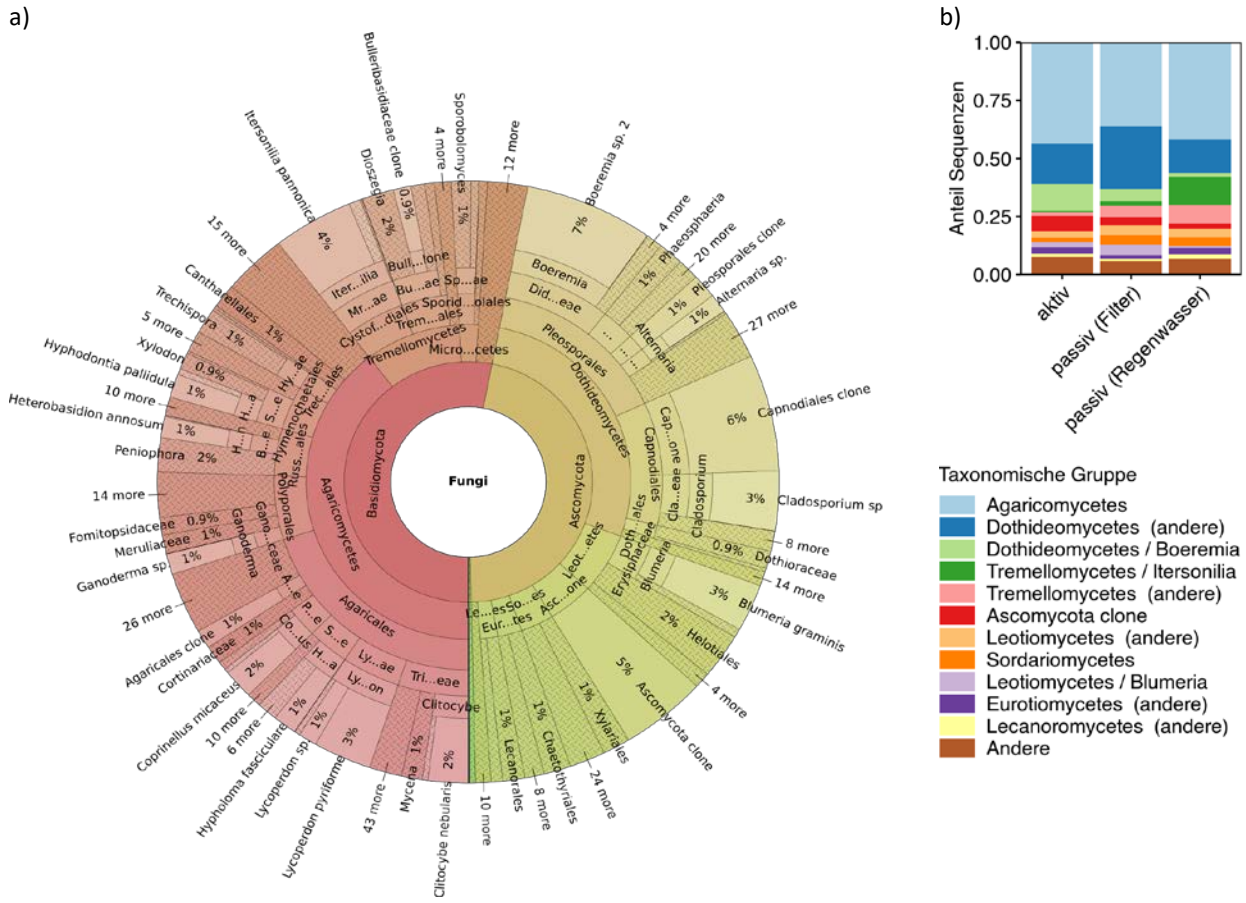

Abbildung 7: Übersicht der relativen Häufigkeiten verschiedener taxonomischer Gruppen an Fallenstandorten, bei denen alle Fallentypen aufgestellt waren (2019) **(a)** in den Proben aller Sporenfallen zusammengenommen als Krona-Grafik (Ondov, Bergman, und Phillippy 2011) **(b)** als Balkengrafik nach Fallentyp aufgeschlüsselt. Bei (a) ist es möglich, dass gewisse Namen ungenau sind, da die Vorhersagen (soweit nicht z.B. in der Roten Liste) automatisch anhand der UNITE-Datenbank gemacht wurden.

4.3 Pilzdiversität in Sporenfallen

4.3.1 Allgemeine Pilzdiversität

Die Metabarcoding-Analyse der ITS2-Region ergab im Mittel (Median) 50'123 Sequenzen pro Probe für die aktiven Sporenfallen und 141'110, bzw. 126'495 für Proben aus passiven Sporenfallen (Filterfallen bzw. Regenwasser). Mit insgesamt 15'920 an häufigeren Sequenzvarianten (hier operational taxonomic units genannt, OTUs) und 3'326 Arten waren die Gemeinschaften sehr divers. Es wurden OTUs gezählt, bei denen mindestens 10 Sequenzen dem OTU zugeordnet waren. Der Anteil der bei allen Fallentypen gefundenen OTUs war mit 30 % eher klein, bei einem Vergleich von Artnamen waren es jedoch 58 %, die bei allen Typen gefunden (Abbildung 6) wurden. Für gewisse Arten (Wiesenpilze, Rote Liste-Arten) wurden spezielle Referenzdatenbanken zur Artbestimmung verwendet, der überwiegende Teil der OTUs wurde jedoch mit einem automatischen Algorithmus zugewiesen, welcher aufgrund fehlender oder widersprüchlicher Informationen in der Referenzdatenbank keine Art zuweisen konnte, sondern nur auf Gattungs- oder einer höheren taxonomischen Ebene einen Namen definierte. Bei den Basidiomyceten wurden 53 % einer Art zugewiesen, bei den Ascomyceten nur 22 %. Somit ist die Artenzahl vermutlich unterschätzt.

Die Verteilung der taxonomischen Gruppen war zwischen den Fallentypen insgesamt relativ ähnlich, und eine grosse Diversität an Gattungen von häufigen Grosspilzen wurde nachgewiesen (Abbildung 7). Der auffälligste Unterschied war, dass im Regenwasser viele Pilze der Tremellomycetes (insbesondere *Itersonillia pannonica*) dominant waren, während bei den anderen Typen gewisse Gruppen der Dothideomycetes (Pleosporales, Capnodiales) häufig waren.

Die geschätzte Diversität an OTUs und Arten (Shannon-Diversitätsindex) war bei passiven Fallen generell höher als bei den aktiven (Daten nicht gezeigt). Die absolut gefundene Diversität in Metabarcoding-Analysen hängt auch davon ab, wie viele Sequenzen einer Probe generiert wurden («sequencing depth»). Um dies zu untersuchen, wurden zufällig verschiedenen Mengen an Sequenzen aus den Proben ausgewählt, und dann die Anzahl der darin enthaltenen Arten analysiert (engl. *Rarefaction*). Proben mit ähnlichen Sequenzzahlen sind tendenziell besser untereinander vergleichbar. Die Ergebnisse zeigen, dass die passiven Sporenfallen im Vergleich zu den aktiven bei allen Probengrössen am meisten Arten entdeckten, wobei im Regenwasser generell am meisten Arten vorhanden waren (Abbildung 9). Die Proben sind nicht ganz vergleichbar, da die aktiven Sporenfallen nur drei bis vier Tage in Betrieb waren (und nur in Intervallen von 20 min an / 20 min sammelten), während die passiven eine ganze Woche kontinuierlich sammelten. Da die Diversität auch nach vier Tagen noch anzusteigen scheint (Abbildung 8), ist zu erwarten, dass die aktiven Sporenfallen bei längerem Betrieb mehr Pilzdiversität finden würden.

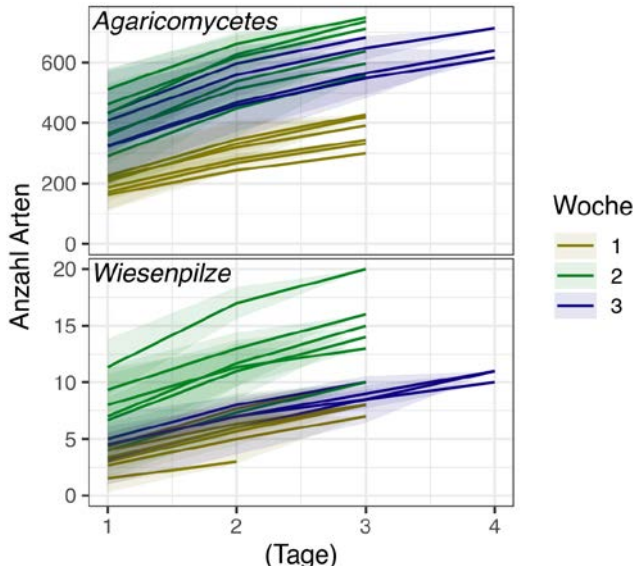

Abbildung 8: Arten-Akkkumulationskurven für die aktiven Sporenfallen über die Tage, an denen jeweils aufeinanderfolgend gesammelt wurde (Dienstag-Freitag, in der dritten Woche zusätzlich noch Sonntag). Die Kurven zeigen die theoretisch errechneten Mittelwerte der möglichen Anzahl Arten, wenn sie über die Tage akkumuliert werden bei unterschiedlichen Anordnungen der Tage (*specaccum* aus dem R-Paket *vegan*). Die Fläche um die Kurven zeigt jeweils die Standardabweichung der verschiedenen Möglichkeiten an. Die Probengrössen wurden zur besseren Vergleichbarkeit auf 30'000 reduziert, und Sporenfallen, bei denen in einer Woche nicht alle Proben so viele Sequenzen hatten, wurden nicht berücksichtigt (betraf die Hälfte der Fallen). Die Artenzahlen sollten entsprechend auch mit der Probengrösse von 30'000 in Abbildung 9 verglichen werden.

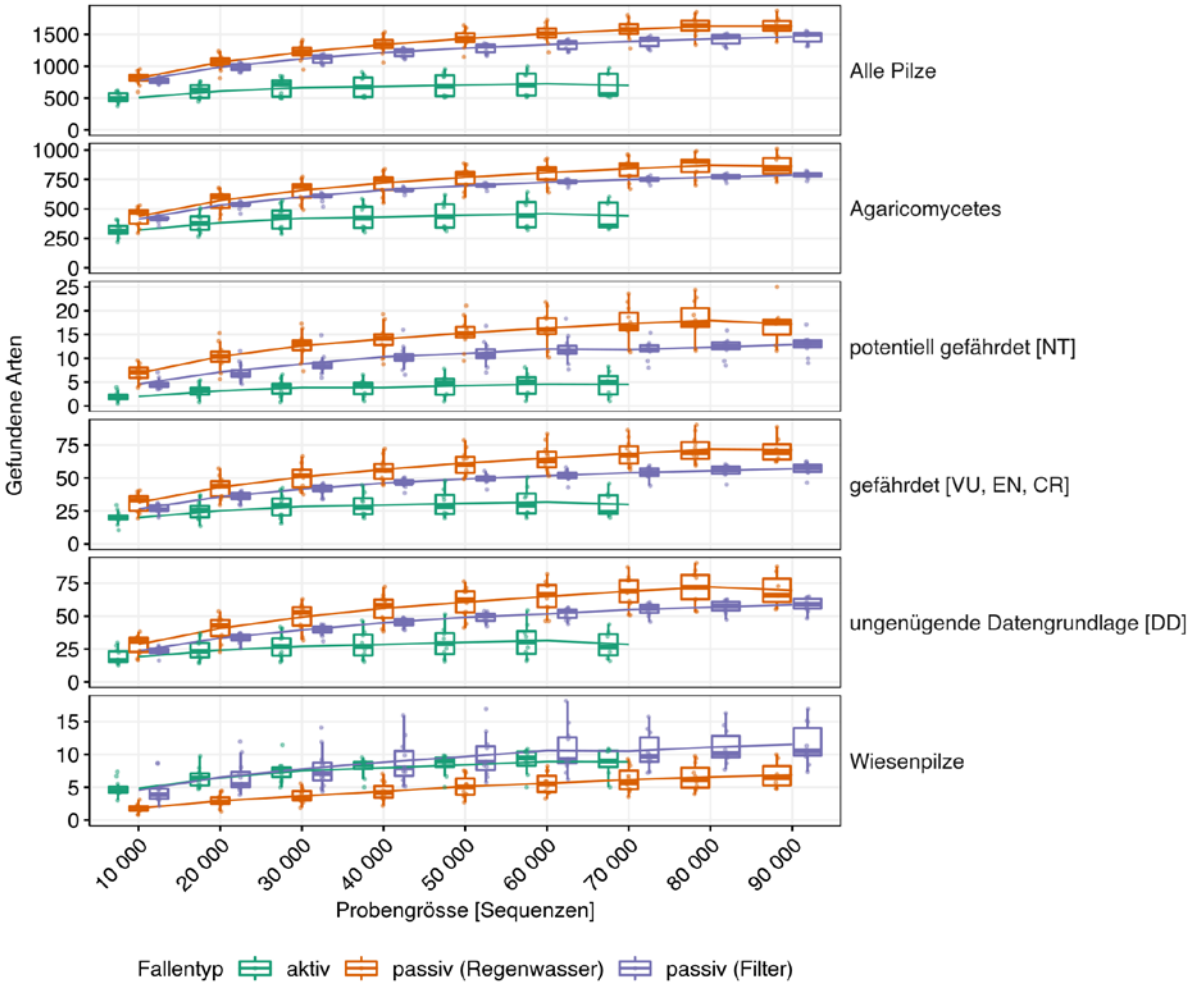

Abbildung 9: Anzahl in den Sporenfallen gefundene Arten in Abhängigkeit der Probengrösse (totale Anzahl Sequenzen). Die Artenzahlen wurden für verschiedene Probengrössen durch wiederholte zufällige Auswahl der Sequenzen ermittelt (einzelne Boxplots mit überlagerten Datenpunkten). Zur Detektion einer Art in einer Probe reichte eine Sequenz aus. Um die Resultate besser vergleichen zu können, wurden bei den aktiven Sporenfallen die drei bis vier Proben derselben Woche zusammengenommen. Die obersten Grafiken zeigen die durchschnittliche Anzahl Pilzarten pro Probe, bzw. die Anzahl Arten aus der Klasse der Agaricomycetes, zu der die meisten Grosspilze gehören. Bei diesen Kategorien wurde die Art zu einem guten Teil durch einen automatischen Algorithmus zugewiesen und kann deshalb ungenau sein. Darunter folgen Grafiken für Arten aus verschiedenen Kategorien der Roten Liste und für die in dieser Studie angeschauten Wiesenpilzgruppen. Eine genauere Aufschlüsselung der Kategorien der Roten Liste ist in Tabelle 3 zu finden.

Während die Proben von passiven Fallen generell relativ viel DNA enthielten und zur Amplifizierung 23-27 PCR-Zyklen ausreichten, war bei den Proben der aktiven Fallen nur sehr wenig DNA vorhanden (44 Zyklen notwendig). Entsprechend scheint bei diesem Fallentyp die Anzahl der entdeckten Arten in Abbildung 9 im Gegensatz zu den passiven Fallen ab einer Probengrösse von ~ 40'000 Sequenzen nicht mehr anzusteigen, was auf eine relativ vollständige Erfassung sämtlicher Arten hindeutet. Viele der Wiesenpilze und Rote Liste-Arten waren ziemlich selten, ihre Häufigkeit in Proben lag zu einem bedeutenden Teil im Bereich von 0.001 - 0.01 % (Abbildung 10), was z.B. bei einer Probengrösse von insgesamt 30'000 Sequenzen im Schnitt nur 0.3 - 3 Sequenzen pro Probe entspricht.

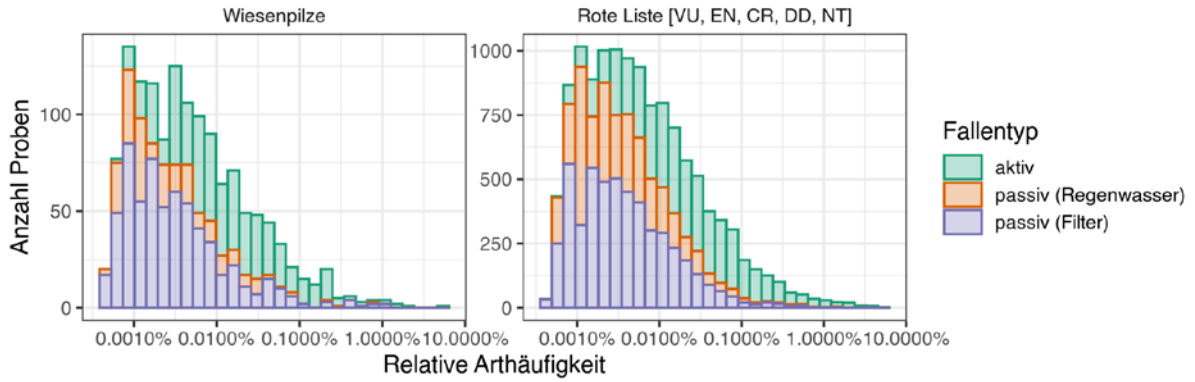

Abbildung 10: Histogramm der prozentualen Sequenz-Häufigkeiten von Wiesenpilz- und Rote Liste-Arten in den Sporenfallen. Die Häufigkeit wurde für jede Probe einzeln bestimmt. Die Balken sind nach Fallentyp gefärbt.

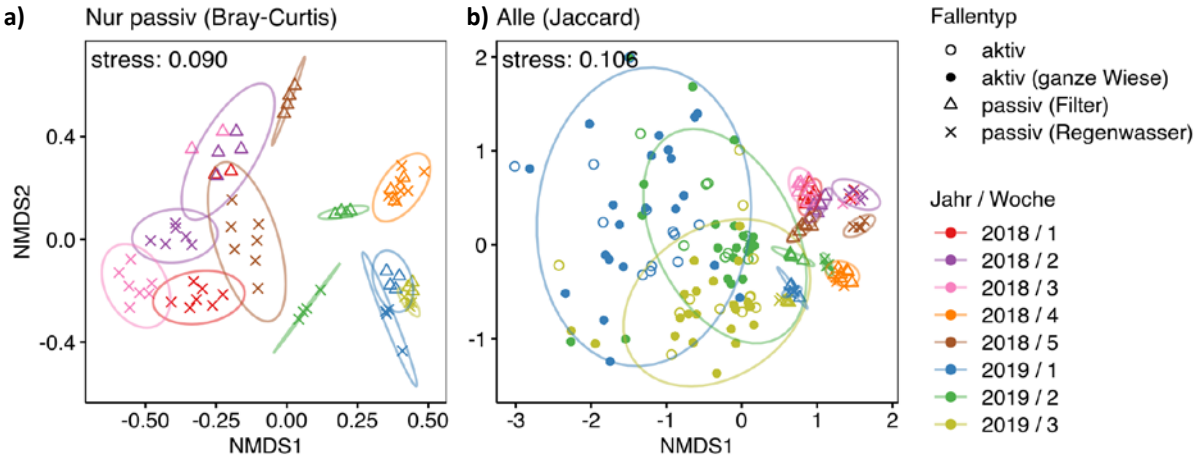

Abbildung 11: Gruppierung der Pilzgemeinschaften in den Sporenfallen nach Ähnlichkeit mittels einer Nonmetrischen Multidimensionalen Skalierung (NMDS). (**a)**: nur passive Sporenfallen mit Verwendung von Bray-Curtis-Distanzen. **(b)** Alle Proben einschliesslich derjenigen von den aktiven Sporenfallen. Bei diesen zeigen die nicht ausgefüllten Punkte Proben an, welche am gleichen Ort wie passive Fallen standen, während an anderen Orten auf der Wiese verteilte Fallen mit ausgefüllten Punkten markiert sind. Bei den aktiven zur Vergleichbarkeit auf gleiche Probengrössen skaliert, da die Normalisierung der Sequenzzahlen bei den aktiven und passiven Proben unterschiedlich war. Ausserdem wurde hier das Jaccard-Distanzmass zum Vergleich der Gemeinschaften benutzt, welches im Gegensatz zu Bray-Curtis nur das Vorhandensein von Arten berücksichtigt, nicht die Sequenzzahlen.

Interessanterweise wurden bei den untersuchten Wiesenpilzarten ein anderes Muster als bei anderen Artgruppen gefunden: die aktiven Sporenfallen detektierten ähnlich viele Arten wie die passiven Filterfallen, während im Regenwasser weniger zu finden waren (Abbildung 9, Tabelle 2).

Eine Gruppierung der Gemeinschaften nach Ähnlichkeit legt nahe, dass sich die Gemeinschaften der aktiven und passiven Sporenfallen generell stärker unterschieden als diejenigen der beiden passiven Fallentypen untereinander (Abbildung 11). Bei Letzteren zeigte sich ein starker zeitlicher Effekt, Proben derselben Woche waren sich generell ähnlich. Bei den aktiven Sporenfallen scheint die Variabilität dagegen viel grösser (Abbildung 11b), was aber zum Teil (aber nicht ausschliesslich) auch damit erklärt werden kann, dass die Fallen über ein grösseres Gebiet verteilt waren. Insbesondere die im Wald platzierte Falle (siehe Abbildung 4) bildete eine eigene Gruppe (nicht gezeigt).

4.3.2 Wiesenpilze

Von den 30 als Fruchtkörper identifizierten Wiesenpilzarten wurden 17 in den Sporenfallen wiedergefunden, wenn auch insgesamt in geringen Mengen (Tabelle 3, Abbildung 10). Von den 13 Arten, die nicht gefunden wurden, waren 11 seltene Saftlinge und Ellerlinge, und nur zwei Arten gehörten zu den Keulenartigen Pilzen (Tabelle 3). Die Fallen fingen zudem Sporen von weiteren, nirgendwo auf dem Feld oder in der Umgebung gefundene Arten ein: *Hygrocybe insipida,* welche als stark gefährdet gilt und ein Saftling (*Hygrocybe* sp. 2), für den es keine näher identifizierbare ITS-Sequenz in den Datenbanken gibt. Weiter wurde bei den Keulenartigen eine grosse Diversität von 13 potentiell neuen oder kryptischen Arten gefunden, welche nicht oder nur als unbestimmte Sequenzen in den Datenbanken erscheinen. Auch in den beiden Fällen, wo zwei Arten morphologisch nicht unterschieden werden konnten, waren die Sporenfallen in der Lage, die einzelnen Arten genau zu identifizieren (siehe Tabelle 3).

Die Detektion von Arten in den Sporenfallen stand in grobem Zusammenhang mit den auf der Wiese gefundenen Pilzen. Um eine Art in allen Sporenfallen zu finden, brauchte es bei einer Probengrösse von 30‘000 Sequenzen mindestens 100 - 500 Fruchtkörper auf der Wiese. Bei sehr seltenen Arten schienen die passiven Filterfallen am besten darin, diese zu finden (Abbildung 12).

4.3.3 Arten der Roten Liste

Knapp die Hälfte (49 %) der 4848 für die Roten Listen der Grosspilze der Schweiz (Senn-Irlet, Bieri, und Egli 2007) evaluierten Arten konnten in den Sporenfallen gesucht werden, da sie in der Sequenzdatenbank UNITE vorhanden waren (Tabelle 2). Dies schliesst auch Arten mit ein, welche nicht als gefährdet gelten oder eine ungenügende Datengrundlage aufwiesen (Stati NT, LC, DD). Unter den total 932 gefährdeten Arten (VU, EN, CR) konnten 57 % in der UNITE Datenbank gefunden werden. Für 148 (15.8 %) dieser gefährdeten Arten wurden ähnliche OTUs gefunden. Es wurden nur OTUs berücksichtigt, die eine Sequenz-Ähnlichkeit von 99 % zur Referenzsequenz der jeweiligen Art in UNITE aufwiesen. Dies ist ein konservatives Vorgehen und führt eher zu einer Unterschätzung der tatsächlichen Anzahl Arten, denn OTUs mit > 1 % Unterschied zur Referenz gehören oft noch zur gleichen Art (siehe z.B. Garnica et al. 2016), würden hier aber nicht detektiert. Umgekehrt können in gewissen Artgruppen die Unterschiede in der ITS-Sequenz auch sehr gering sein (Vu u. a. 2019), solche Arten könnten ungewollt als Rote Liste-Arten erkannt werden, obwohl sie eigentlich unterschiedliche Arten darstellen. Letzteres dürfte aber mit einer Grenze von 99 % Ähnlichkeit deutlich seltener vorkommen.

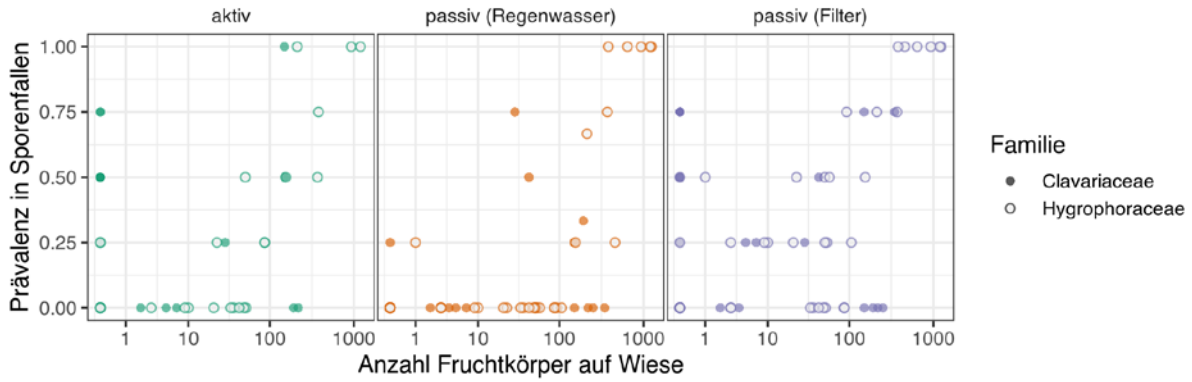

Abbildung 12: Vergleich der Fruchtkörperhäufigkeiten auf der Wiese mit dem Anteil der Sporenfallen-Proben, in welchen die jeweiligen Arten gefunden wurden (Prävalenz). Die Fruchtkörperzahlen stammen von der gesamten Wiese, unabhängig von der Distanz zu den Sporenfallen. Es wurden jedoch nur die aktiven Fallen ausgewählt, die an den gleichen Punkten wie passive Fallen installiert waren (3, 5, 6, 7, siehe Abbildung 1), und die Probengrössen wurden auf 30‘000 Sequenzen reduziert und Proben mit weniger Sequenzen weggelassen.

Tabelle 2: Anzahl Arten verschiedener Kategorien, die in einer Sporenfallenprobe mit 30'000 Sequenzen im Mittel vorhanden waren. Die Zahlen wurden für jeden Sporenfallentyp separat ermittelt (vgl. Beschreibung zu Abbildung 9). Die relativen Angaben in % (jeweils rechte Spalte) beziehen sich auf die Artenzahl in der DNA-Referenzdatenbank in der jeweiligen Kategorie. Die Zahlen in dieser Datenbank wurden wieder in Relation zu den total in der Roten Liste vorhandenen Artenzahlen gesetzt. Für die Wiesenpilze wurde die gesamthafte Zahl der in Fallen und/oder Fruchtkörperaufnahmen gefundenen Arten (Tabelle 3) als Referenz verwendet.

			Arten in DNA-Datenbank		Fallentyp					
							passiv			
	Kategorie	**Arten total**			**aktiv**		**Filter**		**Regenwasser**	
Rote Liste gefährdet	Vom Aussterben bedroht (CR)	82	33	40%	0.8	2.3%	0.7	2.2%	0.6	1.7%
	Stark gefährdet (EN)	356	202	57%	8.0	4.0%	12.0	5.9%	16.0	7.9%
	Verletzlich (VU)	494	293	59%	20.0	6.8%	28.0	9.6%	34.0	11.6%
	total gefährdete	**932**	**528**	**57%**	**28.8**	**5.4%**	**40.7**	**7.7%**	**50.6**	**9.6%**
Rote Liste andere	Potentiell gefährdet (NT)	143	89	62%	3.8	4.3%	8.8	9.9%	13.0	14.6%
	Nicht gefährdet (LC)	1842	1271	69%	190.0	14.9%	280.0	22.0%	310.0	24.4%
	Datengrundlage ungenügend (DD)	1930	536	28%	27.0	5.0%	39.0	7.3%	49.0	9.1%
Untersuchte Wiesenpilze		45	44	98%	7.5	17.0%	7.8	17.7%	3.7	8.4%

Arten der Roten Liste wurden zuverlässig in vielen Proben gefunden, generell waren es im Regenwasser am meisten (Abbildung 9, Tabelle 2). Die Kurven mit den Artenzahlen steigen bei den passiven Sporenfallen sehr lange an, was darauf hindeutet, dass sehr viele Sequenzen pro Probe für eine vollständige Erfassung nötig sind (Abbildung 9). Es konnten auch einige Arten gefunden werden, welche bei der Erarbeitung der Roten Liste noch eine ungenügende Datengrundlage aufwiesen (Tabelle 2). Wenn man das Verhältnis der gefundenen Artenzahl zur gesamten Zahl der in der DNA-Datenbank vorhandenen Sequenzen anschaut, so fällt auf, dass prozentual mehr nicht gefährdete Arten (LC) detektiert wurden (in allen Fallentypen > 14 % aller LC Arten). Bei allen anderen Kategorien lag die Zahl tiefer (Tabelle 2). Insgesamt 51 stark gefährdete (EN), sowie eine vom Aussterben bedrohte Art (CR, *Mycena latifolia*) wurden gefunden. Interessanterweise war letztere jedoch ziemlich häufig in den Sporenfallen zu finden (Abbildung 14). Ein Fehler bei der Identifizierung mittels DNA-Datenbank scheint in diesem Fall unwahrscheinlich, Arten mit sehr ähnlicher ITS-Sequenz sind nicht zu finden.

4.4 Modellierung des Sporenflugs

Um die mögliche Sporenausbreitung anhand der erfassten Fruchtkörper zu berechnen, wurde ein ursprünglich für Samenausbreitung erstelltes Modell verwendet (Katul u. a. 2005), das jedoch auch schon auf Pilze angewendet wurde (Rieux u. a. 2014). Dabei wurden für die drei häufigsten Wiesenpilz-Arten an den Positionen der Sporenfallen die erwarteten Sporenmengen berechnet, um sie dann mit den in den Fallen erfassten Mengen vergleichen zu können.

Es gab eine generelle Übereinstimmung zwischen den berechneten und den gefundenen Sporenmengen, besonders klar bei den passiven Filterfallen (Abbildung 13). Dieses Resultat legt nahe, dass die Zusammensetzung der Pilzsporen in der Luft bis zu einem gewissen Grad direkt auf das Vorkommen der Pilze um die Messstelle herum schliessen lässt. Dieses Modell ist eine erste Annäherung, in Zukunft ist geplant, mehrere Modelle zu vergleichen und die Winddaten von 2019 sowie die Daten von ausserhalb der Schilligsrüti miteinzubeziehen.

Die Daten aus der im Wald platzierten Sporenfalle bestätigen jedoch bereits, dass die Sporenausbreitung der untersuchten Arten mehrheitlich lokal zu erfolgen scheint, es wurden dort praktisch keine Wiesenpilze gefunden (Daten nicht gezeigt).

a)

b)

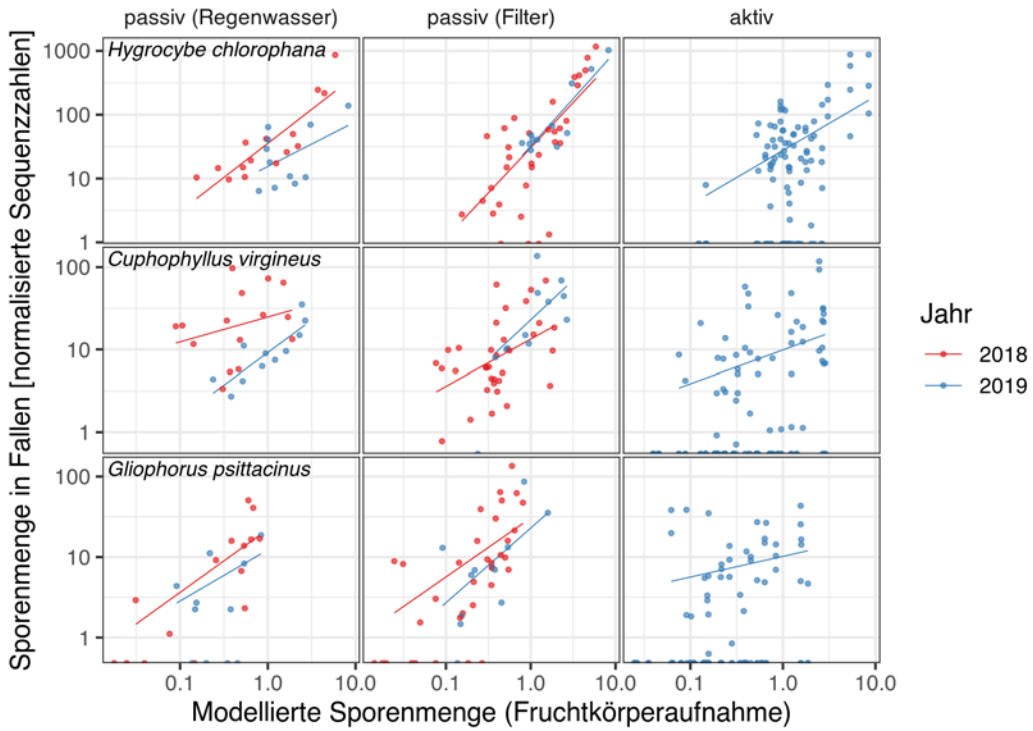

Abbildung 13: Vergleich der erwarteten mit der gefundenen Sporenmenge. **(a)** Illustration der angenommenen Ausbreitungsfunktion, welche beschreibt, wie die Sporenmenge in der Luft mit zunehmender Distanz zur Sporenquelle (Fruchtkörper) abnimmt. Es wurde eine inverse Normalverteilung (WALD, Katul et al. 2005) mit optimierten Parametern benutzt, wobei der höchste Wert hier auf 1 gesetzt wurde. Anhand der Distanzen zwischen den Sporenfallen und den in der jeweiligen Woche gefundenen Fruchtkörpern konnte mit Hilfe dieser Ausbreitungsfunktion die erwartete Sporenzusammensetzung berechnet werden. **(b)** Vergleich der modellierten Sporenmengen [ohne Einheit] mit den tatsächlich in den Fallen gefundenen Mengen für die drei häufigsten Wiesenpilzarten [Anzahl Sequenzen, normalisiert]. Die Punkte am unteren Rand der Grafiken zeigen Proben, in denen die jeweilige Art nicht gefunden wurde. Bei den aktiven Sporenfallen sind die Punkte für jeden Tag einzeln dargestellt. Aufgrund der logarithmischen Skalierung der Achsen können Null-Werte nicht direkt dargestellt werden, sie sind am unteren Rand zu sehen.

5 Diskussion

5.1 Auswahl des Standortes

Die Alp Schilligsrüti eignet sich hervorragend für die Untersuchung von Saftlingen, Ellerlingen und Keulenartigen Wiesenpilzen. Selbst im sehr trockenen Herbst 2018 konnten sehr viele Fruchtkörper und eine hohe Diversität gefunden werden. Wir wurden auf die Wiese aufmerksam, weil von dieser Alp bereits einige Saftlingsarten an SwissFungi gemeldet wurden.

Dadurch, dass auch klare geographische Muster bei der Artverteilung vorhanden waren, war es möglich, die Fruchtkörperhäufigkeiten mit der Sporenzusammensetzung an verschiedenen Standorten in Zusammenhang zu bringen. Nachteilig war, dass die Wiese relativ steil war, was die Aufnahmen der Fruchtkörper anstrengend und aufwändig machte. Zusammen mit ebenfalls vorhandenen lokalen Unebenheiten könnte dies auch die genauere Modellierung des Sporenflugs anhand der Windmessungen erschweren.

Im Rückblick gesehen wäre es auch vorteilhaft gewesen, die höher gelegene Alp Bergrüti südlich der Schilligsrüti miteinzubeziehen, da dort ebenfalls eine hohe Diversität der genannten Wiesenpilze zu finden war. Die einmalige Aufnahme im November 2019 liefert jedoch eine gute Grundlage, um die Verteilung der Pilze in den vorangehenden Wochen und im Herbst 2018 zu schätzen, da sich die Zusammensetzung der Arten im Verlauf des Herbstes nur wenig änderte (Tabelle 3). Zumindest für häufigere Arten, die in der Schilligsrüti einen eindeutigen zeitlichen Trend zeigten, könnten die erwarteten Mengen auch extrapoliert werden.

Dass das umliegende Gebiet teilweise bewaldet ist und an vielen Stellen die Weiden gedüngt werden erwies sich als vorteilhaft für diese Studie, da an diesen Orten das Vorkommen der untersuchten Pilzgruppen als unwahrscheinlich anzusehen ist (Boertmann 2010). So konnte die Verteilung der Pilze im Umkreis von 1-2 Kilometern um die Schilligsrüti mindestens einmal relativ vollständig erfasst werden. Dass die Düngung einen starken negativen Effekt auf viele Wiesenpilze hat, konnte auch in diesem Projekt beobachtet werden. Das untersuchte Feld wird einmal jährlich gedüngt (mit Mist), jedoch nur im Bereich der Strasse, die den unteren und oberen Teil der Wiese trennt. In diesem Bereich wurden sehr wenige Wiesenpilze (sowohl Anzahl Fruchtkörper, wie Arten) gefunden und auch die Vegetation deutete auf Düngung hin.

5.2 Bemerkungen zu den Fruchtkörperaufnahmen

Das gründliche und gezielte Absuchen der Alpwiese durch professionelle Mykologen zeigt in aller Deutlichkeit den Nachteil von punktuellen, durch ehrenamtliche Mitarbeiter erhobene Daten auf. So waren auf dieser äusserst artenreichen und wertvollen Wiese bis vor diesem Projekt erst sieben typische Wiesenpilzarten gemeldet worden. In diesem Projekt konnten nun 30 Arten gefunden werden, darunter 19 Saftlinge und Ellerlingsartige. Das Buch von Boertmann (2010) schlägt vor, dass Saftlingswiesen mit 6-10 Arten einen lokalen, mit 11-15 Arten einen regionalen und ab 16 Arten einen nationalen Naturschutzwert aufweisen. Überträgt man dies auf die Schweiz, weist die Alpwiese auf der Schilligsrüti einen nationalen Naturschutzwert auf. Und tatsächlich sind auf nationaler Ebene nur wenige derart artenreiche Saftlingswiesen bekannt. Trotzdem sind solche für die Pilze sehr wertvollen Lebensräume oft völlig ungeschützt. Ändert der Bewirtschafter sein Düngeregime, z.B. mit einer moderneren Anlage, kann ein solcher Standort innerhalb weniger Jahren vollständig zerstört werden.

Eine weitere Erkenntnis aus den Fruchtkörperaufnahmen ist, dass seltene Wiesenpilze durch professionelle Mykologen zuverlässiger entdeckt werden, als mit den genetischen Methoden. Zudem hat ein während des Projektes durchgeführtes Forschungspraktikum auf dieser Weise gezeigt, dass ein Gebiet mindestens drei bis viermal abgesucht werden muss, um einen Grossteil der Pilze zu erfassen (Daten nicht gezeigt).

5.3 Wie gut werden mit Sporenfallen seltene Arten gefunden?

Es wurde eine sehr grosse Diversität an Pilzen erfasst. Im Vergleich zu häufiger vertretenen und vermutlich aus den umliegenden Wäldern stammenden Grosspilzen der Gattungen *Heterobasidion, Peniophora, Ganoderma, Coprinellus,* etc. waren die Wiesenpilze und Arten der roten Liste meistens nur in sehr kleinen

Mengen zu finden. Um deren volle Diversität zu charakterisieren, mussten sehr viele Sequenzen pro Probe generiert werden. Auf der Wiese sehr seltene Pilze (< 10 - 30 Fruchtkörper) wurden oft in keiner Probe detektiert. Es ist möglich, dass von diesen tatsächlich keine Sporen in den Fallen zu finden waren. Es könnte aber zumindest bei den passiven Sporenfallen auch sein, dass die entsprechenden Sporenmengen so gering waren, dass die Zahl der Sequenzen zur Detektion der Arten nicht ausreichte. Um diese Hypothese zu testen, bzw. das Problem zu umgehen, könnte folgendes helfen: (1) Es könnten Technologien benutzt werden, die mehr Sequenzen generieren, z.B. NovaSeq 6000 von Illumina, (2) die Möglichkeiten für Metabarcoding-Primer, die hauptsächlich Grosspilze erfassen könnten ausgelotet werden, und/oder (3) ausgewählte, seltene Arten könnten per qPCR mit spezifischen Primern quantifiziert werden. Obwohl die gewählte Methodik sicher noch optimiert werden könnte, gehen wir davon aus, dass die Detektion von seltenen Arten mit Sporenfallen immer eine gewissen Schwierigkeit darstellen wird. Man muss bedenken, dass bei diesem Pilotprojekt viele Fallen aufgestellt wurden. Wenn man pro Standort nur 1 Falle aufstellt, wird die Wahrscheinlichkeit, eine seltene Art zu entdecken natürlich entsprechend kleiner.

5.4 Vergleich der Sporenfallentypen

Es wurden drei verschiedene Vorgehensweisen zum Sammeln von Pilzsporen verglichen: (1) Exposition von Glasfaser-Filtern, in welchen sich Sporen verfangen, (2) das Sammeln von Regenwasser über Trichter, und (3) aktive batteriebetriebene Sporenfallen, welche die Luft einsaugen und die Sporen direkt in einem Gefäss deponieren (Emberlin und Baboonian 1995). Die ersten beiden Typen sind passive Sporenfallen. Sie wurden in einer sehr einfachen und kostengünstigen Konstruktion kombiniert, während die aktiven Sporenfallen teurer und aufwändiger zu installieren sind, also auch nicht in unbegrenzter Zahl installiert werden können. Die Handhabung der Proben ist bei diesen Modellen jedoch tendenziell einfacher, sie sammeln automatisch jeden Tag in ein neues Gefäss, und quantitative Analysen werden dadurch ermöglicht, dass die Luft mit 16.5 Litern pro Minute eingesaugt wird, während das Luftvolumen bei den passiven Fallen unbekannt ist. Es ist jedoch unsicher, wie gut das in unserem Fall funktioniert hat, denn es konnte beobachtet werden, dass sich ein Teil der Sporen bereits in der Apparatur ablagerte, bevor sie das Sammelgefäss erreichten, ähnlich wie auch durch Larson et al. (2001) beschrieben. Dass die aktiven Fallen zum Teil eine geringere Diversität erfassten als die passiven, könnte mit einem Pooling von Proben mehrerer Tage ausgeglichen werden. Ob bei den aktiven Sporenfallen ein Pooling von Proben einer ganzen Woche (analog zu den passiven Fallen) eine ähnliche Diversität erfassen würde, müsste weiter untersucht werden.

Die Filterfallen erwiesen sich als sensitive und kostengünstige Alternative bzw. Ergänzung zu den aktiven Sporenfallen. Die Filter konnten für die DNA-Extraktion effektiv zerkleinert werden, ohne dass ein aufwändiges und möglicherweise selektives Abwaschen (Castaño u. a. 2017; Aguayo u. a. 2018; Chen u. a. 2018) notwendig gewesen wäre. Aguayo et al. (2018) vermuteten, dass bei passiven Filterfallen durch Wind und Regen viele eingefangene Sporen wieder verloren gehen. Um den Verlust wenigstens durch Regen zu minimieren, wurde über den Filtern ein Dach platziert, das zumindest bei nicht sehr starkem Wind verhindert, dass die Filter nass werden. Der Aufbau der Fallen könnte weiter vereinfacht werden, so würde es voraussichtlich reichen, statt vier Filtern nur einen zu exponieren.

Wie auch andere Studien (Castaño u. a. 2017; Chen u. a. 2018; Woo u. a. 2018) fanden wir Unterschiede in der taxonomischen Zusammensetzung zwischen Sporenfallen, die Trockendeposition sammeln, und Regenwasser-Fallen. Insgesamt waren wie auch bei Chen u. a. (2018) mehr Basidiomyceten im Regenwasser, was aber hauptsächlich an der grösseren Menge an Pilzen der Tremellomycetes lag. Interessanterweise fand eine koreanische Studie, dass diese Gruppe umgekehrt in der Trockendeposition häufiger war (Woo u. a. 2018).

Die Analyse des Regenwassers ergab den grösseren Artenreichtum als die Fallentypen, die trocken sammelten, ähnlich wie von Woo u. a. (2018) beobachtet. Eine Ausnahme bildeten die in diesem Projekt untersuchten Wiesenpilze, hier schnitt die Methode am schlechtesten ab. Ein ähnliches Muster findet man bei anderen Wiesenpilzen (nicht gezeigt). Eine plausible Erklärung dafür wäre, dass das Regenwasser tendenziell mehr Pilzsporen aus höheren Luftschichten enthält, die von weiter her transportiert wurden. Eine neuere Studie aus Spanien kommt zum gleichen Schluss (Castaño u. a. 2019). Für die Aufnahme von lokal

vorkommenden Pilzen, ist diese Falle daher weniger geeignet. Zudem ist diese Sammelmethode von der Menge an Regen abhängig, im trockenen Herbst 2018 konnte sie wenig Informationen liefern.

5.5 Wie weit fliegen Pilzsporen?

Eine im Zusammenhang mit Biodiversitätsmonitoring wichtige Frage ist, wo der Ursprung der Sporen liegen könnte, welche durch die Fallen gefunden werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass räumliche geographische Muster, bei der die Artzusammensetzung von Pilzsporen in der Luft existieren, Unterschiede wurden sowohl auf grösseren Skalen (hunderte von Kilometern, Abrego u. a. 2018) als auch kleinräumig (Adams u. a. 2013; Peay und Bruns 2014) gefunden. Es konnte auch nachgewiesen werden, dass Änderungen in der Häufigkeit von Pilzfruchtkörpern mit in Sporenfallen gefundenen Mustern übereinstimmten (Castaño u. a. 2017). Sporen können über sehr weite Distanzen transportiert werden, Untersuchungen von einzelnen Pilzarten ergaben aber, dass die überwiegende Mehrheit der Sporen innerhalb von wenigen hundert Metern deponiert wurde (Norros u. a. 2012; Golan und Pringle 2017). Auf kleinster Skala konnte wiederum gezeigt werden, dass 95 % der Sporen von verschiedenen Ektomykorrhizapilzen weniger als einen Meter weit verbreitet wurden (Galante, Horton, und Swaney 2011). Die Grösse und Form der Sporen spielt auch eine Rolle, kleinere Sporen fliegen tendenziell weiter als grosse (Norros u. a. 2014). Die vorliegende Untersuchung lässt annehmen, dass bei den untersuchten Wiesenpilzen der überwiegende Teil der Sporen innerhalb von weniger als 100 m deponiert wurde (Abbildung 12, 13). Es müssen jedoch noch weitere Modelle getestet werden, und durch den Einbezug von Winddaten und möglicherweise weiteren Wetterdaten, sowie Verbreitungsdaten von ausserhalb der Schilligsrüti erhoffen wir uns noch ein genaueres Bild über den Sporenflug.

Ein weiteres Indiz dafür, dass vor allem lokal vertretene Pilze in den Sporenfallen zu finden sind, erhält man durch den Vergleich von detektierten Arten der Gattung *Hygrocybe* zwischen Sporenfallen und Fruchtkörperaufnahmen. Die beiden Aufnahmemethoden decken sich zu einem grossen Teil. Arten, die ausschliesslich auf benachbarten Wiesen gefunden wurden (z.B. *Hygrocybe punicea*) wurden mit Sporenfallen nicht detektiert. Gleichzeitig wurden nur zwei zusätzliche *Hygrocybe* Arten in den Sporenfallen nachgewiesen, die in den Fruchtkörperaufnahmen nicht gefunden wurden. Eine dieser Arten dürfte eine bisher unbeschriebene, also eine neue *Hygroybe* Art sein, die andere Art (*H. insipida*) ist klein, nicht einfach zu bestimmen und dürfte bei den Fruchtkörperaufnahmen übersehen worden sein. Ganz ausschliessen kann man den Einflug von Sporen aus entfernteren Gebieten aber nicht und dies wird auch in Zukunft nicht möglich sein.

5.6 Möglicher Einsatz von Sporenfallen für die Revision der Roten Liste der Schweiz

Alle Fallentypen waren in der Lage, eine hohe Diversität an Pilzarten zu erfassen. Längere Sammelperioden (Wochen statt Tage) scheinen dafür besser geeignet, was eher für die passiven Modelle sprechen würde. Die aktiven Sporenfallen sind ideal, um kurzfristige Fluktuationen zu erforschen, da sie jeden Tag in ein anderes Gefäss sammeln. Werden diese kombiniert, könnte man aber ebenfalls Daten für eine ganze Woche erhalten. Zumindest für die lokalen Wiesenpilze war die erfasste Diversität sogar schon nach drei bis vier Tagen ähnlich wie bei den passiven Filterfallen. Regenwasser-Fallen wiederum scheinen eher dazu geeignet, über weitere Distanzen verbreitete Arten zu erfassen. Wie hoch die jeweiligen Anteile an «lokalen» und von weiter her kommenden Arten sind, ist anhand der vorliegenden Daten schwierig zu ermitteln und dies wird auch in zukünftigen Studien schwierig sein. Falls in Zukunft ein reines Sporenmonitoring aufgezogen werden soll, muss man dies berücksichtigen.

Die Sporenfallen erfassten insbesondere auch viele Waldarten, welche vermutlich aus den angrenzenden Wäldern stammen. Obwohl seltene (Wiesen-)Pilzarten mässig gut detektiert werden konnten (siehe oben), wurden insgesamt 148 Rote Liste Arten gefunden. Mit einer Referenzdatenbank, die alle Rote Liste-Arten abdecken würde, läge die Zahl wahrscheinlich noch deutlich höher, extrapoliert bei ca. 30 % aller Rote Liste Arten. In einer durchschnittlichen Probe wären es auf Grundlage der Zahlen in Tabelle 2 13 - 21 %. Dies sind wohlgemerkt Schätzungen, der genaue Anteil könnte höher liegen, falls gewisse Arten mit > 1 %

Sequenzvariabilität nicht erfasst wurden, aber auch tiefer, wenn mehrere nah verwandte Arten eine sehr ähnliche ITS-Sequenz haben.

Zudem könnte man die Detektion von seltenen Arten noch optimieren (siehe Kapitel 4.2.), indem man z.B. den Anteil der generierten Sequenzen auf eine bestimmte Pilzgruppe optimiert und andere Gruppen ausschliesst (z.B. Gruppen, die in einer Rote Liste nicht evaluiert werden sollen). So oder so erhält man Informationen über sehr viele andere Arten, die nicht auf der Roten Liste stehen, aber dafür evaluiert wurden (Stati NT, LC, DD) und sogar für nicht evaluierte Arten (Status NE). Die Breite des detektierbaren Artspektrums an Pilzen kann mit Feldmykologen an einem Standort kaum oder nur durch sehr aufwändige Aufnahmen erreicht werden. Das Vorhandensein, respektive Fehlen von Spezialisten für solche Aufnahmen würde Feldaufnahmen zusätzlich verkomplizieren.

Ein weiterer wichtiger Baustein beim Monitoring über Sporenfallen ist die verlässliche Identifizierung über DNA-Datenbanken. Das im Zuge dieses Projektes durchgeführte Barcoding von Grosspilzen war bereits sehr hilfreich, um Wiesenpilze verlässlich identifizieren zu können. Die Integration weiterer Referenz-Sequenzen von Rote Liste-Arten, inklusive aller bei der Erstellung der Roten Liste durch Senn-Irlet, Bieri, und Egli (2007) evaluierten Arten, in die Analysen, würde auch dort mehr Sicherheit bei der Qualität der Art-Identifikation bieten.

6 Literatur

Abarenkov, Kessy, Zirk Allan, Piirmann Timo, Pöhönen, Raivo, Ivanov, Filipp, Nilsson, Henrik R., und Kõljalg, Urmas. 2020. «UNITE QIIME release for eukaryotes 2». UNITE Community. https://dx.doi.org/10.15156/BIO/786388.

Abrego, Nerea, Veera Norros, Panu Halme, Panu Somervuo, Heini Ali-Kovero, und Otso Ovaskainen. 2018. «Give Me a Sample of Air and I Will Tell Which Species Are Found from Your Region: Molecular Identification of Fungi from Airborne Spore Samples». *Molecular Ecology Resources* 18 (3): 511–24. https://doi.org/10.1111/1755-0998.12755.

Adams, Rachel I., Marzia Miletto, John W. Taylor, und Thomas D. Bruns. 2013. «Dispersal in Microbes: Fungi in Indoor Air Are Dominated by Outdoor Air and Show Dispersal Limitation at Short Distances». *The ISME Journal* 7 (7): 1262–73. https://doi.org/10.1038/ismej.2013.28.

Aguayo, Jaime, Céline Fourrier-Jeandel, Claude Husson, und Renaud Ioos. 2018. «Assessment of Passive Traps Combined with High-Throughput Sequencing To Study Airborne Fungal Communities». Herausgegeben von Emma R. Master. *Applied and Environmental Microbiology* 84 (11). https://doi.org/10.1128/AEM.02637-17.

Boertmann, David. 2010. *The genus Hygrocybe*. 2. revised edition. Bd. 1. 1. The Danish Mycological Society.

Castaño, Carles, José Antonio Bonet, Jonàs Oliva, Gemma Farré, Juan Martínez de Aragón, Javier Parladé, Joan Pera, und Josu G. Alday. 2019. «Rainfall Homogenizes While Fruiting Increases Diversity of Spore Deposition in Mediterranean Conditions». *Fungal Ecology* 41 (Oktober): 279–88. https://doi.org/10/ggxg9t.

Castaño, Carles, Jonàs Oliva, Juan Martínez de Aragón, Josu G. Alday, Javier Parladé, Joan Pera, und José Antonio Bonet. 2017. «Mushroom Emergence Detected by Combining Spore Trapping with Molecular Techniques». Herausgegeben von Emma R. Master. *Applied and Environmental Microbiology* 83 (13). https://doi.org/10.1128/AEM.00600-17.

Chen, Wen, Sarah Hambleton, Keith A. Seifert, Odile Carisse, Moussa S. Diarra, Rick D. Peters, Christine Lowe, Julie T. Chapados, und C. André Lévesque. 2018. «Assessing Performance of Spore Samplers in Monitoring Aeromycobiota and Fungal Plant Pathogen Diversity in Canada». Herausgegeben von Frank E. Löffler. *Applied and Environmental Microbiology* 84 (9). https://doi.org/10.1128/AEM.02601-17.

Edgar, R. 2016. «UNOISE2: Improved Error-Correction for Illumina 16S and ITS Amplicon Sequencing». Preprint. Bioinformatics. https://doi.org/10.1101/081257.

Edgar, Robert. 2016. «SINTAX: A Simple Non-Bayesian Taxonomy Classifier for 16S and ITS Sequences». *BioRxiv*, September. https://doi.org/10.1101/074161.

Emberlin, J., und C. Baboonian. 1995. «The development of a new method of sampling airborne particles for immunological analysis». In *Proceedings, XVI European Congress of Allergology and Clinical Immunology*, 24–25.

Galante, Tera E., Thomas R. Horton, und Dennis P. Swaney. 2011. «95% of basidiospores fall within 1 m of the cap: a field-and modeling-based study». *Mycologia* 103 (6): 1175–83. https://doi.org/10.3852/10-388.

Gardes, M., und T. D. Bruns. 1993. «ITS Primers with Enhanced Specificity for Basidiomycetes - Application to the Identification of Mycorrhizae and Rusts». *Molecular Ecology* 2 (2): 113–18. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.1993.tb00005.x.

Garnica, Sigisfredo, Max Emil Schön, Kessy Abarenkov, Kai Riess, Kare Liimatainen, Tuula Niskanen, Bálint Dima, u. a. 2016. «Determining Threshold Values for Barcoding Fungi: Lessons from Cortinarius (Basidiomycota), a Highly Diverse and Widespread Ectomycorrhizal Genus». *FEMS Microbiology Ecology* 92 (4). https://doi.org/10/f8n9m6.

Golan, Jacob J., und Anne Pringle. 2017. «Long-Distance Dispersal of Fungi». *Microbiology Spectrum* 5 (4). https://doi.org/10/ggtb5p.

Katul, G. G., A. Porporato, R. Nathan, M. Siqueira, M. B. Soons, D. Poggi, H. S. Horn, und S. A. Levin. 2005. «Mechanistic Analytical Models for Long-Distance Seed Dispersal by Wind.» *The American Naturalist* 166 (3): 368–81. https://doi.org/10/fhr49b.

Larson, Carrie, Leonard J. Francl, und Timothy Friesen. 2001. «Evaluation of the Burkard Cyclonic Spore Sampler for Collection Efficiency of Ascospores». *Plant Disease* 85 (12): 1249–52. https://doi.org/10/dqw765.

McMurdie, Paul J., und Susan Holmes. 2013. «Phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data». *PLOS ONE* 8 (4): e61217. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061217.

Norros, Veera, Reijo Penttilä, Mai Suominen, und Otso Ovaskainen. 2012. «Dispersal May Limit the Occurrence of Specialist Wood Decay Fungi Already at Small Spatial Scales». *Oikos* 121 (6): 961–74. https://doi.org/10/f32fnz.

Norros, Veera, Üllar Rannik, Tareq Hussein, Tuukka Petäjä, Timo Vesala, und Otso Ovaskainen. 2014. «Do Small Spores Disperse Further than Large Spores?» *Ecology* 95 (6): 1612–21. https://doi.org/10.1890/13-0877.1.

Oksanen, Jari, F. Guillaume Blanchet, Michael Friendly, Roeland Kindt, Pierre Legendre, Dan McGlinn, Peter R. Minchin, u. a. 2019. *vegan: Community ecology package*. https://CRAN.R-project.org/package=vegan.

Ondov, Brian D., Nicholas H. Bergman, und Adam M. Phillippy. 2011. «Interactive metagenomic visualization in a Web browser». *BMC Bioinformatics* 12 (1): 385. https://doi.org/10/d7zpbn.

Ovaskainen, Otso, Nerea Abrego, Panu Somervuo, Isabella Palorinne, Bess Hardwick, Juha-Matti Pitkänen, Nigel R. Andrew, u. a. 2020. «Monitoring Fungal Communities With the Global Spore Sampling Project». *Frontiers in Ecology and Evolution* 7. https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00511.

Palmer, Jonathan M., Michelle A. Jusino, Mark T. Banik, und Daniel L. Lindner. 2018. «Non-Biological Synthetic Spike-in Controls and the AMPtk Software Pipeline Improve Mycobiome Data». *PeerJ* 6 (Mai): e4925. https://doi.org/10.7717/peerj.4925.

Peay, Kabir G., und Thomas D. Bruns. 2014. «Spore Dispersal of Basidiomycete Fungi at the Landscape Scale Is Driven by Stochastic and Deterministic Processes and Generates Variability in Plant-Fungal Interactions». *New Phytologist* 204 (1): 180–91. https://doi.org/10.1111/nph.12906.

R Core Team. 2020. *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria. https://www.R-project.org/.

Rieux, Adrien, Samuel Soubeyrand, François Bonnot, Etienne K. Klein, Josue E. Ngando, Andreas Mehl, Virginie Ravigne, Jean Carlier, und Luc de Lapeyre de Bellaire. 2014. «Long-Distance Wind-Dispersal of Spores in a Fungal Plant Pathogen: Estimation of Anisotropic Dispersal Kernels from an Extensive Field Experiment». Herausgegeben von Richard A. Wilson. *PLoS ONE* 9 (8): e103225. https://doi.org/10/f6rb3t.

Senn-Irlet, B., G. Bieri, und S. Egli. 2007. «Rote Liste Grosspilze. Rote Liste der gefährdeten Arten der Schweiz, Ausgabe 2007». *Herausgegeben vom Bundesamt für Umwelt BAFU und der Eidgenössischen Forschungsanstalt für Wald, Schnee und Landschaft WSL, Bern*.

Toju, Hirokazu, Akifumi S. Tanabe, Satoshi Yamamoto, und Hirotoshi Sato. 2012. «High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in environmental samples». *PLoS ONE* 7 (7): e40863. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040863.

Vu, D., M. Groenewald, M. de Vries, T. Gehrmann, B. Stielow, U. Eberhardt, A. Al-Hatmi, u. a. 2019. «Large-Scale Generation and Analysis of Filamentous Fungal DNA Barcodes Boosts Coverage for Kingdom Fungi and Reveals Thresholds for Fungal Species and Higher Taxon Delimitation». *Studies in Mycology* 92 (März): 135–54. https://doi.org/10.1016/j.simyco.2018.05.001.

White, Thomas J., T. Bruns, SJWT Lee, J. W. Taylor, und others. 1990. «Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics». *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18: 315–322. http://msafungi.org/wp-content/uploads/Inoculum/64(1).pdf.

Woo, Cheolwoon, Choa An, Siyu Xu, Seung-Muk Yi, und Naomichi Yamamoto. 2018. «Taxonomic Diversity of Fungi Deposited from the Atmosphere». *The ISME Journal* 12 (8): 2051–60. https://doi.org/10/gd4ng5.

7 Anhang

Tabelle 3: Häufigkeit der ausgewählten Wiesenpilzarten bei den Fruchtkörperuntersuchungen (Anzahl Fruchtkörper, nach Woche) und in den Sporenfallen (Mittlere Anzahl Sequenzen pro Probe nach Fallentyp). Arten mit einem grünen Hintergrund wurden mit beiden Untersuchungsmethoden gefunden, während ein blauer bzw. grauer Hintergrund Arten markiert, die nur als Fruchtkörper, bzw. nur in den Sporenfallen gefunden wurden. Bei den Sequenzzahlen wurde eine Probengrösse von 30'000 Sequenzen angenommen. Sequenzzahlen < 1 wurden rot markiert und solche < 0.1 grau. Es gilt zu bedenken, dass dies Durchschnittswerte über die ganze Wiese sind, in einzelnen Proben wurden durchaus mehr Sequenzen gefunden. Leere Zellen bedeuten, dass für die entsprechende Art keine Sequenzen oder Fruchtkörper gefunden wurden. Die lateinischen Namen wurden nach speciesfungorum.org gewählt, die deutschen Namen basieren auf der Datenbank von SwissFungi.

				Fruchtkörper 2018					Fruchtkörper 2019				Sporenfallen gesamt [mittlere # Sequenzen]		
Familie	**Lateinischer Name**	**Deutscher Name**	**Rote Liste - Status**	**W1**	**W2**	**W3**	**W4**	**W5**	**W1**	**W2**	**W3**	**W4[1]**	**aktiv**	**passiv Glasf.**	**passiv Regen**
Hygrophoraceae	*Hygrocybe chlorophana*	Stumpfer Saftling	LC	267	233	143	190	104	932	1236	1196	224	53.07	44.07	20.87
Hygrophoraceae	*Cuphophyllus virgineus*	Weisser Ellerling	VU	170	196	163	145	74	371	643	381	1709	6.24	4.47	4.69
Hygrophoraceae	*Gliophorus psittacinus*	Papageigrüner Saftling	LC	22	16	31	35	25	155	458	213	151	3.63	4.12	1.90
Clavariaceae	*Ramariopsis laeticolor/helvola*	Schöne/Goldgelbe Wiesenkeule	LC/NT	1	9	4	17	11	150	346	151	7	2.45	1.07	0.26
Clavariaceae	*Clavulinopsis fusiformis*	Spindelförmige Wiesenkeule	VU	4	7	5	7	7	219	252	193	265	0.22	0.05	0.04
Hygrophoraceae	*Cuphophyllus pratensis*	Wiesenellerling	LC	3	7		5	2	23	54	49	171	1.32	0.28	0.21
Hygrophoraceae	*Hygrocybe glutinipes*	Schleimfuss-Saftling	LC	4	4	4	15		87	51	9		0.14	1.14	0.31
Hygrophoraceae	*Hygrocybe coccinea*	Kirschroter Saftling	LC	1	3	12		1	37	93	87	41	1.28	0.19	0.14
Hygrophoraceae	*Gliophorus laetus*	Zäher Saftling	VU		1	2	2	1	52	58	34	19	0.47	0.21	0.08
Clavariaceae	*Clavaria acuta/ falcata*	Weisse Keule		2	1	1		1	29	43	7		0.37	1.49	1.06
Clavariaceae	*Clavaria zollingeri*	Amethystfarbene Koralle	EN	1	1	1	1	1	5	4	2		0.93	0.11	0.07
Hygrophoraceae	*Porpolomopsis calyptriformis*	Rosenroter Saftling	CR	10	5	10	7		10	6	4				
Hygrophoraceae	*Hygrocybe conica*	Kegeliger Saftling	LC	18	16	2			10	1	3		0.09	0.76	0.60
Hygrophoraceae	*Hygrocybe citrinovirens*	Kleinhütiger Saftling	NT	8	3	6	4		21	3				0.15	0.04
Hygrophoraceae	*Hygrocybe splendidissima*	Prächtiger Saftling							51	106	43	67	2.34	0.14	0.10
Clavariaceae	*Clavulinopsis* sp.	Wiesenkeulen (nicht näher bestimmt)		1		14	24	12	1			1	(k. A.)	(k. A.)	(k. A.)
Hygrophoraceae	*Hygrocybe* sp.	Saftlinge (nicht näher bestimmt)							11	1	3	19	(k. A.)	(k. A.)	(k. A.)
Hygrophoraceae	*Hygrocybe reidii*	Honig-Saftling	VU						29	20	4	17			
Clavariaceae	*Clavaria fragilis*	Wurmförmige Keule	LC						11	2	11				
Clavariaceae	*Clavaria* sp. 2												0.81	0.24	0.31
Clavariaceae	*Clavulinopsis aff. luteonana*	(verwandt mit C. luteonana)											1.23	0.16	0.01
Clavariaceae	*Clavulinopsis luteoalba*	Gelbweisse Keule	EN										0.59	0.07	0.02
Clavariaceae	*Clavulinopsis* sp. 1	(Wiesenkeule)											0.22	0.21	0.01
Clavariaceae	*Clavulinopsis* sp. 2	(Wiesenkeule)											0.15	0.02	0.01
Clavariaceae	*Clavulinopsis* sp. 3	(Wiesenkeule)											0.09	0.04	0.01

Familie	Lateinischer Name	Deutscher Name	Rote Liste - Status	Fruchtkörper 2018					Fruchtkörper 2019				Sporenfallen gesamt [mittlere # Sequenzen]		
				W1	W2	W3	W4	W5	W1	W2	W3	W4[1]	aktiv	passiv Glasf.	passiv Regen
Clavariaceae	*Ramariopsis* aff. *subumbrinella 1*[2]												1.87	0.59	0.19
Clavariaceae	*Ramariopsis* aff. *subumbrinella 2*[2]												2.90	0.91	0.27
Clavariaceae	*Ramariopsis crocea*	Safrangelbe Wiesenkoralle	LC										0.13	0.03	0.02
Clavariaceae	*Ramariopsis subumbrinella*[2]												0.96	0.21	0.09
Hygrophoraceae	*Hygrocybe cantharellus*	Trichterförmiger Saftling	LC						10	14	2				
Hygrophoraceae	*Hygrocybe ingrata*	Rötender Nitrat-Saftling	EN							3				0.86	0.15
Hygrophoraceae	*Hygrocybe insipida*	Schmalsporiger Saftling	EN										0.03	0.94	0.01
Hygrophoraceae	*Hygrocybe* sp. 2[3]												0.10	0.28	0.12
Clavariaceae	*Clavaria* sp. 1	(Keule)												0.13	0.03
Clavariaceae	*Clavulinopsis* sp. w1 38[4]								4				0.09	0.02	
Hygrophoraceae	*Gliophorus irrigatus*	Grauer Schleim-Saftling	LC						9	2					
Hygrophoraceae	*Hygrocybe punicea*	Rotkegeliger Saftling	VU									12	0.70		0.01
Clavariaceae	*Clavulinopsis* sp. 4	(Wiesenkeule)											0.08	0.01	
Clavariaceae	*Clavaria* sp. 3	(Keule)												0.08	
Clavariaceae	*Ramariopsis corniculata*									1					
Clavariaceae	*Ramariopsis kunzei*	Weissliche Wiesenkeule	DD						2						
Hygrophoraceae	*Cuphophyllus fornicatus*	Blassrandiger Saftling	VU						1						
Hygrophoraceae	*Hygrocybe aurantiosplendens*[5]										1		(k. A.)	(k. A.)	(k. A.)
Hygrophoraceae	*Cuphophyllus flavipes*	Gelbfüssiger Ellerling	VU						6						
Hygrophoraceae	*Hygrocybe nitrata*	Nichtrötender Nitrat-Saftling	VU	8	2										
Hygrophoraceae	*Cuphophyllus lacmus*	Violettgrauer Ellerling	VU									5			
Hygrophoraceae	*Hygrocybe phaeococcinea*	Dunkelroter Saftling		1											

[1] In «Woche 4» (07. - 11.11.2019) wurden nur Fruchtkörper auf umliegenden Wiesen gesucht, die Zahlen beziehen sich also auf andere Flächen. Durch Windverfrachtung können aber durchaus Sporen von umliegenden Wiesen in die Fallen gelangt sein

[2] *Clavulinopsis subumbrinella* ist eine Art / Artengruppe ohne nachgewiesene Funde in der Schweiz

. Es ist möglich, dass die Art identisch mit einer bisher nicht sequenzierten Art ist. Referenzsequenzen: UDB036605, UDB036677 aus der Datenbank UNITE

[3] Art unsicher, entspricht der Sequenz mit Accession EU784310 auf GenBank, welche mit *Hygrocybe glutinipes* bezeichnet wird, die Sequenz besitzt jedoch keinerlei Ähnlichkeit mit *H. glutinipes* oder anderen häufiger sequenzierten Arten auf GenBank

[4] Diese Wiesenkoralle ähnelt *Ramariopsis helvola*, die ITS-Sequenz zeigt jedoch keine Ähnlichkeit zu bereits publizierten Sequenzen (bester BLAST-Hit: 90%; KX115896)

[5] Keine gute Referenzsequenz, mehrere nicht verwandte Einträge existieren in GenBank und UNITE, klare Gruppierung nicht ersichtlich

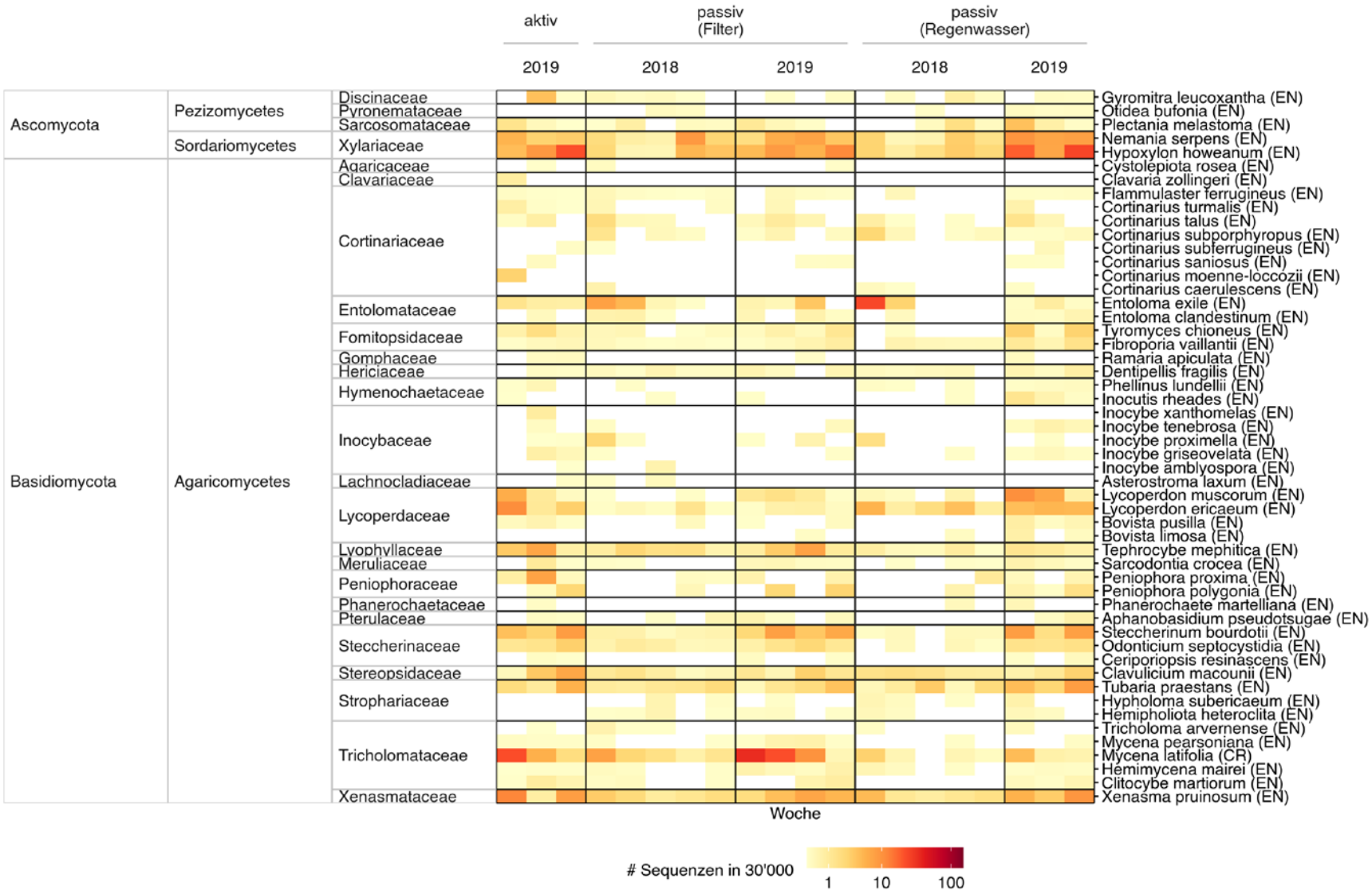

Abbildung 14: Vorkommen von Arten in den Sporenfallen, die in der Roten Liste als stark gefährdet (EN) und vom Aussterben bedroht (CR) eingestuft sind. Die Zellen sind nach Menge (durchschnittliche Anzahl Sequenzen) gefärbt, analog zu Tabelle 3 wurde eine Probengrösse von 30'000 Sequenzen als Referenz genommen. Bei den Regenwasser-Daten ist zu bedenken, dass 2018 nur in der vierten Woche Regen fiel (Abbildung 3), ansonsten handelt es sich um Trockendeposition auf dem Trichter.