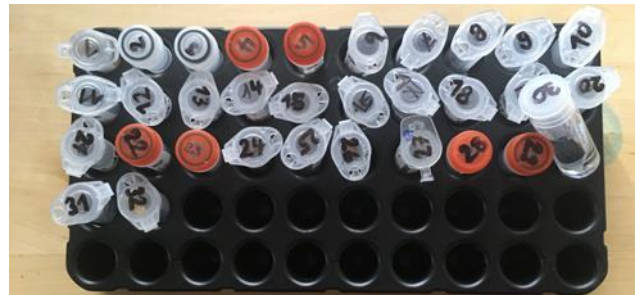




STADTÖKOLOGIE
WILDTIERFORSCHUNG
KOMMUNIKATION

Prüfung neuer Methoden zum Nachweis gefährdeter Kleinsäugerarten in der Schweiz

Aufbau genetische Referenzdatenbank Kleinsäuger 2020



Schlussbericht, V1, November 2020

SWILD – Stadtökologie, Wildtierforschung, Kommunikation

Im Auftrag des Bundesamtes für Umwelt BAFU

Impressum

Projektleitung: Adrian Dietrich, MSc. in Wildlife Ecology and Wildlife Management
Fabio Bontadina, Dr. phil.-nat., Wildtierbiologe SVU

Kontakt: Fabio Bontadina
SWILD – Stadtökologie, Wildtierforschung, Kommunikation

Wuhrstrasse 12, 8003 Zürich
Telefon 044-450 68 05, fabio.bontadina@swild.ch
www.swild.ch

Mitarbeit: Kathi Märki (Lebendfang, Sammlung Kotproben, Bericht)
Anouk Taucher (Literaturrecherche, Wasserproben)
Julia Schmid (Sammlung Kotproben, Wasserproben)
Lara Schaufelberger (Sammlung Kotproben)

Zusammenarbeit: Microsynth (Dr. Christoph Grünig)
Faune Concept (Schweizer Expertengruppe Kleinsäuger)
SwissBOL – Swiss Barcode of Life (Dr. Sofia Wyler)

Dank: Die folgenden Organisationen haben für das Projekt Gewebeproben zur Verfügung gestellt und somit den Aufbau der Referenzdatenbank ermöglicht:
Naturmuseum Solothurn (Dr. Tom Briner)
Bündner Naturmuseum (Dr. Jürg-Paul Müller)
Zürcher Hochschule für Angewandte Wissenschaften ZHAW
(Marilena Palmisano, Martina Reifler-Bächtiger)
Museo cantonale di storia naturale (Nicola Zambelli)
Naturmuseum St. Gallen (Lorenzo Vinciguerra)
Naturmuseum Südtirol (Eva Ladurner)
Universität Zürich (Glauco Camenisch)



STADTÖKOLOGIE
WILDTIERFORSCHUNG
KOMMUNIKATION

Zitat: SWILD. 2020. Prüfung neuer Methoden zum Nachweis gefährdeter Kleinsäugerarten in der Schweiz. Aufbau genetische Referenzdatenbank Kleinsäuger 2020. Schlussbericht V1, SWILD Zürich im Auftrag vom BAFU, Bern, 32 Seiten.

Inhaltsverzeichnis

1. Feldmethoden zur nicht-invasiven Sammlung von Kleinsäuger-DNA	5
1.1. Evaluation von möglichen Feldmethoden	5
1.2. Adaption und Testen der Methoden für Spitzmäuse	5
1.2.1. Methode zur Sammlung von Haarproben	5
1.2.2. Kotröhrchen zum Nachweis von Kleinsäufern	6
1.2.3. Entnahme von Wasserproben	8
2. Genetische Analyse der gesammelten Proben	10
2.1. Suche eines geeigneten Locus für die Analyse der nicht-invasiven Proben	10
2.2. Aufbau Referenzdatenbank für genetische Bestimmung von Kleinsäufern	10
2.3. Analyse der gesammelten Kotproben mit Metabarcoding	10
2.4. Analyse der Wasserproben	11
3. Vergleich der evaluierten Methoden mit Lebendfang	11
3.1. Sammlung von Kotproben	11
3.2. Standorte zur Entnahme von Wasserproben	12
4. Entwicklung der Methoden	13
4.1. Sammlung von Haarproben	13
4.2. Sammlung von Kotproben	13
4.3. Aufbau Referenzdatenbank für genetische Bestimmung der Kleinsäuger der Schweiz	14
4.4. Evaluation eines Locus für die Analyse der nicht-invasiven Proben	15
5. Evaluation der Methoden	16
5.1. Bedeutung der Anzahl Reads und Kreuzkontaminationen	16
5.2. Analyse der Kotproben mit bekannter Herkunft	16
5.3. Ergebnisse der Vergleichsgebiete	18
5.4. Genetische Nachweise von Wasserspitzmäusen mit Wasserproben	22
6. Nachweise von Kleinsäufern mit DNA aus Wasser und Kot	23
6.1. Bewertung von Nachweisen mit Wasserproben	23
6.2. Bewertung der Nachweise durch die genetische Analyse von Kotproben	24
6.2.1. Schwierigkeiten bei der Interpretation der Ergebnisse	24
6.2.2. Verunreinigungen der Proben	24
7. Bedarf für weitere Abklärungen	25

Ausgangslage

In der Schweiz wurden bisher 33 Kleinsäugerarten (Säugetiere unter 200g Körpergewicht ohne Fledermäuse) nachgewiesen. Somit macht diese Gruppe rund ein Drittel der in der Schweiz präsenten Säugetiere aus. Von den Kleinsäugetern sind sieben Arten auf der Roten Liste der Säugetiere ohne Fledermäuse als gefährdet eingestuft und drei Arten sind potenziell gefährdet. Neun dieser Arten sind auch auf der Liste der National Prioritären Arten aufgeführt.

Die aktuell eingesetzten Methoden mit Lebendfang sind sehr aufwändig und liefern für viele Arten erst zusammen mit einer Analyse von entnommenen Proben (Haare, Gewebe) oder mit Schädelvermessung von toten Tieren sichere Artnachweise.

Neue Feld- und Analysemethoden, welche auf unterschiedliche Arten genetisches Material sammeln, besitzen das Potential, dass Kleinsäugerarten effizienter, grossflächiger und tierfreundlich nachgewiesen werden können. Dies ist insbesondere für die bedrohten Arten von Bedeutung, aber auch für das Monitoring von häufigeren Arten relevant.

Das vorliegende Projekt ist im Forschungskonzept Umwelt des BAFU für die Jahre 2017-2020 eingebettet unter Punkt 3.2.14 Biodiversität: Erhaltung von genetischer Vielfalt, Arten und Lebensräumen: Untersuchungen zur Ökologie und der genetischen Diversität von Arten.

Ziele

- 1) Mit dem vorliegenden Projekt zur Prüfung neuer Methoden zum Nachweis gefährdeter Kleinsäugerarten in der Schweiz sollen neue Nachweismethoden (eDNA und Feldmethoden zur nicht-invasiven Sammlung von DNA) für die Anwendung bei Kleinsäugetieren evaluiert werden.
- 2) Im Rahmen der Projektextension soll zudem eine Referenzdatenbank für alle 32 (neu 33) in der Schweiz vorkommenden Kleinsäugetierarten erstellt werden.

Mandate

- 1) entspricht dem Mandat mit den folgenden Kennzahlen:

Bestellnummer 110008938, Kreditnummer A200.0001 Globalkredit / Forschung

Vertragsnummer 16.0100.PJ / R252-0549, Abteilung Arten, Ökosysteme, Landschaften,

Litsios Glenn

- 2) entspricht dem Mandat mit den folgenden Kennzahlen:

Bestellnummer 110011047, Kreditnummer A200.0001 Globalkredit / Forschung

Vertragsnummer 16.0100.PJ / 42C9398CE, Abteilung Arten, Ökosysteme, Landschaften (AÖL),

Litsios Glenn

Methoden

1. Feldmethoden zur nicht-invasiven Sammlung von Kleinsäuger-DNA

1.1. Evaluation von möglichen Feldmethoden

Um mögliche Methoden zur nicht-invasiven Sammlung von DNA von Kleinsäugetieren zu finden, wurde mit einer Literaturrecherche die bisher eingesetzten Methoden zusammengetragen. Die am häufigsten für den Nachweis von Säugetieren angewandte Methode ist die Sammlung von Haaren (Pocock & Jennings, 2006; Chiron et al., 2018; Legall et al., 2015; Henry et al., 2012; Moran et al., 2008; Reiners et al., 2011). Weiter konnte DNA aus Eulengewöllen (Poulakakis et al., 2005, Igea et al. 2015), Kot (Ferreira et al., 2018), Wasserproben (Ushio et al. 2017) und Bodenproben (Andersen et al., 2012) extrahiert werden.

Aufgrund der Relevanz für den Artenschutz haben wir bei der Evaluation der Feldmethoden besonders auf die Anwendbarkeit für Spitzmäuse geachtet.

Ergänzend zur Literaturrecherche wurde mit verschiedenen Kleinsäugerexperten von Faune Concept über mögliche Nachweismethoden gesprochen und die oben beschriebenen Methoden bezüglich der Anwendbarkeit für Spitzmäuse diskutiert.

Basierend darauf, wie auch aufgrund der eigenen Erfahrungen aus früheren Projekten, wurde entschieden, die Sammlung von Haaren und Kot zur DNA-Analyse sowie die Gewinnung von eDNA aus Wasserproben weiter zu verfolgen.

1.2. Adaption und Testen der Methoden für Spitzmäuse

Für die Adaption der bekannten Methoden an die Anwendung mit Spitzmäusen wurde mit verschiedenen internationalen Forschern (Jared Hobbs / Hemmera, Kanada; Jose Castresana, Spanien; Eva Bellemain / Spygen, Frankreich) Kontakt aufgenommen und diese wurden zu ihren Erfahrungen im Umgang mit der Sammlung, Lagerung und Analyse von eDNA befragt.

Ebenfalls wurde mit diesen Personen abgeklärt, ob die Labors für welche sie arbeiten oder sie zusammenarbeiten (University of Victoria, B.C; Spygen, Frankreich), Erfahrungen in der Analyse von Wasser-, Kot- oder Haarproben von Säugetieren haben. Weitere Institutionen (Institut für Umwelt und Natürliche Ressourcen der Zürcher Hochschule für angewandte Wissenschaften ZHAW, Wädenswil; Ecogenics, Balgach; Altermatt Lab EAWAG, Dübendorf; Fera, Grossbritannien; Crestwood Environmental, Grossbritannien; Applied Genomics, Grossbritannien) wurden aufgrund von Empfehlungen oder eigenen Recherchen angefragt.

1.2.1. Methode zur Sammlung von Haarproben

Zum Nachweis von Säugetieren eignen sich Haare sehr gut, weil bei den meisten Säugetieren der Körper fast vollständig damit bedeckt ist und die Haarwurzeln Zellen mit Kern enthalten. Allerdings unterscheiden sich die in der Schweiz nachgewiesenen Spitzmausarten deutlich in der Körpergrösse. Die kleinste Art, die Zwergspitzmaus *Sorex minutus* ist 2.5-5g schwer, während die Wasserspitzmaus *Neomys fodiens* ein Körpergewicht von 12-19g besitzt. Um eine möglichst unspezifische Falle zu konstruieren, wurde nach der Vorlage von Pocock & Jennings (2006) eine Serie von Plastikröhren mit unterschiedlichen Durchmessern entwickelt und getestet (Abb. 1).



Abb. 1: Serie von Plastikröhren mit unterschiedlichen Durchmessern und einem Klebestreifen (weiss im Vordergrund), an welchem die Haare kleben bleiben.

Als Mechanismus zur Sammlung der Haare wurde normales, transparentes Tesa-Klebeband wie auch Streifen des speziell für die Sammlung von Säugetierhaaren entwickelten FaunaGoo Wafer (Faunatech Ltd, Australia) verwendet.

Zur Erprobung dieser Haarfallen wurden Spitzmäuse, welche im Rahmen von Fangaktionen zur Erstellung des neuen Säugetieratlas für die Schweiz und Liechtensteins gefangen wurden, kurze Zeit in einem Plastikterrarium gehalten. Die konstruierten Haarfallen wurden in diese Terrarien gelegt, die Reaktion der Kleinsäuger beobachtet und notiert, welche Röhren von den Tieren aufgesucht wurden.

1.2.2. Kotröhrchen zum Nachweis von Kleinsäuigern

Auf der Oberfläche des von Tieren ausgeschiedenen Kots befinden sich Darmzellen, welche für die Bestimmung der Herkunft des Kots verwendet werden können.

Ferreira et al. (2018) und Castresana (mündlich) sammelten Kot direkt von exponierten Stellen ein, während Churchfield et al. (2000) Plastikröhren zur Sammlung von Kot von Wasserspitzmäusen nutzen.

Ein früher durchgeführtes Pilotprojekt (SWILD 2017) hatte gezeigt, dass die Plastikröhren von verschiedenen Kleinsäugerarten aufgesucht werden und dass die Herkunft des so gesammelten Kots mit genetischen Methoden bestimmt werden kann.

Für die Kotsammlung wurden graue Plastikröhren von 20 cm Länge und einem Durchmesser von 4 cm verwendet. Auf einer Seite der Röhre wurde ein Stück halbrtransparenter Vorhangstoff mit einem Gummiband befestigt (Abb. 2) und zur Anlockung der Tiere eine Fliegenmade als Köder in die Röhre gelegt.

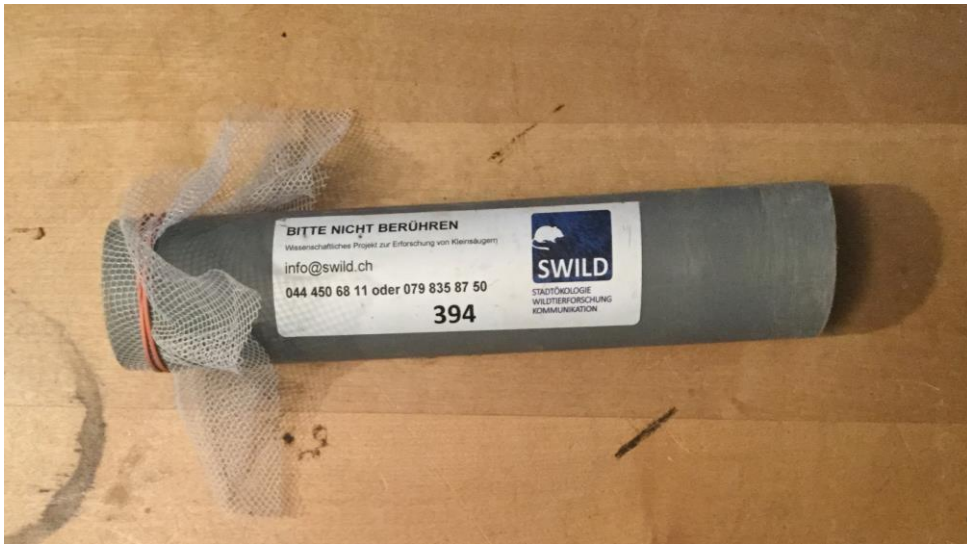


Abb. 2: Graue Plastikröhre zur systematischen Sammlung von Kot von Kleinsäugetern (Länge 20cm, Durchmesser 4cm).

Nach der Platzierung an für Kleinsäuger potenziell attraktiven Stellen, wurden die Kotröhren während sechs Wochen am Ort belassen und jeweils alle sieben Tage kontrolliert. In den Röhren vorhandener Kot wurde mit einem frischen Holzspieß aus der Röhre entnommen und in einen Sammelbehälter transferiert.

Weil DNA durch UV-Strahlung zerstört wird, müssen die Proben lichtgeschützt gelagert werden. Zudem enthält der Kot verschiedene Mikroorganismen, welche die Zellen und die darin enthaltene DNA abbauen. Um dies zu vermeiden, muss nach Empfehlung der Labors der gesammelte Kot möglichst rasch getrocknet oder gekühlt werden.



Abb. 3: Der Sammelbehälter für Kotproben, mit Sila Blaugelkugeln und zwei Schichten Füllmaterial zur Einbettung der Proben. Dies ermöglicht eine schnelle Austrocknung der Proben und die lichtgeschützte Lagerung.

Zur einfacheren Handhabung der Proben wurde ein Sammelbehälter (Abb. 3) konstruiert, welcher zu zwei Dritteln mit Silika Blaugelkugeln mit 2-5 mm Durchmesser gefüllt ist. Darauf werden zwei Lagen Füllmaterial aus Polyester gegeben. Die untere Lage Füllmaterial dient dazu, dass sich die Kotpillen nicht mit den Blaugelkugeln vermischen. Die obere Schicht verhindert eine Kontaminierung der Kotproben mit menschlichen Zellen, da nur der obere Teil der oberen Schicht mit den Händen in Berührung kommt und so auf die Benutzung von Handschuhen verzichtet werden kann.

1.2.3. Entnahme von Wasserproben

Beim Kontakt von Tieren mit Wasser können Körperzellen oder Zellen enthaltende Ausscheidungen (Schleim, Kot) in dieses übergehen und sich dort sammeln. Beim Abbau der Zellen gelangt die DNA ins Wasser und kann als eDNA gesammelt und amplifiziert werden (Deiner et al., 2017).

Für die Tests zum Nachweis von Wasserspitzmäusen *Neomys sp.* mit Hilfe von Wasserproben wurde mit dem darauf spezialisierten Labor Spygen in Frankreich zusammengearbeitet.

Als Vorbereitung haben wir an einem mehrstündigen Videotraining von der Firma Spygen teilgenommen, welches Vorbedingung ist, damit die Sampling-Kits dieser Firma eingesetzt werden können.

Für die Probenahme wurde das VigiDNA tubing sampling kit von Spygen verwendet. Dieses Kit besteht aus einer mobilen Wasserpumpe sowie einem Filter zur Aggregation und Lagerung der DNA. Zusätzlich wird ein Puffer mitgeliefert, welcher nach Abschluss der Probennahme zum Filter hinzugegeben wird.



Abb. 4: Das VigiDNA tubing sampling kit mit einer mobilen, akkubetriebenen Wasserpumpe, Filter und Puffer zur Lagerung der Proben.

Für die Entnahme der Proben wurden Gewässerabschnitte mit flachen und gut zugänglichen Ufern gewählt, wo zwei Wasserproben jeweils von einem unterschiedlichen Ufer aus genommen werden

konnten. Alle Teile, welche mit dem Wasser in Berührung kamen, wurden nur einmalig verwendet (Wasserschlauch) oder mit Plastiksäcken geschützt, welche ebenfalls nach dem Kontakt mit dem Wasser als Abfall entsorgt wurden. Damit wird die Verunreinigung der Proben durch DNA aus einem fremden Gewässer verhindert. Zudem ist so keine Desinfektion des Arbeitsmaterials, als Prävention zur Vermeidung der Verschleppung von Krankheiten, wie zum Beispiel des Chytridpilzes, nötig.

Innerhalb des Gewässerabschnittes wurden Stellen gesucht, an welchen das Wasser gut aufgewühlt war, zum Beispiel unterhalb von Schwellen, Steinen oder bei Zusammenflüssen von Seitenarmen oder -gewässern. An diesen Orten wurde mit Hilfe der Wasserpumpe (VigiDNA pump oder Vampire sampler) während 30 Minuten rund ein Liter Wasser pro Minute dem Gewässer entnommen und über den Filter laufen gelassen. An diesem Filter bleiben im Wasser enthaltene DNA-Fragmente haften, was eine Konzentrierung der DNA erlaubt. Nach Abschluss des Pumpvorganges wurde der Glasbehälter, welcher den Filter enthält, mit dem gelieferten Puffer gefüllt und verschlossen.



Abb. 5: Mit der VigiDNA pump wurde während zwei Mal 30 Minuten jeweils zirka ein Liter Wasser pro Minute aus dem Gewässer entnommen und über den Filter laufen gelassen.

Dieser Vorgang wurde für jeden Standort einmal wiederholt, so dass pro Gewässerabschnitt jeweils zwei Proben analysiert wurden. Dieses Vorgehen ist so von Spygen vorgegeben, damit eine genügend hohe Entdeckungswahrscheinlichkeit auch für Arten gegeben ist, welche nur in kleinen Individuenzahlen vorkommen oder sich nur teilweise im Wasser aufhalten.

2. Genetische Analyse der gesammelten Proben

Im Vergleich zu klassisch invasiv genommenen Proben (z.B. Stück Ohr oder Zehe) enthalten nicht-invasiv gesammelte Proben, insbesondere die aus der Umwelt entnommenen (eDNA), wesentlich kleinere Mengen und oft stark degradierte DNA. Dies macht die Analyse dieser Proben anspruchsvoll und benötigt spezielle Methoden.

Wie bei der Analyse von Gewebeproben, wird die in den Proben vorhandene DNA extrahiert und mit Hilfe von PCR vervielfältigt (amplifiziert). Weil die in den Proben enthaltene DNA oft durch Umwelteinflüsse stark zerstückelt (fragmentiert) ist, werden dazu möglichst kurze Abschnitte gewählt, welche mit weniger als 100 Basenpaaren eine sichere Artzuordnung erlauben.

2.1. Suche eines geeigneten Locus für die Analyse der nicht-invasiven Proben

Für dieses Projekt wurden von der spezialisierten Firma Microsynth, Balgach nach einer ersten Evaluation die Prüfung von zwei Loci der mitochondrialen rRNA, 12S und 16S vorgeschlagen. Diese Abschnitte werden bei Metabarcoding-Analysen bereits für verschiedene Artengruppen erfolgreich eingesetzt.

Die Sequenzen dieser zwei Loci waren nicht für alle in der Schweiz nachgewiesenen Kleinsäugerarten in den internationalen Sequenzdatenbanken, z.B. Genbank, vorhanden. Daher mussten diese im Rahmen dieses Projekts zuerst bestimmt werden. Dazu wurden als Referenz Gewebeproben von mehreren Naturmuseen, universitären Projekten und aus der Sammlung von SWILD gesammelt. Die genaue Herkunft der Proben ist im Anhang 3 aufgeführt.

2.2. Aufbau Referenzdatenbank für genetische Bestimmung von Kleinsäugetieren

Neben dem vollständigen Fehlen von einigen Sequenzen für Kleinsäugerarten ist die Artzuweisung in den internationalen Sequenzdatenbanken nicht immer verlässlich. Die sichere Bestimmung der Kleinsäuger auf Artniveau ist für viele Arten nicht einfach und benötigt spezielle Bestimmungsmethoden, wie Schädelvermessung oder eine Bestimmung über Zahnmerkmale. Zusätzlich sind in mehreren Gattungen sehr nah verwandte, auf die letzte Eiszeit zurückgehende Arten bekannt, welche sich in den untersuchten Loci nur wenig unterscheiden.

Aus diesen Gründen wurde von mehreren Stellen, insbesondere auch von SwissBOL, empfohlen, eine eigene Referenzdatenbank für die zu benutzenden Loci aufzubauen. Dazu wurden die gleichen Gewebeproben wie im Kapitel 2.1 verwendet. Microsynth hat die DNA aus den Gewebeproben extrahiert, mit PCR amplifiziert und mit der Sanger-Methode die Sequenzen bestimmt.

Zusätzlich zu 12S und 16S wurden der mitochondriale Locus COX I, welcher ebenfalls häufig für die Artzuweisungen genutzt wird, sowie die beiden nukleären Loci IRBP und ITS sequenziert.

2.3. Analyse der gesammelten Kotproben mit Metabarcoding

Mit Metabarcoding wird eine Probe, im Unterschied zum Barcoding, nicht nur einer Art zugewiesen, sondern es werden möglichst alle DNA-Fragmente bestimmt. Mit den Gewebeproben und den in mehreren Projektschritten gesammelten Kotproben hat Microsynth die dazu benötigten Amplifikations- und Sequenzierungsverfahren (Next Generation Sequencing) für die Kleinsäugerarten der Schweiz getestet und optimiert.

Dazu wurden 20 Mischungen von Kleinsäugerkot und 10 DNA-Mischungen, welche aus der DNA, die aus den Gewebeproben extrahiert und amplifiziert wurde, mit Illumina MiSeq sequenziert. Die so erhaltenen Sequenzen wurden mit Hilfe von Bioinformatiktools mit den Sequenzen der Referenzdatenbank sowie der internationalen Sequenzdatenbanken abgeglichen und die in den Proben enthaltenen Arten zugeordnet.

2.4. Analyse der Wasserproben

Die Analyse der Wasserproben erfolgte durch das Labor Spygen in Frankreich. Sie benutzen für die Bestimmung der Arten den 12S Locus und besitzen eine eigene Referenzdatenbank für aquatisch und semiaquatisch lebende Tiere.

3. Vergleich der evaluierten Methoden mit Lebendfang

Für die praktische Erprobung der beschriebenen Methoden zur Sammlung von Kot- und Wasserproben und dem Vergleich der Resultate mit denjenigen von Lebendfängen, wurden diese Methoden exemplarisch in Gebieten eingesetzt, welche im Rahmen von anderen Projekten bearbeitet wurden.

3.1. Sammlung von Kotproben

Zur Einschätzung der Aussagekraft der Kotanalysen wurden in einem ersten Projektteil Kotproben gesammelt, welche eindeutig einer Art zugeordnet werden konnten. Diese Proben wurden aus Longworth Kleinsäugerlebensfallen, mit welchen die entsprechenden Arten gefangen wurden, entnommen.

Diese Kotproben wurden teilweise zu einer Probe zusammengelegt, um mehr Ergebnisse über die Erkennung von Arten zu bekommen. Gepoolt wurden nur taxonomisch weit auseinanderliegende Arten, mindestens unterschiedlicher Unterfamilien. So wurden sechs Kotprobensammlungen mit bekannter Herkunft erstellt.

Zum direkten Vergleich der zwei Methoden wurden in zwei Gebieten die Kotröhren gemäss der Beschreibung im Kapitel 1.2.2. eingesetzt. Platziert wurden die Kotröhren jeweils direkt nach Abschluss der Lebendfänge an den gleichen Standorten wie die Lebensfallen. Die Lebensfallen wurden in Linien mit jeweils 10 Fallen gruppiert. Die Fallen einer Linie wurden mit einem Abstand von fünf bis zehn Metern an für Kleinsäuger möglichst attraktiven Orten, zum Beispiel entlang von linearen Strukturen wie liegenden Baumstämmen oder Mauern, am Rand von Asthaufen, in Altgrasinseln, am Fuss von Sträuchern oder zwischen Steinen, platziert.

Als erstes Vergleichsgebiet wurde die **Lombachalp als Teil der Moorlandschaft Habkern-Sörenberg (Kanton Bern)** ausgewählt. Eine voralpine Landschaft mit ausgedehnten Moorflächen, welche im Südwesten des Untersuchungsgebiets in intensiv landwirtschaftlich genutzte Flächen übergeht. In diesem Gebiet wurden 90 Kotröhren in 9 Linien mit jeweils 10 Kotröhren eingesetzt.

Das zweite Vergleichsgebiet war der Abschnitt **Aarau-Wildegg des Auenschuttparks des Kantons Aargau**. Das Gebiet Rohrer- und Ruppenswiler Schachen umfasst ehemalige Auenwälder und teilweise renaturierte Gebiete, welche an intensiv genutztes Landwirtschaftsland und Siedlungen angrenzen. Eingesetzt wurden 110 Kotröhren welche in 11 Linien aufgeteilt waren. Aufgrund der kleinen räumlichen Distanz und der Vergleichbarkeit der Habitate von zwei benachbarten Linien wurden diese für die Analyse zu einer Probe vereinigt.

Durch die unterschiedlichen Habitattypen in den zwei Gebieten, kann eine sich deutlich unterscheidende Artenzusammensetzung erwartet werden, womit die Prüfung der Methode für möglichst unterschiedliche Arten ermöglicht wird.

3.2. Standorte zur Entnahme von Wasserproben

Zur Prüfung der im Kapitel 1.2.3 beschriebenen Methode wurden drei Gebieten bestimmt, in welchen in früheren Projekten Wasserspitzmäuse durch Lebendfänge nachgewiesen werden konnten.

Als erstes Gebiet wurde der **Schwarzbach in der Moorlandschaft Habkern-Sörenberg (Kanton Bern)** ausgewählt. Ein kleiner Bergbach welcher ein Moorgebiet entwässert, in welchem im Jahr 2020 Wasserspitzmäuse *Neomys fodiens* mit Lebendfängen nachgewiesen werden konnten.

Als zweites Gebiet wurde der **Glütschbach in der Gemeinde Thun (Kanton Bern)** ausgewählt. Ein breiter Bach, dessen Wasserführung durch eine Staustufe reguliert ist. Entlang dieses Baches konnten wiederholt und an mehreren Stellen Wasserspitzmäuse *Neomys fodiens* und auch einmalig *N. anomalus* in den Jahren 2013 und 2015 gefangen werden.

Als drittes Versuchsgebiet wurde der **Himmelbach in Oberglatt (Kanton Zürich)** gewählt. Er entwässert ein Gebiet innerhalb und östlich des Flughafens Zürich und ist an der Entnahmestelle ein breiter, langsam fliessender Bach in dessen Einzugsgebiet im Jahr 2015 Wasserspitzmäuse *Neomys fodiens* nachgewiesen werden konnten.

Resultate

4. Entwicklung der Methoden

4.1. Sammlung von Haarproben

Der Prototyp der Haarfalle wurde mit drei Tieren unterschiedlicher Art (*Sorex araneus*, *Neomys fodiens* und *Crocidura russula*) getestet. Kein Test ergab für weitere Analysen verwendbare Haare.

Verhaltensbeobachtungen zeigten, dass die Spitzmäuse aktiv dem Klebestreifen auswichen und sich unterhalb des Streifens durchdrückten. Wenn das Fell der Tiere trotzdem kurz in Kontakt mit dem Klebeband kam, war dieses so fein, dass keine Haare kleben blieben.

Aufgrund dieser schlechten Resultate, und weil keine Verbesserungsmöglichkeiten sichtbar waren, wurde diese Methode nicht weiterverfolgt und es wurde kein Methodenvergleich durchgeführt.



Abb. 6: Prototyp einer Haarfalle, mit einer Wasserspitzmaus in der 3. Röhre. Der Streifen mit dem Klebstoff zur Sammlung der Haare ist als Linie im Vordergrund sichtbar.

4.2. Sammlung von Kotproben

Mit dem Einsatz von insgesamt 200 Kotröhren, die während jeweils sechs Wochen in den zwei Gebieten im Einsatz waren (Total $200 \times 6 \times 2 = 2400$ Einsatzwochen), konnten insgesamt mehr als 400 Kotpillen gesammelt werden (exakte Zahl nicht erfasst, da die Kotpillen teilweise zerfallen sind). Zusätzlich wurden auch Kotsuren aus der unmittelbaren Umgebung der Kotröhre eingesammelt. Im Gebiet Auenschutzpark Rohr-Rupperswil wurde zudem noch einzelner Kot aus Spurentunnels zu den Kotproben hinzugefügt.

4.3. Aufbau Referenzdatenbank für genetische Bestimmung der Kleinsäuger der Schweiz

Es konnten insgesamt 37 Gewebeproben von allen 33 Kleinsäugerarten der Schweiz beschafft werden (Anhang 3). Für die Arten Europäischer Maulwurf *Talpa europaea*, Blindmaulwurf *T. caeca* und Schneemaus *Chionomys nivalis* hat die Amplifizierung der DNA bei der ersten Probe nicht funktioniert und wir mussten eine zweite Gewebeprobe organisieren. Für den Baumschläfer *Dryomys nitedula* wurde eine zweite Gewebeprobe zur Absicherung der Resultate der ersten Probe genutzt (siehe Kapitel 4.3).

Aus den gelieferten Gewebeproben konnte Microsynth bei sieben Proben keine DNA amplifizieren. Die genauen Ursachen sind nicht bekannt und konnten nicht eruiert werden. Da es sich aber mehrheitlich um Proben aus eine alten Sammlung handelte, kann nicht ausgeschlossen werden, dass den Flüssigpräparaten Formalin oder eine andere Substanz zur besseren Konservierung der Tiere beigegeben wurde, welche die Amplifizierung der DNA verhinderte.

Bei den restlichen 30 Proben konnte Microsynth den 16S Locus sequenzieren. Der Locus 12S konnte für 19 Proben (63%), der IBRP Locus für 16 Arten (53%) und COX I für 20 Arten (66%) sequenziert werden.

Der ITS1 Locus konnte für die meisten Proben amplifiziert werden. Der Locus liegt jedoch in vielen Kopien im Genom vor und bei den Kleinsäugerproben konnte der Locus aufgrund von zu häufig auftretenden Deletionen nicht sequenziert werden.

Tabelle 1: Liste aller 33 Kleinsäugerarten der Schweiz für welche DNA aus Gewebeproben extrahiert, amplifiziert und sequenziert wurde.

Familie	Gattung	Art	12S	16S	IRBP	COX I
Soricidae	Crocidura	<i>Crocidura leucodon</i>		+		+
Soricidae	Crocidura	<i>Crocidura russula</i>		*		*
Soricidae	Crocidura	<i>Crocidura suaveolens</i>		+		
Soricidae	Neomys	<i>Neomys anomalus milleri</i>	+	*	+	
Soricidae	Neomys	<i>Neomys fodiens</i>		*		*
Soricidae	Sorex	<i>Sorex alpinus</i>		*		
Soricidae	Sorex	<i>Sorex antinorii</i>	+	+	+	+
Soricidae	Sorex	<i>Sorex araneus</i>	*	*		*
Soricidae	Sorex	<i>Sorex coronatus</i>	+	+		+
Soricidae	Sorex	<i>Sorex minutus</i>	+	*		*
Soricidae	Suncus	<i>Suncus etruscus</i>	+	*		+
Talpidae	Talpa	<i>Talpa caeca</i>				
Talpidae	Talpa	<i>Talpa europaea</i>		*		
Cricetidae	Arvicola	<i>Arvicola amphibius</i>	*	*	*	*
Cricetidae	Chionomys	<i>Chionomys nivalis</i>		+		
Cricetidae	Microtus	<i>Microtus agrestis</i>	*	*	+	*
Cricetidae	Microtus	<i>Microtus arvalis</i>		*	+	*
Cricetidae	Microtus	<i>Microtus lavernedii</i>	+	+	+	+
Cricetidae	Microtus	<i>Microtus multiplex</i>	*	+		
Cricetidae	Microtus	<i>Microtus savii</i>	*	+	+	+
Cricetidae	Microtus	<i>Microtus subterraneus</i>				
Cricetidae	Myodes	<i>Myodes glareolus</i>	*	*	+	*
Gliridae	Dryomys	<i>Dryomys nitedula</i>		+	+	+
Gliridae	Eliomys	<i>Eliomys quercinus</i>	*	+	*	

Gliridae	Glis	<i>Glis glis</i>	*	*	*	
Gliridae	Muscardinus	<i>Muscardinus avellanarius</i>		+		
Muridae	Apodemus	<i>Apodemus alpicola</i>	*	+	+	+
Muridae	Apodemus	<i>Apodemus flavicollis</i>	*	*	+	*
Muridae	Apodemus	<i>Apodemus sylvaticus</i>	*	+	+	*
Muridae	Micromys	<i>Micromys minutus</i>				
Muridae	Mus	<i>Mus domesticus</i>	*	*	*	*
Muridae	Rattus	<i>Rattus norvegicus</i>	*	*	*	*
Muridae	Rattus	<i>Rattus rattus</i>				

Orange: Locus konnte nicht sequenziert werden

Grün: Locus konnte für diese Art sequenziert werden und (*) Sequenz wurde in den Sequenzdatenbanken gefunden, resp. (+) Sequenz war in den Datenbanken bisher nicht vorhanden.

Eine Blast Suche (Basic Local Alignment Search Tool, blast.ncbi.nlm.nih.gov) der erhaltenen Sequenzen zeigte, dass ein bedeutender Anteil der Loci für die Kleinsäuger der Schweiz in den internationalen Sequenzdatenbanken fehlt. Für den Locus 16S waren 45% (13) der aus den Gewebeproben bestimmten Sequenzen nicht enthalten, beim 12S waren es 32% (6) fehlende Sequenzen und für den IRBP Locus fehlten 69% (11) der Sequenzen.

4.4. Evaluation eines Locus für die Analyse der nicht-invasiven Proben

Die Analyse des im Kapitel 4.3 beschriebenen Datensets durch Microsynth zeigte, dass in beiden Loci 12S und 16S eine gewisse Variabilität vorhanden ist. Beim 16S Locus sind die Variationen stärker konzentriert als beim 12S, was den Vorteil hat, dass mit kürzeren Abschnitten Artzuweisungen möglich sind. Aus diesem Grund wurde für die weiteren Analysen mit dem 16S Locus gearbeitet. Von diesem Locus hat auch Manuel Ruedi (Museum Genève) bereits eine umfangreiche, aber nicht vollständige Sammlung von Säugetieren der Schweiz. Der gleiche Locus wird ebenfalls für die Artzuweisungen bei Amphibien und Libellen genutzt.

Für die vier Arten (*Talpa caeca*, *Microtus subterraneus*, *Micromys minutus*, *Rattus rattus*), für welche die Sequenzierung des 16S Locus nicht möglich war, sind die benötigten Sequenzen in den Referenzdatenbanken vorhanden. Eine visuelle Kontrolle mit Hilfe eines phylogenetischen Baumes zeigte, dass diese Sequenzen mit denjenigen der anderen Arten der gleichen Gattung gruppieren und daher die Artzuweisung plausibel ist.

Zusätzlich konnten die 16S Sequenzen aller Arten zur weiteren Kontrolle mit dem Datensatz von Manuel Ruedi vom Musée Genève abgeglichen werden. Dies ergab, abgesehen von einem Fall, dem Baumschläfer *Dryomys nitedula*, eine gute Übereinstimmung.

Zur Absicherung dieser Sequenz wurde die Bestimmung des Tieres, von welchem die Gewebeprobe entnommen wurde, anhand eines Bildes (Abb. 7) geprüft und von mehreren Experten (Eva Ladurner und Kathi Märki) bestätigt. Zusätzlich wurde eine zweite Gewebeprobe von einem anderen Tier sequenziert (Probe 37, Anhang 3). Dies ergab eine Sequenz, welche bis auf ein Nukleotid mit der ursprünglichen Sequenz übereinstimmt. Daher gehen wir davon aus, dass die erhaltene Sequenz von einem Baumschläfer stammt.



Abb. 7: Baumschläfer *Dryomys nitedula*, von welchem die erste Gewebeprobe für die Sequenzierung des 16S Locus genommen wurde. © Eva Ladurner / Naturmuseum Südtirol

5. Evaluation der Methoden

5.1. Bedeutung der Anzahl Reads und Kreuzkontaminationen

Bei der Anwendung der Verfahren für Next Generation Sequencing (NGS) treten Kreuzkontaminationen auf. Dies bedeutet, dass in den Resultaten einer Probe Sequenzen enthalten sind, welche aus einer anderen Probe stammen. Zur Erkennung dieser wird bei den Resultaten angegeben, wie oft eine Sequenz gelesen wurde (reads) und Nachweise unterhalb einer gewissen Schwelle werden für die Auswertung nicht berücksichtigt. Von Dr. Christoph Grünig der Firma Microsynth wurde empfohlen, diese Schwelle bei 50 Reads anzusetzen. Im Diagramm 1 sind die erhaltenen Anzahl Reads für Nachweise mit weniger als 500 Reads dargestellt und bewertet. Als „nicht plausibel“ sind Artnachweise bezeichnet, welche in dieser Region noch nie vorgekommen sind, während die Nachweise von Arten, welche nicht in den Kotmischungen enthalten waren oder nicht im Gebiet gefangen werden konnten, als „nicht gefangen“ eingestuft werden.

Basierend auf diesem Diagramm wurde für die folgenden Auswertungen die Schwelle etwas konservativer auf 100 Reads festgelegt.

5.2. Analyse der Kotproben mit bekannter Herkunft

Es wurden sechs Kotprobensammlungen mit bekannter Herkunft als Proben 20 – 25 zusammengestellt. Bei allen Proben konnte Microsynth die DNA amplifizieren und mit Next Generation Sequencing den 16S Loci bestimmen.

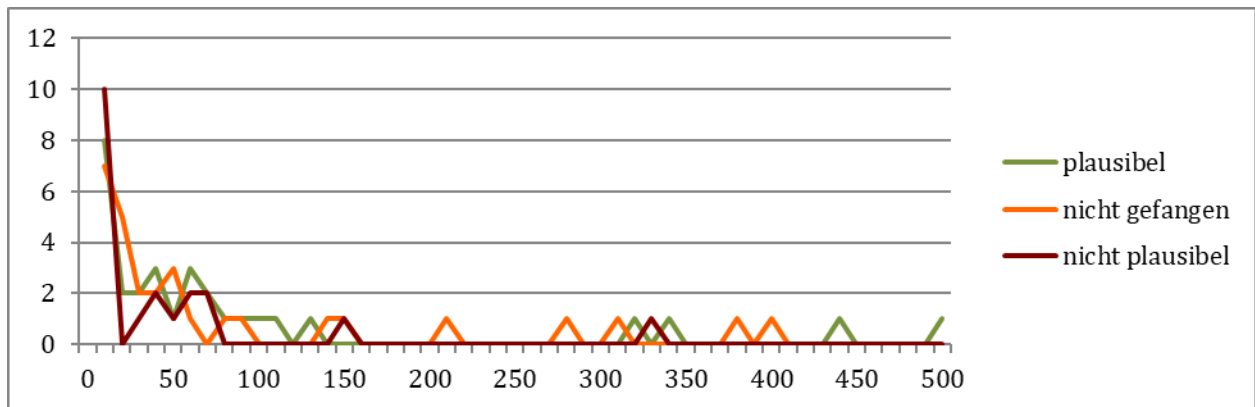


Diagramm 1: Verteilung der Anzahl Reads für Nachweise mit weniger als 500 Reads. Die Einschätzung der Plausibilität des Nachweises basiert auf den bisherigen Nachweisen der Art in der Region der Probennahme sowie den Resultaten der Fangergebnisse, resp. der Herkunft der Proben.

Bei vier Proben (20, 21, 22 und 24) enthalten die Analyseresultate die erwarteten Arten. Die bei der Proben 21, 23 und 25 zusätzlich erhaltenen Arten der Gattung *Apodemus* könnten auf Verunreinigungen der Fallen zurückgeführt werden. Die einmaligen Nachweise von *Canis lupus* und *Homo sapiens* sind plausible Kontaminationen. Die anderen beiden Arten in der Probe 21, *Sorex coronatus* und *Microtus agrestis* müssen auf Verunreinigungen des Sammlungsbehälters durch anderen Kot, Verschleppung von DNA bei der Probenverarbeitung oder Fehler bei der Analyse zurückgeführt werden.

Das Analyseergebnis für die Probe 23 enthält die Art *Sorex antinorii* (mehr als 4000 reads), während die Probe Kot der Schwesterart *S. araneus* enthalten sollte. Ob dies die Folge einer falschen Artzuordnung oder von Verunreinigungen ist, kann nicht geprüft werden.

Die Differenz bezüglich der Schwesterarten *Microtus lavernedii* und *M. agrestis* in der Probe 24 wird später bei den Vergleichsgebieten diskutiert. Im Ergebnis für die Probe 25 fehlt die Art *Neomys fodiens*, wofür die Ursache nicht rekonstruiert werden konnte.

Tabelle 2: Entnahmeorte und Inhalte der Kotproben mit bekannter Herkunft sowie die Analyseergebnisse. Orange: Analyseergebnis stimmt nicht mit der Erwartung überein, Grün: erwartete Art.

Probe	Herkunft (Kanton)	erwartete Art(en)	Analyseergebnis, (Anzahl reads)
20	UR	<i>Chionomys nivalis</i>	<i>Chionomys nivalis</i> (41495)
21	TI	<i>Crocidura suaveolens</i>	<i>Sorex coronatus</i> (4466) <i>Crocidura suaveolens</i> (1043) <i>Canis lupus</i> (1029) <i>Microtus agrestis</i> (327) <i>Apodemus sylvaticus</i> (142) <i>Apodemus flavicollis</i> (135)
22	UR	<i>Myodes glareolus</i>	<i>Myodes glareolus</i> (42334) <i>Homo sapiens</i> (1740)
23	TI, LU, AG	<i>Microtus multiplex</i> <i>Sorex araneus</i> ¹ <i>Crocidura russula</i>	<i>Crocidura russula</i> (15544) <i>Microtus multiplex</i> (15351) <i>Apodemus flavicollis</i> (6155) <i>Sorex antinorii</i> (4055)

24	AG, LU	<i>Microtus lavernedii</i> ¹ <i>Sorex araneus</i>	<i>Microtus agrestis</i> (55600) <i>Sorex araneus</i> (7495)
25	LU	<i>Sorex coronatus</i> ¹ <i>Neomys fodiens</i> ¹	<i>Sorex coronatus</i> (59551) <i>Apodemus sylvaticus</i> (1046)

¹: Artbestimmung aufgrund von Haarproben durch die Zürcher Hochschule für angewandte Wissenschaften (ZHAW)

5.3. Ergebnisse der Vergleichsgebiete

Hier werden aus zwei Gebieten die Ergebnisse von zwei Methoden (Lebendfang und die Analyse von Kotproben) verglichen.

In den beiden Vergleichsgebieten Lombachalp und Auenschutzpark konnten mit der Methode des **Lebendfangs** insgesamt 10 Arten nachgewiesen werden. Dies entspricht einem Drittel der in der Schweiz vorkommenden Kleinsäugerarten. In der Tabelle 3 sind die Resultate zusammengefasst und geben an, in wie vielen Linien zu jeweils 10 Lebendfallen eine Art nachgewiesen werden konnte. Bei sieben Arten (70%) wurden für die sichere Artbestimmung den gefangenen Tieren Haarproben genommen. Aus finanziellen Gründen konnten nur jeweils einzelne Proben, welche möglichst repräsentativ für das Gebiet sind, genetisch bestimmt werden. Diese sicheren Artnachweise sind in der Tabelle 3.1 mit einem Stern markiert.

Alle Kotproben, welche in den Vergleichsgebieten (siehe Kapitel 3.1) gesammelt wurden, konnten erfolgreich analysiert werden. Die Methodik zur Sammlung des Kotes (Holzspieß, Sammelboxen) und die Lagerung haben gut funktioniert: es konnten aus allen Proben DNA amplifiziert werden.

Die **Analyse der Kotproben** ergab insgesamt 11 Arten, wovon vier Arten (*Sorex araneus*, *S. minutus*, *Microtus agrestis*, *Dryomys nitedula* und *Neomys anomalus*) nicht mit den Lebendfängen (inkl. Haarprobenbestimmung) nachgewiesen werden konnten. Andererseits fehlen die drei Arten *Neomys fodiens*, *Sorex araneus* und *S. minutus* in den Ergebnissen der Kotanalysen.

Tabelle 3: Resultate der zwei Nachweismethoden Lebendfang mit Longworth Lebendfallen und der Sammlung und Analyse von Kot in den beiden Vergleichsgebieten Lombachalp (9 Linien) und Auenschutzpark (11 Linien). Pro Linie wurden 10 Lebendfallen, resp. Kotröhren eingesetzt. Nach Abschluss der dreitägigen Lebendfangaktion wurden die Lebendfallen durch Kotröhren ersetzt. Diese wurden während sechs Wochen wöchentlich kontrolliert, der Kot eingesammelt und pro Linie analysiert.

Arten	Lombachalp		Auenschutzpark	
	Lebendfang	eDNA (Kot)	Lebendfang	eDNA (Kot)
<i>Neomys anomalus</i>	-	-	0	1
<i>Neomys fodiens</i>	1*	0		
<i>Sorex araneus</i>	0	5	0	1
<i>Sorex coronatus</i>	1*	1	0	6
<i>Sorex minutus</i>	0	3	-	-
<i>Sorex alpinus</i>	1	0	-	-
<i>Crocidura russula</i>	-	-	1	0
<i>Microtus arvalis</i>	1	1	4*	0
<i>Microtus lavernedii</i>	3	2	3*	0
<i>Microtus agrestis</i>	-	-	0	5
<i>Microtus subterraneus</i>	2*	0	-	-

<i>Myodes glareolus</i>	5	4	10	4
<i>Apodemus sp.</i>	5		1	
<i>Apodemus sylvaticus</i>	1*	4	2*	4
<i>Apodemus flavicollis</i>	1*	1	0	1
<i>Dryomys nitedula</i>	-	-	0	1

*: Artbestimmung aufgrund von Haarproben durch die Zürcher Hochschule für angewandte Wissenschaften (ZHAW)

Zwei dieser nur über den Kot nachgewiesenen Arten, *Dryomys nitedula* und *Neomys anomalus*, wurden noch nie in der weiteren Umgebung des Untersuchungsgebietes nachgewiesen. Eine Verwechslung mit dem verwandten Gartenschläfer kann laut Microsynth ausgeschlossen werden. Beide Arten wiesen nur in jeweils einer Probe mehr als 100 Reads auf. Mit 142 reads dürfte der Nachweis von *N. anomalus* auf eine Kreuzkontaminationen bei der Analyse zurückzuführen sein. Während die 6743 reads von *D. nitedula* nur mit einer Verunreinigung der Probe erklärt werden können. Für die weiteren Auswertungen wurden diese beiden Nachweise ausgeschlossen. Ebenso wurden alle Sequenzen mit weniger als 100 Reads sowie Nachweise nicht von Kleinsäugetern (Reh *Capreolus capreolus*, Wildschwein *Sus scrofa* und zwei Mal Mensch) in den weiteren Analysen nicht berücksichtigt.

Beim Vergleich der Resultate der zwei Methoden fällt auf, dass sich die Resultate der Kotanalysen für die zwei Gebiete teilweise stark von den Nachweisen mit Lebendfallen unterscheiden. So konnten mit der Kotanalyse mehr als die dreifache Anzahl von Nachweisen von Spitzmäusen erzielt werden.

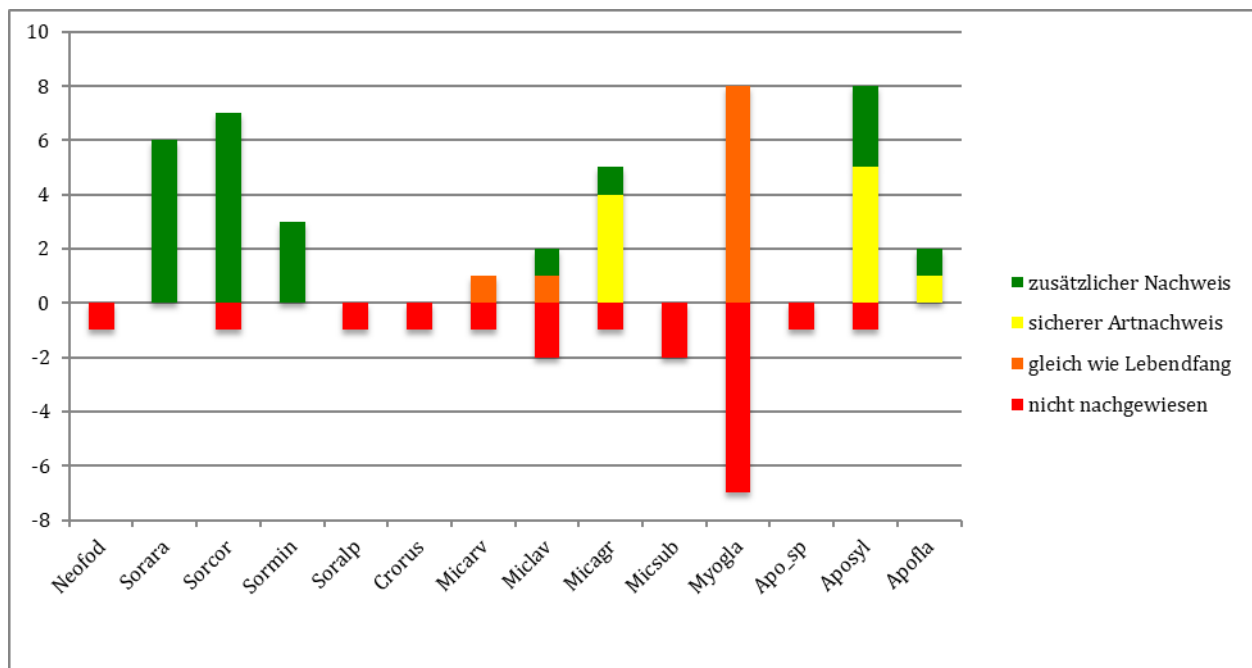
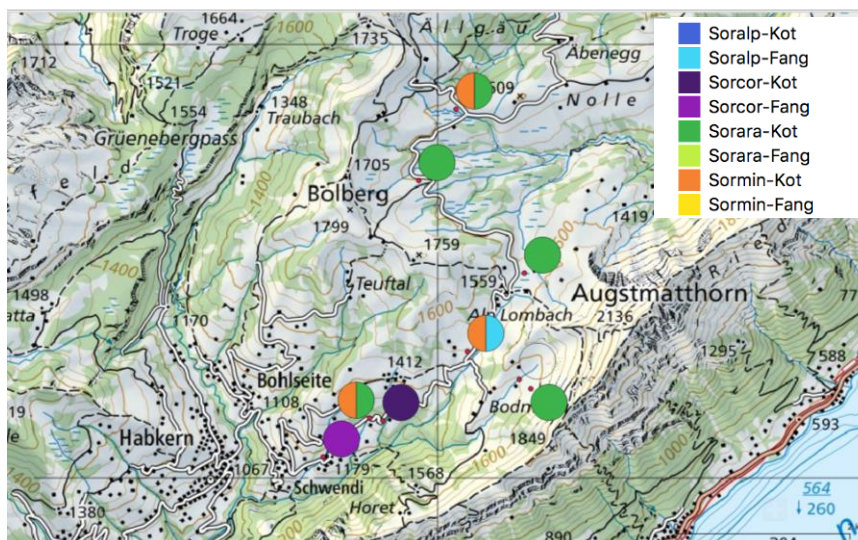


Diagramm 2: Vergleich der Ergebnisse der Lebendfänge mit Artbestimmung durch Haarproben und den Ergebnissen der Kotanalyse.

Die beiden Arten des **Sorex araneus aggr. Komplexes**, *Sorex araneus* und *S. coronatus* konnten an 13 Standorten mit Kot nachweisen werden (Tabelle 3), während sie nur an einem Standort gefangen werden konnten. Es lässt sich nun prüfen, ob diese nahe verwandten Arten in den beiden Vergleichsgebieten gemäss den Erwartungen identifiziert werden konnten.

Die Anteile, mit welchen die beiden Arten in den beiden Vergleichsgebieten nachgewiesen werden konnten, entsprechen den Erwartungen aus den Kenntnissen der Verbreitung diese Arten in der Schweiz.

Die Waldspitzmaus *Sorex araneus* hat ihr Hauptverbreitungsgebiet in den Voralpen und wurde häufiger im Gebiet Lombachalp nachgewiesen (Verhältnis 5:1, *S. araneus* zu *S. coronatus*). Der Nachweis von Schabrackenspitzmäusen *S. coronatus* in diesem Gebiet ist plausibel, da Nachweise dieser Art aus dem Gebiet bekannt sind (CSCF) und die Bestimmung der Haarprobe eines gefangenen Tieres ebenfalls diese Art ergab. Die Schabrackenspitzmaus ist im Mittelland verbreiteter und war im Auenschutzpark die häufiger nachgewiesene Art (Verhältnis 1:6, *S. araneus* zu *S. coronatus*). Die Präsenz der Waldspitzmaus in diesem Gebiet ist möglich, da diese im Jura ein zweiter Verbreitungsschwerpunkt hat und am Fuss der ersten Jurakette, in der Nähe von Oensingen ein Nachweis aus dem Jahr 2015 (CSCF) existiert.

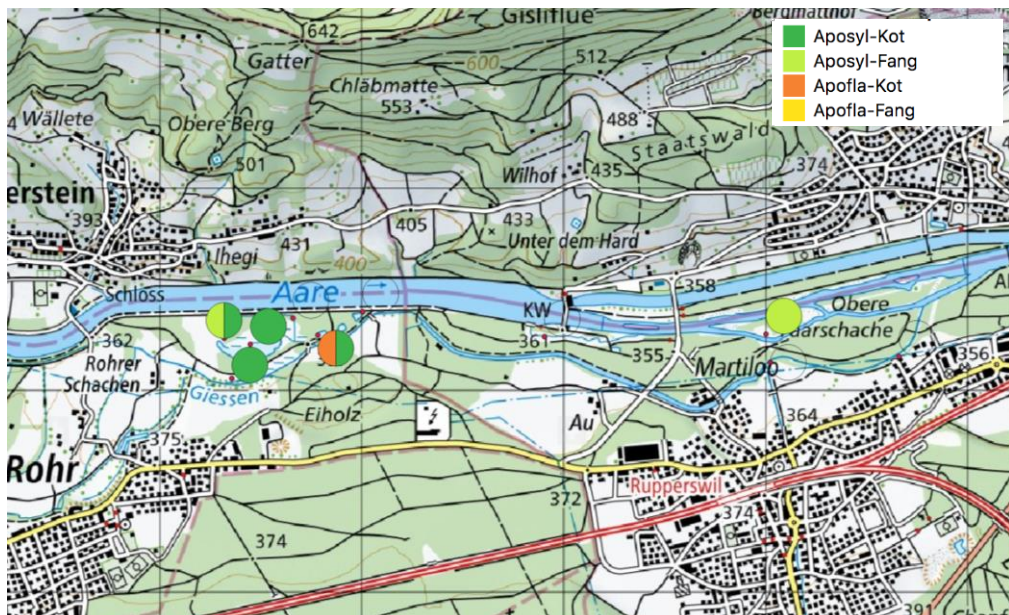
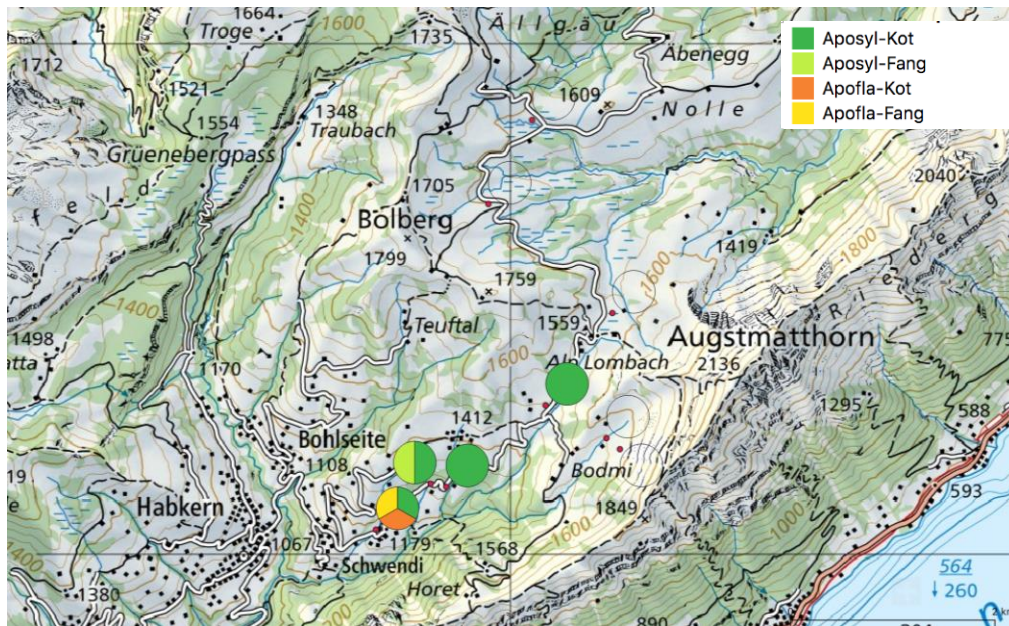


Karte 1: Verteilung der mit beiden Methoden erhaltenen Nachweise der Arten der Gattung *Sorex* in der Moorlandschaft Habkern-Sörenberg.

Zusätzlich konnte mit den Kotanalysen die Zwergspitzmaus *Sorex minutus* im Gebiet Lombachalp an mehreren Stellen nachgewiesen werden, während mit den Lebendfallen kein Tier gefangen werden konnte. Als Kontrast dazu konnten die beiden Arten Wasserspitzmaus *Neomys fodiens* und Alpenspitzmaus *Sorex alpinus* nicht mit den Kotanalysen nachgewiesen werden, während jeweils je ein Tier der Art gefangen werden konnte.

Beim Artenkomplex der **Erdmäuse** *Microtus agrestis aggr.* ist die Anzahl der Nachweise für beide Methoden vergleichbar, aber die Artzuweisung unterscheidet sich deutlich. Für das Gebiet Lombachalp ergaben die Kotanalysen ausschliesslich die Südliche Erdmaus *M. lavernedii*. Die genaue Artzugehörigkeit der lebend gefangenen Tiere wurde nicht genetisch geprüft, weil in den Alpen bis jetzt ausschliesslich diese Art nachgewiesen wurde. Insofern stimmen die Resultate der beiden Methoden vermutlich überein. Von den lebend gefangenen Tieren im Auenschutzpark wurden zwei Tiere genetisch bestimmt und aufgrund der Analysen der Zürcher Hochschule der angewandten Wissenschaften ZHAW, der Art *M. lavernedii* zugeordnet. Im Gegensatz dazu wurden alle im Kot gefundenen Sequenzen durch Microsynth der Art *M. agrestis* zugeordnet. Die genaue Verbreitung dieser Art ist in der Schweiz noch nicht ganz geklärt, sie ist aber sicher im Jura präsent. Aus diesem Grund erscheint das Vorkommen im Auenschutzpark, welcher sich am Fuss der ersten Jurakette befindet, plausibel.

Die Nachweise der Arten der Gattung *Apodemus* sind mit beiden Methoden weitgehend vergleichbar. Aufgrund der Variabilität der morphologischen Merkmale der beiden Arten, können diese nur mit genetischen Analysen sicher bestimmt werden, was bei den Lebendfängen aus Kostengründen nur für ausgewählte Tiere vorgenommen wird. Dies erklärt den hohen Anteil von sichereren Artnachweisen mit der Kotanalyse.



Karten 2a+b: Vergleich der mit Lebendfängen und Kotanalysen erhaltenen Nachweise von Waldmäusen *Apodemus sp.* in der Moorlandschaft Habkern-Sörenberg (oben) und Auenschutzpark des Kantons Aargau (unten).

Die Rötelmaus *Myodes glareolus* kann bei Lebendfängen eindeutig bestimmt werden und ist eine der häufigsten Kleinsäugerarten der Schweiz. Unklar ist, weshalb diese Art im Vergleichsgebiet Auenschutzpark an über der Hälfte der Standorte nicht mit den Kotanalysen nachgewiesen werden konnte.

5.4. Genetische Nachweise von Wasserspitzmäusen mit Wasserproben

Die Analyse der Wasserproben von Gewässern (je zwei Proben) aus drei Gebieten ergab erstmals für die Schweiz den Nachweis der gefährdeten Wasserspitzmaus *Neomys fodiens* mit dieser Methode. Sie konnte in beiden Proben des Standortes Glütschbach mit ähnlichem Umfang an Reads nachgewiesen werden. Weiter konnte an diesem Standort der Biber *Castor fiber* nachgewiesen werden. Diese Art konnte ebenfalls am Standort Himmelbach nachgewiesen werden, zusammen mit der Bisamratte *Ondatra zibethicus* und der Wanderratte *Rattus norvegicus*.

Für alle Arten war das Vorkommen an den jeweiligen Standorten bekannt und somit entsprechen die Resultate den Erwartungen.

Arten	Glütschbach (BE)		Himmelbach (ZH)		Schwarzbach (BE)	
	Probe 1	Probe 2	Probe 1	Probe 2	Probe 1	Probe 2
Biber <i>Castor fiber</i>	33'617	31'150	69'561	65'032		
Wasserspitzmaus <i>Neomys fodiens</i>	2'002	2'058				
Bisam <i>Ondatra zibethicus</i>			6'905	5'494		
Wanderratte <i>Rattus norvegicus</i>			1'233	1'071		

Tabelle 4: Ergebnisse der Analyse der Wasserproben durch die Firma SPYGEN. Für die Artzuweisung benutze SPYGEN ihre eigene, proprietäre Referenzdatenbank.

Diskussion

6. Nachweise von Kleinsäugetern mit DNA aus Wasser und Kot

Mit dem Beginn des Aufbaus der Referenzdatenbank für Kleinsäugeter der Schweiz konnte eine wichtige Ausgangslage für die Nutzung von genetischen Methoden zum Nachweis von Kleinsäugeterarten geschaffen werden. Der im Projekt ermittelte Abschnitt auf dem 16S, welcher genügend kurz ist, dass er für Metabarcoding genutzt werden kann und dennoch die Unterscheidung aller, bis jetzt in der Schweiz nachgewiesenen Kleinsäugeterarten, erlaubt, bildet eine wichtige Grundlage für zukünftige Anwendungen. Neben dem Nachweis von Kleinsäugetern aus Umweltproben (eDNA) kann dieser Abschnitt auch für die Bestimmung von „normalen“ DNA-Proben, z.B. aus Haarwurzeln oder Gewebe, verwendet werden.

Die zusätzlich mit dem Projekt erhaltenen, vollständigen Sequenzen des 16S Locus sowie der weiteren Loci 12S, IRBP und COX I, deren Herkunft dokumentiert und verlässlich ist, können, in Ergänzung zu den internationalen Sequenzdatenbanken, als Grundlage für weitere Anwendungen und Auswertungen dienen.

Die erfolgreiche Anwendung der zwei im Projekt geprüften Methoden, der Kotanalyse und Wasserprobenanalyse, ist eine erste praktische Nutzung der Referenzdatenbank. Auch zeigen die Resultate, dass beide Methoden grundsätzlich für den artspezifischen Nachweis von Kleinsäugetern funktionieren.

Dies ist wichtig, weil für die Kleinsäugeter der Schweiz mehrere Artenkomplexe, also Arten, welche nach dem aktuellen Stand des Wissens mit morphologischen Merkmalen nur schlecht voneinander abgegrenzt werden können, bekannt sind. Dadurch wurden in diesem Projekt zur Prüfung von neuen Methoden zum Nachweis von gefährdeten Kleinsäugeterarten in der Schweiz nur Methoden vertiefter geprüft, welche eine genetische Artbestimmung als Resultat haben und somit auch eine Unterscheidung zwischen Schwesterarten erlauben.

6.1. Bewertung von Nachweisen mit Wasserproben

Die Methode der Analyse von Wasserproben ist durch die grosse Erfahrung von SPYGEN gut etabliert und validiert. Allerdings sind die Zielarten, welche mit Hilfe dieser Methode nachgewiesen werden können, eingeschränkt auf Arten, welche sich regelmässig im Wasser aufhalten. Bei den Spitzmäusen sind dies die beiden Arten der Gattung *Neomys*. Die Sumpfspitzmaus *N. anomalus*, welche auf der überarbeiteten, aber noch nicht publizierten Roten Liste der Säugetiere als stark gefährdet (EN) eingestuft ist, und die als verletzlich (VU) eingestufte Wasserspitzmaus *N. fodiens*. Dazu kommen Neozoen, wie die Bismarckratte *Ondatra zibethicus*, Nutria *Myocastor coypus* oder der amerikanische Nerz *Neovision vison*.

Der im beschränkten Projektrahmen mögliche Methodenvergleich erlaubt keine Aussagen über die Entdeckungswahrscheinlichkeit. Also zu welchem Anteil eine in einem Gebiet vorkommende Art mit Wasserproben und einem bestimmten Sammlungsaufwand erkannt werden kann. Zusätzlich wäre für die Planung von Monitoringaktionen wichtig zu wissen, über welches Gebiet und Zeitraum eine Wasserprobe Aussagen liefert, also bis zu welcher Distanz und Zeit ein Tier nach einem Tauchgang noch nachgewiesen werden kann. Diese Faktoren sind für den Nachweis der angesprochenen Zielarten speziell wichtig, weil sich diese Tiere nur kurzzeitig im Wasser aufhalten und so vermutlich schwieriger nachzuweisen sind, als Fische oder Amphibien.

6.2. Bewertung der Nachweise durch die genetische Analyse von Kotproben

Der qualitative Vergleich der Ergebnisse der Analyse der Kotproben zeigt grundsätzlich eine hohe Übereinstimmung der Resultate mit den Erwartungen. Diese basieren auf den allgemeinen Kenntnissen über die Verbreitung der Kleinsäugerarten in der Schweiz, den Resultaten der Lebendfänge und der Kenntnis der Herkunft der gesammelten Kotpillen. Dies zeigt, dass vermutlich die meisten Kleinsäugerarten der Schweiz die Kotröhren aufsuchen und dort Spuren in Form von Kot hinterlassen. Die Unterschiede in der Anzahl Standorten mit Nachweisen (Tabelle 3) einer Art könnten jedoch Hinweise sein, dass die Kotröhren in der eingesetzten Form nicht für alle Arten gleich attraktiv sind. Die im Vergleich zu den Lebendfängen hohe Anzahl Standorte mit Nachweisen von Arten der Gattung *Sorex* sind erfreulich und zeigen das Potential, welches diese Methode für den Nachweis von gefährdeten Spitzmausarten haben könnte. Andererseits konnten mehrere Arten bisher über den Kot nicht nachgewiesen werden, welche mit Lebendfallen vereinzelt, ein- oder zweimalig, gefangen werden konnten. Aufgrund der Projektdurchführung kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, dass das Ergebnis der Kotanalyse durch die Reihenfolge, zuerst Lebendfang und anschliessend Kotröhren, beeinflusst wurde.

Theoretisch ideal wäre eine für alle Zielarten gleich attraktive Nachweis-Methode, um so einen repräsentativen Eindruck über die Artenzusammensetzung an einem Standort zu bekommen. Allenfalls müssten dazu, um den unterschiedlichen Lebensweisen der verschiedenen Kleinsäugerarten gerecht zu werden, verschiedene Methoden kombiniert werden, um damit das Artenspektrum breit abzudecken.

6.2.1. Schwierigkeiten bei der Interpretation der Ergebnisse

Die Interpretation der Ergebnisse der Methodenvergleiche hat mehrere Schwierigkeiten aufgezeigt. Die Festlegung der Schwelle zur Abgrenzung zwischen **Kreuzkontaminationen** und effektiven Nachweisen hat einen gewichtigen Einfluss auf das Resultat. Wird sie zu hoch angesetzt, gehen Nachweise von Arten, welche nur wenig Kot hinterlassen haben oder deren DNA schlecht amplifiziert wurde, verloren. Ist sie zu hoch, werden Arten an Standorten nachgewiesen, welche gar nicht dort vorkommen. Um diese Schwelle besser festlegen zu können, sind zusätzliche Erfahrung mit solchen Analysen nötig.

Die Referenzsequenzen von **Schwesterarten** unterscheiden sich teilweise in nur wenigen Nukleotiden, während innerhalb der Arten auch eine Variation bei den Sequenzen möglich ist. So unterscheiden sich die im Projekt erhaltenen Sequenzen der beiden Schwesterarten *Microtus agrestis* und *M. lavernedii* nur um drei Nukleotide. Gleichzeitig unterscheiden sich die Artzuweisungen für die im Auenschutzpark Aargau nachgewiesenen Arten. Während alle Haarproben der lebend gefangenen Tiere der Art *M. lavernedii* zugeordnet wurden, wurden die Nachweise über den Kot der Art *M. agrestis* zugeordnet.

Um Falschzuordnungen besser ausschliessen zu können wäre es sinnvoll, dass weitere Sequenzen des für die Zuweisung benutzten 16S Lokus gesammelt werden, um so die innerartliche, und allenfalls auch regionale, Variabilität zu erfassen und damit die Referenzdatenbank zu erweitern.

6.2.2. Verunreinigungen der Proben

Selbst wenn die oben erwähnten Schwierigkeiten berücksichtigt werden, enthalten die Resultate sehr unwahrscheinliche Ergebnisse. So enthalten die Resultate teilweise Arten, welche im Gebiet, in welchem die Probe genommen wurde, noch nie nachgewiesen wurden. Vorausgesetzt, dass hier nicht völlig überraschende Nachweise verborgen sind, ist dies ein Hinweis, dass bei der Sammlung und Verarbeitung noch Optimierungen in allen Bearbeitungsschritten notwendig sind, damit die Methode die erwarteten zuverlässigen artspezifischen Nachweise bringt. Die Methodik zur Sammlung der Proben hat grundsätzlich gut funktioniert, zukünftig muss jedoch noch besser darauf geachtet werden, dass die

Proben nicht verunreinigt werden. Bei der Sammlung entstandene Verunreinigungen mit DNA von Mensch oder Hund können das Analyseresultat beeinflussen, wenn von diesen Arten deutlich mehr DNA in der Probe enthalten ist als von den Zielorganismen. Im Unterschied zu den erwähnten Arten, können Verschleppungen von Kleinsäugerkot von einem Standort an einen anderen, resp. von einer Probe zu einer anderen, nicht erkannt werden und verfälschen das Ergebnis.

Aber auch bei der Verarbeitung der Proben, von der Zusammenstellung der Mischungen bis zur Sequenzierung der amplifizierten DNA, sind mutmasslich ebenfalls Kontaminationen vorgekommen. Dies würde erklären, warum in Proben aus dem Schweizer Mittelland Sequenzen des Baumschläfers gefunden werden konnten, einer Art, die nur in mehr als 200 km Entfernung vorkommt. Oder dass bei einer zu Testzwecken analysierten DNA-Mischungen das Ergebnis überhaupt nicht mit der Erwartung, also der gemischten DNA, übereinstimmte. Hier wird an die Feldbiologen eine neue Herausforderung beim Umgang mit den Proben gestellt.

7. Bedarf für weitere Abklärungen

Das Projekt zur Prüfung von neuen Methoden zum Nachweis von gefährdeten Kleinsäugerarten ist in vielen Teilen ein Pilotprojekt. Gerne würden wir die Ergebnisse des Projekts mit weiteren Fachpersonen diskutieren und weitere Abklärungen treffen. Insbesondere interessieren uns die folgenden Fragen:

- 7.1 Wie können Verunreinigungen der Proben durch Fremd-DNA reduziert werden?
- 7.2 Wie kann die unterschiedliche Artzuweisung der Erdmäuse im Auenschutzpark erklärt werden?
- 7.3 Funktioniert die Methode der Analyse von Kot bei Tieren der Gattung *Neomys* überhaupt?
- 7.4 Wie kann die innerartliche Variation der Sequenzen erfasst werden und wie stark unterscheidet sich diese zwischen den Arten?
- 7.5 Wie kann die Attraktivität der Kotröhren für Spitzmäuse gesteigert werden?

Schlussfolgerung

Mit dem Projekt zur Prüfung neuer Methoden zum Nachweis gefährdeter Kleinsäugerarten in der Schweiz konnten wertvolle Erfahrungen mit verschiedene Nachweismethoden für Kleinsäuger, insbesondere Spitzmäuse, gesammelt und eine gute Grundlage für die zukünftige Anwendung dieser Methoden gelegt werden. Die nicht-invasive Sammlung von Proben und Bestimmung dieser mit Hilfe von genetischen Methoden (Metabarcoding) hat ein grosses Potential, unsere Erkenntnisse über die Verbreitung der bedrohten Spitzmausarten in der Schweiz zu steigern und Monitoringaktionen für diese Artengruppe, zum Beispiel bei der Eingriffsplanung oder als Erfolgskontrolle bei Fördermassnahmen, zu vereinfachen.

Viele der in diesem Pilotprojekt aufgezeigten Unsicherheiten sind auf die noch fehlende Erfahrung im Einsatz dieser Methoden zum Nachweis von Kleinsäugetern zurückzuführen. Es wäre daher wichtig, diese Methoden in weiteren Projekten einsetzen zu können und die Erfahrungen systematisch zu sammeln. Zudem bieten die erarbeiteten Grundlagen und die Referenzdatenbank auch neue Möglichkeiten um die Aussagekraft der Lebendfänge zu steigern. Es wäre wünschenswert, dass die verschiedenen Methoden in Projekten gemeinsam eingesetzt werden können, so dass umfassende Erfahrungen zur Nachweisbarkeit der Kleinsäuger gesammelt werden können.

Trotz des im Vergleich zu den Lebendfängen einfacheren Vorgehens zur Sammlung von Proben, benötigt der Einsatz der neuen Nachweis-Methoden und insbesondere die Interpretation der Resultate solide Kenntnisse der Ökologie und der Verbreitung der Kleinsäuger der Schweiz.

Literatur

- Andersen, K., Bird, K. L., Rasmussen, M., Haile, J., Breuning-Madsen, H., Kjaer, K. H., Willerslev, E. (2012). Meta-barcoding of 'dirt' DNA from soil reflects vertebrate biodiversity. *Molecular Ecology*, 21, 1966–1979.
- Chiron, F., Hein, S., Chargé, R., Julliard, R., Martin, L., Roguet, A., Jacob, J. (2018). Validation of hair tubes for small mammal population studies. *Journal of Mammalogy*. 99.
- Churchfield, S., Barber, J., Quinn, C. (2000) A new survey method for water shrews (*Neomys fodiens*) using baited tubes. *Mammal Review*, 30.3-4: 249-254.
- Deiner, K., Bik, H., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière-Roussel, A., Altermatt, F., Creer, S., Bista, I., Lodge, D., de Vere, N., Pfrender, M., Bernatchez, L.. (2017). Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology*. 26. 10.1111/mec.14350.
- Ferreira, C., Sabino-Marques, H., Barbosa, S., Costa, P., Encarnação, C., Alpizar-Jara, R., Pita, R., Beja, P., Mira, A., Searle, J., Paupério, J. & Alves, P. (2018). Genetic non-invasive sampling (gNIS) as a cost-effective tool for monitoring elusive small mammals. *European Journal of Wildlife Research*. 64.
- Henry, P., Russello, M. (2012). Obtaining high-quality DNA from elusive small mammals using low-tech hair snares. *European Journal of Wildlife Research*. 57. 429-435.
- Igea, J., Aymerich, P., Bannikova, A.A. (2015) Multilocus species trees and species delimitation in a temporal context: application to the water shrews of the genus *Neomys*. *BMC Evol Biol* 15, 209.
- Legall, N., Kett, S., Timmermans, D. (2015). Nature read in tooth and fur: Non-invasive sampling of the Lundy pygmy shrew (*Sorex minutus* Linnaeus, 1766) for population genetics.
- Moran, S., Turner, P.D., O'Reilly, C., 2008. Non-invasive genetic identification of small mammal species using real-time polymerase chain reaction. *Molecular Ecology Resources*, 8(6), pp.1267–1269.
- Pocock, M.J.O. und Jennings, N. (2006), Use of hair tubes to survey for shrews: new methods for identification and quantification of abundance. *Mammal Review*, 36: 299-308.
- Poulakakis, N., Lymberakis, P., Paragamian, K., Mylonas, M.. (2005). Isolation and amplification of shrew DNA from barn owl pellets. *Biological Journal of the Linnean Society*. 85. 331 - 340.
- Reiners, T.E., Encarnação, J.A., Wolters, V., 2011. An optimized hair trap for non-invasive genetic studies of small cryptic mammals. *European Journal of Wildlife Research*, 57(4), pp.991–995.
- SWILD, 2017. Pilotprojekt zur Prüfung von neuen Methoden zum Nachweis von Wasserspitzmäusen (*Neomys* sp.) im Auenschutzpark des Kantons Aargau, 13 Seiten.
- Ushio, M., Fukuda, H., Inoue, T., Makoto, K., Kishida, O., Sato, K., Murata, K., Nikaido, M., Sado, T., Sato, Y., Takeshita, M., Iwasaki, W., Yamanaka, H., Kondoh, M. (2017). Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water. *Molecular ecology resources*. 17.

Kontaktangaben der evaluierten Analyse-Labore:

Microsynth, Balgach, www.microsynth.ch

SpyGen, 73375 Le Bourget du Lac Cedex, France, www.spygen.com

Applied Genomics Ltd, Brixham, UK, <https://appliedgenomics.co.uk>

AIM - Advanced Identification Methods GmbH, Leipzig, Deutschland, <http://www.aimethods-lab.com>

Anhang 1: Artnachweise Vergleichsgebiete

Lombachalp, Moorlandschaft Habkern-Sörenberg (Kanton Bern)

Arten	Linie																	
	1		3		5		10		12		15		16		17		19	
	Fang ¹	Kot ²	Fang ¹	Kot ²	Fang ¹	Kot ²	Fang ¹	Kot ²	Fang ¹	Kot ²	Fang ¹	Kot ²	Fang ¹	Kot ²	Fang ¹	Kot ²	Fang ¹	Kot ²
<i>Neomys fodiens</i>	1 *																	
<i>Sorex araneus</i>		3827		47851		2442		25517										1265
<i>Sorex coronatus</i>													498					1 *
<i>Sorex minutus</i>		523										1197						6948
<i>Sorex alpinus</i>										1								
<i>Microtus arvalis</i>					4	66231												
<i>Microtus lavernedii</i>	2	551	3		2				36700									
<i>Microtus subterraneus</i>			3 *		1													
<i>Myodes glareolus</i>	1	61017								2	26614	5	29802	2	338			6
<i>Apodemus sp.</i>							3			4		2		7				7
<i>Apodemus sylvaticus</i>											3442		690	1 *	36279			26147
<i>Apodemus flavicollis</i>																		1 * 31738

¹: Anzahl gefangene Tiere in der Linie bestehend aus 10 Longworth Kleinsäugerlebensfallen

²: Anzahl Reads

*: Artbestimmung aufgrund von Haarproben durch die Zürcher Hochschule für angewandte Wissenschaften (ZHAW)

Rohrer- und Ruppertsweiler Schachen, im Abschnitt Aarau-Wildegg des Auenschuttparks des Kantons Aargau

Arten	Linie																				
	1		2		3+11a		4		5		6		7+8		9		10		11b		
	Fang ¹	Kot ²	Fang ¹	Kot ²	Fang ¹	Kot ²	Fang ¹	Kot ²	Fang ¹	Kot ²	Fang ¹	Kot ²	Fang ¹	Kot ²	Fang ¹	Kot ²	Fang ¹	Kot ²	Fang ¹	Kot ²	
<i>Sorex araneus</i>										577											
<i>Sorex coronatus</i>		7252		3888		5444		4971		3740											2799
<i>Crocidura russula</i>			1																		
<i>Microtus arvalis</i>							4 *														
<i>Microtus lavernedii</i>						9 *		5			2 *										
<i>Microtus agrestis</i>				272		378		393		305											207
<i>Myodes glareolus</i>	5		5		1		1	318	2		4	580	4		1		2	19547	1	547	
<i>Apodemus sp.</i>																	1				
<i>Apodemus sylvaticus</i>							3 *					5127	436		50150		1	15726			
<i>Apodemus flavicollis</i>												74036									

¹: Anzahl gefangene Tiere in der Linie bestehend aus 10 Longworth Kleinsäugerlebensfallen

²: Anzahl Reads

*: Artbestimmung aufgrund von Haarproben durch die Zürcher Hochschule für angewandte Wissenschaften (ZHAW)

Anhang 2: Analyseergebnis Wasserproben

Scientific name	Genetic database	Glütschbach		Himmelbach		Schwarzbach	
		SPY192802	SPY192804	SPY192805	SPY192806	SPY192803	SPY192801
		Number of DNA sequences	Number of DNA sequences	Number of DNA sequences	Number of DNA sequences	Number of DNA sequences	Number of DNA sequences
<i>Castor fiber</i>	SPYGEN	33'617	31'150	69'561	65'032		
<i>Mustela putorius</i>	SPYGEN			*			
<i>Neomys fodiens</i>	SPYGEN	2'002	2'058				
<i>Ondatra zibethicus</i>	SPYGEN			6'905	5'494		
<i>Rattus norvegicus</i>	SPYGEN			1'233	1'071		

" * " : DNA quantity insufficient to certify the detection of the taxa in the sample.

Anhang 3: Gewebeproben für Referenzdatenbank

Probe	Herkunft Probe	Bezeichnung Tier	Artname	Bestimmungsmethode	Gemeinde	Kanton	Land
1	Naturmuseum Südtirol	MAM 917	Dryomys nitedula	äußere Merkmale, Schädel	Sarnthal	Südtirol	Italien
2	Bündner Naturmuseum		Crocidura leucodon	morphologisch	Chur	Graubünden	Schweiz
3	Bündner Naturmuseum	BNM 017078	Glis glis	morphologisch	Chur	Graubünden	Schweiz
4	Bündner Naturmuseum	BNM 017069	Rattus rattus	morphologisch	Locarno	Tessin	Schweiz
5	Bündner Naturmuseum	BNM 004830	Eliomys quercinus	morphologisch	Poschiavo	Graubünden	Schweiz
6	Naturmuseum St. Gallen	V7366	Muscardinus avellanarius	morphologisch	Amden	St. Gallen	Schweiz
7	Museo cantonale di storia naturale	VT 1736a	Microtus subterraneus	morphologisch	Sant'Antonio	Tessin	Schweiz
8	Museo cantonale di storia naturale	VT 1710a	Chionomys nivalis	morphologisch	Anzonico	Tessin	Schweiz
9	Museo cantonale di storia naturale	VT 2031	Talpa europaea	morphologisch	Prato	Tessin	Schweiz
10	Museo cantonale di storia naturale	VT 1941a	Talpa caeca	morphologisch	Gnosca	Tessin	Schweiz
11	Museo cantonale di storia naturale	V 1558	Micromys minutus	morphologisch	Toricella del Pizzo	Lombardia	Italien
12	Naturmuseum Solothurn	ZMK 054	Microtus lavernedii	genetisch (ZHAW)	Innereriz	Bern	Schweiz
13	Naturmuseum Solothurn	ZMK 444	Rattus norvegicus	morphologisch	Praz	Freiburg	Schweiz
14	Naturmuseum Solothurn	ZMK 016	Mus domesticus	genetisch (ZHAW)	Herrenschwanden	Bern	Schweiz
15	Naturmuseum Solothurn	ZMK 268	Sorex coronatus	genetisch (ZHAW)	Rüttenen	Solothurn	Schweiz
16	Naturmuseum Solothurn	ZMK 061	Arvicola terrestris	morphologisch	Fahrni	Bern	Schweiz
17	Naturmuseum Solothurn	ZMK 240	Apodemus flavicollis	genetisch (ZHAW)	Jens	Bern	Schweiz
18	Naturmuseum Solothurn	ZMK 296	Microtus arvalis	genetisch (ZHAW)	Innereriz	Bern	Schweiz
19	Naturmuseum Solothurn	ZMK 555	Myodes glareolus	morphologisch	Schüpbach	Bern	Schweiz
20	Naturmuseum Solothurn	ZMK 150	Crocidura russula	morphologisch	Grenchen	Solothurn	Schweiz
21	Naturmuseum Solothurn	ZMK 166	Apodemus sylvaticus	genetisch (ZHAW)	Biberist	Solothurn	Schweiz
22	Bündner Naturmuseum	BNM-F 013030	Apodemus alpicola	genetisch (ZHAW)	Sumvitg	Graubünden	Schweiz
23	Bündner Naturmuseum	BNM-F 013015	Microtus multiplex	genetisch (ZHAW)	Bregaglia	Graubünden	Schweiz
24	ZHAW	CC_WILMA_2	Neomys fodiens	genetisch (ZHAW)	Oberrieden	Zürich	Schweiz
25	Bündner Naturmuseum	BNM-F 013027	Sorex minutus	genetisch (ZHAW)	Klosters-Serneus	Graubünden	Schweiz
26	ZHAW	18_035	Sorex araneus	genetisch (ZHAW)	Veytaux	Vaud	Schweiz

27	ZHAW	18_057	Crocidura suaveolens	genetisch (ZHAW)	Santa Margherita	Tessin	Schweiz
Probe	Herkunft Probe	Bezeichnung Tier	Artname	Bestimmungsmethode	Gemeinde	Kanton	Land
28	Naturmuseum St. Gallen	V7069	Neomys anomalus milleri	genetisch (ZHAW)	Neunforn	Thurgau	Schweiz
29	ZHAW	18_170	Sorex antinorii	genetisch (ZHAW)	Poschiavo	Tessin	Schweiz
30	Museo cantonale di storia naturale	VE 0369	Suncus etruscus	morphologisch	Lugano	Tessin	Schweiz
31	Drosera		Microtus savii	morphologisch	Stabio	Tessin	Schweiz
32	Michel Blant	8-1-1	Microtus agrestis	genetisch (Uni NE)	Tavannes	Bern	Schweiz
33	SWILD	-	Talpa caeca	morphologisch	Faido	Tessin	Schweiz
34	SWILD		Talpa europaea	morphologisch	Unterschächen	Uri	Schweiz
35	Uni Zürich	CN16-075	Chionomys nivalis	morphologisch	Churwalden	GR	Schweiz
36	SWILD		Sorex alpinus	morphologisch	Bristen	Uri	Schweiz
37	Ladurner Eva		Dryomys nitedula	morphologisch	Percha	Südtirol	Italien