

## Italienische Wasserfrösche (*Pelophylax bergeri*) in Vorarlberg, Österreich. Umwelt-DNA (eDNA) zur Artbestimmung

Nr. 74 - 2020

Markus Grabher<sup>1</sup> & Maria Aschauer<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Mag. Markus Grabher, Mag. Maria Aschauer  
UMG Umweltbüro Grabher, Marktstraße 18d, A-6850 Dornbirn  
E-Mail: office@umg.at

### Zusammenfassung

Umwelt-DNA-Untersuchungen (eDNA) sind eine relativ neue Methode, um Arten anhand ihrer genetischen Spuren nachzuweisen, die sie in der Umwelt hinterlassen. Im Rahmen der Aktualisierung der Roten Liste der Amphibien und Reptilien Vorarlbergs wurden 2019 im Auftrag der *inatura* eDNA-Untersuchungen durchgeführt mit dem Ziel, den Status der Wasserfrösche in Vorarlberg abzuklären. Dabei zeigte sich, dass der ursprünglich nicht heimische Italienische Wasserfrosch (*Pelophylax bergeri*) – ähnlich wie in der Schweiz – bereits weit verbreitet ist und die heimischen Wasserfrösche großflächig ersetzt hat. Dies ist auch in Hinblick auf die Fauna-Flora-Habitat-Richtlinie von Bedeutung, da der Kleine Wasserfrosch (*Pelophylax lessonae*) durch die Listung in Anhang IV besonderen Schutz durch die Europäische Union genießt.

**Key words:** Wasserfrösche, Italienischer Wasserfrosch, *Pelophylax bergeri*, *Pelophylax lessonae/esculentus*-Komplex, eDNA, Neozoa, Vorarlberg

### 1 Einleitung

In Vorarlberg kommen mehrere sehr ähnliche »Grünfrösche«, also Wasserfrösche, vor: Ursprünglich waren der Kleine Wasserfrosch (*Pelophylax lessonae*) und die Hybridform Teichfrosch (*Pelophylax* kl. *esculentus*) heimisch (ASCHAUER et al. 2008). Der Seefrosch (*Pelophylax ridibundus*) bzw. der Seefrosch-Komplex (vgl. DUFRESNES et al. 2018), der sich akustisch anhand der keckernden Paarungsrufe von den anderen beiden Formen relativ einfach unterscheiden lässt, wurde hingegen eingeschleppt und hat sich lokal stark ausgebreitet (GRABHER et al. 2015).

Genetische Untersuchungen in der Schweiz zeigten, dass sich eine weitere, ursprünglich nicht heimische Wasserfroschart großräumig etabliert hat: Der Italienische Wasserfrosch (*Pelophylax bergeri*) hat sich in nahezu der gesamten Schweiz mit den heimischen Formen vermischt bzw. diese



**Abb. 1:** Wasserfrösche sind den ganzen Sommer über an Gewässern anzutreffen und für die lautstarken Froschkonzerte verantwortlich. Vermutlich wurden die heimischen Formen auch in Vorarlberg bereits nahezu vollständig durch den Italienischen Wasserfrosch ersetzt, dessen natürliches Verbreitungsgebiet Italien südlich der Poebene, Sizilien und Korsika umfasst. Kleiner und Italienischer Wasserfrosch sind Schwesternarten, die zwar genetisch unterschiedlich sind, sich morphologisch und in ihren Rufen aber sehr gleichen (PLÖTNER 2005). Wie bei uns der Kleine Wasserfrosch ist auch der Italienische Wasserfrosch in seiner Heimat mit einer Hybridform vergesellschaftet, die aus einer Kreuzung mit dem Seefrosch hervorgegangen ist – dem Italienischen Hybridfrosch (*Pelophylax* kl. *hispanicus*) (GLANDT 2015).

ersetzt. Ursprüngliche Kleine Wasserfrösche wurden nur mehr im Vallée de Joux nahe der französischen Grenze und im Kanton Tessin nachgewiesen. Vermutlich wurden die Italienischen Wasserfrösche bereits vor den 1960er-Jahren mehrfach aus Mittelitalien in die Schweiz verbracht (DUFRESNES et al. 2017).

Im Rahmen der Überarbeitung der Roten Liste der Amphibien und Reptilien Vorarlbergs stellte sich daher die Frage nach dem Status der bisher als heimisch bewerteten Wasserfroschgruppe in Vorarlberg.

## 2 Die komplizierte Verwandtschaft der Wasserfrösche

Fortpflanzung und Verwandtschaft unserer Wasserfrösche sind kompliziert und folgen anderen Prozessen, als wir das beispielsweise von den meisten Säugetieren oder Vögeln kennen. Da sich Wasserfrösche beliebig untereinander kreuzen können, ist die Ausbreitung nicht heimischer Formen (Neozoen) besonders problematisch. Die europäischen Formen bilden einen Komplex aus mehreren nahe verwandten Arten und hybriden Mischformen (PLÖTNER 2005). Die Entdeckung der Hybridogenese vor etwa 50 Jahren war eine bahnbrechende Erkenntnis in der Amphibienforschung: Der Teichfrosch ist nämlich keine eigenständige Art im herkömmlichen Sinn, sondern aus der Kreuzung von Kleinem Wasserfrosch und Seefrosch hervorgegangen. Bei der Keimzellenbildung wird der Chromosomensatz einer Elternart vollständig eliminiert und nur der Chromosomensatz der zweiten erhalten. Damit die Hybridform bestehen bleibt, muss die Paarung deshalb mit jener Elternart erfolgen, deren genetische Information entfernt wurde. Unsere Teichfrösche können sich deshalb nur mit dem Kleinen Wasserfrosch erfolgreich fortpflanzen. In anderen Regionen wurden dennoch manchmal auch reine Teichfroschpopulationen beobachtet – dort übernehmen triploide Tiere

mit dreifachem anstelle des üblichen zweifachen Chromosomensatzes die Rolle der Elternart (TUNNER 1996, 2001). Seit wann die Hybridform existiert, ist unbekannt. Die weite Verbreitung in Gebieten, in denen nur eine Elternart vorkommt, spricht aber für ein relativ hohes Alter, möglicherweise sind sie aber auch erst am Ende der letzten Eiszeit vor etwa 10.000 Jahren entstanden (TUNNER 2001).

## 3 Erhebungen

Die Bestimmung der heimischen Wasserfrösche nach morphologischen Kriterien ist schwierig und erfordert die exakte Vermessung der Form des Fersenhöckers – einer Erhebung an der Basis der ersten Zehe an den Hinterfüßen – sowie zumindest die exakte Bestimmung der Längenverhältnisse von Körper-Rumpf-Länge zu Unterschenkel-Länge, der Länge der ersten Zehe zur Fersenhöckerlänge und der Unterschenkel-Länge zur Fersenhöckerlänge (GÜNTHER 1996; vgl. auch PLÖTNER 2010). Durch die Ausbreitung nicht heimischer Arten ist eine Identifikation anhand morphologischer Merkma-

le jedoch nahezu unmöglich geworden. Eine exakte Bestimmung ist in der Regel nur mehr durch genetische Methoden möglich (INFO FAUNA – KARCH o. J.). Zur Feststellung der Artzugehörigkeit der in Vorarlberg vorkommenden Wasserfrösche wurden 2019 genetische Analysen mittels Umwelt-DNA (eDNA) durchgeführt. Für diese relativ neue Methode reicht eine Wasserprobe zur Bestimmung: Die vorkommenden Amphibien werden anhand der DNA-Spuren identifiziert, die sie in ihrem Wohngewässer hinterlassen (z. B. über Ausscheidungen, Drüsen-sekrete oder abgestoßene Haut). Wie bei anderen Erfassungsmethoden ist auch bei eDNA-Untersuchungen der Erfassungszeitpunkt wichtig, da eine Art nur nachgewiesen werden kann, wenn sie im Gewässer präsent ist bzw. bis maximal zwei Wochen nach dem Verlassen des Gewässers (vgl. HOLDER-EGGER et al. 2019; SCHMIDT & GRÜNIG 2017). Umwelt-DNA-Untersuchungen liefern Artnachweise, erlauben jedoch keine Aussagen zu Entwicklungsstadien oder zur Häufigkeit der vorkommenden Taxa. Zudem ist der Nachweis von Hybriden nicht möglich. Im Fall der Wasserfrösche bedeutet dies, dass



Abb. 2: Entnahme einer Wasserprobe zur Umwelt-DNA-Analyse: Mit einem speziellen Probennahme-Werkzeug werden aus einem oder aus mehreren Gewässern Wasserproben aus dem Uferbereich, in dem sich Amphibien am wahrscheinlichsten aufhalten, entnommen und in einer neuen, ungebrauchten PET-Flasche gesammelt. Die Anzahl der entnommenen Wasserproben steigt mit der Größe der Gewässer, es wird etwa alle 10 bis 20 m Uferstrecke, mindestens jedoch an drei bis fünf Stellen, eine Probe gezogen.

keine Unterscheidung von Kleinem Wasserfrosch und der Hybridform Teichfrosch möglich ist. Trotz der nahen Verwandtschaft, die bei manchen Wasserfroscharten zu Problemen selbst bei der Bestimmung mittels Umwelt-DNA-Analysen führt, ist jedoch die Trennung von heimischen Grünfroschformen (*Pelophylax lessonae/esculentus*-Komplex) und dem Italienischen Wasserfrosch möglich (HOLDEREGGER et al. 2019)

2019 wurden im Auftrag der inatura 14 Gewässer bzw. Gewässerkomplexe mittels eDNA beprobt. Die Beprobung erfolgte mittels der Feldmethodik des Büros ARNAL – Büro für Natur und Landschaft AG in Herisau (CH), die Laboranalysen führte die Firma Microsynth Ecogenics GmbH der Microsynth AG (Balgach, CH) durch. Parallel dazu wurde eine Probe durch die Sinsoma GmbH (Völs, A) analysiert. Gewässer-auswahl und Geländearbeit vor Ort wurden durch UMG vorgenommen.

#### 4 Ergebnisse und Diskussion

Insgesamt wurden in zehn Proben Wasserfrösche nachgewiesen – in sieben Proben ausschließlich Spuren Italienischer Wasserfrösche, in drei Proben sowohl DNA-Information von Italienischen als auch von heimischen Grünfröschen. DNA des Italienischen Wasserfroschs wurde durch beide Labors bestätigt. Auch im Rahmen des Projekts »Erstellung einer DNA-Barcode-Bibliothek für österreichische Amphibien und Reptilien« im Rahmen der Initiative »Austrian Barcode of Life (ABOL)« wurde bei einem Grünfrosch aus dem Rheindelta genetisches Material des Italienischen Wasserfroschs nachgewiesen (ZANGL et al. 2020).

Der Italienische Wasserfrosch zählt somit zur Vorarlberger Amphibienfauna. Die Ergebnisse deuten auf ähnliche Verhältnisse wie in der Schweiz: Die heimischen Wasserfroschformen wurden wahrscheinlich bereits im gesamten Vorarlberger Verbreitungsareal durch Italienische Wasserfrösche



Abb. 3: Proben für die Laboranalyse. Aus der in der PET-Flasche gesammelten Mischprobe werden pro Untersuchungsstandort drei Proben für die Analyse im Labor gewonnen, indem vor Ort eine definierte Wassermenge mit einer Pufferlösung vermischt wird. Die Laborproben werden kühl transportiert und bis zur Übermittlung ans Labor tiefgekühlt.

»unterwandert«. DNA heimischer Grünfrösche konnten bei den Untersuchungen 2019 nur im nördlichen Rheintal bzw. am Bodensee und auch hier nur gemeinsam mit DNA von Italienischen Wasserfröschen nachgewiesen werden. Dies deutet darauf, dass der Verdrängungs- bzw. Vermischungsprozess noch nicht vollständig abgeschlossen ist. Möglicherweise ist das in Zusammenhang mit den besonders individuenstarken Populationen im Bodenseegebiet zu sehen – der vollständige Ersatz dauert hier vermutlich länger, eventuell können die verschiedenen Wasserfrosch-Formen in großräumigen Habitaten mit großer Gewässerdiversität auch länger gemeinsam koexistieren (LEUENBERGER et al. 2014). Auch die zweite nicht heimische Grünfrosch-Art, der Seefrosch, der im südlichen und mittleren Vorarlberger Rheintal zur dominierenden Wasserfrosch-Art wurde, konnte im Bodenseeraum noch keine großen Populationen entwickeln und kommt hier bislang erst vereinzelt vor; ökologische Nischentrennung scheint für die Erhaltung der unterschiedlichen Arten wichtig zu sein (vgl. auch PAGANO et al. 2001).

Es ist wahrscheinlich, dass die heimischen Formen in naher Zukunft vollständig durch den Italienischen Wasserfrosch verdrängt werden. Nach derzeitigem Datenstand ist anzunehmen, dass Kleiner Wasserfrosch und Teichfrosch in Vorarlberg jedenfalls bereits sehr selten sind. Ob überhaupt noch ursprüngliche, unvermischte Bestände existieren, ist fraglich, kann mit den vorliegenden Untersuchungen aber nicht endgültig beantwortet werden. Die Ergebnisse in der Schweiz zeigen, dass sich heimische Formen nur in isolierten Populationen halten können (DUFRESNES et al. 2017). Damit ist eine europaweit geschützte Amphibienart in Vorarlberg möglicherweise bereits verschwunden oder wird in absehbarer Zeit erlöschen, denn der Kleine Wasserfrosch ist im Anhang IV der Flora-Fauna-Habitat-Richtlinie der Europäischen Union gelistet und unterliegt somit dem strengen Artenschutz. Die über lange Zeit unerkannte Ausbreitung des Italienischen Wasserfroschs ist vielleicht auch dafür verantwortlich, dass sich Teichfrosch und in geringerem Maße auch Kleiner Wasserfrosch – bzw. Individuen, die dafür gehalten wurden – in vielen



Regionen in den letzten zwanzig Jahren ausgebreitet und ökologische Nischen besetzt haben, die bisher anderen Amphibienarten vorbehalten waren (BÜHLER et al. 2014). Bestandserhebungen im Kanton Aargau zeigten, dass Bestände von Gelbbauchunken und Geburtshelferkröten, teils auch von Kreuzkröten, signifikant kleiner sind, wenn im selben Gewässer auch Wasserfrösche vorkommen (ROTH et al. 2016). Auch im Rheinholz sind anspruchsvolle Arten wie Gelbbauchunke bei gleichzeitigem Vorkommen von Wasserfröschen seltener (MOSER 2015). Das Beispiel des Italienischen Wasserfroschs zeigt, wie problematisch das

Freisetzen nicht heimischer Amphibien ist – nicht umsonst gelten eingeschleppte Arten als eine wesentliche Bedrohung für die Artenvielfalt (vgl. z. B. BELLARD et al. 2016, MEASEY et al. 2016). Im Fall des Italienischen Wasserfroschs ist es vermutlich bereits zu spät, da sich der Verdrängungs- bzw. Vermischungsprozess nicht mehr rückgängig machen lässt.

## 5 Dank

Dank gebührt der inatura Erlebnis Naturschau GmbH für die Finanzierung dieser Untersuchung.

## 6 Literatur

- ASCHAUER, M., GRABHER, M., HUBER, D., LOACKER, I., TSCHISNER, C. & AMANN, G. (2008): Rote Liste gefährdeter Amphibien und Reptilien Vorarlbergs. – Rote Listen Vorarlbergs, 5: 124 S.; Dornbirn (inatura).
- BELLARD, C., CASSEY, P. & BLACKBURN, T. M. (2016): Alien species as a driver of recent extinctions. – *Biology Letters*, 12: 20150623 (4 pp.); doi: 10.1098/rsbl.2015.0623
- BÜHLER, C., ROTH, T. & AMRHEIN, V. (2014): Verdrängen Seefrosch und Teichfrosch gefährdete Amphibienarten? – *Natur/Landschaft Inside*, 2014(4): 26-30.
- DUFRESNES, C., DI SANTO, L., LEUENBERGER, J., SCHUERCH, J., MAZEPA, G., GRANDJEAN, N., CANESTRELLI, D., PERRIN, N. & DUBEY, S. (2017): Cryptic invasion of Italian pool frogs (*Pelophylax bergeri*) across Western Europe unraveled by multilocus phylogeography. – *Biological Invasions*, 19(5): 1407-1420.
- DUFRESNES, C., LEUENBERGER, J., AMRHEIN, V., BÜHLER, C., THIÉBAUT, J., BOHNENSTENGEL, T. & DUBEY, S. (2018): Invasion genetics of marsh frogs (*Pelophylax ridibundus sensu lato*) in Switzerland. – *Biological Journal of the Linnean Society*, 123(2): 402-410.
- GLANDT, D. (2015): Die Amphibien und Reptilien Europas. Alle Arten im Porträt. – 716 S., Wiebelsheim (Quelle & Meyer)
- GRABHER, M., ASCHAUER, M., STRAUSS, A. & LOACKER, I. (2015): Ausbreitung des Seefrosches (*Pelophylax ridibundus*) im Vorarlberger Rheintal. – *inatura - Forschung online*, 14: 5 S.
- GÜNTHER, R. (1996): Bestimmungsteil Amphibien. – In: GÜNTHER, R. (Hrsg.): Die Amphibien und Reptilien Deutschlands. 825 S. (48-69); Jena, Stuttgart (Gustav Fischer).
- HOLDEREGGER, R., STAPFER, A., SCHMIDT, B., GRÜNIC, C., MEIER, R., CSENCICS, D. & GASSNER, M. (2019): Werkzeugkasten Naturschutzgenetik: eDNA Amphibien und Verbund. – *WSL Berichte*, 81: 56 S.
- INFO FAUNA - KARCH (o.J.): Wasserfrosch-Komplex. – <http://www.karch.ch/karch/de/home/amphibien/amphibienarten-deutschweiz/Wasserfrosch-Komplex.html>, Neuchâtel (info fauna). [zuletzt abgerufen am 30.03.2020]

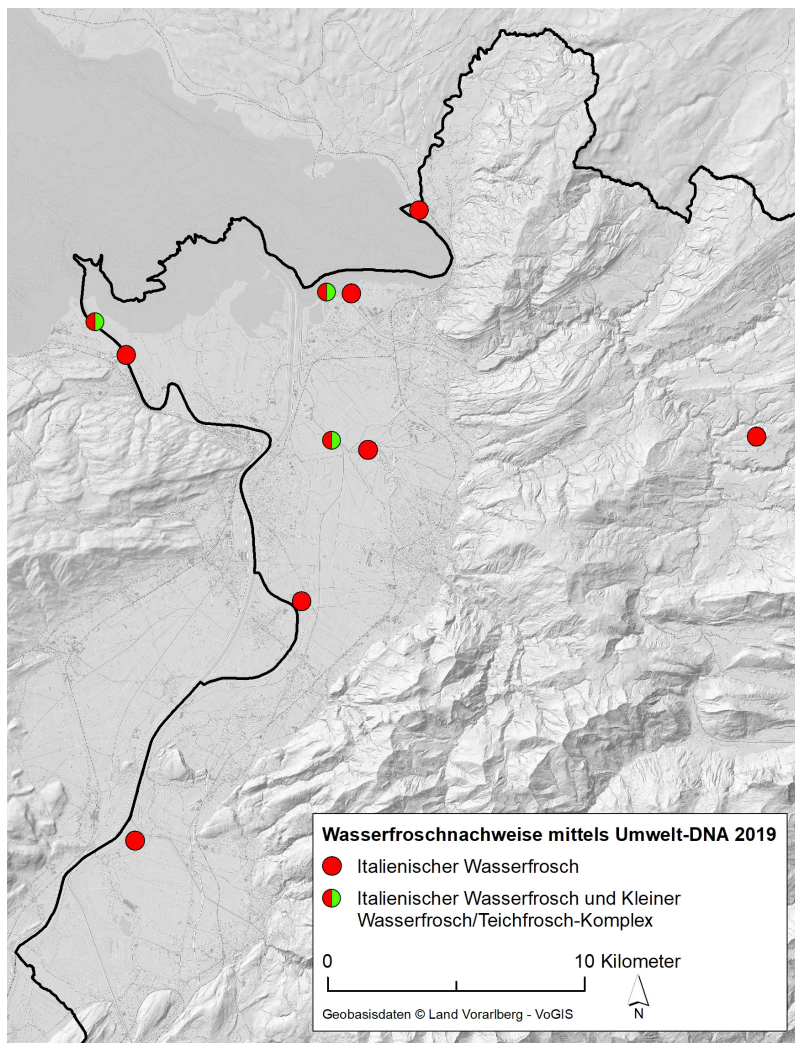


Abb. 4: Die Ergebnisse der Umwelt-DNA-Analyse zeigen schlechte Aussichten für heimische Wasserfrösche. Vermutlich wurden sie bereits größtenteils durch Italienische Wasserfrösche ersetzt.

- LEUENBERGER, J., GANDER, A., SCHMIDT, B. R. & PERRIN, N. (2014): Are invasive marsh frogs (*Pelophylax ridibundus*) replacing the native *P. lessonae*/*P. esculentus* hybridogenetic complex in Western Europe? *Genetic evidence from a field study*. – *Conservation Genetics*, 15(4): 869-878.
- MEASEY, G. J., VIMERCATI, G., DE VILLIERS, F. A., MOKHATLA, M., DAVIES, S. J., THORP, C. J., REBELO, A. D. & KUMSCHICK, S. (2016): A global assessment of alien amphibian impacts in a formal framework. – *Diversity and Distributions*, 22(9): 970-981.
- MOSEY, I. (2015): Endgestaltung Alter Rhein. Erfolgskontrolle 2015 Amphibien. – unveröff. Bericht im Auftrag der Internationalen Rheinregulierung: 35 S. + Anhang (Ökobüro Hugentobler AG).
- PAGANO, A., JOLY, P., PLÉNET, S., LEHMAN, A. & GROLET O. (2001): Breeding habitat partitioning in the *Rana esculenta* complex: The intermediate niche hypothesis supported. – *Écoscience*, 8(3): 294-300.
- PLÖTNER, J. (2005): Die westpaläarktischen Wasserfrösche. Von Märtyrern der Wissenschaft zur biologischen Sensation. – *Zeitschrift für Feldherpetologie*, Beiheft 9: 160 S.
- PLÖTNER, J. (2010): Möglichkeiten und Grenzen morphologischer Methoden zur Artbestimmung bei europäischen Wasserfröschen (*Pelophylax esculentus*-Komplex). – *Zeitschrift für Feldherpetologie*, 17 (2), 129-146.
- ROTH, T., BÜHLER, C. & AMRHEIN, V. (2016): Estimating Effects of Species Interactions on Populations of Endangered Species. – *The American Naturalist*, 187(4): 457-467.
- SCHMIDT, B. R. & GRÜNIG, C. R. (2017): Einsatz von eDNA im Amphibien-Monitoring. – In: CSENCICS D. & GUGERLI F. (Red.): *Naturschutzgenetik*. WSL Berichte, 60 (Forum für Wissen 2017): 57-62.
- TUNNER, H. (1996): Der Teichfrosch *Rana esculenta* – Ein evolutionsbiologisch einzigartiger Froschlurch. – *Stapfia*, 47: 87-101.
- TUNNER, H. G. (2001): Die Wasserfrösche. – In: CABELA, A., GRILLITSCH, H. & TIEDEMANN, F.: *Atlas zur Verbreitung und Ökologie der Amphibien und Reptilien in Österreich*. Auswertung der Herpetologischen Sammlung des Naturhistorischen Museums in Wien. – 880 S. (703-715); Wien (Umweltbundesamt).
- ZANGL, L., DAILL, D., SCHWEIGER, S., GASSNER, G. & KOBLMÜLLER, S. (2020): A reference DNA barcode library for Austrian amphibians and reptiles. – *PLoS ONE*, 15(3): e0229353 (17 pp.); doi: 10.1371/journal.pone.0229353