



# Einblicke in die Nahrungswahl beim Rothirsch

Rothirsche besitzen durch ihr Nahrungsverhalten einen großen Einfluss auf die Entwicklung von Waldökosystemen, sodass genaue Informationen zu ihrer Nahrungszusammensetzung eine wichtige Grundlage für das Wildtiermanagement bilden. Neue Ergebnisse zu ihrer Nahrungswahl mittels DNA-Metabarcoding\* der Losung aus vier Nationalparks in Mittelgebirgsregionen zeigen ein regional differenziertes Bild. Im Nahrungsspektrum dominieren Gräser und Kräuter wie die Brennnessel, aber auch einzelne Sträucher und Bäume wie Heidelbeere und Buche konnten nachgewiesen werden. Die Nahrungswahl ist dabei stark von den vor Ort vorhandenen Ressourcen und Vegetationsbedingungen abhängig.

TEXT: FLAVIUS POPA, MARC FÖRSCHLER, MARCO HEURICH, GÜNTER HOENSELAAR, STEFANIE GÄRTNER, JEROME MORINIÈRE, SÖNKE TWIETMEYER, JÖRN BUSE

Die Zusammensetzung der Nahrung vom Rothirsch ist schon seit langer Zeit Forschungsgegenstand [7, 8, 18]. Dabei wird klassischerweise der Panseninhalt von erlegten Stücken untersucht, um Rückschlüsse auf die gefressene Nahrung zu ziehen. Die wohl umfangreichste Zusammenfassung dieser Ergebnisse zeigt, dass die Nahrung der Rothirsche in Europa aus mindestens 145 verschiedenen Pflanzenarten



Foto: E. Marek

Abb. 1: Im Vergleich zum Reh nimmt der Rothirsch mehr schwer verdauliche und rohfaserhaltige Nahrung zu sich.

## Schneller ÜBERBLICK

- » **Metabarcoding** ist eine schnelle, kostengünstige Methode mit hoher Effektivität zur Analyse des Nahrungsspektrums und deren artspezifischer Anteile
- » **Mithilfe dieser Methode** können aufgrund hoher regionaler Spezifität der Ergebnisse Untersuchungen unterschiedlicher Lebensräume und Regionen durchgeführt werden
- » **Rothirsche** zeigen im Frühjahr und Frühsommer ein regional differenziertes Nahrungsspektrum
- » **Bisher konnten in Europa** 145 Nahrungspflanzen des Rothirsches nachgewiesen werden; diese Studie konnte das Spektrum um weitere 86 Arten ergänzen

besteht [7]. Im Vergleich zum Reh nimmt der Rothirsch mehr schwer verdauliche und rohfaserhaltige Nahrung zu sich [19]. Alternativ zur makroskopischen Pansenuntersuchung gibt es auch die Möglichkeit, die Zusammensetzung der Nahrung über die Losung zu analysieren [16]. Dies hat jedoch erhebliche Nachteile bei der qualitativen und quantitativen Beurteilung der Nahrung aufgrund der unterschiedlichen Zersetzung verschiedener Pflanzen im Verdauungstrakt. Mit den nun seit einigen Jahren verfügbaren Methoden des DNA-Metabarcodings rückt die Untersuchung der

Losung aufgrund niedrigerer Kosten, geringerem Aufwand bei hoher Qualität der Daten zunehmend in den Fokus [5, 10]. Damit können wertvolle neue Daten zur Nahrungswahl in einem viel größerem

\* DNA-Metabarcoding wird eingesetzt, um gleichzeitig bis zu Tausende Individuen bis auf Artebene gleichzeitig zu bestimmen. Dies geschieht durch die parallele Sequenzierung von kleinen standardisierten Genfragmenten (dem DNA-Barcoding-Fragment). Die erhaltenen DNA-Sequenzen werden durch bioinformatische Algorithmen sortiert und durch den Abgleich mit der Referenzdatenbank den verschiedenen Arten zugeordnet. Anders als bei der DNA-Barcodierung kann dies mit der gesamten Artengemeinschaft eines Habitats durchgeführt werden, um die Artenvielfalt nahezu vollständig zu erfassen. Daneben können auch semiquantitative Aussagen zur Häufigkeit von Arten auf der Untersuchungsfläche gemacht werden.

# „Rothirsche sind regional sehr flexibel in der Nahrungswahl.“

FLAVIUS POPA

ren Umfang erhoben werden, als dies bisher möglich war.

## Methodik

Im Mai 2019 wurden in den vier Nationalparks (NLP) Bayerischer Wald, Eifel, Kellerwald-Edersee und Schwarzwald Losung von Rothirschen gesammelt. In jedem Gebiet wurden zehn Transekte (Mess- bzw. Beobachtungspunkte entlang einer geraden Linie) ausgewiesen, die auch für weitere Studien genutzt wurden [3]. Pro Transekt konnten sieben unterschiedlich alte Rothirsch-Losungsgruppen (eine Lösungsgruppe = mindestens fünf Pellets) zu einer Mischprobe vereint werden. Aus jeder Mischprobe wurde so viel Losung entnommen, dass ein 50 ml Falconröhrchen zu etwa 3/4 gefüllt war. Das Gefäß wurde anschließend mit 96 % Ethanol auf 50 ml aufgefüllt und bei -20 °C gelagert.

Die Gesamtzahl von 40 Mischproben repräsentiert damit 280 einzelne Lösungsgruppen. Die DNA der Mischproben wurde nach einem standardisierten Protokoll extrahiert und anschließend sequenziert (weiterführende Informationen dazu im Anhang).

Für die Analyse wurde die ITS2-Region, die innerhalb der ribosomalen Einheiten liegt, ausgewählt, welche sich als verlässliche Region für die Identifikation von Pflanzen eignet und auch

## In der Rothirschlosung nachgewiesene Pflanzenarten

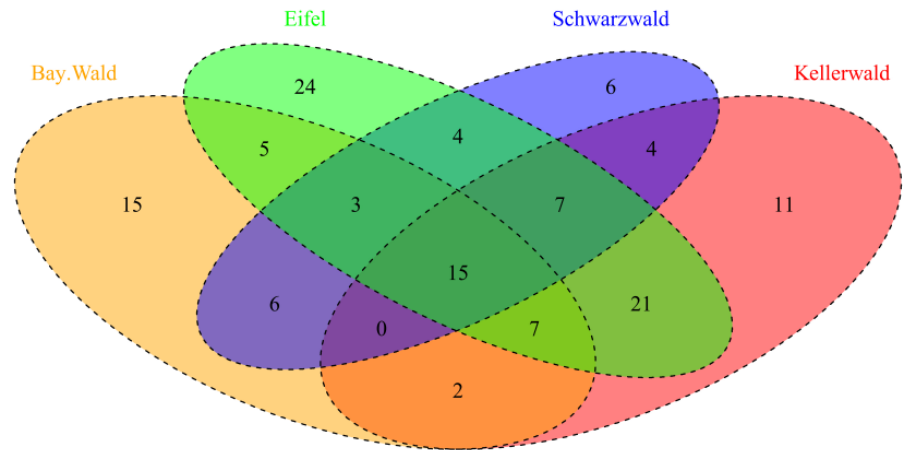


Abb. 2: Venn-Diagramm über die in der Rothirschlosung nachgewiesenen 130 Pflanzenarten. Gezeigt werden exklusive Arten und gemeinsam vorkommende Arten über die vier Untersuchungsgebiete.

## Anzahl der Pflanzenarten nach Wuchsformen

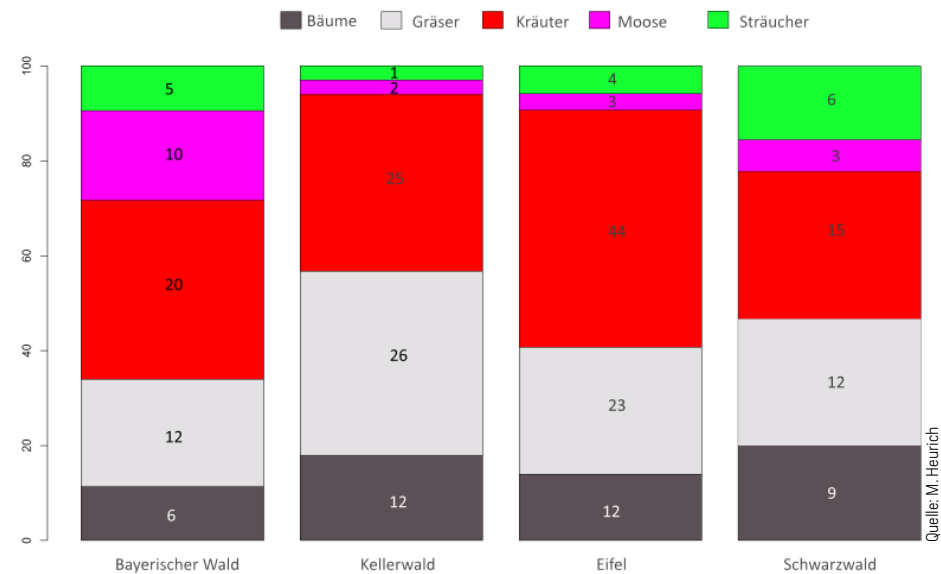


Abb. 3: Die Anzahl der Pflanzenarten mit Zugehörigkeit zu einer der Wuchsformen in Prozent. Die Angaben in den Balkendiagrammen entsprechen der tatsächlichen Artenzahl. Je Gebiet wurden Mischproben von zehn Transekten untersucht.

als eine Standard-Barcodingregion bei Pflanzen gilt [1, 4]. Die bioinformatrische Annotierung der Sequenzdaten

wurde gegen die Referenzdatenbank Genbank durchgeführt [14]. Nur Arten mit einer Ähnlichkeit > 97,5% im Vergleich zur Referenz wurden als sicher zugeordnet angegeben.

## Relative Anteile von Gehölzen

Tab. 1: Gehölzarten, die in den vier Untersuchungsgebieten in der Losung nachweisbar waren.

Art	Bayerischer Wald	Kellerwald-Edersee	Eifel	Schwarzwald
<i>Fagus sylvatica</i>	3.574 (5,9 %)	36.796 (65,6 %)	1.343 (3,25 %)	530 (1,2 %)
<i>Sorbus aucuparia</i>	2.656 (4,39 %)	0	0	137
<i>Picea abies</i>	1.074 (1,8 %)	10 (0,02 %)	999 (2,4 %)	335
<i>Salix sp.</i>	687 (1,1 %)	10	795 (1,93 %)	114
<i>Betula pubescens</i>	880 (1,5 %)	16	30	197

## Ergebnisse und Diskussion

In der Rothirschlosung wurden zwischen 53 und 86 Pflanzenarten in den vier Gebieten nachgewiesen. Das artenreichste Gebiet in unserer Untersuchung mit dem höchsten alpha-Diversitätswert war der NLP Eifel (86 Arten), gefolgt vom NLP Kellerwald-Edersee (67 Arten), dem NLP Bayerischer Wald (53 Arten) und dem NLP

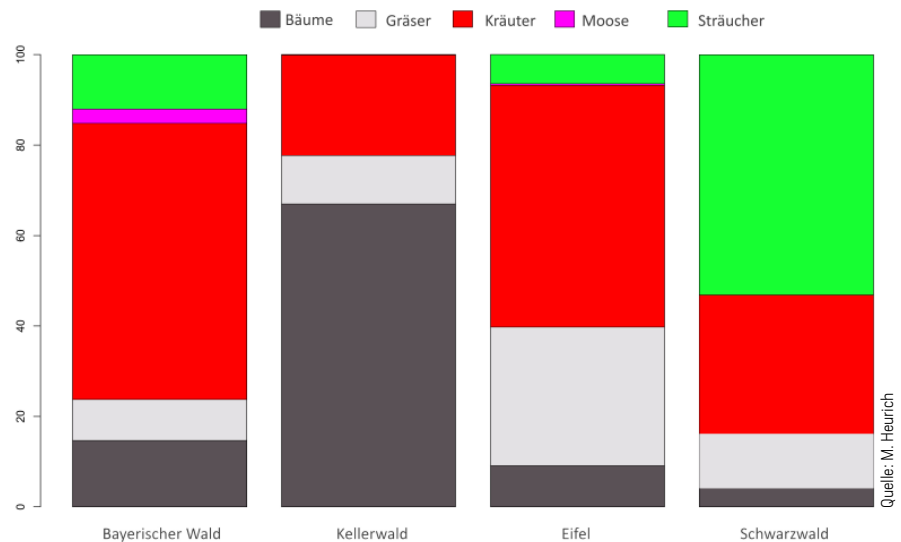


Schwarzwald (45 Arten). Die Anzahl an Pflanzenarten über alle vier Gebiete betrug 130, wobei nur 15 Arten in allen vier Gebieten vorkamen (Abb. 2). In Rothirschlosung aus dem NLP Eifel waren unter den vier Untersuchungsgebieten die meisten Pflanzenarten enthalten, was die hohe Pflanzenartenvielfalt im Gebiet gut widerspiegelt [2, 13, 15]. Grundsätzlich stiegen die Artensättigungskurven in allen vier Gebieten mit dem Erfassungsaufwand stark an und zeigten auch bei gruppierter Betrachtung über alle vier Gebiete nur eine leichte Sättigung. Die Gesamtdiversität an vom Rothirsch gefressenen Pflanzen kann daher mit den jeweils zehn Proben aus den vier Gebieten, innerhalb eines kleinen Zeitfensters im Frühjahr, noch nicht ausreichend abgeschätzt werden. Sie liegt wahrscheinlich aber unter 200 Pflanzenarten (Abb. 2).

### Regionale Unterschiede in der Zusammensetzung der Nahrung

Die Zusammensetzung der Nahrung beim Rothirsch unterscheidet sich sowohl saisonal als auch räumlich in Abhängigkeit von den genutzten Lebensräumen, wobei im

### Anteil der verschiedenen Wuchsformen



**Abb. 4:** Relativer Anteil verschiedener Wuchsformen an den in Rothirschlosung nachgewiesenen Pflanzenarten. Je Gebiet wurden Mischproben von zehn Transekten untersucht.

Winter nur eine geringe Zahl an Pflanzenarten bzw. deren Teile konsumiert werden [6, 18]. In den Sommermonaten hingegen fressen Rothirsche vor allem Gräser und Heidekräuter (Ericaceen) und Bäume werden nur in geringen Mengen verzehrt [20]. In unserer Untersuchung mit Pro-

benmaterial aus dem Monat Mai dominierten Gräser und Kräuter das Artenspektrum (Abb. 3). Sträucher und Bäume waren zwar auch nachweisbar, stellten zahlenmäßig aber die Minderheit dar. Bäume machten zwischen 11 % (Bayerischer Wald) und 20 % (Schwarzwald) der

## ANHANG (METHODIK)

Die Identifizierung von Pflanzenarten in den Dungproben erfolgte mittels DNA-Metabarcoding [9]. Jede Probe wurde mindestens acht Stunden lang bei 60 °C im Ofen durchgetrocknet, um den Konservierungsethanol vollständig zu verdampfen, und anschließend in einer Fast-Prep96-Maschine (MP Biomedicals) mit sterilen Stahlkugeln homogenisiert. Für die DNA-Extraktion wurde 1 mg jedes Homogenisats mit Lysepuffer sowie mit dem DNeasy 96 Plant Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Die Amplifikation der ITS2-Zielregion und die anschließende Vorbereitung der MiSeq-Libraries wurden über eine zweistufige PCR durchgeführt. Zunächst wurde eine 350 bp lange Mini-Barcode-Region amplifiziert (ITS2-plant-F – TAC ACG ACG CTC TTC CGA TCT TCA TAT GCG ATA CTT GGT GTG AAT; ITS-plant-R – CAG ACG TGT GCT CTT CCG ATC AGG AGG ACG CTT CTC CAG ACT ACA AT, [4]), wobei die Hochdurchsatzsequenzierungs-(HTS-)Primer mit komplementären Stellen für die Illumina-Adaptersequenzen verwendet wurden. In einer nachgeschalteten PCR-Reaktion wurden Indexprimer mit eindeutigen i5- und i7-Inline-Tags zur Amplifikation und Indizierung der unterschiedlichen Amplikons verwendet. Äquimolare

Amplikon-Pools wurden durch Messung des DNA-Gehalts erstellt und mittels Gelelektrophorese auf ihre korrekte Basenlänge hin untersucht. Die gepoolte DNA (= library) wurde mittels MagSi-NGSprep Plus Beads Kit (Steinbrenner Laborsysteme GmbH, Wiesbaden, Deutschland) aufgereinigt. Ein Bioanalyzer (High Sensitivity DNA Kit, Agilent Technologies) wurde für eine abschließende Überprüfung der Basenpaar-Verteilung und Konzentration der Amplikons verwendet. Die Hochdurchsatzsequenzierung wurde auf einer Illumina MiSeq mit v2 (2\*250 bp, 500 Zyklen, maximal 20 Mio. Reads) durchgeführt (Illumina).

Die bioinformatische Analyse der originären (RAW-)FASTQ-Sequenzdaten wurde mit der VSEARCH-Suite v2.9.1 und Cutadapt v1.18 durchgeführt [17, 11]. Vorwärts- und Rückwärts-Reads in jeder Probe wurden mit dem VSEARCH-Programm „fastq\_mergepairs“ mit einer Mindestüberlappung von 10 bp (Basenpaaren) zusammengeführt, was etwa 440 bp Sequenzen ergab. Vorwärts- und Rückwärtsprimer wurden mit Cutadapt entfernt, wobei die Option „discard\_untrimmed“ verwendet wurde, um Sequenzen zu verwerfen, für die Primer mit  $\geq 90\%$  Identität nicht zuverlässig erkannt wur-

den. Die Qualitätsfilterung wurde mit dem „fastq\_filter“ in VSEARCH durchgeführt, wobei Sequenzen mit null erwarteten Fehlern („fastq\_maxee“ 1) beibehalten wurden. Die Sequenzen wurden mit „derep\_fulllength“ derepliziert, zunächst auf Probenebene und dann in eine FASTA-Datei konkateniert, die anschließend derepliziert wurde. Chimäre Sequenzen wurden aus der FASTA-Datei mit VSEARCH „uchime\_denovo“ herausgefiltert. Die verbleibenden Sequenzen wurden mit „cluster\_size“, einem Greedy-Centroid-basierten Clustering-Programm, in OTUs mit 97 % Identität geclustert. Die OTUs wurden mit einer lokalen Kopie der NCBI-Nukleotidbibliothek (heruntergeladen von ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/) mithilfe von Geneious (v.10.2.5-Biomatters, Auckland-Neuseeland) abgeglichen und annotiert [12]. Die resultierende csv-Datei wurde aus Geneious exportiert und mit der von der bioinformatischen Pipeline generierten OTU-Tabelle kombiniert. Die kombinierte Ergebnistabelle wurde dann nach Hit-%-ID-Wert und Gesamtreadzahlen pro OTU gefiltert. Alle Einträge mit Identifizierungen unter 97 % und Gesamtreadzahlen unter 0,01 % der summierten reads pro Probe wurden aus der Analyse entfernt.

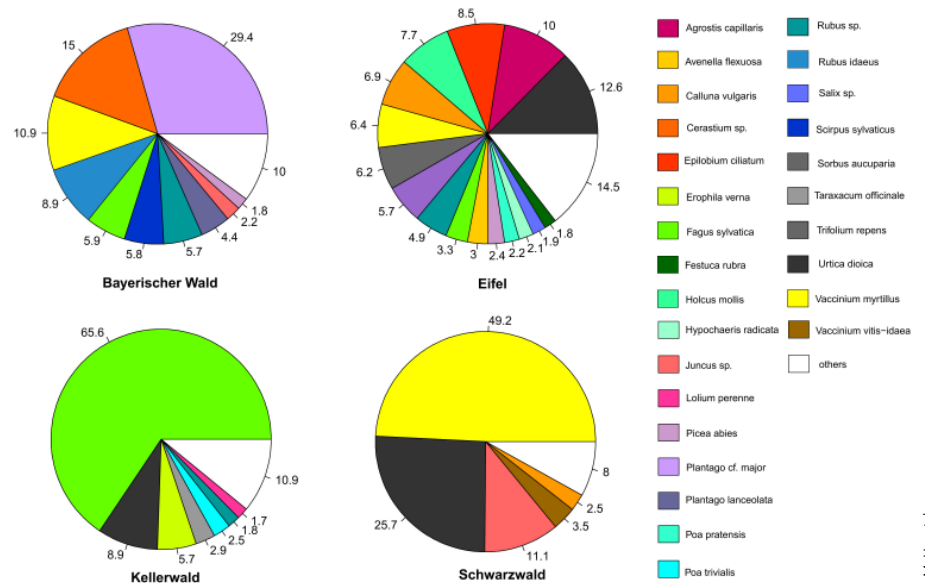
in der Losung nachgewiesenen Arten aus. Die relativen Anteile der verschiedenen Wuchsformen waren über alle vier Gebiete relativ konstant. Deutlich variabler waren die relativen Häufigkeiten der Artnachweise in der Losung (Abb. 4).

Viele Treffer (reads) lassen potenzielle Rückschlüsse auf einen höheren Biomasseanteil der entsprechenden Pflanzen in den Proben zu, was aber nicht immer zutreffend ist. Im Schwarzwald dominierten mit über 50 % die Sträucher (v. a. Heidelbeere) in der Losung. Gehölzreste, d. h. Sträucher und Baumarten (Jungwuchs), waren quantitativ nur mit weniger als 5 % Anteil nachweisbar. In den Niederlanden konnte gezeigt werden, dass sich die Zusammensetzung der Nahrung des Rothwilds über die letzten Jahrzehnte verändert hat und Drahtschmiele (*Avenella flexuosa*) sowie Heidelbeere (*Vaccinium myrtillus*) nun die wichtigsten Nahrungspflanzen im Winter sind [8]. Früher waren dies Nadeln und Knospen von Kiefern sowie Heidekraut. Große Heidelbeerbestände sind also ein wichtiger Bestandteil der aktuell genutzten Rothirschlebensräume. Bei den Kräutern spielt die Große Brennnessel (*Urtica dioica*) in zwei Gebieten eine wichtige Rolle (Abb. 5). Dies zeigt zumindest für den Schwarzwald die relativ hohe Bedeutung von Wegrändern für die Nahrungsaufnahme, da dort Brennnessel hauptsächlich entlang von Wegrändern vorkommt. Im Kellerwald-Edersee wurden hauptsächlich Bäume (67 %), vor allem die Rotbuche, konsumiert. Der frische Laubaustrieb der Buche ist also durchaus attraktiv. Bei den Rothirschen in der Eifel dominierten mit über 80 % Anteil die Gräser und Kräuter. Baumarten machten dort nur einen Anteil von unter 10 % aus (Abb. 4). Die Losungsproben aus dem Bayerischen Wald enthielten einen Anteil von über 70 % Gräsern und Kräutern. Dabei stechen die Wegerich-Arten (*Plantago spec.*) besonders heraus (Abb. 5). Die Zusammensetzung der Losung aus der Eifel und dem Bayerischen Wald war insgesamt heterogener, während in den Proben aus dem Kellerwald-Edersee und aus dem Schwarzwald wenige Arten das Spektrum dominierten. Unsere Daten zeigen, dass

#### Literaturhinweise:

Download des Literaturverzeichnisses in der digitalen Ausgabe von AFZ-DerWald (<https://www.digitalmagazin.de/marken/afz-derwald>) sowie unter: [www.forstpraxis.de/downloads](http://www.forstpraxis.de/downloads)

## Anteil der wichtigsten Pflanzenarten nach Gebieten



**Abb. 5:** Quantitativer Anteil der wichtigsten Pflanzenarten in den vier untersuchten Gebieten. Die prozentualen Anteile spiegeln die von den Hirschen verzehrte Biomasse der jeweiligen Pflanzenart wider. Arten mit weniger als 1,5 % Anteil sind unter „others“ (andere) zusammengefasst.

regional erhebliche Unterschiede in der Nutzung der Pflanzenarten durch den Rothirsch bestehen. Die verzehrten Pflanzen sind sicher auch immer ein Spiegel des tatsächlichen Angebots. Besonders bei geringen Probeumfängen, bei großer räumlicher Verteilung der gesammelten Proben innerhalb eines Gebietes und bei über längere Zeiträume hinweg parallel zur Vegetationsentwicklung gesammelten Proben können sich diese auch deutlich verändern. Für die Diskussion zum Einfluss des Rothirschs auf die Bäume hilft ein Blick auf die in der Losung nachgewiesenen Baumarten und deren Quantität (Tab. 1). 20 verschiedene Baumarten waren nachweisbar, wobei vier Arten in allen Gebieten gefressen wurden (*Betula pubescens*, *Fagus sylvatica*, *Picea abies* und *Salix spec.*). Rotbuche erreichte quantitativ in allen Gebieten die höchsten Werte. Trotzdem gab es regionale Unterschiede. Im Bayerischen Wald wurde besonders häufig Birke und Vogelbeere konsumiert. Im Kellerwald-Edersee wurde neben der besonders häufig nachweisbaren Rotbuche auch Hainbuche gefressen. Eichen und Pappeln sind im Schwarzwald und dem Bayerischen Wald aufgrund der Höhenlage der Gebiete wenig vorhanden und wurden entsprechend auch nicht konsumiert. Im Schwarzwald wurden in abnehmender Quantität v. a. Rotbuche, Bergahorn und Fichte konsumiert. Die Losungspro-

ben aus der Eifel zeigten, dass 12 der 20 insgesamt nachweisbaren Gehölzarten dort auch zum Nahrungsspektrum gehören (Tab. 1).



**Dr. Flavius Popa**  
[flavius.popa@nlp.bwl.de](mailto:flavius.popa@nlp.bwl.de)

ist Sachbereichsleiter Mykologie und Bodenökologie. **Dr. Jörn Buse**, **Dr. Stefanie Gärtner** und **Dr. Marc Förschler** sind Sach- bzw.

Fachbereichsleiter im Nationalpark Schwarzwald. **Sönke Twietmeyer** ist Mitarbeiter im Fachgebiet Forschung und Dokumentation des Nationalparks Eifel. **Günter Hoenselaar** ist Mitarbeiter in der Abteilung Naturschutz, Forschung und Planung des Nationalparks Kellerwald-Edersee.

**Prof. Dr. Marco Heurich** ist Sachgebietsleiter für Besuchermanagement und Nationalparkmonitoring im Nationalpark Bayerischer Wald und Professor für Wildtierökologie und Naturschutzbiologie an der Universität Freiburg. **Jerome Moriniere** ist Geschäftsführer des Unternehmens AIM – Advanced Identification Methods GmbH in Leipzig.