

Kleinsäuger mit Haarproben zuverlässig bestimmen

Um das Vorkommen der Schweizer Kleinsäugetiere zu untersuchen, müssen diese lebend gefangen und bestimmt werden. Gewisse ähnliche Arten lassen sich jedoch morphologisch nicht genau unterscheiden. Für eine sichere Artbestimmung ist deshalb bei einigen Arten eine DNA-Analyse unumgänglich. Die Entnahme von Haarproben ermöglicht eine für das Tier schnelle und schonende Gewinnung von DNA.

Der Zustand der Biodiversität in der Schweiz ist unbefriedigend. Gemäss Bundesamt für Umwelt (Bafu) sind mindestens 40 Prozent der in der Schweiz vorkommenden Tierarten (Wirbeltiere und Wirbellose) gefährdet. Das Bundesamt stützt sich bei diesen Aussagen auf die Ergebnisse der Monitoringprogramme, mit denen die Biodiversität überwacht wird. Zu diesen Programmen zählen auch die Roten Listen, die gemäss Bundesratsbeschluss alle zehn Jahre revidiert werden müssen, um die Entwicklung der Arten verfolgen zu können. Im Auftrag des Bafu überprüft und ermittelt das Centre Suisse de Cartographie de la Faune (CSCF) den Rote-Liste-Status für verschiedene Artengruppen der Schweizer Fauna. Die Liste der Säugetiere wird aktuell überarbeitet, stammt doch die letzte Version dieser Roten Liste aus dem Jahre 1994 (Duelli et al. 1994).

Der Rote-Liste-Status muss nach den Kategorien und Kriterien der International Union for Conservation of Nature festgelegt werden. Dabei ist jedoch freigestellt, welche Daten oder welches Fachwissen für die Erstellung der Roten Liste verwendet werden. In der Schweiz hat das Bafu auf Anregung des CSCF entschieden, bei denjenigen Artengruppen, bei denen nur ungenügende Angaben vorliegen, Erhebungen im Feld durchzuführen. Dies trifft für die Kleinsäuger zu, weshalb die Daten für die Ordnungen der Nagetiere (Rodentia) und der Insektenfresser (Insectivora) systematisch nach einer vorgegebenen Methode über die ganze Landesfläche erhoben werden. In den benachbarten Ländern gibt es kein vergleichbares Monitoring der Kleinsäuger.

Der Rote-Liste-Status wird dort über Expertenwissen in Kombination mit bestehenden Verbreitungsdaten ermittelt.

Für diese Felderhebungen wird der Hauptanteil der Kleinsäugerarten mit Lebendfallen des Typs Longworth gefangen, direkt vor Ort bestimmt und wieder freigelassen (Gurnell & Flowerdew 2006). Bei einigen Arten sind jedoch die morphologischen Merkmale am lebenden Tier für eine sichere Artbestimmung nicht ausreichend. Dies ist der Fall bei den Waldmäusen (*Apodemus* sp.; Abb. 1, links), bei den Kleinwühlmäusen (*Pitymys* sp.) und bei einigen Spitzmäusen (*Soricidae*; Abb. 1, rechts).

Diesen Arten wurde deshalb bis vor kurzem standardmässig eine Gewebeprobe vom Ohr oder der Schwanzspitze zur genetischen Analyse entnommen. Die Tiere werden dazu für die Probeentnahme mittels Äthyläther sediert. Die Gewebeprobe bringt den Vorteil, dass die Tiere durch die Probeentnahme gekennzeichnet werden und somit Doppelbeprobungen bei Wiederfängen ausgeschlossen werden können. Als weniger invasive Alternative können für die Artbestimmung auch Haarproben zur DNA-Analyse verwendet werden (Pfundner et al. 2004). Diese Methode wird bei den Felderhebungen für die Rote Liste der Säugetiere in der Schweiz seit 2012 angewendet (Capt 2012).

Gewinnung der Haarprobe

Befindet sich ein Kleinsäuger in der Lebendfalle, so wird deren Inhalt vorsichtig in einen grossen, durchsichtigen Plastiksack entleert. Auf diese Weise kann das Tier betrachtet und für die Probenahme gezielt ergriffen werden. Am besten gelingt die Beprobung, wenn zwei Personen zusammenarbeiten. Dann kann die eine Person das Tier halten und die andere Person die Haarprobe entnehmen (Abb. 2).

Mit etwas Übung ist es jedoch auch gut möglich, diese Arbeit alleine auszuführen. In diesem Fall geht man wie folgt vor (Egloff 2012): Für das Festhalten des Kleinsäugers wird ein fester Arbeitshandschuh verwendet. Für die andere Hand, mit der die Haarprobe gewonnen wird, benutzt man einen sauberen Wegwerfhandschuh, um möglichst reine Proben zu erhalten.



Abb. 1.: Links: Eine junge Maus des Apodemus-Komplex (*Apodemus* sp.). Nur mit Hilfe von Schädelmerkmalen oder einer DNA-Analyse ist eine Zuteilung zu einer der drei Apodemus-Arten (Gelbhalsmaus, Waldmaus oder Alpenwaldmaus) möglich. Rechts: Eine der drei Waldspitzmaus-Schwesterarten (*Sorex* sp.). Auch sie kann nur mittels DNA-Analyse oder detaillierter Schädelmorphologie auf Artniveau bestimmt werden.

Das Tier wird am besten mit dem Kopf Richtung Handgelenk in der Hand gehalten, so dass die Probe am Hinterteil, idealerweise aus den festeren Deckhaaren am Schwanzansatz des Tieres genommen werden kann. Ausserdem verhält sich das Tier ruhiger, wenn es nichts sieht. Die Haare oder Haarbüschel werden mit einer zuvor in DNAExitusPlus™-Lösung sterilisierten, flachen Wimpernpinzette in Längsrichtung des Körpers ausgezupft. Entscheidend ist die Kontrolle, ob die Haare mit Haarwurzeln (Follikeln) ausgerissen wurden, denn nur die Wurzeln enthalten das für die Analyse benötigte Genmaterial. Falls nötig, wird dies mit einer Lupe kontrolliert. Total sollten 25 bis 30 Haare gezupft werden.

Die entnommenen Haare werden direkt mit der Wurzel voran in ein sauberes, zuvor verschlossenes 1,5 bis 2 ml-Plastikröhrchen gelegt (Abb. 2). Die Haare werden darin trocken aufbewahrt. Die so gewonnene Haarprobe sollte weder dem Sonnenlicht noch der Hitze ausgesetzt werden und möglichst bald respektive spätestens nach 12 Stunden bei -20°C eingefroren werden. So kann gewährleistet werden, dass die DNA nicht frühzeitig zerfällt.

Analyse im Labor

Die DNA der Haarfollikel wird mithilfe von Enzymen extrahiert. Aus der Haarfollikel-DNA-Lösung wird ein Aliquot (3 bis 5 Mikroliter) in einem PCR-Reaktionsröhrchen (Polymerase-Kettenreaktion)

amplifiziert. Die PCR dient der Vervielfältigung eines bestimmten Genabschnittes innerhalb der mitochondrialen DNA. Dabei nutzt man gängige Gene der Cytochrom-Proteine. Die Auswertung erfolgt mittels Kapillar-Gelelektrophorese (z.B. Fragment Analyzer, Labgene). Wenn sich intakte Zellen im Haarfollikel befinden, wird mittels Kapillar-Gelelektrophorese ein DNA-Fragment ersichtlich. Diese Fragmente werden für die Sanger-Sequenzierung aufbereitet und sequenziert. Die ermittelten Basenabfolgen werden mit einer Datenbank verglichen (BLAST von NCBI) und einem Organismus zugeordnet.

Erfolgsquote und Fehlerproblematik

Wenn intakte Zellen in der Haarprobe vorhanden sind, liegt die Erfolgsquote bei 100 Prozent. Werden die Proben unsachgemäss behandelt bzw. der Wärme oder dem Sonnenlicht (UV) ausgesetzt, wird die DNA in den Zellen rasch abgebaut und die Extraktion misslingt. Bei ausgefallenen Haaren ist damit zu rechnen, dass nur noch wenige intakte Zellen vorhanden sind. Die grösste Fehlergefahr ist jedoch die Kontamination durch den Menschen oder durch Kreuzkontaminationen – verursacht u.a. durch unsauberes Arbeiten (ohne Handschuhe oder ohne Desinfektion der Werkzeuge), wenn Proberöhrchen mehrmals verwendet werden oder wenn die Proben lose (ohne Röhrchen) transportiert werden. Alle die-



Abb. 2.: Entnahme einer Haarprobe am Hinterteil einer Maus des Apodemus-Komplex (*Apodemus* sp.) mit Hilfe einer flachen Pinzette.

se Fehlerquellen können bei guter Information und sorgfältigem Arbeiten ausgeschlossen werden.

Bei den Feldaufnahmen der Roten Liste konnten im Labor schon direkt nach der Umstellung von der Gewebe- zur Haarproben-Gewinnung im Jahr 2012 93,5 Prozent der Proben erfolgreich analysiert werden.

Fazit für die Praxis

Die Gewinnung von DNA mittels Haarproben ist eine relativ schonende Methode, bei der das Tier nicht sediert werden muss. Für die Überarbeitung der Roten Liste der Säugetiere, deren Ziel die Erhebung der aktuellen Verbreitung der Säugetiere ist, genügt die Artbestimmung und somit die Haaranalyse vollkommen. Soll die DNA-Analyse über das Artniveau hinausgehen (z.B. Bestimmung von Individuen oder Geschlecht), muss aufgrund der erforderlichen DNA-Menge auf Gewebeproben zurückgegriffen werden. Bei der Entnahme von Haarproben zur genetischen Bestimmung handelt es sich also um eine gute Alternative für die reine Artbestimmung, die jedoch die Entnahme von Gewebeproben nicht ersetzen kann.

Lisa Wirthner-Bitterlin¹, Martina Reifler-Bächtiger¹, Marilena Palmisano¹, Sophia Egloff¹, Thomas Briner², Simon Capt³ und Roland F. Graf¹.

¹ ZHAW Wädenswil, Institut für Umwelt und Natürliche Ressourcen; ² Naturmuseum Solothurn; ³ CSCF – Info Fauna

LITERATUR

Capt, S. 2012. Memorandum für den Fang von Kleinsäugetern, CSCF, Neuchâtel.

Duelli et al. 1994. Rote Listen der gefährdeten Tierarten der Schweiz. Bundesamt für Umwelt, Wald und Landschaft (BUWAL), Bern.

Egloff, S. 2012. Kleinsäugererhebungen im Mittelland. Bachelorarbeit, Zürcher Hochschule für angewandte Wissenschaften (ZHAW), Wädenswil, unveröffentlicht.

Gurnell, J. & Flowerdew, J.R. 2006. Live Trapping Small Mammals: A Practical Guide, The Mammal Society, London.

Pfunder, M., Holzgang, O., Frey, J.E. 2004. Development of microarray-based diagnostics of voles and shrews for use in biodiversity monitoring studies, and evolution of mitochondrial cytochrome oxidase I vs. Cytochrome b as genetic markers. *Molecular Ecology* 13(5):1277-1286.

LINKS

Bundesamt für Umwelt: www.bafu.admin.ch/biodiversitaet

CSCF: www.cscf.ch