

molekulargenetik



Molekulare Bärenjagd

Geschlechtsbestimmung bei Wildtieren

Tobias Bidon¹, Alexander Kopatz², Dr. Frank Hailer¹

¹LOEWE Biodiversität und Klima Forschungszentrum (BiK-F), Senckenberg Gesellschaft für Naturforschung,

²Bioforsk – Norwegian Institute for Agricultural and Environmental Research, Svanvik, Norwegen

Das Geschlecht eines Tieres in freier Wildbahn zu bestimmen, ist aus verschiedenen Gründen oft schwierig. Dabei ist es für viele wissenschaftliche Studien und für das Wildtiermanagement unerlässlich, Informationen über das Verhältnis von Weibchen und Männchen zu sammeln. Mit molekularbiologischen Methoden lässt sich dies heute schnell, einfach und ohne direkten Kontakt zu den Tieren bewerkstelligen.

Selten kommt man an wild lebende Säugetiere so nahe heran, dass ihr Geschlecht ersichtlich ist. Auch sollten Störungen in sensiblen Lebensräumen und von scheuen Tierarten möglichst vermieden werden. Viele Arten sind zudem selten, leben im Verborgenen oder weisen schlicht keine eindeutigen geschlechtsspezifischen äußeren Merkmale auf. Sind sie, wie etwa viele Bärenarten, außerdem scheue Einzelgänger, ist die Geschlechtsbestimmung aus der Ferne oft schwierig. Tiere zur Untersuchung einzufangen ist nicht nur äußerst aufwändig, sondern auch mit unnötigem Stress für Mensch und Tier verbunden. Dennoch, für viele biologische Fragestellungen sind Informationen über das Verhältnis der Geschlechter unerlässlich. Anhand der Anzahl von weiblichen und männlichen Individuen in einer bestimmten Region lassen sich zum Beispiel Rückschlüsse auf geschlechtsspezifisches Wanderungsverhalten und die damit verbundene genetische Dynamik innerhalb von Populationen ziehen. Letztlich dienen solche Informationen dazu, Artenschutzmaßnahmen bes-



ser planen zu können und nach ihrer Durchführung auf ihre Nützlichkeit hin zu kontrollieren. Wie bestimmt man also möglichst einfach das Geschlecht eines Wildtieres?

Ferndiagnose – Molekularbiologie macht's möglich

Die Lösung liegt in der Erbinformation, der DNA (deoxyribonucleic acid), die sich im Kern jeder Körperzelle befindet. Schon mit kleinsten Mengen genetischen Materials kann der Nachweis des Geschlechts geführt werden [1]. Sie kann aus Gewebeproben wie Muskel oder Leber, aber eben auch aus Mundschleimhaut, Haaren und Kot gewonnen werden. Die Zellkerne der Haarwurzeln bzw. der Darmzellen, die dem Kot anhaften, enthalten hierbei die Bären-DNA. Haare und Kot werden als so genannte „nichtinvasive“ Proben bezeichnet, da sie als Hinterlassenschaften der Tiere im Freiland gesammelt werden können, ohne die Tiere direkt aufspüren, beobachten und gegebenenfalls einfangen zu müssen. Gerade bei Braunbären, die in vielen Gebieten nur äußerst selten zufällig beobachtet werden können, ist eine solche Methode ideal – ihren Kot auf Waldwegen zu finden ist im Bärengebiet weitaus einfacher. Die Verfahren zur Isolation der



Haarfallen eignen sich gut, um an genetisches Material zu gelangen, ohne direkten Kontakt zu den Tieren haben zu müssen. Ein Lockstoff zieht die Braunbären an und kleine Haarbüschel bleiben – von den Tieren unbemerkt – am Draht hängen. Aus den Haarwurzeln kann DNA gewonnen und damit das Geschlecht des Bären bestimmt werden.

© Alexander Kopatz

molekulargenetik



Tobias Bidon, Jg. 1985, studierte von 2004 bis 2010 Biologie in Stuttgart, Linköping und Stockholm (Schweden). Während und nach Abschluss des Studiums beschäftigte er sich unter anderem mit der Ökologie von Polarfüchsen in der schwedischen Bergtundra und Seeadlern in Norddeutschland. Seit 2012 untersucht er mit einem Stipendium der Arthur und Aenne Feindt-Stiftung als Doktorand am Biodiversität und Klima Forschungszentrum in Frankfurt genetisches Material verschiedener Bärenarten um darin nach Anpassungen an deren jeweiligen Lebensraum zu suchen und innerartliche Populationsstrukturen aufzuklären.



Alexander Kopatz, Jg. 1973, kam über die Freilandbiologie ins genetische Labor. Er studierte von 1996 bis 2002 Biologie in Kiel und Mainz. Im Anschluss zog es ihn zunächst nach Portugal und daraufhin forschte er in Finnland an Wölfen. Angestellt am staatlichen Fischerei- und Wildtierinstitut und an der Universität Oulu entwickelte und testete er dort Methoden zur nicht-invasiven Beprobung von Braunbären. Seit 2011 setzt er seine Arbeit am norwegischen Bioforsk Institut fort. In Kürze verteidigt er seine Doktorarbeit über nicht-invasive Methoden sowie zur Populationsgenetik der Bären in Norwegen, Schweden, Finnland und Russland.



Frank Hailer, Jg. 1976, studierte in Marburg/Lahn Biologie mit den Schwerpunkten Ökologie, Naturschutz und Geographie. Er promovierte 2006 in Evolutionärer Genetik an der Universität in Uppsala (Schweden). Nach einem 4-jährigen Forschungsaufenthalt an der Smithsonian-Institution in Washington/DC (USA) ist er seit 2011 Wissenschaftler am Biodiversität und Klima Forschungszentrum (BiK-F) in Frankfurt. Seine Spezialität ist es, anhand genetischer Methoden Informationen über die Evolution, Anpassung und den Schutz von Arten zu erhalten.

DNA aus diesen Proben sind relativ simpel und einfach anwendbar. Man macht sich einige spezifische Eigenschaften der großen DNA-Moleküle zu Nutze, um diese von Proteinen, Fetten und anderen Zellbestandteilen zu trennen und aufzureinigen.

Die Suche nach dem Y-Chromosom

Ist die DNA aus einer Probe isoliert, sucht man nach Hinweisen für das Vorliegen oder Fehlen der bei Säugetieren geschlechtsspezifischen Y- und X-Chromosomen. Weibchen haben zwei X-Chromosomen („Genotyp XX“), Männchen hingegen ein Y- und ein X-Chromosom („Genotyp XY“). Unabhängig vom Geschlecht wird man also immer auf X-chromosomale DNA stoßen. Das Prinzip der molekularen Geschlechtsbestimmung besteht nun darin, dass in Proben männlicher Tiere zusätzlich auch das Y-Chromosom nachgewiesen werden kann. Bei der Suche hilft das Standardverfahren der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction). Kurze Abschnitte auf Y- bzw. X-Chromosomen können mit dieser Methode spezifisch

und schnell vermehrt werden. Die große Anzahl identischer Kopien eines solchen Abschnittes wird dann mittels Gelelektrophorese nachgewiesen. Hierbei wandern die kopierten DNA-Abschnitte in einem porösen Gel, an das ein elektrisches Feld angelegt wird, aufgrund ihrer negativen Ladung mit einer bestimmten Geschwindigkeit zum Pluspol. Wählt man die Abschnitte auf dem Y- bzw. X-Chromosom vorher unterschiedlich groß – und erhält dementsprechend nach der PCR unterschiedlich lange Kopien – finden sich diese Kopien an unterschiedlichen Positionen auf dem Gel wieder und lassen sich dort getrennt voneinander identifizieren: Kopien des Y-Abschnittes an der einen, Kopien des X-Abschnittes an einer anderen Stelle. So wird der differenzierte Nachweis Y- bzw. X-chromosomaler DNA gewährleistet.

Bären-DNA aus Haaren oder Kot verrät das Geschlecht

Das Prinzip ist also relativ simpel und die Methodik kann in vielen Laboren einfach angewendet werden. Wie aber gelangt man in der

Praxis an nichtinvasives Probenmaterial? Braunbären reiben sich zur Markierung an Bäumen und hinterlassen dort oft ganze Haarbüschel, die eingesammelt werden können. Des Weiteren ist die Installation von Haarfallen eine gute Möglichkeit, um regelmäßig an Haarproben zu gelangen (siehe „Molekularbiologie im Bärengebiet“). Ein stark riechender, nicht belohnender Lockstoff, der mit Stacheldraht umzäunt ist, lockt Bären aus der Umgebung an. Mit ihrem dicken Fell streifen die Bären den Draht und hinterlassen – ohne es zu merken – genetische Spuren [2]. Das zufällige Sammeln von Kot, z.B. auf Forstwegen, ist eine weitere gute Möglichkeit, große Gebiete abzudecken und regelmäßig an genetisches Material der untersuchten Wildtierart zu kommen [3]. Die molekulare Geschlechtsbestimmung findet auch bei naturschutzfachlichen Fragestellungen Anwendung, die oft auf das Wissen um das Geschlecht der (noch) wild lebenden Individuen angewiesen sind. Man denke etwa an Maßnahmen bei Artenschutzvorhaben, die eine Umsiedelung einzelner Tiere in eine bestimmte Region zum Ziel haben. Zum Beispiel gab es Ende der

molekulargenetik

1990er-Jahre in den Pyrenäen im Grenzgebiet von Frankreich und Spanien nur noch eine Hand voll Braunbären. Durch die genetische Analyse von Haar und Kotproben wusste man, dass die meisten davon Männchen waren. Deshalb wurden bevorzugt weibliche Tiere aus anderen Populationen angesiedelt und heute leben dort wieder bis zu zwei Dutzend Braunbären [4,5].



Ein Mitarbeiter des norwegischen Bioforsk-Instituts sammelt auf einem Forstweg Kotproben eines Braunbären. Aus einer solchen nichtinvasiven Probe kann im Labor DNA isoliert werden, die dann sowohl für Grundlagenforschung als auch für das Wildtiermanagement wichtige Informationen liefert. © Alexander Kopatz



Vom Feld ins Labor Geschlechtsnachweis mit nichtinvasiven Proben mithilfe der Molekularbiologie.

Die neue Methode – empfindlicher, genauer, zuverlässiger

Wie das letzte Beispiel zeigt, sind schon seit längerem molekularbiologische Methoden zur Geschlechtsbestimmung bei Bären verfügbar. Diese waren bisher allerdings mit einigen Nachteilen behaftet [6]. So ist es äußerst wichtig, dass bereits geringste Mengen an DNA, wie sie z. B.

Molekularbiologie im Bärengbiet

Im nordnorwegischen Pasviktal im Grenzgebiet zu Russland kommt es immer wieder zu Konflikten zwischen Landwirten und Bären. Reißt ein Bär Haustiere oder Vieh, wird normalerweise die Jagd auf das Tier eröffnet. Man kann sich jedoch nie ganz sicher sein, den richtigen Bären zu erwischen. Nachdem zwei Braunbären in nächster Nähe eines Hofes beobachtet wurden, entschied man sich, das umliegende Areal im Rahmen einer Fallstudie für eine gewisse Zeit mit Haarfallen zu überwachen. Man war daran interessiert zu erfahren, wie viele Bären welchen Geschlechts sich tatsächlich dort aufhielten. Haarfallen eignen sich hierfür besonders, da sie gleichmäßig verteilt und regelmäßig kontrolliert werden können. Schnell war klar, dass mindestens fünf verschiedene Bären in den ersten vier Wochen nach der Sichtung im Gebiet um die Farm streiften. Männchen gehen bevorzugt auf Wanderschaft und wagen sich auch näher an menschliche Siedlungen heran, unter den nachgewiesenen Bären befand sich jedoch überraschenderweise auch ein Weibchen. Da die Tiere nicht mehrmals „in die Falle“ gingen, sondern bis auf eine Ausnahme nur einmal nachgewiesen werden konnten, waren sie wohl auf der Durchreise und hielten sich nicht in ihrem eigentlichen Territorium auf. Die neuen Erkenntnisse – mehr Individuen als auf den ersten Blick ersichtlich, die sich kurzzeitig in einem bestimmten Gebiet aufhalten sowie der Nachweis eines Weibchens – lassen die bisherige Vorgehensweise, Jagd auf vermeintliche „Problem“-Bären zu machen nicht mehr sinnvoll erscheinen. Und auch in diesem speziellen Fall wurde von der Tötung einer der Bären abgesehen.

in den Wurzeln einiger weniger Haare vorhanden ist, ausreichen, um den Geschlechtsnachweis zu führen. Die angewandte Methode muss also sehr sensitiv sein. Die molekulare Struktur von DNA verändert sich im Freien unter Einwirkung von Temperaturschwankungen und UV-Strahlung, aber auch Mikroorganismen zersetzen die langen Molekülketten. Daher ist es von Vorteil, wenn das Geschlecht auch noch aus kleinen Bruchstücken der einst langen Moleküle sicher herauslesen zu ist. Die analysierten Fragmente müssen also möglichst kurz sein. Zudem darf die eingesetzte Methodik nicht fälschlicherweise Erbgut einer anderen Tierart nachweisen. Zu leicht könnten gesammelte Haar- oder Kotproben auch Material anderer wilder Tiere enthalten, was die eindeutige Bestimmung des Geschlechts dann erschweren würde. Die Methode muss also spezifisch für die zu untersuchende Tiergruppe sein.

In der Gruppe um Prof. Axel Janke vom Biodiversität und Klima Forschungszentrum (BiK-F) wurde eine Methode entwickelt [7], die diese Eigenschaften kombiniert und darüber hinaus einen weiteren wichtigen Vorteil hat: Auf dem Y-Chromosom werden nicht nur ein, sondern gleich zwei Abschnitte unterschiedlicher Länge nachgewiesen. Dies bedeutet eine doppelte Absicherung, da gerade das (Nicht-)Vorhandensein des Y-Chromosoms für die Geschlechtsbestimmung ausschlaggebend ist. Aus geringen Mengen DNA lässt sich mit diesem neuen Ansatz also schnell, eindeutig und mit hoher Sicherheit das Geschlecht unter anderem von Braun-, Eis- und Schwarzbären bestimmen. Die generelle Technik ist auch für andere Säugetiere interessant. Ganz besonders gilt dies für solche Arten, die im Freiland schwer zu beobachten und zu beproben sind. So liefert ein ganz ähnliches Verfahren bereits wertvolle Ergebnisse über afrikanische und asiatische Elefanten [8].

→ tobias.bidon@senckenberg.de
→ alexander.kopatz@bioforsk.no
→ frank.hailer@senckenberg.de

Literatur

- [1] Waits, L. P. & Paetkau, D. (2005) *Journal of Wildlife Management* 69, 1419–1433
- [2] Kopatz, A. et al. (2013) *Ann. Zool. Fennici* 50, 327–332
- [3] Bellemain, E. et al. (2005) *Conservation Biology* 19, 150–161
- [4] Taberlet, P. et al. (1997) *Molecular Ecology* 869–876
- [5] Palazón, S. et al. (2012) *Galemys, Spanish Journal of Mammalogy* 24, 93–96
- [6] Pagès, M. et al. (2008) *Conservation Genetics* 10, 897–907
- [7] Bidon, T. et al. (2013) *Molecular Ecology Resources* 13, 362–368
- [8] Ablering, M. et al. (2011) *Molecular Ecology Resources* 11, 831–834

Foto: © pantbermedia | Sylvester Schneider