

• Einführung

Das 1999 gegründete **Laboratoire de Biologie de la Conservation** (LBC, Labor für Umweltschutzbiologie) ist eine Einheit des Departements für Ökologie und Evolution der Universität Lausanne, die sich auf angewandte Biologie spezialisiert hat. Dem LBC, gegründet und geleitet durch Dr. Luca Fumagalli auch von diesem geleitet wird, gehören zwei Labortechniker sowie Doktoranden und Master-Studenten an. Das Labor entwickelt und nutzt molekulargenetische Verfahren für die Untersuchung und das Management natürlicher und insbesondere vom Aussterben bedrohter Populationen. Die Angebote des LBC richten sich an Organisationen, die sich mit dem Management und der Erhaltung der Artenvielfalt beschäftigen, namentlich Regierungsbehörden, NGOs, universitäre Einrichtungen, Private sowie Gerichtsinstanzen und Zollbehörden (bei Fällen von illegalem Handel mit und Wilderei von geschützten Arten). Im Rahmen seiner Tätigkeit hat sich das LBC mit einer Vielzahl von Arten befasst – von Säugetieren über Vögel und Fische bis hin zu Reptilien und Amphibien – und war für Auftraggeber aus zahlreichen europäischen Ländern tätig. Seit seiner Gründung entwickelt das LBC im Auftrag des Bundesamtes für Umwelt (BAFU) nichtinvasive genetische Methoden zur Untersuchung der Wiederbesiedlung der Schweizer Alpen durch Grossraubtiere wie Wolf und Bär.

Die Analyse von Proben nichtinvasiven Ursprungs (Speichel, Kot, Haar, Urin usw.) ist technisch ausserordentlich anspruchsvoll, da sie nur sehr geringe Mengen an DNA enthalten und das genetische Material zudem von schlechter Qualität ist. Aus diesem Grund erfordert die Analyse solcher Proben eine besondere Logistik und spezifische Protokolle und nimmt bedeutend mehr Zeit in Anspruch als die Untersuchung konventioneller Proben. Ausserdem liefert ein beträchtlicher Anteil der Proben keine korrekt interpretierbaren Resultate. Das LBC ist eines der ganz wenigen Labors weltweit, die derartige Analysen «à la carte» anbieten.

Abbildung 1 gibt Aufschluss über die Anzahl Analysen, welche das LBC mit verschiedenen Arten von Proben zwischen 1999 und 2009 im Rahmen des Mandats über die Wiederbesiedlung der Alpen durch den Wolf (*Canis lupus*) durchgeführt hat.

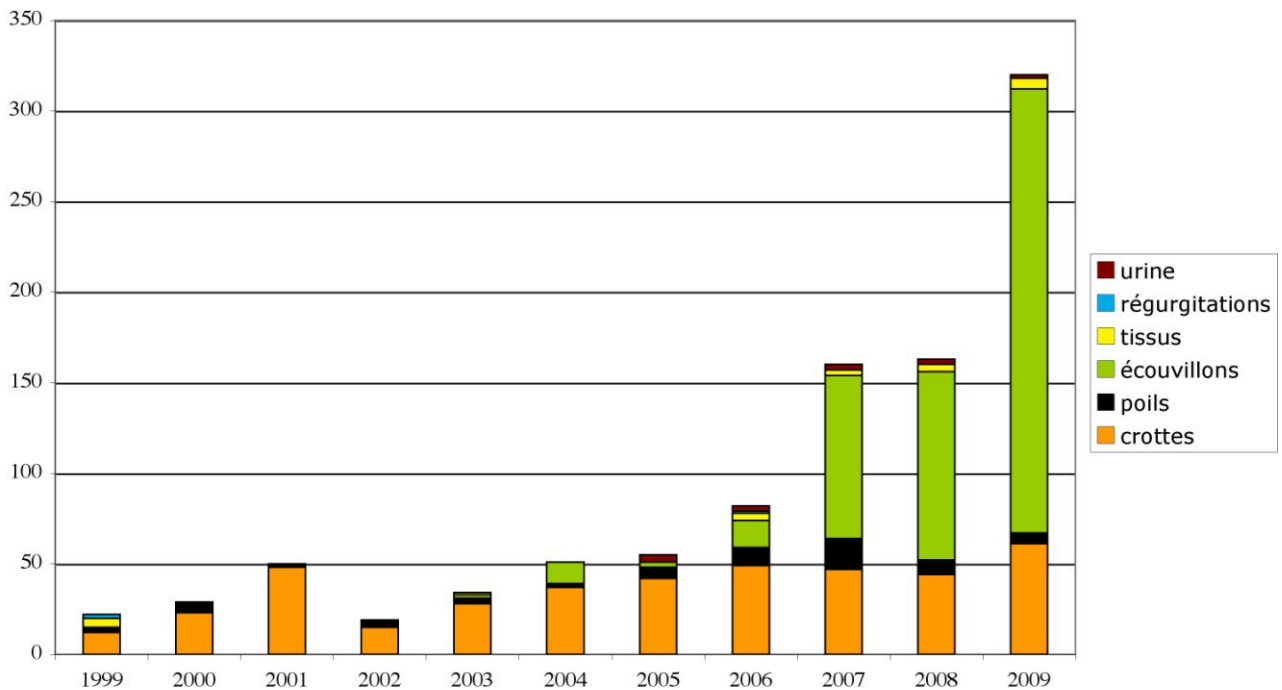


Figure 1: Type d'échantillon analysé au cours des années 1999 à 2009 pour les analyses non invasives concernant le loup (*Canis lupus*).

Abbildungsunterschrift und Legende:

Abbildung 1: Zwischen 1999 und 2009 im Rahmen der nichtinvasiven Analysen über den Wolf (*Canis lupus*) untersuchte Proben nach Probenarten.

Legende, v.o.n.u.: Urin, Ausgewürgtes, Gewebe, Abstrichtupfer, Haare, Kot

Abbildung 2 informiert über die Anteile der verschiedenen Arten, die zwischen 1999 und 2009 im Rahmen des Mandats über die Wiederbesiedlung der Alpen durch den Wolf (*Canis lupus*) mittels DNA-Sequenzierung identifiziert wurden.

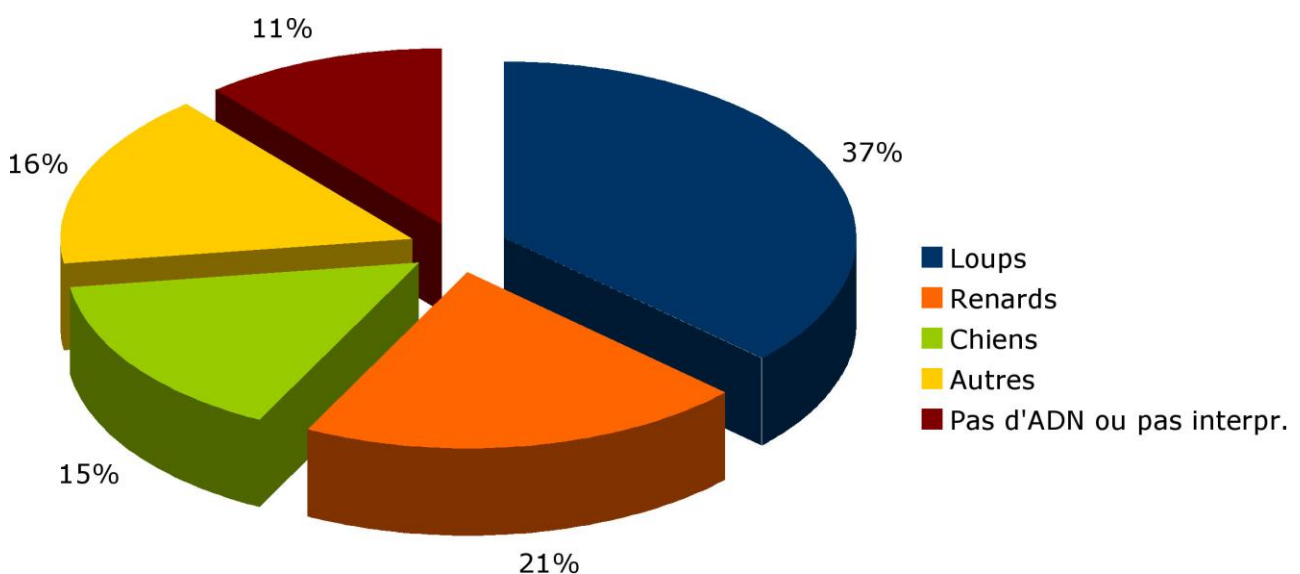


Figure 2: Espèces identifiées au cours des années 1999 à 2009 par séquençage de l'ADN mitochondrial pour les analyses non-invasives concernant le loup (*Canis lupus*).

Abbildungsunterschrift und Legende:

Abbildung 2: Zwischen 1999 und 2009 im Rahmen der nichtinvasiven Analysen über den Wolf (*Canis lupus*) mittels Sequenzierung der mitochondrialen DNA (mtDNA) identifizierte Arten.

Legende, v.o.n.u.: Wolf, Fuchs, Hund, Andere, Keine DNA oder keine Interpretation möglich

Tabelle 1 zeigt, an welchem Datum die Anwesenheit eines Wolfs in den Schweizer Kantonen, durch die mindestens einmal ein Individuum gewandert ist, erstmals durch eine genetische Analyse bestätigt wurde.

Tableau 1: Première identification (mtDNA et microsatellites) d'un loup dans les cantons suisses où la présence de l'espèce a été attestée au moins une fois, et nombre de loups différents déterminés par génotypage microsatellites de novembre 1998 à décembre 2009 et ayant transité par les cantons en question. Les dates correspondent à l'échantillonnage sur le terrain. Les individus identifiés dans les régions italiennes limitrophes de VS et TI n'ont pas été comptabilisés.

	Première identification de l'espèce par séquençage mtDNA	Premier profil ADN par génotypage de marqueurs microsatellites	Nbre. de loups différents identifiés par génotypage^(*)
VS	VI.1996, Val d'Entremont	27.11.1998, Reckingen	15
TI	10.01.2001, Monte Carasso	27.01.2004, Osco	2
GR	20.04.2001, Vicosoprano	29.09.2001, Margna	7
BE	23.03.2006, Gsteigwiler	23.03.2006, Gsteigwiler	3
VD	06.08.2007, Anzeindaz	21.06.2008, Ayerne	1
FR	31.10.2007, Jaun	22.12.2007, Estavannens	2
OW	16.10.2008, Teufibach	01.03.2009, Sarnen	1
LU	02.02.2009, Schwarzenberg	22.04.2009, Eigenthal/Unterlauelen	1
SZ	13.04.2009, Unteriberg	-	-

(*) Le total de cette colonne est supérieur au nombre d'individus différents identifiés en Suisse lors de la même période (31), car certains individus ont transité par plusieurs cantons différents.

Tabellenüberschrift und Tabellentext

Tabelle 1: Erste Identifikation (mtDNA und Mikrosatelliten) eines Wolfes in den Schweizer Kantonen, in denen die Anwesenheit der Art mindestens einmal dokumentiert ist, und Anzahl der mittels Genotypisierung von Mikrosatelliten bestimmten verschiedenen Individuen, die zwischen November 1998 und Dezember 2009 durch diese Kantone gewandert sind. Die Daten beziehen sich auf die Probenentnahme im Feld. Die Individuen, die in an das Wallis und das Tessin angrenzenden italienischen Regionen identifiziert wurden, sind in der Aufstellung nicht berücksichtigt.

Erste Identifikation der Art mittels mtDNA-Sequenzierung	Erstes DNA-Profil mittels Genotypisierung von Mikrosatellitenmarkern	Anzahl verschiedener Individuen, die mittels Genotypisierung identifiziert wurden (*)
--	--	---

(*) Das Total dieser Spalte ist höher als die Anzahl der verschiedenen Individuen, die in dieser Zeit in der Schweiz identifiziert wurden, da gewisse Individuen durch mehrere verschiedene Kantone gewandert sind.

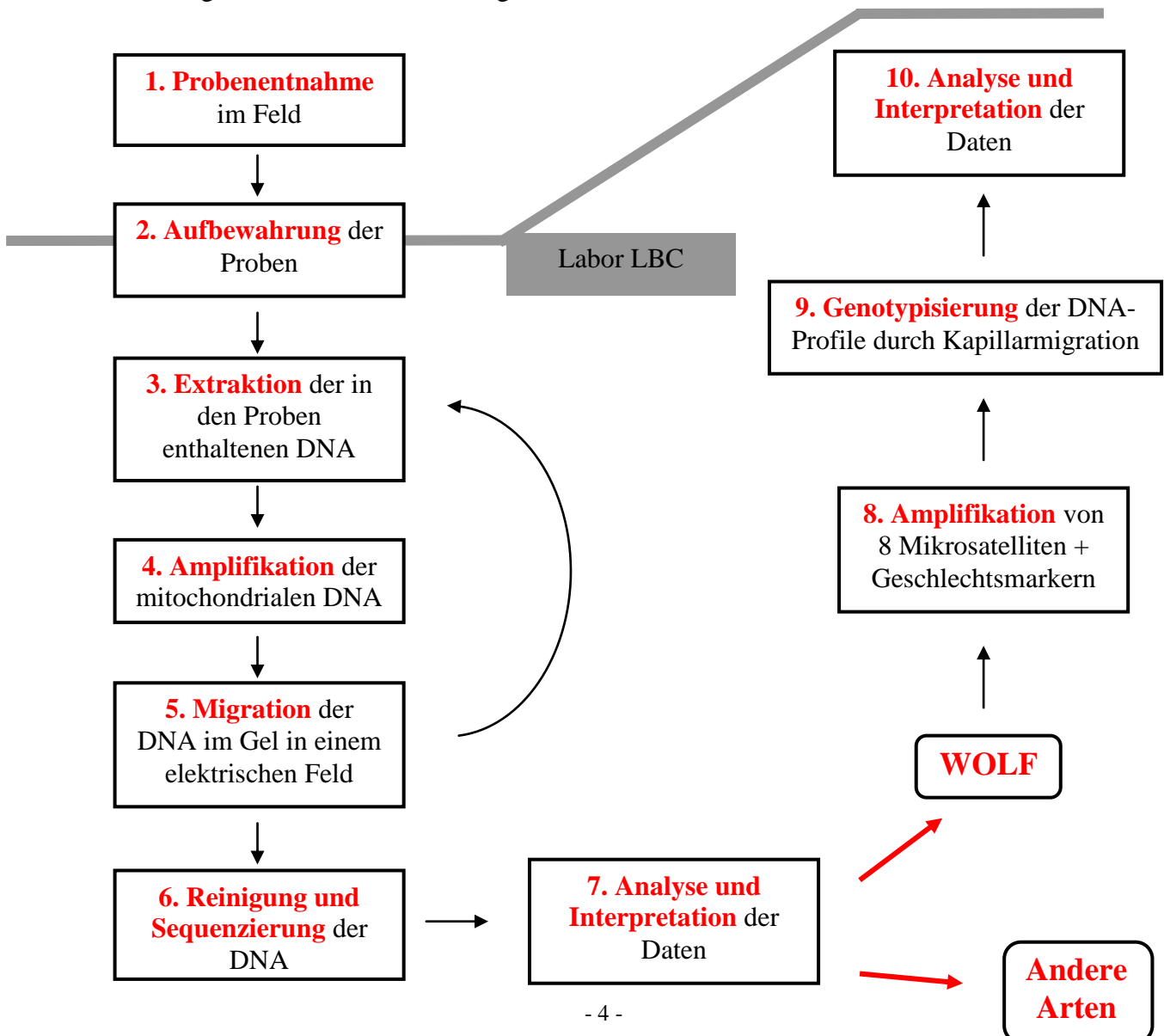
• Methoden

Bei nichtinvasiven Analysen im Zusammenhang mit dem Wolf greift das LBC im Wesentlichen auf zwei Techniken zurück:

- *Sequenzierung der mitochondrialen DNA*: Sie ermöglicht die Identifikation der Art, von der die Probe stammt, und die Feststellung ihrer geografischen Herkunft (genetische Abstammungslinie). Die Präzision der Aussagen zum letztgenannten Punkt hängt weitgehend von der analysierten Art und ihrer demografischen Geschichte ab. Im Falle des Wolfes beispielsweise lässt sich eindeutig nachweisen, dass der genetische Ursprung sämtlicher Individuen, die seit Ende der 1980er-Jahre im Alpenraum identifiziert wurden, auf der italienischen Halbinsel liegt, denn die Genvariante, die mittels Sequenzanalyse bei allen untersuchten Tieren entschlüsselt wurde, ist nur in den wild lebenden Populationen Mittel- und Süditaliens und nirgendwo sonst auf der Welt zu finden.

- *Genotypisierung von Mikrosatelliten*: Anhand dieses Verfahrens können einzelne Tiere durch die Erstellung des genetischen Fingerabdrucks identifiziert werden. Bei dieser Technik ist die geringe Menge bzw. die schlechte Qualität von DNA-Material noch problematischer als bei der Sequenzanalyse. Dies bedeutet, dass bei einem Teil der Proben, bei denen zuvor die DNA erfolgreich sequenziert werden konnte, keine Genotypisierung möglich ist.

Das nachstehende Schema illustriert die verschiedenen Etappen einer genetischen Analyse zur Identifizierung der Art und zur Erstellung eines DNA-Profiles:



Erläuterungen:

- Die Etappen 1 und 2 sind von zentraler Bedeutung und für den weiteren Verlauf der Analysen bestimmend.
- Bei nichtinvasiven Analysen bewegen sich die in Etappe 3 zu extrahierenden Mengen an DNA häufig im Picogramm-Bereich (Billionstel Gramm).
- Bevor mit Etappe 3 begonnen wird, werden die Proben (mit Ausnahme von Kot) über Nacht (ca. 8 Stunden) vorbereitet.
- Werden in Etappe 5 die gesuchten Fragmente nicht gefunden, wird der Versuch ab Etappe 3 oder 4 wiederholt. Bleibt auch dieser Versuch erfolglos, wird die betreffende Probe der Kategorie «Keine DNA» zugeordnet.
- In den Etappen 4 bis 7 sind für Abstrichtupfer doppelt so viele Analysen erforderlich wie bei anderen Proben.
- In Etappe 7 werden die dem Wolf zugeordnete Proben aussortiert; nur diese werden für die weiteren Untersuchungen verwendet.
- Stellt sich in Etappe 7 heraus, dass sich aufgrund einer Kontaminierung durch verschiedene Arten mehrere Sequenzen überlagern und deshalb nicht ausgewertet werden können, wird die betreffende Probe der Kategorie «Keine Interpretation möglich» zugeordnet.
- Etappe 8 wird für jede nichtinvasive Probe 8-mal wiederholt (dies ergibt insgesamt 72 Genotypisierungen pro Probe). Damit soll das Fehlerrisiko aufgrund der geringen Menge bzw. der schlechten Qualität des DNA-Materials minimiert werden.
- In Etappe 9 können für einen bedeutenden Anteil der Proben aufgrund der schlechten Qualität des DNA-Materials in nichtinvasiven Proben keine interpretierbaren Resultate gewonnen werden. Der Anteil ist abhängig von der Art der Probe, von der Beeinträchtigung des Probematerials im Feld, von der Qualität der Lagerung, von der darin enthaltenen Menge DNA-Material usw. und lässt sich nicht von vornherein feststellen.
- In Etappe 10 werden die DNA-Profile mit den Datensätzen einer Datenbank verglichen, um festzustellen, ob es sich um ein noch unbekanntes oder um ein bereits zuvor identifiziertes Individuum handelt.

• **Zeitbedarf**

Aufgrund verschiedener unvorhersehbarer Faktoren – insbesondere technischer Probleme im Zusammenhang mit einer schlechten Probenqualität – lässt sich der Zeitbedarf für die Analyse nichtinvasiver Proben nur sehr schwer abschätzen. Ausserdem werden verschiedene besonders kostenintensive Apparate gemeinsam mit anderen Forschergruppen der Universität genutzt. Ihre Verfügbarkeit hängt von der Belegung durch mehrere Dutzend weiterer Benutzer ab, was zu Verzögerungen führen kann.

Gerechnet ab dem Eintreffen der Proben im Labor dauert es in der Regel bis zu 2 Wochen, bis die Ergebnisse der Sequenzierung der mitochondrialen DNA vorliegen; die Genotypisierung von Mikrosatelliten nimmt zusätzlich bis zu 3 Wochen in Anspruch.

Bei unerwarteten technischen Problemen (z. B. Ausfall eines Geräts) informiert das LBC über allfällige Verzögerungen.

• **Probenahme im Feld und Aufbewahrung der Proben**

Proben für eine genetische Analyse können auch von Personen ohne spezifische Ausbildung entnommen werden. Allerdings kann eine unsachgemässe Entnahme der Proben deren genetische Analyse erschweren oder gar verunmöglichen. Um jegliche Kontaminierung der Proben unter sich und durch menschliche DNA zu vermeiden, sollte die Probenahme grundsätzlich nur mit sauberen

Händen und gereinigtem Werkzeug erfolgen (z. B. Handschuhe, Einwegskalpell oder sauberes, mit der Flamme sterilisiertes Skalpell, an dem keine Spuren eines anderen Individuums haften), und die Proben sind einzeln in etikettierten Röhrchen oder Beuteln zu verpacken. Um eine Zersetzung des Probenmaterials zu vermeiden, sind die Proben nach der Entnahme so rasch als möglich zu konservieren.

Im Hinblick auf Proben von Raubtieren empfiehlt das LBC folgende Techniken:

- *Kot*: Eine kleine Menge Kot in ein Röhrchen geben und vollständig mit 100-prozentigem Alkohol bedecken; den Deckel gut verschliessen, um ein Auslaufen zu vermeiden. Diese Probe ist für die genetische Analyse bestimmt. Der Rest des Kots wird in einen Beutel verpackt. Dieser Teil der Probe wird zur Untersuchung der Ernährungsgewohnheiten verwendet (KORA). Beide Proben sind zu beschriften und an folgende Adresse zu schicken: KORA, Thunerstrasse 31, 3074 Muri. Es darf nur reiner Alkohol verwendet werden (Ethanol oder Äthylalkohol), auf keinen Fall aber denaturierter Alkohol (wie z. B. Brennsprit). Idealerweise sollte man einige mit Alkohol gefüllte Proberöhrchen vorbereiten, bevor man sich ins Feld begibt. Das LBC empfiehlt die Verwendung folgender Gefässe: Roth-Messflaschen, Typ Vial aus LDPE, 20 ml.

Diese Behälter können unter www.carlroth.ch bestellt werden (Artikel Nr. 0794.1).

- *Abstrichtupfer (Wattestäbchen)*: Mit dem Tupfer rund um eine saubere Wunde der Beute (kein oder nur wenig Blut des Beutetiers) streichen, um allfällige Speichelreste des Prädators aufzunehmen. Für jede Wunde ist ein Tupfer zu verwenden. Um die Gefahr einer Kontamination zu minimieren sollten separat erhältliche Trockentupfer benutzt werden!

In Kartonschachtel:

<http://www.forensix.ch/de/produkte/produkte-uebersicht/referenzproben/wangenabstrichset-karton/>

In Plastiktuben: (z.B. Copan CO-155C):

http://www.milian.com/Milian_Schweiz/de/Katalog/Bakteriologie/Abstichtbestecke/Abstrichbestecke_steril_in_Roehrchen/search:4da56f24dcd374_059483690

Beim Gebrauch von Plastiktuben müssen die Trockentupfer bevor Verschluss der Tuben, bei Raumtemperatur trocknen (an einem sauberen Ort und ohne Kontakt mit anderen Trockentupfern).

- *Haare*: Es ist darauf zu achten, dass sich die Haarwurzel (Bulba) noch am Haar befindet. Ein abgeschnittenes Haar ohne Wurzel enthält keine DNA. Entnommene Haare sind in einem Papierumschlag zu trocken und bei Raumtemperatur aufzubewahren.

- *Urin im Schnee*: Einen Teil des Schnees mit Urin entnehmen, in ein verschliessbares Röhrchen geben und im Gefrierschrank aufbewahren.

- *Gewebe*: Einige Kubikzentimeter Gewebe in ein Fläschchen geben und mit 70- bis 100-prozentigem Alkohol bedecken. Bei Raumtemperatur oder im Kühlschrank aufbewahren.

