

## Eine nicht-invasive, kostengünstige Methode zur genetischen Untersuchung von Feldhamsterpopulationen (*Cricetus cricetus*)

A non-invasive, cost-efficient method for genetic analyses of Common hamster populations (*Cricetus cricetus*)

TOBIAS E. REINERS\*<sup>1</sup>, JORGE A. ENCARNÇÃO\*<sup>1</sup> and V. WOLTERS\*<sup>1</sup>

**Zusammenfassung:** Diese Untersuchung hatte die Etablierung und Anwendung einer nicht-invasiven populationsgenetischen Untersuchungsmethode zur Charakterisierung von Feldhamsterpopulationen zum Ziel. Es gelang, mit Hilfe einer speziell entwickelten Haarfalle, Haare von lebenden Feldhamstern im Freiland zu gewinnen und als Grundlage für eine Mikrosatellitenanalyse zu verwenden. Die methodischen Schritte der molekulargenetischen Analyse wurden auf die nicht-invasive Probenahme von Haaren angepasst. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass diese Methode zur genetischen Charakterisierung von Feldhamstern erfolgreich durchgeführt wurde. Zusätzlich konnten die Materialkosten zur Analyse einer Probe auf ca. 20 € beschränkt werden, was eine Anwendung in der Praxis erleichtert. Die Methodik ist somit sowohl für Vorkommensnachweise, als auch als Instrument für ein störungsfreies genetisches Monitoring von Feldhamstern geeignet.

**Schlagnote:** nicht-invasiv, Populationsgenetik, Haare

**Abstract:** The aim of this study was to establish and apply a non-invasive population genetic method for the investigation of Common hamster populations. With the aid of a newly developed hair-trap, we were able to remotely pluck hair from Common hamsters in the field. All methodical steps of the molecular analysis were fitted to work with non-invasive samples. The results of this study show that we successfully established the methodology for a non-invasive study of Common hamster populations. The use of the hair-trap in combination with a simplified laboratory routine allowed us to sample and genotype 30% of 324 known hamster burrows. In addition we minimized costs of material to approximately 20 €, which makes it very applicable. This method may find usage for occurrence verification or could be used as an instrument for long term genetic monitoring of Common hamster populations without the need of ongoing disturbance.

**Key words:** non-invasive, population genetics, hairs

### Einleitung

In dieser Untersuchung wurde eine nicht-invasive genetische Beprobung für eine populationsgenetische Untersuchung von hessischen Feldhamstern entwickelt, welche keinen Fang der Tiere erfordert, sowie einfach und auch kostengünstig durchzuführen ist. Zusätzlich ermöglicht diese Methode auch eine ausreichende Ausbeute für populationsgenetische Studien.

Die nicht-invasive genetische Beprobung wird in den letzten Jahren zunehmend im angewandten Naturschutz und in der wissenschaftlichen Praxis benutzt (PIERRE TABERLET 1999; PIG-GOTT & TAYLOR 2003). Nicht-invasive Methoden ermöglichen genetische Untersuchungen von freilebenden Tieren, ohne diese zu fangen, zu schädigen oder sie überhaupt zu sichten. Die Anwendungsbereiche sind vielfältig und die Methodik findet Gebrauch in Studien im Bereich der Ethologie, im Naturschutz, im Wildtiermanagement und in der klassischen Populationsgenetik.

---

\*<sup>1</sup> Tobias E. Reiners, Jorge A. Encarnação, V. Wolters, Mammalian Ecology Group, Department of Animal Ecology, Justus-Liebig-University of Giessen, Heinrich-Buff-Ring 26, D - 35392 Giessen

Correspondence: tobias.reiners@bio.uni-giessen.de

**Tab. 1** Fünf Stufen einer nicht-invasiven genetischen Untersuchung und verbundene Einschränkungen.

1.	Beprobung	Probenmenge und Probenqualität niedrig
2.	Probenlagerung	Degradierung
3.	DNA Extraktion	Unzureichende Aufreinigung und Ausbeute
4.	PCR Reaktion	Unspezifisch und geringe Produktbildung
5.	Genotypisierungsfehler	„Falsche“ Allele und Ausfall von Produkten

Der Einsatz von nicht-invasiver Beprobung beinhaltet jedoch viele Einschränkungen, welche meist durch die geringe Quantität und Qualität der gewonnenen DNA begründet werden (WAITS & PAETKAU 2005; BROQUET et al. 2007). Zusammenfassend können die Einschränkungen und Nachteile von nicht-invasiver genetischer Beprobungen, im Speziellen bei der Verwendung von Haaren, in fünf Stufen eingeteilt werden (Tabelle 1). In jeder Stufe können negative Einwirkungen den Erfolg einer Studie einschränken. In dieser Studie ist aufgeführt, wie diesen Einschränkungen methodisch entgegengewirkt wurde.

## Material & Methoden

### 1. Beprobung

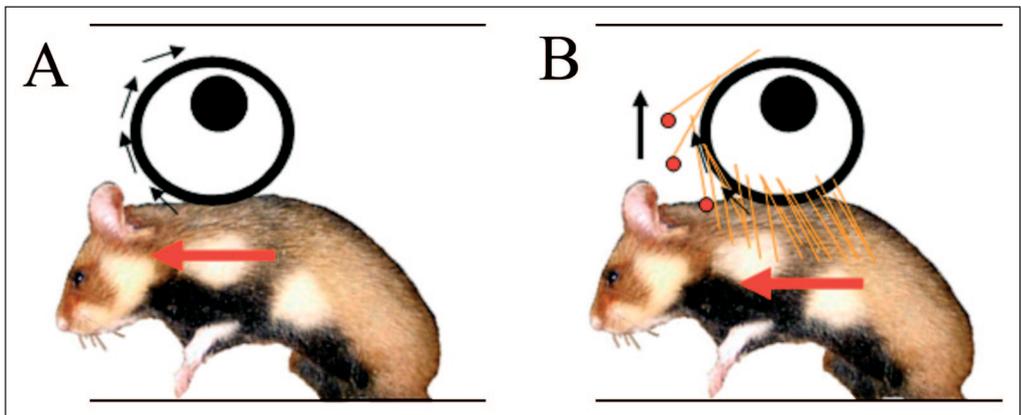
Als Ausgangsmaterialien für die Konstruktion der Haarfallen dienten konventionellen PVC Röhre (Durchmesser 17,5 cm) und hohle Plastikstäbe (Durchmesser 1,2 cm). Als weiteres Material für die Anwendung im Feld wurde doppelseitiges Tesafilm (tesa, doppelseitiges Klebeband, Breite 5 cm) verwendet, welches auch über sehr lange Zeiträume nicht austrocknet. Das Klebeband wurde kurz vor dem Einbringen der Falle in einen Baueingang, außen auf den gekürzten Plastikstab aufgebracht (Abbildung 1).

Die Funktionsweise der Fallen bietet mehrere Vorteile gegenüber einer Röhre, die einfach mit Kleber ausgekleidet ist. Erstens können die Plastikrollen durch einen herausnehmbaren Plastikstift immer leicht entfernt oder ausgewechselt werden. Zweitens verursachen die Röhren keine Behinderung für das Tier, da die Rolle sich bei Bewegung des Tieres dreht (Abbildung 2a). Die Drehung der Rolle hat den weiteren Vorzug, dass diese eine Bewegung vom Tier weg erzeugt, so dass Haare senkrecht herausgezogen werden (Abbildung 2b).



**Abb. 1a)** Verwendete Bauteile,

**b)** in Feldhamsterbau platzierte Haarfalle.



**Abb. 2** Funktionsweise der Haarfalle. A) Die Vorwärtsbewegung des Tieres bewirkt eine Drehung der Rolle B) Die Drehung der Rolle bewirkt eine senkrechte Zugbewegung und Entnahme der Haare.

## 2. Probenaufbewahrung

Für eine optimale Probelagerung wurde eine Aufbewahrungsmethode gewählt, die eine einfache Handhabung ermöglicht, die in den Haarwurzeln enthaltene DNA konserviert und Schädigungen der DNA vermeidet. Eine optimale Lagerung der Proben wird bei minimalen Temperaturschwankungen, sowie lichtgeschützter und trockener Lagerung gewährleistet (FORAN et al. 1997).

Als Aufbewahrungsbehälter wurden Gefäße (Herst. Sarstaedt) mit einem Päckchen mit Silica Gel (Wisepac WiseMini) verwendet (Abbildung 3), die zur Minimierung von Schadeinflüssen in einer Kühlbox transportiert wurden.

## 3. DNA Extraktion

Die Chelex-Extraktion bietet klare Vorteile gegenüber dem kommerziellen Extraktionskit, da sie kostengünstig, einfach und schnell durchzuführen ist. Des Weiteren wurde die Chelex-Extraktion vorgezogen, da jeweils nur ein Eppendorfgefäß für die vollständige Extraktion benö-



**Abb. 3** Verwendetes Probengefäß mit Nagel und Silica Gel und exemplarisch eine eingebrachte Haarprobe.

tigt wird, was die Gefahr einer Kontamination verringert. Andere Extraktionsmethoden benötigen mehrfache Überführung von Chemikalien, Pellets und Überständen. Für die Haarwurzelproben wurde eine abgewandelte Chelex-Extraktion angewendet (WALSH et al. 1991).

#### 4. PCR Reaktion

Für den Feldhamster *C. cricetus* wurden bereits zwei Sätze mit 19 artspezifischen Mikrosatelliten veröffentlicht (NEUMANN & JANSMAN 2004; JAKOB & MAMMEN 2006). In dieser Untersuchung wurden daraus 10 Mikrosatellitenloci ausgesucht und für diese spezifische Primer nach Kriterien für nicht-invasive Proben neu entworfen (TABERLET et al. 1999; BROQUET et al. 2007). Ausgehend von diesen Primern wurden neue Multiplex-Reaktionsansätze konzipiert. Die Multiplex PCR führt durch die Reduktion von Reaktionen und die damit verbundene Zeitminimierung zu einer deutlichen Kostenersparnis. Als Reaktionslösung wurde ein kommerzieller PCR Kit der Firma QIAGEN® verwendet (QIAGEN® Multiplex PCR Kit). Dieser Kit ist speziell für Multiplexreaktionen konzipiert und enthält neben genau abgewogenen Verhältnissen der PCR Reagenzien eine Hot-Start Polymerase (HotStarTaq® DNA Polymerase). In Kombination mit dem QIAGEN Multiplex PCR Kit verringern sich überdies die Anzahl an erforderlichen Pipettierschritten und die Gefahr von Kontaminationen.

Da die in den Haaren enthaltenen DNA Mengen sehr gering sind und Kontaminationen verhindert werden sollten, wurde auf eine sterile Präparation sehr viel Wert gelegt. Die Anwendung einer sterilen Arbeitsweise, sowie die räumliche Trennung der DNA-Extraktion und der PCR, sind wichtige grundlegende Methoden beim Umgang mit nicht-invasiven Proben und geringen DNA Mengen („*ancient lab*“ Methodik) (TABERLET et al. 1999; WAITS & PAETKAU 2005).

Alle PCR Reaktionen wurden in einem Eppendorf® MasterCycler Gradient durchgeführt. Für jeden Reaktionsansatz wurden 2 µl Rnase-freies Wasser, 5 µl 2x QIAGEN® Multiplex PCR Master Mix und 1 µl Multiplex Primer Mix (jeder Primer 2µM) mit 2 µl DNA Lösung gemixt. Als geeignetes PCR Programm wurde ein PCR Programm etabliert, welches für alle Primer und beide Multiplexansätze gleichermaßen gut amplifiziert. In dem ersten 15 Minuten dauernden Denaturierungsschritt wird die Hot-Start Polymerase aktiviert. Anschließend wird in einem „Touch-Down“-Verfahren die Temperatur in acht Zyklen jeweils um 1°C gesenkt und 60°C auf 52°C herabgesetzt. In anschließenden 27 Zyklen wird bei 52°C amplifiziert. Die Genotypisierung wurde mittels eines ABI3130 xl Genetic Analyser durchgeführt.

#### 5. Genotypisierungsfehler

Um abzuschätzen wie hoch die Wahrscheinlichkeit für Genotypisierungsfehler ist, wurden von ~50% der Proben die PCR-Reaktionen nochmals durchgeführt. Hierbei wurden Replikate der Haarpräparate und Wiederholungen bereits verwendeter DNA Isolationen analysiert. Wiederholungen der PCR aus dem gleichen DNA Isolat sollten hierbei Aufschluss über mögliche Fehler in der PCR geben. Replikate wurden verwendet um eventuelle Unterschiede durch fehlerhafte DNA Isolation aufzudecken.

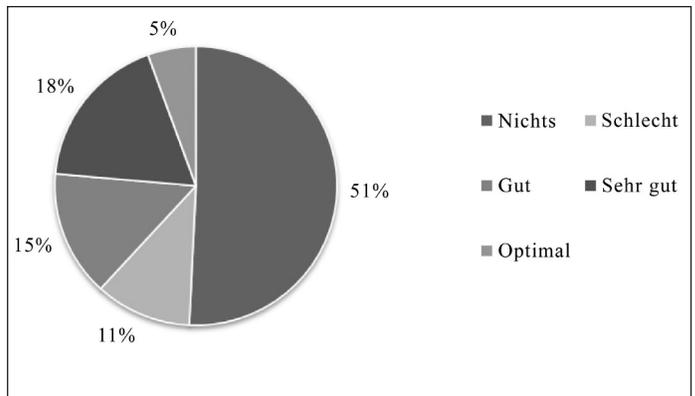
#### Ergebnisse

Für die genetische Untersuchung konnten mit Hilfe der Haarfalle 97 Probenentnahmen in Feldhamsterbauen erfolgreich durchgeführt werden. Um diese Menge an Proben zu erhalten wurden insgesamt 199 Haarfallen in Eingängen von Feldhamsterbauen eingebracht. Hierbei wurden die erhaltenen Proben in 5 Kategorien eingeteilt (Abbildung 4; Abbildung 5). Es ergab sich somit eine Erfolgswahrscheinlichkeit von 49,3%. Dies bedeutet, dass nahezu jede zweite Falle, die ausgebracht wurde, nach einer Nacht Haarproben enthielt. Im Mittel befanden sich 20 (±15) Haare an einer Falle.

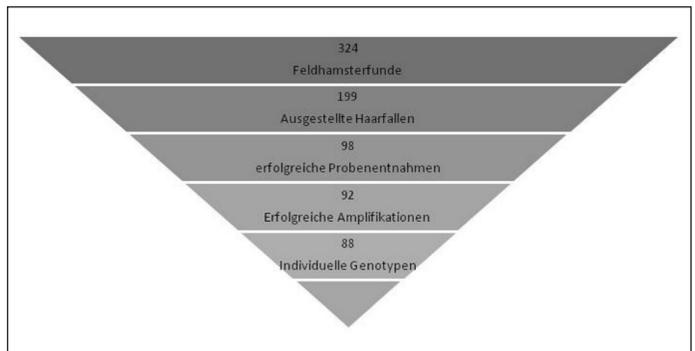
Durch die erneute Analyse der Replikate der Haarpräparate und der Wiederholungen bereits verwendeter DNA Isolationen ermittelte sich ein Amplifikationserfolg von 95,2%.



**Abb. 4** Zwei im erfolgreiche Haarprobenentnahmen. Die linke Falle wurde mit dem „Optimal“ eingestuft. Die rechte Falle erhielt die Bewertung „Sehr gut“.



**Abb. 5** Differenzierung des Haarfallenerfolgs in 5 Stufen.



**Abb. 6** Ausbeute der Kartierung und gewonnene Genotypen im Vergleich zu den Feldhamsterfunden.

Zusammenfassend konnten den 324 gefundenen Feldhamsterbauen im Nacherntezeitraum 2009, 88 einzelne Genotypen gewonnen werden. Somit konnten aus 27,2% der gefundenen Baue Tiere genetisch charakterisiert werden (Abbildung 6).

## Diskussion

Das methodische Ziel der Untersuchung war die Etablierung einer nicht-invasiven populationsgenetischen Untersuchungsmethode. So wurden mit Hilfe einer speziell entwickelten Haarfalle, Haare von lebenden Feldhamstern im Freiland gewonnen und als Grundlage für eine Mikrosatellitenanalyse verwendet. Für die molekulargenetische Analyse wurden die methodischen Schritte auf die nicht-invasiven Methode mittels Haarproben angepasst. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die nicht-invasiven Methode zur genetischen Charakterisierung von Feldhamstern sehr erfolgreich durchgeführt werden konnte. Die einfache Handhabung der Haarfalle und eine effiziente Labortechnik ermöglichten es, einen Anteil von 30% der 324 im Feld nachgewiesenen Feldhamster erfolgreich zu genotypisieren. Die Anwendung einer simplen jedoch effizienten Methodik hatte zur Folge, dass nur 4,8% aller Reaktionen keine Produkte bildeten. Der Amplifikationserfolg dieser Methodik mit 95,2% liegt somit über dem mittleren Amplifikationserfolg von 80,2%, welcher für andere nicht-invasive genetische Untersuchungen mit Haaren angegeben wird (BROQUET et al. 2007). Zusätzlich konnten die Materialkosten zur Analyse eine Probe auf ca. 20 € beschränkt werden, was eine Anwendung in der Praxis erleichtert. Die Methodik könnte sowohl für Vorkommensnachweise als auch als Instrument für ein störungsfreies genetisches Monitoring von Feldhamsterpopulationen genutzt werden.

## Literatur

- BROQUET, T., MÉNARD, N. & E. PETIT (2007): Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. – *Conservation Genetics* 8, 249-260.
- FORAN, D. R., MINTA, S. C. & K. S. HEINEMEYER (1997): DNA-based analysis of hair to identify species and individuals for population research and monitoring. – *Wildlife Society Bulletin* 25, 840-847.
- FRANKHAM, R., BALLOU, J. D. & D. A. BRISCOE (2002): *Introduction to conservation genetics*. – Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- JAKOB, S. S. & K. MAMMEN (2006): Eight new polymorphic microsatellite loci for genetic analyses in the endangered common hamster (*Cricetus cricetus* L.). – *Molecular Ecology Notes* 6, 511-513.
- NEUMANN, K. & H. JANSMAN (2004): Polymorphic microsatellites for the analysis of endangered common hamster populations (*Cricetus cricetus* L.). – *Conservation Genetics* 5, 127-130.
- PIERRE TABERLET, G. L. (1999): Non-invasive genetic sampling and individual identification. – *Biological Journal of the Linnean Society* 68, 41-55.
- PIGGOTT, M. P. & A. C. TAYLOR (2003): Remote collection of animal DNA and its applications in conservation management and understanding the population biology of rare and cryptic species. – *Wildlife Research* 30, 1-13.
- TABERLET, P., WAITS, L. P. & G. LUIKART (1999): Noninvasive genetic sampling: look before you leap. – *Trends in Ecology & Evolution* 14, 323-327.
- WAITS, L. P. & D. PAETKAU (2005): Noninvasive Genetic Sampling Tools for Wildlife Biologists: A Review of Applications and Recommendations for Accurate Data Collection. – *The Journal of Wildlife Management* 69, 1419-1433.
- WALSH, P. S., METZGER, D. A. & R. HIGUCHI (1991): Chelex® 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. – *BioTechniques* 10, 506-513.