

# 'MOLECULAIRE FAECOLOGIE', EEN NIEUWE ONDERZOEKSMETHODE

Hugh Jansman

Onderzoek aan zoogdieren wordt in hoge mate bemoeilijkt door hun slechte waarneembaarheid; ze zijn bijvoorbeeld vaak 's nachts actief. Vandaar dat allerlei hulpmiddelen zijn bedacht om op indirecte wijze toch een en ander te weten te komen. Het huidige zoogdieronderzoek maakt dan ook dankbaar gebruik van methoden en hulpmiddelen als sporenonderzoek, merken en terugvangen, vleermuisdetectoren, infrarood foto-, film- en videocamera's en radiotelemetrie (zenders). Veel van deze methoden hebben het nadeel dat de dieren moeten worden gevangen. Binnen Alterra, het voormalige Instituut voor Bos- en Natuuronderzoek (IBN), wordt momenteel in internationaal verband gewerkt aan een methode om zonder de dieren te storen een aantal onderzoeksvragen te beantwoorden. In dit geval gaat het om de otter, *Lutra lutra*.



Het principe van de methode is, dat gebruik wordt gemaakt van de lichaamscellen en hormonen die zoogdieren in het veld achterlaten, bijvoorbeeld in haren, geurstoffen en uitwerpselen. Alterra ontwikkelt nu een methode om de uitwerpselen van otters te gebruiken voor individu-herkenning.

Hoewel zo nu en dan een enkel individu is gespeurd langs de Maas in Limburg, wellicht afkomstig van een kleine relictpopulatie in de Ardennen, is sinds 1988 in Nederland geen sprake meer van een zelfstandige populatie otters. Belangrijke factoren voor die achteruitgang zijn habitatvernietiging, isolatie, verkeerssterfte en verdrinking in visfuiken. Maar ook ziekte en verstoorde voortplanting door blootstelling aan

Voor het volgen van de otters die in de toekomst in Nederland worden uitgezet, zullen diverse technieken gebruikt worden. Eén daarvan is de 'moleculaire faecologie'... Foto Gerard Müskens

landbouwbestrijdingsmiddelen en milieuvuulende stoffen wordt als een belangrijke oorzaak beschouwd (Leonards 1997).

Inmiddels zijn er vergevorderde plannen om de otter weer in de Nederlandse wateren uit te zetten. Alterra is door het ministerie van LNV aangewezen als verantwoordelijke voor het onderzoek naar het welbevinden van de otters. De meeste otters zullen in de beginfase van een geïmplanteerde zender worden voorzien, waardoor bijvoorbeeld sterfte, terreingebruik, dispersie, voedsel en activiteitenpatroon van de dieren bestudeerd kunnen worden.

### Hormonen

Een mogelijke bedreiging voor de uit te zetten otters vormen de milieuvuulende stoffen. Hoewel de concentraties van deze stoffen in het milieu de laatste jaren zijn afgenomen, komen ze toch nog in relatief hoge concentraties in de top van de voedselpiramide, waar de otter zich bevindt, voor. Een belangrijke vraag is dan ook of deze stoffen de gezondheid van de uitgezette otters zal beïnvloeden. Een veel voorkomende manier waarop milieuvuulende stoffen hun schadelijke werking uitoefenen is versterking van de hormoonhuishouding. Als we bij de uitgezette otters zouden willen weten hoe het met de hormonen staat, zouden regelmatig bloedmonsters genomen moeten worden. Maar omdat otters nogal stressgevoelig zijn en zich nauwelijks laten vangen, is dit in de praktijk geen bruikbare methode.

Hormonen worden echter ook uitgescheiden in de urine en uitwerpselen. Weliswaar gaat het dan voornamelijk om afbraakproducten, en schommelen de concentraties in uitscheidingsproducten meer dan in bloed, maar onderzoek in Oostenrijk heeft aangetoond dat hormoononderzoek aan uitwerpselen zinvol is. Het bleek mogelijk om aan de hand van hormoonconcentraties te bepalen of een uitwerpsel afkomstig was van een mannelijk of vrouwelijk dier, of een wijfje seksueel actief of inactief was, en of ze zwanger was of niet (Tschirch et al. 1996). Zo kan dus indirect worden vastgesteld of de hormoonhuishouding van otters verstoord is als mogelijk gevolg van blootstelling aan milieuvuulende stoffen. In dierentuinen wordt deze methode al toegepast. Voor veldsituaties dient zich echter een ander probleem aan, namelijk hoe stel je vast wie



Zou het mogelijk zijn de uitgezette otters in de gaten te houden door hun keutels te verzamelen?  
*Foto Jaap Mulder*

de eigenaar van een uitwerpsel is? Het antwoord op deze vraag ligt in het DNA, de genetische blauwdruk van het leven.

### DNA in uitwerpselen

De cellen van de binnenwand van de dikke darm worden regelmatig vervangen door nieuwe, waarbij de oude in de uitwerpselen belanden. Deze cellen bevatten het DNA waarmee een uitwerpsel te karakteriseren is. Een bepaalde techniek maakt het mogelijk een DNA-monster op individu te herleiden, een vorm van 'fingerprinting'. In het gerechtelijk onderzoek gaat dit ook een steeds belangrijker rol spelen. De hier gebruikte methode maakt gebruik van 'microsatellieten', dat zijn korte reeksen herhalingen van steeds dezelfde DNA-bouwsteentjes. Ze hebben geen functie bij het bepalen van de erfelijke eigenschappen van het individu. Het aantal herhalingen in zo'n microsatelliet (en dus de lengte ervan) kan tussen individuen sterk verschillen. Microsatellieten erven zodanig over dat een nakomeling zowel een kopie van de vader als van de moeder krijgt, elke microsatelliet is dus dubbel aanwezig maar vaak met een verschillende lengte. Microsatellieten kun je dus ook gebruiken om na te gaan wie de ouders zijn van een individu.

Het probleem bij deze techniek is dat het relatief veel tijd kost om de benodigde speciale merkers, de zogenaamde primers, voor microsatellieten te ontwikkelen. Deze primers moeten name-

lijk zodanig worden geselecteerd dat ze voornamelijk op DNA aanhechten van de soort waarin de onderzoeker geïnteresseerd is. Voor otters zijn met name in Schotland primers ontwikkeld (Dallas & Piertney 1998).

**Procedure**

Eerst wordt uit de verzamelde keutel het DNA geïsoleerd. Dan worden de beschikbare primers eraan toegevoegd en het geheel onderworpen aan een speciale vermenigvuldigings-reactie, de polymerase ketting reactie (PCR). Hierbij worden alleen die stukjes DNA vermenigvuldigd die door de primers herkend worden, de gewenste microsatellieten dus. Door de sterke vermenigvuldiging kunnen deze stukjes DNA uiteindelijk zichtbaar worden gemaakt.

Maar eerst worden de stukjes DNA met verschillende lengte van elkaar gescheiden door 'gel-electroforese'. Daarbij wordt een elektrische spanning gezet op een glasplaat die bedekt is met gel, waarop bovenaan het DNA is gedeponeerd. Door het spanningsverschil

worden de DNA-fragmenten door de gel heen naar onderen getrokken, waarbij de kleinere fragmenten sneller 'lopen' dan de grotere. Zo komen alle stukjes DNA met een bepaalde lengte bij elkaar op één plekje in de gel terecht, de kleinste onder en de grootste boven. Omdat er zoveel DNA voorhanden is, kunnen die plekjes zichtbaar gemaakt worden door het DNA te kleuren met een bepaalde stof. Aan het patroon van de gekleurde bandjes kan dan worden vastgesteld van welk individu het DNA afkomstig is (figuur 1). De PCR-vermenigvuldigings-techniek maakt het dus ook mogelijk om DNA-onderzoek te doen als er heel erg weinig DNA voorhanden is, bijvoorbeeld slechts één enkele haar.

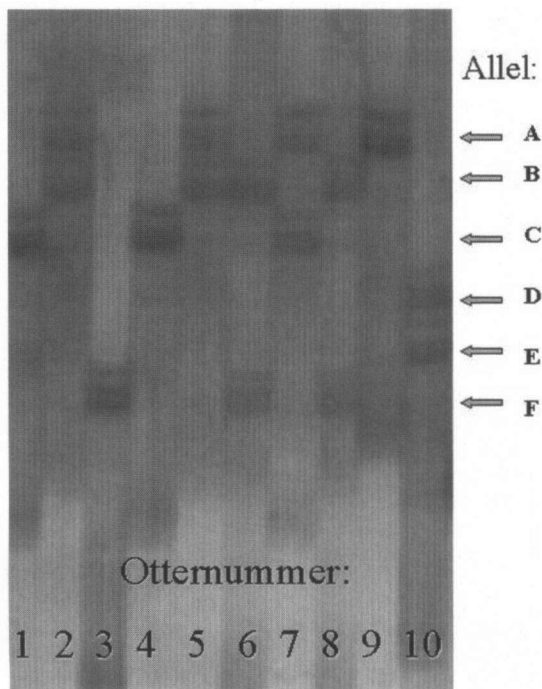
**Koppelen**

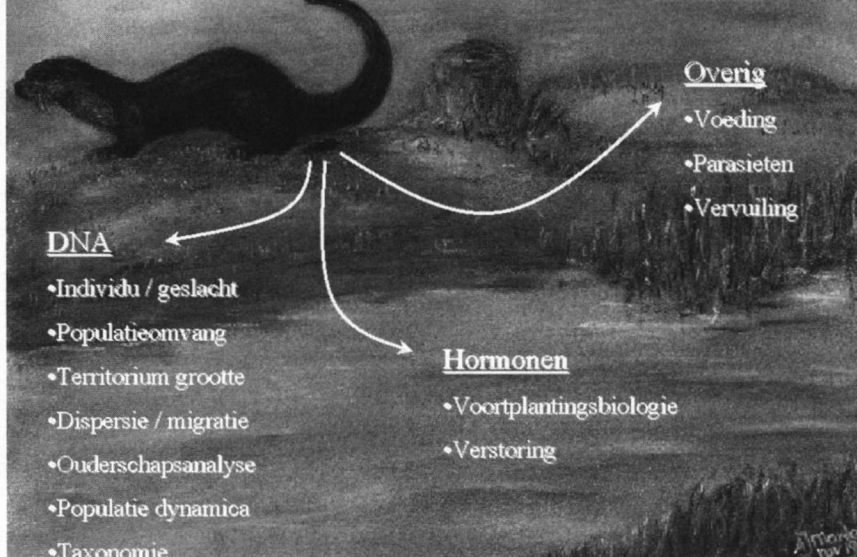
Door keutels zowel te onderwerpen aan hormoon-analyse als aan microsatelliet-analyse, weet je de hormonale toestand van een bepaald individu. Ook kan vastgesteld worden of een zwangerschap succesvol is, als de uitwerpselen van een jong gevonden worden dat via DNA-analyse aan een ouderpaar 'toe te wijzen' is. Ook kan informatie ingewonnen worden over de seksueel actieve periode en de zwangerschappen (maar dus ook het voortijdig afbreken daarvan), in relatie tot omgevingsfactoren als temperatuur, uren zonlicht en voedselbeschikbaarheid. Dit is vooral interessant voor een soort als de otter die (bij ons) geen vast voortplantingsseizoen kent.

De ouderschapsanalyse kan ook helpen om inzicht te krijgen in het sociale leven van de otters. Wie zijn bijvoorbeeld de dominante mannen binnen een populatie, ofwel welke vaders 'krijgen' de meeste jongen. Tenslotte kan onderzoek aan de nieuw te vormen otterpopulatie inzicht verschaffen in populatie-genetische processen. Van alle uit te zetten otters kan een genetisch paspoort gemaakt worden, zodat het verloop in genetische variatie in de tijd te volgen zal zijn. Dit alles is natuurlijk afhankelijk van de mogelijkheden om voldoende keutels te verzamelen!

Op dit moment wordt zowel binnen Alterra als internationaal gewerkt aan het optimaliseren van de beschreven techniek. Als gevolg van bijvoorbeeld bacteriële afbraak en stoffen die de reacties verstoren, is het namelijk nog niet altijd mogelijk om een uitwerpsel op eigenaar te herleiden (Taberlet et al. 1999).

Figuur 1. Microsatellietanalyse bij tien otters. Elke verticale kolom toont voor iedere otter het unieke microsatellietenpatroon. De voorkomende varianten (allelen) van de microsatelliet zijn hier aangeduid met A t/m H. Otters 1, 3, 4 en 9 hebben twee varianten van gelijke lengte, die dus samenvallen en één wat dikker bandje te zien geven, de overige otters hebben steeds twee bandjes.





Figuur 2. Toepassingsmogelijkheden van onderzoek aan uitwerpselen. Tekening Angelique Martens

### Nog meer toepassingen

Naast de hierboven beschreven mogelijkheden kent de DNA-analyse van uitwerpselen, de 'moleculaire faecologie' (engels: *molecular scatology*), nog andere toepassingen voor ecologisch onderzoek (Kohn & Wayne 1997, zie figuur 2). Zo kan het een beeld worden geven van het aantal individuen waaruit een populatie bestaat, de geslachtsverhouding en eventuele verwantschappen tussen individuen door verzamelde uitwerpselen genetisch op individu te determineren. Gericht bemonsteren van gebieden kan zelfs een indruk van de grootte van territoria opleveren, maar bijvoorbeeld ook informatie geven over de dispersie en migratie van individuen. Ook kan zo de genetische variatie binnen een groep bepaald worden. Indien dit na verloop van tijd wordt herhaald, kan worden vastgesteld of er uitwisseling van genetisch materiaal optreedt met omliggende populaties, of dat inteelt optreedt. Dit laatste is een aanwijzing dat de onderzochte populatie in de verdrukking zit, een waardevol signaal voor het natuurbeleid.

Behalve technieken als microsatteliet-analyse, waarmee DNA-monsters op individu kunnen worden herleid, zijn er ook technieken ontwikkeld die het mogelijk maken om de afstamming van gehele populaties te onderzoeken. Op die manier kan bijvoorbeeld uitgezocht worden in hoeverre de in Nederland voorkomende hamsters *Cricetus cricetus* verwant zijn aan hun Oost-Europese soortgenoten en hoelang geleden de populaties van elkaar zijn gescheiden en vervolgens apart geëvolueerd.

### Voedsel en parasieten

Met behulp van deze DNA-analyses kun je natuurlijk niet alleen de eigenaar van een uitwerpsel achterhalen, maar ook voedselsoorten of parasieten aantonen. Op die manier kan uitgezocht worden of een dier een bepaald voedsel wel of niet eet, in welke perioden en in welke mate dat wordt gedaan. Ook kan het analyseren van uitwerpselen inzicht geven in de mate waarin vossen *Vulpes vulpes* geïnfecteerd zijn met bijvoorbeeld de vossenlintworm, door in keutels het DNA van de parasiet aan te tonen.

### Veelbelovend

Het gebruik van uitwerpselen, maar ook van andere bronnen voor DNA, zoals achtergelaten haren en nagels, biedt dus veel mogelijkheden om zonder ingrijpende verstoring dierecologisch onderzoek te verrichten. Zo kon in het recente verleden uit achtergelaten uitwerpselen en haren worden vastgesteld dat de bedreigde populaties bruine beren *Ursus arctos* in Noord-Italië en de Pyreneeën respectievelijk uit slechts twee en vijf individuen bestonden. Deze beren bleken genetisch sterker verwant met soortgenoten uit de andere westeuropese populaties (Scandinavië, Spanje) dan met soortgenoten uit het Oost-Europa. Dit is belangrijk in verband met het selecteren van donorpopulaties waaruit de bedreigde populaties versterkt kunnen worden (Kohn et al. 1995; Taberlet et al. 1997).

DNA- en hormonaal onderzoek aan uitwerpselen kan dus een belangrijke



Otters gedragen zich zó heimelijk, dat onderzoek naar het succes van uitzetten moeilijk zal zijn. Foto Sim Broekhuizen

bijdrage leveren aan onze kennis over zoogdieren. Zeker voor de geheimzinnige otter, die mogelijk in de toekomst in ons land zal worden uitgezet, levert het een waardevol instrument om de verspreiding en het succes van de uitgezette populatie te monitoren. 🐾

Met dank aan Freek Niewold, Barbara van Dam en Albertus Bosveld.

#### Literatuur

- Bijlsma, K. 1995. Moleculair genetische technieken en natuurbeheer. De Levende Natuur 96(2):40-45.
- Dallas, J. & S. Piertney, 1998. Microsatellite primers for the Eurasian otter. Mol. Ecol. 7:1247-1263.
- Kohn, M., F. Knauer, A. Stoffella, W. Schröder & S. Pääbo, 1995. Conservation of the European brown bear - a study using excremental PCR of nuclear and mitochondrial sequences. Mol. Ecol. 4:95-103.
- Kohn, M. & R. Wayne, 1997. Facts from feces revisited. Tree 12: 223-227.
- Leonards, P. 1996. PCBs in mustelids - analysis, food-chain transfer and critical levels. Proefschrift, Inst. Milieuvraagstukken, VU Amsterdam.
- Taberlet, P., J. Camarra, S. Griffin, E. Uhrès, O. Hanotte, P. Waits, C. Dubois-Paganon, T. Burke & J. Bouvet, 1997. Noninvasive

genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. Mol. Ecol. 6:869-876.

Taberlet, P., L. Waits & G. Luikart, 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. Tree 14:323-327.

Tschirch, W., G. Hempel, H. Rothman, R. Schipke & R. Klenke, 1996. Fäkalsteroiduntersuchungen. In: Artenschutzprogramm Fischotter in Sachsen. Landesamt für Umwelt und Geologie: 32-34.

Hugh Jansman, Alterra, Postbus 47, 6700 AA Wageningen, tel. 0317-477867 (NL), email H.A.H.Jansman@ibn.dlo.nl.