

DNA analyse af spyt-prøver fra et får, et rådyr samt et formodet ulve-ekskrement

Notat fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi

Dato: 4. juni 2013

Liselotte Wesley Andersen

Institut for Bioscience

Rekvirent:
Naturstyrelsen
Antal sider: 5

Faglig kommentering:
Aksel Bo Madsen
Kvalitetssikring, centret:
Susanne Boutrup



AARHUS
UNIVERSITET

DCE - NATIONALT CENTER FOR MILJØ OG ENERGI

Tel.: +45 8715 0000
E-mail: dce@au.dk
<http://dce.au.dk>

Indhold

Baggrund	3
Materiale	3
Metode	3
Artsidentifikation	3
Identifikation af individ	4
Køn	4
Reference	4
Bilag 1	5

Baggrund

På foranledning af indleverede spyt-prøver fra et dødfundet får og et dødfundet rådyr ønsker Naturstyrelsen (NST) at få be- eller afkræftet om en ulv har spist af dyrene. Ligeledes ønskes en arts-identifikation ud fra et indleveret formodet ulve-ekskrement. For begge kilder af DNA ønskes også en identifikation af individet, såfremt det er muligt.

Materiale

Den 17.04-2013 blev indleveret tre spytp prøver af Jens Henrik Jacobsen taget fra et enkelt dødfundet får syd for Holstebro. Den 19.04-2013 blev ligeledes indleveret tre spytp prøver fra et dødfundet rådyr af Steen Fjederholdt. Nærmere stedsangivelse er ikke givet, men det formodes, at det er Naturstyrelsen, Midtjylland. Den 02.05-2013 blev der indleveret et ekskrement indsamlet 01.03-2013 ved Dejbjerg.

Metode

På baggrund af antallet af tilsendte prøver er der ekstraheret DNA separat fra hver indleveret prøve. Der blev ekstraheret DNA fra hver af de tre spytp prøver fra henholdsvis Holstebro og Feldborg og en fra det indleverede ekskrement. For at undgå kontaminering fra andre prøver er ekstraktionerne foretaget i et DNA-laboratorium, der kun bliver benyttet til prøver, hvor DNA koncentrationen forventes at være lille, som f.eks. i de tilsendte spytp prøver fra de dødfundne dyr. Opformeringen af både mitokondriemarkøren, der bliver benyttet til at identificere arten, og de gen-markører, der benyttes til at identificere individer (dvs. en DNA-profil), er foretaget i endnu et adskilt laboratorium for at undgå kontaminering fra andet materiale. Mitokondrie DNA-markøren er beskrevet i notatet (Andersen & Madsen 2013). Gen-markørerne (mikrosatelitter), der er benyttet til at identificere individer, er de samme som benyttes i den tyske database på Senckenberg Institutet, Frankfurt (12 stk.) og samtidigt er kønnet bestemt ved markør for Y og X-kromosomet.

Artsidentifikation

Mitokondrie-markøren: Til artsidentifikationen blev prøverne (i alt 7 stk) sendt til sekvensering og analyseret som beskrevet i ovennævnte notat. Sekvenserne blev efterfølgende analyseret efter kvalitetskontrol af sekvenseringen ved at søge efter matchende sekvenser i den internationale NCBI's Genbank database.

Resultatet af denne søgning viste:

Spytp prøve fra får: Ribben 1= 99% match for hund, Ribben 2 = 99% match for ulv og Bov 1= 99% match for hund.

Spytp prøve fra rådyr: Rådyr Feldborg= 99% match for ulv.

Formodet ulveekskrement: UV 14 (ekskrement) = 99% ulv.

Resultaterne viser, at der i alle de indleverede prøver er spor efter ulv. De viser også, at metoden kan skelne mellem hund og ulv, da analysen viser, at der har været en hund, der har afsat spyt på fåret.

Sekvenserne fra de pågældende analyser er vedlagt dette notat i bilag 1.

Identifikation af individ

DNA-profil til identifikation af individ: De 13 gen-markører (12 mikrosatellitter) blev benyttet til at udforme DNA-profilerne for prøverne fra de 3 forskellige områder.

Formodet ulveekskrement: Det lykkedes at få en DNA-profil for UV14 prøven, hvor DNA'et er ekstraheret fra et friskt ekskrement. Efter kalibrering med det tyske DNA-register på Senckenberg Institutet i Frankfurt blev der udført en analyse for at finde en matchende DNA-profil i registret. Dette blev ikke fundet. Det tyske DNA-register indeholder DNA-profiler fra et stort udsnit af de ulve, der findes i Tyskland, men langt fra alle, og et mindre udsnit af DNA-profiler fra de ulve, der findes i Polen. Det skal understreges, at de ulve, der findes i Tyskland, er polske ulve. De vandrer frem og tilbage over grænsen mellem de to lande. En sandsynlig mulighed er således, at det pågældende individ er en ulv, som endnu ikke er i DNA-registret. Muligheden for at det pågældende individ er en hybrid med ulve-tæve som mor og hund som far kan ikke afskrives på baggrund af de foreliggende analyser. Dog er det normale ved den tjekkiske ulvehunde race, at det er hunden som er tæve. Det kan afskrives her, da mitokondrierne nedarves fra mor til afkom, og der blev påvist ulve-mitokondrie (se sekvensen nedenfor). Analyserne af flere øst polske ulve er i gang på Senckenberg Institutet, og der afventes resultater af disse, før der kan gives et endegyldigt svar omkring individets identitet og tilhørsforhold.

Spytprøver fra får og rådyr: For spyt-prøverne var det vanskeligt at få en klar DNA-profil, der kun tilhørte et individ. Som beskrevet ovenfor blev der fundet spor efter hund fra den ene lokalitet, og i DNA-profilen, blev der i prøver fra begge lokaliteter, fundet spor efter ræv. Prøverne kunne derfor ikke benyttes til at identificere individer.

Køn

For alle de analyserede prøver blev kønnet bestemt til at være hanner.

Reference

Andersen, LW & Madsen AB 2013. Notat vedr. DNA analyse af spyt-skrab fra tre nedlagte får, pp 2.

Bilag 1

Mitokondriesekvensen

Spytprøve fra rådyr, Feldborg

TATTGAATCACCCCTACTGTGCTTTGTCAGTATCTCCAGG-
TAATTCCTTCTTCCCTCCCCTATGTACGTCGTGCATTAATGGT-
TTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATAATATTATATTCTTACATAG-
GACATATTAACTCAATCTCATAATTCAGTATCTATCAACAGTAAT-
CAAATGCATATCACTTAGTCCAATAAGGGCTTAATCACCAT-
GCCTCGAGAAACA(ulv)

Spytprøve fra får Ribben 1

TCCCTGACACCCCTACATTCATATATTGAATCACCCCTACTGTGC-
TATGTCAGTATCTCCAGGTA AACCCCTTCTTCCCTCCCCTATGTACGT-
CGTGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATAATAT-
TATATCCTTACATAGGACATATTAACTCAATCTCATAATTCAGT-
GATCTGTCAACAGTAATCGAATGCATATCACTTAGTCCAATAAG-
GGCTTAATCACCATG (hund)

Spytprøve fra får Ribben 2

TCCCTGACACCCCTACATTCATATATTGAATCACCCCTACTGTGC-
TATGTCAGTATCTCCAGGTA AACCCCTTCTTCCCTCCCCTATGTACGT-
CGTGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATAATAT-
TATATTCTTACATAGGACATATTAACTCAATCTCATAATTCAGT-
GATCTATCAACAGTAATCAAATGCATATCACTTAGTCCAATAAG-
GGCTTAATCACCAT (ulv)

Spytprøve fra får Bov

TATTGAATCACCCCTACTGTGCTATGTCAGTATCTCCAGG-
TAAACCCTTCTTCCCTCCCCTATGTACGTCGTGCATTAATGGT-
TTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATAATATTATATCCTTACATAG-
GACATATTAACTCAATCTCATAATTCAGTATCTGTCAACAGTAAT-
CGAATGCATATCACTTAGTCCAATAAGGGCTTAATCACCAT (hund)

Formodet ulveekskrement UV14 Dejbjerg

TGGTTTCTCGAGGCATGGTGATTAAGCCCTTATTGGACTAAGT-
GATATGCATTTGATTACTGTTGATAGATCAGTGAATTATGAGATTG-
AGTTAATATGTCCTATGTAAGAATGTAATATTATGTACATGCT-
TATATGCATGGGGCAAACCATTAATGCACGACGTACATAGGGGAG-
GGAAGAAGGGTTTACCTGGAGATACTGACATAGCACAGTAGGGGT-
GATTCAATATATGAATGTAGGGG(ulv)