

DNA analyse til artsidentifikation af spytprøver fra to dødfundne får

Notat fra DCE -Nationalt Center for Miljø og Energi

Dato: 22. oktober 2013

Liselotte Wesley Andersen

Institut for Bioscience

Rekvirent:
Naturstyrelsen
Antal sider: 5

Faglig kommentering:
Aksel Bo Madsen

Kvalitetssikring, centret:
Jesper R. Fredshavn



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 fire spyt-prøver fra 2 dødfundne får fra samme lokalitet ved Toftlund (se tabel 1) ønsker Naturstyrelsen (NST) at få be- eller afkræftet om en ulv har spist af dyrene. Ligeledes ønskes identifikation til individ, såfremt det er muligt.

Materiale

Der blev indleveret spytprøver til DCE hhv. den 7/9-2013 (prøverne udtaget d. 4/9-2013) og den 25/9-2013 (prøverne udtaget d. 10/9-2013). Prøverne er taget to forskellige steder på to får fundet på samme lokalitet ved Toftlund. Spytpøverne blev indleveret af Svend Hansen, Naturstyrelsen Vadehavet.

Metode

Der blev ekstraheret DNA fra hver af de i alt fire spytprøver fra de to får. Ekstraktionerne blev foretaget i et DNA-laboratorium, der kun bliver benyttet til prøver, hvor DNA koncentrationen forventes at være lille, som f.eks. i de tilsendte spytprøver 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. Mitokondrie DNA-markøren er beskrevet i DCE-notatet (Andersen & Madsen 2013 fra 20/3-2013). 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 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:

Spytprøver fra får fundet den 4/9-2013: Sekvenserne var dårlige, og den del, der kunne aflæses, gav lige stor sandsynlighed for, at det var ulv som hund.

Spytprøver fra får fundet den 10/9-2013: 2 sekvenser viste 100% ulv

Resultaterne viser, at der med sikkerhed er spor efter ulv i fåret fra den 10/9-2013, mens prøverne fra fåret fra den 4/9-2013 desværre gav et dårligt DNA-resultat så det er vanskeligt at få et éntydigt svar. Prøven fra d 10/9, der med sikkerhed var ulv, havde den typiske ulve-haplotype W1-LT.

Tabel 1. Resultater af spytpøveanalysen.

| Spytprøve fra | Lokalitet | Fund-dato | Indleveret | Spytprøve bestemt til art | Individ | Køn |
|---------------|------------------|-----------|------------|---------------------------|----------------|---------|
| Får | Øbjerg, Toftlund | 4/09-2013 | 7/09-2013 | Ulv/hund(dårlig) | negativ | negativ |
| Får | Øbjerg, Toftlund | 10/9-2013 | 25/9-2013 | Ulv | Ikke afsluttet | Han |

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

Identifikation af individ

DNA-profil til identifikation af individ: Der blev benyttet 13 gen-markører (12 mikrosatelitter) til at udforme DNA-profilerne. Desværre gav de spytpøver, der var positiv for ulv, ikke gode, tydelige DNA-profiler. Man kunne se spor efter ræv. Trods den svigtende kvalitet tyder de opnåede DNA-profiler på, at det er den samme ulv, som også havde efterladt spyt på de to får, der blev fundet ved Skærbæk den 12/8-2013. Analyserne fortsættes for om muligt at finde et match eller et slægtskab til et ulvekøbbe i Tyskland.

Køn

Prøverne fra d. 10/9, der var positiv for ulv, blev kønsbestemt til at være en han.

Reference

Andersen, LW & Madsen AB 2013. DNA analyse af spyt-skrab fra tre nedlagte får, pp 2 fra 20/3-2013.

Bilag 1

Mitokondriesekvensen

Får 4/9-2013 Toftlund ulv/hund:

TGTTTCTCGAGGCATGGTGATTAAGCCCTTATTGGACTAAGTGATATG
CATTGATTACTGTTGATAG

Får 10/9-2013 Toftlund ulv:

GGTTTCTCGAGGCATGGTGATTAAGCCCTTATTGGACTAAGTGATATG
CATTGATTACTGTTGATAGATCAGTGAATTATGAGATTGAGTTAATT
TGCCTATGTAAGAATGTAATATTATGTACATGCTTATATGCATGGGG
CAAACCATTAATGCACGACGTACATAGGGGAGGGAAGAAGGGTTA
CCTGGAGATACTGACATAGCACAGTAGGGGTGATTCAATATATGAAT
GTAGGGGTGTCAGGGAATCACCATGC