

DNA analyse til artsidentifikation af spytprøver fra kalve, får og lam

Notat fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi

Dato: 5. september 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 spytp prøver fra dødfundne kalve, får og lam (se tabel) ønsker Naturstyrelsen (NST) at få be- eller afkræftet, om en ulv har spist af dyrene. Ligeledes ønskes identifikation til individniveau, såfremt det er muligt.

Materiale

I perioden 7. juni til 12. august 2013 blev der indleveret spytp prøver, som var udtaget tre forskellige steder på en kalv fundet i Gludsted, fire forskellige steder på et lam fundet i Hodde og fire forskellige steder på en kalv fundet i Hemmet. Desuden blev der indleveret en spytp prøve fra et får og to spytp prøver fra et andet får, begge fundet ved Skærbæk (tabel 1). Spytp prøverne er indleveret af Jens Henrik Jacobsen, Steen Fjederholdt og Svend Hansen fra Naturstyrelsens lokale enheder i Jylland.

Tabel 1. Oversigt over spytp prøver, resultat af undersøgelse samt status for individbestemmelse.

	Lokalitet	Antal	Dato	Art	Individbestemmelse
Kalv	Gludsted	3	29/6-2013	hund,ræv	laves ikke
Lam	Hodde	4	13/6-2013	hund,ræv	laves ikke
Kalv	Hemmet	4	7/6-2013	ulv,hund,ræv	i gang
Får1	Skærbæk	1	12/8-2013	ulv	i gang
Får2	Skærbæk	2	12/8-2013	ulv	i gang

Metode

DNA blev ekstraheret fra de enkelte spytp prøver. 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 spytp prøver fra de dødfundne dyr i denne undersøgelse. 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 (mikrosatellitter), der er benyttet til at identificere individer, er de samme som benyttes i den tyske database på Senckenberg Institut, 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:

- Spytp prøver fra kalv fra Gludsted: to sekvenser viste 100% match for hund.

- Spytpøver fra lam fra Hodde: tre sekvenser viste 100% match for hund.
- Spytpøver fra kalv ved Hemmet: en sekvens viste 100% hund, en sekvens viste 99% ulv og en sekvens viste 97% hund.
- Spytpøve fra får 1 fra Skærbæk: en sekvens viste 98% ulv.
- Spytpøver fra får 2: en sekvens viste 90% ulv.

Ved undersøgelsen blev der i alle de indleverede prøver fra Gludsted og Hodde udelukkende fundet spor efter hund, mens der i prøverne fra Hemmet er fundet spor efter både ulv, hund og ræv. I prøverne fra Skærbæk er der kun fundet spor efter ulv. Alle de positive ulveprøver havde den typiske ulve-haplotype W1-LT.

Sekvenserne fra de pågældende analyser er vedlagt i bilag 1.

Identifikation af individ

DNA-profil til identifikation af individ: De 13 gen-markører (12 mikrosatelitter) blev benyttet til at udforme DNA-profilerne for prøverne. Spytpøverne gav ikke tydelige DNA-profiler. Dog kan det fastslås, at det er samme individ, der har bidt de to får fundet ved Skærbæk. Ligeledes er det muligt i alle prøver, undtagen prøverne fra Skærbæk, at se spor efter ræv. Der arbejdes fortsat på identifikation af individ for om muligt at finde et match eller et slægtskab til et ulvekobbel i Tyskland.

Køn

For alle de analyserede prøver, der var positive for ulv, blev kønnet bestemt til at være hanner.

Reference

Andersen, LW & Madsen AB 2013. Notat vedr. DNA analyse af spyt-skrab fra tre nedlagte får. Notat til Naturstyrelsen. 3 sider.

Bilag 1

Mitokondriesequensen

Kalv Gludsted hund:

TGTTTCTCGAGGCATGGTGATTAAGCCCTTATTGGACTAAGTGATAT-
GCATTGATTACTGTTGATAGATCAGTGAACCTATGAGGTTGAGTTAA-
TATGTCCTATGTAAGGATATAATATTATGTACATGCTTATATGCAT-
GGGGCAAACCATTAATGCACGACGTACATAGGGGAGGGGAGAAG-
GGTTTACCTGGAGATACTGACATAGCACAGTA

Kalv Gludsted hund:

TGTTTCTCGAGGCATGGTGATTAAGCCCTTATTGGACTAAGTGATAT-
GCATTGATTACTGTTGATAGATCAGTGAACCTATGAGGTTGAGTTAA-
TATGTCCTATGTAAGGATATAATATTATGTACATGCTTATATGCAT-
GGGGCAAACCATTAATGCACGACGTACATAGGGGAGGGGAGAAG-
GGTTTACCTGGAGATACTGACATAGCACAGTAGGGGTGATTCAA-
TATATGAATGTAGGGGTGTCAGGGAATCCCCTT

Lam Hodde hund:

GTTTCTCGAGGCATGGTGATTAAGCCCTTATTGGACTAAGTGATATG-
CATTGATTACTGCTGACAGATCAATGAATTATGAGATTGAGTT-
GATATGTCCTATGTAAGAATATAATATTATGTACATGCTTATATGCA-
TGGGGCAAACCATTAATGCACGACGTATATAGGGGAGGGGAAGAAG-
GGTTTACCTGGAGATACTGACATAGCACAGTAGGGGTGATWCAA-
TATATGAATGCC

Kalv Hemmet ulv:

GTCAGTATCTCCAGGTAAACCCTTCTTCCCTCCCCTATGTACGTCGT-
GCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATAATAT-
TACATTCTTACATAGGACATATTAACCTCAATCTCATAATTCACT-
GATCTATCAACAGTAATCAAATGCATATCACTTAGTCCA

Kalv Hemmet hund:

GTTTCTCGAGGCATGGTGATTAAGCCCTTATTGGACTAAGTGATATG-
CATTGATTACTGTTGAAAGATCAGTGAATTATGAGATTGAGTTAA-
TATGTCCTATGTAAGGATATAATATTATGTACATGCTTATATGCAT-
GGGGCAAACCATTAATGCACGACGTACATAGGGGAGGGGAGAAG-
GGTTTACCTGGAGATACTGACATAGCACAGTAGGGG

Får 1 Skærbæk ulv:

CATGGTGATTAAGCCCTTATTGGACTAAGTGATATGCATTTGAT-
TACTGTTGATAGATCAGTGAATTATGAGATTGAGTTAATATGTCC-
TATGTAAGAATGTAATATTATGTACATGCTTATATGCATGGGGCA-
AACCATTAATGCACGACGTACATAGGGGAGGGGAAGAAGGGTT-
TACCTGGAGATACTGACATAGCACAGTAGGGGTGATTCAAT

Får 2 Skærbæk ulv:

CATGGTGATTAAGCCCTTATTGGACTAAGTGATATGCATTTGAT-
TACTGTTGATAGATCAGTGAATTATGAGATTGAGTTAATATGTCC-
TATGTAAGAATGTAATATTATGTACATGCTTATATGCATGGGGCA-
AACCATTAATGCACGACGTACATAGGGG