

DNA-analyser af ulv

Ulve i Danmark

Notat fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi

Dato: 9. februar 2016

Liselotte Wesley Andersen

Institut for Bioscience

Antal sider: 6

Faglig kvalitetssikring:
Flemming Skov

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
Revision af tidligere udmeldinger	3
Artsprøver, der har vist ulv	4
Naturstyrelsens prøver	5
Sammenligning med DNA-analyser af ulve i Tyskland og Polen	5
Diskussion og konsekvenser	6

Baggrund

Efter knapt 200 års fravær er ulven tilbage i Danmark. Den første bekræftede ulv blev fundet død i Nationalpark Thy i Nordjylland i november 2012. Siden er der observeret ulve og indsamlet DNA-spor i det meste af Jylland. DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi har løbende orienteret Naturstyrelsen om antallet af ulvefund og antallet af ulveindivider i Danmark, baseret dels på ekskrementprøver og dels på spytp prøver fra nedlagt vildt eller husdyr. Materialet er indsendt af Styrelsen selv eller fra andre kilder, og analyserne er udført dels som rådgivning af Styrelsen og dels som led i et forskningsprojekt finansieret af 15. Juni-fonden i samarbejde med Naturhistorisk Museum, Aarhus. Prøverne er analyseret for DNA dels med henblik på artsbestemmelse og dels køns- og individbestemmelse. På foranledning af at DCE har nedjusteret antallet af ulve i Danmark, har Naturstyrelsen samt ulvegruppen under Vildtforvaltningsrådet ønsket en afklaring omkring årsagerne til denne nedjustering. På et møde i ulvegruppen den 01/2-2016 i Naturstyrelsen har DCE forklaret sig mundtligt, og dette notat er en skriftlig redegørelse for metoder og usikkerheder i DNA-analyser af ulv. Til mødet havde NST fremsendt følgende spørgsmål:

- Har de nye analyseresultater givet anledning til en revision af de tidligere udmeldte 23 ulveindivider?
- Hvordan vil DCE sikre, at prøverne fremadrettet kan sammenlignes direkte med prøverne fra DNA-registreringen af ulve i Tyskland og Polen?
- Hvor mange artsprøver (prøver som udelukkende har vist art og ikke individ) har vist ulv inden DCE's verificering af prøverne?
- Hvor mange artsprøver (prøver som udelukkende har vist art og ikke individ) har vist ulv efter DCE's verificering af prøverne?
- Hvor mange, hvis nogen, af styrelsens prøver (prøver indsendt og betalt af Naturstyrelsen) danner grundlag for de hhv. 40 og 23 ulveindivider?
- Kan DCE redegøre for hvorvidt styrelsens prøver (prøver indsendt og betalt af Naturstyrelsen) har ændret resultat/artsstatus efter DCE's verificering af prøverne? -Og hvis det er tilfældet, udpege de prøver det drejer sig om?
- Hvordan vil DCE sikre at NST får oplysninger herom, når DCE skifter metoder, herunder hvad formålet og konsekvenserne er, fsva. prøver, der analyseres for NST?
- Hvilke konsekvenser vil DCE drage ift. hidtidige benyttede analysemetoder?

Revision af tidligere udmeldinger

Der er siden de første analyser ikke været et skift i analysemetode for art. Det er således den samme analysemetode, der har været anvendt til de forskellige udmeldinger.

DCE har i notater og rapporter fastslået ved DNA-analyser at der er ulv i Danmark, og i en artikel i Flora & Fauna udmeldt i alt 23 individer. I en senere pressemeddelelse fra juni 2015 er der yderligere udmeldt 17 individer, så der i alt skulle have været 40 forskellige ulveindivider i Danmark i perioden oktober 2012 til april 2015. DCE skal beklage, at det ikke tidligere har været gjort tilstrækkeligt klart, at disse tal er behæftet med stor usikkerhed og derfor har været meldt for tidligt ud. Analyser af DNA-profiler fra ekskrementprøver er vanskelige og profilerne er ofte meget mangelfulde. DCE og Naturhistorisk Museum deltager i et internationalt forskningssamarbejde

(CEWOLF) med laboratorier i Tyskland, Polen og Holland, der skal forbedre analysemetoderne og gøre det muligt at følge ulvenes DNA-profiler på tværs af landegrænserne.

I forbindelse med dette samarbejde må DCE konstatere, at det har været nødvendigt at nedjustere antallet af ulve, der er fundet blandt de hidtidige analyserede prøver i Danmark fra 2012 til 2015. Ved harmoniseringen af brugen af de genetiske markører, viser det sig at DNA fra ræv giver problemer med at læse DNA-profilerne fra ulv i de danske prøver. Samtidig giver de ufuldstændige DNA-profiler stor usikkerhed i forbindelse med at lede efter match i CEWOLF's ulveregistre. De indsamlede danske ekskrementprøver er ikke friske prøver, men har ligget i naturen i op til flere måneder, hvor ræve har haft mulighed for at markere på ekskrementerne. Udmeldingerne om antallet af individer i Danmark burde derfor have afventet en verifikation med de øvrige ulve-DNA-registre i CEWOLF konsortiet.

Status i forhold til de tidligere udmeldinger er:

- To individer er identificeret, kendt som Thyulven og dens halvbroder
- 17 forskellige individer er konstateret ved analyse af ekskrement- og spytpøverne, men DNA-profilerne er så ufuldstændige, at ulvene ikke kan identificeres i DNA-registrene
- 4 prøver er kønsbestemt til hunner, men det kan ikke afgøres om der er tale om forskellige individer.

Der kan altså være tale om op til 23 forskellige ulveindivider i Danmark i perioden 2012 til foråret 2015. Herudover er der en del prøver, der fortsat er under analyse.

Artsprøver, der har vist ulv

Der er i alt analyseret 566 spyt- og ekskrementprøver, og der er fundet ulv i de 144 pr. 26/01-2016 (Tabel 1).

Tabel 1. Antal og type af analyserede prøver i DCE's laboratorium.

Prøvetype	Analyseret	Fund af ulv
Ekskrement	372	
Spyt	194	144

Senckenberg instituttet og DCE anvender forskellige metoder til DNA-analyser af ekskrementprøver. Som en del af bestræbelserne for at harmonisere analyserne, har DCE sendt 50 ekskrementprøver til Tyskland og vi har modtaget 12 fra Senckenberg. Af de 50 danske ekskrementprøver har DCE ved gentagne analyser fundet ulv i 20 af de danske prøver, og ulv i alle de 12 tyske prøver fra Senckenberg. I tre af de danske prøver fandt DCE med sikkerhed hund. De øvrige 17 danske prøver er fortsat under analyse i DCE's laboratorium, da der ved første forsøg er fundet ulv. Det tyske laboratorium fandt ulv i hhv. 2 og 6 af de 50 danske prøver, med to forskellige analysemetoder. Det lave antal skyldes, at Senckenberg benytter mindre følsomme metoder til analyser af ekskrementer, hvor der både fanges ræve-, hunde- og ulvesekvenser. Det danske laboratorium benytter en analysemetode, der kun fanger hund og ulv. Yderligere benytter det danske laboratorium en

metode hvor der bliver kørt PCR to gange- en såkaldt nestet PCR, med en intern primer i PCR nummer to. Hver nested analyse køres op til fire gange, og hvis der ikke på disse fire kørsler er positivt resultat betragtes prøven som negativ, og altså uden ulv.

Tabel 2. Sammenlignende analyser af ekskrementprøver

	Antal	Heraf ulv DCE	Heraf ulv Senckenberg
Danske prøver	50	20	2-6
Tyske prøver	12	12	12

Det har vist sig, at prøvernes beskaffenhed har stor betydning for analyserne. Alle de danske ekskrementprøver er gamle, dvs. de har ligget i naturen i gennem længere tid før de er indsamlet, hvilket betyder at især ræve har markeret på ekskrementerne. Det stemmer overens med analyseresultaterne fra Senckenberg, der fandt et stort antal fund af ræv i deres analyser. Det betyder at forholdet mellem ulve-DNA og ræve-DNA kan være forskubbet mod ræv, hvilket vanskeliggør mulighederne for at finde ulv i analyserne.

Naturstyrelsens prøver

Naturstyrelsen har kun indsendt og betalt for spytp prøver fra nedlagte husdyr. Af de før omtalte ulveindivider er fire fundet i Naturstyrelsens spytp prøver fra 2014 og ét individ i spytp prøver fra 2015. Ikke alle spytp prøver fra 2015 er analyserede endnu.

Tabel 3. Antal fund bestemt til art (Ulv) og til individ (Individ) i 194 spytp prøver fra Naturstyrelsen

År	Ulv	Individ
2014	45	4
2015	18	1

Styrelsens spytp prøver udgør kun en mindre del af det samlede analysesæt. De foretagne justeringer ændrer ikke på hidtil udmeldte resultater om artsfund eller individantal. DCE vedligeholder et register over samtlige prøver og kan således spore alle prøver, og redegøre for analyseresultat af den enkelte prøve.

Sammenligning med DNA-analyser af ulve i Tyskland og Polen

DNA laboratoriet ved Institut for Bioscience, Aarhus Universitet, hvor DCE udfører analyserne, er referencelaboratorium for genetiske analyser af ulv i Danmark inden for CEWOLF konsortiet. Formålet med konsortiet er en harmonisering af genetiske markører, så det er muligt at sammenligne og lede efter match i de respektive landes DNA-registre over ulve. I den forbindelse er der foretaget analyser af et referencesæt bestående af 25 vævs-

prøver fra tyske og polske ulve, der er sendt rundt til de involverede laboratorier. Her har det danske DNA-laboratorium sammen med Senckenberg laboratoriet og Alterra laboratoriet i Holland alle kunnet reproducere de samme genotyper, hvilket er forudsætning for at kunne sammenligne DNA profiler på tværs af laboratorierne. CEWOLF vil intensivere samarbejdet om udvikling af metoder til artsidentifikation og til individidentifikation bl.a. gennem udveksling af prøvemateriale og analyseresultater og ved deling af registre og samkørsel af analyser. Yderligere er der planlagt en videnskabelig artikel om indvandringen af ulv til Danmark i samarbejde med Senckenberg Institutet.

Diskussion og konsekvenser

Danske prøver er ofte ældre og mere nedbrudte, og kræver derfor særligt sensitive analyser, og DCE vil fortsat benytte de nede DNA-analyser, der hidtil har været brugt. De divergerende analyseresultater, de danske og de tyske analyser har givet, er et resultat af den forskellige metodetilgang. Det viser, at der er behov for en nærmere afklaring af hvornår og hvordan de forskellige metoder til arts- og individbestemmelse af ekskrement- og spytprøver skal benyttes.

I alle DCE's notater og rapporter er der oplyst de anvendte analysemetoder. DCE har benyttet samme grundlæggende analysemetode med brug af de samme primere gennem hele perioden fra de første analysemetoder i 2012 til i dag. Selve analysemetoden er optimeret gennem forløbet med henblik på at gøre metoden mere følsom og muliggøre at fange selv meget små mængder ulve-DNA. Hvis der ændres i den grundlæggende metode, vil NST naturligvis blive informeret omgående.

Sådanne ændringer kunne være et resultat af det fortsatte samarbejde med CEWOLF konsortiet med henblik på at skaffe endnu bedre data om ulv i Danmark og dermed forbedre grundlaget for en vidensbaseret forvaltning af ulve i Danmark. DCE har aftalt et tættere samarbejde med CEWOLF (især med Senckenberg i Tyskland) om fælles metodeudvikling, fælles database og fælles referencesæt over ulveindivider og harmonisering af genetiske markører. Senckenberg benytter samme primerpar som DCE laboratoriet i forbindelse med artsidentifikation, hvor der er mistanke om ulv hos nedlagte husdyr. DCE har videreudviklet metoden så der foretages endnu en PCR (nestet PCR) med et primerpar, der fanger samme sekvens igen blot lidt forskudt. Dette er en kendt metode beskrevet i den molekylærbioologiske litteratur, som kan benyttes når der forventes en meget lav koncentration af DNA i den pågældende prøve (se fx Green & Sambrook, Molecular Cloning, 2012, ISBN:978-1-1936113-42.2).

DCE vil også efterprøve analyseresultaterne eksperimentelt, hvor kendte ulveekskremitter (fra fx en dyrepark) udsættes for kortere eller længere tids eksponering for vejrlig og forskellige markeringer med hunde- og ræveurin, og efterfølgende undergår forskellige DNA-analysemetoder.

Yderligere har DCE laboratoriet planlagt at køre 50 ræveprøver for at få en database med ræve-alleler, ligesom der allerede er en database med hunde-alleler for de markører, der benyttes til ulv. Dette vil lette arbejdet med at sortere ræve-alleler og hunde-alleler fra ulve-allelerne. Som en yderligere sikkerhed for at kunne påvise kontaminering er der konstrueret en kunstig ulvehaplotype, der benyttes som en positiv testprøve – dvs. en prøve hvor man tilsætter kendt DNA.