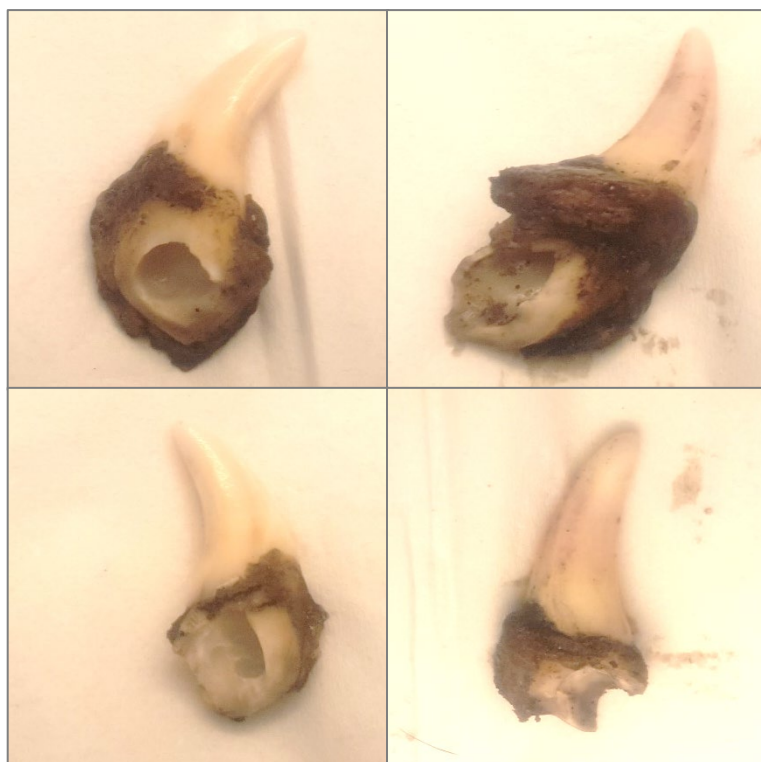


DNA-analyser af fire hjørnetænder tilhørende et hundelignende dyr

Fagligt notat fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi
og
Naturhistorisk Museum, Aarhus

Dato: 20. december 2021 | 92



Datablad

Notat fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi
og
Naturhistorisk Museum, Aarhus

Titel: DNA-analyser af fire hjørnetænder tilhørende et hundelignende dyr

Forfattere: Kent Olsen¹, Philip Francis Thomsen² & Michael Møller Hansen²

Institutioner: ¹Naturhistorisk Museum, Aarhus & ²Institut for Biologi, Aarhus Universitet

Faglig kommentering: Peter Sunde
Kvalitetssikring, DCE: Jesper R. Fredshavn
Sproglig kvalitetssikring: Peter Sunde & Jesper R. Fredshavn

Rekvirent: Miljøstyrelsen

Bedes citeret: Olsen, K., Thomsen, P.F. & Hansen, M.M. 2021. DNA-analyser af fire hjørnetænder tilhørende et hundelignende dyr. Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi, 24 s. – Notat nr. 2021|92
https://dce.au.dk/fileadmin/dce.au.dk/Udgivelser/Notater_2021/N2021_92.pdf

Gengivelse tilladt med tydelig kildeangivelse

Foto forside: Aarhus Universitet

Sideantal: 24

Indhold

| | |
|---|-----------|
| Baggrund | 4 |
| Materiale | 5 |
| Metoder | 7 |
| DNA-analyser til arts-, haplotype- og individniveau | 7 |
| Resultater | 8 |
| DNA-analyser af tandkød og udboret tandpulver | 8 |
| Diskussion | 10 |
| Konklusion | 11 |
| Taksigelser | 12 |
| Referencer | 13 |
| Bilag | 15 |
| Appendiks | 19 |
| Appendiks 1 | 19 |
| Appendiks 2 | 22 |

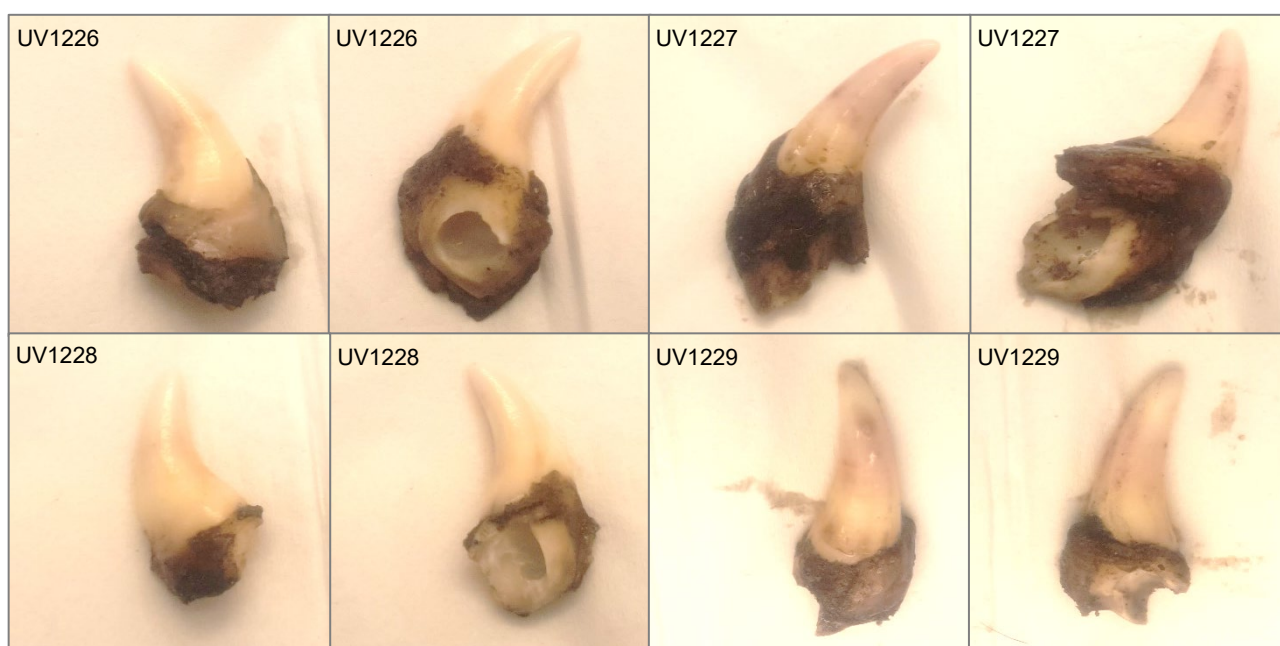
Baggrund

På foranledning af, at Midt- og Vestjyllands Politi under en ransagning i Vestjylland har konfiskeret fire hjørnetænder fundet i en fryser, som vurderes tilhørende et hundelignende dyr, har Miljøstyrelsen ønsket at få be- eller afkræftet, om tænderne stammer fra ulv. Ligeledes er der ønsket identifikation til individniveau, såfremt det er muligt.

I dette notat præsenteres resultaterne af de genetiske analyser til arts-, haplotype- og individniveau af de fire hjørnetænder.

Materiale

I laboratorierne på Biologisk Institut, Aarhus Universitet er der er blevet udtaget prøver til DNA-analyse fra rester af tandkød fra hver af de fire hjørnetænder (Fig. 1, Tabel 1). Dertil er der ved tidligere undersøgelse af tænderne ved National Wildlife Forensics Facility, Globe Institutet, Københavns Universitet blevet udtaget prøver fra to af hjørnetænderne, hvor der både er opsamlet tandkød og tandpulver til DNA-analyse, hvilket er fremkommet ved, at tandens emalje er blevet gennemboret (Tabel 1, Appendiks 1, Appendiks 2). Det opsamlede materiale til DNA-analyse fra hver af hjørnetænderne er i henhold til laboratoriestandard blevet individuelt mærket forud for oprensning af DNA (Tabel 1).



Figur 1. Billeder taget forud for DNA-analysearbejdet af for- og bagside af hver af de fire hjørnetænder (Tabel 1). (Fotograf: Aarhus Universitet).

Tabel 1. Nummerering af prøver udtaget fra de fire hjørnetænder (UV1226, UV1227, UV1228, og UV1229) forud for det genetiske analysearbejde.

| Prøve ID | Oprensning | Prøve ID (sub) | Lab ID | DNA-kilde |
|----------|---------------|----------------|-----------------------|------------|
| UV1226 | 1. oprensning | UV1226_1 | WDK0319 | tandkød |
| UV1226 | 2. oprensning | UV1226_2 | WDK0320 | tandkød |
| UV1226 | 3. oprensning | UV1226_3 | WDK0333 | tandkød |
| UV1226 | 1. oprensning | UV1226_A | CGG_6_801_1_tube1_1 * | tandpulver |
| UV1226 | 1. oprensning | UV1226_B | CGG_6_801_1_tube1_2 * | tandkød |
| UV1227 | 1. oprensning | UV1227_1 | WDK0321 | tandkød |
| UV1227 | 2. oprensning | UV1227_2 | WDK0322 | tandkød |
| UV1227 | 3. oprensning | UV1227_3 | WDK0334 | tandkød |
| UV1228 | 1. oprensning | UV1228_1 | WDK0323 | tandkød |
| UV1228 | 2. oprensning | UV1228_2 | WDK0324 | tandkød |
| UV1228 | 3. oprensning | UV1228_3 | WDK0335 | tandkød |
| UV1228 | 1. oprensning | UV1228_A | CGG_6_800_1_tube2_1 * | tandpulver |
| UV1228 | 1. oprensning | UV1228_B | CGG_6_800_1_tube2_2 * | tandkød |
| UV1229 | 1. oprensning | UV1229_1 | WDK0325 | tandkød |
| UV1229 | 2. oprensning | UV1229_2 | WDK0326 | tandkød |
| UV1229 | 3. oprensning | UV1229_3 | WDK0336 | tandkød |

* Fire prøver fra to af hjørnetænderne er blevet tildelt unikke numre af National Wildlife Forensics Facility, Globe Institutet, Københavns Universitet, der på foranledning af Miljøstyrelsen tidligere har foretaget en artsbestemmelse, der ligeledes bekræfter, at tænderne stammer fra ulv (Appendiks 1 og Appendiks 2).

Metoder

DNA-analyser til arts-, haplotype- og individniveau

Artsanalyse og bestemmelse af haplotype (varianter af mitokondrie-DNA) baseres på DNA fra cellens mitokondrier (mtDNA) og foretages med mindst én af to forskellige mtDNA-markører (generel for pattedyr: H16498/L15995 og specifik for hundefamilien: WDloopH254/WDloopL). I hvert tilfælde er der foretaget to gentagelser (replikater). Hvis minimum to analyser viser ulv, accepteres prøven som værende fra ulv, medmindre de øvrige analyser antyder andre rovdyr eller hund.

Bestemmelse af individ og køn baseres på DNA fra cellens kerne. Individbestemmelsen foretages ved hjælp af 13 autosomale mikrosatellit-markører, som hver især udviser genetisk variation og som på tværs af alle markører udgør en unik DNA-profil (genotype) (Olsen m.fl. 2019). Bestemmelse af køn foretages ved hjælp af to kønsmarkører på hhv. X og Y kromosomerne. De 13 mikrosatellit-markører og to kønsmarkører anvendes i tre forskellige PCR-reaktioner (multiplex) foretaget i hver fire replikater per prøve. Hvis minimum to ud af de fire analyser viser en troværdig og veldefineret profil, vil den blive accepteret.

Analyser af DNA-sekvenser foretages i Geneious 10.2.6 (<https://www.geneious.com>).

For en mere detaljeret beskrivelse af de genetiske metodevalg og fremgangsmåder henvises til Thomsen m.fl. (2020).

Resultater

DNA-analyser af tandkød og udboret tandpulver

Analysesekvenserne på basis af DNA fra cellens mitokondrier (mtDNA) har i alle seksten prøver fra de fire hjørnetænder givet et match med haplotype HW01 (Tabel 2, Bilag 1), hvilket er den fremtrædende og vidt udbredte haplotype i den centraleuropæiske lavlandsbestand af ulve (Czarnomska m.fl. 2013, Olsen m.fl. 2019). Samtidig er haplotype HW01 endnu ikke konstateret hos rene hunde registreret og analyseret i Centraleuropa, hvor minimum 120 forskellige hundeindivider er blevet analyseret ved Senckenberg Research Institute i Tyskland (Sebastian Collet personlig kommentar). Da mtDNA alene nedarves fra moderen, tyder sekvenserne på, at moderen til det analyserede ulveindivid har været en ulv, selv om man på basis af disse data i sig selv ikke kan udelukke et individ af hybridherkomst med en hund som far og en ulv som mor, eller alternativt hybridisering mere end én generation tilbage i tid. Data fra kerne-DNA (mikrosatellitter, se nedenfor) tyder dog ikke på et sådant scenarie.

Tabel 2. Resultater af 16 DNA-analyser foretaget af tandkød og tandpulver fra fire hjørnetænder (UV1226, UV1227, UV1228, og UV1229) (Tabel 1). n.b.: ikke bestemt fordi prøven ikke indeholder tilstrækkeligt med DNA af tilstrækkelig kvalitet. Analyser af DNA-sekvenser foretages i Geneious version 10.2.6. Analyser er foretaget af Institut for Biologi, Aarhus Universitet. I en enkelt prøve (UV1228_3) blev en komplet genotype fundet, og i fire prøver blev fundet en næsten komplet genotype (UV1228_2, UV1229_1, UV1229_2 og UV1229_3), mens det i de resterende elleve prøver ikke lykkedes at opnå en genotype.

| Prøve ID | Prøve ID (sub) | Art_mtDNA | Haplotype | Køn | Individ |
|--|----------------|--------------------|-----------|------|---------|
| DNA fra ulv (køns- og individbestemmelse ikke mulig) | UV1226_1 | <i>Canis lupus</i> | HW01 | n.b. | n.b. |
| DNA fra ulv (køns- og individbestemmelse ikke mulig) | UV1226_2 | <i>Canis lupus</i> | HW01 | n.b. | n.b. |
| DNA fra ulv (kønsbestemmelse mulig, individbestemmelse ikke mulig) | UV1226_3 | <i>Canis lupus</i> | HW01 | Han | n.b. |
| DNA fra ulv (køns- og individbestemmelse ikke mulig) | UV1226_A | <i>Canis lupus</i> | HW01 | n.b. | n.b. |
| DNA fra ulv (køns- og individbestemmelse ikke mulig) | UV1226_B | <i>Canis lupus</i> | HW01 | n.b. | n.b. |
| DNA fra ulv (køns- og individbestemmelse ikke mulig) | UV1227_1 | <i>Canis lupus</i> | HW01 | n.b. | n.b. |
| DNA fra ulv (køns- og individbestemmelse ikke mulig) | UV1227_2 | <i>Canis lupus</i> | HW01 | n.b. | n.b. |
| DNA fra ulv (kønsbestemmelse mulig, individbestemmelse ikke mulig) | UV1227_3 | <i>Canis lupus</i> | HW01 | Han | n.b. |
| DNA fra ulv (køns- og individbestemmelse ikke mulig) | UV1228_1 | <i>Canis lupus</i> | HW01 | n.b. | n.b. |
| DNA fra ulv (køns- og individbestemmelse delvis mulig) | UV1228_2 | <i>Canis lupus</i> | HW01 | n.b. | GWxxxxm |
| DNA fra ulv (køns- og individbestemmelse mulig) | UV1228_3 | <i>Canis lupus</i> | HW01 | Han | GWxxxxm |
| DNA fra ulv (køns- og individbestemmelse ikke mulig) | UV1228_A | <i>Canis lupus</i> | HW01 | n.b. | n.b. |
| DNA fra ulv (køns- og individbestemmelse ikke mulig) | UV1228_B | <i>Canis lupus</i> | HW01 | n.b. | n.b. |
| DNA fra ulv (køns- og individbestemmelse delvis mulig) | UV1229_1 | <i>Canis lupus</i> | HW01 | n.b. | GWxxxxm |
| DNA fra ulv (køns- og individbestemmelse delvis mulig) | UV1229_2 | <i>Canis lupus</i> | HW01 | n.b. | GWxxxxm |
| DNA fra ulv (køns- og individbestemmelse delvis mulig) | UV1229_3 | <i>Canis lupus</i> | HW01 | Han | GWxxxxm |

Ud over analyserne til art og haplotype ud fra mtDNA, er dyrets køn og identitet (individbestemmelse) blevet fastslået ud fra DNA fra cellekerner (Olsen m.fl. 2019). Hvor mtDNA kun nedarves fra moderen, så nedarves kerne-DNA fra begge forældre. Ud fra analysen af mikrosatellitter kan man derfor foretage en bestemmelse af den familiære baggrund for et individ, såfremt dets forældre har været analyseret forudgående med samme metode.

Ud af seksten individuelle DNA-analyser, udført på de fire hjørnetænder for at identificere ulvens mikrosatellitmarkører, lykkes det i et enkelt tilfælde (UV1228_3) at opnå en komplet mikrosatellit-genotype. I fire andre tilfælde (UV1228_2, UV1229_1, UV1229_2, UV1229_3) blev en næsten komplet mikrosatellit-genotype fundet, idet alleler i maksimalt 3 markører ikke kunne scores komplet eller lå under tærskelværdien for signalstyrke (Tabel 2, Bilag 2). Desuden lykkedes det i fire tilfælde (UV1226_3, UV1227_3, UV1228_3, UV1229_3) at opnå kønsbestemmelse til han (m). For de øvrige analyser var det enten ikke muligt at opformere et produkt med tilstrækkeligt indhold af mikrosatellitter, eller også var scoringen af en komplet genotype ikke mulig, da tærskelværdien for signalstyrke ikke blev mødt for alleler i mere end 3 markører (Tabel 2, Bilag 2). For ingen af de seksten individuelle DNA-analyser, der er blevet udført på de fire hjørnetænder, viser analysen af mikrosatellitter modstridende resultater eller resultater, som peger i retning af mere end ét individ. Tænderne ser således ud til at stamme fra det samme individ.

Da det er de samme 13 genetiske mikrosatellitmarkører (og to kønsmarkører), som anvendes til DNA-analyser foretaget af alle de genetiske laboratorier, der indgår i den videnskabelige Central European Wolf (CEWolf) konsortium, og som tilsammen dækker hele udbredelsesområdet for den centraleuropæiske ulvebestand, kan ulveindivider, identificeret ud fra de pågældende mikrosatellitmarkører, spores i det centraleuropæiske ulveregister. I det konkrete tilfælde er profilen ikke kendt fra tidligere fund. Dette er dog ikke ualmindeligt, idet bestanden af ulve i Centraleuropa efterhånden er så stor, at flere og flere ynglepar ikke længere monitoreres genetisk. Der er således også tidligere blevet fundet ulve i Danmark, som ikke tidligere er blevet registreret i det centraleuropæiske ulveregister.

Diskussion

De fire hjørnetænder stammer fra en hanulv, men ikke et individ, der er kendt fra tidligere fund i Danmark eller Centraleuropa. Det har endnu ikke været muligt at bestemme ulvens familiære baggrund og derfor har det heller ikke været muligt at præcisere, hvor i den centraleuropæiske ulvebestand individet eventuelt har sin oprindelse.

Individets haplotype er den almindeligste forekommende mtDNA-variant i den centraleuropæiske ulvebestand. Selvom ulvens familiære baggrund ikke kan præciseres, så består den sammensatte mikrosatellit-genotype udelukkende af alleler, som er forenelige med den centraleuropæiske bestands genetiske sammensætning.

Hvorvidt genotypen også er forenelig eller uforenelig med den genetiske sammensætning af andre ulvebestande end den centraleuropæiske kan ikke afgøres på det foreliggende grundlag, men ville kræve analyser af genetiske data fra både den centraleuropæiske og andre ulvebestande sammen med den aktuelle genotype fra tand-materialet.

Endvidere henledes opmærksomheden på, at de 13 anvendte mikrosatellit-markører er udvalgt med henblik på at identificere individer og ikke at identificere, hvilken bestand et individ stammer fra. Brug af et større antal markører, som eksempelvis SNP-analyser (Kraus et al. 2014), ville optimere opløseligheden med henblik på at afgøre, hvilken population genotypen med størst sandsynlighed stammer fra.

Selvom der på det foreliggende grundlag ikke kan afvises, at ulven kunne stamme fra en anden ulvebestand, så er der ikke noget, der peger i retning af, at den pågældende hanulv ikke skulle have tilhørt den centraleuropæiske ulvebestand ligesom de øvrige ulve registreret i Danmark.

Konklusion

Det kan med overvejende sandsynlighed konkluderes, at de fire hjørnetænder stammer fra en hanulv. Selv om ulvens genetiske profil er ny (individet er ikke tidligere konstateret i hverken Danmark og Europa), stemmer alle genetiske markører overens med de markører, som kendes i den centraleuropæiske ulvebestand.

Alle foreliggende data taler således for og ingen imod, at den pågældende hanulv tilhører den centraleuropæiske ulvebestand, ligesom alle øvrige ulve som hidtil er registreret i Danmark.

Taksigelser

Vi takker Trine Bech Søgaard (Institut for Biologi, Aarhus Universitet) for det genetiske analysearbejde i laboratoriet. Vi takker Anders J. Hansen, Ida B. Nielsen og medarbejdere på National Wildlife Forensics Facility, Globe Instituttet, Københavns Universitet for venligst at videregive tænder og DNA-oprensninger samt øvrigt information.

Referencer

Czarnomska, S. D., Jędrzejewska, B., Borowik, T., Niedziałkowska, M., Stronen, A. V., Nowak, S., Mysłajek, R. W., Okarma, H., Konopiński, M., Pilot, M., Śmietana, W., Caniglia, R., Fabbri, E., Randi, E., Pertoldi, C., & Jędrzejewski, W. (2013). Concordant mitochondrial and microsatellite DNA structuring between Polish lowland and Carpathian Mountain wolves. – *Conservation Genetics* 14: 573–588.

Kraus, R. H. S., von Holdt, B., Cocchiariro, B., Harms, V., Bayerl, H., Kühn, R., Förster, D. W., Fickel, J., Roos, C. & Nowak, C. (2015). A single-nucleotide polymorphism-based approach for rapid and cost-effective genetic wolf monitoring in Europe based on noninvasively collected samples. – *Mol Ecol. Res.* 15: 295–305

Olsen, K., Sunde, P., Hansen, M.M., Thomsen, P.F. & Hansen, A.J. (2019). DNA-analyser og beskrivelse af den Centraleuropæiske ulvebestand, herunder identifikation af ulve og ulvehybrider. 15 s. 24. januar 2019. – Notat fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi & Naturhistorisk Museum Aarhus.

http://dce.au.dk/fileadmin/dce.au.dk/Udgivelser/Notater_2019/DNA_analyser_Centraleuropaeisk_ulvebestand.pdf

Olsen, K., Sunde, P., Vedel-Smith, C., Hansen, M.M. & Thomsen, P.F. (2021). Statusrapport fra den nationale overvågning af ulv (*Canis lupus*) i Danmark – 2. kvartal 2021. 19 s. 15. oktober 2021. – Notat fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi & Naturhistorisk Museum Aarhus.

https://dce.au.dk/fileadmin/dce.au.dk/Udgivelser/Notater_2021/N2021_77.pdf

Thomsen, P.F., Hansen, M.M., Olsen, K. & Sunde, P. (2020). Genetiske analysemetoder i den nationale overvågning af ulv (*Canis lupus*) i Danmark – DNA-analyser til arts- og individniveau. 10 s. 8. juni 2020. – Notat fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi & Naturhistorisk Museum Aarhus.

https://dce.au.dk/fileadmin/dce.au.dk/Udgivelser/Notatet_2020/N2020_43.pdf

Bilag

Bilag 1

Mitokondriesequenser for de 16 DNA-prøver fra de fire hjørnetænder. For UV1226 og UV1228 er der fem replikater og for UV1227 og UV1229 tre replikater, da der blev foretaget flere DNA-oprensninger af hver prøve. Der er tale om konsensussequenser (forward/reverse og replikater) for hver sekvens. Hver DNA-prøve er kørt i to PCR replikater. Prøverne CGG_6_801_1_tube1_2 (UV1226), WDK0322 (UV1227) og CGG_6_800_1_tube2_1 (UV1228) blev foretaget med primere specifik for hundefamilien (WDloopH254/WDloopL), mens resten blev foretaget med primere specifik for pattedyr (H16498/L15995). Dette skyldes at de tre førnævnte prøver ikke gav to brugbare sequenser med pattedyr-primere i første omgang. Analyser er foretaget af Institut for Biologi, Aarhus Universitet.

| Prøve ID | Lab ID | Mitokondriesequens |
|----------|---------------------|--|
| UV1226 | CGG_6_801_1_tube1_1 | CTGAAATTCCTTAAACTATTCCCTGACACCCCTACATTCATATATTGAATCACCCCTACTGTGCTATGTCAGTATCTCCAGGTAAACCCTTCTTCCCTCCCCTATGTACGTCGTGCA TTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATAATATTACATTCCTTACATAGGACATATTAACCTCAATCTCATAATTCAGTATCTATCAACAGTAATCAAATGCATATCACTTAGT CCAATAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAAACCATCAACCCTTGCTCGTAATGTCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCCATACTAACGTGGGGGTTACTATCATGAAACTATACCTGG |
| UV1226 | CGG_6_801_1_tube1_2 | ATATATTGAATCACCCCTACTGTGCTATGTCAGTATCTCCAGGTAAACCCTTCTTCCCTCCCCTATGTACGTCGTGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATAATATT ACATTCCTTACATAGGACATATTAACCTCAATCTCATAATTCAGTATCTATCAACAGTAATCAAATGCATATCACTTAGTCCAATAAGGGCTTA |
| UV1226 | WDK0319 | CTGAAATTCCTTAAACTATTCCCTGACACCCCTACATTCATATATTGAATCACCCCTACTGTGCTATGTCAGTATCTCCAGGTAAACCCTTCTTCCCTCCCCTATGTACGTCGTGCA TTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATAATATTACATTCCTTACATAGGACATATTAACCTCAATCTCATAATTCAGTATCTATCAACAGTAATCAAATGCATATCACTTAGT CCAATAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAAACCATCAACCCTTGCTCGTAATGTCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCCATACTAACGTGGGGGTTACTATCATGAAACTATACCTGG |
| UV1226 | WDK0320 | CTGAAATTCCTTAAACTATTCCCTGACACCCCTACATTCATATATTGAATCACCCCTACTGTGCTATGTCAGTATCTCCAGGTAAACCCTTCTTCCCTCCCCTATGTACGTCGTGCA TTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATAATATTACATTCCTTACATAGGACATATTAACCTCAATCTCATAATTCAGTATCTATCAACAGTAATCAAATGCATATCACTTAGT CCAATAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAAACCATCAACCCTTGCTCGTAATGTCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCCATACTAACGTGGGGGTTACTATCATGAAACTATACCTGG |
| UV1226 | WDK0333 | CTGAAATTCCTTAAACTATTCCCTGACACCCCTACATTCATATATTGAATCACCCCTACTGTGCTATGTCAGTATCTCCAGGTAAACCCTTCTTCCCTCCCCTATGTACGTCGTGCA TTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATAATATTACATTCCTTACATAGGACATATTAACCTCAATCTCATAATTCAGTATCTATCAACAGTAATCAAATGCATATCACTTAGT CCAATAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAAACCATCAACCCTTGCTCGTAATGTCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCCATACTAACGTGGGGGTTACTATCATGAAACTATACCTGG |

| | | |
|--------|-----------------------------|---|
| UV1227 | WDK0321 | CTGAAATTCCTTCTAAACTATTCCCTGACACCCCTACATTCATATATTGAATCACCCCTACTGTGCTATGTCAGTATCTCCAGGTAAACCCCTTCTCCCTCCCCTATGTACGTCGTGCA TTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATAATATTACATTCTTACATAGGACATATTAACCTCAATCTCATAATTCAGTATCTATCAACAGTAATCAAATGCATATCACTTAGT CCAATAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAAACCATCAACCCCTTGCTCGTAATGTCCCTCTTCTCGCTCCGGGGCCATACTAACGTGGGGGTTACTATCATGAAACTATAACCTGG |
| UV1227 | WDK0322 | ATATATTGAATCACCCCTACTGTGCTATGTCAGTATCTCCAGGTAAACCCCTTCTCCCTCCCCTATGTACGTCGTGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATAATATT ACATTCTTACATAGGACATATTAACCTCAATCTCATAATTCAGTATCTATCAACAGTAATCAAATGCATATCACTTAGTCCAATAAGGGCTTA |
| UV1227 | WDK0334 | CTGAAATTCCTTCTAAACTATTCCCTGACACCCCTACATTCATATATTGAATCACCCCTACTGTGCTATGTCAGTATCTCCAGGTAAACCCCTTCTCCCTCCCCTATGTACGTCGTGCA TTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATAATATTACATTCTTACATAGGACATATTAACCTCAATCTCATAATTCAGTATCTATCAACAGTAATCAAATGCATATCACTTAGT CCAATAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAAACCATCAACCCCTTGCTCGTAATGTCCCTCTTCTCGCTCCGGGGCCATACTAACGTGGGGGTTACTATCATGAAACTATAACCTGG |
| UV1228 | CGG_6_8 00_1_tub e2_1 | ATATATTGAATCACCCCTACTGTGCTATGTCAGTATCTCCAGGTAAACCCCTTCTCCCTCCCCTATGTACGTCGTGCATTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATAATATT ACATTCTTACATAGGACATATTAACCTCAATCTCATAATTCAGTATCTATCAACAGTAATCAAATGCATATCACTTAGTCCAATAAGGGCTTA |
| UV1228 | CGG_6_8 00_1_tub e2_2 | CTGAAATTCCTTCTAAACTATTCCCTGACACCCCTACATTCATATATTGAATCACCCCTACTGTGCTATGTCAGTATCTCCAGGTAAACCCCTTCTCCCTCCCCTATGTACGTCGTGCA TTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATAATATTACATTCTTACATAGGACATATTAACCTCAATCTCATAATTCAGTATCTATCAACAGTAATCAAATGCATATCACTTAGT CCAATAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAAACCATCAACCCCTTGCTCGTAATGTCCCTCTTCTCGCTCCGGGGCCATACTAACGTGGGGGTTACTATCATGAAACTATAACCTGG |
| UV1228 | WDK0323 | CTGAAATTCCTTCTAAACTATTCCCTGACACCCCTACATTCATATATTGAATCACCCCTACTGTGCTATGTCAGTATCTCCAGGTAAACCCCTTCTCCCTCCCCTATGTACGTCGTGCA TTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATAATATTACATTCTTACATAGGACATATTAACCTCAATCTCATAATTCAGTATCTATCAACAGTAATCAAATGCATATCACTTAGT CCAATAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAAACCATCAACCCCTTGCTCGTAATGTCCCTCTTCTCGCTCCGGGGCCATACTAACGTGGGGGTTACTATCATGAAACTATAACCTGG |
| UV1228 | WDK0324 | CTGAAATTCCTTCTAAACTATTCCCTGACACCCCTACATTCATATATTGAATCACCCCTACTGTGCTATGTCAGTATCTCCAGGTAAACCCCTTCTCCCTCCCCTATGTACGTCGTGCA TTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATAATATTACATTCTTACATAGGACATATTAACCTCAATCTCATAATTCAGTATCTATCAACAGTAATCAAATGCATATCACTTAGT CCAATAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAAACCATCAACCCCTTGCTCGTAATGTCCCTCTTCTCGCTCCGGGGCCATACTAACGTGGGGGTTACTATCATGAAACTATAACCTGG |
| UV1228 | WDK0335 | CTGAAATTCCTTCTAAACTATTCCCTGACACCCCTACATTCATATATTGAATCACCCCTACTGTGCTATGTCAGTATCTCCAGGTAAACCCCTTCTCCCTCCCCTATGTACGTCGTGCA TTAATGGTTTGCCCCATGCATATAAGCATGTACATAATATTACATTCTTACATAGGACATATTAACCTCAATCTCATAATTCAGTATCTATCAACAGTAATCAAATGCATATCACTTAGT CCAATAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAAACCATCAACCCCTTGCTCGTAATGTCCCTCTTCTCGCTCCGGGGCCATACTAACGTGGGGGTTACTATCATGAAACTATAACCTGG |

UV1229 WDK0325 CTGAAATTCTTCTTAAACTATTCCCTGACACCCCTACATTCATATATTGAATCACCCCTACTGTGCTATGTCAGTATCTCCAGGTAAACCCCTTCTTCCCTCCCCTATGTACGTCGTGCA
TTAATGGTTTGCCCATGCATATAAGCATGTACATAATATTACATTCTTACATAGGACATATTAACCTCAATCTCATAATTCAGTATCTATCAACAGTAATCAAATGCATATCACTTAGT
CCAATAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAAACCATCAACCCTTGCTCGTAATGTCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCCATACTAACGTGGGGGTTACTATCATGAAACTATACCTGG

UV1229 WDK0326 CTGAAATTCTTCTTAAACTATTCCCTGACACCCCTACATTCATATATTGAATCACCCCTACTGTGCTATGTCAGTATCTCCAGGTAAACCCCTTCTTCCCTCCCCTATGTACGTCGTGCA
TTAATGGTTTGCCCATGCATATAAGCATGTACATAATATTACATTCTTACATAGGACATATTAACCTCAATCTCATAATTCAGTATCTATCAACAGTAATCAAATGCATATCACTTAGT
CCAATAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAAACCATCAACCCTTGCTCGTAATGTCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCCATACTAACGTGGGGGTTACTATCATGAAACTATACCTGG

UV1229 WDK0336 CTGAAATTCTTCTTAAACTATTCCCTGACACCCCTACATTCATATATTGAATCACCCCTACTGTGCTATGTCAGTATCTCCAGGTAAACCCCTTCTTCCCTCCCCTATGTACGTCGTGCA
TTAATGGTTTGCCCATGCATATAAGCATGTACATAATATTACATTCTTACATAGGACATATTAACCTCAATCTCATAATTCAGTATCTATCAACAGTAATCAAATGCATATCACTTAGT
CCAATAAGGGCTTAATCACCATGCCTCGAGAAACCATCAACCCTTGCTCGTAATGTCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCCATACTAACGTGGGGGTTACTATCATGAAACTATACCTGG

Bilag 2

Konsensus for mikrosatellitter for de 16 DNA-prøver fra de fire hjørnetænder. Bestemmelse af køn og individ foretages ved hjælp af henholdsvis to kønsmarkører (X- og Y-kromosom) og 13 mikrosatellitmarkører, som hver især udviser genetisk variation og som på tværs af alle markører udgør en unik DNA-profil (genotype) (Olsen m.fl. 2019). For UV1226 og UV1228 er der fem replikater og for UV1227 og UV1229 tre replikater, da der blev foretaget flere DNA-oprensninger af hver prøve. NA benyttes i de tilfælde hvor det oprensede produkt med mikrosatellitter ikke havde tilstrækkelig styrke, eller scoringen af genotypen for den pågældende allel ikke har været muligt, da den ikke ligger over tærskelværdien for signalstyrke. Analyser er foretaget af Institut for Biologi, Aarhus Universitet.

| Prøve ID | Lab ID | Prøve | FH2001a | FH2001b | FH2010a | FH2010b | FH2017a | FH2017b | FH2087La | FH2087Lb | FH2088a | FH2088b | FH2096a | FH2096b | FH2137a | FH2137b | FH2140a | FH2140b | vWfFa | vWfFb | FH2054a | FH2054b | FH2161a | FH2161b | CPH5a | CPH5b | PEZ17a | PEZ17b | DBX6 | DBY7 | | |
|----------|---------------------|-----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|----------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|-------|---------|---------|---------|---------|-------|-------|--------|--------|------|------|----|----|
| UV1226 | CGG_6_801_1_tube1_1 | konsensus | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | |
| UV1226 | CGG_6_801_1_tube1_2 | konsensus | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | |
| UV1226 | WDK0319 | konsensus | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | 89 | 113 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | 144 | 144 | NA | NA | NA | NA | 197 | 197 | NA | NA | | |
| UV1226 | WDK0320 | konsensus | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | 89 | 113 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | 144 | 144 | NA | NA | NA | NA | 197 | 197 | NA | NA | | |
| UV1226 | WDK0333 | konsensus | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | 89 | 113 | NA | NA | NA | NA | 129 | 129 | NA | NA | NA | NA | 244 | 248 | NA | NA | 197 | 197 | NA | 114 | | |
| UV1227 | WDK0321 | konsensus | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | 89 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | 144 | 144 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | |
| UV1227 | WDK0322 | konsensus | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | |
| UV1227 | WDK0334 | konsensus | 136 | NA | 221 | 229 | NA | NA | 228 | 236 | 89 | 113 | 96 | 104 | NA | NA | NA | NA | 130 | 130 | 144 | 144 | NA | NA | NA | NA | 197 | 197 | NA | 114 | | |
| UV1228 | CGG_6_800_1_tube2_1 | konsensus | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | |
| UV1228 | CGG_6_800_1_tube2_2 | konsensus | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| UV1228 | WDK0323 | konsensus | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | 89 | 113 | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA | NA |
| UV1228 | WDK0324 | konsensus | NA | NA | 221 | 229 | NA | NA | 228 | 236 | 89 | 113 | NA | NA | 157 | 171 | 129 | 129 | 130 | 130 | 144 | 144 | 244 | 248 | 113 | 115 | 197 | 197 | 244 | NA | NA | |
| UV1228 | WDK0335 | konsensus | 136 | 148 | 221 | 229 | 264 | 268 | 228 | 236 | 89 | 113 | 96 | 104 | 157 | 171 | 129 | 129 | 130 | 130 | 144 | 144 | 244 | 248 | 113 | 115 | 197 | 197 | 244 | 114 | NA | |
| UV1229 | WDK0325 | konsensus | NA | NA | 221 | 229 | 264 | 268 | 228 | 236 | 89 | 113 | 96 | 104 | 157 | 171 | 129 | 129 | 130 | 130 | 144 | 144 | 244 | 248 | 113 | 115 | 197 | 197 | NA | NA | NA | |
| UV1229 | WDK0326 | konsensus | NA | NA | 221 | 229 | 264 | 268 | 228 | 236 | 89 | 113 | 96 | 104 | 157 | 171 | 129 | 129 | 130 | 130 | 144 | 144 | 244 | 248 | 113 | 115 | 197 | 197 | NA | NA | NA | |
| UV1229 | WDK0336 | konsensus | 136 | NA | 221 | 229 | NA | NA | 228 | 236 | 89 | 113 | 96 | 104 | 157 | 171 | 129 | 129 | 130 | 130 | 144 | 144 | NA | NA | 113 | 115 | 197 | 197 | NA | 114 | NA | NA |

Appendiks

Appendiks 1

Resultat af artsbestemmelse baseret på to prøver (UV1228_A: CCG_6_800_1_tube2_1 og UV1228_B: CCG_6_800_1_tube2_2) udtaget fra én af de fire hjørnetænder (UV1228) forud for det genetiske analysearbejde (Tabel 1). Analysearbejdet er foretaget af National Wildlife Forensics Facility, Globe Institutet, Københavns Universitet, der på foranledning af Miljøstyrelsen tidligere har foretaget en artsbestemmelse.



Taxonomic identification of sample by DNA

Wildfor case ID: WFF_000082

Date: 23th of April 2021

Requestor ID and information:

On picture to the right

Requestor: Miljøstyrelsen, Specialkonsulent | Arter og Naturbeskyttelse (Lasse Jensen, +45 41 26 93 40, lajen@mst.dk)

Samples received: 24/03/2021

Number of samples: 1 x 2 teeth

Sample ID: CGG_6_000800

Requested analysis: A non-urgent investigative species identification of the sample by mitochondrial DNA analysis not intended for legal proceedings.


Price of investigation: 2,000 DKK

Case report issued by: Alba Rey de la Iglesia (ARI) and Anders J. Hansen (AJH).

Statement: ARI is a postdoctoral researcher at the GLOBE Institute. AJH is a Professor and Vice President of the National Wildlife Forensics Facility, GLOBE Institute, University of Copenhagen.



The DNA examination of all the samples in this case, is conducted under the supervision of ARI's, who prepared this investigative* report of the findings. The report was reviewed and approved by AJH.

Signature  _____

Date: 23/04/2021

MSc, Ph.D. Alba Rey de la Iglesia
ardelaiglesia@sund.ku.dk
+45 5022 1213

Signature  _____

Date: 23/04/2021

MSc, Ph.D. Anders Johannes Hansen
Ajhansen@sund.ku.dk
+45 2875 6134



* This report is based on a basic investigative analysis and although the methods employed are widely accepted, supported and published in the field of forensic biology, the data is not intended for use in a legal setting. Therefore, The National Wildlife Forensics Facility of Denmark cannot attest to the results of this report in a court of law.

Results

Sample ID: CGG_6_000800

Sample information: We received two teeth from an individual of the *Canis* genus. We performed genetic species identification based on one of the teeth from the individual. We performed two DNA extractions on the sample: gum tissue and bone DNA extraction.

DNA investigation:

DNA was successfully extracted from the samples using the protocol described in Allentoft *et al.* (2015). Mitochondrial DNA was amplified from one gen (D-loop Control Region) according to our lab's standard operating procedures (available upon request). Mitochondrial amplifications were successful for both DNA extracts. Comparisons of the D-loop Control Region DNA sequence data obtained from the sample with the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) database yielded a 100% match to *Canis lupus* as the only species. The sequence differed in 3 base pairs to sequences from *Canis lupus familiaris*, which represents a 98.81% match.

Identification results:

Common name: Wolf

Scientific classification: Mammalia, Carnivora, Canidae

Appendiks 2

Resultat af artsbestemmelse baseret på to prøver (UV1226_A: CGG_6_801_1_tube1_1 og UV1226_B: CGG_6_801_1_tube1_2) udtaget fra én af de fire hjørnetænder (UV1226) forud for det genetiske analysearbejde (Tabel 1). Analysearbejdet er foretaget af National Wildlife Forensics Facility, Globe Institutet, Københavns Universitet, der på foranledning af Miljøstyrelsen tidligere har foretaget en artsbestemmelse.



Taxonomic identification of sample by DNA

Wildfor case ID: WFF_000083

Date: 23th of April 2021

Requestor ID and information:

On picture to the right

Requestor: Miljøstyrelsen, Specialkonsulent | Arter og Naturbeskyttelse (Lasse Jensen, +45 41 26 93 40, lajen@mst.dk)

Samples received: 24/03/2021

Number of samples: 1

Sample ID: CGG_6_000801

Requested analysis: A non-urgent investigative species identification of the sample by mitochondrial DNA analysis not intended for legal proceedings.


Price of investigation: 2,000 DKK

Case report issued by: Alba Rey de la Iglesia (ARI) and Anders J. Hansen (AJH).

Statement: ARI is a postdoctoral researcher at the GLOBE Institute. AJH is a Professor and Vice President of the National Wildlife Forensics Facility, GLOBE Institute, University of Copenhagen.



The DNA examination of all the samples in this case, is conducted under the supervision of ARI's, who prepared this investigative* report of the findings. The report was reviewed and approved by AJH.

Signature  _____

Date: 23/04/2021

MSc, Ph.D. Alba Rey de la Iglesia
ardelaiglesia@sund.ku.dk
+45 5022 1213


Signature _____

Date: 23/04/2021

MSc, Ph.D. Anders Johannes Hansen
Ajhansen@sund.ku.dk
+45 2875 6134



* This report is based on a basic investigative analysis and although the methods employed are widely accepted, supported and published in the field of forensic biology, the data is not intended for use in a legal setting. Therefore, The National Wildlife Forensics Facility of Denmark cannot attest to the results of this report in a court of law.

Results

Sample ID: CGG_6_000801

Sample information: We received two teeth from an individual of the *Canis* genus. We performed genetic species identification based on one of the teeth from the individual. We performed two DNA extractions on the sample, gum tissue and bone DNA extraction.

DNA investigation:

DNA was successfully extracted from the samples using the protocol described in Allentoft *et al.* (2015). Mitochondrial DNA was amplified from one gen (D-loop Control Region) according to our lab's standard operating procedures (available upon request). Mitochondrial amplification was successful only for the bone sample DNA extraction. Comparisons of the D-loop Control Region DNA sequence data obtained from the sample with the National Centre for Biotechnology Information (NCBI) database yielded a 100% match to *Canis lupus* as the only species. The sequence differed in 3 base pairs to sequences from *Canis lupus familiaris*, which represents a 98.81% match.

Identification results:

Common name: Wolf

Scientific classification: Mammalia, Carnivora, Canidae