

Genetiske analysemetoder i den nationale overvågning af ulv (*Canis lupus*) i Danmark

DNA-analyser til arts- og individniveau

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

Dato: 8. juni 2020 | 43



AARHUS
UNIVERSITET

DCE – NATIONALT CENTER FOR MILJØ OG ENERGI

NATURHISTORISK
MUSEUM AARHUS

Datablad

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

Titel: Genetiske analysemetoder i den nationale overvågning af ulv (*Canis lupus*) i Danmark
Undertitel: DNA-analyser til arts- og individniveau

Forfattere: Philip Francis Thomsen¹, Michael Møller Hansen¹, Kent Olsen² & Peter Sunde³
Institutioner: ¹Institut for Biologi, Aarhus Universitet, ²Naturhistorisk Museum, Aarhus & ³Institut for Bioscience, Aarhus Universitet

Faglig kommentering: Aksel Bo Madsen
Kvalitetssikring, DCE: Jesper R. Fredshavn
Sproglig kvalitetssikring: Aksel Bo Madsen & Jesper R. Fredshavn

Rekvirent: Miljøstyrelsen

Bedes citeret: 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. Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi, 10 s. – Notat nr. 2020|43
https://dce.au.dk/fileadmin/dce.au.dk/Udgivelser/Notatet_2020/N2020_43.pdf

Gengivelse tilladt med tydelig kildeangivelse

Foto forside: Ulveekskrement (Naturhistorisk Museum, Aarhus)

Sideantal: 10

Indhold

| | | |
|----------|---|----------|
| 1 | Baggrund | 4 |
| 2 | Materialer og metoder | 5 |
| | DNA-spor og DNA-analyser til arts- og individniveau | 5 |
| | Indsamling og oprensning af DNA-spor | 5 |
| | Bestemmelse af art fra DNA | 6 |
| | Bestemmelse af individ og køn fra DNA | 6 |
| | Laboratoriefaciliteter | 8 |
| 3 | Referencer | 9 |

1 Baggrund

I henhold til den kontrakt Miljøstyrelsen har indgået med det videnskabelige konsortium mellem Naturhistorisk Museum i Aarhus og DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi ved Aarhus Universitet om overvågning af ulv i Danmark, skal konsortiet udfærdige DNA-analyser til arts- og individniveau med henblik på at kunne kortlægge de enkelte ulves familiære tilhørsforhold og deres vandring i og uden for Danmark.

I dette notat gives en kort beskrivelse af de genetiske analysemetoder, der benyttes under den nationale overvågning af ulv i Danmark.

2 Materialer og metoder

DNA-spor og DNA-analyser til arts- og individniveau

Overordnet set er der i alle pattedyrceller to typer af DNA: DNA fra cellens mitokondrier (mtDNA) i hundred- eller tusindvis af kopier per celle og DNA fra cellekernen i to kopier (én kopi fra hvert kromosom) i hver enkelt celle. Kerne-DNA nedarves fra begge forældre og hvert kromosom er således tilstede i to varianter – én fra hver forælder, mens mtDNA næsten udelukkende nedarves fra moderen (Ballard & Whitlock 2004; Luo m.fl. 2018; Rius m.fl. 2019).

Indsamling og oprensning af DNA-spor

DNA-spor oprenses typisk fra væv, hår, ekskrementer, urin eller blodspor fra ulv eller spytpøver fra nyligt nedlagt bytte, hvor ulv mistænkes for at have dræbt dyret (typisk husdyr og hjortevildt). Prøver indsamles i forbindelse med angreb på husdyr af Naturstyrelsen på vegne af Miljøstyrelsen, mens øvrige prøver som ekskrementer, hår, urin m.m. indsamles af de involverede i den nationale ulveovervågning, herunder frivillige privatpersoner. Alle som deltager i indsamling af DNA-spor har fået nøje instruktion i hvordan DNA bedst indsamles og sikres på en måde, så nedbrydning og risikoen for forurening minimeres. Som alle andre sportegn fra ulv og formodet ulv registreres alle prøver med DNA-spor fra ulv af Naturhistorisk Museum, Aarhus med oplysninger om prøvetype, indsender, indsamlingsdato og georeference. Ekskrementer måles, fotograferes og registreres i felten, hvorefter de indsamles i en steril plast-beholder med 96% Ethanol og opbevares ved -20°C. DNA-spor fra bidsår på byttedyr indsamles med sterile vatpinde (Selefa Cotton tipped applicator REF 120788). Vatpinden roteres i bidmærkerne og på pelsen omkring bidmærkerne, hvor der kan være spyt fra det bidende rovdyr til stede. Flere prøver kan indsamles fra samme nedlagte byttedyr.

DNA oprenses fra ekskrementer ved at udtage en prøve fra det yderste lag fra ekskrement-prøven (ofte findes et hvidt slimet lag yderst på afføringen indeholdende celler fra tarmvæggen). Materiale udtages med sterile engangsskallpeller. DNA fra prøven oprenses vha. QIAmp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen). Protokollen som er vedlagt kittet følges med enkelte modifikationer. Under punkt 2 i protokollen inkuberes prøven natten over ved 56°C i en thermomixer ved 400 rpm efter tilsætning af InhibitEX. Under punkt 3 centrifugeres 5 min i stedet for 1 min, hvorefter der tilsættes 1 µl (µg/µl) blandet Carrier RNA (Qiagen: 15504828) og der vortexes kort. Under punkt 14 tilsættes 2 x 60 µl ATE buffer for at eluere DNA.

DNA oprenses fra vatpinde (spytprøver) og hårprøver vha. QIAmp DNA Investigator Kit (Qiagen). Protokollen som er vedlagt kittet følges med enkelte modifikationer. Under punkt 2 benyttes 400 µl buffer ATL og 25 µl Proteinase K, under punkt 3 inkuberes prøven i tre timer eller natten over ved 56°C i en thermomixer ved 900 rpm, under punkt 5 tilsættes 1 µl (µg/µl) blandet Carrier RNA (Qiagen: 15504828) til 400 µl Buffer AL, og under punkt 16 tilsættes 2 x 40 µl Buffer ATE for at eluere DNA.

Bestemmelse af art fra DNA

Ved de DNA-analyser, der anvendes i overvågningen af ulve i Danmark, foretages først en bestemmelse af art og haplotype (variant af mitokondrie-DNA) på basis af mtDNA med mindst to og op til fire gentagelser (replikater). På den måde bruges DNA-spor i første omgang til at fastslå, om en prøve overhovedet indeholder spor fra ulv, og derved kan tælle som en sikker ulveobservation (C1) jf. Sunde & Olsen (2018). Prøven analyseres vha. PCR (Polymerase Chain Reaction) i to replikater med de pattedyr-specifikke primere L15995 (Taberlet & Bouvet 1994) og H16498 (Fumagalli m.fl. 1996). Hvis disse ikke virker eller opformerer byttedyret i stedet for rovdyret, anvendes i stedet de rovdyr-specifikke primere WDloopL og WDloopH254 (Caniglia m.fl. 2013) i to nye replikater. Begge primer-sæt opformerer et stykke af kontrol regionen (d-loop). PCR-reaktionerne er som følger:

Opsætning for hver PCR-reaktion (total 25 µl): 12 µl lab-grade vand, 10 µl Hot-StarTaq Master Mix kit (1000U) Qiagen, 1 µl BSA (20 mg/µl), 0,5 µl forward primer, 0,5 µl reverse primer og 1 µl DNA.

PCR køres med følgende indstillinger: Denaturering ved 95°C i 15 minutter. Herefter 40 cykler af 94°C i 30 sekunder, 54°C i 30 sekunder, 72°C i ét minut. Afslutning med 72°C i syv minutter.

PCR-produkter visualiseres på 2% agarose geler, og positive reaktioner sekventeres kommercielt hos firmaet Macrogen Europe. Resultater visualiseres i programmet Geneious ver. 10.2.2 (Biomatters Ltd.) og resultater sammenholdes med kendte profiler af ulve-haplotype og identificeres vha. online version af *blastn* algoritmen mod nucleotide (nt) databasen i GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Hvis minimum to replikater viser ulv, accepteres prøven som værende fra ulv, med mindre de øvrige replikater antyder andre rovdyr (ex. ræv, guldsjakal eller hund). Grunden til at der kan være uoverensstemmelse mellem replikater skyldes bl.a., at der til tider, dog meget sjældent, detekteres DNA fra ulvens føde frem for ulven selv eller prøven kan være blevet forurennet ved at et andet dyr har efterladt DNA på indsamlingsstedet forud for at prøven er indsamlet. Siden 2016 er der kun fundet ulve med haplotypen HW01 i Danmark, hvilket gør bestemmelsen mere enkel.

Bestemmelse af individ og køn fra DNA

Hvis prøver indeholder DNA fra ulv, forsøges dyrets køn og individidentitet fastslået ud fra DNA fra cellekerner. Bestemmelse af køn og individ foretages ved hjælp af henholdsvis to kønsmarkører DBX6 og DBY7 (X- og Y-kromosom) (Seddon 2005) og 13 mikrosatellitmarkører, som hver især udviser genetisk variation og som på tværs af alle markører udgør en unik DNA-profil (genotype), som identificerer individer. De 13 mikrosatellitmarkører som anvendes er: FH2001, FH2010, FH2017, FH2087L, FH2088, FH2096, FH2137, FH2140, vWF, FH2054, FH2161, CPH5 og PEZ17 (Francisco m.fl. 1996; Fredholm & Winterø 1995; Neff m.fl. 1999; Shibuya m.fl. 1994). Mikrosatellitter er korte DNA-sekvenser i kernegenomet bestående af motiver på ca. 2-6 basepar gentaget flere gange efter hinanden. Der findes stor variation i, hvor mange gange disse korte motiver af basepar er gentaget, hvilket fører til, at de enkelte alleler kan genkendes ud fra længden af DNA-stykket. Længden af hele mikrosatellitter varierer således ofte mellem individer, og det er denne variation i længder på tværs af flere forskellige mikrosatellitmarkører, som anvendes til at identificere et ulveindivid. Analyse af mikrosatellitter og kønsmarkører

foretages i tre forskellige PCR-reaktioner (multiplex) hver foretaget i fire replikater per prøve. Hvis minimum to ud af de fire analyser viser en troværdig og veldefineret profil ud fra strikte kriterier om signalets styrke, vil den blive accepteret. En genotype vil derfor kun blive accepteret, hvis signalstyrken ("toppe" i elektroferogrammer fra trace-filer) er over en foruddefineret signalstyrke på 200 Relative Fluorescence Units (RFU) og signalet samtidig har en veldefineret form i elektroferogrammet.

Forud for opsætning af hver PCR-reaktion laves først primer-blandinger i henholdsvis forward, forward i farvemærket version og reverse efter forholdene angivet i Tabel 1.

Tabel 1. Oversigt over de forskellige mikrosatellit-primere, som bruges i overvågningen samt mængder tilsat for at lave grundopløsninger til PCR-blandingerne.

| Blanding | Primer | Markør | Forward (µl) | Forward med markør (µl) | Reverse (µl) | Vand (µl) | Total (µl) |
|----------|--------|--------|--------------|-------------------------|--------------|-----------|------------|
| A | FH2001 | PET | 9 | 1 | 10 | 80 | 100 |
| E | FH2087 | 6-FAM | 9 | 1 | 10 | 80 | 100 |
| Q | PEZ17 | VIC | 7,5 | 2,5 | 10 | 80 | 100 |
| X | DBX6 | PET | 8 | 2 | 10 | 80 | 100 |
| Y | DBY7 | 6-FAM | 9 | 1 | 10 | 80 | 100 |
| B | FH2010 | PET | 8,5 | 1,5 | 10 | 80 | 100 |
| C | FH2017 | VIC | 7,5 | 2,5 | 10 | 80 | 100 |
| G | FH2096 | 6-FAM | 9 | 1 | 10 | 80 | 100 |
| J | FH2137 | 6-FAM | 9 | 1 | 10 | 80 | 100 |
| M | Vwf | VIC | 9 | 1 | 10 | 80 | 100 |
| F | FH2088 | VIC | 9 | 1 | 10 | 80 | 100 |
| K | FH2140 | NED | 8 | 2 | 10 | 80 | 100 |
| N | FH2054 | 6-FAM | 9 | 1 | 10 | 80 | 100 |
| O | FH2161 | VIC | 8 | 2 | 10 | 80 | 100 |
| P | CPH5 | PET | 8,5 | 1,5 | 10 | 80 | 100 |

Herefter opsættes multiplex PCR-reaktioner i tre blandinger (Mix A, Mix B og Mix C) med hver fem primer-blandinger fra blandingerne angivet i Tabel 1.

MIX A (total 25 µl): 8,5 µl lab-grade vand, 10 µl HotStarTaq Master Mix kit (1000U) Qiagen, 0,5 µl BSA (20 mg/µl), 0,5 µl primer-blanding A, 0,5 µl primer-blanding E, 0,5 µl primer-blanding Q, 1 µl primer-blanding X, 0,5 µl primer-blanding Y, og 3 µl DNA.

MIX B (total 25 µl): 8,5 µl lab-grade vand, 10 µl HotStarTaq Master Mix kit (1000U) Qiagen, 0,5 µl BSA (20 mg/µl), 0,5 µl primer-blanding B, 1 µl primer-blanding C, 0,5 µl primer-blanding G, 0,5 µl primer-blanding J, 0,5 µl primer-blanding M, og 3 µl DNA.

MIX C (total 25 µl): 9 µl lab-grade vand, 10 µl HotStarTaq Master Mix kit (1000U) Qiagen, 0,5 µl BSA (20 mg/µl), 0,5 µl primer-blanding F, 0,5 µl primer-blanding K, 0,5 µl primer-blanding N, 0,5 µl primer-blanding O, 0,5 µl primer-blanding P, og 3 µl DNA.

Hver multiplex PCR-reaktion køres som "touch-down" program med følgende indstillinger: Denaturering ved 95°C i 15 minutter. Herefter fire cykler af 94°C

i 30 sekunder, 60°C i 90 sekunder, 72°C i 60 sekunder. Herefter fem cykler af 94°C i 30 sekunder, 58°C i 90 sekunder, 72°C i 60 sekunder. Herefter fem cykler af 94°C i 30 sekunder, 54°C i 90 sekunder, 72°C i 60 sekunder. Herefter 25 cykler af 94°C i 30 sekunder, 50°C i 90 sekunder, 72°C i 60 sekunder. Afslutning med 72°C i 30 minutter.

PCR-produkter visualiseres på 2% Agarose geler, og positive reaktioner analyseres kommercielt hos firmaet Macrogen Europe. Resultater analyseres i Geneious ver. 10.2.2 (Biomatters Ltd.) og resultater sammenholdes med kendte genotyper for centraleuropæiske ulve.

Alle genetiske profiler tjekkes og bestemmes uafhængigt af to personer (lektor Philip Francis Thomsen og professor Michael Møller Hansen), og resultaterne sammenholdes afslutningsvist med kollegaer inden for det centraleuropæiske ulvesamarbejde (CEwolf).

Da det er de samme genetiske markører, som anvendes til analyser foretaget på Senckenberg Research Institute i Tyskland og Institut for Biologi på Aarhus Universitet, kan det identificerede individ spores i det centraleuropæiske ulveregister, hvorved oprindelse (fx fødested og tidligere forekomster) og slægtskab med andre ulve (fx forældre eller søskende) kan kortlægges (Olsen m.fl. 2019).

Det er helt konkret deres genetiske profiler baseret på de 13 mikrosatellitmarkører, der har gjort det muligt, at kortlægge de forskellige ulveindividets familiære tilhørsforhold i den centraleuropæiske lavlandsbestand, og for de i Danmark registrerede ulveindividets vedkommende, at følge de voksne ulves på deres vandring fra Tyskland til Danmark og tilsvarende følge flere af de danskfødte ulvehvalpes vandring fra deres fødested til Tyskland. Såfremt en ulv forlader Danmark, kan registrerede fund syd for grænsen fortsat følges i det centraleuropæiske ulveregister.

Laboratoriefaciliteter

Alt DNA-arbejdet udføres i dedikerede laboratoriefaciliteter på Biologisk Institut, Aarhus Universitet. DNA-oprensning og PCR-opsætning udføres i renrums-laboratorier (Clean Labs), hvor personale er iført heldragter, mundbind, handsker og hånet. Laboratorierne rengøres jævnligt og dekontamineres med UV-lys. PCR-reaktioner og alt post-PCR-arbejde udføres i DNA-laboratorier, som er beliggende i en bygning, der er fysisk adskilt fra bygningen, hvor renrums-laboratoriet ligger.

3 Referencer

Ballard, J. W. O. & Whitlock, M. C. (2004). The incomplete natural history of mitochondria. – *Molecular Ecology* 13: 729-744.

Caniglia, R., Fabbri, E., Mastrogiuseppe, L., Randi, E. (2013). Who is who? Identification of livestock predators using forensic genetic approaches. – *Forensic Science International: Genetics* 7: 397-404.

Francisco, L. V., Langsten, A. A., Mellersh, C. S., Neal, C. L. & Ostrander, E. A. (1996). A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. – *Mammalian Genome* 7: 359-362.

Fredholm, M. & Winterø, A. K. (1995). Variation of short tandem repeats within and between species belonging to the *Canidae* family. – *Mammalian Genome* 6: 11-18.

Fumagalli L., Taberlet, P., Favre, L. & Hausser, J. (1996). Origin and evolution of homologous repeated sequences in the mitochondrial DNA control region of shrews. – *Mol. Biol. Evol.* 13: 31-46.

Luo, S., Valencia, C. A., Zhang, J., Lee, N. C., Slone, J., Gui, B., Wang, X., Li, Z., Dell, S., Brown, J., Chen, S. M., Chien, Y. H., Hwu, W. L., Fan, P. C., Wong, L. J., Atwal, P. S. & Huang, T. (2018). Biparental Inheritance of Mitochondrial DNA in Humans. – *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 115: 13039-13044.

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

Neff, M. W., Broman, K. W., Mellersh, C. S., Ray, K., Acland, G. M., Aguirre, G. D., Ziegler, J. S., Ostrander, E. A. & Rine, J. (1999). A Second-Generation Genetic Linkage Map of the Domestic Dog, *Canis familiaris*. – *Genetics* 151: 803-820.

Rius, R., Cowley, M.J., Riley, L., Puttick, C., Thorburn, D.R., Christodoulou, J. (2019) Biparental inheritance of mitochondrial DNA in humans is not a common phenomenon. – *Genet. Med.* 21: 2823-2826.

Seddon, J. (2005). Canid-specific primers for molecular sexing using tissue or non-invasive samples. – *Conservation Genetics* 6: 147-149.

Shibuya, H., Collins, B. K., Huang, T. H. M. & Johnson, G. S. (1994). A polymorphic (AGGAAT), tandem repeat in an intron of the canine von Willebrand factor gene. – *Animal Genetics* 25: 122.

Sunde, P. & Olsen, K. (2018). Ulve (*Canis lupus*) i Danmark 2012-2017. Oversigt og analyse af tilgængelig bestandsinformation. – Videnskabelig rapport fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, Aarhus Universitet, nr. 258. 52 sider. <http://dce2.au.dk/pub/SR258.pdf>

Taberlet, P. & Bouvet, J. (1994). Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography, and conservation genetics of the brown bear *Ursus arctos* in Europe. - Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 255: 195-200.