



Naturstyrelsen

Biodiversitet og arter

Haraldsgade 53

2100 København Ø

NOTAT

vedr. **genetisk analyse af det ulvelignende individ fra Thy november 2012**

Liselotte Wesley Andersen, seniorforsker, Morten Elmeros, seniorrådgiver & Aksel Bo Madsen, seniorforsker,

Institut for Bioscience, Aarhus Universitet, Grenåvej 14, 8410 Rønne

### **Baggrund**

#### **Udbredelse**

Ulv (*Canis lupus*) har i historisk tid været udbredt over hele det europæiske kontinent. De har været top-prædatorer og har spillet en stor rolle i at opretholde naturlige økosystemers funktion og struktur ved at regulere plante-planteæder interaktioner og de mellemstore rovdyr (Randi 2011, Elmhagen & Rushton 2007). De blev udryddet i stort set hele vest Europa i løbet af det 18. og 19. århundrede og overlevede kun i fragmenterede bestande på den iberiske halvø og Italien samt i det østlige Europa. I Danmark blev den sidste ulv skudt i 1813 (Jensen 1993, [www.nst.dk](http://www.nst.dk)). I dag har den europæiske ulv rekoloniseret store dele af Europa (Spanien, Italien, Frankrig, Polen, Tyskland, Finland, Sverige) takket være retslig beskyttelse i de forskellige lande samtidig med, at bestandene af de store planteædere kommer tilbage til deres mere oprindelige størrelser (Randi 2011). I Tyskland indvandrede ulven i 2000 fra Polen (Wagner et al. 2012) og har siden bredt sig til Schleswig-Holstein, hvor der senest blev rapporteret ulv i juli 2012.

#### **Ulv-hund slægtskab og hybridisering**

Ulv og hund er de tættest beslægtede arter af de store rovdyr (carnivorer) og kan uden problemer hybridisere og få fertilt afkom (Vilá & Wayne 1999). De er hidtil betragtet som to underarter, men nyere genetisk forskning har vist, at de er signifikant genetisk forskellige (vonHoldt et al. 2012). Hundeavlere og især nordamerikanske kulturer har gennem tiden benyttet at krydse udvalgte hunderacer med ulv for at få "nyt blod". En sådan hybridisering mellem de to arter er også forekommet i historisk tid. Naturlig hybridisering mellem arterne forekommer især nær menneskelig bebyggelse, hvor der er en stor tæthed af hunde og mere sporadisk forekomst af ulve

(Vilá & Wayne 1999). Faktisk har der været anekdotiske opfattelser af, at den europæiske ulv hovedsagelig bestod af hybrider mellem ulv og hund (Butler 1994).

Et genetisk resultat af frem og tilbagekrydsninger mellem ulve og hunde er forekomsten af sort pelsfarve hos ulve. Denne har vist sig at være fremkommet gennem en ny mutation hos hunde og er senere blevet overført til ulv, et ret enestående eksempel på en mutation der er fremkommet under domestiseringen fra ulv til hund og ført tilbage til den vilde stamfader (Wayne & vonHoldt 2012). Det viser sig, at sorte ulve har en højere overlevelse end de grå ulve, hvilket måske skyldes, at den klasse af gener, der er ansvarlig for den sorte pelsfarve, har en immunrespons virkning, som bevirker, at de sorte ulve er mere modstandsdygtige overfor sygdomme (Wayne & von Holdt 2012).

I dag findes både arkæologiske og genetiske beviser på, at ulven blev domesticeret i Europa omkring 10000-31000 år siden i tiden, hvor mennesket hovedsagelig var jægere og samlere (Germonpré et al. 2009). Tidlige genetiske undersøgelser baseret på mitokondrie DNA har vist, at hybridisering i naturen forekommer mindre hyppigt end tidligere antaget (Vilá & Wayne 1999). Mens nyere genetisk forskning baseret på flere variable genetiske markører (SNP's) har vist, at der kan findes ulve med hunde-afstamning (dvs der kan findes hunde-gener i ulvens genom) i vilde ulve bestande (vonHoldt et al. 2011).

### **Artsbestemmelse ved hjælp af DNA**

Der er imidlertid et problem forbundet med brugen af mitokondrie DNA til påvisning af hybridisering. Mitokondriet er maternelt nedarvet, hvilket betyder, at det kun er det hunlige mitokondrie, der påvises ved en undersøgelse. F.eks. vil man ved en krydsning mellem en ulvetæve og en hanhund umiddelbart tro at individet er en ulv, da det er ulvens mitokondrie DNA, man vil observere og vise versa hvis det er en krydsning mellem en hundetæve og en han ulv. Den fænotypiske karakter vil minde om en ulv, men givet de tidligere beskrevne ind krydsninger af ulv i hunderacer er det vanskeligt at afskrive muligheden for, at det pågældende individ er en hybrid. Ligeledes har det været vanskeligt at påvise hybrider, hvor hybridiseringen er foregået flere generationer tilbage i tiden (F2 eller F3) i et stamtræ. Det er i dag muligt at kunne spore sådanne momentvise hybridiseringer i tidligere generationer takket være udviklingen af tusindvis af nye genetiske markører, der er spredt over hele hunde-genomet (en hunde SNP-chip). En sådan hunde SNP-chip kan adskille de fleste hunderacer genetisk, og den kan også benyttes til at adskille hund og ulv (Wayne & vonHoldt 2012) eller identificere hunde-gener hos ulv og vise versa. Sådanne analyser kan bruges til at teste, hvor der er mistanke om ulovlige hybridiseringer mellem ulv og hund og i forbindelse med arts-identifikation af uidentificerbare kadavere eller, hvor der er usikkerhed omkring arten pga fund af et ulvelignende-individ i et område, hvor der normalt ikke forekommer ulve, som tilfældet i Danmark.

### **Observationer af ulvelignende individ i Thy**

Der har ikke været observeret ulv i Danmark de sidste 199 år, så indløbne meldinger om observationer af ulv i Nationalpark Thy i 2011-2012 blev modtaget med naturlig skepsis. Der blev sat kameraer op rundt omkring i reservatet af Naturstyrelsen og Mogens Trolle fra Statens

Naturhistoriske Museum med udlagt lokkemad for at få billeder af det observerede ulvelignende dyr. Det lykkedes ikke, men i november 2012 blev det ulvelignende dyr fundet død i Nationalpark Thy.

## **Materiale og metoder**

Der blev foretaget en obduktion af individet på DTU-veterinær Institutet i København, hvor der blev udtaget muskelvæv til DNA-analyser. DNA-analysen blev udført af Institut for Bioscience, Aarhus Universitet i samarbejde med Aros Applied Biotechnology, Aarhus. DNA blev ekstraheret ved almindelig CTAB ekstraktion (Andersen et al. 2004). Selve metoden, der blev valgt til artsidentifikation af individet, er baseret på ovenfor nævnte hunde SNP-chip (Canine HD BeadChip microarray fra Illumina (Illumina, Inc., San Diego, California, USA)). Chippen er benyttet af Wayne & vonHoldt (2012) til at analysere det evolutionære slægtskab mellem ulv og hund og selve domesticeringen af hunden. Metoden kan fastslå om individet er en hund, en ulv eller en hybrid, når der foreligger et datasæt, der indeholder hunde, ulve og helst europæiske ulve samt hybrider. Et sådant analyseret datasæt blev stillet til rådighed af professor Cino Pertoldi, Ålborg Universitet samt kolleger. Datasættet indeholdt 13 polske ulve, 13 italienske hunde og 3 hybrider, og der var ligeledes udvalgt et antal SNP-markører fra hunde-chippen (27353 i alt), der bedst kunne adskille ulv, hund og hybrider genetisk. Ud over det ene danske individ blev der inkluderet 9 tyske ulve samt en tysk ulv-hund hybrid. Disse blev leveret af Dr. Carsten Nowak fra Senckenberg Forschungsstation, Freiburg, Tyskland, der foretager genetiske analyser af tyske ulve.

De genetiske parametre som observeret og forventet heterozygositet, antal polymorfe SNP'er og afvigelser fra Hardy-Weinberg forventningerne blev analyseret i PLINK (Purcell et al. 2007) (Tabel 1). Det genetiske slægtskab blev analyseret ved hjælp af Principal Component Analyse (PCA) i Adegenet-pakken i R 2.15.1 (Jombart T (2008)) (R development Core Team 2012)(Fig. 1) samt parvist mellem individerne baseret på antal af alleler fra de forskellige SNP's, de deler (Ape-pakken, Paradis et al. (2004) R 2.15.1 (R development Core Team 2012)) illustreret i et neighbour-joining træ (Fig. 2)

## **Ulv eller hund?**

Af de udvalgte 27353 SNP's var hovedparten variable i de analyserede hunde sammenlignet med både de polske og tyske ulve (Tabel 1) (højere heterozygositet og antal polymorfe SNPs). Dette var forventeligt grundet at SNP-chippen er udviklet til hunde. Forskellen i variationen mellem de polske og tyske ulve skyldes sandsynligvis, at de tyske ulve er udvandrede polske ulve (foundere) og dermed kun repræsenterer en del af den variation der findes i de polske ulve.

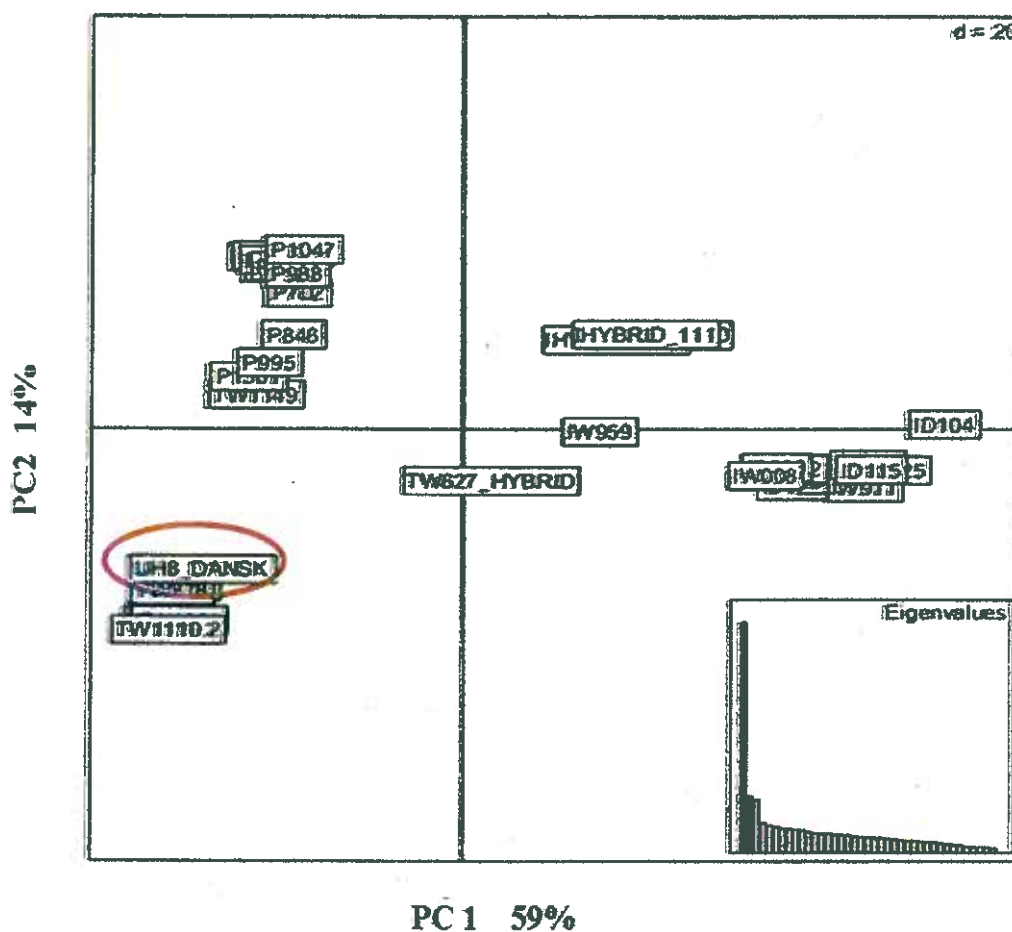
Tabel 1. Basis genetiske parametre for de 27353 autosomale SNP's fra CanineHD BeadChip microarrayen fra Illumina.

N= antal prøver, Ho = observerede heterozygositet, He= forventede heterozygositet,  
HWE= antal SNP's der afviger signifikant fra Hardy-Weinberg forventningerne  
Polymorfe SNP's= procentvise polymorfe SNP's med allelefrekvens > 0.95 af de 27353 SNP's

Land	N	Ho	He	HWE	Polymorfe SNP's
Tyske ulve	9	0,187 ±0,27	0,159±0,14	0	47%
Polske ulve	13	0,223±0,18	0,222±0,15	10	68%
Italienske hunde	13	0,309±0,17	0,325±0,14	16	92%

Slægtskabs-analysen der bedst illustrerer hvor genetisk forskellige de forskellige individer er og dermed også hvorvidt det danske individ er en ulv eller en hund er PCA-analysen (Fig. 1). Som det meget klar fremgår af PCA analysen, er det danske individ en ulv, der er grupperes blandt de tyske ulve. Det fremgår også, at den tyske hybrid ligger midt mellem de italienske hunde og tyske ulve. Det er også tydeligt, at alle 3 grupper er genetisk adskilte. Dette er lidt overraskende, da det hidtil har været vanskeligt at tolke den genetiske populationsstruktur hos de europæiske ulve. Resultatet af analysen tyder på, at de polske og tyske ulve tilsyneladende er genetisk forskellige på trods af, at de tyske er indvandrede polske ulve. Dette er formodentlig en effekt dels af at det er få individer der indvandrede (founder-effekt) og så den efterfølgende effekt af at det er en lille bestand (genetisk drift).

Figur 1. Principal component analyse af de polske ulve (P), italienske hunde (I), tyske ulve (T), hybrider (IHYBRID= italienske hund- ulv hybrider, TW627\_ HYBRID= tysk hund-ulv hybrid) samt det danske individ UH48\_DANSK baseret på 27353 SNP genotype data.

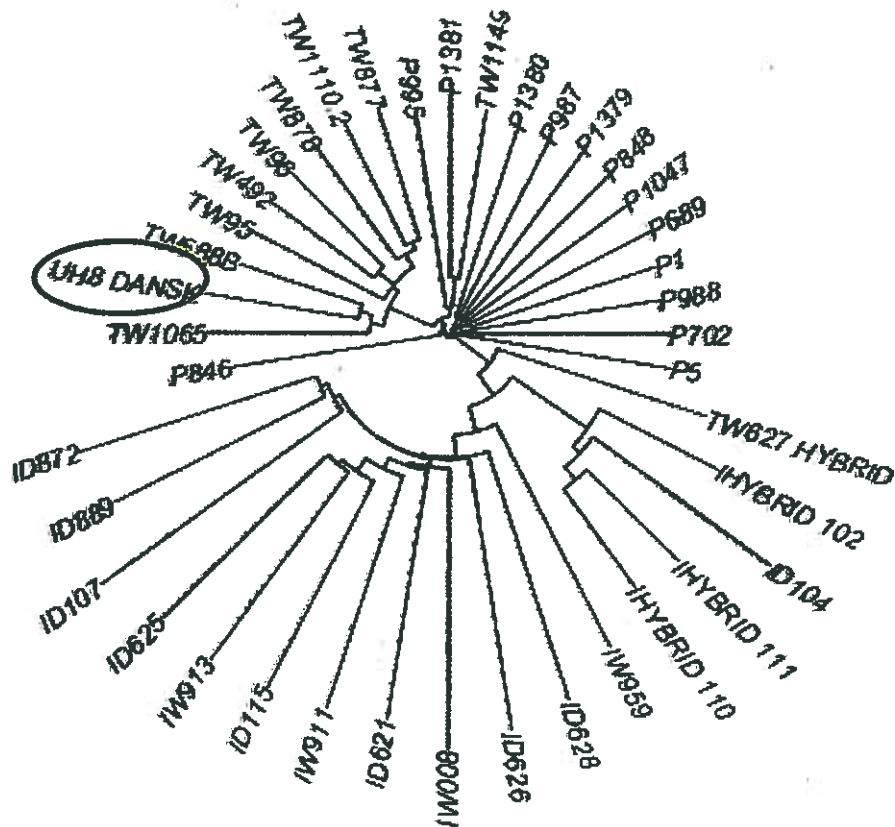


For bedre at illustrere det individuelle slægtskab baseret på antal alleler fra de 27353 SNP's, der deles, er der konstrueret et neighbour -joining træ (Fig. 2). Det danske individ UH8\_ DANSK grupperes mellem de tyske ulve og understøtter klart konklusionen fra PCA analysen, at det er en tysk ulv. Det fremgår også af træet, at de tyske ulve er tæt beslægtet med de polske som forventet. En af de tyske ulve TW1149 grupperes blandt de polske ulve hvilket kunne tyde på at dette individ er et dyr som er indvandret for nylig hvilket understreger den tætte forbindelse mellem tyske og polske ulve.

På baggrund af den valgte analyse metode kan det med sikkerhed konkluderes, at det undersøgte individ er en tysk ulv.

Figur 2. Træ der viser den genetiske identitet mellem de 13 polske ulve (P), 13 italienske hunde (I), hybrider samt 9 tyske ulve og det danske individ baseret på 27353 SNP genotype data.

## Genetiske slægtskab mellem ulve, ulve-hunde og hunde



### Tak til samarbejdspartnere

En stor takt til alle involverede parter især til professor Cino Pertoldi, Dr. Astrid Vik Stronen og samarbejdspartnere for adgang til datasættet, til Aros Applied Biotechnology for hjælp med laboratorie-analyser og til Dr. Carsten Nowak for adgang til DNA fra tyske ulve.

### Referencer

Butler D (1994) Bid to protect wolves from genetic pollution. *Nature* 370,497.

Elmhagen B & Rushton SP (2007) Trophic control of mesopredators in terrestrial ecosystems: top-down or bottom-up? – *Ecol Lett* 10, 197-206.

Germonpré M, Sablin MV, Stevens RE, Hedges REM, Hofreiter M, Stiller M, Després VR (2009) Fossil dogs and wolves from Palaeolithic sites in Belgium, the Ukraine and Russia: osteometry, ancient DNA and stable isotopes. *Journal of Archaeological Science* 36, 473-490.

Illumina (2010) GenomeStudio™ Genotyping Module v1.0 User Guide. An integrated platform for data visualization and analysis.

Jensen, B (1993) Nordens Pattedyr. Gads Forlag, pp 325.

Jombart T (2008) Aadeget: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Biochemical Genetics* 10, 149-163.

Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas K, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ, Sham PC (2007) PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based lineage analyses. *American J Hum Gen* 81, 559-575.

R Development Core Team (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>.

Randi E (2011) Genetics and conservation of wolves *Canis lupus* in Europe. *Mammalian Review* vol 41, 99-111.

Paradis E, Claude J, Strimmer K (2004) APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, 20, 289–290.

Vilá C, Wayne RK (1999) Hybridization between wolves and dogs. *Conserv Biol* 13(1):195–198

vonHoldt BM, Pollinger JP, Earl DA, Parker HG, Ostrander EA, Wayne RK, (2012) Identification of recent hybridization between gray wolves and domesticated dogs by SNP genotyping. *Mamm. Genome* DOI 10.1007/s00335-012-9432-0.

Wagner C, Holzapfel M, Kluth G, Reinhard I, Ansorge H (2012) Wolf (*Canis lupus*) feeding habits during the first eight years of its occurrence in Germany. *Mammalian Biology* 77, 196–203

Wayne RK, vonHoldt BM (2012) Evolutionary genomics of dog domestication. *Mamm. Genome* 21, 3-18.

