



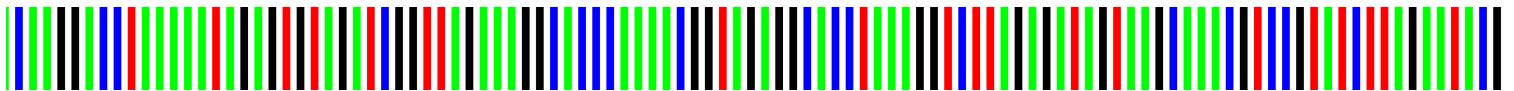
Naturhistoriska
riksmuseet

RAPPORT

Datum
2018-06-26

Dnr
4.1-17-2017

1(8)



Centrum för genetisk identifiering
**Teknisk rapport – Björnspillningsinventering
2017**

Naturhistoriska riksmuseet

Postadress:
Box 50007
104 05 Stockholm

Besöksadress:
Frescativägen 40
114 18 Stockholm

Telefon: 08-519 540 00
Telefax: 08-519 540 85
registrator@nrm.se

Sammanfattning

För genetisk analys av spillningsinventering av björn 2017 i det södra utbredningsområdet har samma metodik använts som vid tidigare björns spillningsinventeringar i Sverige och Norge. Det innebär samma antal markörer och identiska markörer, små skillnader i protokoll kan dock förekomma. Proverna har mottagits från Viltskadecenter (VSC). Proverna har genotypats på Naturhistoriska riksmuseet (NRM) och matchats mot databasen vid NIBIO i Norge och databasen vid NRM. Resultaten har importerats till Rovbase. Spillningsprover och DNA-extrakt lagras vid NRM och är *open access*.

Totalt har 3250 prover levererats och registrerats. Antal prover som har analyserats och importerats till Rovbase är 3238 stycken. Antalet konstaterade individer är 642 stycken. Andelen prover med björn-DNA är 84 % och andelen individbestämda prover är 66 %.

Metodik

Registrering av prover

Alla inkomna prover har skannats och getts ett unikt labnummer. De skannade streckkoderna och tillhörande labnummer har sparats i en lokal databas. Totalt innehåller databasen 3250 poster.

Provtagning

Från varje inkommet prov provtogs ca 200 mg spillning. Spillningsprovet lades i InhibitEX-buffert (Qiagen) tills vidare analys. Resterande delen av provet har lagrats i Miljöprovbanken. Proven kommer att sparas till nästa omdrev eller som längst i 10 år.

Extraktion av DNA

DNA-extraktion har skett i laboratorium dedikerat för analys av degraderade prover. Prover har extraherats i batcher om 80 st plus ett blankprov. Blankprov har inkluderats för att möjliggöra spårbarhet. Spårbarhet är viktig för att spåra eventuell kontamination eller andra oregelbundenheter som kräver utredning. Prover har extraherats med QiAamp® Fast DNA Stool Mini kit (Qiagen) enligt tillverkarens instruktioner.

Screening

Alla inkomna prover har screenats för förekomst av björn-DNA. Den artspecifika markören MU51 har körts tillsammans med könsbestämningsmarkören SE47/R143_modif (tabell 1). F är forward-primer och R är reverse-primer. Primrar avgränsar det fragment som ska amplifieras. Den ursprungliga primern R143 för könsbestämning gav ganska mycket bakgrundssignal som störde analysen. En något modifierad version (R143_modif) utvecklades och fungerade tillfredsställande.

Tabell 1. Detaljer om primrar som använts vid screening.

Namn	Sekvens (5' till 3')	Inmärkning	Kommentar
MU51_F	GCCAGAATCCTAAGAGACCT	6FAM	Specifik för björn
MU51_R	GTTTCTTGAAAGGTTAGATGGAAGAGATG		Specifik för björn
SE47 R143	CAGCCAAACCTCCCTCTGC AGGTGGCTGTGGCGGCA	PET	Könsbestämning Könsbestämning, ursprunglig reverse-primer
R143_modif	AGGTGGCTGTGGTGGCAG		Könsbestämning, ny reverse-primer

Genotypning

Metodik för genotypning följer till stora delar Andreassen et al (2012). Åtta autosomala mikrosatellit-loci har använts i analysen. Dessa är MU05, MU09, MU10, MU23, MU50, MU51, MU59 och G10L. Loci har PCR-amplifierats i två tetraplexer (tabell 2), dvs de åtta mikrosatellit-loci delats upp i två grupper med fyra loci (tetraplex) i varje grupp. Qiagen Multiplex PCR® kit har använts för amplifiering enligt tillverkarens instruktioner. Varje PCR

har gjorts i 10 µl-volymer och innehållit: 5 µl Mastermix, 1 µl primermix, 2 µl H₂O och 2 µl templat. Primermixer (tetraplex 1 och tetraplex 2, tabell 2) har innehållit: tetraplex 1, MU09_F/R 0,2 µM, MU10_F/R 0,1 µM, MU23_F/R 0,08 µM, MU05_F/R 0,1 µM, tetraplex 2, MU50_F/R 0,2 µM, MU51_F/R 0,1 µM, G10L_F/R 0,08 µM, MU59_F/R 0,8 µM.

PCR-cykel har varit:

Steg 1 Initial denaturering	95°C	15 mins
Steg 2 Denaturering	94°C	30 sec
Steg 3 Annealing	58°C	1 min 30 sec
Steg 4 Extension	72°C	1 min
Steg 5 Till steg 2, totalt	35 cykler	
Steg 6 Extension	60°C	30 mins

Tabell 2. Detaljer om primrar som använts vid genotypning.

Namn	Sekvens (5'till 3')	Inmärkning	Kommentar
G10L_F	CAGGACAGGATATTGACATTGA	VIC	Tetraplex 2
G10L_R	GATACAGAAACCTACCCATGCG		
MU10_F	TTCAGATTCATCAGTTTGAC	VIC	Tetraplex 1
MU10_R	TTTGATCTTGGTTGTCAGC		
MU23_F	GCCTGTGTGCTATTTTATCC	NED	Tetraplex 1
MU23_R	GTTCTTTTGCTTGCCAGACCACC		
MU51_F	GCCAGAATCCTAAGAGACCT	6FAM	Tetraplex 2
MU51_R	GTTCTTGAAAGGTTAGATGGAAGAGATG		
MU59_F	GCTGCTTTGGGACATTGTAA	6FAM	Tetraplex 2
MU59_R	GTTCTTCAATCAGGCATGGGGAAGAA		
MU50_F	GTCTCTGTCATTTCCCATC	PET	Tetraplex 2
MU50_R	GAGCAGGAAACATGTAAGATG		
MU05_F	ATGTGGATACAGTGAATAGACC	NED	Tetraplex 1
MU05_R	GTTCTTGTGACATGAACTGAACTTGTAT		
MU09_F	GCCAGCATGTGGGTATATGTGT	6FAM	Tetraplex 1
MU09_R	GTTCTTAGCAGCATATTTTGGCTTGAAT		

Resultat och diskussion

Deskriptiv statistik

Deskriptiv statistik för populationen har gjorts med mjukvaran GenAIEx 6.5 (Peakall and Smouse, 2012).

Av 3238 analyserade prover konstaterades björn-DNA i 2735 prover (84 %; tabell 3). Det erhöles individbestämde genotypdata för 2138 prover (66 %; tabell 3). Antalet unika björnar var 642 stycken (tabell 4). För 503 prover (16 %) kunde inte björn-DNA detekteras, anledningar till detta är främst att spillningen inte kommer från björn eller att DNA i provet var alltför degraderat för analys. För 597 prover som innehöll björn-DNA gick det inte att få fram en komplett genetisk profil. Anledningen är dålig DNA-kvalité.

Tabell 3. Björnsplinningsprover från södra utbredningsområdet 2017. Även från Norrbotten, Jämtland och Västernorrland kom det in prover, vilka togs med i analyserna. Av proverna insamlade i Dalarna är 13 st insamlade 2016 (se bilaga 1 för detaljer).

	Totalt	Gävleborg	Dalarna	Värmland	Västmanland	Uppsala	Örebro	Stockholm	Jämtland	Norrbotten	Västernorrland
Antal prover	3238	2016	1117	56	11	15	8	7	6	1	1
Antal insamlare	1390	847	503	32	10	15	6	7	5	1	1
Prover med björn-DNA	2735	1718	942	43	10	9	4	2	6	0	1
Individbestämda prover	2138	1329	765	32	3	0	2	0	6	0	1
Prov utan björn-DNA	503	298	175	13	1	6	4	5	0	1	0
Av de inskickade proverna											
% prover med björn-DNA	84%	85%	84%	77%	91%	60%	50%	29%	100%	0%	100%
% prover individbestämda	66%	66%	68%	57%	27%	0%	25%	0%	100%	0%	100%

Tabell 4. Individbestämda prover separerade på kön och län. Även från Norrbotten, Jämtland och Västernorrland kom det in några prover.

	Totalt	Gävleborg	Dalarna	Värmland	Västmanland	Uppsala	Örebro	Stockholm	Jämtland	Norrbotten	Västernorrland
Konstaterade individer	642	373	252	11	1	0	2	0	2	0	1
Individer som redan var kända	190	96	86	4	1	0	0	0	2	0	1
Antal honor	376	212	160	2	0	0	0	0	2	0	0
Antal hanar	264	160	91	9	1	0	2	0	0	0	1
Antal okända kön	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Könskvot (♂/♀)	1.43	1.33	1.76	0.22	0	0	0	0	0	0	0
Högsta återfynd	29	23	29	6	2	0	1	0	2	0	1
Prov per hane	3.34	3.46	2.86	2.5	0	0	0	0	1.25	0	0
Prov per hona	3.32	3.31	3.04	2.45	1.5	0	1	0	1	0	1
Prov per individ	3.33	3.4	2.92	2.46	1.5	0	1	0	1.2	0	1

Totalt innehöll datasetet 642 unika björnindivider (tabell 4). Antalet alleler för de olika loci varierade mellan 6 och 10 och observerad heterozygoti mellan 0,642 och 0,797 (tabell 5). Heterozygoti-värdena är i paritet eller något högre än de som rapporterats tidigare för svenska björnar (Andreassen *et al.*, 2012). Den observerade heterozygotin är något högre än den förväntade, men skillnaderna är små, vilket innebär att det inte finns anledning att tro att parningsstrukturen avviker från slumpmässig parning.

Tabell 5. Deskriptiv statistik för de åtta mikrosatellit-loci där N är antal prover, Na är antal olika alleler, Ho är observerad heterozygoti och He är förväntad heterozygoti.

	MU05	MU09	MU10	MU23	MU50	MU51	MU59	G10L	$\bar{x} \pm SE$
N	640	641	632	640	641	638	633	639	638±1,25
Na	6.0	10.0	7.0	8.0	7.0	10.0	9.0	7.0	8,0±0,54
Ho	0.642	0.752	0.797	0.756	0.789	0.784	0.733	0.768	0.753±0,018
He	0.645	0.734	0.808	0.738	0.764	0.795	0.712	0.750	0,743±0,018

De prover som gick att genotypa för 6-8 loci har använts för individbestämning. Prover där 1-5 loci har gett resultat har bedömts som björn, men ej använts för individbestämning. Tabell 6 visar sannolikheter för att individer har samma genotyp och tabell 7 visar sannolikheter för att syskon har samma genotyp.

Tabell 6. Sannolikhet att två individer har samma genotyp för ökande antal loci.

Antal loci	1	1+2	1+2+3	1+2+3+4	1+2+3..5	1+2+3..6	1+2+3..7	1+2+3..8
	1.1E-01	6.9E-03	1.3E-03	1.3E-04	9.7E-06	1.3E-06	1.3E-07	1.2E-08

Tabell 7. Sannolikhet att syskon har samma genotyp för ökande antal loci.

Antal loci	1	1+2	1+2+3	1+2+3+4	1+2+3..5	1+2+3..6	1+2+3..7	1+2+3..8
	4.1E-01	1.5E-01	7.1E-02	2.9E-02	1.1E-02	4.5E-03	1.8E-03	7.1E-04

Återfynd

Det högsta antal återfyndet av en björn är 29 st (tabell 4). Antalet återfynd per individ totalt är 3,3. För populationsberäkningar är det önskvärt med en återfyndsfrekvens över 3. Generellt är återfyndsfrekvensen jämn för könen (tabell 4).

Könskvot

Könskvoten var skev med ett överskott av honor (tabell 4). Återfyndsfrekvensen är jämn för hanar och honor trots att det finns ett överskott av honor i populationen.

Import till Rovbase

Totalt har 3238 poster importerats till Rovbase (bilaga 1).

Matchning

Matchning av unika genotyper mot den genetiska databasen gav 190 träffar på björnar som tidigare analyserats. Av dessa har 177 st individID och är registrerade och sökbara publikt i Rovbase (bilaga 1). Ytterligare 12 st björnar som är kända sedan tidigare var forskningsbjörnar dessutom fanns en björn med som är känd sedan tidigare men inte registrerad i Rovbase. Dessa 13 individer har inte individID och redovisas inte som ”Återfynd” i bilagan.

Lagring

Spillningsproverna lagras frysta (-20°C) till dess nästa björnspillningsinventering genomförs i Norrbotten eller som längst i 10 år. DNA-extrakt av spillningarna bevaras frysta (-20°C) och samlingsförs hos Naturhistoriska riksmuseet. Varje DNA-extrakt har ett accessionsnummer, se kolumn ”Referenstext” i bilaga 1. Resultat av genotypning sparas i en lokal databas hos Naturhistoriska riksmuseet. Prover och data är ”open access” vilket innebär att provmaterial och data lämnas ut efter ansökan och när beställaren (Naturvårdsverket) informerats.

Niclas Gyllenstrand

Intendent

Referenser

Andreassen, R., Schregel, J., Kopatz, a., Tobiassen, C., Knappskog, P. M., Hagen, S. B., Kleven, O., Schneider, M., Kojola, I., Aspi, J., Rykov, a., Tirronen, K. F., Danilov, P. I. and Eiken, H. G. (2012) ‘A forensic DNA profiling system for Northern European brown bears (*Ursus arctos*)’, *Forensic Science International: Genetics*. Elsevier Ireland Ltd, 6(6), pp. 798–809. doi: 10.1016/j.fsigen.2012.03.002.

Peakall, R. and Smouse, P. E. (2012) ‘GenAlEx 6 . 5 : genetic analysis in Excel . Population genetic software for teaching and research — an update’, 28(19), pp. 2537–2539. doi: 10.1093/bioinformatics/bts460.