

DNA-analyser og beskrivelse af den Centraleuropæiske ulvebestand, herunder identifikation af ulve og ulvehybrider

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

Dato: 24. januar 2019

Kent Olsen¹, Peter Sunde², Michael Møller Hansen², Philip Francis Thomsen² og Anders Johannes Hansen³

¹Naturhistorisk Museum, Aarhus

²Institut for Bioscience, Aarhus Universitet

³Sektion for GeoGenetik, Biologisk Institut, Københavns Universitet

Rekvirent:
Miljøstyrelsen
Antal sider: 15

Faglig kommentering:
Aksel Bo Madsen
Kvalitetssikring, centret:
Jesper R. Fredshavn

Indhold

Baggrund	3
Metode	3
Besvarelse af de konkrete spørgsmål fra Miljøstyrelsen	5
Spørgsmål a	5
Spørgsmål b	7
Spørgsmål c	9
Spørgsmål d	11
Referencer	12

Baggrund

Gennem den seneste tid har der i medierne været fremsat tvivl om hvorvidt de danske ulve er genetisk rene ulve og ikke hybrider mellem ulv og hund. For at skabe klarhed om dette spørgsmål har Miljøstyrelsen den 11. januar 2019 fremsendt en bestilling til Nationalt Center for Miljø og Energi (DCE) om et notat, som redegør for DNA-analysers betydning i forbindelse med beskrivelsen af den Centraleuropæiske ulvebestand, herunder analysernes betydning i forbindelse med identifikation af ulve og ulvehybrider.

I notatet skal Nationalt Center for Miljø og Energi (DCE) besvare følgende spørgsmål:

- *Hvad betyder det, at den Centraleuropæiske ulvebestand er oplyst at være en velbeskrevet og en ren ulvebestand uden indblanding fra hund?*
- *Er der DNA fra hund i de ulve, som er omfattet af EU's habitatdirektiv?*
- *Hvad viser hhv. en fuld genomsekventering og de DNA-analyser til arts- og individniveau der er foretaget af de danske ulve på det tyske Senckenberg institut?*
- *I hvor stort omfang forekommer der ulvehybrider i den Centraleuropæiske ulvebestand?*

Miljøstyrelsen har ønsket, at notatet så vidt muligt er beskrevet så det er forståeligt for lægmand.

Metode

Som en forudsætning for at kunne besvare flere af spørgsmålene, skitseres her nogle af de metodiske procedurer for det genetiske arbejde under hvilken den nationale monitoring af ulv under Miljøstyrelsen foregår.

DNA-analyser til arts- og individniveau

Diversiteten i haplotyper (varianter af mitokondrie-DNA) i den Centraleuropæiske lavlandsbestand af ulv er meget begrænset med kun to varianter, hvor haplotype HW01 er den fremtrædende og vidt udbredte, mens haplotype HW02 er langt mere sjælden (Czarnomska m.fl. 2013). Begge typer er registreret hos ulveindivider i Danmark (Sunde & Olsen 2018). I andre europæiske ulvebestande er diversiteten større, og der kendes flere andre haplotyper end HW01 og HW02. Men i forhold til Danmark har det begrænsede antal haplotyper en betydning, da hunde har en række haplotyper, der ikke forekommer i den Centraleuropæiske lavlandsbestand af ulv. Viden om de enkelte danskregistrerede ulveindividers haplotype indgår derfor i den genetiske overvågning, da det kan understøtte artsbestemmelsen. I tilfælde hvor DNA-analyser foretaget på baggrund af spytprøver fra byttedyr har vist "hund", har en samtidig forekomst af haplotype HW04, der ikke forekommer i den Centraleuropæiske lavlandsbestand af ulv, således kunne understøtte artsbestemmelsen til hund (Olsen & Sunde 2018b). Det skal dog tages i betragtning, at eksempelvis en hybrid med en hund som mor og en ulv som far vil udvise en haplotype karakteristisk for hunde, og omvendt vil en hybrid med en ulv som mor og en hund som far udvise en haplotype karakteristisk for ulv. Derfor kan mitokondrie-DNA ikke i sig selv bruges til at identificere hybrider. Dette kræver analyse af kerne-DNA.

Overordnet set er der i alle pattedyrceller to typer af DNA: DNA fra cellens mitokondrier (mtDNA) i tusindvis af kopier per celle og DNA fra cellekernen i kun én kopi i hver enkelt celle. Kerne-DNA nedarves fra begge forældre og hvert kromosom er således tilstede i 2 varianter – én fra hver forælder, mens mtDNA kun nedarves fra moderen.

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 i alt fire gentagelser (replikater). Hvis minimum to ud af de fire analyser viser ulv, accepteres prøven som værende fra ulv, med mindre de øvrige analyser antyder andre rovdyr eller hund. Grunden til at der kan være uoverensstemmelse mellem replikater skyldes bl.a., at der til tider detekteres DNA fra ulvens føde frem for ulven selv (Olsen m.fl. 2018a, b).

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 (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), som identificerer individer. Mikrosatellitter er korte DNA-sekvenser i kernegenomet bestående af motiver på ca. 2-6 basepar gentaget efter hinanden. Længden af hele mikrosatellitten varierer ofte mellem individer, og det er denne variation i længder på tværs af flere forskellige mikrosatellitmarkører, som anvendes til at identificere et ulve-individ.

Da det er de samme genetiske markører, som anvendes til analyse foretaget på Senckenberg Research Institutet i Tyskland og Institut for Bioscience 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. 2018a, b).

I Danmark er der aktuelt registreret 13 forskellige ulveindivider med kendt genotype, hvor syv er indvandret fra Tyskland og seks er danskfødte (Sunde & Olsen 2018, Olsen & Sunde 2018a, b, Olsen m.fl. 2018a, b). Her er det helt konkret den genetiske profil baseret på de 13 mikrosatellitmarkører, der har gjort det muligt, at kortlægge deres familiære tilhørsforhold i den Centraleuropæiske lavlandsbestand.

Med baggrund i en velbeskrevet bestand som den Centraleuropæiske lavlandsbestand, vurderes det, at de analyser, der anvendes i den national overvågning af ulv under Miljøstyrelsen er fyldestgørende med hensyn til at identificere kendte individer og deres slægtskabsforhold. Der er derfor ikke et fagligt behov for at benytte genomsekventering hver gang en genetisk analyse skal foretages på et fund af en formodet ulv i Danmark, og det vil endvidere gøre sagen yderligere kompliceret (men ikke umulig) at foretage sådanne analyser på basis af fækalioprøver. Her er de benyttede standarder tilstrækkelige med kravet til dokumentation i form af billeder, hvor ulvenes udseende kan vurderes, kombineret med den genetiske overvågning med DNA-analyser, der har til formål ikke kun at sikre en arts-, køn- og haplotype-bestemmelse, men vigtigere endnu og mere specifikt en individbestemmelse, der gør det muligt, at følge det enkelte individ og afdække dets familiære ophav.

Besvarelse af de konkrete spørgsmål fra Miljøstyrelsen

For at kunne imødekomme ønsket om at redegørelsen på samme tid skal være både fyldestgørende og forståelig for lægmand, har DCE valgt til hvert spørgsmål at levere et grundigt, fyldestgørende svar med forklaringer og et sammendragende, kort svar som redegør for essensen af det adspurgte.

Spørgsmål a

Hvad betyder det, at den Centraleuropæiske ulvebestand er oplyst at være en velbeskrevet og en ren ulvebestand?

I det følgende besvares spørgsmålet *'Hvorledes kan den Centraleuropæiske ulvebestand betragtes som velbeskrevet?'*. Spørgsmålet *"Kan den Centraleuropæiske ulvebestand betragtes som ren uden indblanding fra hund?"* er søgt besvaret under spørgsmål b

Svar

Den Centraleuropæiske lavlandsbestand af ulv (som alle hidtil identificerede ulve i Danmark har vist sig at tilhøre) er bestandsmæssigt en af verdens mest velbeskrevne og mest intenst overvågede ulvebestande. Dette skyldes at bestanden siden den blev etableret i det østlige Tyskland og vestlige Polen af immigranter fra den baltisk-østpolske bestand, har været genstand for systematisk genetisk overvågning fra myndighederne i de respektive lande og delstater. Den genetiske overvågning er især baseret på analyser af 13 forskellige genetiske markører (såkaldte autosomale mikrosatellitter¹) samt køns-markører (X og Y kromosom), som dels gør det muligt at identificere enkeltindivider ud fra deres unikke genetiske kombination, dels etablere slægtskabsforhold mellem individer (fx stamtræer) såvel som mellem bestande. Den genetiske overvågning af ulve er baseret på lignende videnskabelig teori og metode som benyttes af retsgenetikere til at identificere menneskers identitet og slægtskab ud fra DNA-profiler.

Da bestandsovervågning af ulve påhviler de respektive nationale eller regionale myndigheder (i Tyskland har hver delstat således sin egen ulveovervågning), varierer den grundighed og metodik hvormed ulveindivider registreres fra land til land og fra delstat til delstat. I de tyske delstater (og i Danmark) har man således som ambition at identificere alle ynglepar genetisk, hvilket betyder, at deres afkom senere vil kunne spores tilbage til deres forældre også selv om afkommets DNA-profil aldrig blev registreret i deres fødelev. I Polen gøres ikke samme indsats for at kortlægge alle ulvepars DNA-profiler. Dette betyder, at individer, som er født i Polen, ikke altid vil kunne spores tilbage til deres forældre og fødested. Det er dog fortsat muligt fra deres genetiske profil at fastslå hvilken bestand de stammer fra.

For at holde overblik over den samlede mængde DNA-fund fra det centraleuropæiske udbredelsesområde, har de pågældende landes ulveovervågnings-ansvarlige dannet et samarbejde (CEwolf 2019). Hjørnesteinen i dette samarbejde er en genetisk referencedatabase over ulve-individer fundet i det centraleuropæiske udbredelsesområde. Referencedatabasen har også dannet udgangspunkt for analyser af den Centraleuropæiske lavlandsbestands

¹ Genetiske markører er i dette tilfælde 'unyttige' DNA-sekvenser, som ikke koder for egenskaber, og derfor ikke er genstand for naturlig selektion. Disse DNA-sekvenser varierer tilfældigt mellem individer med forskellig oprindelse pga. mutationer i tidligere generationer.

slægtskab med Europas øvrige ulvebestande. Ud over at man i databasen vil kunne spore oprindelsen af enkeltindivider (etablere stamtræer), giver databasen mulighed for at opdage individer med fremmet ophav (fx ulve indvandret fra fremmede bestande eller individer med tydelig genetisk indblanding af hund), idet sådanne individer vil indeholde genetiske markører, som ikke er kendt fra bestanden i forvejen.

På basis af det ovenstående datamateriale er den genetiske variation i den Centraleuropæiske lavlandsbestand beskrevet og analyseret i videnskabelige publikationer, hvoraf det fremgår, at den regnes som en genetisk distinkt ulvebestand i lighed med alle øvrige beskrevne ulvebestande i Europa (Hulva m.fl. 2018). Ud fra de genetiske analyser har det været muligt at klarlægge, at de ulve, der grundlagde bestanden i det vestlige Polen og det østlige Tyskland i slutningen af 1990'erne, havde en genetisk oprindelse i den baltiske ulvebestand (Chapron m.fl. 2014), og at det lille antal ulve, der oprindeligt koloniserede grænseregionen mellem Tyskland og Polen, udsprang fra det nordøstlige Polen (Czarnomska m.fl. 2013).

Den centraleuropæiske ulvebestands udbredelsesområde strækker sig hovedsageligt over den vestlige del af Polen og Tyskland (Reinhardt m.fl. 2015) med enkelte nyere yngleforekomster i Tjekkiet (Hulva m.fl. 2018) og Danmark (Sunde & Olsen 2018). Strejfdyr fra bestanden er desuden blevet påvist i Holland og Belgien (Lelieveld m.fl. 2016). Bestanden er i fremgang (Kaczensky m.fl. 2013), men fordi den er grundlagt fra et forholdsvis lille antal ulve udvandret fra den Baltiske bestand, er bestandens genetiske diversitet begrænset (Hulva m.fl. 2018). Dette ses eksempelvis som en lav haplotype-diversitet (varianter af mitokondrie-DNA) i bestanden. De genetiske analyser viser ligeledes, at der kun i et begrænset omfang sker genetisk udveksling mellem denne Centraleuropæiske lavlandsbestand og den Baltiske bestand, og at der er genetisk forskel mellem de to bestande til trods for at den Centraleuropæiske lavlandsbestand er grundlagt ud fra individer fra den Baltiske bestand og de derfor oprindeligt har været nært beslægtet (Andersen m.fl. 2015, Chapron m.fl. 2014, Czarnomska m.fl. 2013).

Siden den første rapporterede reproduktion i Tyskland fandt sted i Lausitz nær den tysk-polske grænse i 2000 (Reinhardt m.fl. 2015), er bestanden i henhold til den seneste opgørelse steget til 780-1030 ulve (Linnell & Cretois 2018). Eftersom den genetiske overvågning indledtes tidligt i bestandens etablering, har det været muligt at opbygge et stamtræ, der går tilbage til de ulve, der oprindeligt grundlagde bestanden, og hvor nye enkeltindivider er blevet tilføjet efterhånden som bestanden er vokset og individers indbyrdes slægtskab er blevet genetisk kortlagt. Et arbejde, der er fortløbende og grundet det internationale samarbejde gør det muligt, at individbestemte ulve i Danmark kan matches i forhold til profiler i referencedatabasen.

Sammenfattende svar: Som redegjort ovenfor, må den Centraleuropæiske lavlandsbestand af ulv betegnes som godt kortlagt, både hvad angår dens oprindelse (Baltikum), etableringshistorie, udbredelse, udvikling og de fleste individers indbyrdes slægtskab. Bestanden må overordnet set betegnes som velovervåget med henblik på at monitorere bestanden. Selv om den genetiske monitoring er tilrettelagt efter at monitorere bestandens indbyrdes slægtsforhold frem for at spore eventuelle hybrider eller tilbagekrydsede individer, vil første-generations-hybrider, sandsynligvis blive identificeret ud fra afvigende DNA-profiler.

Spørgsmål b

Er der DNA fra hund i de ulve, som er omfattet af EU's habitatdirektiv?

Svar

Domesticering er den proces, hvormed et vildt dyr tilpasser sig at leve med mennesker ved selektiv opdræt over tusinder af år. Hunde har udviklet sig fra ulve gennem en lang proces af domesticering. I de senere år er nye resultater blevet publiceret, der baserer sig på analyse af hele genomer og kaster nyt lys over hundes og ulves evolutionære historie. Især må fremhæves et studie af Fan m.fl. (2016), som viser, at selv efter at ulve blev domesticerede, altså blev tamhunde, var der en lang periode med udveksling af gener, både fra tamhunde til ulve, og fra ulve til tamhunde. Det betyder, at tamhunde og ulve har haft en fælles evolutionær historie fra den oprindelige domesticering af hund for ca. 15-35.000 år siden og meget længere op i tid, end man hidtil har troet (det skal bemærkes at tidspunktet for domesticering i sig selv er omdiskuteret og svært at estimere pga. den efterfølgende udveksling af genetisk variation mellem hund og ulv).

Fra et biologisk synspunkt, er hunde (*Canis lupus familiaris*) og ulve (*Canis lupus lupus*) at betragte som underarter af samme art, som er fremkommet og opretholdes pga. forskelligt selektionspres (vildform vs. tamform) til trods for at de to økotypen op i gennem historien til stadighed synes at have udvekslet genetisk materiale gennem parringer og tilbagekrydsninger (Fan m.fl. 2016, Pilot m.fl. 2018).

Der er således genetisk variation fra tamhund i en stor del af undersøgte ulvebestande i verden, inklusiv alle de bestande, der er omfattet af EU's habitatdirektiv. Denne udveksling af gener mellem hunde og ulve fra forhistorisk tid og selv indtil i dag, har medført, at de fleste eurasiske ulve viser en vis grad af blanding med hunde; mellem 7% og 25% af genomet i ulve fra Europa og Mellemøsten stammer således på et eller andet tidspunkt fra hunden (Fan m.fl. 2016).

Selvom om hunde har blandet sig med ulve i forskellige dele af Eurasien, siden den oprindelige domesticering af hunde, har ulvebestande ikke desto mindre opretholdt en tydelig genetisk profil, der tydeligt adskiller dem fra hunde. Rent biologisk skyldes dette formentlig, at der i naturen er selektion mod de fleste af de egenskaber i hunde, som er et resultat af domesticeringsprocessen (Pilot m.fl. 2018). En ulvehybrid, som i naturen opfører sig som en hund, må populært sagt forventes at klare sig dårligere end en ulvehybrid, som opfører sig som en rigtig ulv. De alleler (genvarianter), som koder for hundeegenskaber (fx adfærd) må dermed forventes at forsvinde efter nogle generationer. Der er dog også eksempler på at indkrydsede alleler fra hund har vist sig fordelagtige i ulvepopulationer: Ulve med sort pelsfarve er hyppigt udbredt i Nordamerikanske ulve. Denne farvevariant kan henføres til en allel fra hund i et gen, der har indflydelse på pelsfarve. Allellen menes at være blevet krydset ind i ulvebestanden i forhistorisk tid, for siden at have spredt sig i bestanden gennem naturlig selektion (Anderson m.fl. 2009). Tilsvarende mørke former optræder undertiden også i italienske ulvebestande, hvilket også antages at skyldes indkrydsning langt tilbage i historien (Pilot m.fl. 2018). Genvarianter, som ikke medfører forskelle i fænotypen, vil derimod kunne forblive i bestanden som et målbart udtryk for krydsninger mange generationer tilbage. Rent praktisk betyder det også, at man må skelne mellem en langvarig evolutionær proces med udveksling af genetisk variation mellem hunde og ulve, og en hybridisering, der er sket for ganske

nylig, såsom en førstegenerations-hybrid (F1) mellem hund og ulv. Her vil afkommet have en række egenskaber fra såvel hund som ulv, som ikke er blevet påvirket af naturlig selektion.

Krydsning mellem beslægtede arter med efterfølgende tilbagekrydsning til den ene af forældrearterne (introgressiv hybridisering), er ikke unik for ulve. Mange dyrearter kan hybridisere og nuværende estimater viser, at der hos mindst 6% af de europæiske pattedyrarter foregår en vis hybridisering (Mallet 2005). Men ligesom hos ulve antages hyppigheden af hybridisering normalt at være lav, og effekten på bestandsniveau begrænset. Eksempler på dette er fx europæisk vildkat (krydsning med tamkat) (Steyer m.fl. 2018), vildren (krydsning med tamren) (Roed m.fl. 2014) og vildsvin (krydsning med tamsvin) (Iacolina m.fl. 2018).

Eksempler på hybridisering mellem vilde arter i naturen omfatter fx ulv, rødulv og prærieulv (coyote) i Nordamerika (Hinton m.fl. 2018, Monson m.fl. 2014), eller den europæiske bison, som er resultatet af hybridisering mellem steppebison og urokse i forhistorisk tid (Soubrier m.fl. 2016). Endeligt har det for vores egen art vist sig, at den nu uddøde neandertaler og det moderne menneske indtil flere gange har hybridiseret, hvorved mindst 20% af genomet fra neandertaler kan findes i det moderne menneske (Vernot & Akey 2014). Ca. 2-3% af genomet hos enkeltindivider af mennesker med ikke-afrikansk etnicitet (dvs. europæere, asiater m.fl.) stammer således fra neandertalere.

Kan den Centraleuropæiske ulvebestand betragtes som ren uden indblanding fra hund?

Der findes ingen objektivt defineret standard for hvor genetisk 'ren' en bestand skal være for at blive betragtet som 'ren' idet alle ulvebestande i Eurasien synes at rumme et kontinuum af genotyper fra individer uden spor af hunde-DNA til individer med op til 25%-hunde-DNA uden at disse individer kan adskilles morfologisk (Pilot m.fl. 2018). Rent praktisk kan man skelne mellem en historisk evolutionær proces med udveksling af variation mellem hunde og ulve, og så de konkrete tilfælde, hvor en nulevende hund og ulv parrer sig. I sidstnævnte tilfælde er der decideret tale om en sammenblanding af egenskaber mellem vilde og domesticerede dyr, mens der i den langvarige evolutionære proces har fundet naturlig selektion sted.

Europæiske ulve synes at have en genetisk opblandingsgrad med hunde som gennemgående er på linje med ulvebestande i Asien og Mellemøsten (Pilot m.fl. 2018). Den Centraleuropæiske lavlandsbestand har endnu ikke været undersøgt specifikt i forhold til andre Europæiske ulvebestande hvad angår graden af opblanding med hund. Det er derfor ikke mulig for indeværende, at udtale sig om hvorvidt opblandingsgraden med hund for den Centraleuropæiske lavlandsbestand af ulv skulle afvige fra andre europæiske ulvebestande.

Ud fra et økologisk perspektiv er der dog ikke noget som tilsiger at hyppigheden af hybridisering og efterfølgende tilbagekrydsning mellem ulv og hund (introgressiv hybridisering) for indeværende eller inden for de seneste generationer skulle forekomme hyppigere i den Centraleuropæiske lavlandsbestand af ulv sammenlignet med fx Sydeuropa, snarere tvært i mod. Det skyldes at antallet af løse hunde alt andet lige er lavere og at myndighederne i de lande, som huser den Centraleuropæiske lavlandsbestand af ulv overvåger bestanden tæt og målrettet søger at eliminere hybrider når de måtte optræde.

Sammenfattende svar: Der er DNA fra hund i en stor del af de undersøgte ulvebestande i verden, inklusiv alle de bestande, der er omfattet af EU's habitatdirektiv. Dette skyldes at ulve og hunde (der biologisk set er at betragte som samme art) formentligt aldrig på noget tidspunkt har været 100% reproduktivt adskilte i de 15.000-35.000 år de to former har eksisteret som adskilte underarter eller økotyper af den samme art. Af samme grund er det ikke muligt at definere eller identificere 'rene' ulvebestande. Alleller (genvarianter) med hunde-oprindelse, som spores i ulvebestande, er derfor resultatet af parringer mellem ulv og hund på en tidsskala, der spænder over tusinder af år. Som beskrevet må man forvente, at genetisk variation, der permanent er overført fra hund til ulv, ikke koder for specifikke hunde-egenskaber, som der vil være selektion imod i naturen.

Europæiske ulve synes at have en genetisk opblandingsgrad med hunde som er på linje med ulvebestande i Asien og Mellemøsten. Den Centraleuropæiske lavlandsbestand har endnu ikke været undersøgt specifikt i forhold til andre Europæiske ulvebestande hvad angår graden af opblanding med hund. Ud fra de aktuelle bestands- og landskabsforhold i udbredelsesområdet for den centraleuropæiske ulvebestand antages den aktuelle hyppighed af genudveksling fra hund til ulv ikke at være højere end i fx Sydeuropa, hvor løse hunde forekommer i større tal end i fx Tyskland og Danmark.

Rent praktisk er det hensigtsmæssigt at skelne mellem en evolutionær proces over et langt tidsrum, og hybridisering der er sket inden for få generationer. I sidstnævnte tilfælde er der decideret tale om en sammenblanding af egenskaber mellem vilde og domesticerede dyr, mens der i den langvarige evolutionære proces har fundet naturlig selektion sted.

Spørgsmål c

Hvad viser hhv. en fuld genomsekventering og de DNA-analyser til arts- og individniveau der er foretaget af de danske ulve på det tyske Senckenberg institut?

Svar

Der skal indledningsvist gøres opmærksom på, at valget ikke kun står mellem at anvende et mindre antal genetiske markører, som det bruges i den nuværende overvågning af ulve under Miljøstyrelsen, og at sekventere hele genomer, som vil identificere hundredetusinder eller endnu flere genetiske markører. Der findes således en lang række metoder midt imellem disse to yderpunkter, hvor man analyserer få tusinde eller mange tusinde genetiske markører fordelt over hele genomet, eksempelvis ved brug af såkaldte "SNP chips" (SNP står for single nucleotide polymorphism, dvs. variation, hvor f.eks. A i en DNA-sekvens hos ét individ er muteret til C hos et andet individ). Afhængigt af, hvilke spørgsmål, man ønsker at besvare, kan SNP chips og andre metoder være meget nyttige og billigere end en fuld genomsekventering.

Med en genomsekventering (eller metoder, som analyserer en stor del af genomet, som nævnt ovenfor) kan man opnå mange flere detaljer end ved de DNA-analyser til arts- og individniveau, der anvendes i den nationale ulveovervågning. Der er således store forskelle på en genomsekventering og de aktuelt benyttede analysemetoder. Men alt efter det spørgsmål, der ønskes besvaret, vælges den bedst egnede metode. Med udgangspunkt i den grundige genetiske overvågning af den Centraleuropæiske lavlandsbestand, som blandt andet har gjort det muligt at lave stamtræer og etablere en database over individer, så er de DNA-analyser, der aktuelt anvendes i ulveovervågningen i Danmark fyldestgørende for at kunne sikre bestemmelser til arts- og

individniveau samt haplotype og køn. Desuden er metoder og genetiske markører udvalgt til at kunne analysere stærkt nedbrudt DNA i små mængder fra fækalier, spyt eller andre lignende prøver fra ulve. Det har således ikke været formålet at bruge de anvendte genetiske markører til at identificere hybrider, og både typen af markører (mikrosatellitter) og det relativt lave antal markører, der er brugt, er heller ikke optimalt til analyse af introgressiv hybridisering. Skulle et individ i fremtiden blive identificeret uden det kan forbindes familiært til andre individer i det Centraleuropæiske ulveregister, vil der kunne argumenteres for, at det i et sådan tilfælde kunne være hensigtsmæssigt at foretage en genomsekventering (eller mindre omfattende analyser på genomisk niveau, som beskrevet ovenfor) med henblik på med sikkerhed at afklare individets genetiske tilhørsforhold, det være sig ulve-hundehybrid eller en ulv, som enten selv er indvandret fra en anden bestand eller er efterkommer af en ulv indvandret fra en anden bestand, som har fået afkom med Centraleuropæiske ulve .

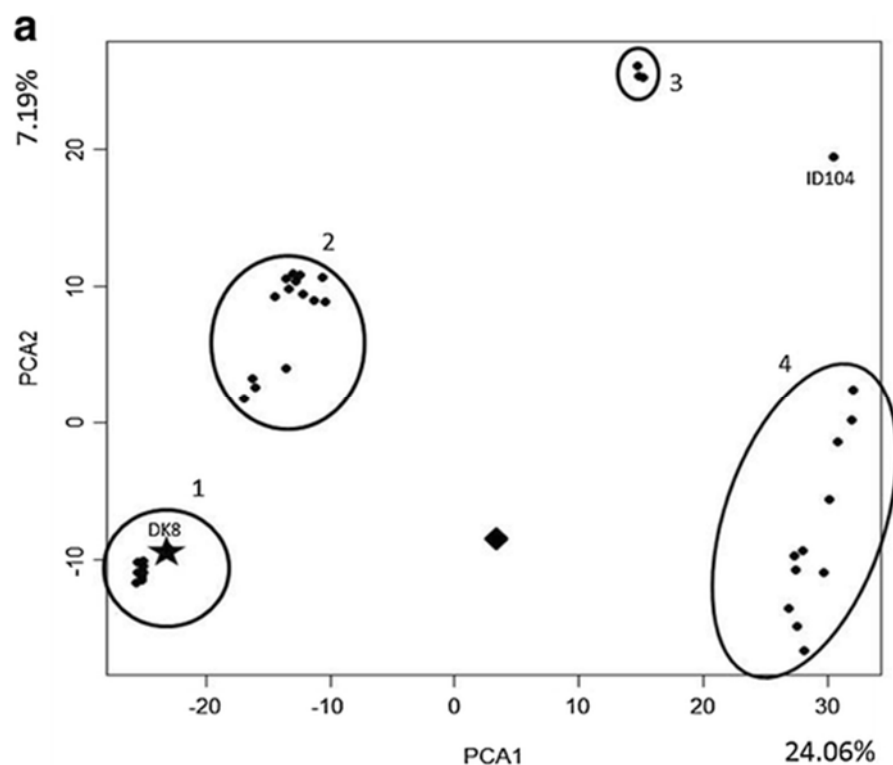
Et antal ulve i den Centraleuropæiske lavlandsbestand er blevet analyseret ud fra et stort antal genetiske markører (SNP chip), men ikke besluttet genomsekventering. SNP chip blev eksempelvis benyttet i det danske eksempel med Thy-ulven GW051m (Andersen m.fl. 2015). Her viste resultatet af omfattende analyser af 22.163 genetiske markører (SNPs), at der ikke var indikationer på, at der for nyligt havde været hunde blandt forfædrene til Thyulven og heller ikke til de ni ulve fra Tyskland eller de 13 ulve fra Polen, der alle indgik i studiet (Fig. 1, Andersen m.fl. 2015). Endvidere viste analysen, at GW051m (*stjerne*) grupperede med ulve fra Tyskland (*circle 1*) og adskilt i forhold til ulve fra det nordøstlige Polen (*circle 2*), mens kendte ulvehybrider (*circle 3* og *diamant*) grupperede mellem ulve og domesticerede hunde (*circle 4*). En af de tyske prøver grupperede sammen med ulve fra det nordøstlige Polen, hvilket i det konkrete tilfælde tyder på en nylig indvandring til det østlige Tyskland (Fig. 1).

Den høje opløselighed i studiet af GW051m skyldes det store antal genetiske markører, som giver høj statistisk sikkerhed. Går man trinnet endnu længere op og sekventerer hele genomer, kan man drage nytte af en lang række faktorer, hvor især "koblingen" mellem de genetiske markører på kromosomerne er informative. Det vil føre for vidt at beskrive dette i detaljer, men det er eksempelvis det, der har gjort det muligt at foretage de avancerede genetiske analyser i Fan m.fl. (2016).

Sammenfattende svar: Valget af metode er - som altid - betinget af de spørgsmål, man stiller. De nuværende analyser baseret på mikrosatellitter og mtDNA er tilstrækkelige til den monitoring, man har ønsket at iværksætte. Det betyder dog omvendt ikke, at der ikke er plads til og behov for udvikling af nye metoder med højere effektivitet og detaljeringsgrad end de nuværende metoder.

Hvis formålet er at analysere evt. forekomst af hybrider, vil det være formålstjenligt at bruge metoder baseret på mange flere genetiske markører. Det vil man bestemt kunne opnå ved analyse af hele genomer, og i det hele taget ville dette kunne generere en enorm mængde information. Der findes dog også metoder, såsom analyser baseret på SNP chips, der er billigere, analysemæssigt mindre komplicerede og velegnede til identifikation af hybrider, som illustreret af den tidligere nævnte undersøgelse af Thy-ulven GW051m.

Det mest fremtidssikre ville være at udvikle metoder, der både er effektive til at kunne analysere DNA fra fækalier m.m. og samtidigt kraftigt øger antallet af genetiske markører, således at man med samme metode kan opfylde kravene til selve monitoringsprogrammet samt identificere eventuelle hybrider og måske også samtidig kan generere yderligere information om f.eks. føde-dyr, parasitter m.m. i fækalieprøver.



Figur 1. Principal Component Analysis (PCA) plot af ulve fra Tyskland og Polen, hunde samt hybrider mellem ulv og hund baseret på 22.163 genetiske markører (se Andersen m.fl. 2015). Tæthedens hvormed individerne (hver enkelt markering angiver et individ) grupperer er et udtryk for, hvor beslægtede de er. *Stjerne:* DK8 = individet GW051m fundet i Nationalpark Thy i 2012 (Sunde & Olsen 2018), *cirkel 1:* ulve fra Tyskland, *cirkel 2:* ulve fra det nordøstlige Polen, *cirkel 3:* førstegenerations-hybrider (F1) af hanulve × hunhund, og *cirkel 4:* hunde. ID104 (afvigende værdi, italiensk hund) kan være en tilbagekrydsning mellem en ulvehybrid og hund. *Diamant:* en tysk F1-hybrid af hunulve × hanhund (fra 2003 i Neustadt i det østlige Sachsen, se *spørgsmål d* for yderligere information). Referenceprofiler omfattede ulve fra Tyskland (n = 9) og hovedsageligt det nordøstlige Polen (nogle stammer fra det vestlige Polen) (n = 13), domesticerede hunde (n = 13, italiensk oprindelse) og kendte F1-hybrider mellem hanulve og hunhund fra fangenskab (n = 3, italiensk oprindelse) og den tyske ulvehybrid fra 2003 (gengivet efter Andersen m.fl. (2015)).

Spørgsmål d

I hvor stort omfang forekommer der ulvehybrider i den Centraleuropæiske ulvebestand?

Svar

Der kendes til fem tilfælde af ungekuld som følge af krydsning mellem hund og ulv (F1-hybridkuld) inden for den Centraleuropæiske lavlandsbestands udbredelsesområde med to fund i Tyskland og tre i Polen. I alle fem tilfælde har det drejet sig om en enlig hunulv, som har parret sig med en hanhund, hvorefter hunulven har opfostret kullet på egen hånd. De fem tilfælde er som følger:

2003 i Sachsen i Tyskland: (Nowak m.fl. 2018, Reinhardt & Kluth 2007): Seks unger, hvoraf fire blev indfanget den følgende vinter. De sidste to forsvandt i februar 2004.

2014 i Vestpommern i Polen (Robert Mystajek, personlig mail-korrespondance): Alle unger blev fanget og aflivet.

2017 i Thüringen i Tyskland (Nowak m.fl. 2018). Seks unger, hvoraf de fire blev observeret den følgende vinter. Af disse blev tre indfanget. Det sidste afkom er stadig i følge med sin mor.

2018 i Kujavien-Pommern i Polen (Robert Mystajek, personlig mail-korrespondance): Nogle, men ikke alle unger er blevet fanget og aflivet.

2018 i Łódźsk i Polen (Robert Mystajek, personlig mail-korrespondance): Alle unger er blevet fanget og aflivet.

I de to tyske tilfælde, der fandt sted i henholdsvis 2003 i Neustadt i det østlige Sachsen og 2017 på det militær øvelsesterræn Ohrdruf i det sydlige Thüringen, blev mistanken om at der var tale om ulvehybrider i begge tilfælde rejst hurtigt, da de pågældende hvalpe udviste karakteristika, der ikke var forenelige med det normale udeende hos ulve tilhørende den Centraleuropæiske lavlandsbestand. Sammenlignet med andre bestande i verdenen, er variationen i ulvenes udseende i den Centraleuropæiske lavlandsbestand forholdsvis begrænset hvad angår pelsens grundfarver og generelle mønstring samt kroppens proportioner, hvorfor afvigelse forventeligt vil springe i øjnene. Det gjorde sig gældende i de to tyske tilfælde, hvor mistanken efterfølgende kunne bekræftes ud fra genetiske analyser.

Med udgangspunkt i de standarder der er for ulveovervågningen i den Centraleuropæiske lavlandsbestand med krav til billedokumentation og genetisk overvågning, så er det forventeligt, at eventuelle ulvehybrider vil blive opdaget forholdsvis hurtigt.

DCE er ikke vidende om at der i den Centraleuropæiske ulvedatabase skulle være rapporteret om F1-hybrider ud over de ovennævnte tilfælde.

Sammenfattende svar: Der kendes til fem tilfælde af hybrid-kuld mellem ulv og hund (alle med ulv som mor) fra den Centraleuropæiske lavlandsbestand. De allerfleste første-generations-hybrider (F1-hybrider) er blevet indfanget før de blev selvstændige, og der kendes endnu ikke til F1-hybrider, som er konstateret som selvstændige, endsige reproducerende fra den Centraleuropæiske lavlandsbestands udbredelsesområde. Med den nuværende bestands-overvågningsindsats i Danmark og Tyskland, må det betragtes som sandsynligt, at fremtidige ulvehybrider vil blive opdaget forholdsvis hurtigt, og hvis ikke før, så hvis de måtte danne par.

Referencer

Andersen, L. W., Harms, V., Caniglia, R., Czarnomska, S. D., Fabbri, E., Jędrzejewska, B., Kluth, G., Madsen, A.B., Nowak, C., Pertoldi, C., Randi, E., Reinhardt, I. & Vik Stronen, A. (2015a). Long-distance dispersal of a wolf (*Canis lupus*) in Northwestern Europe. – Mammal Research 60: 163-168.

Anderson, T. M., von Holdt, B. M., Candille, S. I., Musiani, M., Greco, C., Stahler, D. R., Smith, D. W., Padhukasahasram, B., Randi, E., Leonard, J. A., Bustamante, C. D., Ostrander, E. A., Tang, H., Wayne, R. K. & Barsh, G. S. (2009). Molecular and Evolutionary History of Melanism in North American Gray Wolves. – *Science* 323: 1339-1343.

Chapron, G., Kaczensky, P., Linnell, J. D. C., von Arx, M., Huber, D., Andrén, H., López-Bao, J. V., Adamec, M., Álvares, F., Anders, O., Balčiauskas, L., Balys, V., Bedó, P., Bego, F., Blanco, J. C., Breitenmoser, U., Brøseth, H., Bufka, L., Bunikyte, R., Ciucci, P., Dutsov, A., Engleder, T., Fuxjäger, C., Groff, C., Holmala, K., Hoxha, B., Iliopoulos, Y., Ionescu, O., Jeremić, J., Jerina, K., Kluth, G., Knauer, F., Kojola, I., Kos, I., Krofel, M., Kubala, J., Kunovac, S., Kusak, J., Kutal, M., Liberg, O., Majić, A., Männil, P., Manz, R., Marboutin, E., Marucco, F., Melovski, D., Mersini, K., Mertzanis, Y., Mysłajek, R. W., Nowak, S., Odden, J., Ozolins, J., Palomero, G., Paunović, M., Persson, J., Potočnik, H., Quenette, P-Y., Rauer, G., Reinhardt, I., Rigg, R., Ryser, A., Salvatori, V., Skrbinšek, T., Stojanov, A., Swenson, J. E., Szemethy, L., Trajçe, A., Tsingarska-Sedefcheva, E., Váňa, M., Veeroja, R., Wabakken, P., Wölfl, M., Wölfl, S., Zimmermann, F., Zlatanova, D. & Boitani, L. (2014). Recovery of large carnivores in Europe's modern human-dominated landscapes. – *Science* 346: 1517-1519.

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.

CEwolf (2019). The Central European Wolf Consortium (CEwolf): <http://www.senckenberg.de/CEwolf>.

Fan, Z., Silva, P., Gronau, I., Wang, S., Armero, A. S., Schweizer, R. M., Ramirez, O., Pollinger, J., Galaverni, M., Ortega Del-Vecchyo, D., Du, L., Zhang, W., Zhang, Z., Xing, J., Vilà, C., Marques-Bonet, T., Godinho, R., Yue, B. & Wayne, R. K. (2016). Worldwide patterns of genomic variation and admixture in gray wolves. – *Genome Research* 26: 163–173.

Freedman, A. H., & Wayne, R. K. (2017). Deciphering the origin of dogs: From fossils to genomes. – *Annual Review of Animal Biosciences* 5: 281–307.

Gravendeel, B., de Groot, A., Kik, M., Beentjes, K. K., Bergman, H., Caniglia, R., Cremers, H., Fabbri, E., Groenenberg, D., Grone, A., Bruinderink, G. G., Font, L., Hakhof, J., Harms, V., Jansman, H., Janssen, R., Lammertsma, D., Laros, I., Linnartz, L., van der Marel, D., Mulder, J. L., van der Mije, S., Nieman, A. M., Nowak, C., Randi, E., Rijks, M., Speksnijder, A. & Vonhof, H. B. (2013). The first wolf found in the Netherlands in 150 years was the victim of a wild-life crime. – *Lutra* 56: 93-109.

Hindrikson, M., Remm, J., Pilot, M., Godinho, R., Stronen, A. V., Baltrūnaitė, L., Czarnomska, S. D., Leonard, J. A., Randi, E., Nowak, C., Åkesson, M., López-Bao, J. V., Álvares, F., Llaneza, L., Echegaray, J., Vilà, C., Ozolins, J., Rungis, D., Aspi, J., Paule, L., Skrbinšek, T. & Saarma, U. (2016). Wolf population genetics in Europe: a systematic review, meta-analysis and suggestions for conservation and management. – *Biological Reviews* 92: 1601–1629.

Hinton, J. W., Gittleman, J. L., van Manen, F. T. & Chamberlain, M. J. (2018). Size-assortative choice and mate availability influences hybridization between red wolves (*Canis rufus*) and coyotes (*Canis latrans*) – Ecology and Evolution 8: 3927-3940.

Hulva, P., Černá Bolfíková, B., Woznicová, V., Jindřichová, M., Benešová, M., Myslajek, R. W., Nowak, S., Szewczyk, M., Niedźwiecka, N., Figura, M., Hájková, A., Sándor, A. D., Zyka, V., Romportl, D., Kutal, M., Find'ó, S. & Antal, V. (2018). Wolves at the crossroad: fission-fusion range biogeography in the Western Carpathians and Central Europe. – Diversity and Distributions 24: 179-192.

Iacolina, L., Pertoldi, C., Amills, M., Kusza, S., Megens, H. J., Balteanu, V. A., Bakan, J., Cubric-Curic, V., Oja, R., Saarma, U., Scandura, M., Sprem, N. & Stronen, A. V. (2018). Hotspots of recent hybridization between pigs and wild boars in Europe. – Scientific Reports 8: 10.

Lelieveld, G., Beekers, B., Kamp, J., Klees, D., Linnartz, L., van Norren, E., Polman, E. & Vermeulen, R. (2016). The first proof of the recent presence of wolves in the Netherlands. – Lutra 59: 23-31.

Mallet, J. (2005). Hybridization as an invasion of the genome. – Trends in Ecology & Evolution 20: 229-237.

Monzon, J., Kays, R. & Dykhuizen, D. E. (2014). Assessment of coyote-wolf-dog admixture using ancestry-informative diagnostic SNPs. – Molecular Ecology 23: 182-197.

Nowak, C., Jarausch, A., Cocchiarraro, B. & von Thaden, A. (2018). Wieviel Hund steckt in unseren Wölfen? Senckenberg. Natur – Forschung – Museum 148: 138-141.

Olsen, K. & Sunde, P. (2018a). Statusrapport fra den nationale overvågning af ulv (*Canis lupus*) i Danmark - 4. kvartal 2017. 10 s. 14. april 2018. – Notat fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi & Naturhistorisk Museum Aarhus. http://dce.au.dk/fileadmin/dce.au.dk/Udgivelser/Notater_2018/Statusrapport_ulv_4kvar_2017.pdf

Olsen, K. & Sunde, P. (2018b). Statusrapport fra den nationale overvågning af ulv (*Canis lupus*) i Danmark - 1. kvartal 2018. 11 s. 23. april 2018. – Notat fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi & Naturhistorisk Museum Aarhus. http://dce.au.dk/fileadmin/dce.au.dk/Udgivelser/Notater_2018/Statusrapport_ulv_1kvar_2018_.pdf

Olsen, K., Sunde, P., Hansen, M. M. & Thomsen, P. F. (2018a). Statusrapport fra den nationale overvågning af ulv (*Canis lupus*) i Danmark - 2. kvartal 2018. 19 s. 2. november 2018. – Notat fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi & Naturhistorisk Museum Aarhus. http://dce.au.dk/fileadmin/dce.au.dk/Udgivelser/Notater_2018/Statusnotat_ulv_2kvar_2018.pdf

Olsen, K., Sunde, P., Hansen, M. M. & Thomsen, P. F. (2018b). Statusrapport fra den nationale overvågning af ulv (*Canis lupus*) i Danmark - 3. kvartal 2018. 16 s. 30. november 2018. – Notat fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi & Naturhistorisk Museum Aarhus.

http://dce.au.dk/fileadmin/dce.au.dk/Udgivelser/Notater_2018/Statusnotat_ulv_3kvar_2018.pdf

Pilot, M., Greco, C., von Holdt, B. M., Randi, E., Jędrzejewski, W., Sidorovich, W. E., Konopiński, M. K., Ostrander, E. A. & Wayne, R. K. (2018). Widespread, long-term admixture between grey wolves and domestic dogs across Eurasia and its implications for the conservation status of hybrids. – *Evolutionary Applications* 11: 662-680.

Reinhardt, I. & Kluth, G. (2007). *Leben mit Wölfen. – Leitfaden für den Umgang mit einer konfliktträchtigen Tierart in Deutschland.* – BfN-Skripten 201. 180 sider.

Reinhardt, I., Kluth, G., Pieruzek-Nowak, S. & Mysłajek, R. W. (2015). Standards for the monitoring of the Central European wolf population in Germany and Poland. – BfN Federal Agency for Nature Conservation.

http://www.polskiwilk.org.pl/download/2015_Joint%20Wolf%20Monitoring%20Standards%20DE&PL_BfNSkript398.pdf

Roed, K. H., Bjørnstad, G., Flagstad, O., Haanes, H., Hufthammer, A. K., Jordhøy, P. & Rosvold, J. (2014). Ancient DNA reveals prehistoric habitat fragmentation and recent domestic introgression into native wild reindeer. – *Conservation Genetics* 15: 1137-1149.

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>

Soubrier, J., Gower, G., Chen, K., Richards, S. M., Llamas, B., Mitchell, K. J., Ho, S. Y. W., Kosintsev, P., Lee, M. S. Y., Baryshnikov, G., Bollongino, R., Bover, P., Burger, J., Chivall, D., Cregut-Bonnoure, E., Decker, J. E., Doronichev, V. B., Douka, K., Fordham, D. A., Fontana, F., Fritz, C., Glimmerveen, J., Golovanova, L. V., Groves, C., Guerreschi, A., Haak, W., Higham, T., Hofman-Kaminska, E., Immel, A., Julien, M. A., Krause, J., Krotova, O., Langbein, F., Larson, G., Rohrlach, A., Scheu, A., Schnabel, R. D., Taylor, J. F., Tokarska, M., Tosello, G., van der Plicht, J., van Loenen, A., Vigne, J. D., Wooley, O., Orlando, L., Kowalczyk, R., Shapiro, B. & Cooper, A. (2016). Early cave art and ancient DNA record the origin of European bison. – *Nature Communications*: 7: 7.

Steyer, K., Tiesmeyer, A., Munoz-Fuentes, V. & Nowak, C. (2018). Low rates of hybridization between European wildcats and domestic cats in a human-dominated landscape. – *Ecology and Evolution* 8: 2290-2304.

Vernot, B. & Akey, J. M. (2014). Resurrecting surviving neandertal lineages from modern human genomes. – *Science* 343: 1017-1021.