

# Populasjonsovervåkning av jerv ved hjelp av ikke-invasiv DNA analyse.

## Bakgrunn

Den skandinaviske populasjonen av jerv er i dag gjennom yngleregistreringer estimert til  $595 \pm 69$  SE individer og må ansees som sårbar. Omfattende overvåkning av populasjonen er av betydning for å kunne følge bestandsutviklingen på den Skandinaviske halvøy. Den sør-norske bestanden bør forvaltes som en separat enhet, ettersom den med støtte i genetiske data (Walker et al. 2001), synes å være delvis isolert fra de større bestandene i Nord-Norge og Nord-Sverige. Det er derfor av stor betydning at forholdene legges til rette for å kunne følge utviklingen i denne bestanden på en forsvarlig måte.

Det at jerven er en art med store arealkrav i fjellet hvor det til tider svært ustabile værforhold fører til at en effektiv bestands-registrering og -overvåkning kan være problematisk. Tradisjonelle tilnærmelser som sporing og registrering av ynglehi har gitt verdifulle indikasjoner på reproduksjon og populasjonsstørrelse, men usikkerheten er likevel stor rundt den forvaltningsmessige status til bestanden. Nyere forskning har vist at det er mulig å identifisere individer basert på DNA isolert fra ekskrementer. Dette åpner opp for en ny metodisk tilnærming i populasjonsovervåknings-sammenheng som kan supplere populasjonsestimater basert på sporing og ynglehiregistrering. Videre kan et slikt supplement gi et klart bilde av kjønns sammensetningen i bestanden, og potensielt bidra til å belyse slektskapsforhold og derigjennom individuell variasjon i reprodutiv suksess.

Vi vil i denne rapporten redegjøre for vårt arbeid for å kvalitetssikre en DNA-basert overvåkningsmetode på jerv. Videre vil vi presentere resultatene fra 211 ekskrementprøver innsamlet i Sør-Norge i løpet av 2000 og 2001 (Figur 1). Vi har lagt spesiell vekt på følgende aspekter: 1) Metodens robusthet som generelt overvåkningsverktøy 2) Metodens anvendbarhet i forhold til å estimere minimum bestands-størrelse og kjønns-sammensetning i bestanden 3) Metodens potensiale for videre utvikling og i denne sammenhengen en anbefaling om hvordan fremtidig innsamling bør gjennomføres.

## Metodikk

DNA ble ekstrahert fra totalt 243 ekskrement-prøver som var antatt å komme fra jerv; 211 fra Sør-Norge og 32 fra Sarek. Videre har vi i tilfeller av vellykket ekstraksjon av jervspesifikt kjerne-DNA gjennomført genotyping på tvers av 9 mikrosatelitt markører som følger: Ggu10, Ggu14, Ggu25, Ggu42, Gg443, Gg452, Gg454, Gg465 (Walker et al. 2001) samt Gg216 (Duffy et al. 1998).

Siden isolater fra ekskrementer som oftest har en meget lav DNA konsentrasjon er det vesentlig for metodens robusthet å kjøre et antall replikater for hver prøve. I et pilot-studium av Sarek-materialet ble alle prøver kjørt med fire replikater per locus. Basert på resultatene herfra, har vi valgt å legge følgende kriterier til grunn for robust genotyping. Et individ som er homozygot (dvs. har én genetisk variant) for et locus, må vise dette i tre uavhengige replikater for at dette skal aksepteres som et autentisk resultat. Et individ som er heterozygot (dvs. har to ulike genetiske varianter) for et locus, må vise et slikt mønster i minst to uavhengige replikater for at individet skal aksepteres som heterozygot for dette locuset. Dette betyr i klartekst at alle individuelle prøver er kjørt i minst 2-3 replikater for hvert locus. Dersom noe

som helst tvil skulle ligge til grunn etter gjennomføring i henhold til disse kriteriene, er ytterligere replikater blitt gjennomført for de aktuelle prøvene.

Alle prøver som gav jervspesifikt kjerne-DNA ble kjønnsbestemt ved hjelp av en kjønns-markør som bare kunne amplifisere opp jerv-DNA. På denne måten kan vi utelukke at amplifisering av byttedyr DNA fører til at prøven blir feilbestemt hva angår kjønn. Tre uavhengige replikater ble kjørt for alle prøver ved kjønnsbestemmelsen.

De prøvene som ikke gav jervspesifikt kjerne-DNA ble amplifisert og sekvensert for ca. 300 bp av det mitokondrielle genet *cytB*. For å bestemme artstilhørigheten til prøvene, ble sekvensene i sin tur kjørt opp mot en genbank database.

Etter endt mikrosatelitt-analyse og kjønnsbestemmelse ble de genetiske profilene til alle individuelle prøver sammenlignet. Prøver som var identiske på tvers av 9 loci samt representerte det samme kjønn, ble klassifisert som representanter for ett og samme individ.

## **Resultater og diskusjon**

### *Metodens robusthet – pilotstudiet i Sarek*

For å kvalitetssikre metoden, testet vi 32 ekskrementprøver fra Sarek (nærvær av jervspesifikt kjerne-DNA kunne påvises i 22 av prøvene). Fra det samme området hadde vi også tilgang til ca. 150 blod- eller vevsprøver. Resultatene fra ekskrement-prøvene ble sammenlignet med DNA-profilene fra blod- og vevsprøvene. Denne delen av analysen ble gjennomført som en blindtest, hvor vi ikke på forhånd kjente til hvilke blod/vevsprøver som hadde korresponderende ekskrementprøver.

Vi kjørte alle fungerende ekskrementprøver gjennom 4 replikater, og de 22 prøvene representerte 17 ulike individer. Sammenligningen med blod- og vevsprøvene viste at alle ekskrement-individer hadde korresponderende genotype med et "vevs-individ". Overensstemmelsen viste seg å være korrekt utfra de opplysningene som var tilgjengelige fra innsamlingen i felt. Alle multi-locus genotyper var korrekte allerede etter 3 replikater. (Figur 2). Dette gjaldt også prøvene av dårligere kvalitet som hadde høy feilprosent etter ett og to replikater. Dette tilsier at 3 replikater per locus per prøve skulle være tilstrekkelig for å oppnå korrekte multi-locus genotyper fra jervekskrementer.

Genotypingen av vevsprøvene fra Sarek viste at de aller fleste individpar kan skilles ved hjelp av ni markører; kun et søskenpar og et annet individpar der slektskap ikke er kjent viste identiske DNA-profiler. I Sør-Norge er den genetiske variasjonen noe lavere, men oppløsningen på individnivå er fortsatt meget høy. Vi har derfor valgt å bruke disse 9 markørene som et utgangspunkt for å skille mellom ulike individer.

### *Den sør-norske jervbestanden – amplifiserings-suksess og feilkilder*

Tabell 1 sammenfatter amplifiserings-suksessen for de sør-norske jervene samlet inn i 2000 og 2001. Vi ser at ca 70 % av alle innsamlede prøver gir positive DNA-profiler for jerv. Noen prøver kommer fra andre arter, og for noen prøver dominerer byttedyr-DNA i isolatet. Dersom vi tar bort de prøvene som påviselig stammer fra andre arter, får vi en amplifiserings-suksess på 80%. Interessant er det å observere at helt tilsvarende suksessrater ble oppnådd i Sarek.

Den vanligste feilen ved amplifisering av isolater med lav DNA konsentrasjon er såkalt "allelic drop-out", dvs. at bare et av to alleler i en heterozygot prøve detekteres. Tabell 2 viser drop-out rater for 9 loci for de sør-norske prøvene samt tilsvarende resultater fra pilotstudiet i Sarek. Drop-out raten ligger rundt 10% for de fleste loci blant de sør-norske prøvene. Dette innebærer en meget lav sannsynlighet for ikke-detekterte drop-outs i datasettet, som i sin tur innebærer en statistisk forventning om feil tolkning av genotypen i 3 av 2,000 tilfeller. Tilsvarende resultater ble oppnådd i pilotstudiet, dog med noe høyere verdier for enkelte loci. De samsvarende drop-out ratene indikerer at 3 replikater per locus skulle holde for å oppnå pålitelige multi-locus genotyper for de sør-norske prøvene. Konsistensen på tvers av de to populasjonene bærer bud om at metoden er robust. Et datasett helt fritt for feil kan man dog aldri garantere, og i tilfeller med overraskende resultater (det være seg identitet mellom prøver som ble samlet i urimelig stor avstand fra hverandre, alternativt uoverenstemmelse mellom flere prøver som er samlet langs ett jervspor), bør man kjøre flere replikater.

#### *Prøvenes identitet og minimum populasjons-størrelse*

Tabell 3 samt Figur 3-5 oppsummerer prøvenes identitet og kjønns-spesifisitet i de tilfeller der vi har fått positive DNA profiler fra jerv. Vi ser at det totale ekskrement-materialet identifiserer 68 individer, hvorav 60 fortsatt påviselig var i live i 2001. Fra materialet som ble samlet inn i et begrenset geografisk område i 2000, ble flere, men ikke alle, individer gjenfunnet ved en mer omfattende innsamling i 2001. For materialet fra 2001, som hadde et betydelig større geografisk innsamlingsområde, ble det samlet ekskrementer fra minst 60 jerver. Dette minimums-estimatet av bestandsstørrelsen er i overensstemmesle med bestandsestimater basert på ynglehi-registreringene i 1999-2001 (64 dyr). Omtrent halvparten av individene er imidlertid bare representert med en ekskrement-prøve, noe som i praksis betyr at det fortsatt finnes en del jerver i Sør-Norge som ikke er fanget opp via ekskrementinnsamlingen. Hvor mange individer dette kan dreie seg om er utfra det foreliggende datasettet usikkert. Ytterligere en innsamlingssesong vil kreves for å få et pålitelig bestandsestimater basert på en fangst-gjenfangst tilnærming.

Våre data indikerer en tilnærmet uniform kjønnsfordeling i bestanden (Figur 3-5). Ser man hele datasettet under ett finner vi 36 hunner og 32 hanner. Hanner og hunner synes å være jevnt fordelt i hele utberedelsesområdet.

Når det gjelder den geografiske fordelingen til individene som var representert ved mer enn en prøve (Figur 3 og 5), ligger det begrenset informasjon i dette isolert sett. Innsamling over flere år vil derimot kunne gi viktig informasjon om bevegelsesmønsteret til de ulike individene. Det kan også være grunn til å peke på at de genetiske analysene ble gjennomført isolert, dvs. uten kjennskap til innsamlingslokalitet. Eventuelle feil i metodikken for genotypingen eller i innsamlingsrutinene, skulle dermed kunne detekteres ved en geografisk avstand mellom individuelle prøver som ikke kunne forklares med ordinære biologiske data for leveområdebruk og dispersal-avstander. Slike feil ble ikke avdekket, med unntak av ett individ (individ 13). En av de fem prøvene som synes å representere dette individet, ble funnet i uventet stor geografisk avstand fra de andre prøvene som representerer dette individet. Alle fem prøver var imidlertid fortsatt genetisk identiske etter at ytterligere 3 loci ble inkludert for

disse. Vi kan dermed høyst sannsynlig utelukke feil i den genetiske analysen, og må derfor anta at dette er et eksempel på dispersal av en ungjerv.

#### *Sammenligninger med blod / vevsprøver fra skutte eller merkede dyr.*

Genotypene fra alle skutte dyr som potensielt kunne gjenfinnes i materialet vårt samt 13 tidligere radiomerkede individer fra Snøhetta-området (1990-1995) ble sammenlignet med ekskrement-genotypene. En av de 13 tidligere radiomerkede jervene ble gjenfunnet i 2001-materialet vårt. Dette gjelder individ 19 (Tabell 3, Figur 5), en hann som er representert i vårt materiale med tre prøver samlet inn i Oppdal. Dette individet befant seg i samme område under Snøhetta-prosjektet. Ingen av de tre vevsindividene som ble felt før 2001-innsamlingen (Figur 6a) ble gjenfunnet i 2000-materialet. Blant 16 dyr felt under eller etter 2001-innsamlingen (8 voksne, 4 unger utenfor hi, 4 unger i hi) fant vi tre reproduserende tisper i ekskrement-materialet vårt. Dette gjaldt J76-01 (individ 12; 8 prøver), J82-01 (individ 51; 1 prøve) og individ J85-01 (individ 21; 1 prøve); se Figur 6b.

#### *Slektskapsanalyser*

Slektskapsanalyser er viktig for å kunne si noe om variasjon i reproduktiv suksess. Dessverre er slike analyser i liten grad gjennomført på det gjeldende datasettet. For at dette skal kunne gjennomføres på forsvarlig vis, bør samplingen foregå på en slik måte at ynglehi dekkes spesielt godt. Et eksempel på vellykket innsamling i tilknytning til et ynglehi, er gitt i Figur 7, der begge foreldrene var representert med flere prøver. To sannsynlige avkom ble funnet i datasettet vårt, individ 6 og individ 35.

Innsamling i tilknytning til ynglehi vil altså høyst sannsynlig gi oss prøver fra en reproduserende hunn, og potensielt også avkommet hennes. Utifra denne informasjonen kan man slutte seg til hvilken eller hvilke prøver fra det totale datasettet som representerer en potensiell far. Ved god oppløsning (ca. 20 loci) er det sannsynlig at man faller ned på kun en mulig far. Slektskapsanalyser kan også gjøres uten noen annen informasjon enn kjønn, men dette vil sannsynligvis kreve at mer enn 20 loci genotypes for alle individer. Erfaringer fra tilsvarende analyser på ulv viser at en slik tilnærming kan løse opp deler av slektskapstreet.

#### **Konklusjoner – metodens potensiale og innsamlingsdirektiver**

Pilotprosjektet i Sarek viste at metoden er robust med tanke på å kartlegge identiteten til ekskrementprøver av jerv. Tilsvarende amplifiserings-suksess og drop-out rater i det sørnorske materialet tyder på at denne metoden kan fungere som et pålitelig supplement til mer tradisjonell bestandsregistrering og –overvåkning. Vårt bidrag vil kunne belyse viktige forvaltningsmessige spørsmål som bestandsstørrelse, kjønnsfordeling i ulike deler av bestanden og reproduktivt bidrag fra ulike individer.

For at potensialet i metodikken skal kunne utnyttes til fulle, bør imidlertid innsamlingen av prøver gjennomføres mer målrettet enn tilfellet var under vinteren 2001. Antall prøver bør økes i kjerneområdet og i tilknytning til ynglehi men også i de mer perifere områdene. Det sistnevnte aspektet er viktig med tanke på å få et sikrere estimat på antall streifindivider. Spesielt viktig vil det være å samle inn prøver ved lokaliserte ynglehi, slik at vi har muligheter til å identifisere den reproduserende hunnen og potensielt dens avkom. Som nevnt ovenfor bør

slike lokaliteter besøkes flere ganger under innsamlingsperioden og også etter at ungen har kommet ut av hiet.

Ytterligere et viktig aspekt i overvåkings- og forvaltningssammenheng er hvorvidt immigranter fra Sverige eller Nord-Norge bidrar til reproduksjon i den sør-norske bestanden, noe som også kan belyses gjennom denne metoden. Våre genetiske data gir klare indikasjoner på at bestanden er relativt isolert fra de større bestandene mot nord. Vi fant imidlertid et individ som med stor sannsynlighet kan knyttes til en av de to nordlige populasjonene. Dette gjelder individ 54 som er representert ved to prøver innsamlet i Alvdal (R203193 og R203209). Intensiv innsamling på begge sider av i de perifere nord-østlige områdene i Sør-Norge samt i de sørlige områdene på den svenske siden av grensen, kan belyse i hvor stor grad utveksling mellom bestandene forekommer og i hvilken retning migrasjonen er størst. Slektskapsanalyser kan i sin tur belyse hvorvidt immigrantene bidrar til reproduksjon i Sør-Norge.

**Tabell 1** Amplifiserings-suksess blant sør-norske ekskrement-prøver sammenlignet med eksperiment populasjonen vår i Sarek.

	antall prøver	positiv DNA-profil for jerv	påvist jerv som ikke gav positiv DNA profil	prøven stammer fra annen art	byttedyrs-DNA dominerer i prøven	ukjent opprinnelse på prøven	amplifisering -suksess (total)	amplifisering-suksess (minus byttedyr og andre arter)
Sør-Norge	211	147	14	18	9	23	70%	80%
Sarek	32	22	0	0	5	5	69%	81%

**Tabell 2** Allelic drop-outs detektert blant sør-norske ekskrement-prøver sammenlignet med eksperiment-populasjonen vår i Sarek.

	<i>Ggu14</i>	<i>Gg454</i>	<i>Gg465</i>	<i>Gg443</i>	<i>Gg452</i>	<i>Ggu42</i>	<i>Ggu10</i>	<i>Gg216</i>	<i>Ggu25</i>	<b>Total</b>
<b>Sør-Norge</b>										
Heterozygote replikater	223	185	236	143	192	111	155	145	235	1625
Allelic drop-outs	34	17	20	9	16	15	15	22	21	169
Allelic drop-outs (%)	15.2%	9.2%	8.5%	6.3%	8.3%	13.5%	9.7%	15.2%	8.9%	10.4%
<b>Sarek</b>										
Heterozygote replikater	39	39	38	34	32	20	25	53	34	314
Allelic drop-outs	3	3	5	5	2	5	5	12	3	43
Allelic drop-outs (%)	7.7%	7.7%	13.2%	14.7%	6.3%	25.0%	20.0%	22.6%	8.8%	13.7%

**Tabell 3** Oversikt over alle sør-norske prøver samlet inn i 2000 og 2001. Ulike prøver som representerer samme individ er gruppert sammen. Kjønn til de ulike individene er indikert i form av M (hanner) og F (hunner). I tilfeller der prøven gav fra andre arter enn jerv er dette indikert i kolonne 1.

<b>Individ nr.</b>	<b>Rovbase nr. (2001) / ID kode (2000)</b>	<b>Kjønn</b>
1	1, 39, R203100, R203099	M
2	2, R203092	F
3	3, 5, 7, 9, 11, 12, 13, 27	M
4	4, 15, 17, R202939	M
5	6, 8, 16, 25, 26, 28, R203269	F
6	14, 19	F
7	R203250, 48, 18, R202937, R202938	F
8	21, 29, 31, 32, 33	F
9	24	F
10	40	M
11	42	M
12	44, 45, 47, R203242, R203243, R203235, R202940, R203238, R203240	F
13	R203170, R203080, R203219, R203216, R203088	F
14	R203133	M
15	R202935, R202926	F
16	R202941	M
17	R203184, R203185	F
18	R203212, R203203, R203161, R203189, R203090, R203217	M
19	R203131a, R203112, R203134	M
20	R203113	F
21	R203076	F
22	R203098	F
23	R203223, R203107, R203109, R203207	F
24	R203202	M
25	R202931	M
26	R203136	F
27	R203195	M
28	R203070, R203157, R203159, R203158, R203071	M
29	R203164, R203168, R203166, R203163	M
30	R203205, R203237, R203234	M
31	R203138, R203065, R203201	M

32	R203119, R203120, R203117	F
33	R203218	F
34	R203128, R203129	M
35	R203244, R202923, R203239	F
36	R203104, R203105	F
37	R203073	M
38	R203125, R203137	F
39	R203347	M
40	R202934	M
41	R202969, R202970	M
42	R203172	F
43	R202933	F
44	R203116, R203110	F
45	R203165, R203167	F
46	R203222	F
47	R203124, R203122	M
48	R203096	M
49	R203190	M
50	R203060	F
51	R202928	F
52	R203187	M
54	R203209, R203193	F
55	R203130	F
56	R203211	F
57	R203252	F
58	R203254	F
59	R202932	F
60	R203091	M
61	R203162, R203075	M
62	R202921, R202924	F
63	R203101	M
64	R203156	F
65	R203214	M
66	R203241	M
67	R203102, R202927	M
68	R203188	F

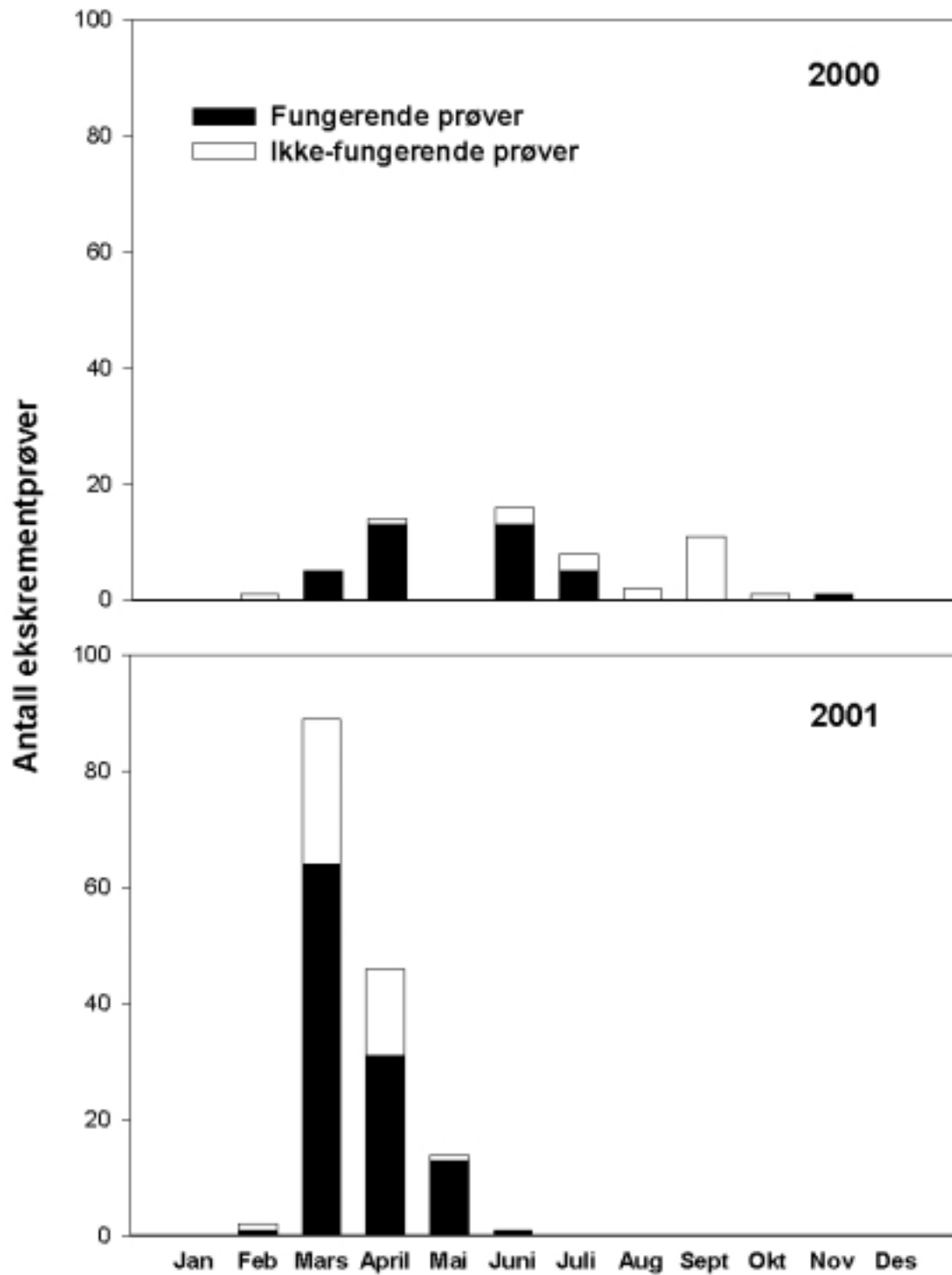


69 R203131b M  
Påvist jerv der mikro-satelittanalyse ikke fungerte 23 (DNA fra to ulike individer), 34, 35, 41, R202929, R203061, R203089, R203108, R203140, R203186, R203198, R203204, R203266, R203275

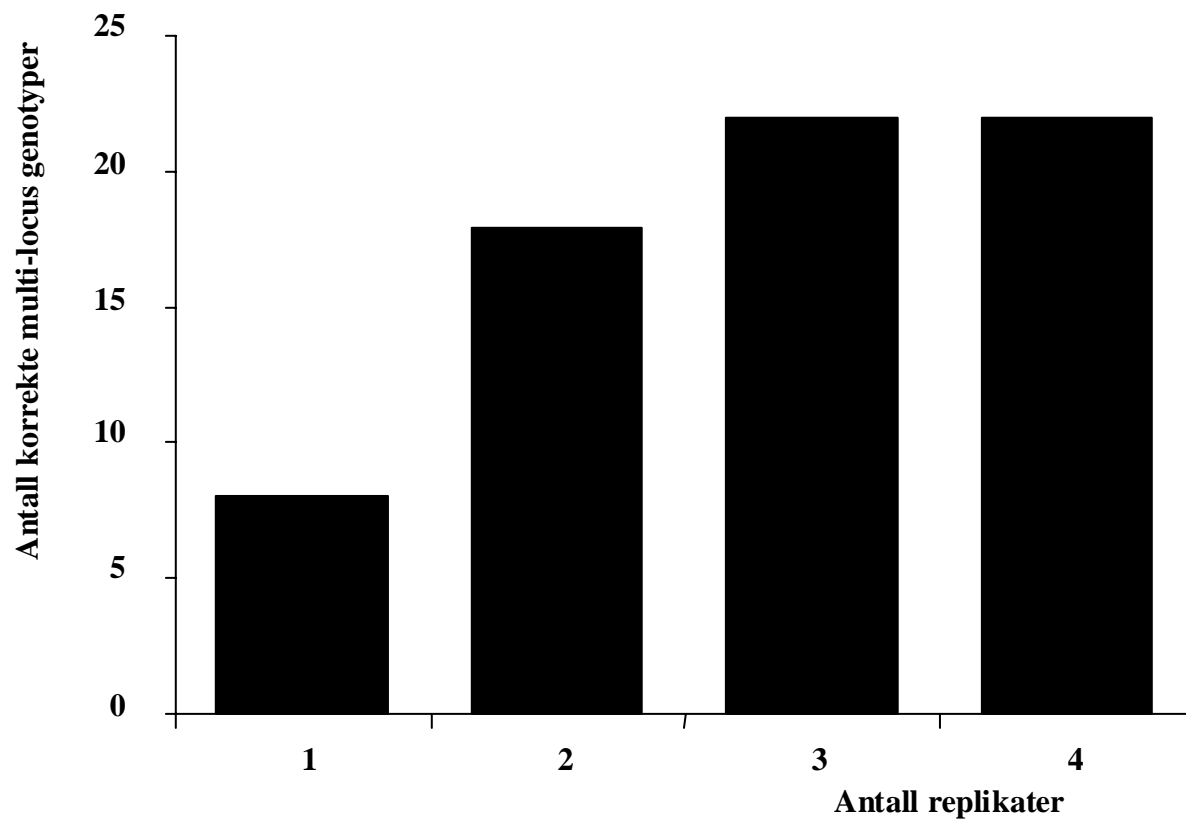
**Andre arter**

Fjellrev? R203194, R203199, R203215 (kan være annet hundedyr)  
Ravn R203094, R203169, R203197, R203256, R203261, R203262, R203273  
Gris R202922, R203260  
Rev R203191, R203196  
Røyskatt/Mår? R203213  
Orrfugl/Rype? 22, R203210, R203251  
Hare R203095, R203208, R203249 (byttedyrs-DNA dominerer i isolatet)  
Mus R203127, R203192, R203263 (byttedyrs-DNA dominerer i isolatet)  
Reinsdyr 30, R202971, R203114 (byttedyrs-DNA dominerer i isolatet)  
Ukjent opprinnelse 43, R202936, R202968, R203066, R203142, R203160, R203171, R203183, R203200, R203206, R203220, R203221, R203224, R203236, R203253, R203255, R203257, R203258, R203259, R203264, R203265, R203267, R203344

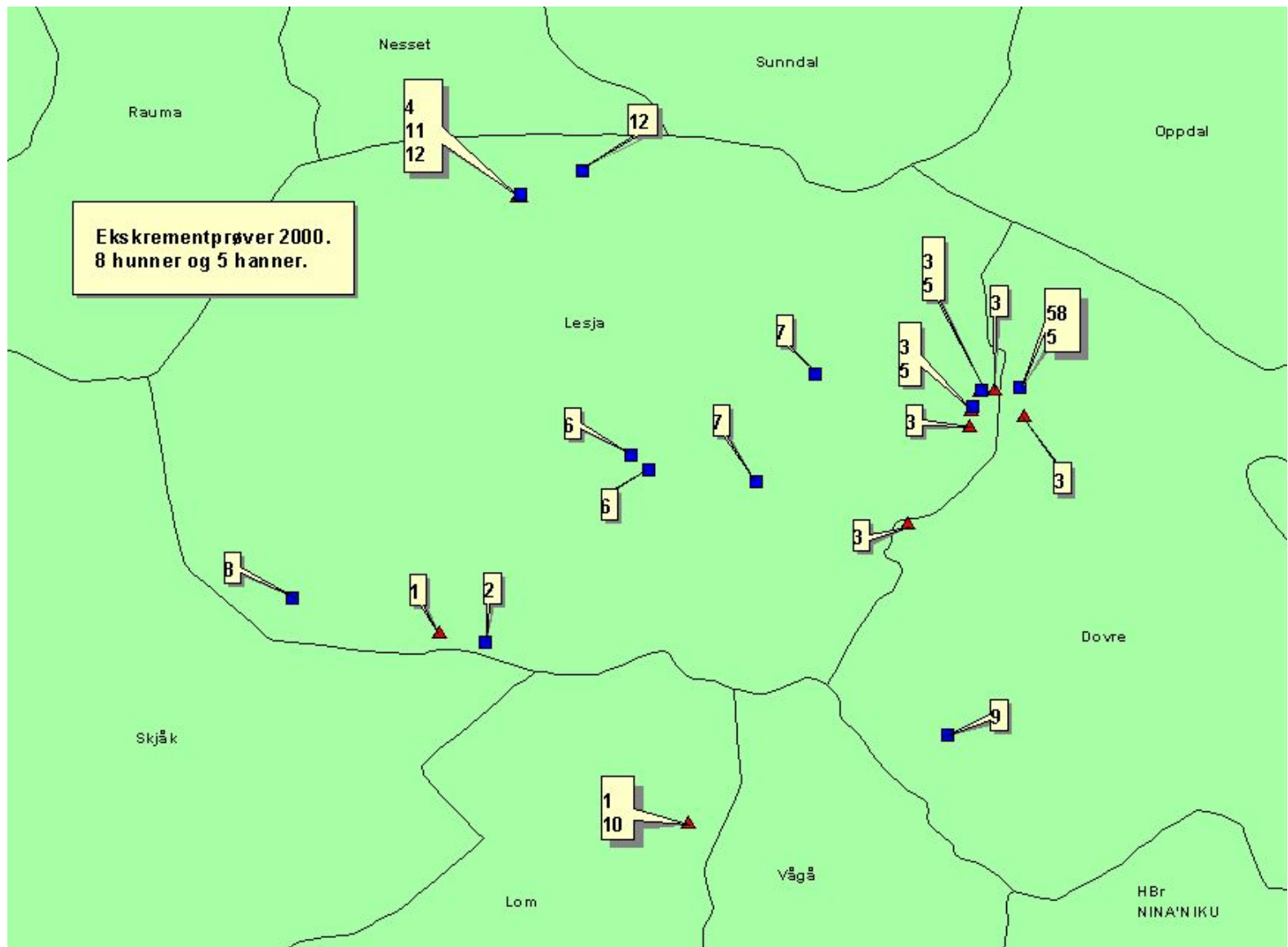
---



**Figur 1** Ekskrementprøver samlet inn i 2000 og 2001. Fungerende prøver er indikert i svart, mens ikke-fungerende er indikert i hvitt.

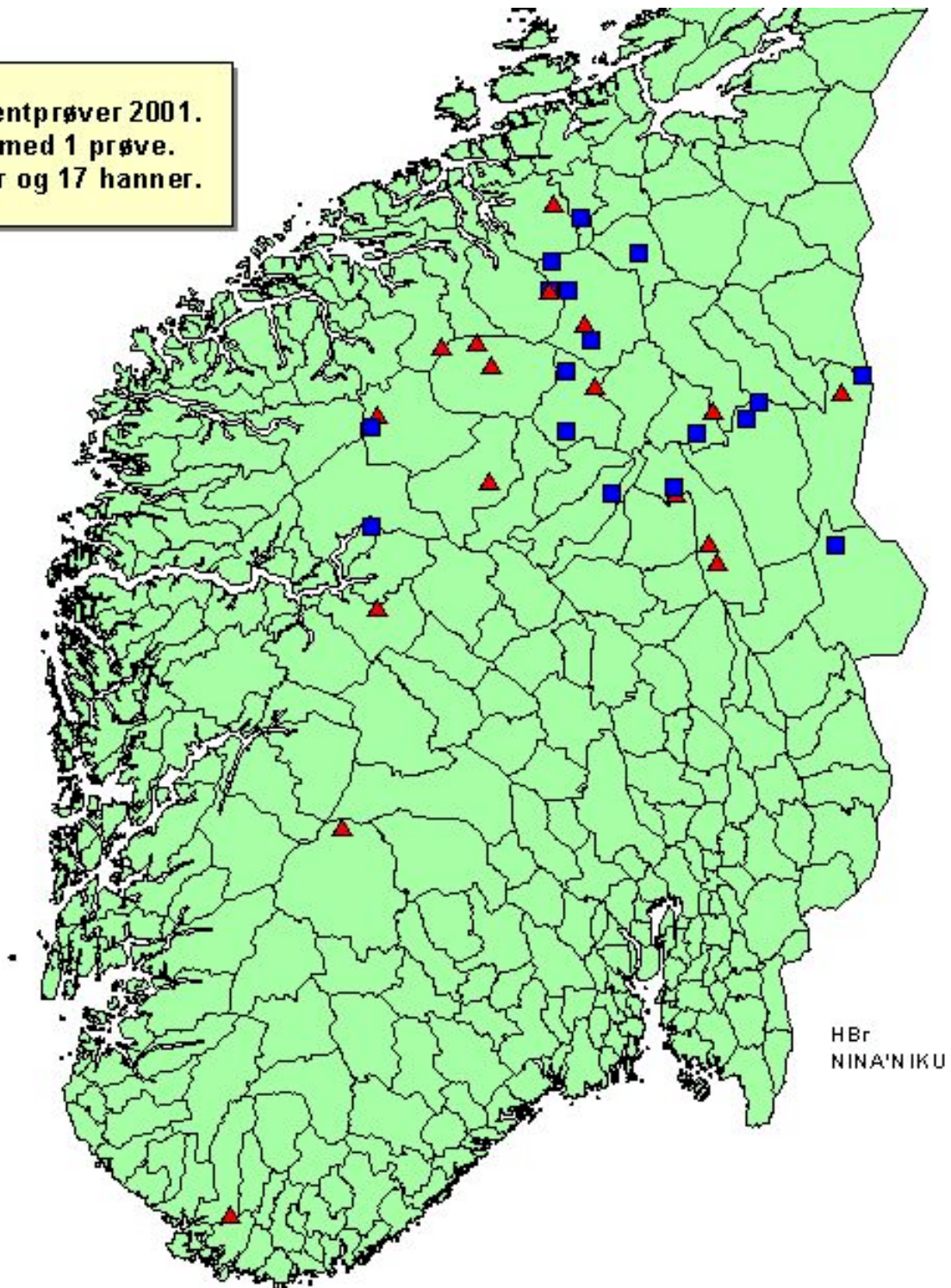


**Figur2** Antall korrekte multi-locus genotyper etter ett, to, tre og fire replikater.



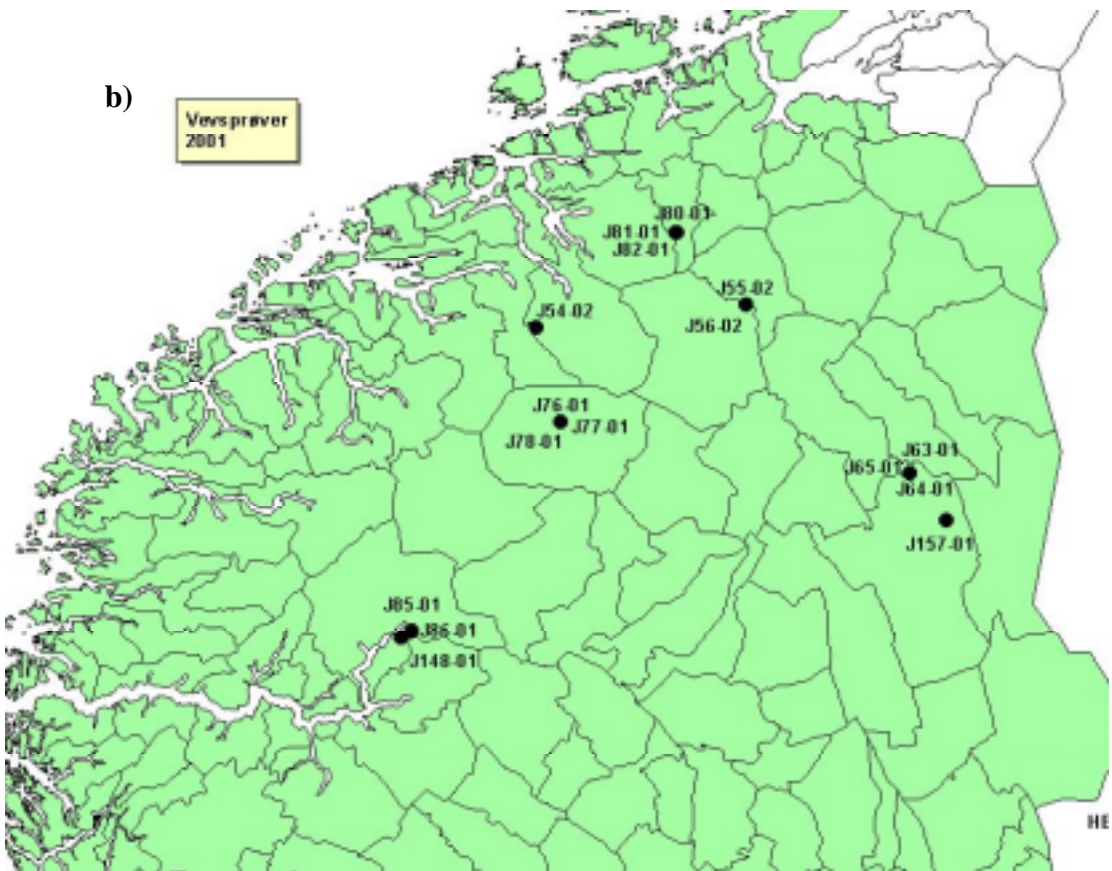
**Figur 3** Lokalitet, individ-nummer og kjønn for 2000-materialet. Røde trekkanter symboliserer hanner, mens blå firkanter symboliserer hunner.

Ekskrementprøver 2001.  
Individer med 1 prøve.  
17 hunner og 17 hanner.

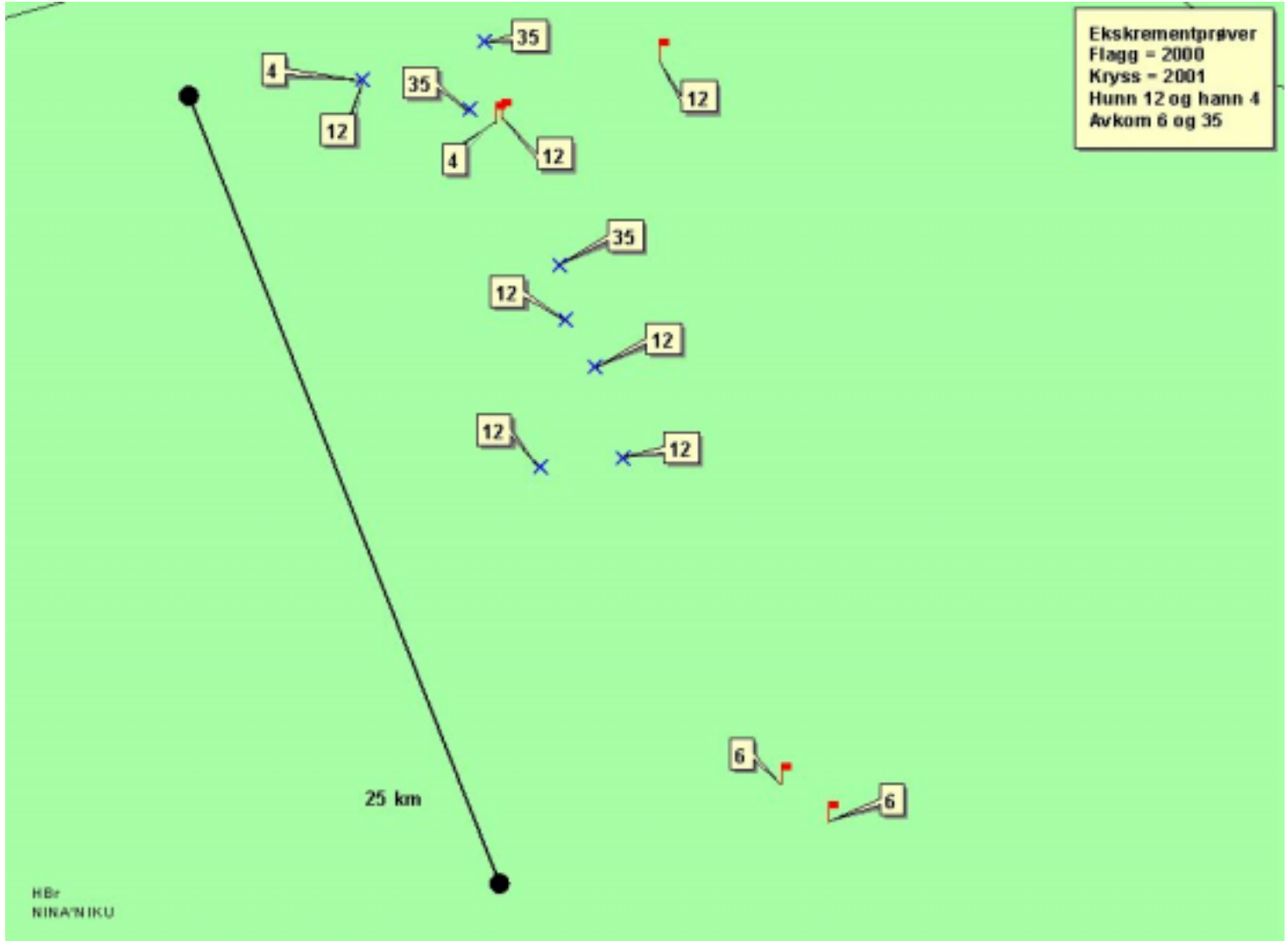


**Figur 4** Lokalitet og kjønn for individer som var representert med en prøve i 2001-materialet. Røde trekanter symboliserer hanner, mens blå firkanter symboliserer hunner.





**Figur 6** Lokalteten til felte dyr i a) 2000 og b) 2001.



**Figur 7** Eksemplifisering av sannsynlig slektskap mellom individer representert i ekskrement-materialet. Røde flagg angir prøver samlet i 2000, mens blå kryss angir prøver fra 2001.