Неинвазивно генотипизиране с приложение върху българските популации на кафява мечка, вълк, дива котка и рис

Нели Иванова [4], Елена Цингарска [4], Александър Дуцов [4], Венислава Рачева [4], Костадин Вълчев [4], Диана Златанова [4], Johannes Becker-Follmann [2], Christiane Frosch [3], Katherine Schteyer [3], Carsten Novak [3], Величка Кърджева[1]

[1]АКВАХИМ АД, България, София, 1582, бул. Цветан Лазаров № 83
[2] Institut für Polymorphismus und Mutationsanalytik, Am Torhaus 55-H8, 66113 Saarbrucken, Germany
[3] Senckenberg Research Institute, Conservation Research Section, Research Station Gelnhausen, Clamecystrasse 12, 63571 Gelnhausen, Germany
[4] Сдружение за дива природа БАЛКАНИ, България, София, 1142, бул. Евлоги и Христо Георгиеви № 93

Увод

Неинвазивното събиране на генетичен материал от диви животни с цел изследване на структурата и размера на популациите им, става все по-популярно през последните години. В рамките на настоящото проучване за първи път бяха въведени методики за събиране и съхранение на генетичен материал на 4 вида от българската фауна и беше разработен протокол за обработка на пробите и анализ на събраните данни.

Материали и методи

Проучването беше осъществено през 2014 - 2015 г. Внедрени бяха методики за неинвазивно пробонабиране за четири вида диви животни в България: кафява мечка (*U. arctos*), вълк (*C. lupus*), дива котка (*F. silvestris*) и рис (*L. lynx*).

Неинвазивно събиране на проби от:

❖ Кафява мечка:

Космени проби се събират чрез космени капани – бодлива тел около дървета и миризлива примамка, както и от маркировъчни дървета.

Проби от екскременти се събират чрез трансектния метод.

Събрани са проби от Стара планина, Витоша и Родопите.

❖ Вълк:

Проби от екскременти и косми се събират чрез трансектния метод.

Събрани са проби от Западни Родопи, Западни покрайнини, Пирин.

❖ Дива котка и рис:

Космени проби се събират с помощта на космени капани – колчета и дървени четки с велкро и пирони, напоени с валерианова тинктура.

Събрани са проби за дива котка и рис (предполагаеми) от Осогово и Западна Стара планина, а само за дива котка от Витоша и Лудогорието.

Пробите от екскременти се съхраняват в контейнери с 96 % спирт, а космените проби - във филтърна хартия, поставена в полиетиленов плик и силикагел.

Анализ на събраните проби:

Методите бяха адаптирани за българските популации на видовете като една част от пробите бяха обработени и анализирани до вид, пол и индивид, посредством конвенционална PCR техника, секвениране и фрагментен анализ на геномен анализатор производство на Applied Biosystems, след което методите бяха адаптирани за апартурата в ИАОС и бяха трансферирани, като анализите на конвенционален PCR се прехвърлиха на Real-time PCR, SYBR Green анализ и последващо секвениране и фрагментни анализ на геномен анализатор GenomLab GeXP (SCIEX, USA).

Резултати

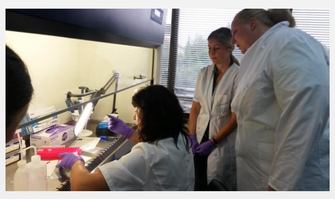
В рамките на проучването събраното количество проби бе достатъчно за разработването и внедряването на генетични методи за идентификация.

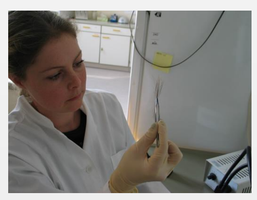
Таблица 1. Проби, събрани чрез неинвазивни и други методи – тип и брой

Вид	Тип проби, събрани чрез неинвазивни методи	Брой	Проби, събрани чрез други методи*
Кафява мечка	косми и екскременти	60	19
Вълк	косми и екскременти	25	-
Дива котка	косми	50	4
Рис	косми	11	-

*Космени проби от мъртви животни (жертви на автомобилния трафик) и уловени с научни цели животни.

Събраните проби бяха обработени за последващи молекулярни анализи чрез ръчна и автоматизирана ДНК екстракция.





ДНК анализите позволиха събраните проби да бъдат определени до:

❖ Род, вид и хаплотип чрез секвениране на митохондриална ДНК, посредством следните праймери:

- Мечка /вид и хаплотип/- L15995, H16498, FUA, CR2R;
- вълк /вид и хаплотип/- L15995, H16498, CR1A, CR2R;
- дива котка /вид/- CanidC1; HCarn200; /хаплотип/- LF4, DLH;
- Рис /вид/- CanidC1; HCarn200; /хаплотип/- CR-L16298 , CR-H16458; CR-L16782; CR-H16922;

❖ пол и индивид чрез фрагментен (микросателитен) анализ на ядрена ДНК, използвайки следните микросателитни и полови маркери:

- Мечка /13 маркера/- G1A; G1D; G10C; G10P; G10H; G10J; G10U; UarMU26; Msut; Mu10; G10L; Mu23; Mu51;
- Вълк /17 маркера/- FH2001; FH2010; FH2017; FH2087; FH2088; FH2096; FH2097; FH2137; FH2140; FH2175; vWF; FH2054; FH2161; CPH5; PEZ17; DBX6; DBX7
- дива котка / 15 маркера/- FCA171; FCA8; FCA571; FCA124; FCA170; FCA149; FCA88; FCA275; FCA364; FCA132; FCA576; FCA232; FCA347; FCA567; Zf.
- Рис/ 16 маркера /: FCA718; FCA008; FCA478; FCA126; FCA723; FCA1018; LCA110; LCA109; FCA031; F115; FCA506; FCA096; FCA069; FCA006; FCA082; Zf.

Заключения

❖ Успешно бяха тествани и въведени методики за събиране и съхранение на проби от диви животни за неинвазивно генотипизиране;

❖ Пробите събрани чрез неинвазивни методи успешно могат да се използват за видово и индивидуално разпознаване;

❖ Резултатите показват, че при достатъчно количество събран материал може да бъде направена оценка на структурата и числеността на дадена популация;

❖ Трудности при прилагане на методиката за неинвазивно събиране на проби за генетичен анализ се оказа събирането на достатъчна извадка от редки видове, както и необходимостта от честа проверка на космените капани.

Благодарности

Това проучване беше осъществено в рамките на проект „Извършване на дейности, свързани с разработване и внедряване на генетични методи за установяване състоянието на видовете (кафява мечка, вълк, дива котка и рис) на територията на Република България“ (Договор № 2687 /27.01.2014 г. между Изпълнителна Агенция Околна Среда и ДЗЗД „АКВА-БАЛКАНИ“), финансиран по Оперативна програма „Околна среда 2007-2013“.