

Протокол за полево събиране, съхранение и транспорт на проби (генетичен материал) от вълк *Canis lupus*

За целите на опазването и управлението на популациите на дивите животни е важно да бъде събирана информация за параметри като: размер на популацията, демография, родствени връзки, структура на популацията и др. Събирането на данни по тези параметри е трудно за видове, които са редки и/или водят скрит начин на живот, каквито са хищниците (Taberlet et al. 1996; Kohn et al. 1999; Creel et al. 2003). Генетичните изследвания заемат все по-важно място при изследването на видове и могат да дадат много ценна информация, както за състоянието на дадени популации, така и за други параметри (например: родствени връзки, миграционни разстояния и др.).

Събирането на проби, подходящи за генетичен анализ може да става по инвазивен или неинвазивен начин. При инвазивния, е необходимо животните да бъдат уловени или убити, за взимане на проба.

Учените, работещи в сферата на консервационната биология и етологията винаги са били заинтересовани от неинвазивните техники за събиране на проби за генетични изследвания, защото не е необходимо животните да бъдат убивани, улавяни или дори обезпокоявани (Taberlet & Luikart, 1999). Неинвазивните генетични изследвания започват да се използват преди около 20 – 25 години (Taberlet & Bouvet, 1991; Taberlet & Bouvet, 1992; Morin et al. 1993; Taberlet et al. 1996 и 1997; Gagneux et al. 1997).

В зависимост от вида, с който се работи и от неговите биологични и екологични особености, неинвазивно могат да бъдат намирани и събирани различен тип проби за извличане на ДНК. Това са: косми, пера, екскременти, урина, кръв, слюнка.

Правилното събиране и съхраняване на тези проби е от първостепенна важност за осигуряване на успешно провеждане на последващите генетични анализи. Резултатите от тези анализи са зависими от качеството на събраните проби и възможни замърсявания (с чужда ДНК). Поради това е необходимо биологичните проби да се събират и съхраняват като се следват някои правила.

Събиране на генетични проби от вълци.

Най-подходящ тип проби за извличане на генетичен материал от вълк *Canis lupus* и начини за събиране и съхраняване

За набавяне на генетични проби от вълк най-подходящо е събирането на проби от тъкан, екскременти, урина и косми от вида.

- ***Събиране на тъканни ДНК проби от мъртви вълци***

Най-удобни и лесни за събиране проби от мъртви вълци са тъканните проби. От мъртвия индивид се отрязва парченце тъкан, за предпочитане от мускул или кожа като се следват предписанията за правилно събиране и съхранение на пробата, посочени по-долу.

- ***Неинвазивно събиране на ДНК проби от вълци***

Вълкът използва урината и екскрементите си за маркиране на територията на семейната група и по тази причина ги оставя на явни места, лесни за намиране

(горски пътища и пътеки). Също така, но по-рядко, при проследяване на вълча дия, на определени места могат да бъдат регистрирани и събрани косми от индивиди на вида (при преминаване на вълците през гъсти харталяци с бодливи тръни, където се закачат космите). С цел успешно извличане на ДНК от косми е необходимо те задължително да са с луковиците (т.е. да не са отрязани, а отскубнати). При намиране на косми, закачили се по клонки в храсталаци, те обикновено са с луковиците. Екскременти могат да се регистрират на места, където вълците са се хранили, т.е. в близост до тяхна жертва или по редовно използвани от тях пътеки в територията им. Както от пресни екскременти, така и от урина, запазена върху снега, могат да бъдат събрани проби, от които да бъде изолирана ДНК за последващи генетични анализи.



Пресен екскремент от вълк в дия



Пресен екскремент от вълк до ядена жертва



Депонирана урина на сняг по вълча дия



Оставени косми при преминаване на вълци под клон

Препоръчително е събирането на проби от вълци да става чрез проследяване на вълча дия в сняг (Caniglia, 2008; Scandura et al., 2011). Този начин на събиране има някои значителни предимства:

- според възрастта на останената дия може да се изчисли с голяма точност преди колко време са оставени пробите (екскременти, урина, косми);
- с много по-голяма вероятност могат да бъдат намерени и събрани проби от повече вълци от семейната група, а не само от доминантните, които използват екскременти и урина за маркиране;

- в някои случаи могат да се направят изводи за това от кой точно индивид от семейната група (възрастен мъжки, възрастен женски, млад и т.н.) е дадена проба;
- ниските температури спомагат за по-добро съхранение на ДНК до събирането;
- при проследяване на вълча диря в сняг има вероятност за намиране и събиране на космени проби от някои индивиди. Това става при проследяване на вълците в места с гъсталаци, където при провирането им под храсти с множество клони и тръни, оставят фъндъци козина или поне по-няколко косми.

Освен при проследяване на вълча диря в сняг, може да се прави обход на горски пътища и пътеки (без наличие на снежна покривка), за които е известно, че се използват от вълците за преминаване. В този случай могат да бъдат събирани основно проби от екскременти. За регистриране и събиране на проби от урина е необходимо проследяване на диря в сняг. Урината се задържа върху и в снега.

Относно търсене и събиране на проби от екскременти в сезони без сняг съществуват някои неудобства:

- Обхождане на много дълги разстояния (трансекти) преди евентуално намиране на наскоро депонирани екскременти, които са годни за взимане на проба за ДНК анализ;
- По-кратки периоди, в които ДНК е съхранена и годна за пробовзимане, изолиране и анализ (поради по-високите температури);
- В повечето случаи възможност за намиране само на екскременти, които са депонирани по горски пътища и пътеки.

Улеснението за избор на трансекти, които да бъдат обхождани в летния период (юли – август) е фактът, че по това време вълците се придържат към сърцевинните си зони. В райони, в които са известни сърцевинните зони на семейните групи се стеснява периметъра, в който се планират трансекти.

Независимо, че съществуват някои улеснения за работа в райони, в които има повече данни за семейните групи, летният период си остава по-неподходящ в сравнение със зимния. Зимният период с наличие на снежна покривка е най-подходящият за намиране на генетични проби от вълци, събрани по неинвазивен метод.

Според Scandura et al. (2011), екскрементите, от които се взимат проби с цел изолиране на ДНК, е необходимо да са не по-стари от няколко дни, до 1 седмица. Caniglia (2008) допуска събиране на проби от екскременти стари до около две седмици (в зимния период). Взима се парче основно от повърхността на началото (тъпата част) на екскрементата. Като правило там е най-голямо съдържанието на ДНК от съответния индивид. Пресните екскременти са с влажна повърхност (изглеждат лъскави) и се характеризират с отчетлива миризма (на хищник). След 24 до 48 часа (в зависимост от температурата) губят лъскавината по повърхността си и стават матови. Допълнителен индикатор за възрастта на екскрементата могат да бъдат оставените отпечатъци в субстрата – пресните следи се отличават с ясно отбелязани възглавнички и нокти и остри ръбове на следата. С течение на времето ръба на следата се изронва.

Полево оборудване и консумативи.

Необходимото оборудване на терен е както следва:

- контейнери с етикети за съхраняване на пробите до пристигането им в лабораторията с етанол 96 % във всеки контейнер;
- чист уред за събиране на пробата без смесването и с ДНК от друг вид или индивид (шпатула, клечка, скалпел, ножче и др.);
- латексови ръкавици;
- хирургична маска за лице;
- **МОЛИВ** (а не химикалка) за надписване на пробата върху етикета и попълване на формуляр;
- GPS за взимане на координати на мястото, където е намерена пробата;
- фотоапарат за заснемане на пробата на мястото на намирането ѝ.

Условия за правилно събиране и съхранение на пробите

- ***Проби от тъкан***

След отрязване на парченце тъкан, пробата се поставя в чисто полипропиелново контейнерче, с добавен 96% етанол количествено съотношение 3:1 (спирт:проба). Етанолът дехидратира пробите, блокирайки биохимичните реакции, които биха разрушили ДНК.

Пробата се отрязва с чист уред (нож или скалпел) и се поставя в чист контейнер с етанол 96% (при липса на такъв може и по-нисък процент за краткосрочно съхранение на пробата). При взимане на проби от повече индивиди в едно и също време е задължително пробата от всеки индивид да се отрязва с отделен чист уред или преди пробовземане от поредния индивид, уреда да се измива и обгорява на пламък, с цел предотвратяване на смесване с ДНК от предходната проба. По нататък се следват останалите предписания, направени в настоящия протокол.

- ***Проби от екскременти***

Подобно на тъканните проби, тези от екскременти се поставят в чисти полипропиленови контейнерчета, с добавен 96 % етанол в количествено съотношение 3:1 (спирт:проба) (Caniglia, 2008; Greco, 2009; Scandura et al., 2011).

- ***Проби от урина***

Урината може да бъде събрана (разредена със сняг) в по-голям контейнер/съд (100 мл) с добавен 96 % етанол.

- ***Проби от косми***

Относно пробите от косми различни автори препоръчват съхраняване или в чисти полипропиленови контейнерчета, с добавен 96 % етанол (Greco, 2009), или в хартиен плик с добавени силициеви топчета за изсушаване (поддържане на пробата суха) (Taberlet et al., 1997; Caniglia, 2008; Greco, 2009; Scandura et al., 2011). Относно пробите от екскременти и урина, е необходимо възможно най-скоро (до 1 – 2 дни) след събирането и съхраняването на пробите в етанол, те да бъдат поставяни на ниска температура в хладилник (до +4°C). При такива условия могат да се запазят за дълго време (няколко години). Някои автори препоръчват замразяване на минусови температури (-20 °C). Транспортирането на контейнера с пробата до лабораторията може да става без допълнително охлаждане (но да не се излага на пряка слънчева светлина и топлина), тъй като ДНК е стабилна за няколко дни при подобни условия.

Според Caniglia (2008), след пристигането им в лабораторията и преди последващи манипулации, пробите трябва да бъдат дълбоко замразявани при

температура -80 °C за поне 10 дни с цел да бъдат унищожени всякакви яйца на *Echinococcus*.



Пресен екскремент от вълк



Взимане на проба от екскремент на вълк

Всяка намерена и събрана проба се етикетира и за нея се попълва и формуляр (приложен е към настоящия протокол). Върху етикета се записва: дата на събиране; име на събралия пробата; латинско наименование на вида, от който е пробата (в случая *Canis lupus*); пол и приблизителна възраст на индивида (ако са известни); GPS координати (при липса на GPS точно описание за местоположението) на мястото на намиране на пробата, приблизителна възраст на пробата (преди колко време е депонирана), при случаите, в които се събират проби от екскременти или урина. Формулярът съдържа същата информация и допълнителна такава за: тип на пробата (екскремент, косми, тъкан); район, в който е намерена пробата (Например: Западни Родопи, 2 км източно от язовир Широка поляна), информация за типа местообитание (гора (тип), открити пространства и др.), качество и възраст на пробата, както и друга информация, която е от значение за последващото изследване. В случаи на взимане на проба директно от мъртъв или жив индивид, се записва мястото, където е убит/заловен индивида.

Места за събиране на генетичен материал

Най-общо, събирането на генетичен материал става в райони с постоянно присъствие на вида, в пригодни местообитания, чрез обход на места (горски пътища и пътеки), за които е известно че се използват от вълци.

Период на пробовземане

Както става ясно от написаното по-горе, най-подходящ период за пробовземане е зимният, при наличие на снежна покривка, с цел възможност за регистриране и проследяване на вълча диря, а и поради по-дългото запазване на годна ДНК при ниските температури. При липса на такива условия, е възможно обходът на „вълчи пътеки“ да бъде правен във всеки друг период от годината. В периода на

раждане и отглеждане на малките (май-август) семейната група се придържа в сърцевинната зона на територията си, като доминиращите индивиди маркират интензивно пътеките в тази зона с екскременти (Zub et al. 2002). Това може да помогне за по-голяма успеваемост при намиране и събиране на проби в летния период, но само за райони, за които са известни сърцевинните зони на семейните групи.

Мерки за безопасност при провеждане на теренната работа

- При работа задължително се използват латексови ръкавици. Всички биологични материали се пипат само с нови ръкавици;
- Пробите от екскременти се събират само с шпатула, скалпел, ножче, клечка или др., върху които няма друг генетичен материал. Събирането никога да не става с голи ръце.
- Пробите (екскременти) не се доближават до лицето за оглед и помириране, без да е поставена хирургична маска на носа и устата;

Литература:

Caniglia R. 2008. Non-invasive genetics and wolf (*Canis lupus*) population size estimation

in the Northern Italian Apennines. PhD. DOCTOR OF PHILOSOPHY Biodiversity and Evolution . Alma Mater Studiorum – University of Bologna. Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica. Settore scientifico disciplinare di afferenza: BIO/05 ZOOLOGIA. Cycle XX

Creel S., Spong G., Sands J. L., Rotella J., Zeigle J., Joe L., Murphy K.M., Smith D. 2003. Population size estimation in Yelloowstone wolves with error – prone noninvasive microsatellite genotypes. *Molecular Ecology* 12, 2003 – 2009.

Gagneux P., Woodruff D. S., Boesch C. 1997. Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. *Molecular Ecology* 6: 861–868.

Greco C. 2009. Genomic characterization of the Italian wolf (*Canis lupus*): the genes involved in black coat colour determination and application of microarray technique for SNPs detection. PhD. DOCTOR OF PHILOSOPHY Biodiversity and Evolution. Alma Mater Studiorum - University of Bologna. Cycle XXI

Kohn M. H., York E. C., Karmradt D. A., Haught G., Sauvajot R. M., Wayne R. K. 1999. Estimating population size by genotyping faeces. *Proceedings of the Royal Society of London B* 266: 657 – 663.

Morin P.A., Wallis J., Moore J.J., Chakraborty R., Woodruff D. 1993. Non-invasive sampling and DNA amplification for paternity exclusion, community structure, and phylogeography in wild chimpanzees. *Primates* 34: 347–356.

Moura A.E., Tsingarska E., Dabrowski M., Czanomska S.D., Jedrzejewska B., Pilot M. 2014. Unregulated hunting and genetic recovery from a severe population decline: the cautionary case of Bulgarian wolves. *Conservation Genetics*, DOI: 10.1007/s10592-013-0547-y.

Pilot M, Branicki W, Jędrzejewski W, Goszczyński J, Jędrzejewska B, Dykyy I, Shkvyrya M, Tsingarska. 2010. Phylogeographic history of grey wolves in Europe. *BMC Evol. Biol.* 10:104

Scandura M., Iacolina L., Capitani C., Gazzola A., Mattioli L., Apollonoi M. 2011. Fine-scale genetic structure suggests low levels of short-range gene flow in a wolf population of the Italian Apennines. *Eur J Wildl Res.* 57:949 – 958

Taberlet P., Bouvet J. 1992. Bear conservation genetics. *Nature* 358: 197.

Taberlet P., Camarra J-J., Griffin S., Uhre`s E., Hanotte O., Waits L. P., Dubois-Paganon C., Burke T., Bouvet J. 1997. Non-invasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Molecular Ecology* 6: 869–876.

Taberlet P., Griffin S., Goossens B., Questiau S., Manceau V., Escaravage N., Waits L. P., Bouvet J. 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* 26: 3189–3194.

Zub K., Theuerkauf J., Jędrzejewski W., Jędrzejewska B., Schmidt K. & Kowalczyk R. 2002: Wolf pack territory marking in the Białowieża Primeval Forest (Poland). *Behaviour* 140: 635–648.