



Оперативна програма „Околна среда 2007 – 2013 г.“



ПРОЕКТ DIR - 5113024-1-48

„Теренни проучвания на разпространение на видове/оценка на състоянието на видове и хабитати на територията на цялата страна – I фаза”

Деятност № 4 „Разработване и внедряване на генетични методи за установяване на видовете кафява мечка (*Ursus arctos*), вълк (*Canis lupus*), дива котка (*Felis silvestris*) и рис (*Lynx lynx*),

Този документ е създаден с финансовата подкрепа на Европейския съюз чрез Оперативна програма „Околна среда 2007 - 2013 г.". Цялата отговорност за съдържанието на документа се носи от Изпълнителна агенция по околна среда и при никакви обстоятелства не може да се приема, че този документ отразява официалното становище на Европейския съюз и правителството на Република България, представявано от Министерство на околната среда и водите.



Изпълнителна агенция по околна среда



Цел на дейността

Разработване и внедряване на методи за генотипиране (вид, пол, индивид, анализ на популацията) на четири вида хищника:

- Мечка (*Ursus arctos*);
- Вълк (*Canis lupus*);
- Дива котка (*Felis silvestris*);
- Рис (*Lynx lynx*);

Изпълнител

Обединение “Аква-Балкани”

Всички материали са налични на адрес:

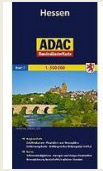
<http://eea.government.bg/bg/bio/opos/activities-results/gienietichni-mietodi-za-analiz>

Основни дейности:

- Полева работа – събиране на проби
- Лабораторна работа – разработване на методиките за изолиране и генотипиране
- Обучения на експерти от ИАОС, РИОСВ, ДНП и ДПП.
- Внедряване на разработените методи в ИАОС

Резултати

1. Разработени 4 методики за неинвазивно взимане на генетичен материал. Методики за полево събиране, съхранение и транспорт на генетичен материал.
 - *формуляр за събиране на проби от екскременти, мечки*
 - *формуляр за залагане на капани и дървета за косми, мечки*
 - *формуляр за полево събиране на проби за генетичен анализ от вълк.*
 - *полеви формуляр за поставяне и проверка на космени капани за дива котка и рис*
 - *формуляр за събиране на кръвни и тъканни проби от дива котка и рис*



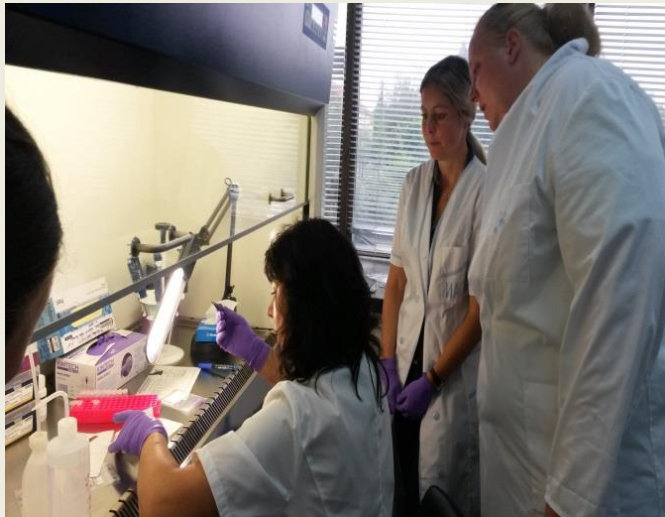
Съхранение на пробите:

- Фекални проби в 96% етанол;
съхранение в хладилник
- Пробите от козина се сгъват във
филтърна хартия и се поставят в
полиетиленов плик със силика гел
за да се запазят сухи; съхраняват се
в тъмни и сухи помещения.



Резултати

2. Методики за автоматично и ръчно изолиране на ДНК от косми, изпражнения и тъкани на кафява мечка (*Ursus arctos*), вълк (*Canis lupus*), дива котка (*Felis silvestris*) и рис (*Lynx lynx*)



Резултати

3. Разработени и внедрени „Методики за генотипиране до вид, пол и индивид на кафява мечка (*Ursus arctos*), вълк (*Canis lupus*), дива котка (*Felis silvestris*) и рис (*Lynx lynx*) “

- *Схема на смесване на праймерите за микросателитен анализ на **Ursus arctus** & Размер на алелите*

- *Схема на смесване на праймерите за микросателитен анализ на **Canis lupos** & Размер на алелите*

- *Схема на смесване на праймерите за микросателитен анализ на **Felis silvestris** & Размер на алелите*

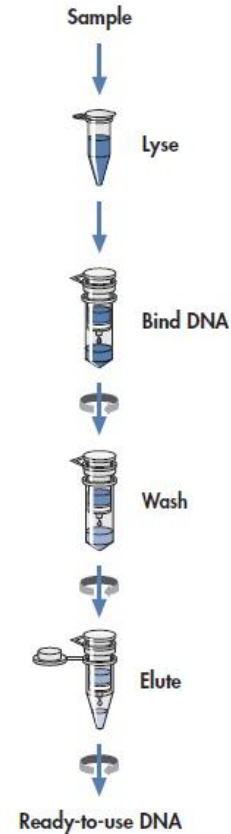
- *Схема на смесване на праймерите за микросателитен анализ на **Felis silvestris LL-MPLX** & Размер на алелите*

Изолиране на ДНК ръчно и автоматизирано

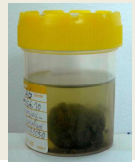
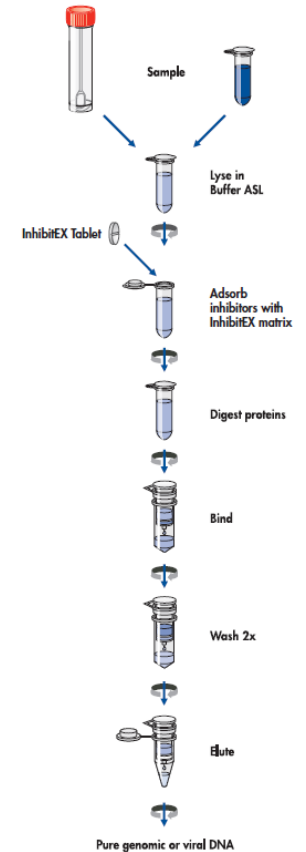
- QIAamp DNA Investigator Kit
 - КОЗИНА
 - КОСТИ/зъби
- QIAamp DNA Stool Kit
 - фекалии
 - урина (сняг)
- QIAamp DNA Blood and Tissue Kit
 - тъкани



QIAamp DNA Investigator Procedure



QIAamp DNA Stool Mini Procedure



Резултати

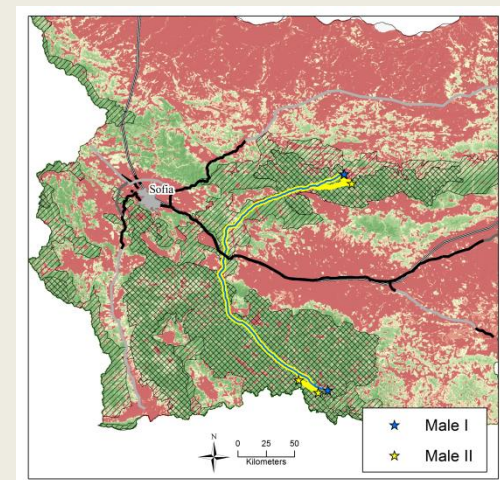
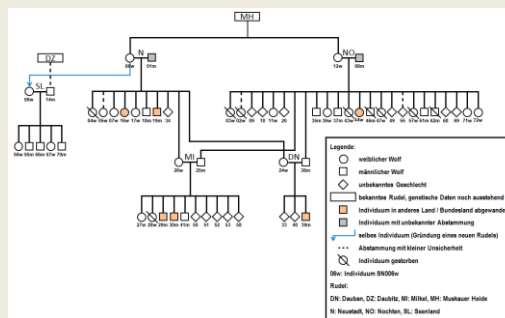
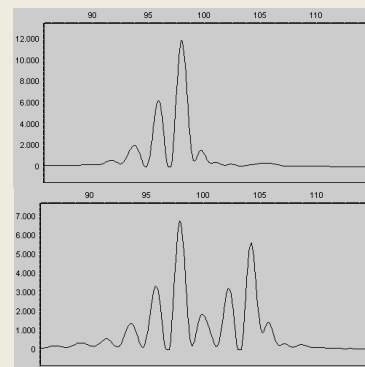
4. Методики за оценка състоянието на видовете на национално ниво, чрез анализ и статистическа обработка на резултатите от генотипирането на кафява мечка (*Ursus arctos*), вълк (*Canis lupus*), дива котка (*Felis sylvestris*) и рис (*Lynx lynx*)

Методики базирани на митохондриална ДНК

- Определяне на Вид ;
- Определяне на хаплотипове – по голям брой хаплотипове, по голямо генетично разнообразие и здрава популация;
- MEGA – брой хаплотипове, хаплотипна мрежа;
- База данни на National Center for Biotechnology Information (NCBI);

Методики базирани на ядрена ДНК – микросателитен анализ

- Идентифицирането на индивиди
- Определяне на пол
- Определяне на хомо и хетерозиготност – хетерозиготните популации са богати на генетично разнообразие;
- разпространение
- популационна структура
- хибридизация
- оценка на големината на популацията
- родствени връзки
- миграция
- генетично разнообразие



Методики за оценка състоянието на видовете на национално ниво чрез анализ и статистическа обработка на резултатите

- Диференциация и структура на популацията – STRUCTURE и STRUCTURE HARVESTER;
- Оценка на размера, генетичното разнообразие и близкородствени кръстосвания - GeneAlex и CAPWIRE



Кафява мечка (*Ursus arctos*)

- 50 проби – изследвани / + 20 за внедряване
 - Косми
 - тъкани
- ДНК изолиране – ръчно и на Biomek 3000
 - Qiagen Investigator Kit
 - DNeasy Blood and Tissue Kit

ДНК анализ

Митохондриална ДНК

Контролен регион L15995 5'-CTCCACTATCAGCACCCAAAG-3' (Taberlet and Bouvet 1994) и H16498 5'-CCTGAAGTAAGAACCAGATG-3' (Fumagalli et al. 1997)

Микросателити

13 микросателита: Msut2, G10C, G10P, G10D, G10L, G10H, G10J, G10U, UarMU26, G1A, Mu10, Mu23 and Mu51 (Bellemain & Taberlet 2004; Kitahara *et al.* 2000; Paetkau & Strobeck 1994; Taberlet *et al.* 1997)

Полови маркери

3 полови маркера (Bidon et al. 2013)



Вълк (*Canis lupus*)

- 32 проби (+10 референтни кучешки проби) - изследвани/
+ 20 за внедряване
 - 22 Фекалии
 - 10 тъкан
 - 10 космени /кучешки/ - хибридизация
- Изолиране на ДНК - ръчно и на Biomek 3000
 - QIAamp DNA Stool Kit
 - DNeasy Blood and Tissue Kit
 - Qiagen Investigator Kit

ДНК анализ

Митохондриална ДНК

Контролен регион L15995 5'-CTCCACTATCAGCACCCAAAG-3' (Taberlet and Bouvet 1994) and H16498 5'-CCTGAAGTAAGAACCAGATG-3' (Fumagalli et al. 1997)

Микросателити

14 микросателита: (Francisco et al. 1996: FH2001, FH2010, FH2017, FH2054; FH2087L, FH2088, FH2096, FH2097, FH2137, FH2140, FH2161; Fredholm & Wintero 1995: CPH5; Shibuya et al. 1994: vWF; Dog Genome Project: PEZ17).

Полови маркера

2 полови маркера (Seddon 2005)

Рис (*Lynx lynx*)

- 10 проби (Германия) - изследвани+ България - ? 😊
 - Козина -1
 - Фекалии - 1
 - Тъкан - 8
- ДНК екстракция - ръчно и на Biomek 3000
 - Qiagen Investigator Kit
 - QIAamp DNA Stool Kit
 - DNeasy Blood and Tissue Kit



ДНК анализ

Митохондриална ДНК

цитохром b CanidC1: 5'AATGACCAACATTCGAAA (Paxinos et al. 1997) HCarn200: 5'ATTCAGCCRTARTTAACGTC (Bidlack et al. 2007) и контролен регион CR-L16298: 5' TCCCAAAGCTGAAATTCTTT и CR-H16456: 5' CAGTGGTTGGTAGGTTAATTTT както и CR-L16782: 5' TAGTGCTTAATCGTGCAAT CR-H16922: 5' CAGATGCCAGGTATAGTTCC (Gugolz et al. 2008)

Микросателити

15 микросателитни маркера (718, 008, 478, 126,723, 1018, 110, 109,031, 115, 506, 069, 096, 006,082; Menotti-Raymond et al. 1999, Carmichael et al. 2000)

Полов маркер

1 полов маркер (Pilgrim 2006)



Дива котка (*Felis silvestris*)

- 73 проби (+10 проби от домашна котка) - изследвани + 20 за внедряване
 - косми
 - тъкан
- Изолиране на ДНК
 - Qiagen Investigator Kit
 - DNeasy Blood and Tissue Kit

ДНК анализ

Митохондриална ДНК

цитохром b: CanidC1 5'AATGACCAACATTCGAAA (Paxinos *et al.* 1997); HCarn200 5'ATTCAGCCRTARTTAACGTC (Bidlack *et al.* 2007) и контролен регион: DLH 5'-CCTGAAGTAAGAACCAGATG-3' (Tiedemann *et al.* 1996a) и Lf4 5'-GACATAATAGTGCTTAA-TCGTGC-3' (Lopez *et al.* 1996)

Микросателитни маркери

14 микростелита: FCA8, FCA171, FCA571 and FCA124; FCA149, FCA170, FCA88 and FCA275; FCA364, FCA132 and FCA576; and FCA232, FCA347 and FCA567 (Menotti-Raymond *et al.*, 1999)

Полов маркер

1 полов маркер (Pilgrim *et al.*, 2005)

Заклучения и препоръки

1. За видовете рис и вълк е необходимо да се предвиди по-голям времеви диапазон за събиране на проби;

- Вълк – зима, при наличие на снежна покривка
- Рис – пролет

2. Работните етапи да бъдат разделени, за да се предотвратят кръстосани замърсявания. Необходимо увеличаване броя на работните помещения и броя на работещите специалисти в лаборатория „Биологичен мониторинг“ при ИАОС.

Заклучения и препоръки

3. Необходимо е увеличаване на времето за анализ на проби от изпражнения и косми, когато те не са с добро качество.

4. Да се направи добър подбор на положителни /референтни/ контролни проби за българската популация на всеки от четирите вида. Препоръчва се за бъдещата работа, от изследваните проби да се изберат по 2 броя (една от мъжки индивид и една от женски индивид) дали добър резултат, които да се използват, като бъдещи положителни контроли за вида.

БЛАГОДАРЯ ЗА ВНИМАНИЕТО

