

Kvalitetssikring av metodikk og kalibrering av genetiske data fra jerv-ekskrementer

Øystein Flagstad



NINAs publikasjoner

NINA Rapport

Dette er en ny, elektronisk serie fra 2005 som erstatter de tidligere seriene NINA Fagrapport, NINA Oppdragsmelding og NINA Project Report. Normalt er dette NINAs rapportering til oppdragsgiver etter gjennomført forsknings-, overvåkings- eller utredningsarbeid. I tillegg vil serien favne mye av instituttets øvrige rapportering, for eksempel fra seminarer og konferanser, resultater av eget forsknings- og utredningsarbeid og litteraturstudier. NINA Rapport kan også utgis på annet språk når det er hensiktsmessig.

NINA Temahefte

Som navnet angir behandler temaheftene spesielle emner. Heftene utarbeides etter behov og serien favner svært vidt; fra systematiske bestemmelsesnøkler til informasjon om viktige problemstillinger i samfunnet. NINA Temahefte gis vanligvis en populærvitenskapelig form med mer vekt på illustrasjoner enn NINA Rapport.

NINA Fakta

Faktaarkene har som mål å gjøre NINAs forskningsresultater raskt og enkelt tilgjengelig for et større publikum. De sendes til presse, ideelle organisasjoner, naturforvaltningen på ulike nivå, politikere og andre spesielt interesserte. Faktaarkene gir en kort framstilling av noen av våre viktigste forskningstema.

Annen publisering

I tillegg til rapporteringen i NINAs egne serier publiserer instituttets ansatte en stor del av sine vitenskapelige resultater i internasjonale journaler, populærfaglige bøker og tidsskrifter.

Norsk institutt for naturforskning

Kvalitetssikring av metodikk og kalibrering av genetiske data fra jerv-ekskremer

Øystein Flagstad

Flagstad, Ø. 2007. Kvalitetssikring av metodikk og kalibrering av genetiske data fra jervekskrementer - NINA Rapport 260, 29 s.

Trondheim, mai 2007

ISSN: 1504-3312

ISBN: 978-82-426-1822-1

RETTIGHETSHAVER

© Norsk institutt for naturforskning

Publikasjonen kan siteres fritt med kildeangivelse

TILGJENGELIGHET

[Åpen]

PUBLISERINGSTYPE

Digitalt dokument (pdf)

KVALITETSSIKRET AV

Henrik Brøseth

ANSVARLIG SIGNATUR

Forskningsjef Inga Elise Bruteig (sign.)

OPPDRAGSGIVER(E)

DN

KONTAKTPERSON(ER) HOS OPPDRAGSGIVER

Morten Kjørstad, Terje Bø

FORSIDEBILDE

Jervtispe i den sørnorske bestanden våren 2005 (Ind72)

Foto: Roy Andersen

NØKKEWORD

Jerv, Gulo gulo, ekskrementer, DNA, overvåking, laboratorie-analyse, kvalitetssikring, datakalibrering

KEY WORDS

Wolverine, Gulo gulo, faeces, DNA, monitoring, laboratory analysis, quality control, calibration of data

KONTAKTOPPLYSNINGER

NINA hovedkontor
7485 Trondheim
Telefon: 73 80 14 00
Telefaks: 73 80 14 01

NINA Oslo
Gaustadalléen 21
0349 Oslo
Telefon: 73 80 14 00
Telefaks: 22 60 04 24

NINA Tromsø
Polarmiljøsenteret
9296 Tromsø
Telefon: 77 75 04 00
Telefaks: 77 75 04 01

NINA Lillehammer
Fakkelgården
2624 Lillehammer
Telefon: 73 80 14 00
Telefaks: 61 22 22 15

www.nina.no

Sammendrag

Flagstad, Ø. 2007. Kvalitetssikring av metodikk og kalibrering av genetiske data fra jervekskrementer - NINA Rapport 260, 29 s.

Genetiske analyser er de siste årene blitt implementert som et viktig verktøy i rovvilt-observasjonen. I særlig grad er det DNA-analyser av rovdirekskrementer som har ekspandert voldsomt, og disse teknikkene brukes i dag i en eller annen form for alle våre fire store rovdyrarter. Resultatene av analysene har gitt forvaltende myndigheter en bedre forståelse av bestandsstørrelse, reproduksjon, populasjonsstruktur og immigrasjon. Enda bedre utbytte vil en imidlertid ha av disse dataene dersom en kan kombinere data generert ved ulike laboratorier. Dette er ikke uten videre uproblematisk siden de genetiske rådataene, som for eksempel mikrostaelitter, vil tolkes noe ulikt mellom laboratorier. Dette skyldes små forskjeller i analysemaskineriet ved de ulike laboratoriene. Vi initierte derfor et pilotprosjekt der vi ville se på muligheten for kalibrering av genetiske data. Vellykket kalibrering vil sikre kompatibilitet av data produsert ved ulike laboratorier, og at datasettene således kan kombineres i fremtidige analyser. En annen viktig målsetning var å kvalitetssikre nåværende "state-of-the-art" metodikk for genotyping av ekskrementer ved NINAs genetiske laboratorium. Prosjektet ble gjennomført ved å reanalysere et relativt stort antall jervekskrementer som tidligere var analysert i Uppsala, for deretter å vurdere kompatibiliteten av datasettene fra de to ulike laboratoriene.

Kvaliteten på analysene var gjennomgående god. Suksessraten for fungerende prøver og feilprosenten i enkeltreplikater lå omtrent på samme nivå som for tilsvarende materiale analysert i Uppsala. Vi konkluderer med at nøyaktig oppfølging av forhåndsdefinerte regler for akseptering av genotyper og tilstrekkelig mange replikater vil gi svært høy sannsynlighet for at den endelige DNA-profilen for hver enkelt prøve blir korrekt.

En kalibreringsnøkkel ble laget på bakgrunn av fem prøver som var analysert både på NINA og i Uppsala. Prøvenes DNA-profiler viste at allel størrelsene produsert på NINA måtte justeres noe opp eller ned for de fleste markører for å være kompatible med dataene som tidligere var produsert i Uppsala. Ytterligere 38 prøver som var analysert i Uppsala ble inkludert i analysen, og dataene ble automatisk justert i henhold til kalibreringsnøkkelen. Samtlige prøver hadde identiske DNA-profiler mellom de to laboratoriene etter justering. Resultatene viste på en overbevisende måte at nøyaktig kalibrering av genetiske data fra flere ulike laboratorier er mulig dersom man har et felles referansemateriale.

Ut fra analysene som er gjennomført i denne pilotstudien er det ingen grunn til å tro at datakalibreringen vil være mer problematisk for de andre rovviltartene våre. Dette fordi de skandinaviske bestandene for alle de fire artene av store rovdyr har et relativt begrenset og oversiktlig sett med alleler for hver av markørene som er i bruk i dag. Vi ser derfor meget optimistisk på opprettelsen og bruken av en felles database over genetiske data for rovvilt i Skandinavia, og er overbevist om at kalibrerte data fra ulike laboratorier kan kombineres i fremtidige analyser.

Øystein Flagstad, Norsk institutt for naturforskning, 7485 Trondheim. oystein.flagstad@nina.no

Abstract

Flagstad, Ø. 2007. Quality control and calibration of genetic data from wolverine scats - NINA Rapport 260, 29 pp.

Genetic analysis has over the last decade been implemented as an important tool in monitoring of large carnivores in Scandinavia. In particular, DNA analysis of carnivore scats has been extensively used, and these techniques have been implemented for all four large Scandinavian carnivores. The results of the analyses have given the management authorities a better understanding of population size, reproduction, population structure, and immigration. However, the data can be even more useful if it is possible to combine data from different laboratories. This is not necessarily unproblematic since the interpretation of genetic raw data, such as microsatellite profiles, will differ slightly between different laboratories. This is due to specificities of the genotyping instruments used in the different laboratories. Therefore, we initiated a pilot project to examine the possibilities for calibration of genetic raw data. Successful calibration will ensure compatibility of data produced at different laboratories, and that the data sets can be combined in future analyses. Another important goal of this project was to implement and test the quality of present "state-of-the-art" methodology for genotyping of scats at our genetic laboratory. In order to do this, we re-analysed a relatively large number of wolverine scats that earlier had been analysed at Hans Ellegren's laboratory in Uppsala. The results obtained at the two laboratories were compared and the compatibility between the two data sets was examined and discussed.

In general, the quality of the laboratory analysis was satisfactory. The success rate and genotyping error rate were found to be at the same level as was obtained in Uppsala based on the same material. We concluded that pre-defined rules for acceptance of genotypes and a sufficient number of replicates will ensure a high probability that the final DNA profile is correct for samples analysed in our laboratory.

A key for calibration of data was generated based on the results from five samples that had been analysed at both laboratories. The DNA profiles showed that the allele sizes produced at NINA needed to be slightly adjusted for most markers to be compatible with the data that had earlier been generated in Uppsala. Another 38 samples were included in the analysis and the data was automatically modified according to the calibration key. All samples had identical DNA profiles between the two laboratories after adjustment. These results convincingly show that appropriate calibration of genetic data from different laboratories indeed is possible if a common reference material is available.

Judged from the results of this pilot study, there is no reason to believe that data calibration will be more problematic for any of the other carnivore species in Scandinavia. This is because the Scandinavian populations of all four species have relatively few alleles for all markers that are in use. We are thus quite optimistic regarding the initiative to generate a common Scandinavian database for genetic data of carnivores. Indeed, we are convinced that calibrated data from different laboratories can be combined in future analysis.

Øystein Flagstad, Norsk institutt for naturforskning, 7485 Trondheim. oystein.flagstad@nina.no

Innhold

Sammendrag	3
Abstract	4
Innhold	5
Forord	6
1 Bakgrunn	7
2 Metodikk	7
2.1 Laboratorieanalyser	7
2.2 Datakalibrering	8
3 Resultater og diskusjon	9
3.1 Suksessrate og genotypningsfeil	9
3.2 Kalibrering av data og individbestemmelse	11
4 Konklusjon	13
5 Referanser	14
Vedlegg 1	15
Vedlegg 2	18
Vedlegg 3	26

Forord

Forvaltende myndigheter i Norge og Sverige har gjennom opprettelsen av en felles skandinavisk database for rovdyrgenetikk uttrykt ønske om at data produsert i ulike laboratorier skal kunne kombineres og at DNA-profiler generert i ulike laboratorier skal være fullstendig kompatible. På denne måten kan hver enkelt DNA-profil i databasen knyttes til et bestemt individ uansett hvor prøvene som representerer dette individet er analysert. Det rapporterte pilotprosjektet kan ansees som et skritt på veien for å sikre en slik kompatibilitet, og således at datasett produsert i ulike laboratorier skal kunne kombineres i formelle analyser. Vi anser dette som et meget viktig initiativ, og ser et stort potensial for fremtidig samarbeid mellom de ulike forskningsgruppene som i dag gjør DNA-analyser på våre store rovdyr. Vi takker Hans Ellegren, Cecilia Wärdig og Malin Johansson for å stille rådata produsert ved Uppsala Universitet til rådighet for komparative analyser.

Trondheim 11. mai, Øystein Flagstad

1 Bakgrunn

Genetiske analyser er de siste årene blitt implementert som et viktig verktøy i rovvilt-overvåkingen. I særlig grad er det DNA-analyser av ekskrementer som har ekspandert voldsomt, og disse teknikkene brukes i dag i en eller annen form for alle våre fire store rovdyrarter. Resultatene av analysene har gitt forvaltende myndigheter en bedre forståelse av bestandsstørrelse, reproduksjon, populasjonsstruktur og immigrasjon.

Jervens begrensede utbredelse i Europa gir Norge og Sverige et spesielt ansvar for å bevare den i et langsiktig perspektiv, og et omfattende overvåkingsprogram er nødvendig for å følge bestandsutviklingen. Metodeutvikling og genetiske analyser innenfor jervovervåkingen har siden 2000 blitt gjennomført i Hans Ellegrens laboratorium ved Uppsala Universitet (Flagstad et al. 2004, Flagstad et al. 2007), mens selve overvåkingsprogrammet og innsamling av materiale har vært ledet av NINA. Gjennom sin strategiske satsing på genetikk, kan NINA også bli en viktig leverandør av genetiske data. Maksimal overføringsverdi krever imidlertid at analyser ved NINA kalibreres opp mot metodene som er utviklet i Uppsala. Vi initierte derfor et pilotprosjekt for å sikre identisk tolkning av genetiske profiler ved de to ulike laboratoriene. Dette ble gjort ved å reanalysere et relativt stort antall jervekskrementer som tidligere var analysert i Uppsala for deretter å vurdere kompatibiliteten av datasettene fra de to laboratoriene.

2 Metodikk

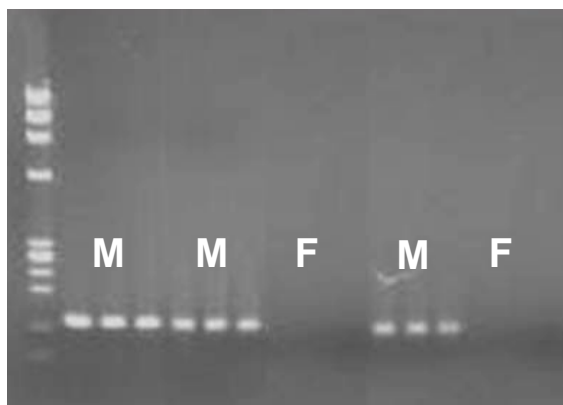
2.1 Laboratorieanalyser

DNA ble isolert fra totalt 71 prøver samlet inn i 2005. Av disse hadde 47 gitt jervspesifikke DNA-profiler ved tidligere analyse i Uppsala, mens de resterende 24 ikke hadde latt seg analysere. Isoleringsmetodikken var den samme som er blitt brukt i Uppsala med utgangspunkt i Qiagens spesialdesignede kit for isolering av DNA fra ekskrementer (QIAamp DNA stool mini kit, se **Vedlegg 1** for en mer detaljert beskrivelse av isoleringsprotokollen).

Prøvenes artstilhørighet ble testet ved bruk av en mitokondriell markør der en, basert på lengdeforskjeller i det analyserte fragmentet, kan skille mellom jerv, fjellrev og rødrev (Kvaløy 2004; Landa et al. 2005). Vi gjennomførte artstesten på de 24 prøvene som ikke hadde fungert ved tidligere analyser. De som ble bestemt som jerv ble sammen med de 47 tidligere analyserte prøvene tatt videre til individbestemmelse. Individbestemmelsen ble basert på 8 mikrosatelitt-markører: Gg7 (Davies and Strobeck 1998), Ggu14, Ggu42, Gg443, Gg454, Gg465 (Walker et al. 2001), Gg216 (Duffy et al. 1998), og Mvis075 (Fleming et al. 1999).

Basert på resultatene fra et pilotstudium (Hedmark et al. 2004), la vi følgende kriterier til grunn for robust genotyping. En prøve 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. En prøve som er heterozygot (dvs. har to ulike genetiske varianter) for en markør, må vise et slikt mønster i minst to uavhengige replikater for at individet skal aksepteres som heterozygot for dette locuset.

Alle individuelle prøver er kjørt i minst 3 replikater for hvert locus. Prøver med genotyper som kunne aksepteres i henhold til disse kriteriene på minst seks markører ble ansett som ferdig-analysert, og klare til å individbestemmes. Prøver der svært mange replikater mislyktes eller der det var sterk grad av inkonsistens på tvers av replikater, ble strøket fra datasettet. De resterende prøvene ble vurdert å være av god nok kvalitet til å analyseres. For imidlertid å kunne



Figur 1 Kjønnstest for fem prøver, tre replikater per prøve. M=hann, F=hunn

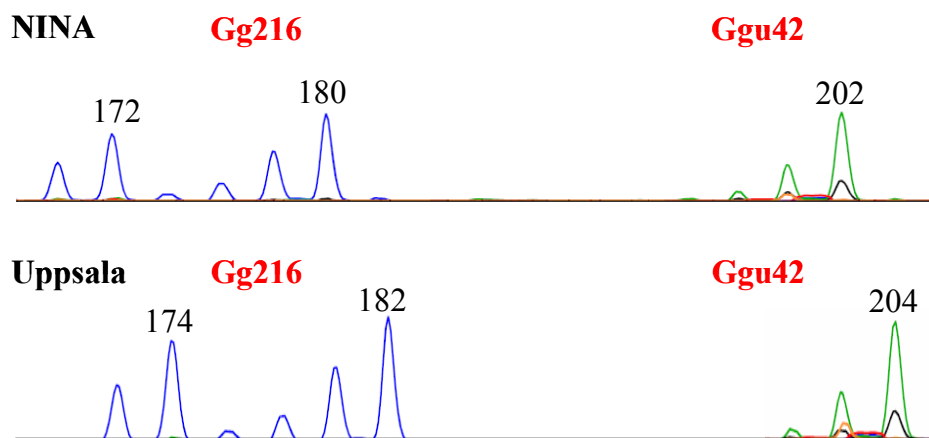
detektere genotypingsfeil med stor grad av sikkerhet, kjørte vi ytterligere tre replikater på tvers av alle markører for disse prøvene. Prøvene ble også kjønnsbestemt ved hjelp av en kjønnsmarkør (DBYGgu7; Hedmark et al. 2004). Dette er en hannspesifikk markør lokalisert til Y-kromosomet, og vil således kun fungere for hanner. Markøren visualiseres ved UV-eksponering, hvorpå en kan avlese kjønn for den aktuelle prøven i form av et synlig bånd for hanner og intet slikt bånd for hunner (**Figur 1**). Tre replikater pr prøve ble brukt i kjønnsbestemmelsen.

Ti av prøvene ble analysert for å kalibrere ytterligere 11 markører: Tt4 (Davies and Strobeck 1998), Ggu10, Ggu25, Gg452, Gg470, Gg471 (Walker et al. 2001), Gg101B, Gg234 (Duffy et al. 1998), Mvis057 (O'Connell et al. 1996), Mvis075 (Fleming et al. 1999), og Lut604 (Dallas and Pierny 1998). Disse markørene innlemmes i analysene når det er påkrevd med spesielt høy oppløsning, f.eks. ved slektskapsanalyser eller detaljert analyse av populasjonsstruktur.

For mest mulig standardisert analyse brukte vi en såkalt "touchdown"-protokoll for all mikrosatelittamplifisering (PCR). I vårt spesifikke tilfelle brukte vi seks touchdown-sykler der annealingstemperaturen ble redusert fra 58 til 52°C, fulgt av ytterligere 33 sykler med annealing ved 52°C. Alle PCR-produkter ble kjørt på en ABI3130 for generering av DNA-profiler.

2.2 Datakalibrering

DNA-profilene fra fem individer ble brukt som grunnlag for kalibrering av dataene. Her ble DNA-profiler generert i Uppsala og ved NINA sammenlignet og en kalibreringsnøkkel ble laget basert på lengdeforskjeller på de ulike markørene. Prinsippet for tillaging av kalibreringsnøkkel er illustrert i **figur 2**. For de to markørene som er angitt i illustrasjonen ser vi at Uppsalas analysemaskin tolker allel størrelsen to basepar (bp) lengre enn maskinen ved NINAs laboratorium. Dersom forskjellen i allel størrelser er konsistent for alle individer som kalibreringen baseres på, vil det i praksis bety at NINA må oppjustere sine allel størrelser med 2 bp for alle analyserte prøver på disse to markørene for å få data som er compatible med Uppsalas data. Andre markører må kanskje oppjusteres med 1 bp eller 3 bp, for andre igjen kan det være aktuelt å trekke fra 1 bp eller 2 bp, mens enkelte av markørene gir identiske allel størrelser ved de to laboratoriene. Alle markører ble kalibrert på denne måten, og en justert genotype ble automatisk generert i Excel ut i fra kalibreringsnøkkelen. De justerte dataene ble så brukt til individbestemmelsen, som altså var basert på 8 markører. Resultatene fra Uppsala og NINA ble sammenlignet og eventuelle uoverensstemmelser ble notert.



Figur 2 Prinsippet for tillaging av en kalibreringsnøkkel. Illustrasjonen viser analyseresultat fra to laboratorier for et individ på tvers av to markører. For nøyaktig og sikker kalibrering bør kalibreringsgrunnlaget være basert på minst 5 individer der flest mulig alleler er representert.

3 Resultater og diskusjon

3.1 Suksessrate og genotypningsfeil

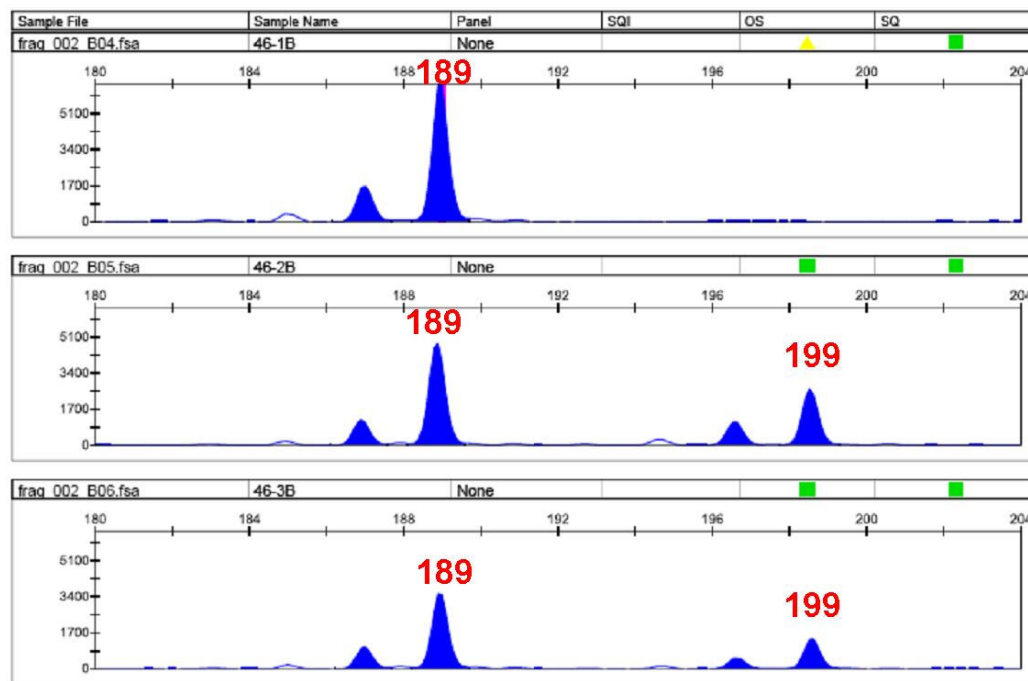
DNA ble isolert fra totalt 71 prøver, hvorav 47 hadde gitt fungerende DNA ved laboratoriet i Uppsala, mens de resterende 24 ikke hadde fungert. 43 av de 47 opprinnelig fungerende prøvene gav DNA-isolater av god nok kvalitet til å gi tolkbare DNA-profiler fra våre analyser. De resterende fem gav ikke-konsistente DNA-profiler på tvers av uavhengige replikater eller fungerte ikke i det hele tatt, og ble tatt ut av analysen. Til gjengjeld fikk vi tolkbare resultater fra tre av de prøvene som opprinnelig ikke hadde fungert i Uppsala. Dette viser at det er en viss variasjon i kvaliteten også blant fungerende prøver, slik at en prøve som har gitt fungerende DNA fra en isoleringsrunde, ikke behøver å gi DNA av god nok kvalitet i neste runde. Likeledes kan enkelte av de prøvene der første isoleringsforsøk mislykkes gi fungerende DNA ved reanalyse.

Alle 24 prøver som opprinnelig ikke fungerte i Uppsala ble testet for artstilhørighet, eksemplifisert for ti av prøvene i **figur 3**. Kun fem av disse 23 prøvene (25 %) var av sikker jervopprinnelse, mens hele 14 (58 %) var rødrevskremler. Artstesten mislyktes for fire av prøvene. Dersom dette er et representativt bilde, kan det se ut som drøyt halvparten av de ikke-fungerende prøvene er rødrevskremler. Med en suksessrate på ca 60 %, betyr det at drøyt 20 % av alle prøver samlet inn i forbindelse med overvåkingen av den sørnorske jervbestanden kan være rødrevskremler, og at den reelle suksessraten for faktiske jervekskremler har ligget på ca 80 % snarere enn 50-60 % som har vært rapportert for flere innsamlingsseonger. Våre resultater viser også at det kan være verdt å kjøre artstesten for alle ikke-fungerende prøver, og reanalysere de som er av sikker jervopprinnelse. Tre av fem prøver i denne kategorien gav tolkbare DNA-profiler fra reanalysen ved vårt laboratorium. En slik strategi vil potensielt kunne øke antall analyserte prøver i det ferdige datasettet med 10-15 %.

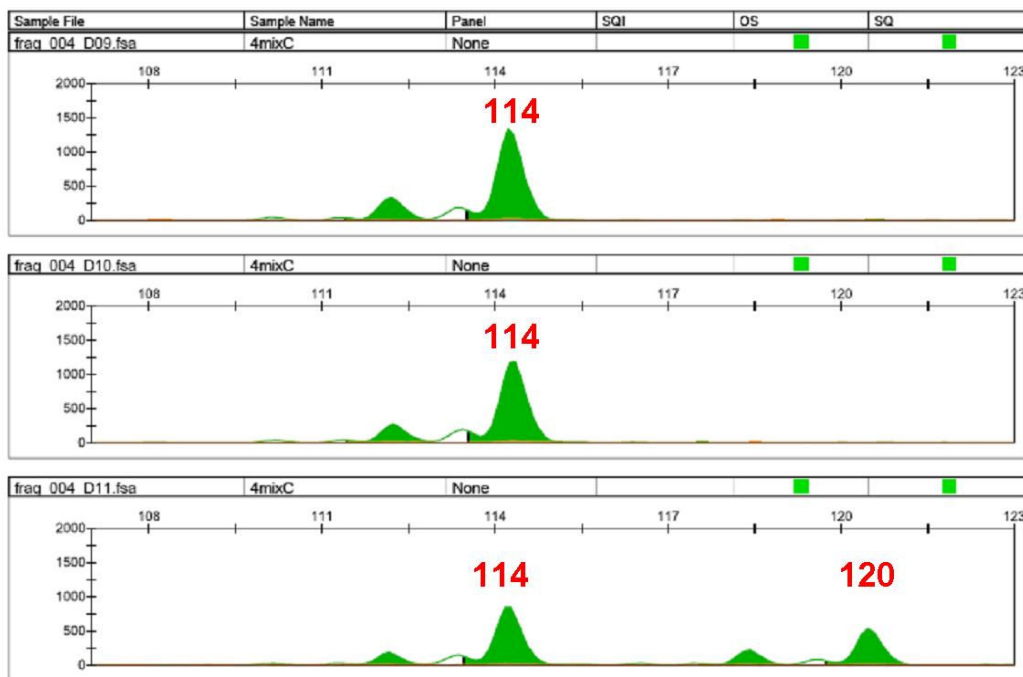


Figur 3 Artsbestemmelse for ti prøver som ikke gav fungerende jerv-DNA ved opprinnelig analyse i Uppsala. Tallene er løpenummer for hver av de ti prøvene. De tre båndene til høyre angir forventet lengde på fragmentet dersom prøven kommer fra fjellrev (F), rødrev (R) eller jerv (J). Av disse ti prøvene er det bare nr 63 som er jerv, mens de resterende ni er rødrev.

Genotypingskvaliteten for de 46 fungerende prøvene var meget tilfredsstillende (**Vedlegg 2, Vedlegg 3**). Legger en til grunn de åtte markørene som individbestemmelsen var basert på, fant vi totalt 33 såkalte "allelic drop-out", dvs genotypingsfeil der et av de to allelene faller ut på et heterozygot locus og således ikke vil detekteres i den synlige DNA-profilen (**Figur 4**). Dette er den vanligste formen for genotypingsfeil, og dersom analysene ikke replikeres tilstrekkelig mange ganger kan feil av denne typen føre til feil i den endelige DNA-profilen, som igjen kan føre til at det dukker opp falske individer i datasettet. De observerte allelic drop-out utgjør 6,1 % av 553 enkeltreplikater der den korrekte genotypen er heterozygot. Dette er i tråd med drop-out raten på mindre enn 10 % som er rapportert for det sør-norske materialet analysert i Uppsala fra 2001-2006. Åtte av de resterende elleve markørene fungerte tilfredsstillende. De tre siste markørene fungerte ikke eller i beste fall svært dårlig, og ble strøket fra analysen. Den totale drop-out raten for de ti prøvene som ble kjørt for alle 16 fungerende markører var på 6,4 %, altså så å si identisk med resultatet fra alle 46 prøver på tvers av åtte markører.



Figur 4 Eksempel på allelic dropout der allel 199 har falt ut for det første av tre replikater.



Figur 5 Eksempel på et falskt allel der den korrekte genotypen er homozygot for 114, men der et falskt allel 120 dukker opp i det siste av tre replikater. For å blindt kunne gjenkjenne det falske allelet i dette tilfellet burde vi gjort ytterligere tre replikater for denne markøren.

En sjeldnere form for genotypingsfeil er såkalte falske alleler, som av og til vil dukke opp i enkeltreplikater. Dette er artefakter som kan være til forveksling lik ekte alleler, slik at et individ som er homozygot (en genetisk variant) på et locus vil fremstå som heterozygot (to genetiske varianter) på dette locuset (**Figur 5**). En sjelden gang observerer vi også tre alleler for et locus, hvorav et er falskt. Totalt observerte vi 10 slike falske alleler på 1320 fungerende enkeltreplikater. Dette gir en meget lav feilprosent på 0,8 %, som også er i tråd med det som er rapportert fra Uppsala 2001-2006. Den lave feilprosenten tilsier at de fleste feil, om ikke alle, burde være detektert og utelukket fra de endelige DNA-profilene forut for individbestemmelsen.

3.2 Kalibrering av data og individbestemmelse

Fem prøver ble brukt til å lage en kalibreringsnøkkel (**Tabell 1**). For at dataene produsert ved NINA skulle være compatible med det som var produsert i Uppsala, måtte allel størrelsene justeres opp 1 eller 2 bp for de aller fleste markørene. To markører måtte justeres opp 3 bp, mens en måtte justeres ned 1 bp. Kun to markører gav eksakt samme allel størrelse på de to laboratoriene. Ved å justere dataene i henhold til denne kalibreringsnøkkelen kunne vi så bruke databasen over individuelle genotyper fra Uppsala til å bestemme hvilke individer de analyserte prøvene våre representerte. Individbestemmelsen ble utført som en blindtest ved at vi dataene våre ble justert automatisk ved hjelp av en Excel-makro, og så matchet opp mot alle individuelle jervgenotyper i Uppsala-databasen.

Av de 46 fungerende prøvene våre var 43 tidligere analysert i Uppsala. Dataene våre for alle disse 43 prøvene matchet perfekt med et eller to individer i databasen. I 40 av tilfellene kunne vi basert på DNA-profilen alene med sikkerhet slå fast at det dreide seg om et enkelt individ. Hver av de tre resterende prøvene hadde DNA-profiler som var identiske med to ulike individer

Tabell 1 DNA-profiler for 5 prøver generert ved laboratoriene på NINA og EBC i Uppsala. For at dataene skal være kompatible mellom de to laboratoriene, ser vi at allel størrelsen må justeres noen få basepar opp eller ned for de aller fleste markører. Justeringskolonnen angir hvor mange basepar NINA-dataene må justeres for å være kompatible med Uppsala-dataene. Brun bakgrunn er angitt for de åtte markørene som ble brukt til individbestemmelsen, mens de resterende åtte markørene har rød bakgrunn.

	Ind140 (R306150)		Ind88 (R306380)		Ind147 (R306454)		Ind175 (R306455)		Ind542 (R306707)		
Markør	NINA	EBC	NINA	EBC	NINA	EBC	NINA	EBC	NINA	EBC	Justering
Gg7	166 170	167 171	168 170	169 171	166 170	167 171	168 170	169 171	168 168	169 169	+1
Gg14	189 189	191 191	189 199	191 201	189 199	191 201	197 199	199 201	189 199	191 201	+2
Gg42	202 202	204 204	202 202	204 204	202 202	204 204	202 202	204 204	202 204	204 206	+2
Mvis75	138 140	141 143	136 138	139 141	134 140	137 143	134 140	137 143	134 138	137 141	+3
Gg216	174 174	176 176	174 180	176 182	172 174	174 176	172 180	174 182	174 176	176 178	+2
Gg443	95 95	96 96	95 95	96 96	95 95	96 96	95 95	96 96	95 99	96 100	+1
Gg454	138 138	140 140	134 136	136 138	138 140	140 142	134 140	136 142	138 140	140 142	+2
Gg465	183 183	183 183	173 181	173 181	173 173	173 173	173 183	173 183	183 183	183 183	0
Gg25	163 165	164 166	163 165	164 166	157 165	158 166	157 163	158 164	163 165	164 166	+1
Mvis72	265 267	265 267	267 269	267 269	267 267	267 267	265 265	265 265	267 267	267 267	0
Gg101	145 151	147 153	145 145	147 147	151 151	153 153	143 143	145 145	145 151	147 153	+2
Gg234	97 101	98 102	91 97	92 98	91 91	92 92	91 101	92 102	91 97	92 98	+1
Gg452	113 113	114 114	113 113	114 114	113 115	114 116	115 115	116 116	115 115	116 116	+1
Gg470	113 115	116 118	115 115	118 118	113 113	116 116	113 115	116 118	115 115	118 118	+3
Gg470	115 117	117 119	115 115	117 117	117 117	119 119	115 115	117 117	115 115	117 117	+2
Lut604	114 120	113 119	114 120	113 119	114 114	113 113	120 120	119 119	- -	113 113	-1

i databasen på tvers av de 8 anvendte markørene. Det var likevel ingen tvil om hvilket individ det dreide seg om. I to av tilfellene hadde de to matchende individene forskjellig kjønn. For det siste individparet var et av de to dyra representert med en vevsprøve fra et hiuttak gjort i 2004, altså en død jerv som ikke kunne gjenfinnes i 2005. Alle de matchende individene var de samme som var identifisert fra de aktuelle prøvene i Uppsala (Flagstad et al. 2006). Disse resultatene viser at kalibreringen har fungert utmerket og at kvaliteten på genotypingen er god nok til sikker identifisering av individer og kjønn.

To av de tre prøvene som ikke tidligere var analysert i Uppsala gav også en utvetydig match i databasen. R306420 representerer Ind176, en hann som ble observert første gang i 2005 i Rindal kommune, mens R306402 representerer Ind771. Denne prøven ble samlet inn i februar i Tydal kommune, ca tre mil fra svenskegrensen. Sent i juni finner vi så igjen denne tispa ca ti mil inne i Jämtland der hun rapporteres å ha etablert seg på et hi. Trolig er dette ei ung tispe som våren/forsommeren 2005 var i ferd med å etablere territorium et godt stykke fra fødestedet sitt. Den siste prøven, R306443, representerer en ny hann i Surnadal kommune.

4 Konklusjon

Første delmål i dette pilotprosjektet var å kvalitetssikre nåværende "state-of-the-art" metodikk for genotyping av ekskrementer ved NINAs genetiske laboratorium. Vi fulgte etablerte metoder utviklet ved Hans Ellegrens laboratorium i Uppsala med meget tilfredsstillende resultater. Både suksessraten for fungerende prøver og feilprosenten for genotypingen lå på samme nivå som for tilsvarende materiale analysert i Uppsala. Våre analyser viste videre at mange av de ikke-fungerende prøvene er rødrevskrementer (58 %), mens bare 25 % var sikre jervekskrementer. Tre av de fem ikke-fungerende verifiserte jervekskrementene gav tolkbare DNA-profiler. Dette betyr at en reanalyse av ikke-fungerende prøver som i henhold til artstesten er av sikker jervopprinnelse, kan gi en viss økning i suksessraten, som igjen kan gi sikrere informasjon over hvor mange jerv som finnes i ulike områder.

Et annet viktig delmål var å sikre kompatibilitet mellom data produsert på NINA og data produsert i Uppsala. Totalt 43 prøver gav fungerende DNA ved begge laboratorier, og samtlige prøver hadde identiske DNA-profiler etter justering av dataene i henhold til kalibreringsnøkkelen som ble lagd forut for analysen. Resultatene viser på en overbevisende måte at nøyaktig kalibrering av genetiske data fra flere ulike laboratorier er mulig dersom man har et felles referansemateriale. Resultatene viser videre at ved nøyaktig oppfølging av forhåndsdefinerte regler for akseptering av genotyper, og tilstrekkelig mange replikater, er det svært sannsynlig at den endelige DNA-profilen blir korrekt.

Disse resultatene har viktige implikasjoner i forhold til opprettelsen av en felles database over genetiske data for rovvilt i Skandinavia. I denne sammenhengen er det av stor betydning for forvaltende myndigheter og de ulike forskningsmiljøene at data generert i ulike laboratorier er compatible. Det er ingen grunn til å tro at kalibreringen er mer problematisk for de andre rovviltartene våre. Dette fordi den skandinaviske bestanden av alle arter har et relativt begrenset og oversiktlig sett med alleler for hver av de anvendte markørene.

Vi vil før sommeren legge fram et forslag på minst fem referanseprøver og et sett med markører for hver av de fire artene, som alle involverte laboratorier må kjøre gjennom for å kunne levere data til den felles skandinaviske databasen for rovviltgenetikk. Selve kalibreringsprosessen vil bli beskrevet i detalj inklusive et forslag på hvordan rådataene fra de ulike laboratoriene skal håndteres og konverteres til universelle data på en mest mulig hensiktsmessig måte.

5 Referanser

- Dallas, J.F. & Piertney, S.B. 1998. Microsatellite primers for the Eurasian otter. *Mol. Ecol.* 7: 1248–1251.
- Davis, C.S. & Strobeck, C. 1998. Isolation, variability, and cross-species amplification of polymorphic microsatellite loci in the family Mustelidae. *Mol. Ecol.* 7: 1776-1778.
- Duffy, A.J., Landa, A., O'Connell, M., Stratton, C. & Wright, J.M. 1998. Four polymorphic microsatellites in wolverine, *Gulo gulo*. *Anim. Genet.* 29: 63-72.
- Flagstad, Ø., Andersen, R., Wärdig, C., Johansson, M., Brøseth, H. & Ellegren, H. 2006. Populasjonsovervåkning av jerv ved hjelp av DNA-analyse fra ekskrementer – Rapport 2005. NINA Rapport 165, 42 pp.
- Flagstad, Ø., Hedmark, E., Landa, A. Brøseth, H., Persson, J., Andersen, R., Segerström, P., & Ellegren, H. 2004. Colonization history and noninvasive monitoring of a re-established wolverine population. *Cons. Biol.* 18, 676-688.
- Flagstad, Ø., May, R., Wärdig, C., Johansson, M., Andersen, R., Brøseth, H. & Ellegren, H. 2007. Populasjonsovervåking av jerv i Skandinavia ved hjelp av DNA-analyse fra ekskrementer. Rapport 2006 - NINA Rapport 251. 38 s.
- Fleming, M.A., Ostrander, E.A. & Cook, J.A. 1999. Microsatellite markers for American mink (*Mustela vison*) and ermine (*Mustela erminea*). *Mol. Ecol.* 8: 1352-1354.
- Hedmark, E., Flagstad, Ø., Segerström, P., Persson, J., Landa, A. & Ellegren, H. 2004. DNA-based individual and sex identification from wolverine (*Gulo gulo*) faeces and urine. *Conserv. Genet.* 5: 405-410.
- Kvaløy, K. 2004. Sikring av fjellrevens framtid i Norge: En integrert pakke for forskning og bevaringstiltak. Komponent 2. Genetikk. Delrapport I - 30.06.04. - NINA Minirapport 72: 2-8 pp.
- Landa, A., Strand, O., Kvaløy, K., Dijk, J.V., Eide, N., Herfindal, I., Linnell, J. & Andersen, R. 2005. Bevaringsbiologi. Fjellrev i NINA 2005. - NINA Rapport 102. 31 pp.
- Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L. & Pemberton J.M. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* 7: 639-655.
- O'Connell, M., Wright, J.M. & Farid, A. 1996. Development of PCR primers for nine polymorphic American mink *Mustela vison* microsatellite loci. *Mol. Ecol.* 5: 311–312.

Vedlegg 1

Detaljert beskrivelse av protokollen for isolering av DNA fra ekskrementer slik den er utviklet ved Hans Ellegrens laboratorium i Uppsala

General information

This method is used to extract DNA from faeces samples. A kit from QIAGEN is available for this method and is called 'QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit'. This procedure is taken directly from the handbook (Ref 1), with a few modifications.

Description of method

Important notes before starting

- Ensure that Buffers AW1 and AW2 have been prepared according to the instructions on the labels.
- Mix all buffers before use.
- If a precipitate has formed in Buffer ASL or AL, dissolve by incubating at 70°C. This can be done by putting the bottle on the heating block until there is no longer any precipitation in the buffer.
- Prepare a 70°C water bath or heating block for use in step 16.
- All centrifugations should be carried out at room temperature (15-25°C).
- The 2 ml tubes used should be wide enough to accommodate an InhibitEX tablet (e.g., Eppendorf Safe-Lock, cat. no. 0030120.094 or Sarstedt Safe-Seal, cat. no. 72.695).
- To increase robustness of downstream PCR assays of DNA eluates from stool (faeces) samples, we strongly recommend adding BSA to PCR mixtures to a final concentration of 0.1 µg/µl (e.g., Serva cat. no. 11920 or New England Biolabs[®] BSA, cat. no. BSA-007). To increase PCR specificity, we recommend the use of QIAGEN HotStarTaq DNA polymerase.
- It is very important to be careful when dealing with extractions and DNA, as not to get contamination. Therefore, always use the assigned lab space using coats available in that room. Always clean the bench with bleach before and after each extraction. Change gloves regularly or as soon as you see you've been contaminated. During step 2, when cutting the samples, change gloves between each sample. Use a new scalpel and a new piece of aluminum foil for each sample.
- The samples should soak in buffer overnight, so you need to plan your work accordingly.

The procedure

1. Add 1.6 ml Buffer ASL to 2 ml microcentrifuge tubes (not provided in the kit), one for each extracted individual. Always have a negative control, a tube with no sample, to detect contaminations.
2. Put a piece of aluminium foil on the bench, to put under the faeces sample. Take a new scalpel and cut a small piece of the faeces sample (~180-220 mg) and put it in the tube containing Buffer ASL. Secretions are handled the same way. For frozen urine samples,

cut a small piece of ice and put it in the tube containing Buffer ASL. If precipitation occurs in buffer, heat up the tube to 70°C for about a minute. For liquid urine samples, pipet 200 μ l into the tube.

3. Vortex samples so the material is mixed with the buffer.
4. Put tubes in fridge (+4-8°C) over night to let the samples soak in buffer for a longer time. This has proven to be more effective than continuing at once.
5. Before continuing the next day, heat the samples for a few minutes at 70°C to dissolve the precipitation in the buffer.
6. Vortex continuously for 1 min or until the faeces sample is thoroughly homogenized.
7. Prepare a set of new tubes by adding 1 InhibitEX tablet into a new 2 ml microcentrifuge tube (not provided in the kit).
8. Centrifuge the faeces sample at full speed (13,000rpm) for 1 min to pellet faeces particles.
9. Pipet 1.4 ml of the supernatant into the tube with the InhibitEX tablet and discard the faeces pellet.
Note: Transferring small quantities of pellet will not affect the procedure.
10. Vortex immediately and continuously for 1 min or until the tablet is completely suspended. Incubate suspension for 1 min at room temperature to allow inhibitors to adsorb to the InhibitEX matrix.
11. Centrifuge sample at full speed (13,000rpm) for 6 min to pellet faeces particles and inhibitors bound to InhibitEX.
Note: The pellets formed after each centrifugation will break up quickly if supernatant is not removed immediately. Therefore, work as fast as you can in the next step. If you have a large number of samples, you can split them up and centrifuge one part first before continuing with the second.
12. Immediately after the centrifuge stops, pipet all of the supernatant into a new 1.5 ml centrifuge tube (not provided in the kit) and discard the pellet. Centrifuge sample at full speed (13,000rpm) for 6 min.
Note: Transferring small quantities of pellet material will not affect the procedure.
13. Pipet 25 μ l Proteinase K into a new 2 ml microcentrifuge tube (not provided in the kit).
14. Pipet 600 μ l supernatant from step 12 to the 2 ml microcentrifuge tube containing Proteinase K.
Note: With new manufacturer of InhibitEX tablets it is usually difficult to get as much as 600 μ l of supernatant. Remove as much of the supernatant as you can without touching the pellet. Also work fast in this step so the pellet does not break up. No remains of tablet material should be transferred.
15. Add 600 μ l Buffer AL and vortex for 15 s.
Note: Do not add Proteinase K directly to Buffer AL. It is essential that the sample and Buffer AL are thoroughly mixed to form a homogenous solution.

16. Incubate at 70°C for 10 min. Centrifuge briefly to remove drops from the inside of the tube lid.
17. Add 600 μ l of ethanol (95%) to the lysate, and mix by vortexing. Centrifuge briefly to remove drops from the inside of the tube lid.
Note: Once ethanol has been added, it is OK to take a break and leave the samples up to a few hours at room temperature before continuing.
18. Label the lid of the QIAamp spin columns provided in a 2 ml collection tube. Carefully apply 600 μ l lysate from step 17 to the QIAamp spin column without moistening the rim. Close the cap and centrifuge at 11,000rpm for 1 min. Place the QIAamp spin column in a new 2 ml collection tube, and discard the tube containing the filtrate.
Note: If the lysate has not completely passed through the column after centrifugation, centrifuge again until the column is empty.
19. Carefully open the spin column, apply a second aliquot of 600 μ l lysate and centrifuge at 11,000rpm for 1 min. Place the QIAamp spin column in a new 2 ml collection tube, and discard the tube containing the filtrate.
20. Repeat step 19 to load the third aliquot of lysate onto the spin column.
21. Carefully open the spin column and add 500 μ l Buffer AW1. Centrifuge at 13,000rpm for 1 min. Place the spin column in a new 2 ml collection tube, and discard the tube containing the filtrate.
22. Carefully open the spin column and add 500 μ l Buffer AW2. Centrifuge at 13,000rpm for 3 min. Place the spin column in a new 2 ml collection tube, and discard the tube containing the filtrate.
23. Place the column into a new 2 ml collection tube (not provided in the kit) and centrifuge at 13,000rpm for 1 min to remove the last remains of Buffer AW2. Residual Buffer AW2 in the eluate may cause problems in downstream applications.
24. Transfer the spin column into a new, labelled 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided in the kit) and pipet 100 μ l Buffer AE directly onto the QIAamp membrane. Incubate for at least 5 min at room temperature, then centrifuge at 11,000rpm for 1 min to elute DNA.
25. Leave spin column in tube and add another 100 μ l Buffer AE onto the QIAamp membrane. Incubate for at least 3 min at room temperature, then centrifuge at 11,000rpm for 1 min to elute DNA. Final volume of eluted DNA in tube will be 200 μ l.

Storage

DNA extractions are stored at -20°C.

References

1. QIAamp DNA Stool Mini Kit Handbook, 08/2001, pages 22-24

Vedlegg 2

Rådata for fungerende prøver på tvers av de åtte markørene som individbestemmelsen ble basert på. Konsensusgenotypen basert på 3-6 replikater er angitt i rødt, mens den justerte genotypen er uthevet i svart. Allelic dropout markeres med rød bakgrunn, mens falske alleler markeres med oransje bakgrunn.

	Gg7		Gg14		Gg42		Mvis75		Gg216		Gg443		Gg454		Gg465	
R306150	166	170	189	189	202	202	138	140	174	174	95	95	138	138	183	183
	166	170	189	189	202	202	138	140	174	174	95	95	138	138	183	183
	166	170	189	189	202	202	138	140	174	174	95	95	138	138	183	183
	166	170	189	189	202	202	138	140	174	174	95	95	138	138	183	183
	166	170	189	189	202	202	138	140	174	174	95	95	138	138	183	183
	167	171	191	191	204	204	141	143	176	176	96	96	140	140	183	183
R306380	168	170	189	199	202	202	136	138	174	180	95	95	134	136	173	181
	168	170	189	199	202	202	136	138	174	180	95	95	134	136	173	181
	168	170	189	199	202	202	136	138	174	180	95	95	134	136	173	181
	168	170	189	199	202	202	136	138	174	180	95	95	134	136	173	181
	169	171	191	201	204	204	139	141	176	182	96	96	136	138	173	181
R306406	170	170	199	199	202	202	136	140	172	172	95	95	138	140	173	183
	170	170	199	199	202	202	136	140	172	172	95	95	138	140	173	183
	170	170	199	199	202	202	136	140	172	172	95	95	138	140	173	183
	170	170	199	199	202	202	136	140	172	172	95	95	138	140	173	183
	171	171	201	201	204	204	139	143	174	174	96	96	140	142	173	183
R306420	166	166	189	189	202	202	138	138	174	174	95	95	138	140	183	183
	166	166	189	189	202	202	138	138	174	174	95	95	138	140	183	183
	166	166	189	189	202	202	138	138	174	174	95	95	138	140	183	183
	166	166	189	189	202	202	138	138	174	174	95	95	138	140	183	183
	167	167	191	191	204	204	141	141	176	176	96	96	140	142	183	183
R306454	166	170	189	199	202	202	134	140	172	174	95	95	138	140	173	173
	166	170	189	199	202	202	134	140	172	174	95	95	138	140	173	173
	166	170	189	199	202	202	134	140	172	174	95	95	138	140	173	173
	166	170	189	199	202	202	134	140	172	174	95	95	138	140	173	173
	167	171	191	201	204	204	137	143	174	176	96	96	140	142	173	173

R306455	168	170	197	199	202	202	134	140	172	180	95	95	134	140	173	183
	168	170	197	199	202	202	134	140	172	180	95	95	134	140	173	183
	168	170	197	199	202	202	134	140	172	180	95	95	134	140	173	183
	168	170	197	199	202	202	134	140	172	180	95	95	134	140	173	183
	169	171	199	201	204	204	137	143	174	182	96	96	136	142	173	183
R306482	166	170	-	-	202	202	138	140	172	174	95	99	138	138	173	173
	166	170	189	199	202	202	140	140	172	174	95	99	138	138	173	183
	168	170	189	199	202	202	138	140	172	172	95	95	138	138	173	183
	166	170	189	199	202	202	138	140	172	174	95	99	138	138	173	183
	167	171	191	201	204	204	141	143	174	176	96	100	140	140	173	183
R306501			189	189	202	202	136	140	-	-	95	95	138	138	173	183
	166	168	189	189	202	202	-	-	174	174	95	95	138	138	173	173
	166	168	189	189	202	202	136	140	-	-	95	95	138	138	173	183
	166	168	189	189	202	202	136	140			95	95	138	138	173	183
	167	169	191	191	204	204	139	143			96	96	140	140	173	183
R306707	168	168	189	199	202	204	134	138	174	176	95	99	138	140	183	183
	168	168	189	199	202	204	134	138	174	176	95	99	138	140	183	183
	168	168	189	199	202	204	134	138	174	176	95	99	138	140	183	183
	168	168	189	199	202	204	134	138	174	176	95	99	138	140	183	183
	169	169	191	201	204	206	137	141	176	178	96	100	140	142	183	183
R306272	166	170	199	199	202	206	140	140	172	174	99	99	134	138	183	183
	166	170	199	199	202	206	140	140	172	174	99	99	134	138	183	183
	170	170	199	199	202	206	140	140	172	174	99	99	134	138	183	183
	166	170	199	199	202	206	140	140	172	174	99	99	134	138	183	183
	167	171	201	201	204	208	143	143	174	176	100	100	136	140	183	183
R306210	166	166	189	199	206	206	138	140	174	174	95	99	138	138	173	183
	166	166	189	199	-	-	-	-	174	174	-	-	138	138	-	-
	166	166	189	199	206	206	138	140	174	174	95	99	138	138	173	183
	166	166	189	199			138	140	174	174	95	99	138	138	173	183
	167	167	191	201			141	143	176	176	96	100	140	140	173	183
R306364	168	168	189	199	202	202	138	138	172	172	95	95	134	134	173	183
	168	168	189	189	202	202	138	138	172	172	95	95	134	134	173	183
	168	168	199	199	202	202	138	138	172	172	95	95	134	134	173	183
	168	168	189	199	202	202	138	138	172	172	95	95	134	134	173	183
	169	169	191	201	204	204	141	141	174	174	96	96	136	136	173	183

R306283	166	168	-	-	-	-	134	138	174	174	95	95	134	136	181	183
	166	168	-	-	-	-	134	138	174	174	95	95	134	136	181	183
	166	168	-	-	-	-	134	138	174	174	95	95	134	136	181	183
	166	168					134	138	174	174	95	95	134	136	181	183
	167	169					137	141	176	176	96	96	136	138	181	183
R306363	168	168	189	189	-	-	138	138	172	172	95	95	132	134	-	-
	168	168	189	189	-	-	138	138	172	172	95	95	134	134	183	183
	168	168	189	189	-	-	138	138	172	172	95	95	-	-	183	183
	168	168	199	199	-	-	138	138	172	172	95	95	134	134	173	173
	168	168	199	199	-	-	138	138	172	172	95	95	134	134	173	183
			199	199	202	202	136	138	172	172	95	95	134	134	183	183
	168	168	189	199			138	138	172	172	95	95	134	134	173	183
	169	169	191	201			141	141	174	174	96	96	136	136	173	183
R306208	166	168	-	-	202	202	134	138	172	174	95	95	134	140	173	183
	166	168	-	-	202	202	134	138	172	174	95	95	134	140	173	183
	166	168	-	-	202	202	134	138	172	174	95	95	134	140	173	183
	166	168			202	202	134	138	172	174	95	95	134	140	173	183
	167	169			204	204	137	141	174	176	96	96	136	142	173	183
R306213	166	166	189	199	206	206	138	140	174	174	95	99	138	138	173	183
	166	166	189	199	206	206	138	140	174	174	95	99	138	138	173	183
	166	166	189	199	206	206	138	140	174	174	95	99	138	138	173	183
	166	166	189	199	206	206	138	140	174	174	95	99	138	138	173	183
	167	167	191	201	208	208	141	143	176	176	96	100	140	140	173	183
R306390	170	170	-	-	202	202	138	138	174	180	95	97	134	140	181	183
	170	170	189	199	202	202	138	138	174	180	95	95	134	140	181	183
	170	170	189	199	202	202	138	138	174	180	95	95	134	140	181	183
	170	170	189	199	202	202	138	138	174	180	95	95	134	140	181	183
	171	171	191	201	204	204	141	141	176	182	96	96	136	142	181	183
R306491	166	168	189	189	202	202	136	140	174	174	95	95	138	138	173	183
	166	168	189	189	202	202	136	140	174	174	95	95	138	138	173	183
	166	168	189	189	202	202	136	140	174	174	95	95	138	138	173	183
	166	168	189	189	202	202	136	140	174	174	95	95	138	138	173	183
	167	169	191	191	204	204	139	143	176	176	96	96	140	140	173	183

R306180	166	170	189	199	202	202	136	140	172	174	95	95	134	138	183	183
	166	170	189	199	202	202	136	140	172	174	95	95	134	138	183	183
	166	170	189	199	202	202	136	140	172	172	95	95	134	138	183	183
	166	170	189	199	202	202	136	140	172	174	95	95	134	138	183	183
	167	171	191	201	204	204	139	143	174	176	96	96	136	140	183	183
R306254	168	168	189	199	202	206	138	138	174	174	99	99	138	138	183	183
	168	168	189	199	202	206	138	138	174	174	99	99	138	138	183	183
	168	168	189	199	202	206	138	138	174	174	99	99	138	138	183	183
	168	168	189	199	202	206	138	138	174	174	99	99	138	138	183	183
	169	169	191	201	204	208	141	141	176	176	100	100	140	140	183	183
R306193	170	170	189	199	202	202	136	140	174	180	99	99	138	140	173	183
	170	170	189	199	202	202	136	140	174	180	99	99	138	140	173	183
	170	170	189	199	202	202	136	140	174	180	99	99	138	140	173	183
	170	170	189	199	202	202	136	140	174	180	99	99	138	140	173	183
	171	171	191	201	204	204	139	143	176	182	100	100	140	142	173	183
R306107	166	166	189	189	202	202	134	140	172	174	95	95	134	138	183	183
	166	166	189	189	202	202	134	140	172	174	95	95	134	138	183	183
	166	166	189	189	202	202	134	140	172	174	95	95	134	138	183	183
	166	166	189	189	202	202	134	140	172	174	95	95	134	138	183	183
	167	167	191	191	204	204	137	143	174	176	96	96	136	140	183	183
R306242	166	168	-	-	202	202	134	138	172	174	95	99	134	138	173	183
	166	168	-	-	202	202	134	138	172	174	95	99	134	138	173	183
	166	168	-	-	202	202	134	138	172	174	95	99	134	138	173	183
	166	168			202	202	134	138	172	174	95	99	134	138	173	183
	167	169			204	204	137	141	174	176	96	100	136	140	173	183
R306404	168	168	189	199	202	202	136	138	172	174	95	99	134	140	183	183
	168	168	189	199	202	202	136	138	172	174	95	99	134	140	183	183
	168	168	189	199	202	202	136	138	172	174	95	99	134	140	183	183
	168	168	189	199	202	202	136	138	172	174	95	99	134	140	183	183
	169	169	191	201	204	204	139	141	174	176	96	100	136	142	183	183
R306354	166	168	189	197	202	202	134	138	172	174	95	95	134	140	183	183
	166	168	189	197	202	202	134	138	172	174	95	99	134	140	183	183
	166	168	189	197	202	202	134	138	172	174	95	95	134	140	183	183
	166	168	189	197	202	202	134	138	172	174			134	140	183	183
	167	169	191	199	204	204	137	141	174	176			136	142	183	183

R306103	166	170	189	199	202	202	138	140	172	172	95	99	134	134	183	183
	166	170	189	199	202	202	138	140	172	172	95	101	134	134	183	183
	166	170	189	199	202	202	138	140	172	172	95	99	134	134	183	183
	166	170	189	199	202	202	138	140	172	172	95	99	134	134	183	183
	167	171	191	201	204	204	141	143	174	174	96	100	136	136	183	183
R306698	170	170	199	199	202	202	134	138	174	174	95	95	138	140	183	183
	170	170	199	199	202	202	134	138	174	174	95	95	138	140	183	183
	170	170	199	199	202	202	134	138	174	174	95	95	138	140	183	183
	170	170	199	199	202	202	134	138	174	174	95	95	138	140	183	183
	171	171	201	201	204	204	137	141	176	176	96	96	140	142	183	183
R306725	168	168	189	199	202	206	136	140	174	174	95	95	138	140	183	183
	168	168	189	199	202	206	136	140	174	174	95	95	138	140	183	183
	168	168	189	199	202	206	136	140	174	174	95	95	138	140	183	183
	168	168	189	199	202	206	136	140	174	174	95	95	138	140	183	183
	169	169	191	201	204	208	139	143	176	176	96	96	140	142	183	183
R306416	168	170	189	199	202	202	134	138	174	174	95	97	134	136	-	-
	-	-	189	199	-	-	134	138	-	-	95	95	134	136	-	-
	168	170	-	-	202	202	134	138	174	174	95	95	134	136	181	183
	168	170	189	199	202	202	134	138			95	95	134	136		
	169	171	191	201	204	204	137	141			96	96	136	138		
R306716	168	170	189	189	202	206	138	138	172	174	95	95	138	140	181	183
	168	170	189	189	202	206	138	138	172	174	95	95	138	140	181	183
	168	170	189	189	202	206	138	138	172	174	95	95	138	140	183	183
	168	170	189	189	202	206	138	138	172	174	95	95	138	140	181	183
	169	171	191	191	204	208	141	141	174	176	96	96	140	142	181	183
R306370	168	168	189	199	202	202	138	138	172	172	95	95	134	134	173	183
	168	168	189	199	202	202	138	138	172	172	95	95	134	134	173	183
	168	168	189	199	-	-	138	138	172	172	95	95	134	134	173	183
	168	168	189	199	202	202	138	138	172	172	95	95	134	134	173	183
	169	169	191	201	204	204	141	141	174	174	96	96	136	136	173	183
R306262	170	170	189	199	202	202	136	136	-	-	95	95	138	140	173	173
	170	170	189	199	202	202	136	136	172	180	95	95	138	140	173	173
	170	170	189	199	202	202	136	136	172	180	95	95	138	140	173	173
	170	170	189	199	202	202	136	136	172	180	95	95	138	140	173	173
	171	171	191	201	204	204	139	139	174	182	96	96	140	142	173	173

R306251	166	166	189	189	202	206	138	138	174	174	95	95	138	138	173	183
	166	166	189	189	202	206	138	138	174	174	95	95	138	138	173	183
	166	166	189	189	202	206	138	138	174	174	95	95	138	138	173	183
	166	166	189	189	202	206	138	138	174	174	95	95	138	138	173	183
	167	167	191	191	204	208	141	141	176	176	96	96	140	140	173	183
R306115	166	168	189	199	-	-	134	138	174	174	95	95	134	136	181	181
	166	166	-	-	-	-	134	138	174	174	95	95	134	136	181	181
	166	168	189	199	-	-	138	138	-	-	95	95	134	136	-	-
	166	168	-	-	-	-	134	138	-	-	95	95	134	136	181	181
	166	168	189	189	-	-	134	138	174	174	95	95	134	136	181	183
	166	168	-	-	-	-	134	138	-	-	95	95	134	136	-	-
	166	168	189	199			134	138	174	174	95	95	134	136		
	167	169	191	201			137	141	176	176	96	96	136	138		
R306192	170	170	189	199	202	202	136	140	174	180	99	99	138	140	173	183
	170	170	189	199	202	202	136	140	174	180	99	99	138	140	173	183
	170	170	189	199	202	202	136	140	174	180	99	99	138	140	173	183
	170	170	189	199	202	202	136	140	174	180	99	99	138	140	173	183
	171	171	191	201	204	204	139	143	176	182	100	100	140	142	173	183
R306112	166	168	189	197	202	202	134	138	172	174	95	95	134	140	173	183
	166	168	189	197	202	202	134	138	172	174	95	95	134	140	173	183
	166	168	189	197	202	202	134	138	172	174	95	95	134	140	173	183
	166	168	189	197	202	202	134	138	172	174	95	95	134	140	173	183
	167	169	191	199	204	204	137	141	174	176	96	96	136	142	173	183
R306426	168	168	199	199	202	204	138	138	172	174	95	99	140	140	173	183
	168	168	199	199	202	204	138	138	172	174	95	99	140	140	173	183
	168	168	199	199	202	204	138	138	172	174	95	99	140	140	173	183
	168	168	199	199	202	204	138	138	172	174	95	99	140	140	173	183
	169	169	201	201	204	206	141	141	174	176	96	100	142	142	173	183
R305913	166	166	189	189	202	206	138	138	174	174	95	95	138	138	173	183
	166	166	189	189	-	-	138	138	174	174	95	95	138	138	173	183
	166	166	189	189	202	206	138	138	174	174	95	95	138	138	173	183
	166	166	189	189	202	206	138	138	174	174	95	95	138	138	173	183
	167	167	191	191	204	208	141	141	176	176	96	96	140	140	173	183

R306696	170	170	189	189	206	206	138	138	172	172	95	95	134	138	173	183
	170	170	189	199	-	-	138	138	172	172	95	95	134	138	173	183
	170	170	189	199	-	-	138	138	-	-	95	95	134	138	173	183
	170	170	189	199			138	138			95	95	134	138	173	183
	171	171	191	201			141	141			96	96	136	140	173	183
R306738	168	170	189	199	202	202	138	140	172	172	95	99	138	138	183	183
	168	170	189	199	-	-	138	140	172	172	95	99	138	138	183	183
	168	170	189	199	-	-	138	140	172	172	95	99	138	138	183	183
	168	170	189	199			138	140	172	172	95	99	138	138	183	183
	169	171	191	201			141	143	174	174	96	100	140	140	183	183
R305917	168	170	189	199	202	202	138	140	174	180	95	99	138	140	173	173
	168	170	189	199	-	-	138	140	174	180	95	99	138	140	173	173
	168	170	189	199	202	202	138	140	174	180	95	99	138	140	173	173
	168	170	189	199			138	140	174	180	95	99	138	140	173	173
	169	171	191	201			141	143	176	182	96	100	140	142	173	173
R306402	168	170	199	199	202	202	136	138	172	174	99	99	136	140	181	183
	168	168	199	199	-	-	136	138	172	174	95	99	136	140	181	183
	168	168	199	199	202	202	136	138	172	174	95	99	136	140	181	183
			199	199			136	138	172	174	95	99	136	140	181	183
			201	201			139	141	174	176	96	100	138	142	181	183
R306289	166	170	189	189	202	202	138	138	174	174	95	95	134	138	173	183
	166	170	189	189	-	-	138	138	174	174	95	95	134	138	173	183
	166	170	189	189	202	202	138	138	174	174	95	95	134	138	173	183
	166	170	189	189			138	138	174	174	95	95	134	138	173	183
	167	171	191	191			141	141	176	176	96	96	136	140	173	183
R306444	168	168	189	189	202	202	138	138	172	172	95	95	134	140	183	183
	168	168	189	189	-	-	138	138	172	172	95	95	134	140	183	183
	168	168	189	189	202	202	138	138	172	172	95	95	134	140	183	183
	168	168	189	189			138	138	172	172	95	95	134	140	183	183
	169	169	191	191			141	141	174	174	96	96	136	142	183	183
R306635	168	170	199	199	202	202	138	140	172	172	95	95	138	138	173	173
	168	170	199	199	-	-	138	140	172	172	95	95	138	138	173	173
	168	170	199	199	202	202	138	140	172	172	95	95	138	138	173	173
	168	170	199	199			138	140	172	172	95	95	138	138	173	173
	169	171	201	201			141	143	174	174	96	96	140	140	173	173

R306443	166	170	189	197	202	202	134	138	172	174	95	95	134	138	173	183
	166	170	189	197	202	202	134	138	172	174	95	95	134	138	173	183
	166	170	189	197	202	202	134	138	172	174	95	95	134	138	173	183
	166	170	189	197	202	202	134	138	172	174	95	95	134	138	173	183
	167	171	191	199	204	204	137	141	174	176	96	96	136	140	173	183

Vedlegg 3

Rådata for de ti prøvene som ble kjørt på tvers av alle 16 fungerende markører. Konsensus-genotypen basert på 3 replikater er angitt i rødt, mens den justerte genotypen er uthevet i svart. Allelic dropout markeres med rød bakgrunn, mens falske alleler markeres med oransje bakgrunn.

	R306150					R306380					R306406				
Gg7	166	166	166	166	167	168	168	168	168	169	170	170	170	170	171
	170	170	170	170	171	170	170	170	170	171	170	170	170	170	171
Gg14	189	189	189	189	191	189	189	189	189	191	199	199	199	199	201
	189	189	189	189	191	199	199	199	199	201	199	199	199	199	201
Gg25	163	163	163	163	164	163	163	163	163	164	157	157	157	157	158
	165	165	165	165	166	165	163	165	165	166	157	157	157	157	158
Gg42	202	202	202	202	204	202	202	202	202	204	202	202	202	202	204
	202	202	202	202	204	202	202	202	202	204	202	202	202	202	204
Mvis72	265	265	265	265	265	267	267	267	267	267	267	267	265		
	267	267	267	267	267	269	269	269	269	269	267	267	265		
Mvis075	138	138	138	138	141	136	136	136	136	139	136	136	136	136	139
	140	140	140	140	143	138	138	138	138	141	140	140	140	140	143
Gg101	145	145	145	145	147	145	145	145	145	147	151	151	151	151	153
	151	151	151	151	153	145	145	145	145	147	151	151	151	151	153
Gg216	174	174	174	174	176	174	174	174	174	176	172	172	172	172	174
	174	174	174	174	176	180	180	180	180	182	172	172	172	172	174
Gg234	97	97	97	97	98	91	91	91	91	92	91	91	91	91	92
	101	101	101	101	102	97	97	97	97	98	91	91	91	91	92
Gg443	95	95	95	95	96	95	95	95	95	96	95	95	95	95	96
	95	95	95	95	96	95	95	95	95	96	95	95	95	95	96
Gg452	113	113	113	113	114	113	113	113	113	114	113	113	113	113	114
	113	113	113	113	114	113	113	113	113	114	115	115	115	115	116
Gg454	138	138	138	138	140	134	134	134	134	136	138	138	138	138	140
	138	138	138	138	140	136	136	136	136	138	140	140	140	140	142
Gg465	183	183	183	183	183	173	173	173	173	173	173	173	173	173	173
	183	183	183	183	183	181	181	181	181	181	183	183	183	183	183
Gg470	113	113	113	113	116	115	115	115	115	118	113	113	113	113	116
	115	115	115	115	118	115	115	115	115	118	113	113	113	113	116
Gg471	115	115	115	115	117	115	115	115	115	117	115	115	115	115	117
	117	117	117	117	119	115	115	115	115	117	117	117	117	117	119
LUT604	114	114	114	114	113	114	114	114	114	113	114	114	114	114	113
	120	120	120	120	119	120	120	120	120	119	114	114	114	114	113

	R306420					R306454					R306455				
Gg7	166	166	166	166	167	166	166	166	166	167	168	168	168	168	169
	166	166	166	166	167	170	170	170	170	171	170	170	170	170	171
Gg14	189	189	189	189	191	189	189	189	189	191	197	197	197	197	199
	189	189	189	189	191	199	199	199	199	201	199	199	199	199	201
Gg25	163	163	163			157	157	157	157	158	157	157	-	157	158
	163	165	163			165	165	165	165	166	163	163	-	163	164
Gg42	202	202	202	202	204	202	202	202	202	204	202	202	202	202	204
	202	202	202	202	204	202	202	202	202	204	202	202	202	202	204
Mvis72	267	-	267			267	267	267	267	267	265	265	265	265	265
	267	-	267			267	267	267	267	267	265	265	265	265	265
Mvis075	138	138	138	138	141	134	134	134	134	137	134	134	134	134	137
	138	138	138	138	141	140	140	140	140	143	140	140	140	140	143
Gg101	143	143	143	143	145	151	151	151	151	153	143	143	143	143	145
	143	143	143	143	145	151	151	151	151	153	143	143	143	143	145
Gg216	174	174	174	174	176	172	172	172	172	174	172	172	172	172	174
	174	174	174	174	176	174	174	174	174	176	180	180	180	180	182
Gg234	97	97	97	97	98	91	91	91	91	92	91	91	91	91	92
	97	97	97	97	98	91	91	91	91	92	101	101	101	101	102
Gg443	95	95	95	95	96	95	95	95	95	96	95	95	95	95	96
	95	95	95	95	96	95	95	95	95	96	95	95	95	95	96
Gg452	115	115	115	115	116	113	113	113	113	114	115	115	115	115	116
	115	115	115	115	116	115	115	115	115	116	115	115	115	115	116
Gg454	138	138	138	138	140	138	138	138	138	140	134	134	134	134	136
	140	140	140	140	142	140	140	140	140	142	140	140	140	140	142
Gg465	183	183	183	183	183	173	173	173	173	173	173	173	173	173	173
	183	183	183	183	183	173	173	173	173	173	183	183	183	183	183
Gg470	113	113	113	113	116	113	113	113	113	116	113	113	113	113	116
	115	115	115	115	118	113	113	113	113	116	115	115	115	115	118
Gg471	115	115	115	115	117	117	117	117	117	119	115	115	115	115	117
	115	115	115	115	117	117	117	117	117	119	115	115	115	115	117
LUT604	114	114	114			114	114	114	114	113	120	120	120	120	119
	114	114	120			114	114	114	114	113	120	120	120	120	119

	R306482						R306501				
Gg7	166	166	168	166	167		-	166	166	166	167
	170	170	170	170	171		-	168	168	168	169
Gg14	-	189	189	189	191		189	189	189	189	191
	-	199	199	199	201		189	189	189	189	191
Gg25	163	163	-				-	163	-		
	165	163	-				-	163	-		
Gg42	202	202	202	202	204		202	202	202	202	204
	202	202	202	202	204		202	202	202	202	204
Mvis72	-	267	269				267	-	269		
	-	269	269				269	-	269		
Mvis075	138	140	138	138	141		136	-	136	136	139
	140	140	140	140	143		140	-	140	140	143
Gg101	151	151	151	151	153		143	143	143	143	145
	151	151	151	151	153		151	151	151	151	153
Gg216	172	172	172	172	174		-	174	-		
	174	174	172	174	176		-	174	-		
Gg234	91	91	91	91	92		97	97	97	97	98
	91	91	91	91	92		97	97	97	97	98
Gg443	95	95	95	95	96		95	95	95	95	96
	99	99	95	99	100		95	95	95	95	96
Gg452	113	113	113	113	114		113	113	113	113	114
	113	113	113	113	114		113	113	113	113	114
Gg454	138	138	138	138	140		138	138	138	138	140
	138	138	138	138	140		138	138	138	138	140
Gg465	173	173	173	173	173		173	173	173	173	173
	173	183	183	183	183		183	173	183	183	183
Gg470	113	113	113	113	116		113	-	113	113	116
	113	113	113	113	116		115	-	115	115	118
Gg471	115	115	115	115	117		115	115	115	115	117
	117	117	117	117	119		117	117	117	117	119
LUT604	114	114	114	114	113		114	114	114	114	113
	120	120	120	120	119		114	114	114	114	113

	R306707						R306272				
Gg7	168	168	168	168	169		166	166	170	166	167
	168	168	168	168	169		170	170	170	170	171
Gg14	189	189	189	189	191		199	199	199	199	201
	199	199	199	199	201		199	199	199	199	201
Gg25	163	163	163	163	164		157	163	163		
	165	165	165	165	166		163	163	163		
Gg42	202	202	202	202	204		202	202	202	202	204
	204	204	204	204	206		206	206	206	206	208
Mvis72	267	267	267	267	267		267	267	267	267	267
	267	267	267	267	267		267	267	267	267	267
Mvis075	134	134	134	134	137		140	140	140	140	143
	138	138	138	138	141		140	140	140	140	143
Gg101	145	145	145	145	147		151	151	151	151	153
	151	151	151	151	153		151	151	151	151	153
Gg216	174	174	174	174	176		172	172	172	172	174
	176	176	176	176	178		174	174	174	174	176
Gg234	91	91	91	91	92		91	91	91	91	92
	97	97	97	97	98		91	91	91	91	92
Gg443	95	95	95	95	96		99	99	99	99	100
	99	99	99	99	100		99	99	99	99	100
Gg452	115	115	115	115	116		113	113	113	113	114
	115	115	115	115	116		113	113	113	113	114
Gg454	138	138	138	138	140		134	134	134	134	136
	140	140	140	140	142		138	138	138	138	140
Gg465	183	183	183	183	183		183	183	183	183	183
	183	183	183	183	183		183	183	183	183	183
Gg470	115	115	115	115	118		113	113	113	113	116
	115	115	115	115	118		115	115	115	115	118
Gg471	115	115	115	115	117		117	117	117	117	119
	115	115	115	115	117		117	117	117	117	119
LUT604	-	-	114				-	114	114	114	113
	-	-	114				-	120	120	120	119

NINA Rapport 260

ISSN:1504-3312

ISBN: 978-82-426-1822-1



Norsk institutt for naturforskning

NINA hovedkontor

Postadresse: 7485 Trondheim

Besøks/leveringsadresse: Tungasletta 2, 7047 Trondheim

Telefon: 73 80 14 00

Telefaks: 73 80 14 01

Organisasjonsnummer: NO 950 037 687 MVA

www.nina.no