

NON-INVASIVE GENETIC SAMPLING OF THE EURASIAN OTTER (*LUTRA LUTRA*) USING HAIRS

HEATHER M. ANDERSON¹, DOMINIC J. McCAFFERTY^{2a},
ILIK J. SACCHERI³, ALAN E. McCLUSKIE¹

¹ Natural Research Ltd., Banchory Business Centre, Banchory, AB31 5ZU, Scotland, UK

² Department of Adult & Continuing Education, University of Glasgow, 11 Eldon Street, Glasgow G3 6NH, Scotland, UK (^a Author for correspondence: Tel.: +44 141 330 1803; E-mail: d.mccafferty@educ.gla.ac.uk)

³ School of Biological Sciences, University of Liverpool, Biosciences Building, Crown Street, Liverpool L69 7ZB, England, UK

ABSTRACT - The material for the genetic characterisation of wild Eurasian otters (*Lutra lutra*) has previously been derived from carcasses and spraints. Hair samples however have proved to be a much more reliable source of DNA than spraints, and offer the opportunity of sampling the living population non-invasively. Until now there has been no research into methods of sampling hairs from wild otters or on the DNA extraction efficiency from these hairs. A hair trap was therefore developed and tested on otters in captivity. The success rate of the trap was 0.71 samples collected per trap night. The suitability of genetic analysis from otter hairs was examined using paired samples of hair and tissue taken from 15 individual otters recovered from road mortalities. DNA was extracted from the tissue samples using a Proteinase K digestion in a PCR compatible buffer. This process had a 100% success rate. Individual root hair segments were treated by Chelex Ionic bead resin treatment and Proteinase K digestion in a PCR compatible buffer. The Chelex method gave a 55% amplification success rate while the Proteinase K method gave a much higher amplification success rate of 87%. The DNA extracts were typed for 9 microsatellites using the latest versions of the primers. Proportions of allelic dropout and false allele detection associated with hair DNA extracts were estimated by comparing the genotypes of hair extracts with the genotypes from tissue. Preliminary attempts to develop a ZFX/Y assay to sex otters identified polymorphisms between ZFX and ZFY sequences, but typing based on restriction digests requires further optimisation. The use of recovered DNA from hair offers a step forward in the study of Eurasian otter populations as its continuing endangered status in many countries creates legal and ethical constraints on capturing animals for marking or radio tracking.

Key words: Otter, *Lutra lutra*, DNA, hair, genotyping, molecular sexing

RIASSUNTO – *Campionamento genetico non-invasivo della Lontra (Lutra lutra) mediante l'uso dei peli.* La caratterizzazione genetica di lontre selvatiche (*Lutra lutra*) fino ad ora è stata ottenuta da carcasse e feci. Campioni di peli tuttavia forniscono DNA più affidabile, ed offrono la possibilità di campionare le popolazioni mediante metodi non-invasivi. Fino ad ora non sono state sperimentate metodologie per il campionamento e l'estrazione di DNA da campioni di peli ottenuti da lontre selvatiche. Perciò abbiamo costruito un model-

lo di trappola per peli che è stato sperimentato in lontre in cattività. Il tasso di cattura della trappola utilizzata è stato di 0,71 campioni per notte-trappola. L'efficacia delle analisi genetiche da peli è stata esaminata comparando i risultati ottenuti da campioni di peli e tessuti prelevati da 15 carcasse di lontre raccolte da incidenti stradali. Il DNA è stato estratto dai tessuti tramite digestione con Proteinasi K in un tampone compatibile con la PCR. Questo protocollo ha avuto successo nel 100% dei casi. Radici di singoli peli sono state trattate con Chelex ed estratte con il metodo della Proteinasi K in un *buffer* compatibile con la PCR. Le estrazioni col Chelex hanno avuto successo nel 55% dei casi, mentre il protocollo con la Proteinasi K ha prodotto un successo molto più alto dell'87%. I campioni di DNA sono stati genotipizzati con 9 microsatelliti utilizzando le più recenti versioni dei *primers*. Le percentuali di *dropout* allelico e falsi alleli associati con le amplificazioni del DNA estratto dai peli sono state stimate in confronto con i genotipi ottenuti dai tessuti. Tentativi preliminari di sviluppare un metodo di sessaggio molecolare hanno identificato polimorfismi tra sequenze ZFX e ZFY, ma la genotipizzazione basata sui siti di restrizione richiede ulteriori ottimizzazioni. La possibilità di utilizzare DNA estratto da peli rappresenta un progresso nello studio delle popolazioni di Lontra, poiché il loro status a rischio pone, in molti paesi, limitazioni legali ed etiche alla cattura di esemplari ai fini di marcatura o di *radio-tracking*.

Parole chiave: Lontra, *Lutra lutra*, DNA, peli, genotipizzazione, sessaggio molecolare.