

# DNA-analyser af odderekskrementer fra Sjælland

---

Notat fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi

Dato: 1. juli 2016

Liselotte Wesley Andersen, Bjarne Søgaard & Aksel Bo Madsen

Institut for Bioscience

Rekvirent:  
Naturstyrelsen  
Antal sider: 13

Faglig kommentering:  
Morten Elmeros  
Kvalitetssikring, centret:  
Jesper R. Fredshavn



AARHUS  
UNIVERSITET

DCE - NATIONALT CENTER FOR MILJØ OG ENERGI

Tel.: +45 8715 0000  
E-mail: [dce@au.dk](mailto:dce@au.dk)  
<http://dce.au.dk>

# Indhold

Baggrund	3
2. Svar på spørgsmål	3
Bilag 1.	5
Bilag 2.	8
Bilag 3.	12

## Baggrund

Naturstyrelsen (NST) har i e-mail af 17. juni og 22. juni 2016 anmodet Nationalt Center for Miljø og Energi (DCE) om svar på følgende:

I 2006 analyserede DCE 25 formodede odderekskrementer indsamlet på Sjælland af observatører fra Danmarks Naturfredningsforening (DN). DCE fandt odder-DNA i 8 af disse prøver.

I forbindelse med DCE's gennemgang og validering af DNA-analyser for ulv, har Naturstyrelsen fået behov for at rejse spørgsmål til DCE's DNA-analyser for odder. DCE har overfor styrelsen oplyst, at DCE til artsbestemmelse af ulv har benyttet en analysemetode hvor DNA opformeres (omtalt som metode 3 i tidligere korrespondancer mellem Naturstyrelsen og DCE). NST anfører desuden, at DCE efterfølgende har trukket resultaterne af denne metode tilbage, således at art- og individbestemmelsen til ulv udelukkende bygger på andre metoder.

På den baggrund har NST stillet følgende spørgsmål:

1. Anvendte DCE i 2006 metode 3 (samme metode som nu er trukket tilbage ifm. artsbestemmelse for ulv) til at artsbestemme odder ved fundet af odder-DNA i 2006?
2. Anvendte det hollandske analyseinstitut som senere bekræftede DCE's fund af odder i de 8 prøver også metode 3 (samme metode som nu er trukket tilbage ifm. artsbestemmelse for ulv)?
3. Findes de fysiske odderekskrementer indsamlet på Sjælland i 2006 stadig (i givet fald hvor?), og vil det være muligt at få dem analyseret igen (med anden metode)?
4. Hvilken videnskabelig værdi tillægger DCE i dag resultaterne af de analyserede odderekskrementer, indsamlet på Sjælland i 2006?
5. Findes der stadig DNA-sekvenser fra DCE's 8 positive odder prøver fra 2006 samt DNA-sekvenser fra det hollandske analyseinstitut som senere bekræftede DCE's fund?

## 2. Svar på spørgsmål

### Ad 1.

DCE benyttede ikke metode 3 til at artsbestemme odder. Til analyse af mulige odderekskrementer, der blev udført i april 2007, blev det ønskede DNA-stykke opformeret ved hjælp af den samme PCR-analyse som benyttes af bl.a. Senckenberg til analyse af ulve-DNA.

### Ad 2

Det hollandske analyseinstitut, Alterra, benyttede metode 3. For at verificere resultaterne af fund af odder på Sjælland blev det resterende materiale fra 10 ekskrementer sendt til Alterra i Holland. Af disse ekstraherede Alterra DNA fra 8 prøver. I løbet af efteråret 2007 og foråret 2008 blev den semi-nestede PCR-metode (metode 3) til artsbestemmelse af odder udviklet i det danske laboratorium. En protokol for denne PCR-metode blev sendt med prøverne til Alterra, der benyttede denne metode til at fastslå, om der var odder-DNA i prøverne. Resultatet af den hollandske analyse viste 6 odder-sekvenser, men det var kun muligt at identificere fem af prøvenumrene. Derfor er den sidste odder-sekvens fra det hollandske laboratorium udeladt.

I det tekniske notat (Bilag 1) er angivet hvilke prøver, der blev bestemt til odder og med hvilken sikkerhed. Baserækkefølgen i sekvenserne fra det hollandske laboratorium er i overensstemmelse med de danske DNA-fund af odder på Sjælland.

**Ad. 3**

Ekskrementerne forefindes ikke længere i fysisk form.

**Ad. 4**

DCE betragter DNA resultaterne fra de oprindelige analyser i 2007 som bevis for at der har været odder på Sjælland i 2006.

**Ad. 5.**

DNA sekvenserne fra de 8 ekskrementer, som DCE identificerede som odder, samt sekvenserne som det hollandske laboratorium identificerede som odder, er vedhæftet (Bilag 2 & 3).

## Bilag 1.

Danmarks Miljøundersøgelser  
Aarhus Universitet  
Afd. for Vildtbiologi og Biodiversitet

Teknisk Notat, d. 21/05/08

### Analyse af formodede odderekskrementer indsamlet på Vestsjælland

Liselotte Wesley Andersen, seniorforsker, Ph.D, populationsgenetiker  
Afdeling for Vildtbiologi og Biodiversitet, Danmarks Miljøundersøgelser,  
Århus Universitet, Grenåvej 12, 8410 Rønede

#### Formål

Projektets formål er at undersøge hvorvidt odderen *Lutra lutra* stadig forekommer i Vestsjælland. Projektet blev udført i samarbejde med Danmarks Naturfredningsforening (DN), der iværksatte 'Projekt Odder' i 2006 (<http://www.dn.dk/sw46976.asp>). Som et led i 'Projekt Odder' blev der indsamlet formodede 'odderekskrementer' langs udvalgte indsamlingsruter langs vandløb i Vestsjælland.

#### Materialer og metoder

Danmarks Miljøundersøgelser (DMU) har modtaget 25 ekskrementer indsamlet af DN til analyse. Analyserne blev udført som blindtest sammen med ca. 200 andre ekskrementer, der var indsamlet på forskellige lokaliteter i Jylland som en del af en evaluering af kvaliteten af standardmetoden til overvågning af odder. Prøvenumrene på ekskrementerne var randomiseret af DN, så det var ukendt for DMU, hvorfra i landet det enkelte ekskrement stammede.

#### DNA-analyse af det samlede materiale

Ekskrementerne blev analyseret på Institut for Genetik og Bioteknologi, Århus Universitet og DMU's, Århus Universitets DNA-laboratorium i Silkeborg.

DNA blev ekstraheret fra ekskrementerne ved hjælp af DNA-stoolkit fra OMEGA i et laboratorium, hvor der ikke tidligere er arbejdet med odderprøver. Ligeledes blev DNA-ekstraktion og den efterfølgende opformering af den genetiske markør udført i to forskellige laboratorier, hvorfor kontaminering kan udelukkes. Efterfølgende blev prøverne artsbestemt ved hjælp af en genetisk markør (Cytochrom B) på mitochondriell DNA, der kan benyttes til at artsbestemme ilder, mink og odder, og som samtidig har en basepar længde på ca. 180bp.

DNA ekstraheret fra ekskrementer er meget nedbrudt. Derfor er det vigtigt at DNA-fragmentet, der benyttes til identifikationen, ikke er for langt, så der er en højere sandsynlighed for at fragmentet findes i det ekstraherede DNA. Selve metoden er baseret på en opformering af DNA-fragmentet på 180bp, hvilket foregår ved hjælp af PCR (polymerase chain reaction), der er en metode som efterligner cellens eget reparationsystem ved at benytte enzymer, nuklotider og DNA-stykker. Det er derfor vigtigt, at det kan verificeres hvilken art DNA'et kommer fra, det vil sige at man kan påvise at opformeringen af DNA-fragmentet har virket. Et negativt resultat, dvs. en manglende opformering af DNA-fragmentet, kan forekomme enten fordi metoden ikke har virket, eller fordi prøven ikke er en odder. Når opformeringen var positiv blev DNA-fragmentet sekventeret på et sekventeringsmaskine.

Den fundne sekvens blev analyseret ved at søge efter den samme sekvens i GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>). GenBank er en international database, som indeholder sekvenser fra både dyre- og plantearter. Et match mellem den fundne DNA-sekvens i prøven og referencen i databasen blev accepteret, når den pågældende sekvens fra prøven havde fra 84-100% overensstemmelse med den mest sandsynlige art, der blev fundet i databasen.

Da sekvenserne var korte, blev sekvenserne editerede. Det betyder at den længste, læsbare sekvens, blev udvalgt efter kriterierne: sekvensen ikke var dobbelt og baserne var tydelige at læse. Dernæst blev sekvensen sammenlignet med sekvenserne i den internationale database, GenBank.

### Resultater

Tabel 1 angiver, hvor mange *Lutra lutra*-DNA-sekvenser der blev observeret blandt de 10 første sekvenser med det bedste match, som GenBank foreslog. Da den fundne sekvens ligger på Cytochrom B genen i mitochondriet, som er et gen der er bevaret gennem millioner af år på tværs af taxa på grund af dets funktion i det respiratoriske system, er det ikke uventet, at arter, der ikke er medlemmer af Carnivor-ordenen, kan have sekvenser, der ligner den fundne sekvens.

De fundne positive odder-ekskrementer blev sendt til et hollandsk laboratorium for at verificere resultaterne. Der blev sendt 10 prøver i alt, hvoriblandt der var to prøver som ikke var oddere. Det hollandske laboratorium blev ikke oplyst om identiteten af de tilsendte prøver. Det hollandske laboratorium kunne ekstrahere DNA fra 8 af de 10 tilsendte prøver. Syv blev sekventeret, hvoraf 5 prøver blev identificeret som oddere, og de sidste to som mink og ræv, selv samme prøver som DMU laboratoriet fandt henholdsvis mink og en dårlig sekvens, der ikke var odder i. Resultaterne af de 5 odder-prøver er givet i tabel 1.

### Konklusion

I DMU's DNA-laboratorium blev der med sikkerhed fundet DNA fra odder, *Lutra lutra*, i otte af de 25 indsamlede ekskrementer, som DMU har modtaget fra DN fra undersøgelsen i Vestsjælland. Prøve 1131 blev betragtet som usikker p.g.a. dårlig kvalitet, men det hollandske laboratorium identificerede prøven som odder, hvilket betyder at der er identificeret 8 odder-ekskrementer. Prøverne er efterfølgende blevet identificeret til at være indsamlet ved Nedre Halleby Å, Øvre Haleby Å, Bregninge Å og flere steder i Åmosen.

Tabel 1

Prøve	1129DK			1129NL			1131DK			1131NL			1132DK			1135DK			1135NL		
A	M/N	%	Art	M/N	%	Art	M/N	%	Art	M/N	%	Art	M/N	%	Art	M/N	%	Art	%	Art	
1	75/78	96	LL	130/132	98	LL	36/40	90	LP	131/134	97	LL	38/40	95	LP	41/42	97	LL	81/84	96	LL
2	75/78	96	LL	130/132	98	LL	35/40	87	LL	131/134	97	LL	38/41	92	LL	41/42	97	LL	81/84	96	LL
3	75/78	96	LL	130/132	98	LL	33/34	91	IS	131/134	97	LL	38/41	92	LL	41/42	97	LL	81/84	96	LL
4	75/78	96	LL	130/132	98	LL	35/40	87	LL	131/134	97	LL	38/41	92	LL	41/42	97	LL	81/84	96	LL
5	75/78	96	LL	130/132	98	LL	35/40	87	LL	131/134	97	LL	38/41	92	LL	41/42	97	LL	81/84	96	LL
6	75/78	96	LL	130/132	98	LL	35/40	87	LL	130/134	97	LL	38/41	92	LL	41/42	97	LL	81/84	96	LL
7	75/79	94	LL	129/132	97	LL	35/40	87	LL	130/134	97	LL	38/41	92	LL	41/42	97	RHSP	80/84	95	LL
8	75/79	94	LL	129/132	97	LL	35/40	87	LF	130/134	97	LL	38/41	92	LL	41/42	97	LL	80/84	95	LL
9	69/75	92	LP	125/132	94	LS	35/40	87	LL	126/134	94	LS	37/40	92	IS	41/42	97	LL	78/84	92	LP
10	70/78	89	MF	124/132	93	LP	35/40	87	LL	129/139	92	LP	37/40	92	LLO	37/37	100	VP	75/80	93	LPE

Prøve	1138DK			1140DK			1140NL			1147DK			1148DK			1148NL		
A	M/N	%	Art	M/N	%	Art	M/N	%	Art	M/N	%	Art	M/N	%	Art	M/N	%	Art
1	121/143	84	LL	78/78	100	LL	102/104	98	LL	38/41	92	LL	37/39	94	LL	134/136	98	LL
2	121/143	84	LL	78/78	100	LL	102/104	98	LL	38/41	92	LL	37/39	94	LL	134/136	98	LL
3	121/143	84	LL	78/78	100	LL	102/104	98	LL	38/41	92	LL	37/39	94	LL	134/136	98	LL
4	121/143	84	LL	78/78	100	LL	102/104	98	LL	38/41	92	LL	37/39	94	LL	134/136	98	LL
5	121/143	84	LL	78/78	100	LL	102/104	98	LL	38/41	92	LL	37/39	94	LL	134/136	98	LL
6	121/144	84	LL	78/78	100	LL	102/104	98	LL	38/41	92	LL	37/39	94	LL	134/136	98	LL
7	120/143	83	LL	78/78	100	LL	102/104	98	LL	38/41	92	LL	37/39	94	LL	133/136	97	LL
8	120/143	83	LL	77/78	99	LL	101/104	97	LL	37/40	92	LP	37/39	94	LL	133/136	97	LL
9	111/137	81	MZ	74/77	96	PM	98/104	94	LS	37/40	92	LP	27/28	96	MC	129/136	94	LS
10	111/137	81	MZ	74/77	96	PM	98/104	94	LP	36/40	90	IS	27/28	96	AC	128/136	94	LP

DK= resultat opnået i DMU's DNA-laboratorium

NL= resultat opnået for den samme prøve i et hollandsk laboratorium

A= Arts-rækkefølge, der angiver hvilken arts-sekvens der ligner mest den ukendte sekvens, baseret dels på sekvensens længde og antal base-match.

M= Antal base-match i den fundne sekvens

N= Antal baser i den ukendte sekvens, der er sammenlignet med de kendte sekvenser i GenBank udført af søge-algoritmen i databasen.

AC= Akodon cursor

IS= Ictonyx striatus

LF= Lontra felina

LL= Lutra lutra

LLO=Lontra longicaudis

LP = Lontra provocax

LPE = Lutrogale perspicillata

LS = Lutra sumatra

MC= Megadontomys cryophilus

MF= Martes Fiona

MZ=Martes zibellina

PM= Peromyscus maniculatus

RHSP= Rhipidomys sp

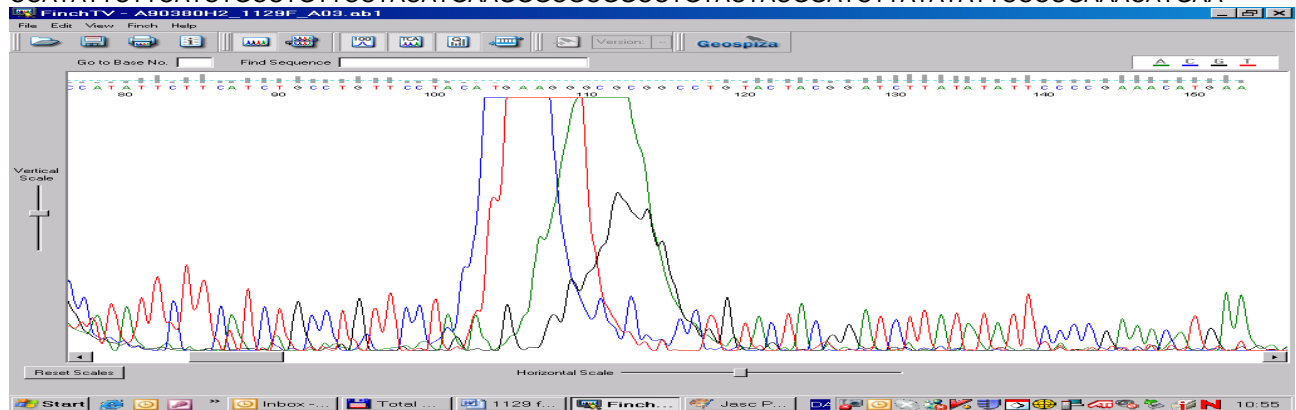
VP= Vormela peregusna

## Bilag 2.

1129

Editeret blasted sekvens.

CCATATTCTTCATCTGCCTGTTCTACATGAAGGGCGCGGCCTGTACTACGGATCTTATATATTTCCCGAAACATGAA

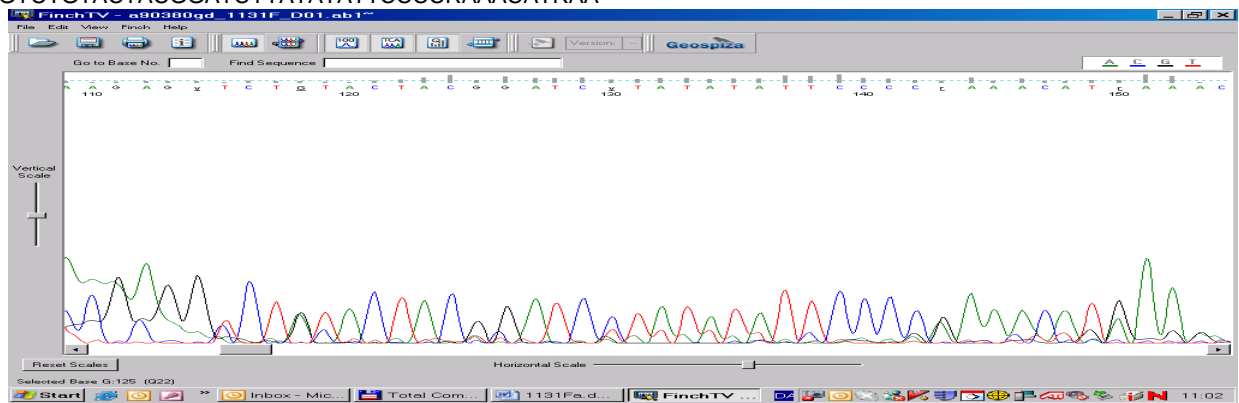


> [gb|EF689068.1](#) Lutra lutra isolate LI28m0304 cytb gene, complete sequence; and cytochrome b gene, complete cds; mitochondrial  
Length=1140  
Score = 127 bits (140), Expect = 4e-27  
Identities = 75/78 (96%), Gaps = 0/78 (0%)  
Strand=Plus/Minus

1131

Editeret blasted sekvens.

GGYCTGTACTACGGATCYTATATATTTCCCRAAACATRAA



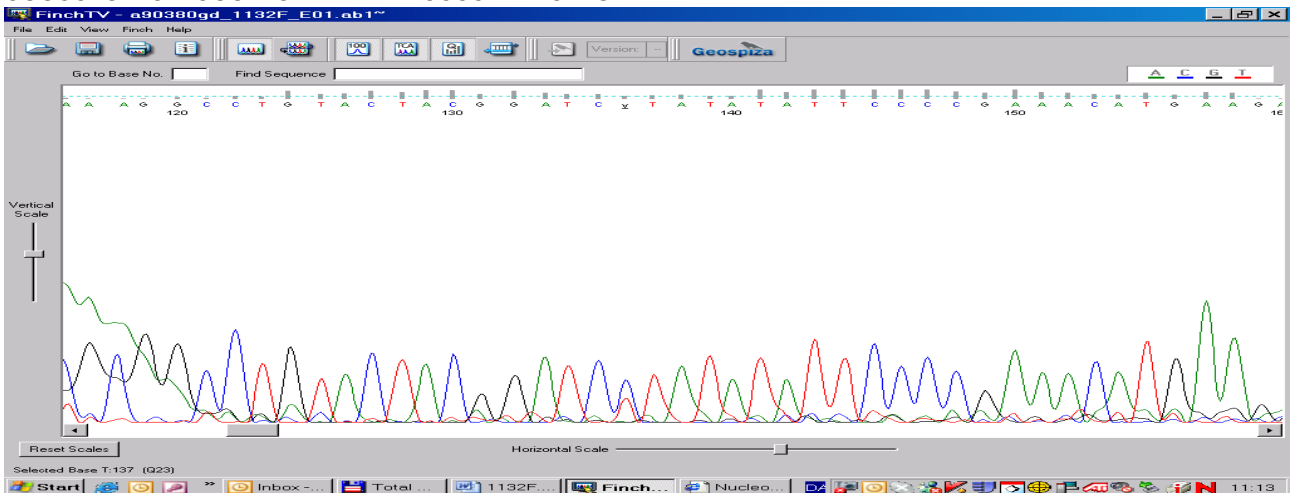
>  
> [gb|DQ341273.1](#) Lontra provocax cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial  
Length=671  
Score = 68.4 bits (32), Expect = 1e-09  
Identities = 36/40 (90%), Gaps = 0/40 (0%)  
Strand=Plus/Plus



1132

Editeret blasted sekvens.

CGGCCTGTACTACGGATCYTATATATTTCCCRAACATGAA



[gb|DQ341273.1](http://gb|DQ341273.1) Lontra provocax cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial

Length=671

Score = 74.2 bits (36), Expect = 2e-11

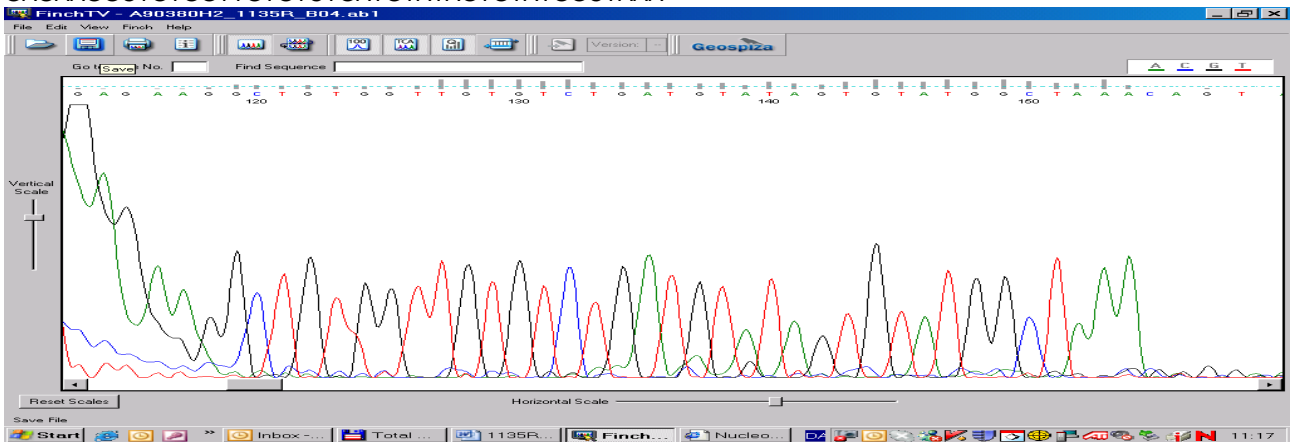
Identities = 38/40 (95%), Gaps = 0/40 (0%)

Strand=Plus/Plus

1135

Editeret blasted sekvens.

GAGAAGGCTGTGGTTGTGTCTGATGTATAGTGTATGGCTAAA



>[emb|AJ536012.1|LLU536012](http://emb|AJ536012.1|LLU536012) Lutra lutra mitochondrial partial cytb gene for cytochrome b,

isolate m355

Length=402

Score = 75.8 bits (38), Expect = 7e-12

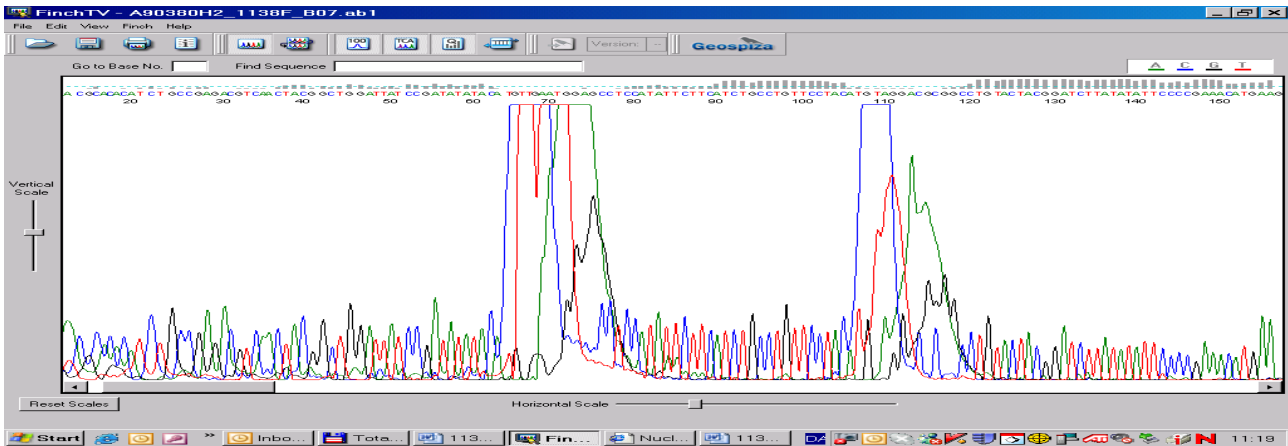
Identities = 41/42 (97%), Gaps = 0/42 (0%)

Strand=Plus/Minus

1138

Editeret blasted sekvens.

ACGCACACATCTGCCGAGACGTCAACTACGGCTGGATTATCCGATATATACAC-  
CATATTCTTCATCTGCCTGTTCCCTACATCGCGGCCTGTACTACGGATCTTATATATTTCCCCGAACATGAA



>[emb|AJ536010.1|ILLU536010](#) Lutra lutra mitochondrial partial cytb gene for cytochrome b, isolate m217

Length=402

Score = 169 bits (186), Expect = 3e-39

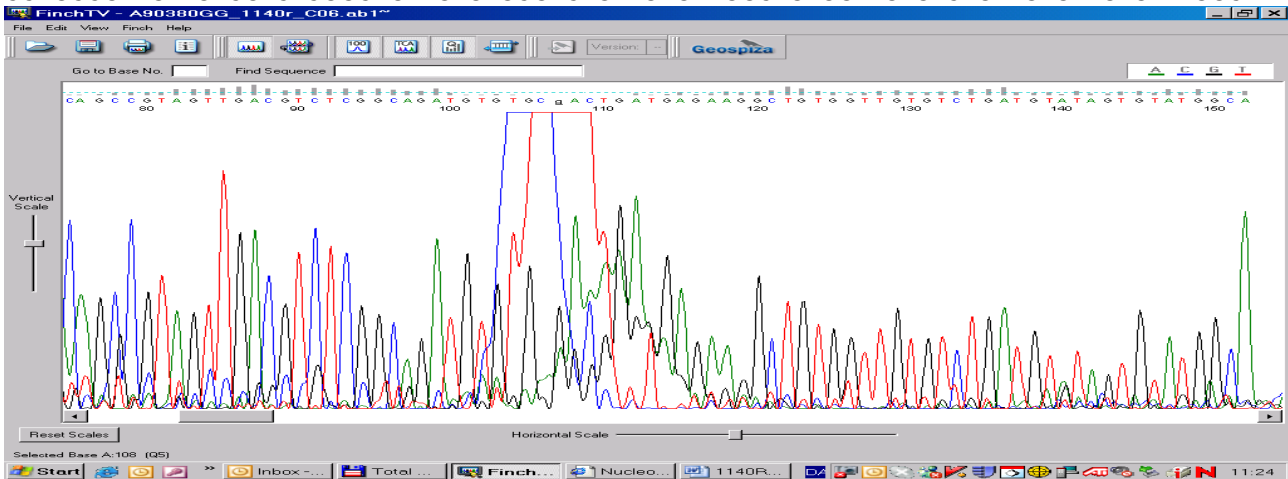
Identities = 121/143 (84%), Gaps = 20/143 (13%)

Strand=Plus/Plus

1140

Editeret blasted sekvens.

CCAGCCGTAGTTGACGTCTCGGCAGATGTGTGCGACTGATGAGAAGGCTGTGGTTGTGTCTGATGTGTAGTGTATGGCA



>[emb|AJ536012.1|ILLU536012](#) Lutra lutra mitochondrial partial cytb gene for cytochrome b, isolate m355

Length=402

Score = 141 bits (156), Expect = 2e-31

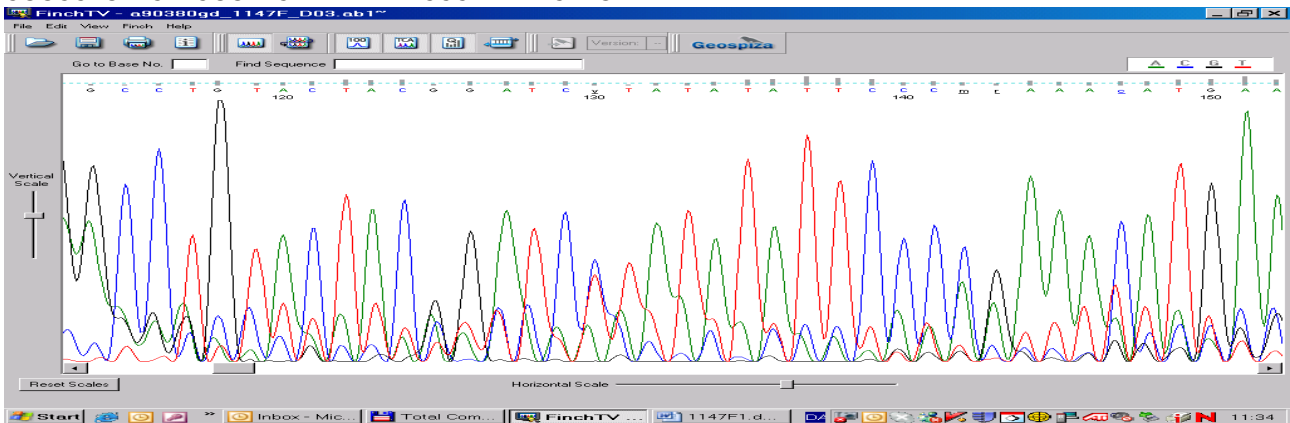
Identities = 78/78 (100%), Gaps = 0/78 (0%)

Strand=Plus/Minus

1147

Editeret blasted sekvens.

CGGCCTGTACTACGGATCYTATATATCCCMRAAACATGAA



>[gb|DQ341273.1](#) Lontra provocax cytochrome b gene, partial cds; mitochondrial

Length=671

Score = 71.3 bits (34), Expect = 2e-10

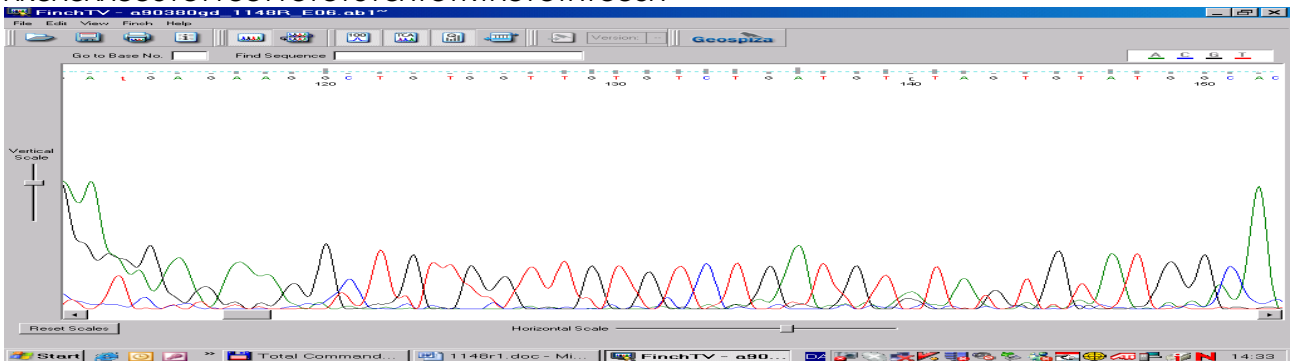
Identities = 37/40 (92%), Gaps = 0/40 (0%)

Strand=Plus/Plus

1148

Editeret blasted sekvens.

AKGAGAAGGCTGTTGGTGTCTGATGTRTAGTGTATGGCA



>[emb|AJ536012.1|ILLU536012](#) Lutra lutra mitochondrial partial cytb gene for cytochrome b,

isolate m355

Length=402

Score = 59.8 bits (29), Expect = 5e-07

Identities = 37/39 (94%), Gaps = 1/39 (2%)

Strand=Plus/Minus

### Bilag 3.

>1129\_T80771073\_A19\_040.ab1 131 0 131 ABI trimmed  
TGCCGAGACGTCACACTACGGCTGGATTATCCGATACATACACGCAAACGGA\_  
GCCTCCATATTCTTCATCTGCCTGTTCTACATGTAGGACGCGGCCTGTA  
CTACGGATCTTATATATTCCCCGAAACATGA  
#Lutra lutra mitochondrial gene for cytochrome b, partial cds, strain: A line

>1131\_T80771074\_C19\_039.ab1 136 0 136 ABI trimmed  
CCACTCTGCCGAACGTCACACTACGGCTGGATTATCCGATACATACACGCAA  
ACGGAGCCTCCATATTCTTCATCTGCCTGTTCTACATGTAGGACGCGGC  
CTGTACTACGGATCTTATATATTCCCCGAAACATGA  
#Lutra lutra mitochondrial gene for cytochrome b, partial cds, strain: A line

>1140\_T80771075\_E19\_038.ab1 955 0 955 ABI trimmed  
GACGAGAGTTACTACTACTGGAATATCCGATACATACACGCAAACGGAGA  
CTCCATATTCTTCATCTGCCTGTTCTACATGTAGGACGCGGCCTGTACT  
ACGGATCTTATATATTCCCCGAAACATGAACCGCACCGAGACAGGGGCCC  
AGGGCAAAGATTCCCTAACGAACCGAACATAACCCGIGTTCGGCTGAT  
AAGACCAGGAGCGGAATAATGAGAGACAACACTTACCCCTCTGTGCAG  
ACATAAAGCGGCGAAAGCACGCGTCACGCATGCAGACACACAAAAACGAA  
CAGGTCAAAGAAGATAAGAATCAGTAGATAACAACAAACGACCAAATAAG  
CCTTATACTGTACAGCAGAAGCACCGACTTCACAGCCAGCCGCCCGCTTA  
CTATATAATAGAATTACGCCACAGAATGGAACACACACACAACAAGTGCG  
GAGCATCAGACCCGACGATGTAACACCACACAGAACTCAAACCGAGACA  
ACAGAACAAGCAATCCATTATATGTAGTCAACGATGACGCCACACGCACT  
AGAGAGATAAACAAGCGTAGCACAATGGAGCATGGTCATACAGCACAAGA  
CCACAAGACAAGACAAGGACGTATCACAAGTCACAAACACCAAACACGCA  
CAAGACAAGATTCTATCAATAGTAGTAAAGGAGACAAAATAGGACGACAG  
ATGACCGACACAGTATCAGACACACTTCAAGACTACACAGTTGTGACGTA  
CGAAACATAATTTTCATAGAGACAGACGAAAATAAGAGCGGACAGACAAAA  
TACTACACTGAGAACAGAGCGTTCAAGAAAGAAAACATAAAGGCGCAAGA  
CGGTGGACGCCCAAAAAGAAGACCCCATAGGAGGTCGACCACGCGAGCAC  
TTTCATAATAATGGATCAACATCAGTAAAGATACAGGCTGACAGACTAAT  
CGAGT  
#Lutra lutra mitochondrial partial cytb gene for cytochrome b, isolate m258

>1148\_T80771077\_I19\_036.ab1 147 0 147 ABI trimmed  
CTCTTCGTCGCCCATCTGCCGAGACGTCACACTACGGCTGGATTATCCGATA  
CATACACGCAAACGGAGCCTCCATATTCTTCATCTGCCTGTTCTACATG  
TAGGACGCGGCCTGTACTACGGATCTTATATATTCCCCGAAACATGA  
#Lutra lutra mitochondrial gene for cytochrome b, partial cds, strain: A line

>1135\_T80771079\_M19\_034.ab1 922 0 922 ABI trimmed  
TCGGTTATCCGATACTTACACGGCCACCGGAGGCTCCGTATTCTTCATCT  
GCCTGTTCTACATGTAGGACGCGGCCTGTACTACGGATCTTATATATTC  
CCCGAAACATGAAGACACTGGCCGCTGCCGGCCGTGCCGATTTCTAGCC  
CGAGCCCCCATTTCCCTTAGGCCCGATTTGAGTGAAGGGGGCAACGTGGA  
AAGAGAGCTTGCCACCGTCAGCCGCCTTACTCACACCTTAAGGCCGTCTA  
CCCCTCACATCATCAGGGGCGGATCCAGCCGCCCGGGAGTCTCCCGTCTA  
CCCGCAGTGCCTCCCTCTCCTCGCCCCGCTGTAAATTGATCACGTGCAC  
CGTCCACTCTGGCCCCGTGCGCCCCGATACAATTGATCCCTAAATAACCC  
CCTGTGCGGTTCCAGTGTAACCACACGCGGGCTGCTAACTCAAGTCTGTC  
GGGCCCCACAAAAACAACGCTCGGCTGTTTCGTGCACCGGCCAATGAA  
TGGGAGTTAGTAAGCGGCCTCGCGTCCACCCAATAACGCGACCCAAGCGG

CTGAGACGACGGCCATCCGACACCCATCGCTGTACTACTGGGAACACATA  
CTTCATCTCCGTCGCCCTATACGCGCCCCACGAGTGCCACCGAAGACGT  
CTGCTCGTTTACTGCTCATGCAGCCTCCTGCATCCCTGTACTATAACCGT  
ATAAAGTGGAGCTGAGAGGCGGCAGTCAACGTTAGTCCCCGCAGGAGGCT  
TCTTCGCACTTCGGTCATGAAGATCCGCTCCAACCTTGCCAGTCCGCTCC  
CTTGCCGTGTCTGCGATCGCTGGCACACTCACTATCCAGCCCGCCACTAC  
TCCCCGAGGTCTCGCCCAGTCGATCACTCGTCCTGCAAACAAGATGAGCG  
ACCTACTGGCTCCGACCCGAAA

# *Lutra lutra* mitochondrial gene for cytochrome b, partial cds, strain: A line