

DNA analyse af mulige odder-ekskrementer indsamlet på Fyn

Notat fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi

Dato: 12. juni 2017

Liselotte Wesley Andersen & Bjarne Søgaard

Institut for Bioscience

Rekvirent:
Miljøstyrelsen
Antal sider: 7

Faglig kommentering:
Lars-Erik Holm, Institut for Molekylær Biologi og Genetik, AU
Kvalitetssikring, centret:
Jesper R. Fredshavn



AARHUS
UNIVERSITET

DCE - NATIONALT CENTER FOR MILJØ OG ENERGI

Tel.: +45 8715 0000
E-mail: dce@au.dk
<http://dce.au.dk>

Indhold

Baggrund	3
Metode	3
Resultat og diskussion	4
Referencer	4
Bilag 1	6
Bilag 2	7

Baggrund

Odder (*Lutra lutra*) overvåges i det nationale overvågningsprogram for vandmiljø og natur (NOVANA) hvert 6. år, og den seneste overvågning er gennemført i 2017. Odderens levevis gør det ikke muligt at gennemføre en overvågning baseret på direkte observationer af arten. Til overvågning af odder anvendes derfor en international standardiseret kortlægningsmetode, der baserer sig på, at odderen afmærker sit territorium med ekskrementer, som normalt placeres på iøjnefaldende steder langs vandløb og søer. Eftersøgningen af odder-ekskrementer foretages på et i forvejen fastlagt stationsnetværk bestående af godt 1.200 stationer fordelt over hele landet og er beskrevet i en teknisk anvisning (Søgaard m.fl. 2017).

Den tekniske anvisning foreskriver en kvalitetssikringsprocedure for fund af ekskrementer – der vurderes at stamme fra odder – der indebærer en dokumentation for artsbestemmelsen ved DNA-analyse hvorefter fundet og stationen betegnes som positiv. Denne kvalitetssikring gælder kun for fund af ekskrementer i overvågningsområder, hvor odder mangler eller er meget fåtallig: Fyn, Sjælland, Lolland, Falster og Møn.

I forbindelse med NOVANA-overvågningen af odder på Fyn blev der indleveret 29 mulige odder-ekskrementer til DNA-analyse for odder. Ekskrementerne blev indsamlet i marts 2017 af Miljøstyrelsen-Fyn. 28 af de analyserede ekskrementer kunne med sikkerhed artsbestemmes til odder (Tabel 1) (se resultater og diskussion).

Metode

DNA-ekstraktionerne blev foretaget i et DNA-laboratorium, der kun bliver benyttet til prøver, hvor DNA-koncentrationen forventes at være lav. DNA blev ekstraheret med Qiagen DNA Fast stool kit. Opformeringen af mitokondriemarkøren, der bliver benyttet til at identificere arten, er foretaget i et andet, særskilt laboratorium for at undgå kontaminering. Prøverne er artsbestemt ved hjælp af en genetisk markør (Cytochrom B) på mitochondriel DNA, der kan benyttes til at artsbestemme ilder, mink og odder, og som samtidig har en baseparlængde på ca. 180bp (Hansen & Jacobsen, 1999). Den genetiske markør blev opformet ved en PCR-kørsel. Prøverne blev opsat i 0,2 mikroliter mikrorør i serie af 8 sammenhængende rør (også kaldet strips). For hver af de 8 rør blev der i de 6 første rør tilsat DNA, mens de 2 sidste blev benyttet som negative kontroller, dvs. rør med enzym-mix hvor der ikke er tilsat DNA. De 29 prøver blev opsat i replikater af 2. For at minimere kontamineringsrisikoen yderligere blev hver strip behandlet for sig, dvs. efter tilsætning af enzym og før tilsætning af DNA blev de lukket med låg. Lågene blev taget af ved tilsætning af DNA til den enkelte strips med de 8 rør og derefter lukket før tilsætning af DNA til næste strip.

Alle 29 x 2 replikater gav et DNA-fragment og alle 22 medkørte negative kontroller var blanke. Et DNA fragment fra hver prøve blev udvalgt og efterfølgende sekventeret ved firmaet MACROGEN, Holland. De fremkomne 29 sekvenser blev analyseret ved at søge efter den samme sekvens i Genebank, der er en international database, som indeholder sekvenser fra både dyre- og plantearter. Et match blev accepteret, når den pågældende sekvens havde 99% overensstemmelse med den mest sandsynlige art, der blev fundet i databasen.

Tabel 1. Resultaterne af DNA-analyser af 29 indsamlede mulige odderekskrementer på Fyn i marts 2017. Gråtonede lokaliteter er stationer, som ikke er del af det stationsnetværk, der skal overvåges iht. den tekniske anvisning ("Løsfund")

Lab-ID	Lokalitet	Kn10kmdk	MST	Odder
FY1	Stor Å v Højrup	10km_615_56	Fyn	ja
FY2	Stor Å v Varbjerg Strand	10km_615_56	Fyn	ja
FY3	Stor Å v Labølledam	10km_615_57	Fyn	ja
FY4	Gamborg Vildreservat s udløb	10km_614_55	Fyn	ja
FY5	Viby Å, S Viby	10km_614_55	Fyn	ja
FY6	Stor Å v Nybro NV Graderup	10km_614_56	Fyn	mink
FY7	Hybæk v Dæmningsbro	10km_613_55	Fyn	ja
FY8	Brænde Å v Breding Bro	10km_613_55	Fyn	ja
FY9	Brænde Å v Kerte Bro	10km_613_56	Fyn	ja
FY10	Pugemølle Å vest for Ørsted	10km_613_56	Fyn	ja
FY11	Brænde Å vest for Skalbjer	10km_613_57	Fyn	ja
FY12	Odense Å under motorvej E20	10km_613_58	Fyn	ja
FY13	Vejrup Å v Vejrupgård	10km_613_59	Fyn	ja
FY14	Vindinge Å syd for Ullerslev	10km_613_60	Fyn	ja
FY15	Vindinge Å	10km_613_60	Fyn	ja
FY16	Odense Å v Nr. Broby	10km_612_57	Fyn	ja
FY17	Vindinge Å v dæmning	10km_612_61	Fyn	ja
FY18	Odense Å v Nedre Hillerslev	10km_611_58	Fyn	ja
FY19	Odense Å v Arreskov	10km_611_58	Fyn	ja
FY20	Hundstrup Å v udløb	10km_610_58	Fyn	ja
FY21	Hundstrup Å v Ågrønnehuse	10km_610_59	Fyn	ja
FY22	Syltemade Å v Åbro	10km_610_59	Fyn	ja
FY23	Sallinge Å v Fåborgvej	10km_612_58	Fyn	ja
FY24	Lindved Å, udløb Odense Å	10km_614_59	Fyn	ja
FY25	Stavis Å, udløb Odense kanal	10km_614_58	Fyn	ja
FY26	Rislebæk, 30 m opstrøms udløb i Arreskov Sø	10km_611_58	Fyn	ja
FY27	Hundstrup Å, vejbro på Strandvejen mel. Vr Åby og Fjellebro	10km_610_58	Fyn	ja
FY28	Viby Å, nedstrøms Nr Åby renseanlæg	10km_614_55	Fyn	ja
FY29	Hygind Bæk, Tyvs Banke øst for Hygind	10km_613_55	Fyn	ja

Resultat og diskussion

Af de 29 prøver havde 28 et 99% match med odder-sekvenser i GenBank. Den sidste havde et 99% match med mink (*Mustela vison*). Yderligere blev der identificeret to forskellige haplotyper, benævnt Od1 og Od2. Prøverne Fy1-3, Fy5, Fy7-10, Fy13-14, Fy16-23, Fy26-29 (bilag 1) havde haplotypen Od1 mens prøverne Fy4, Fy11-12, Fy15, Fy24-25 havde haplotype 2 (bilag 2). Det betyder, at der mindst er to forskellige individer på Fyn. De fundne sekvenser blev sammenlignet med sekvenser fra odder fundet på Fyn ved Odense Å og Lindved Å i 2016 (Andersen 2016). Begge disse sekvenser var identiske til haplotype Od2, der ligeledes blev fundet i prøver indsamlet fra Odense Å (Fy12) samt løsfund fra Lindved Å i 2017.

Referencer

Andersen, L.W. (2016). Resultat af DNA analyse af fire mulige odder-ekskrementer indsamlet på Fyn. (Teknisk notat afleveret til Rambøll Danmark A/S sendt 19/5-2016)

Hansen, M.M. & L. Jacobsen (1999). Identification of Mustelid species: otter (*Lutra lutra*), American Mink (*Mustela vison*) and polecat (*Mustela putorius*) by analysis of DNA from faecal samples. - J. Zool. L. 247, 177-181.

Søgaard, B., Elmeros, M. & Madsen, A.B. (2017). Overvågning af odder *Lutra lutra*. Teknisk anvisning til ekstensiv overvågning fra DCE's Fagdatacenter for Biodiversitet og Terrestrisk natur; Nr. A01, Ver.1.3. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2017. 11 s.

Bilag 1

Haplotype OD1 fundet I prøvenr: Fy1-3,Fy5,Fy7-10,Fy13-14,Fy16-23,Fy26-29 CTCATCAGTCGCA-CACATCTGCCGAGACGTCAACTACGGCTGGATTATCCGATATATACACGCAAACGGAG-CCTCCATATTCTTCATCTGCCTGTTCCCTACATGTAGGACGCGGCCTGTACTACGGATCT-TATATATTCCCCGAAACATGAAGA

Lutra lutra mitochondrial Cytb gene for Cytochrome b protein, haplotype H7

Sequence ID: [LT593916.1](#) Length: 1140 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 189 to 340 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
270 bits(146)	6e-69	150/152(99%)	0/152(0%)	Plus/Plus
Query 1	CTCATCAGTCGCACACATCTGCCGAGACGTCAACTACGGCTGGATTATCCGATATATACA			60
Sbjct 189	CTCATCAGTCGCACACATCTGCCGAGACGTCAACTACGGCTGGATTATCCGATACATACA			248
Query 61	CGCAAACGGAGCCTCCATATTCTTCATCTGCCTGTTCCCTACATGTAGGACGCGGCCTGTA			120
Sbjct 249	CGCAAACGGAGCCTCCATATTCTTCATCTGCCTGTTCCCTACATGTAGGACGCGGCCTGTA			308
Query 121	CTACGGATCTTATATATTCCCCGAAACATGAA	152		
Sbjct 309	CTACGGATCTTATATATTCCCTGAAACATGAA	340		

Bilag 2

Haplotype OD2 fundet i prøvenr: FY4, Fy11-12,Fy15,Fy24-25

TTCTCATCAGTCGCACACATCTGCCGAGACGTCAACTACGGCTGGATTATCCGATACA-
TACACGCAAACGGAGCCTCCATATTCTTCATCTGCCTGTTCCCTACATGTAG-
GACGCGGCCTGTACTACGGATCTTATATATTCCCCGAAACATGAA

Lutra lutra mitochondrial Cytb gene for Cytochrome b protein, haplotype H7

Sequence ID: [LT593916.1](#) Length: 1140 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 187 to 340 [GenBankGraphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
279 bits(151)	9e-72	153/154(99%)	0/154(0%)	Plus/Plus
Query 1	TTCTCATCAGTCGCACACATCTGCCGAGACGTCAACTACGGCTGGATTATCCGATACATA			60
Sbjct 187	TTCTCATCAGTCGCACACATCTGCCGAGACGTCAACTACGGCTGGATTATCCGATACATA			246
Query 61	CACGCAAACGGAGCCTCCATATTCTTCATCTGCCTGTTCCCTACATGTAGGACGCGGCCTG			120
Sbjct 247	CACGCAAACGGAGCCTCCATATTCTTCATCTGCCTGTTCCCTACATGTAGGACGCGGCCTG			306
Query 121	TACTACGGATCTTATATATTCCCCGAAACATGAA		154	
Sbjct 307	TACTACGGATCTTATATATTCCCTGAAACATGAA		340	