

Anvendelse af eDNA-metoder i NOVANA-artsovervågningen

Muligheder og begrænsninger

Notat fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi

Dato: 5. juni 2012

Liselotte Wesley Andersen
Bjarne Søgaard
Liselotte Sander Johansson
Peter Wiberg-Larsen

Institut for Bioscience

Rekvirent:
Naturstyrelsen
Antal sider: 20

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

Formål	3
Baggrund	3
Brugen af DNA i overvågningen	3
Identifikation af enkelt-arter	4
Identifikation af artsgrupper eller hele artssammensætningen (biodiversitetsmonitoring)	5
Sammenhæng mellem eDNA-koncentrationen og biomassen af den pågældende art	7
Følkilder ved brugen af eDNA i monitoringen af arter og biodiversitet	7
Implementering af eDNA i NOVANA-overvågnings- programmerne	10
Sammenlignende undersøgelser af eDNA med konventionelle metoder	11
Forslag til forsøgsdesign ved hver ny art der ønskes overvåget med eDNA	13
Business cases	15
Referencer	19

Formål

Formålet med udredningen er at belyse de teoretiske muligheder og begrænsninger for at operationalisere anvendelsen af DNA til identifikation af arter i overvågningen af arter og naturtyper i natur- og ferskvandprogrammerne i NOVANA. Foruden de teoretiske muligheder metoderne tilbyder, redegøres der for de krav metoderne stiller i forhold til laboratoriekraav, prøvetagningsdesign og metodik, kalibrering med nuværende metode og vidensopbygning.

Baggrund

Den eksisterende artsovervågning i NOVANA har til formål er at følge tilstand og påvirkninger af udvalgte arter og udviklingen heri. I henhold til habitatdirektivet er medlemslandene i EU forpligtiget til at sikre arter omfattet af direktivet en gunstig bevaringsstatus. Overvågningen af arter på habitatdirektivets bilag er derfor specifikt målrettet mod at tilvejebringe en viden om de enkelte arters bevaringsstatus og dermed et grundlag for at vurdere, om der skal iværksættes forvaltningsmæssige tiltag, der kan forbedre den enkelte arts udbredelse og talrigheid. Begge parametre udgør centrale elementer i habitatdirektivets definition af gunstig bevaringsstatus. I overvågningen skelnes mellem intensiv og ekstensiv overvågning, hvor intensiv er overvågning af bestandsstørrelser og ekstensiv overvågning er overvågning af arternes udbredelse med udgangspunkt i et 10 km x 10 km kvadratnet.

Mange arter kan dog være vanskelige at påvise eller identificere afhængig af arternes livsstadier, levemåder, adfærd og det tidspunkt på året overvågningen foretages på. Det betyder, at uanset hvilken overvågningsmetode der vælges, kan detektionssandsynligheden være lav. Påvisningen af sjældne arter er en særlig udfordring, fx er det i akvatiske miljøer problematisk, at de konventionelle metoder som net og elektrofiskning giver en lav fangstsandsynlighed per ønsket art og derfor er disse metoder kun anvendelige for arter, der forekommer i rimelige tætheder, med mindre der anvendes en meget høj prøvetagningsintensitet. For sjældne arter vil der således ofte være en tendens til øget falske-negative forekomster idet "ikke fanget" ofte tolkes som "ikke tilstede".

De seneste års udvikling dels i mulighederne for ekstraktion af DNA fra forskellige miljøprøver taget i både vand og jord samt i udviklingen af DNA-sekvenseringsteknologien har gjort det muligt at benytte DNA til identifikation af både mikroorganismer, planter og dyr (Ficetola et al 2008, Thomsen et al. 2012). Fx viser Thomsen et al. (2012), at det er muligt at påvise om overvågede arter forekommer i et vandhul ved at genfinde arternes DNA i en vandprøve.

Brugen af DNA i overvågningen

Hvis DNA-metoderne skal finde anvendelse i den eksisterende NOVANA artsovervågning vil det derfor umiddelbart være et bidrag til den ekstensive overvågning af arternes udbredelse, men også den mere intensive overvågning kan drage nytte af DNA-metoderne, der kan benyttes som et screeningsværktøj til at udpege områder, hvor den mere intensive overvågning skal foregå. Eksemplet med vandhulsarter viser, at det er muligt at foretage en bred screening af vandhuller/små søer for forekomst af enkeltarter. Men ikke kun DNA i vandprøver kan være relevante at overveje i NOVANA-

overvågningen. Der er også muligheder for at benytte DNA til identifikation af arter i jord-, dynd- og vegetationsprøver. Samtidig åbner DNA-metoderne også for muligheden for at identificere arter, der er vanskelige at artsbestemme, og kan således give mere pålidelige data for artssammensætningen, der f.eks. kan styrke beregningen af faunaindeks og artsindeks, samt inddrage arter, vi endnu har været tilbageholdende med i overvågningen, som mosser og laver, der stiller særlige krav til artsbestemmelsen.

I det følgende skelnes mellem to grundlæggende forskellige metoder til at benytte environmental DNA (eDNA) i naturforvaltningen: 1) identifikation af enkelt-arter og 2) identifikation af artsgrupper eller hele artssammensætningen (biodiversitetsmonitoring). Enkelt-artsovervågningen, hvor der kun screenes for en enkelt art, er mere simpel at benytte, mens biodiversitetsmonitoringen, hvor flere artsgrupper kortlægges samtidigt, er baseret på de nyeste teknologier som Next Generation Sequencing (NGS) og er væsentligt mere kompliceret.

En væsentlig forudsætning for begge metoder er, at der forefindes tilgængelige biblioteker over de pågældende arters DNA. Biblioteket skal også omfatte korte DNA-sekvenser (metabarcoder), der er særligt væsentlige for identifikationen af eDNA, der typisk består af meget korte, ofte nedbrudte stykker DNA (Taberlet et al. 2012). DNA-metoderne stiller også særlige krav til analysefaciliteter, og en knowhow hos prøvetagere og analytikere. For at metoderne realistisk skal kunne implementeres i overvågningsprogrammet skal de være mindst lige så pålidelige som de eksisterende metoder og prøvetagnings- og analyseomkostningerne skal være sammenlignelige med de nuværende omkostninger.

Forskellige undersøgelser har påvist, at korte DNA stykker kan eksistere gennem lange tidsperioder under optimale miljøforhold (Willerslev et al. 2003). Det er derfor vigtigt at vide, hvilken tidsperiode den pågældende eDNA prøve repræsenterer. En forudsætning for at indgå i overvågningen er at et positivt fund af arten kan tolkes som en nylig tilstedeværelse af arten, dvs. at arten forefindes på det tidspunkt eller samme år, som prøven er taget. Hvis prøven er udtryk for en historisk tilstedeværelse, der strækker sig 50-100 år tilbage i tiden, vil den ikke kunne bruges i denne sammenhæng. Varigheden af DNA stykkerne varierer i forhold til mediet (om det er vand eller jord) hvori eDNA-prøven er udtaget, og hvorledes den er udtaget.

Der er en righoldig litteratur om de molekylære metoder til artsbestemmelse ved eDNA, mens implementeringen af disse i forvaltningen stadig er mangelfuld. På globalt plan benyttes eDNA hovedsageligt til påvisning af invasive arter, mens brugen i naturforvaltningen stadig er sparsom. I det følgende gives nogle eksempler på, hvor eDNA til identifikation af en enkelt art er benyttet.

Identifikation af enkelt-arter

Invasive arter

eDNA er benyttet til påvisning af invasive arter i forbindelse med importen af danske østers til opdræt i Holland. Her blev opdagelsen af små ægkapsler der lignede æg fra den japanske invasive østers bekræftet med DNA. Denne påvisning førte til, at der i Holland blev nedlagt forbud mod import af østers fra samme sted i DK (Darling & Mahon, 2011). I USA har naturforvaltningen i Utah indført krav om positiv påvisning af DNA fra *Dreissena-*

muslingearterne i et vandsystem før der ageres forvaltningsmæssigt. DNA påvisningen fungerer dog ikke som eneste bevis for arternes tilstedeværelse. Man benytter en multidisciplinær screeningsprotokol, der også inkluderer de traditionelle mikroskopimetoder m.m. Især New Zealand og Australien benytter DNA-barcodning til at understøtte forvaltningsbeslutninger for at undgå invasive arter. Her benyttes DNA-barcodning til verifikation af morfologisk taksonomi (Darling & Mahon, 2011).

Sjældne arter

Thomsen et al. (2012) benytter eDNA til at monitorere sjældne arter i eller omkring akvatiske systemer. De udvalgte 6 arter, der repræsenterede forskellige taksonomiske grupper (løgfrø, stor vandsalamander, dyndsmerling, odde, larver fra stor kærguldsmed og forårssdamrokke). De udførte komparative undersøgelser i naturlige søer, vandhuller, vandløb og midlertidige vandhuller ved at kombinere DNA-påvisning af en art med den visuelle bekræftelse af forekomsten. Ud fra DNA ekstraktion fra 3 x 15 ml vandprøver fra 98 vandhuller og efterfølgende opformering af artsspecifikke DNA-stykker var der positive PCR for alle vandhuller med fisk (100 % detektion), for stor vandsalamander og løgfrø (91-100 % detektion), for stor kærguldsmed (82 % detektion) og for forårssdamrokke (100 % detektion). Positiv PCR er tegn på, at markøren fanger en specifik DNA- sekvens for den pågældende art. Analyserne af de 3 kontrol vandhuller, hvor arterne ikke var fundet tidligere, gav alle negativ detektion.

Løgfrø blev påvist i 5 vandhuller, hvor den tidligere var fundet, men hvor de konventionelle metoder ikke kunne påvise den for nylig. I disse 5 vandhuller var DNA-koncentrationen lav i forhold til vandhuller med høj tæthed af løgfrø. Dyndsmerling blev påvist i 54 % af de vandløbssystemer med kendt forekomst, hvilket svarede til detektionsraten for den konventionelle metode. Odde blev påvist i 27 % af vandløbssystemerne, hvor den skulle være. Dvs. der her var en falsk negativ detektionsrate på 73 %. Odderen lever ikke kun i vand, og er derfor vanskelig at påvise med metoden pga. lav DNA-koncentration.

Hollandske RAVON (2012) har udført et pilotprojekt, hvor eDNA og design af artsspecifikke markører blev benyttet til påvisning af dyndsmerling. I projektet udvalgte de 4 vandsystemer med høj tæthed, 4 med lav tæthed og 4 uden dyndsmerling. Vandprøverne blev indsamlet efter standardiseret protokol, hvor redskaberne blev steriliseret efter hver prøvetagning. De benyttede en positiv PCR som positiv påvisning af arten efter grundig efterprøvnings af, at markørerne ikke fangede andre arter. Efterfølgende påviste de artens tilstedeværelse ved elektrofiskning. De fandt, at i vandhuller med høj tæthed, var der en detektionsrate på 100 %, ved lave tætheder på 75 %, dvs. der var en gennemsnitlig detektionsrate på 87,5 %. Det er af væsentlig betydning for påvisningen med eDNA, hvornår på året vandprøverne tages, da koncentrationen af DNA afhænger af, om arten er aktiv (dvs. yngler) eller om den ikke er aktiv. Jo mere aktiv, jo mere urin, fæces og hudceller er der i vandet og jo større er sandsynligheden for detektion.

Identifikation af artsgrupper eller hele artssammensætningen (biodiversitetsmonitoring)

Akvatisk

Til monitorering af biodiversitet med eDNA benytter Thomsen et al. (2012) bl.a. mere generelle markører for fisk og padder, hvorefter det opformerede

DNA bliver sekvenseret på anden-generations sekvenser (NGS). Vandprøver blev udtaget fra vandhuller med en kendt padde- og fiske fauna. Her var det muligt at afspejle den kendte artsdiversitet for de to grupper med en detektionsrate på 100 %. Yderligere blev der også påvist DNA fra arter, der lever i nærheden af vandet eller kun opholder sig en del af tiden i vandet, dvs. blichøne (*Fulica actra*), ringdue (*Columba palumbus*), kæranger (*Arocephalus palustris*) og kronstyr (*Cervus elaphus*). Dvs. metoden også kan detektere organismer i nærheden af vandet. Om man fanger alle arterne, der er til stede, afhænger af markørdesignet og er et trade-off mellem at målrette disse mod højere taksonomiske niveauer og detektion af sjældne sekvenser (Thomsen et al. 2012). Med forbehold for de fejlkilder der er ved brugen af eDNA til biodiversitetsmonitoring ("Fejlkilder ved brugen af eDNA i monitoringen af arter og biodiversitet" og "Biodiversitetsmonitoring") er det således muligt at monitorere biodiversiteten for et bestemt økosystem.

Terrestrisk

Andersen et al. (2012) monitorerede biodiversiteten af vertebrater ved hjælp af eDNA fra jordprøver i kombination med NGS og målrettede DNA-markører i udvalgte områder som safari parker, zoologiske haver og strudse farme. Områderne blev udvalgt, fordi artssammensætningen her ikke afspejler den danske vertebratfauna. Dette er nødvendigt for at illustrere, at metoden kan benyttes til at monitorere den levende/recente fauna i området uden at resultatet er kontamineret af arter, der levede for 50 eller flere år siden. Nedsivning af DNA gennem jordlagene er vigtig i tolkning af resultaterne for artssammensætningen og dennes udvikling over en tidsperiode. Foregår der nedsivning vil der forekomme arter, der historiske set, ikke var til stede i den pågældende periode. Nedsivning har også betydning i forbindelse med kvantificering af biomasse af den pågældende art, og for omsætningen af DNA over tid.

Da jordbundstypen kan forventes at have stor betydning for DNA-nedsivningen gennem jordlagene blev denne faktor undersøgt i separat forsøg. Det var muligt at påvise DNA-fragmenter i jordprøver udtaget i jordoverfladen og lige under overfladen, der afspejlede de arter, der var til stede ved prøvetagningen. Metoden kunne altså fange artsdiversiteten. Der blev påvist nedsivning af DNA i jordtyper med grov struktur, og på lokaliteter dyrene benytter som latriner (Andersen et al. 2012). Jordstrukturen påvirker også, hvor meget DNA, der bliver absorberet og jo større jordpartikler jo mere DNA-absorption. Dette forhold skal også tages i betragtning i vurderingen af metodens egnethed på en lokalitet.

Plantediversiteten over jorden kan også påvises med eDNA fra jordprøver og metabarcoding (Yoccoz et al. 2012). DNA fra jordprøver udtaget i den boreale zone afspejlede både den plante-taksonomiske diversitet og diversiteten i vækstformerne, som blev påvist med den konventionelle monitoringsmetode foretaget over jorden. Ligeledes blev der fundet taxa, som ikke blev fundet med den traditionelle monitoringsmetode. På landbrugsjorde, som har ligget brak igennem få årtier, fandtes stadigt DNA-sekvenser fra afgrøder i eDNA jordprøverne, men hyppigheden af disse var meget lav efter 50 år. I tilstødende uopdyrkede områder fandtes ikke DNA-sekvenser fra afgrøder.

Sammenhæng mellem eDNA-koncentrationen og biomassen af den pågældende art

Akvatisk

På baggrund af kontrollerede akvarieforsøg med løgfrøhaletudser og DNA-koncentration fandt Thomsen et al. (2012), at DNA-koncentrationen var signifikant afhængig af tætheden af individerne og af tidspunktet for, hvornår prøven var taget efter fjernelse af individerne. Ligeledes var DNA-koncentrationen relativt højere for løgfrø end for stor vandsalamander. Dvs. der var en størrelses effekt. Løgfrøhaletudser er større og mere aktive (herbivore) end vandsalamanderlarverne. Efter fjernelse af individerne i akvarierne blev DNA nedbrudt hurtigt. Efter 1-2 uger kunne DNA ikke påvises længere. Dvs. DNA'et, der er til stede, repræsenterer arter der lever i vandhullet. Sammenhængen mellem tæthed af individer og DNA-molekyler over tid antyder muligheden for at benytte DNA til at estimere populationstætheder, men dette kræver flere undersøgelser og validering (Thomsen et al. 2012).

Terrestrisk

For vertebratfaunaen fandt Andersen et al. (2012), at det er vigtigere for koncentrationen af DNA, og dermed relationen til biomassen af arterne, at jordprøverne er taget forskellige steder på lokaliteten end størrelsen af jordprøven. Ligeledes synes adfærd forbundet med markering af territorier at have en indflydelse på mængden af DNA i jordprøven. Der blev fundet en klarere positiv sammenhæng mellem populationens biomasse på stedet, hvor jordprøven blev udtaget, og mængden af DNA, sammenlignet med sammenhængen mellem antallet af individer i populationen og mængden af DNA.

For planter afhænger relationen mellem biomasse og DNA-koncentrationen/sekvenserne i jordprøven af vækstformerne. For graminoiderne (græsserne) var forholdet mellem biomasse og andelen af specifikke DNA-sekvenser 1:1 over og under jorden, for trævæksterne udgjorde DNA-sekvenserne i jordprøven en væsentlig lavere del, selv om de var den dominerende biomasse over jorden, og for urterne var andelen af DNA-sekvenser i jordprøven højere i forhold til biomassen over jorden. Dette betyder sandsynligvis, at sammensætningen af DNA-sekvenserne i jordprøven afspejler biomasse-turnover og ikke den totale biomasse. Det viser også, at det er vigtigt at identificere de faktorer, der har betydning for mængden af DNA-sekvenser i en jordprøve for fortolkning af resultaterne (Yoccoz et al 2012).

Fejlkilder ved brugen af eDNA i monitoringen af arter og biodiversitet

Som ved de konventionelle overvågningsmetoder er der både falske positive og falske negative påvisninger/detektioner (type I og type II fejl) i forhold til antagelsen af, om arten findes i det pågældende system (Darling & Maron 2011). Groft kan fejlene deles op i to kilder, dels er der deciderede metodefejl i forbindelse med DNA-metoden, og dels kan der opstå fejl under monitoringsprocessen (prøvetagningsfejl).

PCR amplifikation (opformering) af en bestemt DNA-sekvens i en prøve med en meget lav DNA-koncentration kan give falske positive. Der skal her især tages hensyn til kontaminering fra andre prøver. Dette gøres normalt ved at benytte adskilte laboratorier til fx ekstraktion af recent DNA eller DNA, hvor det er muligt at ekstrahere høje koncentrationer af DNA, og til prøver med forventeligt lav koncentration af DNA. Et andet problem er, at

den DNA-sekvens, man benytter til identifikation af en art, også kan opfanget andre nært-beslægtede arter. Dette kan opdages ved sekvensering af det positive PCR-produkt. Falske positive kan også forekomme selv om, der ikke er levende individer tilbage af arten i systemet, da det ikke muligt at skelne mellem levende og døde organismer med DNA-metoderne.

Falske negative er også et problem. DNA fra den overvågede art kan sagtens være til stede men ikke påvises med PCR'en på grund af fx en meget lav DNA-koncentration. Tilstedeværelsen af en art garanterer ikke altid, at man også finder DNA'et. Det kan fx skyldes dårlig opbevaring af prøven, hvilket har forårsaget, at DNA'et er blevet nedbrudt, eller selve prøvetagningsdesignet har været ineffektivt og ikke fanget DNA'et.

PCR-metoden kan ligeledes forårsage fejl i det opformerede stykke DNA. Fejlene kan være punktmutationer og dannelsen af kimære sekvenser (sekvenser fra forskellige gener), som vil give ophav til kunstige sekvenser og en efterfølgende fejlagtig antagelse om ny art. Endelig kan sekvenseringsmetoden forårsage unikke kunstige DNA-sekvenser, der i den efterfølgende databehandling ikke er blevet filtreret fra og fjernet, da de forekommer i sekvensregioner, der er lette at aflæse på grund af høj kvalitet. Disse fejlkilder forekommer hovedsagelig i forbindelse med monitorering af biodiversitet, hvor eDNA bliver analyseret ved hjælp af NGS (Coissac et al. 2012).

Alt i alt er der 4 kritiske punkter, der skal adresseres ved DNA-monitoring

1. *Designet af det molekylære assey*

Udviklingen af DNA-metoder skal baseres på standardiserede retningslinjer, der imødeser specificitet, sensitivitet, brugen af kontroller, kriterier for falske positive og falske negative rater, definere positiv detektion og gentagelse og reproducerbarhed (se evt. Parshionikar et al. 2009).

2. *Kvalitetskontrol af laboratoriet*

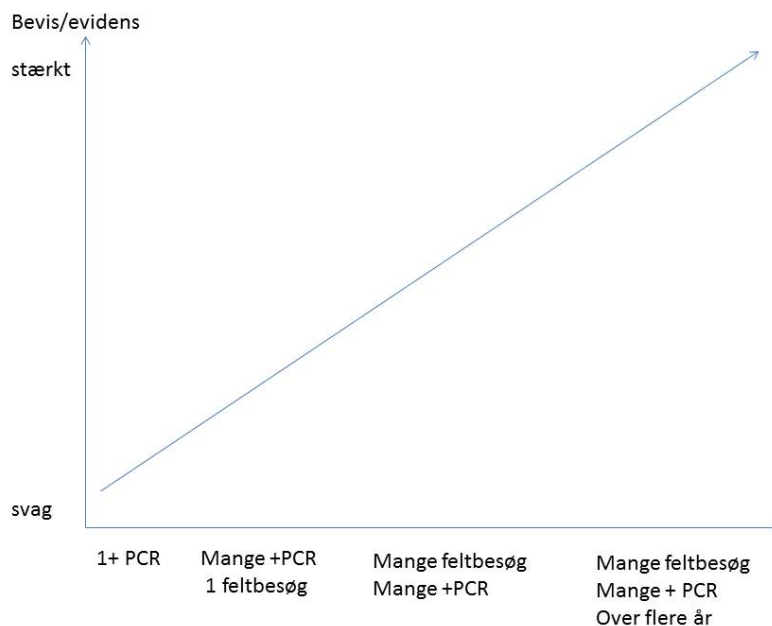
Det er nødvendigt at sikre at laboratoriefejl er minimeret. Derfor skal laboratorier, der udfører DNA-monitoring akkrediteres /certificeres, så kvaliteten kan sikres. DNA-baserede monitoringsprogrammer kan kræve overførsel af prøver fra et laboratorium til et andet, hvorfor reproducerbarhed er kritisk. Kvalitetskontrol i forbindelse med prøveopbevaring og håndtering er også en nødvendighed for at sikre kvaliteten af prøverne.

3. *Sampling design*

Overvågningssuccesen afhænger af DNA-metodens sensitivitet, tætheden af den overvågede art og spatiotemporal fordeling af indsamlingsindsatsen.

Effektive indsamlingsskemaer er essentielle. Fx styrker flere feltbesøg og flere positive PCR-fund at arten er til stede (se Figur 1).

Figur 1. Flere feltbesøg over flere sæsoner og år øger evidensen for artens tilstedeværelse.



Et gennemtænkt samplingdesign er vigtigt. Fx siger "falsk positiv paradokset", at selv meget specifikke DNA-baserede metoder (med meget lav falsk positiv rate) kan give misvisende resultater, når hyppigheden af den overvågede art er tæt på eller under den falske positiv rate (dvs. arten er meget sjælden). Det betyder, at det nærmest er umuligt at undgå falske positive. Falske positive og falske negative rater bør estimeres for hvert laboratorium. Dette kan gøres ved at køre positive prøver og negative prøver x-antal gange og estimere fejl-raten.

Den falske positive rate estimeres ud

$$\text{FalskPosRate} = \text{FalskB} / (\text{SandD} + \text{FalskB})$$

Hvor FalskB er antal gange, en PCR test er positiv, når der rent faktisk ikke er DNA fra arten i reaktionen (falsk positiv), SandD er antal PCR'er, der er sande negative (PCR hvor DNA fra arten ikke er tilsat og heller ikke giver bånd), se Tabel 1.

Tabel 1. Muligt udkomme af en analyse baseret på positive PCR-reaktioner, som indikation for en arts tilstedeværelse.

PCR-test for en art	Til stede (present)	Ikke til stede (absent)
Positiv	Sand A	Falsk B
Negativ	Falsk C	Sand D

4. Usikkerhed i forholdet mellem DNA fra den overvågede art og levende eksemplarer af arten.

Det er vigtigt at kende DNA'ets nedbrydning i miljø-prøver. Tilstedeværelsen af DNA afhænger af de givne miljøforhold som fx temperatur, pH, mm. (Darling & Mahon 2011).

Frygten for falske positive

Moniteringsprogrammer søger at minimere sandsynligheden for falske positive ved at sammenholde resultaterne med konventionelle fangstmetoder for arterne eller ved at indføre flere screeningsfiltre (forskellige metoder til påvisningen af arten). Forsøget på at eliminere de falske positive skubber fejlene over mod de falske negative. Metoder med meget lave falske positive rater har forholdsvis høje falske negative rater. Mange screenings-filtre reducerer falske positive, men hvert filter har en falsk negativ rate, som vil øge chancerne for falske negative. Da mange screenings filtre kræver lang tid, vil der være en risiko for at agere på præliminære detektioner (Darling & Mahon 2011).

Implementering af eDNA i NOVANA-overvågningsprogrammerne

Resultaterne af de forskellige undersøgelser i vand og jord, der benytter eDNA, viser, at særligt DNA-metoden til biodiversitetsmonitoring skal vurderes kritisk i forhold til de eksisterende metoder. Det samme er også i nogen grad gældende for anvendelse af DNA-metoderne ved enkelt-arts overvågningen. Men her giver implementeringen af DNA-metoderne ikke de samme udfordringer i forbindelse den efterfølgende analyse af eDNA'et og fortolkning af resultaterne. Det vurderes, at for udvalgte arter i NOVANA-programmet kan eDNA-metoden til påvisning af enkelt-arter benyttes til påvisning af artens tilstedeværelse, under forudsætning af omhyggeligt tilrettelagte samplingdesigns og en laboratoriepraksis, der tager højde for mulige fejlkilder.

Anvendelsen af eDNA målrettet enkelt-art overvågning er mange steder stadig ikke implementeret i natur-overvågningen og forvaltningen. Potentialer er stort, men der mangler stadig en del validering og kalibrering med de eksisterende feltmoniteringsmetoder. Typisk anvendes eDNA-metoden derfor ikke som eneste bevis på, at en arts tilstedeværelse, men som én metode blandt flere i en multidisciplinær screenings- protokol.

Det vil være oplagt at fokusere på arter, der forekommer i lukkede, akvatiske systemer som vandhuller/søer, og hvis tilstedeværelse monitoreres med presence/absence. Det kan være paddler, vandkalve, stor kæruldsmid, grøn mosaik guldsmed, dyndsmerling og pigsmerring. For planternes vedkommende kunne det være liden najade og vandranke. For arter, der findes i større vandløbssystemer som odder, lampret, snæbel, helt, tykskallet malmusling, flodperlemusling, grøn kølleguldsmed og bæver, vil eDNA-metoden kunne være et alternativ, der med samme eller bedre sikkerhed end konventionelle metoder kunne anvendes til screening af større vandområder/vandløbssystemer for tilstedeværelsen af den pågældende art og bidrage til en prioritering af områder, hvor en mere målrettet felteftersøgning af arten kunne iværksættes. Metoden har yderligere den fordel, at den er skånsom overfor arter, der er sårbare overfor de traditionelle indsamlingsmetoder som fx flodperlemusling. For både de lukkede systemer og de åbne vandløbssystemer skal der foreligge en tilbunds gående evaluering af den eksisterende monitorings-metode i forhold til eDNA- metoden (se nedenfor)

Forudsætninger for at bruge DNA-metoden

Den første betingelse for at anvende eDNA til enkelt-arter er, at der eksisterer eller udvikles artsspecifikke markører, der ligger i mitokondriet eller chloroplast genomet. Det er vigtigt at lægge markørerne i disse to genomer,

da forholdet mellem mitokondrie hhv. chloroplast DNA i forhold til kerne DNA er større end 1, så der er større sandsynlighed for, at en eDNA prøve indeholder så høj en koncentration af organel-DNA'et, at amplificeringen (PCR-metoden) vil foregå.

Hvorvidt markørerne må fange andre, nært-beslægtede arter eller ikke, afhænger af den efterfølgende påvisningsmetode efter amplificeringen (PCR) af eDNA'et. Man kan beslutte, at en positiv PCR er nok til at påvise, at arten er til stede, hvis en forudgående undersøgelse viser, at markøren kun fanger den ønskede art. Det kræver at der forinden er gennemført et pilotprojekt, hvor man sekvenserer de positive PCR produkter for at få en sikker identifikation af produktet/arten.

Ligeledes kan der opstilles kriterier for detektionsraten, fx at en prøve skal analyseres 8 gange (8 PCR), og at der højst må være 2 ud af de 8 PCR-produkter, der er negative, hvilket betyder, at der er en detektionsrate på 75 %. Man kan også vælge at udvikle en qPCR-metode med en intern markør for arten, der ikke fanger andre nærtstående arter. Fordelen med denne metode er, at man kan benytte den til at kvantificere mængden af DNA fra den pågældende art, og derved få et mål for biomassen, hvis der foreligger en kalibrering mellem antal individer og mængden af eDNA fra den pågældende art.

Endelig kan man vælge at sekvensere PCR-produkterne, hvorved man får en direkte artsbestemmelse, hvilket er uafhængigt af om de pågældende markører kun fanger arten, der overvåges. Endelig kan der benyttes en kombination af metoderne, hvor der udvælges x antal positive PCR produkter til sekvensering.

Det er vigtigt, at der udarbejdes en protokol for metoderne og kravene til detektionsraterne og laboratorierne, der skal udføre analyserne for at imødesee og minimere de ovenfor beskrevne fejlkilder.

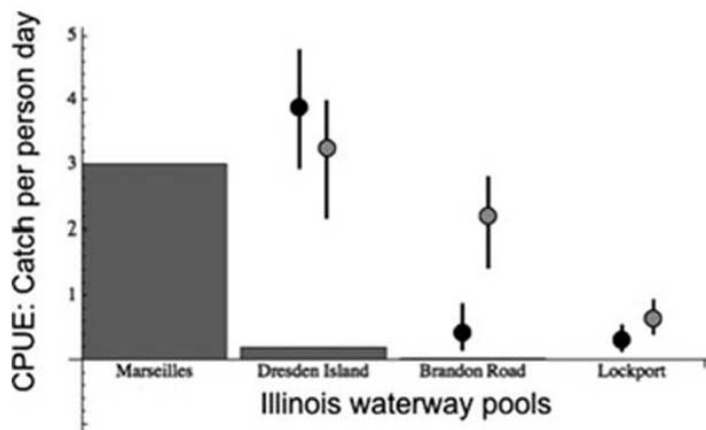
Sammenlignende undersøgelser af eDNA med konventionelle metoder

Fangst/unit effort

Med eDNA er det muligt at påvise forekomst af arter ved meget lave tætheder, hvilket øger fangst/unit effort i felten, hvor fangst ved brug af eDNA defineres som en positiv PCR prøve eller sekvensering afhængigt af den benyttede protokol. Jerde et al. (2011) giver et eksempel på en beregning af dette i forbindelse med påvisningen af 2 invasive karpearter, sølvkarp og marmorkarp, i USA (Figur 2 efter Jerde et al. 2011). Det er tydeligt, at fangst/unit effort falder jo længere opstrøms man kommer, men eDNA har altid en højere fangst/unit effort end elektrofiskning. Ved de laveste tætheder af arterne er de kun påvist med eDNA.

Senere blev karpernes tilstedeværelse bekræftet i forbindelse med Rotenone bekæmpelse (Jerde et al. 2011). En sådan større fangst/unit effort med eDNA sammenlignet med traditionelle metoder er vist i andre undersøgelser (Hayes et al. 2005)

Figur 2. Fangst/unit effort for elektrofiskning, søjler, og eDNA overvågning af sølvkarpe (grå prikker) og marmorkarpe (sorte prikker) fra syd (nedstrøms Mar-seilles pool) mod nord (opstrøms) (Lockport pool). I Brandon Pool blev en enkelt sølvkarpe fanget med elektrofiskning (CPUE= 0,01) og ingen blev fanget ved Lockport (Jerde et al. 2011).



Sammenligning af detektionsrater

Der er foretaget få sammenligninger af fangst/unit effort mellem de konventionelle feltmetoder og eDNA-metoden som ovenfor. I forbindelse med en eventuel implementering i NOVANA-programmet bør der foretages en evaluering af fangst/unit effort art for art, da denne vil være artsafhængig, hvilket fremgår, når man sammenligner detektionsrater. Ved en sammenligning af detektionsrater mellem de konventionelle metoder og eDNA-metoden, fremgår det tydeligt, at der er forskel på om arten er akvatisk dvs. tilbringer alle livsstadier i vandet (fisk) eller semi-akvatisk, hvor det er bestemte livsstadier, der tilbringes i vand (fx løgfrø, stor vandsalamander og andre padder samt insekter), eller om arten lever ved vandet og benytter det sporadisk (fx odder).

For decideret akvatiske arter eller semi-akvatiske arter i et lukket vandsystem, der forekommer i moderate til høje tætheder, er der en høj detektionsrate. For en art, der benytter vandet sporadisk, som odderen, er der fundet en lav detektionsrate på 27% (falsk negativ rate 73%). På lokaliteten, hvor der blev indsamlet eDNA-prøver til at teste for forekomst af odder, var den høj, hvilket betyder, at her er den konventionelle monitoringsmetode mere sikker (lavere falsk negativ rate) medmindre man kombinerer de to metoder og tager vandprøver meget tæt på hinanden i systemet, hvilket vil være mere ressourceforbrugende.

I åbne vandsystemer eller vandløbsstrækninger, hvor der er en vandgenemstrømning, vil koncentrationen af eDNA i de udtagne vandprøver være lav for alle arter, mens det vil forventes, at mængden af eDNA fra mere sessile arter som tykskallet malermusling og flodperlemusling vil være mere koncentreret jo tættere på det lokale område eDNA prøven bliver udtaget.

Udover disse vigtige faktorer har tætheden af arten, eDNA'ets nedbrydningshastighed i det pågældende system, årstiden hvor prøven tages, mængden af dødt materiale af den pågældende art også indflydelse på detektionsraten for eDNA-metoden. Som nævnt ovenfor har de konventionelle feltmetoder nogle af de samme problematikker omkring detektionsraten som eDNA.

Kvantificering ved brug af eDNA

Thomsen et al. (2012) viser en sammenhæng mellem eDNA-koncentration og mængden af haletudser i deres opsætning under kontrollerede forhold, dvs. biomasse af den pågældende art kan beregnes ud fra mængden af indi-

vider. Denne sammenhæng bør valideres for alle de arter, hvor man ønsker at implementere metoden, før den tages i brug. Samtidig skal det nøje overvejes, hvad det ønskede biomasse mål skal benyttes til. Er det blot til en evaluering af sammenhæng mellem biomasse og andre fysiske faktorer i vandhullet/søen, kan det benyttes efter validering og kalibrering med eksisterende metoder. Ønskes en vurdering af bevaringsstatus for den pågældende art, mangler man stadig at få en sammenhæng mellem antallet af voksne individer i det pågældende vandhul/sø og den målte eDNA-koncentration, da det ikke er muligt ud fra biomassen af den pågældende art at evaluere de tæthedsafhængige faktorer, der påvirker ynglesuccesen. Det betyder, at der fx hos løgfrøen blot kan være 2 adulte individer med ynglesucces, der repræsenterer den observerede biomasse. Her er det nødvendigt at få kendskab til den genetiske variation inden for arten for at evaluere indavlsniveauet for den pågældende population.

Evaluering af mulige fejlkilder i forbindelse med prøvetagning

Endeligt skal der udarbejdes en protokol for indsamling af eDNA prøver i felten. Protokollen bør tilpasses efter formål og art, der overvåges. Her skal der tages højde for:

Prøvetagning

- Hvornår på året prøven tages
- Hvor mange vandprøver der bør tages fra hvert vandhul
- Hvor i vandsøjlen prøven udtages
- Eventuel forstyrrelse på tidspunktet hvor prøven tages.

Redskaber

- Prøvetagningsudstyr steriliseres mellem hvert prøvetagningssted,
- Gummistøvler/vaders steriliseres mellem hvert prøvetagningssted
- Laboratoriehandsker skiftes ved hvert vandhul.

Forslag til forsøgsdesign ved hver ny art der ønskes overvåget med eDNA

Påvisning af arten med eDNA

Med udgangspunkt i at den overvågede art findes i et afgrænset akvatisk system som vandhul eller sø udvælges den relevante DNA-metode. I princippet er der tre muligheder:

- positive PCR på gel med sekvensering af x antal positive PCR for artsbestemmelse afhængig af det fastsatte kriterium for falsk positive raten.
- kvantitativ PCR (qPCR) bestemmelse med intern artsspecifik markør
- sekvensering af PCR-produkt.

Dernæst udvikles artsspecifikke markører, der amplificerer et 100-200bp fragment. Disse testes på DNA fra frisk væv fra den pågældende art og på DNA fra frisk væv fra nært-beslægtede arter. Analyserne foregår i et DNA laboratorium adskilt fra det DNA laboratorium hvor analyserne af eDNA foregår, for at undgå kontaminering.

Til feltindsamlingen udvælges 3-5 vandhuller med en kendt høj tæthed, 3-5 vandhuller med kendt lav tæthed og 3-5 vandhuller uden den pågældende art. Hvor dette ikke kan lade sig gøre pga. artens sjældenhed, afsøges muligheden for at udføre forsøgene i områder uden for landets grænser, hvor arten er hyppig. Hvert vandhul underkastes både eDNA-metoden og den

konventionelle monitoringsmetode for at få dels en sammenligning mellem detektionsraten og et mål for fangst/unit effort for de 2 metoder. Antallet af vandhuller, der skal indgå afhænger af, hvor sjælden arten er, dvs. i hvor mange vandhuller den forventes at være. Er den vidt udbredt udvælges 50 vandhullet med de forskellige tætheder. Hvis den er meget lokalt udbredt udvælges de vandhuller, hvor arten forventes at kunne findes. Der skal opstilles kriterier for bestemmelse af detektionsraten og fangst/unit effort for begge metoder. Et kriterium for eDNA kan fx være at arten er påvist ved én positiv ud af 8 eller én ud af 6 PCR-bånd? Tilsvarende skal der opstilles kriterier for den konventionelle metode, fx ved fangst efter 10 minutter eller 30 minutter. Beregning af fangst / unit effort afhænger dels af fangst-definitionen samt tiden, der bruges for at der fanges et individ af arten.

I hvert vandhul udtages 5 x 15 ml vandprøver i overfladen fordelt rundt i vandhullet. Disse konserveres som beskrevet hos Thomsen et al. (2012). Det er vigtigt, at der arbejdes sterilt. Hvis det er samme hold, der udtager vandprøver til eDNA og foretager den konventionelle montering, startes der med at tage eDNA prøver. Ved ankomst til hvert vandhul tages handsker på, udstyr steriliseres, støvler steriliseres før der udtages vandprøver. Hvis der er 2 personer i felten, vil det være en fordel, at den samme person udtager vandprøver til eDNA for at mindske sandsynligheden for kontaminering fra den konventionelle metode til eDNA. Denne del af valideringen af metoden foregår indenfor samme sæson.

For at undersøge effekten af hvornår på året, at vandprøverne til eDNA-monitoring udtages, foretages indsamlingen af prøverne i 5 vandhuller med kendt høj og lav tæthed hhv. en gang om måneden (midt i) året ud, én gang om ugen (samme dag) i 3 måneder dækkende yngle-sæsonen og én gang om ugen i 1 måned i vintersæsonen.

For at undersøge om der er en effekt af hvor i vandsøjlen vandprøverne udtages, udvælges 5 vandhuller med kendt høj og lav tæthed af arten, hvor der udtages vandprøver 5 steder i vandhullet i 5 forskellige dybder målt fra overfladen.

Ved analyse i laboratoriet foregår ekstraktionen af eDNA og den efterfølgende amplificering af eDNA i to separate laboratorier. Både ekstraktionen og amplificeringen foregår med kontroller i opsætningen. Der bør foreligge kriterier for certificering af laboratorierne der benyttes til eDNA analyserne og metoderne bør være standardiserede så de er reproducerbare, laboratorierne i mellem.

Biodiversitetsmonitoring

Priser på biodiversitetsovervågningen for NGS ligger omkring 15.000-17.500 kr/prøve, når bioinformatik-delen samt selve laboratorie-arbejdet er inkluderet. Der kræves dog stadig en del forskning og en del valideringsundersøgelser inden disse kan tages i brug i forvaltningen, men perspektiverne er spændende. Nogle af de forskningsmæssige valideringsundersøgelser der skal foretages er bla.a., hvor mange baselæsninger (reads) der skal til for at fange meget sjældne arter i en prøve, hvor DNA-koncentrationen består af 99% af de 10 hyppigste arter. Et andet spørgsmål er hvornår man vil kunne sige at en art er tilstede eller ikke er tilstede, er en sekvens tilstrækkelig eller skal der være flere? Endelig skal der også findes eller oprettes biblioteker, der indeholder arternes korte DNA-sekvenser, så disse kan genfindes. Hidtil er DNA-barcoding centreret omkring brugen af lange stykker DNA

((500-600bp) fra et mitokondriegen, cytochrome oxidase I (COI) eller chloroplast gener (rbcL og matK) til artsbestemmelse som er meget svære at påvise i hele sin længde i en eDNA prøve. Dette er nogle af de vigtige undersøgelser i forbindelse med fx biodiversitets-profiler for forskellige levesteder eller økosystemer, der nødvendigvis må adresseres før implementeringen af metoden.

Business cases

Generelle bemærkninger

Der er valgt businesscases fra udelukkende vandige miljøer, da de er bedst underbyggede i øjeblikket (Thomsen et al. 2012). Der er valgt to cases – én, der repræsenterer ekstensiv overvågning af arter, hvor den eksisterende metode er ganske arbejdskrævende (vandkalve), og én, der repræsenterer fund af sjældne arter (pigsmerling), der kræver mange eftersøgninger af lokaliteter, hvor arten ikke findes. Forslagene er opstillede som indledende forsøgsdesign, hvor DNA metoden afprøves og kalibreres i fht den konventionelle metode for at vurdere perspektiverne, og hvor der samtidig indgår afprøvning af laboratorie-fejlkilder og udvikling af nødvendige primere. Ved en eventuelt senere implementering af metoden i NOVANA-overvågningen vil afprøvning af fejlkilder og udvikling af primere ikke længere være nødvendige og derfor udgå.

Overvågning af en række vandhulslevende arter som fx vandkalve, padde og guldsmede er primært overvågning af eventuelle ændringer af arternes udbredelse i form af presence-absence data på de undersøgte lokaliteter. Metoden er derfor umiddelbart velegnet til at blive helt eller delvis erstattet af DNA-overvågningsmetoden. En række vandhulslevende dyr forekommer i samme vandhuller og vil i princippet kunne overvåges ved ét besøg på den samme lokalitet, hvorved den største omkostning ved overvågningen, transportomkostningerne, ville kunne reduceres betydeligt. Men kun i meget begrænset omfang er det tilfældet i den nuværende overvågning, da overlappet i levesteder ikke er særligt stort. Eksempelvis deler vandkalve kun i meget begrænset omfang levesteder med andre vandhulslevende dyr som fx padde og guldsmede, så her vil der ikke kunne opnås nogen mærkbar synergieffekt.

Heller ikke for pigsmerling vil der kunne opnås nogen synergieffekt med overvågning af andre arter. Pigsmerlingen lever i dagtimerne primært i tæt vegetation, hvor den er nedgravet i bunden. Pga. denne levemåde er arten ofte vanskelig at lokalisere. Hvis DNA-sporingen findes pålidelig vil der, til lige med en økonomisk gevinst, være sandsynlighed for at opnå mere sikre data.

Forsøgsdesign for bred vandkalv og lys skivevandkalv

Vandkalve (2 arter: Bred vandkalv og lys skivevandkalv) overvåges i NOVANA 2011-2015 i samlet 39 vandhuller/søer én gang i hvert af årene 2011 og 2014. Den nuværende overvågning af vandkalve er ganske ressourcekrævende, og udføres som fældefangst i maj måned (2 besøg: hhv. udsætning og røgtning af 8 fælder pr. lokalitet) og ketsjning (1 besøg) i september måned, altså i alt tre besøg på samme lokalitet (Søgaard et al. 2011b) med et samlet tidsforbrug på knap 16 timer pr. lokalitet (Tabel 2).

Tabel 2. Ressourcesætning pr. lokalitet ved overvågning af vandkalve i NOVANA 2011-2015.

Aktivitet – NOVANA	Forberedelse og fælder	Transport	Feltarbejde	I alt
Antal timer	5,29	4,5	6	15,79

Feltarbejde

Til validering af brugen af eDNA til overvågningen af vandkalve udvælges 5 vandhuller med sikker påvisning i perioden 2005-2012, 5 vandhuller hvor de er påvist tidligere (1990-2004) men ikke ved sidste overvågning og endelig 5 vandhuller, hvor de har været registreret, men ikke påvist siden 1989. I forsøgsdesignet vil feltvalideringen skulle udføres i overensstemmelse hermed, men der vil skulle afsættes yderligere ressourcer til DNA-relaterede aktiviteter (Tabel 3). Det drejer sig om forberedelser, indsamlingsudstyr, datahåndtering og feltarbejde, i alt halvanden time. I felten indsamles således 1 vandprøve ved hver af de 8 fælder. Vandprøverne hældes sammen, således at kun 1 vandprøve pr. lokalitet underkastes DNA-analyse. Kolonnen "Forberedelse og fælder" inkluderer blandt andet indkøb/fremstilling af fælder og udstyr til opsætning af fælder.

Tabel 3. Ressourcesætning for feltarbejde pr. lokalitet ved overvågning/feltvalidering af vandkalve. Det ekstra ressourceforbrug (1,5 t) omfatter i alt 15 lokaliteter.

Aktivitet - NOVANA	Forberedelse og fælder	Transport	Feltarbejde	I alt
Antal timer	5,29	4,5	6	15,79
Antal timer – DNA	1		0,5	1,5
I alt	6,29	4,5	6,5	17,29

DNA-analyse

Der udvikles et primer design for hver af de 2 arter ud fra eksisterende sekvenser i GenBank. Disse testes på nærtstående arter og på 10 individer af hver vandkalve-art. For at estimere fejlraten i laboratoriet køres 20 PCR uden DNA og 20 med DNA. DNA bliver ekstraheret i et laboratorium adskilt fra laboratoriet, hvor arbejde med højmolekylært DNA samt PCR-opsætning foregår for at undgå kontaminering. Der medtages en 0-kontrol i DNA-oprensningen samt i de efterfølgende PCR-kørsler. Der bliver kørt 8 PCR for hvert vandhul. Op til 6 positive bånd vil blive sekvenseret (Tabel 4). Et positivt PCR bånd med sekvens betragtes som et positivt fund af arten i det enkelte vandhul. Resultatet af analyserne bliver sammenlignet med den konventionelle metode for at estimere fangst/unit effort. Den konventionelle metode udføres som beskrevet i TA'en for vandkalve.

Hvis DNA-metoden skulle vise sig at være brugbar, vil metoden kunne erstatte den nuværende fangstmetode. Feltarbejdet vil blive reduceret til ét besøg med ca 1,5 t transporttid og ca 1 times feltarbejde pr. lokalitet og de samlede laboratorieudgifter kan reduceres til i alt 41.365 Dkr for det samlede program med de nuværende 39 vandhuller, 2 arter samt sekvensering af 3 positive PCR (Tabel 4). Beløbet kan variere afhængigt af antallet af prøver, der analyseres, samt af hvorvidt det ønskes, at der kan forevises DNA-sekvenser for de analyserede positive prøver som bevis for de 2 arters tilstedeværelse.

Tabel 4. Samlet ressourcensætning for laboratorieudgifterne ved udvikling af DNA-metoden til identifikation af bred vandkalv og lys skive vandkalv.

Bred vandkalv og lys skive vandkalv		Dkr
Drift budget til kemikalier		27.750
Estimeret tidsforbrug	timer	
DNA ekstraktion	14,8*	9.620
PCR forsøg	37*	24.050
Udvikling af primere	29,6**	31.080
Dataanalyser	22,2**	23.310
Rapport	88,8**	93.240
Laboratorie analyser samt databehandling		181.300
I alt		209.050

*= TAP timer á 650 kr/t

**=AC timer á 1050 kr/t

Forsøgsdesign for pignmerling

Arten overvåges i NOVANA 2011-2015 på i alt 118 lokaliteter fordelt på 16 søer og 22 vandløb. Lokaliteterne fastlægges ud fra kendskab om tidligere forekomst af arten, men overvågningen skal også dække tilgrænsende områder. Overvågningen finder sted vha. elektrofiskeri, og hver lokalitet besøges én gang i løbet af perioden 2011-2015. Der er fastsat et tidsforbrug på 4 timer pr. lokalitet (Tabel 5).

Tabel 5. Ressourcensætning pr. lokalitet ved overvågning af pignmerling. Der indgår 118 lokaliteter i overvågningen af pignmerling.

Aktivitet - NOVANA	Forberedelse og inddatering	Transport	Feltarbejde (herunder opstilling og nedtagning af udstyr)	I alt
Antal timer	0,6	1,5	1,8	3,9

Feltarbejde

Der tages en eDNA vandprøve på hver lokalitet, hvor der iflg. den tekniske anvisning for overvågning af arten er planlagt elektrofiskeri. Disse prøver tages samtidig med elektrofiskeriet, der foretages i programperioden 2011-15. eDNA-metoden kalibreres ved at sammenligne resultaterne af positive og negative fund fra den konventionelle overvågning (elektrofiskeriet) med resultaterne fra DNA-analyserne. Der skal afsættes yderligere op til halvanden time pr. lokalitet til DNA-relaterede aktiviteter (Tabel 6), såsom forberedelser, håndtering af indsamlingsudstyr, feltarbejde og datahåndtering.

DNA-analyse

De eksisterende primere for pignmerling efterprøves i laboratoriet på DNA ekstraheret fra muskeltvæv eller andet væv. For at estimere fejlraten i laboratoriet køres 20 PCR uden DNA og 20 med DNA. DNA bliver ekstraheret i et laboratorium adskilt fra laboratoriet, hvor arbejde med højmolekylært DNA samt PCR-opsætning foregår for at undgå kontaminering.

Tabel 6. Ressourcesætning pr. lokalitet ved overvågning/feltvalidering af pignmerling – Forsøgsdesign. Der indgår 118 lokaliteter i overvågningen af pignmerling.

Aktivitet - NOVANA	Forberedelse og		Feltarbejde (herunder opstilling	
	inddatering	Transport	og nedtagning af udstyr)	I alt
Antal timer	0,6	1,5	1,8	3,9
Antal timer - DNA	1		0,5	1,5
I alt	1,6	1,5	2,3	5,4

Der medtages en 0-kontrol i DNA-oprensningen samt i de efterfølgende PCR-kørsler. For hvert vandløb/sø (118prøver i alt) køres 8 PCR-bånd. Op til 6 positive bånd vil blive sekvenseret (Tabel 7). Et positivt PCR bånd med sekvens betragtes som et positivt fund af arten i det enkelte vandhul. Resultatet af analyserne bliver sammenlignet med den konventionelle metode for at estimere fangst/unit effort. Den konventionelle metode udføres som beskrevet i TA'en for pignmerling (Wiberg-Larsen og Johansson, 2012 *in prep*).

Tabel 7. Estimering af prisen for udvikling af DNA-metoden til identifikation af pignmerling samt for den efterfølgende rutinemæssige DNA-analyse af samtlige vandprøver udtaget i de 118 lokaliteter i laboratoriet.

Pignmerling	Dkr	
Drift budget til kemikalier		71.300
Estimeret tidsforbrug	Timer	
DNA ekstraktion	22,2*	14.430
PCR forsøg	22,2*	14.430
Udvikling af primere	14,8**	15.540
Dataanalyser	22,2**	23.310
Rapport	88,8**	93.240
Laboratorie analyser samt databehandling		160.950
I alt		232.250

*= TAP timer á 650 kr/t

**=AC timer á 1050 kr/t

Hvis DNA-metoden skulle vise sig at være brugbar, vil metoden kunne supplere den nuværende fangstmetode. På lokaliteter med høj tæthed af pignmerling vurderes det, at der ikke er nogen økonomisk gevinst eller større sikkerhed ved anvendelse af eDNA- metoden i forhold til den konventionelle metode. Det anslås, at dette er tilfældet ved knap 50 af de 118 lokaliteter, svarende til ca. 40% af lokaliteterne. På lokaliteter med lave tætheder af pignmerling eller ved lokaliteter, hvor arten ikke er fundet indenfor de seneste 10 år kan eDNA-metoden anvendes til at afgøre om elektrofiskeriet skal benyttes. En eventuel økonomisk besparelse ved indførelse af eDNA metoden består dermed i, at der kun foretages elektrofiskeri i vandløb/søer, hvor der ved DNA-metoden konstateres fund på nye lokaliteter eller på lokaliteter hvor den ikke er fundet indenfor de seneste 10 år. Det er ikke på forhånd muligt at angive, hvor mange vandløb/søer (eller lokaliteter), det drejer sig om, men det antages at være mindre end halvdelen af de resterende knap 70 lokaliteter.

Under antagelse af at eDNA-metoden anvendes på ca. 30-35 lokaliteter anslås de samlede laboratorieudgifter for hele programmet til ca. 21.700 Dkr svarende til analyse af en vandprøve fra hver lokalitet (sekvensering af 3 positive PCR). Beløbet vil variere afhængigt af antallet af prøver, der analyseres, samt evt. ønsker om at kunne forevise DNA-sekvenser for de analyserede positive prøver som bevis for artens tilstedeværelse.

Referencer

Andersen K, Bird KL, Rasmussen M et al. (2012) Meta-barcoding of "dirt" DNA from soil reflects vertebrate biodiversity. *Molecular Ecology*, 21, 1966–1979.

Darling JA, Mahon AR (2011) From molecules to management: Adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments. *Environmental Research*, 111, 978-988.

Coissac E, Riaz T, Puillandre N (2012) Bioinformatic challenges for DNA metabarcoding of plants and animals. *Molecular Ecology*, 21, 1834–1847.

Epp LS, Boessenkool S, Bellemain EP et al. (2012) New environmental metabarcodes for analysing soil DNA: potential for studying past and present ecosystems. *Molecular Ecology*, 21, 1821–1833.

Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P (2008) Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4, 423–425.

Hayes KR, Cannon R, Neil K, Inglis G (2005) Sensitivity and cost considerations for the detection and eradication of marine pests in ports. *Mar Pollut Bull* 50, 823–834.

Jerde CL, Mahon AR, Chadderton WL, Lodge DM (2011) "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters*, 4, 150-157.

Parshionikar S, Haugland RA,, Shanks O et al. (2009) Method Validation of U.S. Environmental Protection Agency Microbiological Methods of Analysis. FEM Document Number 2009-01 October 7.

RAVON (Herder J, Valentini A, Kranenbarg J) (2012) Detectie van grote modderkruipers met behulp van Environmental DNA. www.environmental-dna.nl

Søgaard B, Adrados LC, Fog K, Jensen MW, Svendsen A (2011a) Padder. Teknisk anvisning til ekstensiv overvågning. Ver. 1. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi. - Teknisk anvisning fra Fagdatacenter for Biodiversitet og Terrestrisk Natur TAA17. 18 s.

Søgaard B, Holmen M, Holm TE (2011b) Overvågning af bred vandkalv *Dytiscus latissimus* og lys skivevandkalv *Graphoderus bilineatus*. Teknisk anvisning til ekstensiv overvågning. Ver. 1. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi. - Teknisk anvisning fra Fagdatacenter for Biodiversitet og Terrestrisk Natur TAA05. 16 s.

Søgaard B, Holmen M, Rabjerg S, Nielsen OV, Holm TE (2011c) Overvågning af guldsmede. Teknisk anvisning til ekstensiv overvågning. Ver. 1. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi. - Teknisk anvisning fra Fagdatacenter for Biodiversitet og Terrestrisk Natur TAA06. 19 s.

Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Brochmann C, Willerslev E (2012) Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 21, 2045–2050.

Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, Wiuf C, Rasmussen M, Gilbert MTPO, Orlando L, Willerslev E (2012) Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21, 2565–2573.

Wiberg-Larsen, P.; Johansson, L. (2012) Overvågning af pigsmørling (*Cobitis taenia*) i vandløb og søer. Aarhus Universitet, DCE Nationalt Center for Miljø og Energi. Teknisk anvisning fra Fagdatacenter for Ferskvand TA S15. 22 s.

Willerslev E, Hansen AJ, Binladen J et al. (2003) Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. *Science*, 300, 791–795.

Yoccoz NG, Brathen KA, Gielly L et al. (2012) DNA in soil mirrors plant functional and structural diversity. *Molecular Ecology*, 21, in press.