

# DNA analyse af mulige odder- ekskrementer indsamlet på Sjælland

---

Notat fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi

Dato: 7. august 2017

Liselotte Wesley Andersen & Bjarne Søgaard

Institut for Bioscience

Rekvirent:  
Miljøstyrelsen  
Antal sider: 8

Faglig kommentering:  
Frank Panitz, Institut for Molekylær Biologi og Genetik, AU  
Kvalitetssikring, centret:  
Jesper 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
Metode	3
Resultat og diskussion	4
Referencer	5
Bilag 1	6
Bilag 2	7
Bilag 3	8

## 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 lande 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 Sjælland blev der indleveret 12 mulige odder-ekskrementer til DNA-analyse for odder. Ekskrementerne blev indsamlet i marts 2017 af Miljøstyrelsen-Sjælland i forbindelse med overvågning af arten. 10 af de analyserede ekskrementer fundet på 8 forskellige lokaliteter kunne med sikkerhed artsbestemmes til odder (se Tabel 1 og 'Resultater og diskussion').

**Tabel 1.** Resultatet af de to uafhængige DNA-analyse gange af 12 formodede odder ekskrementer indsamlet i forbindelse med NOVANA overvågning af odder på Sjælland.

Labld	Lokalitet	MST-Station	MST-nr	1. analysegang	2. analysegang
Sj1	Åmose Å v Bromølle	616_65_B	90	odder	odder
Sj2	Åmose Å v Bromølle	616_65_B	90	odder	odder
Sj3	Bøstrup Å	615_64_C	105	odder	odder
Sj4	Bregninge Å v. Vejlebro	617_64_C	67	negativ/dårlig	odder
Sj5	Bregninge Å v. Vejlebro	617_64_C	67	odder	odder
Sj6	Bregninge Å v Bregninge	617_64_B	66	odder	odder
Sj7	Bregninge Å v Bregninge	617_64_B	66	Skovmår	ikke analyseret
Sj8	Hallenslev Bæk v Hallenslev	615_64_A	103	odder	odder
Sj9	Åmose Å v Undløse Å	616_66_C	93	Mink	ikke analyseret
Sj10	øvre Halleby Å v Øre Sø	616_64_E	88	odder	odder
Sj11	Nedre Halleby Å v Ornum Strand	615_63_B	102	negativ/dårlig	odder
Sj12	Åmose Å v Skellingsted	616_65_A	89	odder	odder

## Metode

Analysen af de indsamlede ekskrementer på Sjælland blev foretaget ved to uafhængige analyse gange. Ved begge analyse gange blev DNA ekstraheret og efterfølgende opformeret med en PCR og sekventeret. Ekstraktionerne blev foretaget i et DNA-laboratorium, der kun bliver benyttet til prøver, hvor DNA-koncentrationen forventes at være lav. DNA blev ekstraheret med Qia-gen 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, odder, ræv, skovmår mfl. og som samtidig har en baseparlængde på ca. 180bp (Hansen & Jacobsen, 1999). Den genetiske markør

blev opformeret 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 12 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.

I første analysegang gav 10 x2 replikater et DNA-fragment. Den tomme prøve, der var medtaget fra ekstraktions-proceduren, og alle medførte negative kontroller (12) var negative. Alle 20 opformede DNA-fragmenter blev efterfølgende sekventeret ved firmaet MACROGEN, Holland. De fremkomne 20 sekvenser blev analyseret ved at søge efter den samme sekvens i Genbank, der er en international database, som indeholder sekvenser fra både dyre- og plantearter. Et match blev accepteret, når den pågældende sekvens havde > 97% overensstemmelse med den mest sandsynlige art, der blev fundet i databasen. Her blev der fundet en mink og en skovmår blandt de 10 prøver (beskrevet under 'Resultater og diskussion'). I anden analysegang blev alle 8 positive prøver for odder ekstraheret igen samt de 2 af de 12 prøver, der ikke havde virket i første omgang. Prøverne blev analyseret som beskrevet for den første analysegang, dvs. også med 2 replikater pr prøve, 1 tom prøve fra ekstraktionen og 9 negative kontroller. Igen var de negative prøver samt den tomme prøve ekstraktions-proceduren negative. Resten, de 10x2 replikater fra de gen-ekstraherede prøver gav alle et DNA-fragment, som blev sendt til sekventering hos MACROGEN, Holland.

## Resultat og diskussion

I første analysegang af de 12 prøver havde 8 (Sj1, Sj2, Sj3, Sj5, Sj6, Sj8, Sj10, Sj12) prøver 99% match med odder (bilag 1, 2, 3). Begge replikater gav samme resultat (bilag 3). Der blev observeret to forskellige haplotyper, OD2 og OD3 (bilag 1, 2). I anden analysegang blev de to prøver, der ikke viste odder, sorteret fra. Resultatet af denne analyse viste, at alle 10 prøver var oddere. Der var fuld overensstemmelse mellem de 8 prøver, hvor der blev observeret 99% match med odder og samme haplotype i både analysegang 1 og 2. To prøver, Sj4 og Sj11, der var negative i første analysegang, kunne bestemmes i anden analysegang. Her blev Sj4 identificeret som odder med 99% match og haplotype OD2 i begge replikater. Prøve Sj11 havde 98% og 97% match til odder for de to replikater. Sj11A kunne bestemmes til OD3 ved sammenligning med de andre opnåede sekvenser. Denne uafhængige dobbeltbestemmelse af alle prøver samt replikater påviser, at de indleverede prøver med meget stor sandsynlighed stammer fra odder. OD2 blev fundet blandt de fynske oddere (Andersen & Søgaard, 2017), mens OD3 ikke er observeret tidligere. Ved sammenligning med sjællandske odderprøver, der blev påvist i 2007 (Andersen et al. 2016) og verificeret af et hollandsk laboratorie, viste analysen, at de sjællandske oddere, der blev indsamlet i 2006, havde haplotype OD2. Derved er OD3 en ny haplotype. To af prøverne havde 99% match med henholdsvis mink (*Mustela vison*) og skovmår (*Martes martes*) (bilag 3). OD1 den anden haplotype, der også blev påvist på Fyn, blev ikke observeret blandt de 12 prøver. Det betyder, at der har været eller er mindst 2 forskellige individer på Sjælland.

## Referencer

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

Andersen, LW & Søgaard, B., Madsen AB. 2016, 'DNA analyse af oddereks-  
krementer fra Sjælland'. Notat fra DCE - Nationalt center for Miljø- og Energi

Andersen, LW & Søgaard, B. 2017, 'DNA analyse af mulige odder-ekskre-  
menter indsamlet på Fyn'. Notat fra DCE - Nationalt center for Miljø- og  
Energi

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 OD2 fundet i prøver : Sj4, Sj5, Sj6

ACATCAGACACAACCACAGCCTTCTCATCAGTCGCACACATCTGCCGAGACGTCAAC-  
TACGGCTGGATTATCCGATACATACACGCAAACGGAGCCTCCATATTCTTCATCTGCCTGT-  
TCCTACATGTAGGACGCGGCCTGTACTACGGATCTTATATATTCCCCGAAACATGAA

Lutra lutra mitochondrial Cytb gene for Cytochrome b protein, haplotype H3

Sequence ID: [LT593915.1](#) Length: 1140 Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 166 to 340 [GenBankGraphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

	<b>Score</b>	<b>Expect</b>	<b>Identities</b>	<b>Gaps</b>	<b>Strand</b>
	318 bits(172)	2e-83	174/175(99%)	0/175(0%)	Plus/Plus
Query 1	ACATCAGACACAACCACAGCCTTCTCATCAGTCGCACACATCTGCCGAGACGTCAACTAC	60			
Sbjct 166	ACATCAGACACAACCACAGCCTTCTCATCAGTCGCACACATCTGCCGAGACGTCAACTAC	225			
Query 61	GGCTGGATTATCCGATACATACACGCAAACGGAGCCTCCATATTCTTCATCTGCCTGTTC	120			
Sbjct 226	GGCTGGATTATCCGATACATACACGCAAACGGAGCCTCCATATTCTTCATCTGCCTGTTC	285			
Query 121	CTACATGTAGGACGCGGCCTGTACTACGGATCTTATATATTCCCCGAAACATGAA	175			
Sbjct 286	CTACATGTAGGACGCGGCCTGTACTACGGATCTTATATATTCCCTGAAACATGAA	340			

## Bilag 2

Haplotype OD3 fundet i prøvenr: Sj1, Sj2, Sj3, Sj8, Sj10, Sj11, Sj12

ACATCAGACACAACCACAGCCTTCTCATCAGTCGCACACATCTGCCGAGACGTCAGC-  
TACGGCTGGATTATCCGATACATACACGCAAACGGAGCCTCCATATTCTTCATCTGCCTGT-  
TCCTACATGTAGGACGCGGCCTGTACTACGGATCTTATATATTCCCCGAAACATGAA

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: 166 to 340 [GenBankGraphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
313 bits(169)	1e-81	173/175(99%)	0/175(0%)	Plus/Plus
Query 1	ACATCAGACACAACCACAGCCTTCTCATCAGTCGCACACATCTGCCGAGACGTCAGCTAC	60		
Sbjct 166	ACATCAGACACAACCACAGCCTTCTCATCAGTCGCACACATCTGCCGAGACGTCAACTAC	225		
Query 61	GGCTGGATTATCCGATACATACACGCAAACGGAGCCTCCATATTCTTCATCTGCCTGTTC	120		
Sbjct 226	GGCTGGATTATCCGATACATACACGCAAACGGAGCCTCCATATTCTTCATCTGCCTGTTC	285		
Query 121	CTACATGTAGGACGCGGCCTGTACTACGGATCTTATATATTCCCCGAAACATGAA	175		
Sbjct 286	CTACATGTAGGACGCGGCCTGTACTACGGATCTTATATATTCCCTGAAACATGAA	340		

### Bilag 3

#### Resultat af DNA-analyser af formodede odder-prøver fra Sjælland

Labld	1. Analysegang	Match	2. Analysegang	Match
Sj1A	OD3	(173/175bp) 99%	OD3	(173/175bp) 99%
Sj1B	OD3	(173/175bp) 99%	OD3	(173/175bp) 99%
Sj2A	OD3	(173/175bp) 99%	OD3	(173/175bp) 99%
Sj2B	OD3	(173/175bp) 99%	OD3	(173/175bp) 99%
Sj3A	OD3	(173/175bp) 99%	OD3	(173/175bp) 99%
Sj3B	OD3	(173/175bp) 99%	OD3	(173/175bp) 99%
Sj4A	Neg		OD2	(174/175bp) 99%
Sj4B	Neg		OD2	(174/175bp) 99%
Sj5A	OD2	(174/175bp) 99%	OD2	(174/175bp) 99%
Sj5B	OD2	(174/175bp) 99%	OD2	(174/175bp) 99%
Sj6A	OD2	(174/175bp) 99%	OD2	(174/175bp) 99%
Sj6B	OD2	(174/175bp) 99%	OD2	(174/175bp) 99%
Sj7A	Skovmår	(171/173bp) 99%	NA	
Sj7B	Skovmår	(171/173bp) 99%	NA	
Sj8A	OD3	(170/172bp) 99%	OD3	(173/175bp) 99%
SJ8B	OD3	(173/175bp) 99%	OD3	(173/175bp) 99%
Sj9A	Mink	(173/175bp) 99%	NA	
Sj9B	Mink	(173/175bp) 99%	NA	
Sj10A	OD3	(173/175bp) 99%	OD3	(173/175bp) 99%
Sj10B	OD3	(173/175bp) 99%	OD3	(173/175bp) 99%
Sj11A	Neg		OD3(d)	(135/138bp) 98%
SJ11B	Neg		OD_kort	(111/114bp) 97%
Sj12A	OD3	(173/175bp) 99%	OD3	(173/175bp) 99%
SJ12B	OD3	(173/175bp) 99%	OD3	(142/144p) 99%

Neg= Ikke virket

NA= ikke analyseret

OD\_kort= sekvensen for kort til at bestemme haplotype men prøven viste odder

OD3(d)= Få basepar er usikre med det der odder og ligner OD3.

(173/175bp) = 175basepar I den opnåede sekvens matcher 173 basepar I oddersekvens I Genbank