

Pilotprojekt: Sporing af forekomst af odder, *Lutra lutra*, ved anvendelse af eDNA

Notat fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi

Dato: 23. februar 2018

Liselotte Wesley Andersen, Bjarne Søgaard, Ole R. Therkildsen, Aksel Bo Madsen
Institut for Bioscience

Antal sider: 13

Faglig kommentering:
Frank Panitz, 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
Overvågning af odder i NOVANA	3
Formål	4
Indsamling af prøver	4
Analysemetoder og resultater	5
Konklusion	11
Referencer	12
Bilag 1	13

Baggrund

Udviklingen i mulighederne for ekstraktion af DNA fra miljøprøver taget i både vand og jord samt udviklingen af DNA-sekventeringsteknologien har gjort det muligt at benytte DNA til identifikation af både mikroorganismer, planter og dyr. Thomsen m.fl. (2012) har vist, at det er muligt at påvise forekomst af forskellige arter i et vandhul/vandløb ved at genfinde arternes DNA i en vandprøve.

eDNA-sporing/overvågning i NOVANA (det Nationale Overvågningsprogram for Vandmiljø og Natur) af forekomst af enkeltarter vil især være velegnet i forbindelse med den ekstensive overvågning af arternes udbredelse, hvor metoden kan benyttes som et screeningsværktøj til at identificere områder, hvor arten bør eftersøges nøjere. Muligheder og begrænsninger i anvendelse af eDNA-metoder i NOVANA-artsovervågningen er nærmere beskrevet i et notat fra DCE (Andersen m.fl. 2012).

Overvågning af odder i NOVANA

I NOVANA er odder blevet overvåget i 2004, 2011-2012 og i 2017. Eftersøgningen er foretaget på ca. 1.140 stationer fordelt over hele Danmark med undtagelse af Bornholm, Samsø, Læsø og en række småøer, hvor odder aldrig er observeret. Når spor efter odder – typisk i form af ekskrementer – findes på en lokalitet (station) stopper den videre eftersøgning på lokaliteten, og den betegnes som positiv. Findes der ikke spor efter odder inden for en strækning af 600 m betegnes lokaliteten som negativ (Søgaard m.fl. 2017).

Ved overvågningen i 2004 blev der kun fundet spor efter odder i Jylland, mens der i 2012 blev fundet ekskrementer af odder på to lokaliteter på Fyn, som ved DNA-analyse blev bestemt som stammende fra odder. I forbindelse med NOVANA-overvågningen af odder i 2017 blev der vha. DNA-analyser registreret odder på 28 lokaliteter spredt over hele Fyn (Andersen & Søgaard 2017a), mens der blev fundet ekskrementer stammende fra odder på otte lokaliteter i den nord-vestlige del af Sjælland (Andersen & Søgaard 2017b).

Resultaterne fra overvågningen af odder på Sjælland i 2017 bekræfter resultaterne af en særlig intensiv eftersøgning, hvor der i 2006 blev fundet spor efter odder (DNA-analyser) på otte lokaliteter i Nordvestsjælland (<http://dce.au.dk/udgivelser/udgivelser-fra-dmu/dmunyt/2007/15/odder/>), dog ikke på de samme lokaliteter som i 2017, men i de samme regionale områder.

Ved den nationale overvågningen af odder i 2017 (NOVANA) blev der udpeget ca. 140 stationer beliggende i Sydsjælland, Lolland, Falster og Møn - med ringe sandsynlighed for forekomst af odder ud fra overvågningsresultaterne i 2011-2012. Det blev besluttet at en eventuel konventionel eftersøgning af odder i disse geografiske områder skulle afvente testningen af eDNA som et muligt screeningsværktøj for forekomst af odder i de forskellige vandløbssystemer – og i positive tilfælde målrette eftersøgningen på de stationer, hvor eDNA havde vist, det ville være relevant at eftersøge arten.

Da det stod klart, at den foreløbige konklusion på nærværende pilotprojekt var, at eDNA ikke i den foreliggende form var et brugbart screeningsværktøj, blev odder eftersøgt på de 140 stationer efter den konventionelle metode.

Formål

Projektet har til formål at afprøve eDNA-metoder som et screeningværktøj til at detektere forekomsten af odder i vandløbssystemer med særligt henblik på at kunne registrere mulig forekomst af odder i vandløbssystemer på Sjælland, Lolland-Falster og Møn, hvor der ved den konventionelle kontrolovervågning i NOVANA ikke er fundet spor efter odder. Dette blev gennemført på følgende måde:

- Opsætning af DNA-metoden baseret på qPCR og primerne udviklet af Thomsen et al. (2012) til påvisning af odder i laboratoriet samt egne primere udviklet fra CytB primere (Hansen og Jacobsen, 1999) benyttet til påvisning af odder fra ekskrementer.
- Afprøve anvendeligheden af den foreslåede indsamlingsprotokol for vand og sedimentprøver.
- Dernæst om det er muligt at påvise odder-DNA i vandprøver taget på lokaliteter med:
 1. Kendt stor bestand af odder (Salten Å og Almind Sø afløb)
 2. Kendt lille bestand odder (Odense Å, Dalum samt Hillerslev)
 3. Ingen kendt bestand af odder (Dammen ved Kalø).

Indsamling af prøver

Der blev udvalgt 2 stationer for hver af de tre ovennævnte bestandstætheder af odder, hvor selve pilotforsøget blev udført. Silkeborgområdet blev udvalgt, da NOVANA overvågningen for 2017 udpegede områder med stor tæthed af ekskrementer. Vand og sedimentprøver blev indsamlet i begyndelsen og slutningen af maj måned midt på formiddagen. Der blev udtaget 3 biologiske vandprøver og 3 sedimentprøver på hver station. Der blev eftersøgt odder-ekskrementer ved Salten Å og Almind sø, hvor der også blev påvist ekskrementer. Der blev ikke eftersøgt odder-ekskrementer ved Odense Å (Tabel 1 oversigt over indsamlede prøver). Vandprøverne blev kørt til DCE, Silkeborg og frosset ved ankomst. De blev optøet i slutningen af maj og filtreret i stinkskab med UV-lampe. Der blev benyttet cellulose nitratfiltre med porestørrelse på 0,45 mm ved filtreringen af to af vandprøverne og 0,2 mm ved en af vandprøverne for hver lokalitet. Filter-papirerne blev nedfrosset straks efter filtreringen i DCE, Silkeborg.

Table 1. Oversigt over indsamlede vand- og sedimentprøver fra de udvalgte odderlokalteter.

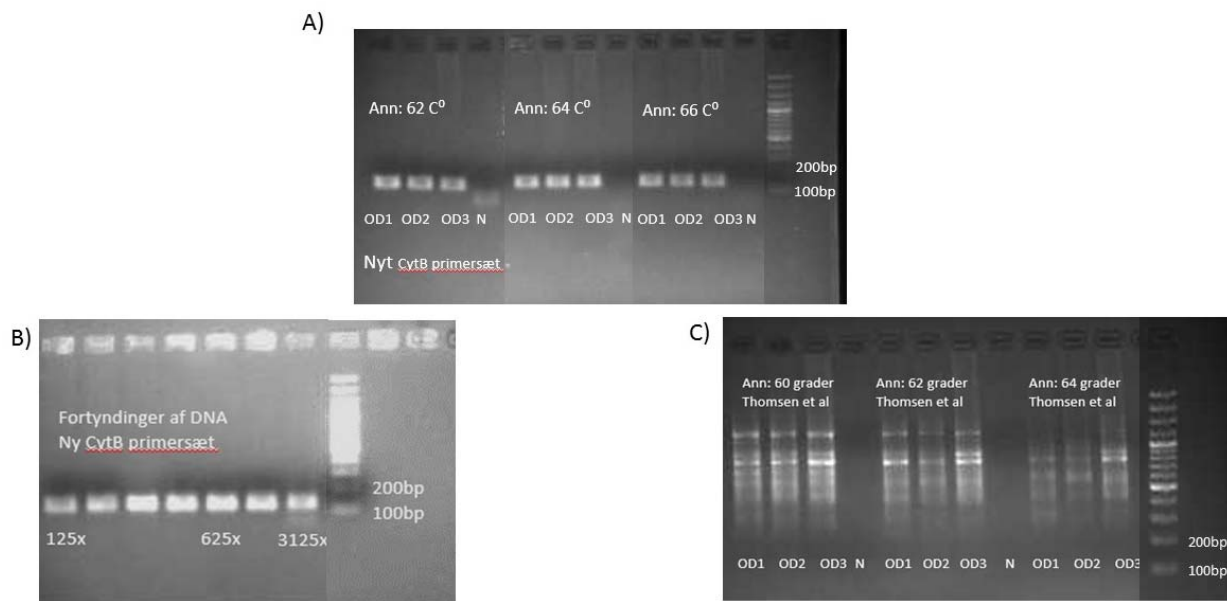
Lokalitet	Labid Filter	Labid Sediment	Dato Indsamling	Dato Filtrering	Filter Porest
Salten Å øst f St Hjøllund	SAL1	SAS1	11_05_17	30_05_17	0.45
	SAL2	SAS2	11_05_17	30_05_17	0.45
	SAL3	SAS3	11_05_17	30_05_17	0.2
Odense Å Dalum	OAD1	ODS1	09_05_17	30_05_17	0.45
	OAD2	ODS2	09_05_17	30_05_17	0.45
	OAD3	ODS3	09_05_17	30_05_17	0.2
Odense Å Hillerslev	OAH1	OHS1	09_05_17	30_05_17	0.45
	OAH2	OHS2	09_05_17	30_05_17	0.45
	OAH3	OHS3	09_05_17	30_05_17	0.2
Almind Sø	ASO1	ASS1	23_05_17	30_05_17	0.45
	ASO2	ASS2	23_05_17	30_05_17	0.45
	ASO3	ASS3	23_05_17	30_05_17	0.2
Almind Sø afløb	ALA1	AAS1	11_05_17	30_05_17	0.45
	ALA2	AAS2	11_05_17	30_05_17	0.2
	ALA3	AAS3	11_05_17	30_05_17	0.45
Kalø (Dammen)	KAL1	KAS1	30_05_17	30_05_17	0.45
	KAL2	KAS2	30_05_17	30_05_17	0.45
	KAL3	KAS3	30_05_17	30_05_17	0.2

Analysemetoder og resultater

Opsætning af selve laboratorieanalyserne foregik på baggrund af DNA ekstraheret fra kendte oddere, samt fra odderekskrementer (Fy1 og Fy5) indsamlet på Fyn. Dette giver optimale betingelser for, at metoden fungerer. Generelt blev alle forsøg med højkoncentreret DNA foretaget i DNA-laboratorium dedikeret til dette, mens eDNA prøverne alle blev behandlet i cleanrooms-laboratorium for derved at holde prøver med lav og høj koncentration af DNA fysisk adskilte og således undgå kontaminering. Det betyder også, at DNA fra kendte oddere blev ekstraheret i DNA-laboratorium til recente prøver med forventeligt høj DNA koncentration, mens DNA fra filterprøverne og sedimentprøverne blev ekstraheret i cleanrooms-laboratorium. eDNA prøverne blev ekstraheret med Power Feces fra Qiagen. Dette kit kan bruges til fæces, jord, vand etc. Laboratoriearbejdet foregik altid fra pre-PCR opformering til post-PCR opformering for at undgå kontaminering. Samtidig blev der medtaget blanke prøver ved selve ekstraktionen, samt medtaget to negative kontroller (hvor der ikke er tilsat prøve) ved selve opsætningen til PCR for hver 8. prøve/replik. Primerne til qPCR forsøget blev udviklet på baggrund af sammenligning med sekvenser fra ilder, skovmår, husmår, mink og lækat downloaded fra GenBank (den globale database for DNA sekvenser), samt af odder-sekvenser fra Fyn (Andersen & Søgaard, 2017) og CytB primerne, der benyttes til påvisning af odder fra ekskrementer (Hansen & Jacobsen, 1999). Samtidig blev primerne udviklet af Thomsen et al. (2012) også afprøvet.

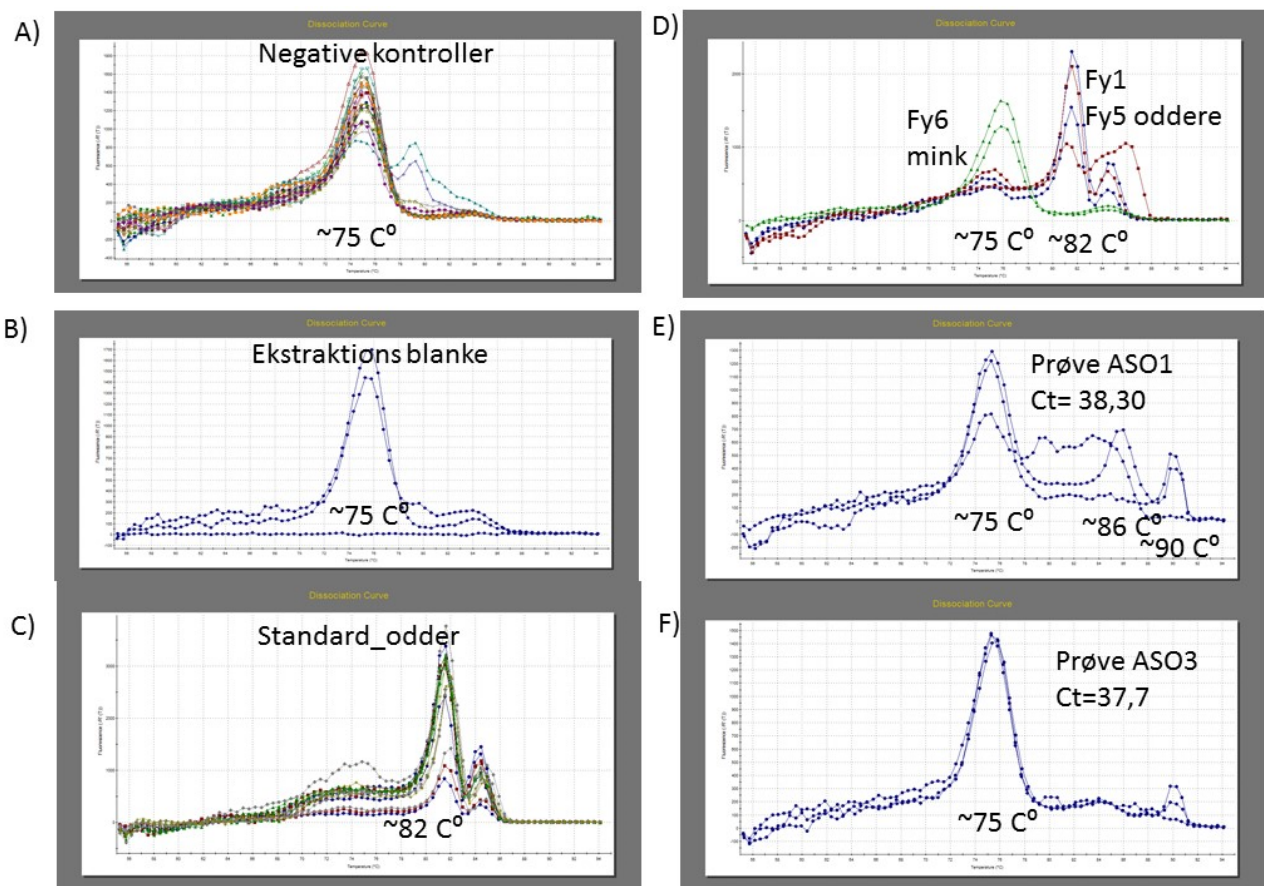
Det nyudviklede primer-sæt blev efterfølgende testet på de kendte prøver af oddere (Gelbillede 1). Billedet viser et enkelt bånd med den forventede størrelse på ca 120bp, samt at det nye primer-sæt giver en u-specifik primer-dimer reaktion (svagt bånd ved den negative kontrol, som ligger klart under båndet for odder). Primer-dimer er et hyppigt biprodukt ved PCR opformering, der

opstår når de to primere hybridiserer, fordi der er en række med komplementære baser i hver primer. Ligeledes ses, at det er muligt at påvise odder ved fortyndinger af DNA, i dette tilfælde op til 3125 gange DNA-koncentrationen. Primer-sættet fra Thomsen et al. (2012) gav uspecifikke bånd med DNA polymerase enzymet, der blev benyttet til qPCR analysen (KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2x) Universal, Sigma Aldrich) (Gelbillede 1, c).



Gelbillede 1. Test af det nye CytB primer-sæt ved forskellige annealings temperaturer A) samt ved forskellige fortyndinger B). C) primer-sættet udviklet af Thomsen et al. (2012) ved forskellige annealings temperaturer med KAPA SYBR DNA polymerasen.

Dernæst blev det nyudviklede primer-sæt (LL_CytB) testet for evt. at påvise odder i de indsamlede eDNA prøver. Samtidigt blev DNA fra to tidligere analyserede odderekrementprøver samt 1 minkprøve (Fy6) medtaget og fortyndet 10x, 100x og 100x. Ligeledes blev der medtaget en fortyndingsrække baseret på fortyndinger af DNA fra kendte oddere gående fra en 5³ til 5⁷ x fortyndinger (benævnte 'standard') (Tabel 2, Analyse 1). Ct værdierne (treshold cycle) er et indirekte udtryk for indholdet af DNA i prøven, hvor en lav Ct værdi angiver et højt indhold af DNA fra den pågældende art. Resultatet af denne qPCR kørsel viste, at det nye primer-sæt kan påvise odder i ekskrementprøver fortyndet 100x ved en annealingstemperatur på 66 grader. Dissociations-kurven læst fra qPCR analysen viste en top ved ~75 C°, som var det uspecifikke primer-dimer produkt eksemplificeret ved de negative kontroller og resultatet for replikaterne fra den blanke prøve fra ekstraktions proceduren (Figur 1A, B). Dissociationskurven for de kendte standardprøver med odder viste en top ved ~82 C° (Figur 1C). DNA fra fæcesprøverne med kendte oddere (Fy1, Fy5) viste samme top ved ~82 C°, mens minkprøven ved 100x fortynding viste den uspecifikke top ved ~75 C° (Figur 1D). Dette viser, at primersættet påviser odder og ikke mink. De resterende prøver viste toppe ved ~75 C° eller ~86 C° og ~90 C° som vist i Figur 1E og F for de to prøver som har den laveste Ct værdi (Tabel 2, Analyse 1) og ikke ved ~82 C° som karakteriserer odder. Dette betyder, at den angivne Ct værdi i disse prøver (og resten af prøverne) ikke skyldes DNA fra odder, men fra primer-dimer produktet og andet ukendt DNA i prøverne.



Figur 1. Dissociations-kurver fra analyse gang 1. A) dissociations-kurver for alle replikater for de negative kontroller, B) de ekstraktions blanke, C) alle standarder med kendt odder-DNA, D) for fæces-prøven fra den kendte mink (Fy6) og fæces-prøven fra de to kendte oddere (Fy1 og Fy5), E) sedimentprøve fra Almind Sø med næst laveste Ct værdi blandt de indsamlede prøver, F) sedimentprøve fra Almind Sø med den lavest Ct værdi blandt de indsamlede prøver. X-aksen= temperatur, y-aksen = fluorescence ($-R'(T)$).

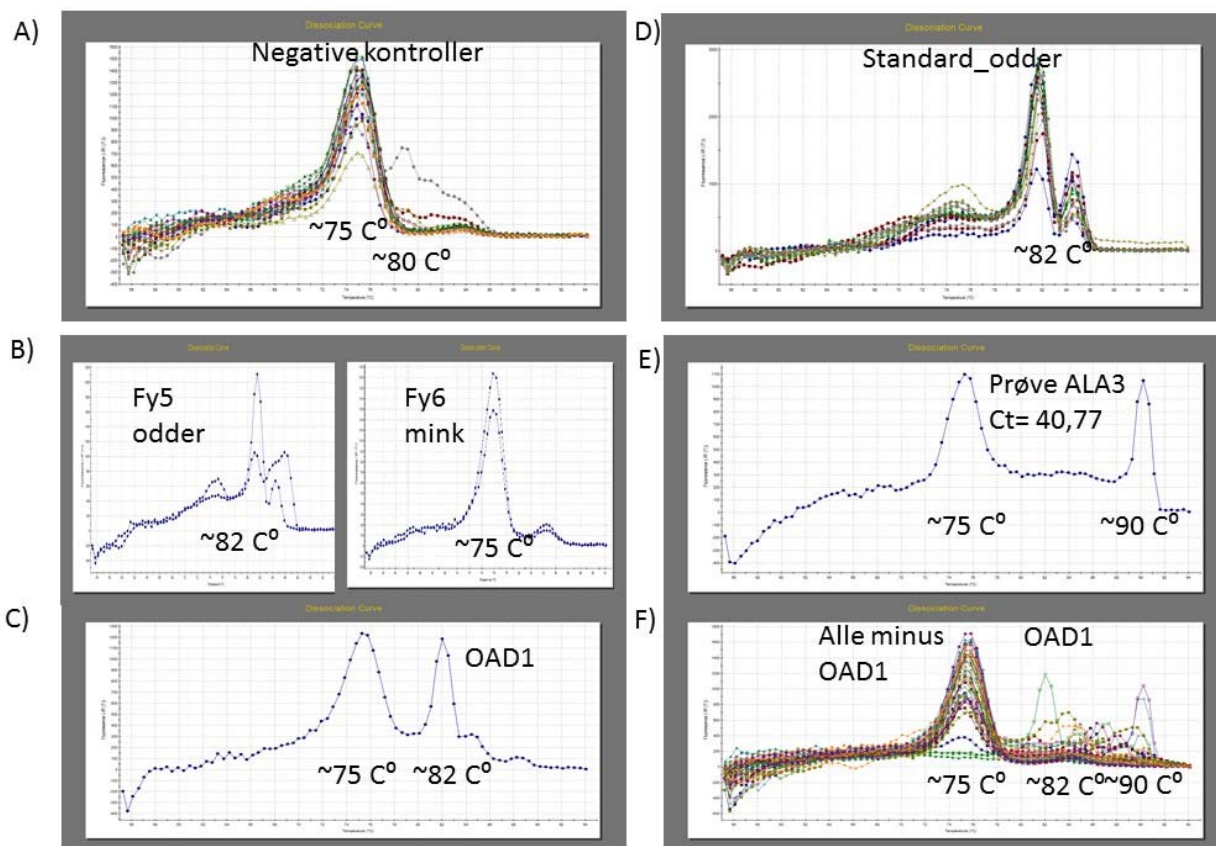
Resten af prøverne blev analyseret i Analyse 2 (Tabel 2) sammen med de 3 ekskrementprøver, som nu blev fortyndet 1000X. Ved inspektion af dissociations-kurverne viste de negative kontroller igen den karakteristiske top for uspecifikt DNA forårsaget af primer-dimer produkterne ved $\sim 75\text{ C}^0$ (Figur 2A). Fy5, fæcesprøven fra kendt odder fortyndet 1000x, viste top ved $\sim 82\text{ C}^0$ (Ct=34-35, Tabel 2, Analyse 2) mens Fy6, fæces fra kendt mink fortyndet 1000x, viste top ved $\sim 75\text{ C}^0$ (Ct= ~ 40 , Tabel 2, Analyse 2) karakteriseret ved uspecifikt DNA (Figur 2B). Én af de tre replikater fra prøve OAD1, viste en top $\sim 82\text{ C}^0$ (Figur 2C) (Ct= 39,43, Tabel 2, Analyse 2), hvilket antydede, at der i denne prøve var DNA fra odder. Ingen af de andre prøver viste signal. Alle standarderne med kendt odder DNA viste den forventede top $\sim 82\text{ C}^0$ (Figur 2D) og tilsvarende lave Ct værdier (Tabel 2, Analyse 2). Prøven med den næstlaveste Ct værdi, ALA3, (Tabel 2, Analyse 2) viste top ved $\sim 75\text{ C}^0$ og $\sim 90\text{ C}^0$ og ikke ved $\sim 82\text{ C}^0$ (Figur 2E), dvs heller ikke denne prøve indeholdt DNA fra odder. For at illustrere, at det blot var OAD1, der viste top ved $\sim 82\text{ C}^0$ karakteristisk for odder, er dissociations-kurverne vist i Figur 2F.

Tabel 2. Resultater fra to qPCR analyse-gange. I begge analyser er inkluderet standarder baseret på DNA fra kendte oddere i stigende fortyndingsgrad, der er kørt i op til 4 replikater samt tilhørende Ct værdier (treshhold cycle) for det pågældende replikat. Ct værdien er et indirekte udtryk for indholdet af DNA i prøven, hvor en lav Ct værdi angiver et højt indhold af DNA. Resultatet af vand- og sedimentprøverne er ligeledes angivet. Fy1 10x =DNA fra odder fæces fortyndet 10x, etc. Fy6= DNA fra mink fæces. Positive= antal replikater der er vurderet positive for oddere ud fra dissociations-kurver og Ct værdier og gel-billeder for nogle. BLA_sed = blank prøve fra ekstraktionen af sedimentprøverne. NTC= negative kontroller hvor der ikke er tilsat DNA. No Ct: Intet qPCR produkt.

Analyse 1	Replicate	Ct (dR)	Positive*	Analyse 2	Replicate	Ct (dR)	Positive*
Standard 5 ³	19	23,68	4/4	Standard 5 ⁴	20	27,01	4/4
Standard 5 ³	19	22,54		Standard 5 ⁴	20	25,39	
Standard 5 ³	19	21,28		Standard 5 ⁴	20	25,49	
Standard 5 ³	19	21,17		Standard 5 ⁴	20	24,38	
Standard 5 ⁴	20	24,94	4/4	Standard 5 ⁵	21	28,20	4/4
Standard 5 ⁴	20	24,81		Standard 5 ⁵	21	29,32	
Standard 5 ⁴	20	23,55		Standard 5 ⁵	21	27,41	
Standard 5 ⁴	20	23,74		Standard 5 ⁵	21	27,31	
Standard 5 ⁵	21	26,13	4/4	Standard 5 ⁶	22	30,47	4/4
Standard 5 ⁵	21	26,60		Standard 5 ⁶	22	30,21	
Standard 5 ⁵	21	26,50		Standard 5 ⁶	22	30,45	
Standard 5 ⁵	21	27,15		Standard 5 ⁶	22	30,59	
Standard 5 ⁶	22	30,00	4/4	Standard 5 ⁷	23	33,43	4/4
Standard 5 ⁶	22	27,99		Standard 5 ⁷	23	34,23	
Standard 5 ⁶	22	27,75		Standard 5 ⁷	23	32,91	
Standard 5 ⁶	22	28,94		Standard 5 ⁷	23	33,35	
Standard 5 ⁷	23	30,82	2/2	Standard 5 ⁸	24	35,59	2/2
Standard 5 ⁷	23	31,12		Standard 5 ⁸	24	38,42	
Fy1_10x	1	24,74	3/3	F1_1000x	1	34,42	2/2
Fy1_10x	1	24,41		F1_1000x	1	32,68	
Fy1_10x	1	24,31		F5_1000x	2	33,07	2/2
Fy5_10x	2	24,97	3/3	F5_1000x	2	34,60	
Fy5_10x	2	24,68		F6_1000x	3	39,95	0
Fy5_10x	2	24,89		NTC		No Ct	0
Fy6_10x	3	33,95	3/3	NTC		44,80	0
Fy6_10x	3	33,46		NTC		No Ct	0
Fy6_10x	3	33,46		NTC		No Ct	0
Fy1_100x	4	27,28	2/3	NTC		No Ct	0
Fy1_100x	4	27,52		NTC		No Ct	0
Fy1_100x	4	No Ct		NTC		No Ct	0
Fy5_100x	5	27,49	3/3	NTC		No Ct	0
Fy5_100x	5	27,07		NTC		No Ct	0
Fy5_100x	5	27,16		NTC		No Ct	0
Fy6_100x	6	37,44	0/3	NTC		No Ct	0
Fy6_100x	6	35,62		NTC		40,00	0
Fy6_100x	6	34,93		NTC		No Ct	0
BLA_sed	18	37,69	0/3	ODS1	4	44,79	0/3
BLA_sed	18	No Ct		ODS1	4	No Ct	
BLA_sed	18	39,22		ODS1	4	No Ct	
NTC	---	40,63	0	OHS1	5	No Ct	0/3

NTC	---	42,00	0	OHS1	5	45,59	
NTC	---	41,65	0	OHS1	5	44,56	
NTC	---	41,75	0	KAS2	6	No Ct	0/3
NTC	---	42,90	0	KAS2	6	No Ct	
NTC	---	41,45	0	KAS2	6	No Ct	
NTC	---	43,14	0	KAL2	7	43,82	0/3
NTC	---	42,14	0	KAL2	7	No Ct	
NTC	---	43,72	0	KAL2	7	No Ct	
NTC	---	40,70	0	ALA1	8	45,66	0/3
NTC	---	43,47	0	ALA1	8	No Ct	
NTC	---	43,87	0	ALA1	8	45,14	
NTC	---	42,22	0	ALA2	9	44,11	0/3
NTC	---	36,21	0	ALA2	9	41,34	
NTC	---	41,78	0	ALA2	9	44,85	
NTC	---	41,59	0	ALA3	10	43,27	0/3
NTC	---	39,79	0	ALA3	10	40,77	
NTC	---	40,88	0	ALA3	10	43,50	
NTC	---	42,29	0	SAL1	11	43,76	0/3
NTC	---	41,64	0	SAL1	11	43,92	
NTC	---	40,71	0	SAL1	11	44,01	
NTC	---	42,69	0	SAL2	12	No Ct	0/3
NTC	---	43,90	0	SAL2	12	No Ct	
NTC	---	42,85	0	SAL2	12	44,74	
ASS1	7	No Ct	0/3	SAL3	13	No Ct	0/3
ASS1	7	44,62	0/3	SAL3	13	No Ct	
ASS1	7	No Ct	0/3	SAL3	13	45,83	
ASS2	8	No Ct	0/3	OAD1	14	41,11	1/3
ASS2	8	No Ct	0/3	OAD1	14	39,34	
ASS2	8	No Ct	0/3	OAD1	14	41,72	
ASS3	9	42,27	0/3	OAD2	15	43,57	0/3
ASS3	9	45,01	0/3	OAD2	15	41,13	
ASS3	9	No Ct	0/3	OAD2	15	42,69	
SAS1	10	No Ct	0/3	OAD3	16	43,70	0/3
SAS1	10	No Ct	0/3	OAD3	16	41,96	
SAS1	10	No Ct	0/3	OAD3	16	45,69	
SAS2	11	44,78	0/3	OAH1	17	45,40	0/3
SAS2	11	No Ct	0/3	OAH1	17	No Ct	
SAS2	11	No Ct	0/3	OAH1	17	43,98	
SAS3	12	No Ct	0/3	OAH2	18	42,26	0/3
SAS3	12	45,13	0/3	OAH2	18	41,81	
SAS3	12	No Ct	0/3	OAH2	18	45,43	
KAS1	13	No Ct	0/3	OAH3	19	43,16	0/3
KAS1	13	No Ct	0/3	OAH3	19	43,62	
KAS1	13	No Ct	0/3	OAH3	19	42,44	
ASO1	14	39,46	0/3				
ASO1	14	39,91	0/3				
ASO1	14	38,30	0/3				
ASO2	15	38,97	0/3				
ASO2	15	39,94	0/3				

ASO2	15	39,12	0/3
ASO3	16	40,86	0/3
ASO3	16	37,72	0/3
ASO3	16	38,78	0/3
KAL1	17	40,83	0/3
KAL1	17	40,05	0/3
KAL1	17	41,81	0/3



Figur 2. Dissociations-kurver fra analyse gang 2. A) dissociations-kurver for alle replikater for de negative kontroller, B) for Fy5 kendt odder-fæces og Fy6 kendt mink-fæces, C) for OAD1 vandprøven fra Odense Å ved Dalum, D) alle standarder med kendt odder-DNA, E) Vandprøve fra Almind Sø med næst laveste Ct værdi blandt de indsamlede prøver, F) for alle prøver der er kørt i analyse gang 2 fra Tabel 2. X-aksen= temperatur, y-aksen = fluorescence ($-R'(T)$).

Den fundne positive OAD1 prøve blev Sanger-sekventeret ved firmaet MacroGen, Holland. Kvaliteten af sekvensen var desværre ikke god. På trods af dette var der 90% match med odder i de første 12 hits, der fremkom ved sammenligning med sekvenser i den globale database GenBank (Bilag 1).

Slutteligt blev en anden DNA-polymerase benyttet (KiCqStart™Probe Ready Mix (Sigma Aldridge)), der er baseret på brugen af en Taqman probe, sammen med primer-sættet udviklet af Thomsen et al. (2012). Denne qPCR metode svarede til den Thomsen et al. (2012) benyttede. Her blev der ikke påvist odder i nogen af prøverne, mens det var muligt at påvise odder baseret på fortyndinger af fæcesprøverne. Primer-sættet skulle give en sekvens fra odder på ~78bp. Gelbillede 2 viser, at det var muligt at påvise odderDNA med qPCR assayet og Taqman proben i de kendte odderfæces prøver, men det var ikke muligt at påvise odder DNA i OAD1 prøven som tidligere. Vandprøverne,

SAL, OAD, OAH, ALA, KAL, og ASO1,2 blev analyseret men alle var negative (data ikke vist).

Gelbillede 2. Test af Thomsen et al. (2012) primer-sættet med ny DNA-polymerase, og brugen af Taqman probe, der annealer til DNA fra odder. Fy1 og Fy5 er DNA fra fæces prøver fra odder og OAD1 er prøven fra Odense Å Dalum, der gav en enkelt top med den nyudviklede primer.



Konklusion

Resultatet af analyserne med de forskellige primer-sæt viste, at det ikke var muligt at benytte primer-sættet udviklet af Thomsen et al. (2012), da dette gav mange uspecifikke bånd af den forkerte størrelse med qPCR assayet KAPA SYBR FAST qPCR Kit Master Mix (2x) Universal (Sigma Aldrich). Det nyudviklede primer-sæt fra CytB genet designet ud fra eksisterende sekvenser fra odder viste, at det var muligt at opformere kendt odderDNA med den forventede størrelse på ca 120bp. Dette primer-sæt blev benyttet i qPCR analysen med KAPA SYBR FAST Master Mix DNA polymerasen (Sigma Aldrich) til at forsøge at påvise odder i de indsamlede eDNA prøver fra to forskellige lokaliteter med en kendt odderbestand. Primer-sættet blev testet på mink, hvor det ikke opformerede DNA fra minken. Det mangler at blive testet på andre mårdyr, før det er endelig verificeret. Det lykkedes at få et signal fra ét replikat fra en filter-prøve fra Odense Å Dalum. Lokaliteten ligger ved motorvejen (station 613_58_E med koordinater: 586442, 6135166). Efterfølgende, blev qPCR assayet samt Taqman proben som Thomsen et al. (2012) havde benyttet afprøvet. Her var det ikke muligt at påvise DNA fra odder i OAD1 prøven. Dette kunne indikere, at signalet fra OAD1 prøven skyldes kontaminering, men der blev ikke fundet signal i nogen af de negative kontroller, der var taget med i analyserne for hver 4. prøve for at kontrollere kontamineringen. Givet dette store antal negative kontroller er det meget lidt sandsynligt at signalet skyldes kontaminering. Vandprøverne og sedimentprøverne fra Odense Å ved Dalum, blev indsamlet, hvor der var en meget langsom vandføring.

Pilotforsøget viser at det er meget vanskeligt at påvise odder i et hurtigt strømmende vandløb med det foreliggende samplingdesign, hvor der blot er en enkelt prøvetagning i løbet af 24 timer. På trods af den utilstrækkelige verifikation af specificiteten af mårdyr kunne sekventeringen af qPCR produktet påvise odder, mens det var vanskeligt med samplingdesignet. Sandsynligheden for at påvise odder i et vandløb forventes at kunne øges ved, at der udtages en vandprøve hver time døgnet rundt og måske i flere døgn med en automatisk vandsampler eller med et andet evt. filterbaseret indsamlingsaggregat, der kan tage op til 1 liter ad gangen eller mere hver time i udvalgte vandløb. Vandprøverne kan dernæst puljes i 4 timers intervaller, så der bliver 6

filterprøver per døgn. Det er ikke afprøvet om en sådan opskalering af prøvetagningen vil gøre metoden til et effektivt screeningsværktøj, og afprøvningen ligger udenfor rammerne af dette pilotprojekt.

Referencer

Andersen, L.W., Søgaard, B., Johansson, L.S. & Wiberg-Larsen, P. (2012). Anvendelse af eDNA-metoder i NOVANA- artsovervågningen – Muligheder og begrænsninger. – Notat fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi. 20 s.

Andersen, L.W. & Søgaard, B. (2017a). DNA analyse af mulige odder-ekskre-menter indsamlet på Fyn. Notat fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi Dato: 12. juni 2017 http://dce.au.dk/fileadmin/dce.au.dk/Udgivelser/No-tater_2017/DNA_analyse_odder_Fyn.pdf

Andersen, L.W. & Søgaard, B. (2017b). DNA analyse af mulige odder-ekskre-menter indsamlet på Sjælland. Notat fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi Dato: 7. august 2017. http://dce.au.dk/fileadmin/dce.au.dk/Udgi-velser/Notater_2017/DNA_analyser_odder_Sjaelland.pdf

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. & A.B. Madsen (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.

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

