

Vejledning til indsamling af eDNA

DNA & liv



**STATENS
NATURHISTORISKE
MUSEUM**

KØBENHAVNS
UNIVERSITET



Indsamling af eDNA til *DNA & liv*

Miljø-DNA, også kaldet *eDNA* (environmental DNA) kan indsamles fra en sø eller et vandhul i Danmark, hvor padde og fisk lever og yngler. Indsamling af *eDNA*-prøven foretages ved at suge vand op i en stor sprøjte og presse vandet igennem et filter, som tilbageholder DNA. Vandet indsamles fra 10 steder på lokaliteten og gerne forskellige dybder for at få DNA fra arter i hele søen med. Filteret dækkes efterfølgende med ethanol for at bevare DNA'et bedst muligt, og sendes straks til Statens Naturhistoriske Museum sammen med data om indsamlings-stedet og dets miljø.

Denne protokol indeholder

- Udstyrsliste
- Protokol: "Sådan indsamler du *eDNA* fra ferskvand"
- Beskrivelse af tidspunkt og sted for indsamling af *eDNA*
- Tabel over arter og qPCR-systemer
- Tag-med-i-felten **Quickguide**

Udstyrsliste

Alt hvad du skal bruge, finder du i kuverten:

- Vejledning til indsamling af *eDNA* med dataark for *eDNA*-prøven
- 50 ml sprøjte
- Sterivex-filterenhed med en farvet og en ufarvet ende samt to tilhørende propper
- 5 ml centrifugerør med 96 % ethanol
- 3 ml sprøjte
- Lynlåspose med mærkat til indsamlingsdata
- Frankeret svarkuvert til forsendelse af den indsamlede prøve

Medbring evt. selv et bægerglas eller spand til at opsamle vand i.

Sådan indsamler du eDNA fra ferskvand:

1. Vælg et tidspunkt og en lokalitet for indsamling af eDNA (se nedenstående afsnit)
2. Planlæg de 10 forskellige indsamlingssteder på lokaliteten (se Foto A). I alt 500ml vand skal opsamles og filtreres (10x50ml).
3. Begynd med at suge 50 ml vand op i den store sprøjte. Du kan suge vand op direkte fra søen eller først fylde det i et bægerglas og suge op derfra. **Se foto 1 i quickguiden.** *Sørg for, at der ikke kommer større partikler med i prøven, da det kan blokere filteret.*
4. Skru sprøjten fast på filterenhedens ufarvede ende. Vær omhyggelig med at skrue den helt fast. Sprøjt de opsamlede 50 ml vand gennem filteret. Vandet skal ikke gemmes. **Se foto 2.**
5. Skru sprøjten af filterenheden. Sug på ny 50 ml søvand op i sprøjten og sprøjt det på samme måde ud gennem filterenheden. Gentag dette, så der i alt sprøjtes 10x50ml søvand gennem filteret. Hvis det bliver meget hårdt at trykke stemplet ned (pga. ophobning af organisk stof), bør du nøjes med færre gentagelser for ikke at ødelægge filteret. Noter den samlede mængde vand over filteret. **Se foto 3.**
6. Skru til slut den tomme, luftfyldte sprøjte på igen, og tryk luft gennem filteret, så det sidste vand bliver presset ud og filteret tørrer. **Se foto 4.**
7. Luk filterenhedens **lilla** ende med den tilhørende prop og fjern den store sprøjte.
8. Fyld den lille sprøjte med 96% ethanol og sprøjt dette ind i filterenheden til filteret er dækket. Ethanolen skal blive i filteret. **Se foto 5.**
9. Sæt prop på den **ufarvede** ende af filterenheden og kassér ethanolrøret og den lille sprøjte. DNA-prøven er nu fikseret på filteret og konserveret i ethanol. **Se foto 6.**
10. Læg filterenheden i lynlåsposen og læg den i svarkuerten

11. Udfyld dataark for eDNA-prøven (se bagerst). Det er vigtigt at de geografiske koordinater er præcise og i det rigtige format¹
12. Læg dataark for både eDNA-prøven og miljøvariable i svarkuerten og afsend den så hurtigt som muligt til museet. Opbevar den i køleskab, indtil du kan sende den.
13. Send på forsendelsesdagen en mail til dnalab@snm.ku.dk med navn og evt. dato for planlagt besøg i DNALab samt besked om, at prøven er på vej. Angiv hvor mange steder i søen prøven stammer fra og vedhæft meget gerne **fotos fra lokaliteten** og **fotobelæg af paddearter** som I finder (se vejledning til indsamling af miljødata).
14. Har du spørgsmål i forbindelse med prøvetagningen, så skriv til dnalab@snm.ku.dk.
15. Du kan dele fotos på INSTAGRAM ved at bruge **#dnaogliv**.

¹ **Koordinaterne skal være i formatet decimalgrader der ligner disse: 55.941245, 12.30178.** Koordinaterne findes via Google Maps ved at zoome ind på kortet, højreklikke på det præcise indsamlingssted og vælge "What's here?" ("Hvad er der her?"), hvormed der fremkommer der et lille vindue med et sæt geografiske koordinater. Punktet skal ligge et sted mellem indsamlingsstederne.

Tidspunkt for indsamling af eDNA

Det mest optimale tidspunkt at indsamle eDNA-prøven er fra **slutningen af maj til midten af juni** (se nedenstående figur), hvor der forventes at være mest eDNA fra både padder og fisk i vandet.



Farvekode angiver forekomst af eDNA af padder og fisk i forhold til tidspunkt, hvor 1 angiver stor sandsynlighed for forekomster og 4 angiver ingen eller meget ringe sandsynlighed for forekomst. Bemærk at eDNA for fisk kun er undersøgt i begrænset omfang i perioden september til februar.



Der er størst forekomst af eDNA når metabolismen hos de akvatiske organismer er størst, dvs. når de juvenile stadier (haletudser og larver) vokser sig store. De fleste padder overvintrer på land og de fleste voksne individer vil forlade vandet efter yngleperioden, med undtagelse af et par enkelte arter (især Grøn frø, lille vandsalamander og stor vandsalamander). Da eDNA nedbrydes i vandet, kræver der konstant tilførsel fra organismerne for at man kan detektere DNA'et. For akvatiske organismer der periodisk eller sæsonmæssigt ikke forekommer i vandet, som fx padder, er timingen af indsamlingen derfor meget vigtig. Den optimale periode for at indsamle eDNA fra fisk er betydelig længere og kan formentlig indsamles hele året rundt.

Sted for indsamling af eDNA

eDNA kan indsamles fra en sø eller et vandhul, hvor der lever og yngler padder og fisk. Der skal indsamles fra 10 forskellige steder fra lokaliteten og de i alt 500ml (10x50ml) der skal indsamles fra samme vandssystem og bør dække variationen bedst muligt. Indsamlingen foretages bedst i nærheden af vegetation eller andre former for skjulesteder i søen. Indsamles der fra et vandhul eller en lille sø bør hele lokaliteten dækkes, mens man bør begrænse sig til en mindre del af meget store søer (se eksempel på foto).



Grindsted Gymnasium indsamler *e*DNA fra Engsøen ved Grinsted Ådal og undersøger samtidig makroindeks. Cirklerne markerer 8 af de 10 indsamlings-steder; de to sidste er placeret udenfor billedet. Foto af Anja Hundebøll Nielsen

Prøven skal indsamles fra stillestående eller kun svagtrindende vand. Det kan være både naturlige søer og vandhuller eller kunstige systemer, som damme, gadekær, voldgrave, opstemninger, vandfyldte grus- og kalkgrave.

For stillestående vand differentieres der typisk mellem sø og vandhul, hvor vandhul defineres som små og/eller lavvandede lokaliteter der temporært *kan* bundfryse eller udtørre. Søer er typisk store og/eller dybe med stillestående eller svagt rindende vand, der ikke tørrer ud, men godt kan bundfryse. Padder og fisk kan yngle i alle disse lokalitetstyper og er de derfor alle interessante.

Organismerne

Der findes 14 **paddearter** i Danmark, hvoraf vi pt. har udviklet *realtime* PCR-systemer til 8 arter (se nedenstående tabel). Halvdelen af de danske paddearter er almindelige, mens de resterende findes hist og her eller er sjældne til meget sjældne (men kan lokalt være hyppigt forekommende). Padder findes både i akvatiske og terrestriske systemer, men du skal kun indsamle prøver fra deres vandige miljø, som ofte er vandhuller eller søer med god vegetation. De fleste arter overvintrer på land og da *eDNA* nedbrydes bør man indsamle i den periode hvor individerne er i vandet (se afsnit "Tidspunkt for indsamling af *eDNA*"). Padder kan forekomme i både ferskt og saltpræget stillestående eller svagtrindende vand.

Der er fundet i alt 64 **fiskearter** i ferskvand i Danmark, hvoraf 38 af disse er hjemmehørende arter. Enogtyve af de hjemmehørende arter er almindelige eller findes hist og her. Det er arter som aborre, brasen, gedde, rudskalle, skalle, trepigget hundestejle, ørred og ål. Fire arter er meget sjældne, herunder dyndsmerling og heltling. De fleste introducerede arter er meget sjældne, men der findes en håndfuld arter, som karpe, sølvkarsusse (guldfisk) og regnbueørred, der er almindelige. Vi har pt. udviklet *realtime* PCR-systemer til 11 af ferskvandsfiskene (se nedenstående tabel).

Tabel over arter og qPCR-systemer

Gruppe	Dansk navn	Latinsk navn	Hypighed	Udbredelse	Ferskvands-system	qPCR-system
Fisk	Aborre	<i>Perca fluviatilis</i>	Almindelig	Hele DK	S, VL	Ja
Fisk	Brasen	<i>Abramis brama</i>	Almindelig	Hele DK	S	Ja
Fisk	Dyndsmerring	<i>Misgurnus fossilis</i>	Meget sjælden	Sønderjylland	S, VL	Ja
Fisk	Europæisk Ål	<i>Anguilla anguilla</i>	Almindelig	Hele DK	VL, S	Ja
Fisk	Gedde	<i>Esox lucius</i>	Almindelig	Hele DK	S, VL	Ja
Fisk	Karpe	<i>Cyprinus carpio</i>	Hist og her	Det meste af DK	S	Ja
Fisk	Karusse	<i>Carassius carassius</i>	Almindelig	Hele DK	S	Ja
Fisk	Pigsmerling	<i>Cobitis taenia</i>	Sjælden	Fyn og Sjælland	VL, (S)	Ja
Fisk	Skalle	<i>Rutilus rutilus</i>	Almindelig	Hele DK	VL, S	Ja
Fisk	Skrubbe	<i>Platichthys flesus</i>	Hist og her	Hele DK, kystnær	VL, (S)	Ja
Fisk	Trepigget hundestjle	<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Almindelig	Hele DK	VL, (S)	Ja
Padde	Klokkefrø	<i>Bombina bombina</i>	Sjælden	Spredt, kystnær	VH	Ja
Padde	Løøfrø	<i>Pelobates fuscus</i>	Relativt sjælden	Spredt	VH	Ja
Padde	Løøfrø	<i>Hyla arborea</i>	Relativt sjælden	Spredt	VH	Ja
Padde	Grønbroget Tudse	<i>Bufo viridis</i>	Relativt sjælden	Spredt, kystnær	VH	Ja
Padde	Skrubtudse	<i>Bufo bufo</i>	Almindelig	Hele DK	S, VH	Nej
Padde	Strandtudse	<i>Epidalea calamita</i>	Relativt sjælden	Spredt, kystnær	VH	Ja
Padde	Latterfrø	<i>Pelophylax ridibundus</i>	Meget sjælden	Bornholm	VH	Nej
Padde	Grøn frø	<i>Pelophylax esculentus</i>	Almindelig	Øst-DK	S, VH, (VL)	Nej
Padde	Butsnudet frø	<i>Rana temporaria</i>	Almindelig	Det meste af DK	S, VH	Nej
Padde	Spidssnudet frø	<i>Rana arvalis</i>	Almindelig	Det meste af DK	S, VH	Ja
Padde	Springfrø	<i>Rana dalmatina</i>	Relativt sjælden	Øst-DK	VH, (S)	Ja
Padde	Lille vandsalamander	<i>Lissotriton vulgaris</i>	Almindelig	Hele DK	S, VH, (VL)	Ja
Padde	Stor vandsalamander	<i>Triturus cristatus</i>	Hist og her	Det meste af DK	VH, (VL)	Ja
Padde	Bjergsalamander	<i>Ichthyosaura alpestris</i>	Meget sjælden	Sønderjylland	VH, (VL)	Nej

Ferskvandssystem: S, sø; VL, vandløb; VH, vandhul. System sorteret efter artens hyppighed. Parentes angiver sjælden forekomst

Quickguide

1. Planlæg de 10 forskellige indsamlingssteder på lokaliteten.
2. Filtrer først 50 ml vand fra ét sted i søen/vandhullet og undgå større partikler/mudder
3. Gentag dette for samtlige 10 indsamlingssteder, så der i alt indsamles 500ml vand, eller indtil det ikke længere er muligt at presse mere i igennem filteret.
4. Sug luft op i sprøjten og pres det sidste vand ud af filteret. Luk filteret i den ene ende med den lilla prop
5. Sprøjt 95% ethanol ind i filteret og luk den anden ende med den farveløse prop
6. Læg filterenheden i lynlåsposen, som puttes i svarkuerten.
7. Udfyld dataark for hhv. eDNA-prøven og miljøvariable. Alle oplysninger skal udfyldes. Vedlæg dataarkene i svarkuerten og afsend den så hurtigt som muligt til museet.
8. Giv os besked om, at prøven er på vej via dnalab@snm.ku.dk og oplys dit navn og evt. dato for planlagt besøg i DNAlab.



1. Opsaml vand og sug op i sprøjten
2. Sæt filteret på 50ml sprøjten
3. Filtrér vand – gentag 10 gange
4. Pres det sidste vand ud af filteret
5. Skru prop på den lille ende og sprøjt ethanol i filteret
6. Skru prop på den anden ende



Dataark for eDNA-prøven

Lokalitet	
Indsamlingsdato	
Koordinater	
	koordinater skal ligne disse; 55.940923, 12.300627
Antal indsamlingssteder	
Filtreringsvolumen (ml)	
Institution (skole)	
Navn (lærer)	
Forventer I at analysere prøven selv?	
- Bookingnummer og besøgsdato	