



OVERVÅGNING AF BILAG II- OG IV-ARTER BASERET PÅ eDNA

– muligheder og begrænsninger

Videnskabelig rapport fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi

nr.367

2020



AARHUS
UNIVERSITET

DCE – NATIONALT CENTER FOR MILJØ OG ENERGI

[Tom side]

OVERVÅGNING AF BILAG II- OG IV-ARTER BASERET PÅ eDNA

– muligheder og begrænsninger

Videnskabelig rapport fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi

nr. 367

2020

Liselotte Wesley Andersen
Ole Roland Therkildsen

Aarhus Universitet, Institut for Bioscience



AARHUS
UNIVERSITET

DCE – NATIONALT CENTER FOR MILJØ OG ENERGI

Datablad

Serietitel og nummer:	Videnskabelig rapport fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi nr. 367
Titel:	Overvågning af bilag II- og IV-arter baseret på eDNA
Undertitel:	- muligheder og begrænsninger
Forfattere:	Liselotte Wesley Andersen & Ole Roland Therkildsen
Institution:	Institut for Bioscience
Udgiver:	Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi ©
URL:	http://dce.au.dk
Udgivelsesår:	Februar 2020
Redaktion afsluttet:	Februar 2021
Faglig kommentering:	Aksel Bo Madsen, Morten Elmeros & Anne Winding
Kvalitetssikring, DCE:	Jesper R. Fredshavn
Sproglig kvalitetssikring:	Anne Mette Poulsen
Finansiel støtte:	Ingen ekstern finansiering
Bedes citeret:	Andersen, L.W. & Therkildsen, O.R. 2020. Overvågning af bilag II- og IV-arter baseret på eDNA – muligheder og begrænsninger. Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi, 74 s. - Videnskabelig rapport nr. 367 http://dce2.au.dk/pub/SR367.pdf
	Gengivelse tilladt med tydelig kildeangivelse
Sammenfatning:	Rapporten er en opdatering og præcisering af et tidligere notat (Andersen m.fl. 2012) omhandlende "Anvendelsen af eDNA (miljø DNA) i overvågningen". Notatet belyste de teoretiske muligheder og begrænsninger for at operationalisere anvendelsen af eDNA til identifikation af arter i NOVANA overvågningen af arter og naturtyper. I den foreliggende rapport er formålet at gennemgå de teoretiske muligheder for at benytte eDNA-monitoring til overvågning af bilag II- og IV-arter på habitatdirektivet. Denne overvågning kan både foregå med eDNA indsamlet i forskellige medier som fx jord og vand eller med eDNA fra en målrettet indsamling af fx ekskrementer, hår eller urin, eller DNA udtaget fra selve arten.
Erneord:	Odder, bæver, hasselmus, birkemus, flagermus, spættet sæl, gråsæl, marsvin, markfirben, padder, klokkefrø, dyndsmørling, pigsmørling, havlampret, flodlampret og bæklampret, hedepletvinge, sortpletet blåfugl, natlyssværmer, grøn kølleguldsmed, grøn mosaikguldsmed, stor kærguldsmed, eremit og Stellas mosskorpion, lys skivevandkalv og bred vandkalv, kildevældsvindelsnegl, sumpvindelsnegl og skævvindelsnegl, tykskallet malermusling, flodperlemusling, mygblomst, gul stenbræk, enkelt månerude, fruesko, vandranke, liden najade, grøn buxbaumia, blank seglmos,
Layout:	Grafisk Værksted, AU Silkeborg
Foto forside:	Bufo viridis. Svklimkin [CC BY-SA (https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0)]
ISBN:	978-87-7156-473-0
ISSN (elektronisk):	2244-9981
Sideantal:	74
Internetversion:	Rapporten er tilgængelig i elektronisk format (pdf) som http://dce2.au.dk/pub/SR367.pdf

Indhold

Sammenfatning	5
1 Baggrund	8
2 Brugen af eDNA i overvågningen	10
3 Materialer og metoder	12
4 Bilag II- og IV-arter på habitatdirektivet	13
4.1 Pattedyr	14
Odder, <i>Lutra lutra</i>	14
Bæver, <i>Castor fiber</i>	16
Hasselmus, <i>Muscardinus avellanarius</i>	18
Birkemus, <i>Sicista betulina</i>	19
Flagermus	19
Spættet sæl, <i>Phoca vitulina</i> , og gråsæl, <i>Halichoerus grypus</i>	21
Marsvin, <i>Phocoena phocoena</i>	23
4.2 Padder og krybdyr	24
Markfirben, <i>Lacerta agilis</i>	24
Padder	25
Klokkefrø, <i>Bombina bombina</i>	28
4.3 Fisk	29
Dyndsmerling, <i>Misgurnus fossilis</i>	29
Pigsmerling, <i>Cobitis taenia</i>	30
Havlampret, <i>Petromyzon marinus</i> , flodlampret, <i>Lampetra fluviatilis</i> , og bæklampret, <i>Lampetra planeri</i>	31
4.4 Dagsommerfugle og guldsmede	32
Hedepletvinge, <i>Euphydryas aurinia</i>	32
Sortpletet blåfugl, <i>Maculinea arion</i>	33
Natlyssværmer, <i>Proserpinus proserpina</i>	34
Grøn kølleguldsmed, <i>Ophiogomphus cecilia</i>	35
Grøn mosaikguldsmed, <i>Aeshna viridis</i>	36
Stor kær guldsmed, <i>Leucorrhinia pectoralis</i>	37
4.5 Biller og mosskorpioner	37
Eremit, <i>Osmoderma eremita</i> , og Stellas mosskorpion, <i>Anthrenochernes stellae</i>	37
Vandkalve: lys skivevandkalv, <i>Graphoderus bilineatus</i> og bred vandkalv, <i>Dytiscus latissimus</i>	38
4.6 Snegle og muslinger	40
Kildevældsvindelsnegl, <i>Vertigo geyeri</i> , sumpvindelsnegl, <i>Vertigo moulinsiana</i> , og skæv vindelsnegl, <i>Vertigo angustior</i>	40
Tykskallet malermusling, <i>Unio crassus</i>	41
Flodperlemusling, <i>Margaritifera margaritifera</i>	42
4.7 Karplanter og mosser	45
Mygblomst, <i>Liparis loeselii</i>	45
Gul stenbræk, <i>Saxifraga hirculus</i>	46
Enkelt månerude, <i>Botrychium simplex</i>	47
Fruesko, <i>Cypripedium calceolus</i>	47
Vandranke, <i>Luronium natans</i>	48

Liden najade, <i>Najas flexilis</i>	49
Grøn buxbaumia, <i>Buxbaumia viridis</i>	50
Blank seglmos, <i>Hamatocaulis vernicosus</i>	51
5 Diskussion	52
6 Konklusion	55
7 Referencer	57

Sammenfatning

I de senere år har udviklingen af eDNA-metoderne taget fart, og der er således inden for en kort årrække sket store fremskridt mod en egentlig integration af teknikken i overvågningen. Selve anvendelsen af eDNA præsenteres generelt som en hurtigere, nemmere og mere præcis metode, der kan anvendes i naturovervågningen både som erstatning og/eller som et supplement til den traditionelle overvågning. Udviklingen af eDNA-metoderne, både på den tekniske og økonomiske side, foregår med stor hastighed, og der er store ambitioner mht. anvendelse af eDNA-teknikker i overvågningssammenhænge. eDNA-teknikkerne har vist sig brugbare i det akvatiske og terrestriske miljø både mht. detektion af specifikke arter samt organismegrupper/ biodiversitet. Der er dog stadig udfordringer både mht. databehandling og fortolkning af resultaterne, der skal løses og standardiseres, før anvendelsen af eDNA til overvågning kan implementeres. Det er fx afgørende, at den tilgængelige viden om den praktiske anvendelse af eDNA-metoderne deles, og at tilgangen harmoniseres via protokoller og anbefalinger for at opnå en standardisering, samt at der foregår en videreudvikling af procedurer for alle trin i processen (såsom prøvetagning, DNA-ekstraktion, primer design, bioinformatisk analyse) og håndtering af falsk positive og falsk negative prøver.

I denne rapport præsenterer vi den nyeste viden på området, og på denne baggrund gennemgår vi mulighederne for at anvende eDNA i overvågningen af udvalgte arter omfattet af habitatdirektivet. Formålet er at gennemgå de teoretiske muligheder for at benytte eDNA-monitoring til overvågning af bilag II- og IV-arter på habitatdirektivet. Denne overvågning kan både foregå med eDNA indsamlet i forskellige medier som fx jord og vand eller med eDNA fra en målrettet indsamling af fx ekskrementer, hår eller urin, eller DNA udtaget fra selve arten. Gennemgangen er baseret på litteratursøgning udført i perioden op til marts 2019 med Google, Google Scholar, Web of Science samt ved søgning i NCBI-databasen og GenBank efter sekvenser på de forskellige arter. Det er derved et vidtgående, men ikke udtømmende litteraturreview, der er foretaget.

De udvalgte arter indgår i den danske NOVANA-overvågning i henhold til habitatdirektivet. På baggrund af eksisterende erfaringer vurderes potentialet for at overvåge den enkelte art eller artsgruppe ved hjælp af eDNA med udgangspunkt i de overvågningsmetoder, der anvendes i dag, jf. den tekniske anvisning for den pågældende art eller artsgruppe. Det vurderes afslutningsvist, hvorvidt eDNA aktuelt er en relevant metode at anvende i overvågningen af den pågældende art eller artsgruppe. Desuden peges på teknikkens eventuelle mangler samt behov for udvikling og raffinering af metoderne med henblik på at gøre dem egnede til overvågningsformål i fremtiden. Arterne fordeler sig på terrestriske pattedyr, havpattedyr, padder, krybdyr, fisk, dagsommerfugle, guldsmede, biller, mosskorpioner, snegle, muslinger, karplanter og mosser. Arterne har forskellige karakteristika. Størrelsesmæssigt spænder de fra den få millimeter store Stellas mosskorpion til vores største sæl, gråsælen. Nogle af arternes bestande skal tælles i hundredetusinder, måske millioner, som fx vindelsneglene, mens bestandene af andre arter, som fx sortplettet blåfugl, er ganske fåtallige og kun udgør nogle hundrede individer. Nogle arter forekommer over det meste af landet, som fx vores almindelige paddearter, mens andre arter kun forekommer på en enkelt, fx karplanten liden najade, eller ganske få lokaliteter, fx lys skivevandkalv. Arterne varierer

desuden i forhold til deres krav til levestedet, idet nogle arter er stærkt specialiserede, som fx eremit, der lever i hulheder i gamle løvtræer, mens odder kan træffes i alle typer af vådområder. Desuden forekommer arterne i vidt forskellige medier i løbet af deres livscyklus. Nogle arter, som fx fisk, opholder sig i det samme medie gennem hele sin livscyklus, mens guldsmedene veksler mellem et larvestadie i vand og et voksenstadie, der er terrestrisk. Disse forskellige karakteristika giver både udfordringer og muligheder, når den givne art skal overvåges. Dette gælder ikke alene i forbindelse med anvendelsen af de konventionelle overvågningsmetoder, der fremgår af den tekniske anvisning for overvågningen af den enkelte art eller artsgruppe, men også ved en eventuel fremtidig anvendelse af eDNA i overvågningen.

eDNA som monitoringsmetode i den nationale overvågning er en del af fremtidens værktøjskasse. Som det fremgår af gennemgangen af bilagsarterne, er der nogle arter, hvor metoden med fordel kan implementeres efter lidt udvikling. Metoden kan benyttes med fordel, hvor overvågningen er ekstensiv og kun sigter mod en registrering af forekomsten af en art på en given lokalitet. For arter, hvor mere detaljerede informationer om populationsstørrelser, demografi m.m. skal registreres, er eDNA-metoderne endnu ikke tilstrækkeligt raffinerede. I langt de fleste tilfælde vil eDNA-monitoring således ikke kunne erstatte de konventionelle overvågningsmetoder, men den vil kunne fungere som et supplement til de konventionelle metoder. Ved at benytte eDNA som screeningsværktøj vil det formodentlig i mange tilfælde være muligt at effektivisere den konventionelle metode i overvågningen. På denne baggrund vurderes det, at såfremt eDNA-metoderne skal finde anvendelse i den eksisterende artsovervågning under NOVANA-programmet, vil det i første omgang være som et bidrag til den ekstensive overvågning af arternes udbredelse. Den intensive overvågning kan dog også drage nytte af DNA-metoderne, der kan anvendes som et screeningsværktøj til at udpege områder, hvor den mere intensive overvågning skal foregå.

Gennemgangen af arterne og vurderingen af, hvor det er muligt at benytte eDNA-metoden – enten artsspecifikt eller ved metabarcoding – har vist, at for den semiakvatiske art, odderen, er især den målrettede eDNA-metode, hvor ekskrementer benyttes som DNA-kilde, brugbar til både identifikation på arts- og individniveau. For eDNA-baseret overvågning fra vandprøver mangler udvikling af en sampling-procedure. For de vandlevende arter, stor vandsalamander og dyndsmørling, benyttes artsspecifik eDNA i overvågningen af stor vandsalamander i UK og formodentlig også i andre europæiske lande, men der er ikke fundet dokumentation for dette. Dyndsmørlingen kan påvises med artspecifikke primere og eDNA, og der pågår en feltverifikation af metoden i Danmark. Det samme er gældende for flodperlemusling. Andre arter, for hvilke den artsspecifikke eDNA-metode vurderes at kunne udvikles baseret på den eksisterende viden uden de store omkostninger og med et meget omhyggeligt sampling-design, er pigsmørling, grøn mosaikguldsmed, stor kærguldsmed, bred vandkalv, lys skivevandkalv og tykskallet malermusling. For paddernes og flagermusenes vedkommende vil en metabarcoding-metode være oplagt. For de resterende habitatarter på bilag II og IV vurderes det, at der skal udvikles laboratorieprocedurer, herunder primer-afprøvning m.m., for at afgøre, hvilke medier, der er størst sandsynlighed for at påvise arterne i. Derudover skal der udvikles samplingprocedurer, før det kan afgøres, om det er muligt at påvise arterne med eDNA.

Stadig mangler der dog mere forskning i forskellige aspekter af eDNA-metoden før brug især med hensyn til udvikling af standardprocedurer til håndtering af usikkerheder ved de forskellige stadier i processen, dvs. samplingdesign og prøvetagning, feltindsamling, laboratoriehåndtering, PCR-opformering etc., samt kvantificering af disse usikkerheder og sammenligning med usikkerhederne forbundet med de konventionelle overvågningsmetoder.

1 Baggrund

Det nationale overvågningsprogram NOVANA understøtter nationale prioriterede behov for overvågningsdata om påvirkning, tilstand og udvikling i naturen og miljøet i Danmark. Programmet bidrager bl.a. til opfyldelse af forpligtelser i EU-direktiver, dansk lov og internationale konventioner om overvågning af natur, vandmiljø og luft samt behovet for viden i forbindelse de nationale vandområde- og NATURA 2000-planer.

NOVANA-programmet omfatter således arter anført på habitatdirektivet (Annonymos 1992). Overvågningen udføres enten som en intensiv overvågning af bestandsstørrelse eller en ekstensiv overvågning af den pågældende arts udbredelse. Overvågningen er tilpasset artens biologi og det aktuelle vidensniveau om den. Overvågning af bestandsstørrelser er i mange tilfælde meget ressourcekrævende, mens overvågning af artens udbredelse kan gennemføres for færre ressourcer.

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.

Mange arter kan dog være vanskelige at påvise eller identificere med de konventionelle standardiserede metoder, da de er afhængige af arternes livsstadier, levemåder, adfærd og det tidspunkt på året, hvor overvågningen udføres. Det betyder, at uanset overvågningsmetode kan detektionssandsynligheden være lav. Påvisningen af fåtallige arter udgør således en særlig udfordring.

Overvågningen gennemføres efter retningslinjer, såkaldte tekniske anvisninger, udarbejdet af DCE, Aarhus Universitet. Den tekniske anvisning fastlægger således metoder for feltundersøgelser, prøvetagning m.v. Anvisningerne, der gælder for enkelte arter eller artsgrupper, tilpasses efter behov, og det er hensigten, at de teknologier og metoder, som anvendes i forbindelse med overvågningen, løbende udvikles med henblik på at forbedre og effektivisere overvågningen.

I de senere år har udviklingen af eDNA-metoderne taget fart, og der er således inden for en kort årrække sket store fremskridt mod en egentlig integration af teknikken i overvågningen.

I denne rapport præsenterer vi derfor den nyeste viden op til marts 2019 på området, og på denne baggrund gennemgår vi mulighederne for at anvende eDNA i overvågningen af udvalgte arter omfattet af habitatdirektivet.

Rapporten er en opdatering og præcisering af et tidligere notat (Andersen m.fl. 2012) omhandlende "Anvendelsen af eDNA (miljø DNA) i overvågningen". Notatet belyste de teoretiske muligheder og begrænsninger for at operationalisere anvendelsen af eDNA til identifikation af arter i NOVANA overvågningen af arter og naturtyper. I den foreliggende rapport er formålet at

gennemgå de teoretiske muligheder for at benytte eDNA-monitering til overvågning af bilag II- og IV-arter på habitatdirektivet. Denne overvågning kan både foregå med eDNA indsamlet i forskellige medier som fx jord og vand eller med eDNA fra en målrettet indsamling af fx ekskrementer, hår eller urin, eller DNA udtaget fra selve arten.

2 Brugen af eDNA i overvågningen

Winding m.fl. (2019) gennemgår state-of-the-art inden for anvendelsen af eDNA i forskellige sammenhænge gående fra påvisningen af sjældne eller invasive arter/enkeltarter til identifikation af artsgrupper (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 eDNA metabarcoding og Next Generation Sequencing (NGS), hvilket er væsentligt mere kompliceret. Endnu er metoderne ikke implementeret mange steder i de nationale overvågningsprogrammer. Der er til dato kun fundet dokumentation for, at eDNA-metoden til påvisning af enkeltarter benyttes i overvågningen af stor vandsalamander (*Triturus cristatus*) i UK (Biggs m.fl. 2015). Området er i hastig udvikling gennem flere målrettede projekter på internationalt plan. Eksempelvis er formålet med EU Cost Action DNAqua-Net (<https://dnaqua.net/>) (Lese m.fl. 2016) at udvikle og standardisere eDNA-baserede metoder til overvågning i akvatiske miljøer. I EU Interreg-projektet GEANS (<https://northsearegion.eu/geans/>) udvikles og standardiseres ligeledes procedurer for monitoring af marin bentisk fauna i Nordsøen, og referencebiblioteker for DNA-sekvenser opdateres. Den europæiske komité for standardisering (European Committee for Standardisation), CEN, har nedsat en arbejdsgruppe med henblik på at udarbejde standarder for eDNA-baseret akvatisk monitoring (CEN/TC230/WG 28 "DNA and eDNA Methods"), og der er udarbejdet udkast til "Water sampling for capture of environmental DNA in Aquatic environments" i CEN-dokumentet CEN/TC230/WG2 NWIP 1156 (Blackman m.fl. 2019). I Danmark er der udarbejdet et udkast til en teknisk anvisning til indsamling af marine vandprøver og eDNA-analyse (Andersen m. fl. 2016).

Selve anvendelsen af eDNA præsenteres generelt som en hurtigere, nemmere og mere præcis metode, der kan anvendes i naturovervågningen både som erstatning og/eller som et supplement til den traditionelle overvågning. Udviklingen af eDNA-metoderne, både på den tekniske og økonomiske side, foregår med stor hastighed, og der er store ambitioner mht. anvendelse af eDNA-teknikker i overvågningssammenhænge. eDNA-teknikkerne har vist sig brugbare i det akvatiske og terrestriske miljø både mht. detektion af specifikke arter samt organismegrupper/bestemmelse af biodiversitet (Winding m.fl. 2019). Der er dog stadig udfordringer både mht. databehandling og fortolkning af resultaterne, der skal løses og standardiseres, før anvendelsen af eDNA til overvågning kan implementeres. Det er fx afgørende, at den tilgængelige viden om den praktiske anvendelse af eDNA-metoderne deles, og at tilgangen harmoniseres via protokoller og anbefalinger for at opnå en standardisering, samt at der foregår en videreudvikling af procedurer for alle trin i processen (såsom prøvetagning, DNA-ekstraktion, primer design, bioinformatisk analyse) og håndtering af falsk positive og falsk negative prøver (Winding m.fl. 2019, Zinger m.fl. 2019).

En anden vigtig faktor, der skal inddrages i forbindelse med undersøgelser baseret på eDNA, er, at metoden generelt giver en mere detaljeret viden på en anden skala end traditionel overvågning. Dette gælder både for biodiversitet og artsspecifik forekomst. De konventionelle lange tidsserier af monitoringsdata er af høj værdi, og det bør sikres, at disse ikke kompromitteres ved en eventuel overgang til eDNA-baserede teknikker. Hvis vi umiddelbart skifter

til eDNA-baserede teknikker, mistes muligheden for undersøgelser, der kræver lange tidsserier, da det endnu ikke er muligt at sammenligne data indsamlet med de forskellige teknikker. Derfor anbefales det at udføre parallel-
overvågning med eDNA-teknikker og traditionelle metoder, indtil der er indsamlet tilstrækkelig erfaring og data, så analyser af lange tidsserier kan gennemføres med sikkerhed for tilstrækkelig kvalitet (Winding m.fl. 2019).

3 Materialer og metoder

Nærværende gennemgang er baseret på litteratursøgning udført i perioden op til marts 2019 med Google, Google Scholar, Web of Science samt ved søgning i NCBI-databasen og GenBank efter sekvenser på de forskellige arter. Det er derved et vidtgående, men ikke udtømmende litteraturreview, der er foretaget. I søgekriterierne er indgået artens latinske og engelske navn samt "eDNA, population genetics, genetic, genetic markers, monitoring" i forskellige kombinationer. Sammenfatningen af vurderingen omkring brugen af eDNA, der angives under hver art, forudsætter, at usikkerhedsestimaterne, der er beskrevet for de forskellige trin i processen (felt, laboratorie m.m.) inkluderes i modelleringen af selve forekomsten og udbredelsen (Ficetola m.fl. 2016, Guillera-Arroita 2017, Guillera-Arroita m.fl. 2017, Brost m.fl. 2018).

4 Bilag II- og IV-arter på habitatdirektivet

I dette afsnit gennemgås udvalgte arter, der indgår i den danske NOVANA-overvågning i henhold til habitatdirektivet. På baggrund af eksisterende erfaringer vurderes potentialet for at overvåge den enkelte art eller artsgruppe ved hjælp af eDNA med udgangspunkt i de overvågningsmetoder, der anvendes i dag, jf. den tekniske anvisning for den pågældende art eller artsgruppe. Det vurderes afslutningsvist, hvorvidt eDNA aktuelt er en relevant metode at anvende i overvågningen af den pågældende art eller artsgruppe. Desuden peges på teknikens eventuelle mangler samt behov for udvikling og raffinering af metoderne med henblik på at gøre dem egnede til overvågningsformål i fremtiden.

Arterne fordeler sig i følgende grupper:

- Terrestriske pattedyr
- Havpattedyr
- Padder og krybdyr
- Fisk
- Dagsommerfugle og guldsmede
- Biller og mosskorpioner
- Snegle og muslinger
- Karplanter og mosser.

Det fremgår, at der er tale om en samling af arter med vidt forskellige karakteristika. Størrelsesmæssigt spænder arterne fra den få millimeter store Stellas mosskorpion til vores største sæl, gråsælen. Nogle af arternes bestande skal tælles i hundredetusinder, måske millioner, som fx vindelsneglene, mens bestandene af andre arter, som fx sortpletet blåfugl, er ganske fåtallige og kun udgør nogle hundrede individer. Nogle arter forekommer over det meste af landet, som fx vores almindelige paddearter, mens andre arter kun forekommer på en enkelt, fx karplanten liden najade, eller ganske få lokaliteter, fx lys skivevandkalv.

Arterne varierer desuden i forhold til deres krav til levestedet, idet nogle arter er stærkt specialiserede, som fx eremit, der lever i hulheder i gamle løvtræer, mens odder kan træffes i alle typer af vådområder. Desuden forekommer arterne i vidt forskellige medier i løbet af deres livscyklus. Nogle arter, som fx fisk, opholder sig i det samme medie gennem hele sin livscyklus, mens guldsmedene veksler mellem et larvestadie i vand og et voksenstadie, der er terrestrisk.

Disse forskellige karakteristika giver både udfordringer og muligheder, når den givne art skal overvåges. Dette gælder ikke alene i forbindelse med anvendelsen af de konventionelle overvågningsmetoder, der fremgår af den tekniske anvisning for overvågningen af den enkelte art eller artsgruppe, men også ved en eventuel fremtidig anvendelse af eDNA i overvågningen.

4.1 Pattedyr

Odder, *Lutra lutra*

Formål med overvågning

”Formålet med overvågningen er at indsamle data, der kan danne grundlag for en vurdering af artens bevaringsstatus i henhold til habitatdirektivet. Dette indebærer en overvågning af artens forekomst og nationale udbredelse. Den tekniske anvisning skal sikre en ensartet og reproducerbar overvågning” (Søgaard m.fl. 2017).

Overvågningsmetode i NOVANA

Odderens levevis gør det ikke muligt at gennemføre en overvågning baseret på direkte observationer af arten. Den lever i tilknytning til både stillestående og rindende salt- og ferskvand ved uforstyrrede søer, moser, vandløb og fjordområder. Den er hovedsagelig nataktiv samt territoriehævdende, hvilket betyder, at det er muligt at eftersøge dens ekskrementer som dokumentation for forekomst. Til den ekstensive overvågning af udbredelsen anvendes derfor en international standardiseret kortlægningsmetode baseret på fund af ekskrementer eller andre odderspor (Reuther m.fl. 2000, Elmeros & Bussenius 2002). Eftersøgningen bliver foretaget på ca. 1.140 udvalgte stationer fordelt over hele Danmark med undtagelse af Bornholm, Samsø, Læsø og en række småøer, hvor odder aldrig er observeret. Når spor efter odder 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). Denne metode følger ændringen i forekomst og udbredelse, men giver ikke mulighed for en kvantitativ vurdering af populationsstørrelse på individniveau (Søgaard m.fl. 2017).

Overvågning på basis af eDNA i vandprøver

Da odderen er tilknyttet vand, er der en mulighed for at påvise dens tilstedeværelse ved eDNA fra en vandprøve. Odderen fouragerer efter føde i vandet i begrænsede perioder, hvilket betyder, at den befinder sig i vandet i begrænsede perioder. Det medfører mindre afsondring af eDNA, og derfor er der større sandsynlighed for at påvise odder i vandprøver indsamlet i stillestående vand som vandhuller, sammenlignet med prøver indsamlet i vandløb, hvor der er en kontinuert strøm. Yderligere vil der formodentlig også være en større sandsynlighed for at påvise odder-DNA i sedimentprøver fra vandhuller sammenlignet med vand fra vandsøjlen, da der synes at være mere eDNA i sedimentet, formodentlig fordi DNA'et bliver beskyttet ved at binde sig i sedimentet og derved kan ophobes (Turner m.fl. 2015). Analogt til den konventionelle eftersøgningsmetode er det ikke muligt at kvantificere antal individer på baggrund af påvisning af forekomst af odder med eDNA fra vandprøver.

Thomsen m.fl. (2012) påviste odder med eDNA ved artsspecifikke CytB-primere (cytochrom B i mitokondriet) og qPCR udført på vandprøver indsamlet i 15 vandløbssystemer og vandhuller/søer, hvoraf 27 % blev fundet positive. Desværre fremgår det ikke, hvorvidt de positive prøver blev påvist i vandløbssystemerne eller vandhullerne, men forfatterne argumenterer, at netop odderens levevis samt territoriестørrelsen kan være en forklaring på den lave positive succesrate.

I 2017 foretog Andersen m.fl. (2018) et pilotforsøg med det formål at afprøve, om det var muligt at detektere forekomsten af odder i vandløbssystemer med eDNA og qPCR (CytB) med særligt henblik på at kunne registrere mulig forekomst af odder i vandløbssystemer på Sjælland, Lolland-Falster og Møn, hvor

der ved den konventionelle overvågning i NOVANA ikke er fundet spor efter odder. Med det benyttede indsamlingsdesign blev der indsamlet triplikate vandprøver (2l) og én sedimentprøve én gang i løbet af et døgn fra udvalgte vandløb. De udvalgte vandløb var kendetegnet ved en kendt stor odderpopulation, en kendt lille odderpopulation og et vandhul uden forekomst af oddere. Det lykkedes kun at påvise odder i et enkelt stillestående vandløb (Andersen m.fl. 2018). Resultatet af pilotforsøget viste, at det var vanskeligt at påvise odder i vandløb med det benyttede indsamlingsdesign. Dette resultat blev understøttet af Harper m.fl. (2019b), der i et eDNA metabarcoding-studie undersøgte muligheden for at overvåge terrestriske pattedyr i vandhuller. Her var det ikke muligt at påvise odder, på trods af at dens tilstedeværelse var kendt i prøvetagningsområdet. Det vurderes dog stadig tænkeligt, at en artsspecifik påvisning qPCR vil være mulig ved en ændring af indsamlingsdesignet. Hvis dette også omfatter dels filtrering af større vandmængder samt prøvetagning på flere tidspunkter i døgnet, vil sandsynligheden for at påvise odder i et vandløb formentlig øges. Derved forventes det muligt at benytte eDNA fra vandprøver som screeningsværktøj sammen med en efterfølgende modellering af de usikkerheder, der er forbundet med brugen af eDNA, fx i forbindelse med feltindsamling af prøver, ved ekstraktion af DNA i laboratoriet samt ved opsætning af analyserne til artspåvisningen i laboratoriet. Usikkerhedsestimaterne for de forskellige trin i processen inkluderes i modelleringen af selve forekomsten og udbredelsen, som er udviklet og beskrevet hos Ficaretola m.fl. (2016), Guillera-Arroita (2017), Guillera-Arroita m.fl. (2017) og Brost m.fl. (2018).

Overvågning på basis af eDNA fra ekskrementer

Odder er en af de få bilagsarter, hvor der er benyttet målrettet indsamling af eDNA fra ekskrementer til kvalitetssikring af forekomst. I modsætning til den konventionelle monitoring er det muligt at indhente information om populationsstørrelse baseret på eDNA-analyser fra den målrettede indsamling af ekskrementer. Her kan der både foretages artsbestemmelse og derefter individbestemmelse af prøverne ved at oparbejde en DNA-profil med kernemarkører som microsatelitter eller andre genetiske markører som SNP's (single nucleotid polymorfe markører). Via fangst-genfangst-analyser vil DNA-profilerne kunne benyttes til at kvantificere individantallet i et givent område. Denne metode er blevet benyttet til at påvise både forekomst, udbredelse, populationsstørrelse, kønssammensætning samt markeringsadfærd i en lang række lande, hvor arten har været eller er truet. Eksempelvis benyttede Prigioni m.fl. (2006) eDNA fra ekskrementer til at kvantificere antallet af oddere i Pollino National Park i det sydlige Italien. Mucci & Randi (2007) benyttede metoden til at kønsbestemme oddere. Koelewijn m.fl. (2010) benyttede eDNA (benævnte den non-invasiv genetisk monitoring) til at følge genudsætningen af oddere i Holland. White m.fl. (2013) anvendte citizen science-indsamling af ekskrementer og efterfølgende eDNA-analyser til at påvise forekomsten samt antallet af odderindivider i Cork City, Irland. Vergara m.fl. (2014) gjorde brug af metoden (benævnte den non-invasiv genetisk teknik) til at monitorere udbredelse og tæthed af oddere i det nordlige Spanien. Lampa m.fl. (2015) benyttede metoden (benævnte den non-invasiv genetisk monitoring) i Øvre Lusatia (Saksen, Tyskland) til at påvise arten, køn samt populationsstørrelse og derigennem undersøge markeringsadfærd hos odder. Martin m.fl. (2017) undersøgte odderpopulationen på den vestlige skovgrænse i det centrale Tjekkiet (Bohemian forest) ved hjælp af eDNA fra ekskrementer for få en indikation af populationsstørrelsen med henblik på at evaluere muligheden for jagt i området.

I Danmark er eDNA fra ekskrementer indsamlet på Fyn og Sjælland i 2017 benyttet til at kvalitetssikre disse fund og påvise forekomsten af oddere. Dog blev der ikke udarbejdet DNA-profiler på disse til kvantificering (Andersen m.fl. 2017a, b). Undersøgelsen viste eksistensen af tre forskellige haplotyper (typer af mitokondrier, CytB), hvoraf én var unik for Fyn og én unik for Sjælland, mens den tredje var fælles. En tidligere DNA-analyse af formodede odderekskrementer, der blev udført i 2011 som en kvalitetstest af 10 ekskrementer, der var indsamlet af Naturstyrelsen i henholdsvis Ribe, Aarhus, Ålborg og Ringkøbing, påviste alle tilstedeværelse af odder undtagen i to prøver, hvor sekvensernes kvalitet var for dårlig. Blandt disse 38 jyske prøver blev der påvist to forskellige haplotyper, identisk med de to, der blev observeret på Fyn. Den tredje haplotype observeret på Sjælland blev ikke påvist, hvilket antyder, at denne kunne være specifik for Sjælland, være kommet fra Sverige eller være meget sjælden blandt de jyske oddere. Dette er naturligvis afhængig af antallet af prøver, samt hvorvidt disse prøver er fra forskellige individer (Andersen 2019).

Sammenfatning

Overvågning med eDNA baseret på ekskrementer kan med fordel benyttes til at påvise forekomst af odder i yderkanten af dens udbredelsesområde, som beskrevet i den tekniske anvisning. Individ-information kan opnås fra den målrettede indsamling af ekskrementer, og antal individer i et givet område kan opnås med fangst-gefangst-analyser. Denne metode bør udvikles og verificeres for arten. Metoden for eDNA indsamlet fra vandløb kræver også stadig udvikling, og især selve indsamlingsdesignet, bl.a. hyppighed for indsamling, bør undersøges, og metoden bør verificeres. Når metoden er udviklet, kan den benyttes som screeningsværktøj i områder, hvor det er uvist, om odderen forekommer, men hvor habitatkravene er opfyldt, og hvor arten evt. har været dokumenteret i historisk tid (tabel 3 -

http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

Bæver, *Castor fiber*

Formål med overvågning

”Formålet med overvågningen er at indsamle data, der kan danne grundlag for en vurdering af artens bevaringsstatus i henhold til habitatdirektivet. Dette indebærer en overvågning af artens bestandsstørrelse og forekomst/udbredelse” (Søgaard & Therkildsen 2019).

Overvågningsmetode i NOVANA

Bæveren lever i tilknytning til vand-å-systemer/vandløb, er semi-akvatisk og nataktiv ligesom odderen. Den er vanskelig at observere i naturen, hvorfor der i den konventionelle overvågning dels benyttes direkte observationer af bævere, hvor det er muligt, dels observationer af spor som gnav/afbidning, fældning, veksler, duftmarkeringer m.m. samt bo- og dæmningsbyggeri i kerneområder. Metoden monitorer forekomst og udbredelse, og populationsstørrelse estimeres ved optælling af aktive bæverboer (Søgaard & Therkildsen 2019).

Overvågning på basis af eDNA

Bæverens semi-akvatiske levevis og territoriale afmærkning betyder, at det formentlig vil være muligt at benytte lignende eDNA-overvågningsmetoder, som benyttes for odder. Dette vil være indsamling af bæverekscrementer, en mere målrettet ikke-invasiv genetisk overvågningsmetode og indsamling af vandprøver fra udvalgte vandløbssystemer for at teste tilstedeværelsen af bæver i udkanten af deres udbredelsesområde.

eDNA fra ekskrementer

Som for odder er det ikke muligt hverken via den konventionelle eftersøgningsmetode eller ved eDNA fra vandprøver at kvantificere antallet af individer i bæverpopulationen. Denne information kan derimod indhentes ved hjælp af eDNA-analyser fra den målrettede indsamling af ekskrementer. Dette sker først på baggrund af en artsidentifikation af ekskrementet og derefter på baggrund af de genererede DNA-profiler baseret på microsatellit- eller single nucleotid polymorfe- (SNP's) markører. Via fangst-genfangst-analyser vil DNA-profilerne kunne benyttes til at kvantificere individantallet i et givent område. Denne metode er ikke tidligere benyttet til at påvise både forekomst samt antallet af bæverindivider, hvorfor metoden skal udvikles. Der forefindes både mtDNA-markører til artsidentifikation (CR, control region i mitokondriet), kønsspecifikke markører samt microsatellit- (Frosh m.fl. 2014, Mai m.fl. 2018) og SNP's -markører (Senn m.fl. 2013, Senn m.fl. 2014) udviklet til bævere. Disse vil formodentlig kunne benyttes til dels artsidentifikation, kønsbestemmelse, samt individ-identifikation efter test og videreudvikling i laboratoriet. Ud over ekskrementer til brug for genetisk monitoring/eDNA-overvågning vil det også være muligt at benytte DNA fra hår indsamlet via opsatte hårfælder som beskrevet af Herr & Schley (2009).

eDNA i vandprøver

Bæveren er tilknyttet vand som odderen, hvorfor det højest sandsynligt vil være muligt at påvise dens tilstedeværelse ved eDNA fra en vandprøve. Bæveren fouragerer efter føde samt bygger bo og dæmninger i vandløbssystemerne. Det betyder, at den befinder sig i vandet i længere perioder. Derfor forventes det, at der er stor sandsynlighed for at påvise den i vandprøver indsamlet i stillestående vand såsom vandhuller, sammenlignet med prøver indsamlet i vandløb, hvor der er en kontinuert strøm. Harper m.fl. (2019) påviste bæver i vandprøver i et eDNA metabarcoding-studie, hvor de benyttede primere, der opformerede 12sRNA-sekvenser i mitokondriet. Det vurderes, at disse primere kan benyttes til artsspecifik påvisning med qPCR af bævere i vandprøver indsamlet analogt til vandprøver beskrevet for odder. Metoden vil formodentlig kunne benyttes som screeningsværktøj til påvisning af bæver i udkanten af dens udbredelsesområde og derved påvise, om der sker en udvikling af populationen. Selve brugen af metoden bør foregå efter samme beskrivelser og forbehold som for odderen.

Sammenfatning

Overvågning med eDNA baseret på ekskrementer kan med fordel benyttes til bestemmelse af udbredelse og kvantificering af antal bævere ved individ-analyser og fangst-genfangst-analyser. Metoden skal dog udvikles og verificeres. eDNA indsamlet fra vandløb, søer og damme vurderes også at kunne benyttes til påvisning af forekomst af bæver, men metoden skal udvikles, og som for odder skal selve indsamlingsdesignet, og hvor hyppigt prøvetagningen skal foretages, undersøges. Endelig skal metoden verificeres. Når metoden er udviklet, kan den benyttes som screeningsværktøj i områder, hvor det er uvist, om bæveren forekommer, men hvor habitatkravene er opfyldt (tabel 3) - http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf.

Hasselmus, *Muscardinus avellanarius*

Formål med overvågning

”Formålet med overvågningen er at indsamle data, der kan danne grundlag for en vurdering af artens bevaringsstatus i henhold til habitatdirektivet”, dvs. ekstensiv monitoring af artens forekomst og udbredelse (Søgaard & Elmeros 2018).

Overvågningsmetode i NOVANA

Hasselmusens yngle- og rasteområder er blandet løvskov med underskov rig på frø, bær og frugter m.m., som er dens fødeunderlag samt i skovbryn (Bright & Morris 1990, Wilhelmsen 2004, Wilhelmsen 2011). Hasselmusen er afhængig af adgang til redeområder til sommerreder fra juli til september og mulighed for overvintring (vinterhi) fra november til maj i specielle plantereder tæt ved jorden (Søgaard & Asferg 2007, Wilhelmsen 2011). Den konventionelle overvågningsmetode er baseret på eftersøgning af naturlige sommerreder og/eller sommerreder i rederør, der er opsatte til formålet (Søgaard & Elmeros 2018). Som for de andre pattedyrarter på bilag IV foregår den ekstensive overvågning ved at monitere, hvor mange 10X10 UTM-kvadrater, der er positive for hasselmus, dvs. hvor arten findes nu, hvor den er forsvundet fra, og hvilke nye kvadrater den er indvandret til.

Overvågning på basis af eDNA

Grundet hasselmusens levevis antages det at være meget vanskeligt at påvise dens forekomst ved indsamling af jordprøver på udvalgte lokaliteter. Laboratorieteknisk vil det være muligt at påvise arten genetisk, men ikke antallet af individer. Det antages, at primere benyttet af Mouton m.fl. (2017) til at opformere cytochrom B- (CytB) genet i mitokondriet og efterfølgende sekventering vil kunne benyttes til artsbestemmelsen. Dette kræver dog en udvikling og afprøvning af metoden.

Det vil være muligt også at benytte en målrettet indsamling af ekskrementer, der eventuelt kunne indsamles i nærheden af de rederør, der er opsat til den konventionelle overvågning. Dernæst kan disse artsbestemmes ved at benytte primerne for CytB-genet som beskrevet ovenfor og efterfølgende individbestemmes på baggrund af DNA-profiler baseret på 10 genetiske markører (microsatelliter, Mouton m.fl. 2017). Sammen med en efterfølgende fangst-genfangst-analyse vil det være muligt at få et estimat af, hvor stor den pågældende population er. Disse analyser ville også kunne foretages med DNA fra indsamlede hår med hårsække fra samme rederør. Selve laboratoriemetoderne og de artsspecifikke primere til hasselmus for både arts- og individbestemmelserne bør afprøves og videreudvikles/optimeres om nødvendigt.

Sammenfatning

Grundet hasselmusens levevis vurderes, at det vil være vanskeligt at påvise arten ved hjælp af eDNA indsamlet fra jord. Laboratorieteknisk er det muligt at udvikle den genetiske test til påvisning af arten. eDNA fra den målrettede indsamling via ekskrementer eller DNA fra hårsække kan benyttes til vurdering af individantal som beskrevet. Endelig skal metoderne verificeres. Når metoderne er udviklet, kan de benyttes som screeningsværktøj i områder, hvor det er uvist, om hasselmus forekommer, men hvor habitatkravene er opfyldt (tabel 3 - http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

Birkemus, *Sicista betulina*

Formål med overvågning

”Formålet med overvågningen er at indsamle data, der kan danne grundlag for en vurdering af artens bevaringsstatus i henhold til habitatdirektivet. Den ekstensive overvågning fokuserer på at følge artens udbredelse, og det registreres derfor kun, om arten er til stede eller ej på en lokalitet” (Elmeros m.fl. 2019).

Overvågningsmetode i NOVANA

Overvågningen er baseret på en registrering af birkemus med specielle vildtkameraer (van der Kooij & Møller 2017). Overvågningen af arten er ekstensiv og registreres i 10x10 UTM-kvadrater, hvor det angives, hvilke der er positive for arten, hvilke kvadrater den er forsvundet fra, og hvilke den er indvandret til.

Birkemus lever i områder med tæt græs og urtevegetation, gerne fugtigt, som hyppigt findes ved skovkanter, der støder op til udyrkede marker/enge samt i levende hegn, ugræssede marker og ekstensivt græssede ådale (Møller m.fl. 2011, Møller 2012). Yngle- og overvintringsreder er placeret under jorden i Danmark, og det er vanskeligt at finde spor som fx ekskrementer efter birkemus (Møller 2012).

Overvågning på basis af eDNA

Da birkemusen efterlader meget få spor, og dens reder bygges under jorden, er den vanskelig at overvåge med eDNA. Den konventionelle metode kunne evt. suppleres med analyser af eDNA fra jord, indsamlet efter et omhyggeligt tilrettelagt indsamlingsdesign med udgangspunkt i de områder, hvor den er observeret tidligere. Laboratorieteknik findes sekvenser i GenBank, samt genetiske studier (Cserkés m.fl. 2015, Rusin m.fl. 2018), der beskriver birkemusens fylogenetiske slægtskab, hvor der er beskrevet primere, der opformerer CytB-genet, som benyttes til artsbestemmelse. Hvis det skal være muligt at påvise birkemus med eDNA fra sådanne jordprøver, kræves dels en udvikling af metoderne i laboratoriet, dels efterfølgende afprøvning i felten.

Sammenfatning

Det vurderes som vanskeligt at benytte eDNA indsamlet fra jord til påvisning af arten. Det forventes, at eDNA fra jord er meget uhomogent fordelt, hvilket kræver brug af et fintmasket indsamlingsdesign i områder, hvor arten formodes at forekomme. Laboratorieteknik kan metoden udvikles (tabel 3 - http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

Flagermus

Formål med overvågning

Sytten flagermusearter (tabel 1) monitoreres i Danmark i forhold til habitatdirektivets (92/43/CEE) bilag II og IV. ”Formålet med den tekniske anvisning er at sikre, at overvågningen af flagermusarternes forekomst og udbredelse i Danmark foregår efter en standardiseret og reproducerbar metode” (Søgaard m.fl. 2018b).

Overvågningsmetode i NOVANA

Overvågningen registrerer ændringer i forekomst og yngleudbredelse over tid gennem kortlægning af antallet af UTM-kvadrater med de pågældende arter. Dette gøres ved at monitorere arterne i yngletiden (sommerperioden), hvor hunner antages at være stedfaste omkring deres dagsopholdssteder tæt på ynglekolonierne (Søgaard m.fl. 2018b). Selve påvisningen af flagermusarterne foregår ved at detektere flagermusenes ekkolokationskrik ved hjælp af Petterson

D 1000 X understøttet af observationer af flyveadfærd og udseende. Om nødvendigt understøttes påvisningen med netfangster (Søgaard m.fl. 2018b).

Overvågning på basis af eDNA

Flagermus er flyvende pattedyr og forventes at have meget lidt direkte berøring med vand i vandhuller/søer, vandløb eller jord, hvorfor det er meget lidt sandsynligt, at det er muligt gennem eDNA fra en vand- eller jordprøve at kunne påvise tilstedeværelsen af flagermus. Det er dog lykkedes at påvise forekomsten af Pipistrellflagermus, (*Pipistrellus pipistrellus*) i vandprøver fra et enkelt ud af 532 vandhuller i et eDNA metabarcoding-studie fra UK (Harper m.fl. 2019b). Dette understreger, at det er muligt, men at sandsynligheden for påvisning af arten med eDNA er lille. Dette kræver yderligere studier, der fokuserer på at påvise flagermus i vandprøver og/eller jordprøver taget i områder, hvor de forskellige arter forekommer.

eDNA fra ekskrementer

Laboratorieteknisk er det muligt at påvise alle 17 arter genetisk, da der findes mitokondrie-sekvenser i GenBank, der kan benyttes til at udvikle arts-specifikke primere til at identificere enkeltarter, og Walker m.fl. (2016) har udviklet flere COI-primersæt, der kan identificere 54 flagermusarter. Der er også studier med fokus på flagermusenes fødevalg ud fra eDNA fra ekskrementer (Galan m.fl. 2017). Disse studier har påvist, at det er muligt at detektere flere flagermusearter med eDNA metabarcoding og samtidigt at studere prædatorens (flagermusen) populationsstruktur (Bohmann m.fl. 2018). Swift m.fl. (2018) benyttede "multifaceted DNA metabarcoding (MDM)", hvor de gennem DNA fra ekskrementer påviste flagermuse-arterne, deres DNA profiler baseret på microsatellit-markører, kønsratio, fødevalg og tilstedeværelsen af "white-nose syndrome (WNS)", som er en svampesygdom, der inficerer huden på flagermus (Lorch m.fl. 2011). Studierne understøtter, at det er teknisk muligt at påvise flagermus med eDNA metabarcoding.

Som for andre af bilag II- og IV-pattedyrarterne vil det via den målrettede indsamling af ekskrementer være muligt at påvise flagermusearterne med eDNA i forbindelse med en genetisk overvågning. Dette ville forudsætte et indsamlingsdesign, der tager højde for arternes forskellige præferencer mht. yngle- og overvintringssteder. Tabel 1 giver en oversigt over, hvor arterne yngler samt overvintrer. For arterne, der overvintrer i gruber/miner (tabel 1), vil indsamlinger foretaget med mindst mulig forstyrrelse i gruberne/minerne på et tidspunkt fx lige efter udflyvningen om foråret kunne give et billede af artsdiversiteten/forekomsten i vinterperioden. For de resterende syv arter (tabel 1) kan ekskrementindsamlingen på overvintringsstederne foregå omkring hule træer og lignende under hensyntagen til at minimere forstyrrelse. De sidste to arter, skimmelflagermus (*Vespertilio murinus*) og sydflagermus (*Eptesicus serotinus*), overvintrer hovedsagelig i bygninger og lignende (tabel 1), hvorfor ekskrementindsamlingen om vinteren kunne foregå som beskrevet for hule træer. Her forudsættes det dog, at det er kendt, hvor arterne overvintrer. For påvisningen af udbredelsen, og hvorvidt der er sket ændringer i denne, bør indsamlingsdesignet tilrettelægges så denne afspejler dette. I den eksisterende overvågning foregår dette ved, at arterne eftersøges i et fastlagt net af undersøgelseområder med lytteposter (Søgaard m.fl. 2018b). Udbredelsen om sommeren er mere problematisk at overvåge med ekskrementindsamling, da populationerne er mere spredt, og det kræver, at de eksakte lokaliteter er kendte for at kunne målrette indsamlingen.

Sammenfatning

Flagermus kan påvises med eDNA metabarcoding fra vand og ekskrementer, hvor flere flagermusarter bliver påvist samtidig. Det vurderes, at der kan udvikles eDNA-metoder til at påvise de forskellige arter på samme tid – især for arter, der overvintrer i huler/kalkminer. Det vil kræve, at metoderne optimeres og verificeres (tabel 3 - http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

Tabel 1. Oversigt over de 17 flagermusearter, der er observeret i Danmark, deres status på EU-habitatdirektivet samt deres sommer- og vinteropholdssteder (Baagø & Jensen 2007; Søgaard & Asferg 2007; Møller m.fl. 2013).

Flagermus			Anvendelse af opholdssteder*		
EU-habitatdirektivet			Sommer/Vinter		Under jorden
Bilag	Art	Latinsk navn	Hule træer	Bygninger	Miner/kalkgruber/ kældre
			m.m.	og lign.	
Bilag II+IV	Bechsteins flagermus	<i>Myotis bechsteinii</i>	SS, VV	-S, -V	-S, V
Bilag II+IV	Bredøret flagermus	<i>Barbastella barbastellus</i>	S, V	SS, V	-S, VV
Bilag II+IV	Damflagermus	<i>Myotis dasycneme</i>	S, -V	SS, -V	-S, VV
Bilag II+IV	Stor museøre**	<i>Myotis myotis</i>	-S, -V	SS	-S, VV
Bilag IV	Brandts flagermus	<i>Myotis brandtii</i>	S, -V	SS, V	-S, VV
Bilag IV	Brunflagermus	<i>Nyctalus noctula</i>	SS, VV	-S, -V	-S, -V
Bilag IV	Dværgflagermus	<i>Pipistrellus pygmaeus</i>	SS, VV	SS, VV	-S, -V
Bilag IV	Frynseflagermus	<i>Myotis nattereri</i>	SS, V	SS, V	-S, VV
Bilag IV	Langøret flagermus	<i>Plecotus auritus</i>	SS, V	SS, VV	-S, V
Bilag IV	Nordflagermus***	<i>Eptesicus nilssonii</i>	-S, -V	SS, V	-S, V
Bilag IV	Pipistrellflagermus	<i>Pipistrellus pipistrellus</i>	SS, VV	SS, VV	-S, -V
Bilag IV	Skimmelflagermus	<i>Vespertilio murinus</i>	-S, -V	SS, VV	-S, -V
Bilag IV	Skægflagermus	<i>Myotis mystacinus</i>	S, -V	SS, V	-S, VV
Bilag IV	Sydflagermus	<i>Eptesicus serotinus</i>	-S, -V	SS, VV	-S, -V
Bilag IV	Troldflagermus	<i>Pipistrellus nathusii</i>	SS, VV	S, V	-S, -V
Bilag IV	Vandflagermus	<i>Myotis daubentonii</i>	SS, V	-S, -V	-S, VV
Bilag IV	Leislers flagermus***	<i>Nyctalus leisleri</i>	SS, VV	-S, -V	-S, -V

* modificeret efter Søgaard & Asferg (2007), ** Baagø & Jensen (2007), *** Møller m.fl. (2013)

SS = Meget anvendt sommeropholdssted

S = Anvendt sommeropholdssted

-S = Sjældent eller ikke anvendt sommeropholdssted

VV = Meget anvendt vinteropholdssted

V = Anvendt vinteropholdssted

-V = Sjældent eller ikke anvendt vinteropholdssted

Spættet sæl, *Phoca vitulina*, og gråsæl, *Halichoerus grypus*

Formål med overvågning

”De to fast forekommende sælarter i Danmark, spættet sæl (*Phoca vitulina*) og gråsæl (*Halichoerus grypus*), overvåges på deres hvilepladser på land i forbindelse med deres årlige fældning af pels og fødsler for at estimere henholdsvis antallet af sæler og ungeproduktionen” (Teilmann & Galatius 2018).

Overvågningsmetode i NOVANA

”Overvågningen foregår ved optællinger fra fly, hvor sælernes hvilepladser fotograferes i de relevante perioder i de områder, hvor der er hvilepladser med betydelig forekomst af sæler” (Teilmann & Galatius 2018). Sælarters levevis muliggør optællinger af både ynglende sæler ved direkte tællinger af sælunger i yngleperioden via fly og af voksne sæler i fældeperioden i starten af efteråret,

hvor begge sælarter ligger på land, ligeledes via fly. Derved er det muligt at få populationsestimater for begge sælarter (Teilmann & Galatius 2018).

Overvågning på basis af eDNA

Generelt vil det være teknisk muligt at benytte eDNA til at påvise forekomsten af begge arter, da der eksisterer mange populationsgenetiske undersøgelser, hvor der er benyttet artsspecifikke primere (CR, CytB, COI etc.) (fx Reed m.fl. 1997, Heers m.fl. 2018), der kan anvendes. Samtidig forefindes sekvenser i GenBank, hvorfra der også kan udvikles artsspecifikke primere. Derimod vil det være vanskeligere og i øjeblikket ikke muligt at komme med populationsestimater.

Et nyt studie (Parson m.fl. 2018) baseret på et andet havpattedyr, marsvin (*Phocoena phocoena*), har vist, at det er muligt at påvise forekomsten af havpattedyr med eDNA gennem en målrettet indsamling af vandprøver i et meget snævert område, hvor den pågældende art er observeret indenfor meget kort tid. Parson m.fl. (2018) viste, at det er muligt ved at indsamle prøver i "fødsporet" fra marsvinet, og med en efterfølgende eDNA analyse med NGS, at få estimater for populationsstruktur samt et konservativt estimat for populationsstørrelse. Denne metode vil kunne benyttes til sælovervågning. Dette forudsætter, at metoden verificeres og kalibreres, samt at alle usikkerheder estimeres på alle niveauer og inkorporeres i modeller for forekomst og udbredelse (Ficetola m.fl. 2016, Guillera-Arroita 2017, Guillera-Arroita m.fl. 2017, Brost m.fl. 2018, Cristescu & Hebert 2018).

eDNA som early warning-system

Der er udviklet DNA-metoder (baseret på qPCR), der kan påvise PDV hos gråsæl (Hammond m.fl. 2005) og canine distemper virus (CDV) hos hunde (Elia m.fl. 2006). En videreudvikling af den første metode vil sandsynligvis også kunne benyttes til eDNA-påvisning af PDV i miljøet. På baggrund af vandprøver indsamlet i udvalgte områder med stor forekomst af sæler vil eDNA-monitoring evt. kunne benyttes som early warning-system for kommende epidemier. Det er muligt at påvise fx forekomsten af ranavirus ved hjælp af eDNA fra vandprøver (Hall m.fl. 2016), hvilket antyder, at det er muligt at påvise vira gennem vandprøver.

Sammenfatning

Det vurderes, at brugen af eDNA fra vandprøver indsamlet i områder med forekomst af henholdsvis spættet sæl og gråsæl ikke vil bidrage med yderligere viden til den eksisterende overvågning og ikke vil give så præcise estimater over populationsstørrelsen, og dennes udvikling, som de eksisterende konventionelle metoder. En mere målrettet eDNA-indsamling af vandprøver som beskrevet for marsvin vil kunne tilvejebringe populationsgenetisk information for begge arter, men dette kræver videreudvikling og verifikation af metoden. eDNA fra vandprøver kan evt. benyttes til at påvise phocine distemper virus (PDV) og benyttes som early warning-system. Denne metode skal også udvikles og verificeres

(tabel 3 - http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

Marsvin, *Phocoena phocoena*

Formål med overvågning

"Formålet med overvågning af marsvin (*Phocoena phocoena*) er at monitorere udviklingen i bestandene i alle udpegede habitatområder samt de danske farvande generelt. Dette vil ske med en frekvens, som gør det muligt at vurdere bestandsudviklingen inden for hver afrapporteringsperiode" (Teilmann & Sveegaard 2012).

Overvågningsmetode i NOVANA

"Marsvin indgår i udpegningsgrundlaget i 16 Natura2000-områder, heraf 11 områder inden for populationen i de indre danske farvande og i fem områder i Skagerrak/Nordsøen. I Østersø-populationen er der endnu ikke udpeget Natura2000-områder, men et stort EU LIFE+ projekt, SAMBAH, skal kortlægge marsvins antal og foretrukne levesteder i perioden 2010-2014 (SAMBAH Final report 2016). I de indre danske farvande overvåges med faste akustiske lyttestationer, akustiske surveys og en total tælling svarende til de tidligere gennemførte SCANS-surveys. I Skagerrak/Nordsøen overvåges marsvin med survey fra fly. Da marsvin har store "home ranges", der strækker sig ud over grænser for udpegede habitatområder, skal overvågningen ikke blot inkludere habitat-områderne men hele marsvinets udbredelsesområde" (Teilmann & Sveegaard 2012).

Marsvins levevis vanskeliggør en direkte overvågning af populationerne som for sælerne, dvs. det er ikke muligt at få estimater for ynglepopulationen. Kvantificeringen af populationerne muliggøres ved monitorering fra skib og fly; dette kan ikke opnås gennem den passive overvågning via lyttestationer.

Overvågning på basis af eDNA

Det er muligt at gennemføre ekstensiv overvågning og at angive forekomsten af marsvin gennem eDNA indsamlet med vandprøver fra havet. Foote m.fl. (2012) sammenlignede påvisning af marsvin (baseret på qPCR-analyser af 12s rRNA-genet) med den konventionelle metode i form af lyttestationer og påvisningen af marsvin med eDNA. Resultatet af denne undersøgelse viste, at den konventionelle lyttestation var mere effektiv til at monitorere marsvin end eDNA-påvisningen. For påvisningen med artsspecifik eDNA indsamlet med vandprøver er det kun muligt at identificere, om arten har været til stede, mens kvantificering ikke er mulig som for de andre pattedyr på bilag II og IV.

Et andet studie (Parson m.fl. 2018) benyttede ligeledes artsspecifikke mitokondrie-markører (CytB-genet), men benyttede NGS til påvisningen i stedet for qPCR af marsvin i farvandede omkring Alaska. Parson m.fl. (2018) foretog en målrettet indsamling af vandprøver baseret på direkte observationer af marsvin, hvorefter vandprøverne blev udtaget i "sporet" efter marsvinene. Dette muliggjorde en indsamling af naturligt "fældet" væv i vandet, hvilket forbedrede den efterfølgende DNA-analyse, så det var muligt at detektere forskellige haplotyper. Derved kunne man foretage populationsgenetiske analyser og få dels et estimat for populationsstrukturen, dels et konservativt estimat for populationsstørrelsen. Denne nye tilgang betyder, at det er muligt via en målrettet vandprøveindsamling at benytte eDNA-analyser, der også delvist opfylder de kriterier, der foreligger omkring populationsstørrelser til vurdering af gunstig bevaringsstatus ifølge habitatdirektivet. Dette kræver verifikation samt kalibrering med eksisterende metoder til overvågning, fx skibs- og flytællinger af arten.

Som nævnt for de andre bilagsarter bør der i forbindelse med en eventuel implementering af metoden tages højde for de usikkerheder, der forekommer på de forskellige trin – dvs. i felten, i laboratoriet og i modelleringen af forekomst og udbredelse (Ficetola m.fl. 2016, Guillera-Arroita 2017, Guillera-Arroita m.fl. 2017, Brost m.fl. 2018).

Sammenfatning

Selve forekomsten af marsvin i et givet område kan påvises med eDNA, men metoden skal udvikles, hvis den skal være lige så effektiv som benyttelse af passive lyttestationer. Måltrettede eDNA-indsamlinger med vandprøver fra marsvine-”spor” kan tilvejebringe populationsgenetiske informationer om arten, hvilket ellers er vanskeligt at opnå fra levende individer. Denne metode skal udvikles og verificeres før brug (tabel 3 - http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

4.2 Padder og krybdyr

Markfirben, *Lacerta agilis*

Formål med overvågning

“Formålet med overvågningen er at indsamle data, der kan danne grundlag for en vurdering af arternes bevaringsstatus i henhold til habitatdirektivet. Dette indebærer i første omgang ekstensiv overvågning af artens forekomst og udbredelse” (Søgaard & Adrados 2014).

Overvågningsmetode i NOVANA

Markfirben er tilknyttet åbne og varme, solrige lokaliteter som grusgrave, jernbane- og vejskråninger, diger, heder, overdrev, strandenge, kystskrænter, klitter og sandede bakkeområder, hvor de kønsmodne og juvenile individer registreres, når de solbader. Forekomsten registreres i 10x10 UTM-kvadrater, og der noteres, hvilke de forekommer i, forsvinder fra og indvandrer til (Søgaard & Adrados 2014).

Overvågning på basis af eDNA

Markfirbenets levevis og foretrukne habitat gør det formentlig meget vanskeligt at benytte eDNA til at påvise forekomsten. Sandet jord har store porestørrelser, hvorfor DNA formodentlig vil blive vasket ud eller ned i den sandede jord. Andersen m.fl. (2011) påviste i et forsøg med eDNA-metabarcoding af vertebrater fra jordprøver, at mængden af DNA i jord afhang af jordens tekstur og struktur, dvs. indholdet og mængden af sand, silt og ler, samt hvordan jordpartiklerne er fordelt. Sandede jorde har store partikler og store porestørrelser, så vandet lettere løber ned i grundvandet sammenlignet med lerede jorde. Det betyder, at det afsatte DNA fra markfirben sandsynligvis vil blive udvasket, med mindre det er hele stykker af ham. Laboratorieteknik er det muligt at udvikle artsspecifikke primere ud fra publicerede primere til opformering af CytB- (Kalyabina m.fl. 2001, Böhme m.fl. 2007, Andres m.fl. 2014), CR- (kontrolregionen, D-loopen) (Andres m.fl. 2014) og COI-generne i mitokondriet (Andres m.fl. 2014) samtidig med en sensitiv metode (qPCR) til selve påvisningen. Der er også udviklet artsspecifikke microsatellit-primere til individbestemmelse/DNA-profiler (Gullberg m.fl. 1997), men givet den forventede meget lave eDNA-koncentration vil det være usandsynligt at opformere disse fra eDNA ekstrakter, der er fundet positive for markfirben. Der er ikke fundet dokumentation for brugen af eDNA til hverken bestemmelse af artens tilstedeværelse eller DNA-profiler. Metoden bør udvikles og verificeres i felten, og usikkerhedsestimater skal inkluderes som beskrevet for andre bilagsarter.

Sammenfatning

Det vurderes meget vanskeligt at benytte eDNA til påvisning af markfirben i overvågningen grundet dets levevis. Mediet skulle være sand indsamlet i udvalgte områder, hvorfra det er vanskeligt at ekstrahere eDNA. Metoden vil kræve udvikling af både indsamlingsdesign og primere samt verifikation (tabel 3 - http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

Padder

Formål med overvågning

Formålet med overvågningen er at indsamle data om arternes forekomst og udbredelse” (Søgaard m.fl. 2018a).

Overvågningsmetode i NOVANA

”Den tekniske anvisning omfatter overvågning af padder omfattet af habitatdirektivets bilag II, IV og V. Der er tale om i alt otte paddearter:

- Spidssnudet frø, *Rana arvalis*
- Springfrø, *Rana dalmatina*
- Butsnudet frø, *Rana temporaria*
- Grønbroget tudse, *Bufo variabilis* (*Bufo viridis*)
- Strandtudse, *Epidalea calamita* (*Bufo calamita*)
- Løvfrø, *Hyla arborea*
- Løgfrø, *Pelobates fuscus*
- Stor vandsalamander, *Triturus cristatus*.

Forekomsten af padderne undersøges i 10x10 UTM-kvadrater, og det registreres, hvilke de forekommer i, forsvinder fra og indvandrer til. Overvågningen er opdelt, så de brune frøer (springfrø, spidssnudet og butsnudet frø) samt stor vandsalamander eftersøges i samme vandhuller på bestemte tidspunkter af året. Fælles for alle otte paddearter er, at eftersøgningen foregår ved ketsjefangst af haletudser og larver og/eller lytning efter kald (Søgaard m.fl. 2018a).

Overvågning af padder på basis af eDNA

Flere studier har benyttet eDNA til at undersøge biodiversiteten i søer og vandløb. Disse har blandt andet vist, at det er muligt ved hjælp af eDNA metabarcoding at påvise flere arter samtidigt, fx mange forskellige paddearter. Dette er også en forudsætning for, at en eventuel eDNA-metode er anvendelig i den danske paddeovervågning. Den tekniske anvisning forudsætter, at brune frøer og stor vandsalamander overvåges i de samme vandhuller på bestemte tidspunkter, der er fastsat ud fra de specifikke yngleperioder for arterne. De øvrige arter (løvfrø, løgfrø, grønbroget tudse og strandtudse) kan principielt eftersøges på samme tid som de brune frøer og stor vandsalamander, da der ifølge den tekniske anvisning er et tidsmæssigt overlap i det eftersøgningsvindue, der er angivet, svarende til de to første uger i juni (Søgaard m.fl. 2018a). Grundet forskellen i deres ynglehabitat og habitatkrav samt udbredelse i landet vil det være meget lidt sandsynligt, at alle otte arter vil forekomme i samme vandhul.

For de brune frøer og stor vandsalamander har Thomsen m.fl. (2012) påvist spidssnudet frø og butsnudet frø ved eDNA metabarcoding med primere, der opformerede et fragment af 12S rRNA-genet i mitokondriet. Stor vandsalamander kunne derimod ikke påvises med disse primere i eDNA metabarcoding. I stedet blev der udviklet en artsspecifik primer (CytB) til stor vandsalamander,

der derefter blev påvist med kvantitativ PCR (qPCR) (tabel 2). Stor vandsalamander er senere i 2018 blevet påvist med eDNA metabarcoding ved hjælp af nyudviklede primere, der ligeledes opformerer en del af 12S rRNA i mitokondriet (Harper m.fl. 2019a). UK er det eneste land, der til dato har accepteret, at tilstedeværelsen af stor vandsalamander bliver bestemt med qPCR-analyse af eDNA som et led i den nationale overvågning af arten (Biggs m.fl. 2015).

Thomsen m.fl. (2012) opfangede ikke løgfrø-DNA i deres DNA metabarcoding-studie, der ellers påviste flere arter med de samme primere. Derfor benyttede de også her artsspecifikke primere og qPCR til påvisningen af arten. Der er til dato ikke publiceret studier, hvor løgfrø er påvist i et eDNA-metabarcoding-studie.

Strandtudse er påvist med eDNA og qPCR med artsspecifikke 16S rRNA-primere (Blom 2018), og Valentini m.fl. (2016) påviste den i et eDNA metabarcoding-studie, hvor det var 12S rRNA-sekvenserne, der blev opformeret (tabel 2).

Der er ikke publiceret studier, der har benyttet eDNA til at påvise forekomsten af de sidste to paddearter, løvfrø og grønbroget tudse. Der forefindes primere for COI-, COIII-, CytB- og RAG 1-generne (Stöck m.fl. 2008) samt for 12S rRNA og 16S rRNA (Gvoždick m.fl. 2010) for løvfrø (tabel 2), der kan videreudvikles til artsbestemmelse med qPCR og sandsynligvis også til påvisning med eDNA metabarcoding. For den grønbrogede tudse findes der primere for 16S rRNA-genet (Igawa m.fl. 2006) samt CytB-genet og D-Loop (Degani m.fl. 2013) og for 12S rRNA-genet og D-loop (Özdemir m.fl. 2014), der vil kunne benyttes dels til artsbestemmelse, dels i et eDNA metabarcoding-studie efter en videreudvikling af de beskrevne metoder i de nævnte artikler.

Lacoursière-Roussel m.fl. (2016) kunne påvise otte canadiske frø- og tudsearter i vandprøver indsamlet fra søer og floder ved eDNA metabarcoding og en kombination af flere primere, der opformerede sekvenser af COI- og CytB-generne på mitokondriet. Lopes m.fl. (2017) påviste forekomsten af de ni mest almindeligt forekommende paddearter i vandløb/floder i en brasiliansk atlantisk tropeskov med eDNA metabarcoding baseret på 12S rRNA-primere udviklet af Valentini m.fl. (2016).

Sammenfatning

Resultaterne af de forskellige både nationale og internationale studier viser, at det er muligt at benytte eDNA metabarcoding til overvågningen af padder. Det vurderes, at eDNA metabarcoding/qPCR-påvisning af enkeltarter vil være en effektiv overvågningsmetode til bilag II- og IV-paddearterne efter en videreudvikling af de laboratorietekniske metoder. Samtidig skal der inkluderes usikkerhedsestimater, der beskriver kontamineringsrisici i felten, under DNA ekstraktion og ved opsætning af PCR ved at medtage mindst en negativ kontrol (en prøve uden tilsætning af ekstraheret DNA) for hver ottende prøve eller mere. Usikkerhedsestimaterne for de forskellige trin inkluderes i modelleringen af selve forekomsten og udbredelsen som udviklet og beskrevet hos Ficetola m.fl. (2016), Guillera-Aroita (2017), Guillera-Aroita m.fl. (2017), Brost m.fl. (2018) og Cristescu & Hebert (2018). Padderne vil således kunne påvises med eDNA metabarcoding fra vand, hvor arterne bliver påvist samtidigt. Det kræver, at metoden og primerne videreudvikles/optimeres og verificeres før en mulig implementering i overvågningen (tabel 3 - http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

Tabel 2. Padde eDNA metabarcoding-pakke.

Art	Latinsk navn	Påvist	Medie	Primer	Reference
Spidssnudet frø	<i>Rana arvalis</i>	x metabarcoding	vand	amphibie primer (CytB)	Thomsen m.fl. 2012
		x	æg	ND1	Bonk m.fl. 2012
Springfrø	<i>Rana dalmatina</i>	x	æg	ND1	Bonk m.fl. 2012
		x metabarcoding	vand	12S rRNA	Valentini m.fl 2016
Butsnudet frø	<i>Rana temporaria</i>	x metabarcoding	vand	amphibie primer (CytB)	Thomsen m.fl. 2012
		x metabarcoding	vand	12S rRNA	Harper m.fl. 2019a
		x	æg	ND1	Bonk m.fl. 2012
Grønbroget tudse	<i>Bufo variabilis (Bufo viridis)</i>		væv, cPCR	16S rRNA, CytB, D-Loop, COI, , 12S rRNA,	Igawa m. fl. 2006, Degani m.fl. 2013, Özdemir m.fl. 2014
Strandtudse	<i>Epidalea calamita (Bufo calamita)</i>	x qPCR	vand	16S rRNA	Blom 2018
		x metabarcoding	vand	12S rRNA COI, COIII , CytB, RAG 1, 12S rRNA , 16S	Valentini m.fl 2016
Løvfør	<i>Hyla arborea</i>		væv cPCR	rRNA	Stöck m.fl. 2008, Gvozdick m.fl. 2010
Løgfør	<i>Pelobates fuscus</i>	x qPCR	vand	arstspecifik (CytB)	Thomsen m.fl. 2012
Stor vandsalamander	<i>Triturus cristatus</i>	x qPCR	vand	arstspecifik (CytB)	Thomsen m.fl. 2012
		x qPCR	vand	arstspecifik (CytB)	Biggs m.fl. 2015
		x qPCR	vand	arstspecifik (CytB)	Buxton m.fl. 2017
		x metabarcoding, qPCR	vand	12S rRNA og arstspecifik (CytB)	Harper m.fl. 2019a

qPCR= kvantitativ PCR

cPCR= konventionel

PCR

Klokkefrø, *Bombina bombina*

Overvågningsmetode i NOVANA

”Intensiv overvågning omfatter registrering af artens bestandsstørrelse og udbredelse. Metoden baserer sig på lytning og optælling af kvækkende haner af klokkefrø” (Søgaard & Fog 2018).

Ifølge den tekniske anvisning overvåges arten på kendte /potentielle og nye lokaliteter, der ligger i tilknytning til de kendte. De nye lokaliteter omfatter også udsætningslokaliteter. Det skal tilstræbes, at så mange som muligt af vandhullerne med forekomst eftersøges ved udvælgelsen af lokaliteter, og for at påvise spredning af arten foretages stikprøver på lokaliteter, der er tilgrænsende de kendte lokaliteter. Selve eftersøgningen foregår på bestemte tidspunkter af året (Søgaard & Fog 2018).

Overvågning af klokkefrø med eDNA

Klokkefrø kan som de andre paddearter også overvåges med eDNA fra vandprøver. Der er ikke publiceret artikler, der beskriver en qPCR-metode til påvisning af arten, men der er flere fylogeografiske og populationsgenetiske undersøgelser af klokkefrø baseret på forskellige sekvenser i dels mitokondriet til artsbestemmelse, dels på artsspecifikke microsatellit-markører til individbestemmelse. Vörös m.fl. (2006) har benyttet variation i nicotinamide adenine dinucleotid dehydrogenase subunit 4- (NADH4) og Cytochrome oxidase 1- (COX1) generne samt flere sekvensfragmenter omkring disse gener i mitokondriet til artsbestemmelse. Hawlitschek m.fl. (2016) benyttede cytochrome oxidase 1 (COI) til dette, Hofman & Szymura (2007) og Fijarczyk m.fl. (2011) benyttede CytB-generne, mens Dolgener m.fl. (2014) benyttede variation i kontrolregionen i mitokondriet. Samtidig har Dolgener m.fl. (2014) benyttet seks microsatellit markører (Hauswaldt m.fl. 2007) udviklet specifikt til arten til individbestemmelse. Ud over disse seks har Stukas & Tiedemann (2006) udviklet yderligere syv polymorfe microsatellitmarkører. Microsatellitmarkører, der sidder på cellens nucleære DNA, forventes at være meget vanskelige at få til at fungere ved eDNA fra vandprøver grundet lav koncentration og formodentlig nedbrudt DNA, som forventes at være tilfældet for vandprøver taget i udkanten af dens udbredelsesområde og i områder med små bestandstætheder. Tages vandprøverne derimod i klokkefrøernes kerneområde, hvor der er en høj bestandstæthed, forventes eDNA'et at forefindes i højere koncentrationer og i længere fragmenter, hvorfor det ikke kan afskrives, at microsatellitmarkørerne ville virke. Derved vil det være muligt at få bestandsestimater ved at foretage fangst-gefangst-analyser baseret på eDNA-vandprøver taget på forskellige tidspunkter. Dette skal udvikles, men vil formodentlig være muligt. Problemerne med flere af selve sekvensfragmenter beskrevet ovenfor til artsbestemmelse er, at de er fra ~357bp til ~800 bp lange, hvilket sandsynligvis er for langt til, at primerne kan benyttes i eDNA-studier.

Det betyder, at der ved brug af eDNA-metoden efter udvikling ville kunne påvises tilstedeværelse eller ikke-tilstedeværelse af arten, mens det formodentlig vil være meget vanskeligt at få et kvantitativt estimat for antallet af individer i vandhullerne i kanten af udbredelsesområdet. I kerneområdet ville det formodentlig være muligt at udvikle metoden, så den også er kvantitativ, ved brug af de beskrevne microsatellitmarkører. Som for de andre bilagsarter skal usikkerhederne ved eDNA-metoden inkorporeres på alle niveauer for til sidst at blive benyttet i en evt. modellering af forekomsten.

Sammenfatning

Det vurderes, at det kunne være fordelagtigt at benytte eDNA som screeningsværktøj i udkanten af artens udbredelsesområde, da den konventionelle metode afhænger af, at der sidder hanner og kalder. Det vil eventuelt være muligt at udvikle en eDNA-baseret metode, der kan bruges til individbestemmelse og dermed efter fangst-gefangst-analyser og modellering til vurdering af bestandsstørrelser i kerneområdet. Udvikles artsbestemmelsesmetoden og metoden til individbestemmelse, ville de være uafhængige af vejr og temperatur i modsætning til den konventionelle metode. Artsbestemmelsesmetoden er udviklet til *Bombina variegata pachypus* af Salvavidio m.fl. (2014) (tabel 3 - http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

4.3 Fisk

Dyndsmerling, *Misgurnus fossilis*

Formål med overvågning

”Formålet med overvågningen er at indsamle data om artens samlede forekomst (nationale udbredelse), herunder dens forekomst i de habitatområder, hvor den er en del af udpegningsgrundlaget” (Wiberg-Larsen m.fl. 2013a).

Overvågningsmetode i NOVANA

Dyndsmerling forekommer i både søer og vandløb og især i områder med blød bund og tæt vegetation (vandplanter) med svag eller ingen strøm. Den er meget sjælden i Danmark og forekommer kun på meget få lokaliteter. Artens bevaringsstatus vurderes/overvåges ved at registrere ændringer i udbredelsen ud fra kendte lokaliteter og tilstødende potentielle lokaliteter. Arten kan formodentlig ikke spredes fra et vandsystem til et andet ved egen hjælp, hvorfor potentielle lokaliteter må være forbundet til en kendt lokalitet via en passabel ferskvandsforbindelse, før det kan tænkes, at arten forekommer det pågældende sted. Den kan også spredes ved menneskets indvirkning. Selve påvisningen foregår ved elektrofiskning. Udbredelsen afrapporteres for 10 x 10 UTM-kvadrater hvor den forekommer, er forsvundet fra eller indvandret til (Wiberg-Larsen m.fl. 2013a).

Overvågning på basis af eDNA

Sigsgaard m.fl. (2015) påviste forekomsten af dyndsmerling med eDNA. De indsamlede vandprøver til eDNA-analyser på 10 lokaliteter dels i Sølsted Mose, DK, hvor arten er til stede, og dels på historiske lokaliteter, hvor arten har været til stede i begyndelsen af det tyvende århundrede. I alt blev der indsamlet vandprøver fra 54 stationer dækkende de 10 lokaliteter. Påvisningen af arten blev foretaget med qPCR-opformering og artsspecifikke CytB-primere. Arten blev påvist på fem stationer, hvoraf den ene lå i vådområdet Magisterkogen, hvor arten ikke er observeret siden 1995. Den konventionelle overvågningsmetode foretaget nogle år før eDNA-studiet påviste kun dyndsmerling i Sølsted Mose, hvor eDNA-metoden også havde detekteret arten. eDNA-metoden havde her en højere detektionssandsynlighed sammenlignet med den konventionelle metode, hvilket også er vist for andre fiskearter (Dejean m.fl. 2012, Jerde m.fl. 2011). Sigsgaard m.fl. (2015) estimerede også arbejdstidsforbruget for begge metoder udført som beskrevet i studiet fra 2015. For den konventionelle metode blev den estimeret til ~8100 USD (52.938 DKR), og for eDNA metoden (felt- og laboratoriarbejde) blev den estimeret til ~2750 USD (17.973 DKR). Hertil skal der lægges driftsudgifter til forbrug af reagenser m.m. på ~1500 USD (9.803 DKR). Andre studier har ligeledes påvist, at eDNA-metoden med den højere detektionssandsynlighed er mindre

omkostningstung sammenlignet med elektrofiskning (Biggs m.fl. 2015, Lugg m.fl. 2018). På denne baggrund foreslår Sigsgaard m.fl. (2015), at eDNA-metoden kan benyttes som et screeningsværktøj til at udpege områder, hvor den konventionelle metode efterfølgende med større sandsynlighed vil kunne påvise artens fysiske tilstedeværelse.

Undersøgelsen blev udført i 2015 og var baseret på de state-of-the-art metoder, der var gældende på dette tidspunkt. Kontamineringsrisici blev fulgt med blanke kontroller ved feltindsamlingen og i laboratoriet, men disse blev ikke kvantificeret. Dette vil være nødvendigt i forbindelse med en evt. implementering i forbindelse med overvågningen. Her bør usikkerhederne, der er forbundet med metoden på de forskellige niveauer (feltindsamling, DNA-ekstraktion, antal negative kontroller i forbindelse med PCR-opsætning m.m.), inkorporeres i den endelige modellering af forekomst og udbredelse (Ficetola m.fl. 2016, Guillera-Arroita 2017, Guillera-Arroita m.fl. 2017, Brost m.fl. 2018, Cristescu & Hebert 2018).

Sammenfatning

Det vurderes, at eDNA fra vandprøver indsamlet i bestemte områder og bestemte steder i vandsøjlen kan benyttes som screeningsværktøj for dyndsmerling. Metoden skal verificeres yderligere med den konventionelle overvågning før implementering i overvågningsprogrammet. Den kan ikke erstatte den konventionelle metode fuldstændigt, da der med jævne mellemrum bør foretages fiskning efter arten for at verificere dens forekomst (tabel 3 - http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

Pigsmerling, *Cobitis taenia*

Formål med overvågning

”Formålet med overvågningen er at indsamle data om artens samlede forekomst (nationale udbredelse), herunder dens forekomst i de habitatområder, hvor den er en del af udpegningsgrundlaget” (Wiberg-Larsen & Johansson 2013b).

Overvågningsmetode i NOVANA

Pigsmerling forekommer i vådområder herunder søer og vandløb og gerne i områder med blød bund og tæt vegetation (vandplanter) (Wiberg-Larsen & Johansson 2013). Pigsmerling overvåges ved registrering af ændringer i udbredelsesområdet fra kendte lokaliteter samt tilstødende potentielle lokaliteter. Populationsstørrelsen overvåges ikke. Det antages, at arten kun kan spredes til potentielle lokaliteter, der er forbundet til en kendt lokalitet via en pas-sabel ferskvandsforbindelse, ved menneskets indvirkning eller med fugle. Derfor eftersøges arten i kendte områder samt områder, der er forbundet med disse i overvågningen. Selve påvisningen foregår ved elektrofiskning. Udbredelsen af-rapporteres i 10 x 10 UTM-kvadrater, hvor den forekommer, er forsvundet fra eller indvandret til (Wiberg-Larsen & Johansson 2013b).

Overvågning på basis af eDNA

Pigsmerling er som dyndsmerling en oplagt art, for hvilken eDNA-metoden kunne benyttes til påvisning. Der er dog ikke fundet nogen dokumenterede studier. Der eksisterer nogle enkelte studier af artens fylogeografiske udbredelse og slægtskab baseret på variation i CytB-genet, der er ca. 1150bp langt (Culling & Côte 2005, Culling m.fl. 2006, Rahbari m.fl. 2017). Laboratorieteknik vil det sandsynligvis være muligt på baggrund af disse CytB-sekvenser at udvikle primere, der opformerer en kortere sekvens, der kan benyttes til en

artsspecifik påvisning med eDNA- og qPCR-metoden. Dernæst skal der udvikles et indsamlingsdesign, der afspejler områderne, hvor arten forekommer, og i nærtliggende områder, hvor den forventes at forekomme. Metoden ville som for dyndsmerring kunne benyttes som et screeningsværktøj til at afgrænse områder, hvor den konventionelle metode med elektrofiskning kunne foregå. Som for de andre bilagsarter skal usikkerhederne ved eDNA-metoden inkorporeres på alle niveauer for til sidst at blive benyttet i en evt. modellering af forekomsten.

Sammenfatning

Det vurderes, at eDNA fra vandprøver eller sedimentprøver indsamlet i områder, hvor arten formodes at forekomme, kan benyttes som screeningsværktøj for pingsmerling. Metoden skal udvikles og verificeres. Den kan evt. benyttes som screeningsværktøj, hvorefter der kan elektrofiskes efter arten (tabel 3 - http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

Havlampret, *Petromyzon marinus*, flodlampret, *Lampetra fluviatilis*, og bæklampret, *Lampetra planeri*

Formål med overvågning

”Formålet med overvågningen er at indsamle data om arternes samlede nationale udbredelse i ferskvand (og evt. ændringer i denne), herunder deres forekomst og status i de habitatområder, hvor de er en del af udpegningsgrundlaget. For de migrerende arter er der tale om kortlægning af deres muligheder for reproduktion i ferskvand, mens de under deres liv i de marine områder ikke overvåges specifikt. Denne tekniske anvisning er derfor specifikt rettet mod de områder, hvorfra arterne er kendt, men sigter også delvist mod at afdække mulige forekomster uden for den kendte udbredelse” (Wiberg-Larsen 2014).

Overvågningsmetode i NOVANA

De tre arters bevaringsstatus overvåges ved at monitere deres forekomst og ikke deres populationsstørrelser. Hav- og flodlampret er begge migrerende arter, der gyder i ferskvand, hvorefter de migrerer til havet. Det betyder, at de forekommer enten som larver eller som opgangsfisk, der skal gyde, i vandløbene. Havlampret kan registreres både som larve og som gydende fisk, mens flodlampretten kun registreres som gydende fisk, da det ikke er muligt at skelne dens larver fra bæklampretens larver. Bæklampretten migrerer ikke, og dens larver findes året rundt, mens voksne fisk kun forekommer i forbindelse med gydning. Det er larverne fra bæklampret, der monitoreres ved ketsjefangst, selv om de ikke kan skelnes fra flodlampretens larver. Bæklampret forekommer til sammenligning med flodlampret i mindre vandløb (Wiberg-Larsen 2014).

Overvågning på basis af eDNA

Gustavson m.fl. (2015) har udviklet en artsspecifik qPCR-metode til at påvise havlampret og ørred (*Salmo trutta*) i vandløb. eDNA-metoden er baseret på variation i en sekvens i cytochrome oxidase 1 (COI). De demonstrerede ved hjælp af vandprøver fra vandløb med kendt forekomst af arterne samt vandløb, hvor arterne ikke forekom, at det var muligt at påvise arterne, og bekræftede forekomsten med en konventionel metode: snorkling. Urdaci m.fl. (2014) har udviklet en metode indebærende indledningsvist PCR-opformering af en CytB-sekvens fra væv, hvorpå produktet efterfølgende blev skåret med et restriktionsenzym, der gav to bånd med forskellig basepar-længde, afhængigt af om det var havlampret eller lampret spp. Det var ikke muligt at skelne mellem flod- og bæklampret med denne metode, der var baseret på indfangning

af lampretterne og dermed ikke eDNA. Til eDNA-påvisning benyttes sædvanligvis meget kortere sekvenser på ca. 70-300 basepar, hvilket reducerer den taksonomiske opløsning. Flod- og bæklamprettens fylogenetiske slægtskab, der er baseret på både mitokondriesequenser og markører i kerneDNA, har vist, at det er meget vanskeligt at finde artsspecifikke genetiske forskelle (Schreiber & Engelhorn 1998, Docker m.fl. 1999, Espanhol m.fl. 2007, Blank m.fl. 2008, Pereira m.fl. 2011, Hume 2013). Dette kan tyde på, at flod- og bæklampret måske burde defineres som økolyper frem for arter (Zancolli m.fl. 2018). Zancolli m.fl. (2018) downloadede og analyserede alle mtDNA- og kerneDNA-sekvenser for flod- og bæklampret i GenBank-databasen for at identificere en sekvens/region, der genetisk adskilte de to arter, men uden held. Rougemont m.fl. (2017) har i et genomisk studie påvist, at de to arter har været adskilt geografisk i historisk tid. Det observerede genflow mellem arterne er etableret for nylig gennem sekundær kontakt, og derfor er der kun meget få genetiske forskelle mellem de to økolyper (Rougemont m.fl. 2017). De påviste 40 variable steder på genomet, der kunne identificere henholdsvis flodlampret og bæklampret. Disse data er endnu ikke tilgængelige, og yderligere er der endnu ikke et eDNA-studie, der har benyttet SNP's (single nucleotide polymorfi) kerneDNA til at påvise arter. Dette skal undersøges og udvikles, såfremt metoden skal benyttes. Normalt benytter eDNA-undersøgelser markører, der sidder i mitokondrierne til at påvise arter, da der findes mange flere mitokondrier/kerne i en celle, der normalt kun har én kerne. Zancolli m.fl. (2018) foreslår som alternativ en qPCR-baseret metode med et primer-sæt, der påviser flod- og bæklampret samtidigt, og som bør sammentænkes med Gustavson m.fl.'s (2015) metode til påvisning af havlampret. Selve udviklingen og brugen af eDNA-metoden bør foregå efter samme beskrivelser og forbehold som beskrevet for fx odderen.

Sammenfatning

Det vurderes, at eDNA fra vandprøver kan benyttes til at skelne havlampret fra flod- og bæklampret. Metoden skal udvikles og verificeres. Muligvis kan SNP-markører benyttes til at skelne mellem flod- og bæklampret, men metoden er under udvikling og skal senere verificeres (tabel 3 - http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

4.4 Dagsommerfugle og guldsmede

Hedepletvinge, *Euphydryas aurinia*

Formål med overvågning

"Formålet med denne tekniske anvisning er at angive en standardiseret og reproducerbar metode til at gennemføre overvågning og indsamle data om artens forekomst og udbredelse" (Søgaard m.fl. 2019).

Overvågningsmetode i NOVANA

"Overvågningen baserer sig på en totaloptælling af larvespind i tilknytning til værtsplanten, djævelsbid. Denne parameter indikerer samtidigt, at arten yngler på stedet" (Søgaard m.fl. 2019). Arten lever i overgangszonen mellem fugtige og tørre arealer på fx fugtige heder, tørvemoser, ikke-gødskede enge, dvs. på magre jorde, hvor værtsplanten djævelsbid, *Succisa pratensis*, vokser. Her klækkes den voksne sommerfugl i maj-juni. De flyver ~3 uger, hvorefter de lægger æg på undersiden af djævelsbidbladene, og larverne klækkes ~2-3 uger senere. Larverne danner spind på værtsplantens blade, som de æder, hvorefter de flytter til næste blad. Omkring august-september danner de et spind nede i bunden af vegetationen, hvor de overvintrer (Søgaard m.fl. 2019).

Overvågning på basis af eDNA

Hedepletvinges levevis gør, at den afsætter meget lidt DNA i fx jord og vand. Eventuelt afsat DNA forventes at være meget lokalt, dvs. tæt på værtsplanten. Skulle man forsøge at påvise arten med eDNA, kunne det være fra værtsplanten, jord eller vand indsamlet meget lokalt og efter et omhyggeligt tilrettelagt indsamlingsdesign. Joyce & Pullin (2001) benyttede blandt andet variationen i CytB-genet (cytochrom B) til analyse af populationsstruktur, og Korb m.fl. (2016) benyttede COI-primere til at identificere populationer af arten. Zimmermann m.fl. (2000) benyttede både COI- (600bp), ND1- (NADH dehydrogenase, subunit 1, 490bp) og 16s RNA- (478-483bp) gensekvenser i mitokondriet til en fylogenetisk analyse af Euphydryas-arter. Dette vil sige, at både CytB-primere, COI-primere og ND1-primere eller 16S rRNA-primere kan benyttes til at opformere sekvenser af disse gener i mitokondriet til artsbestemmelse. Det er formentlig nødvendigt med en modifikation af primerne, så det bliver kortere DNA-fragmenter, der opformeres, da eDNA er nedbrudt i fragmenter af korte sekvenser. Samtidig skal der benyttes en mere sensitiv metode, qPCR, til at påvise eDNA-fragmenter, da disse findes i meget lave koncentrationer. Der er udviklet artsspecifikke microsatellitmarkører, der kan benyttes til individbestemmelse/DNA-profiler (Sigaard m.fl. 2008, Smee m.fl. 2013). Disse forventes vanskelige at benytte i forbindelse med eDNA fra jord. Der er ikke fundet dokumentation for brugen af eDNA til hverken bestemmelse af forekomst eller DNA-profiler. Metoden bør udvikles og verificeres i felten, og usikkerhedsestimater skal inkluderes som beskrevet for andre bilagsarter. Såfremt metoden kan fungere, vil den kunne benyttes i et bredere tidsinterval sammenlignet med den beskrevne konventionelle metode.

Sammenfatning

Det vurderes vanskeligt at benytte eDNA til påvisning af hedepletvinge i overvågningen grundet dens levevis. Mediet skulle være jord eller planter indsamlet i udvalgte områder. Metoden vil kræve udvikling af både indsamlingsdesign og primere samt verifikation (tabel 3 – http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

Sortplettet blåfugl, *Maculinea arion*

Formål med overvågning

“Den ekstensive overvågning er overvågning af artens udbredelse, og det registreres derfor primært, om arten er til stede eller ej på lokaliteten, men i dette tilfælde også om arten yngler på lokaliteten og/eller om der er ynglemuligheder til stede i form af værtsmyrer og -planter.” (Søgaard & Helsing 2017)

Overvågningsmetode i NOVANA

I Danmark forekommer sortplettet blåfugl kun på Møn. Arten eftersøges i flyvetiden. Her registreres flyvende individer, hvor æglæggende hunner, larver samt hanner, der tiltrækkes af alt blåt, registreres. Hunnerne lægger æg på værtsplanterne timian (*Thymus sp.*) og merian (*Origanum vulgare*). Larverne fouragerer på blomsterne, og på et tidspunkt efter ca. 2-3 uger falder de til jorden, hvor de bliver indsamlet af hedestikmyre (*Myrmica sabuleti*), der transporterer larverne til myreboet. Her parasiterer de på myrelarverne til det følgende forår, hvor de forpupes og klækkes som sommerfugle sidst i juni til først i juli (Søgaard & Helsing 2017).

Overvågning på basis af eDNA

Artens levevis gør det vanskeligt at eftersøge den med eDNA. Mediet, hvorfra den evt. skulle eftersøges, kunne være jord eller værtsplanterne timian og merian. Jordprøver skulle udtages tæt omkring værtsplanterne efter et omhyggeligt tilrettelagt indsamlingsdesign. Der forefindes COI-primere (~1420bp, Ugelvig m.fl. 2011), der kan benyttes til artsbestemmelse efter videreudvikling af en qPCR-metode og et kortere, men stadig informativt DNA-fragment, der kan bestemme arten. Der er flere populationsgenetiske undersøgelser af arten, der fx fokuserer på den genetiske diversitet eller spredning og genflow mellem populationer, hvor der er benyttet artsspecifikke microsatellitmarkører til individbestemmelse/DNA-profiler (Ugelvig m.fl. 2011, Ugelvig m.fl. 2012). Disse markører vil formodentlig være vanskelige at opformere i eDNA fra jordprøver. Der er ikke fundet dokumentation for brugen af eDNA til hverken bestemmelse af artens tilstedeværelse eller af dens DNA-profiler. Før brugen af eDNA til dokumentation af forekomst bør metoden udvikles og verificeres i felten. eDNA-metoden kan benyttes i et længere tidsinterval end den nuværende konventionelle metode, der skal udføres på et bestemt tidspunkt af året. Der er tilknyttet de samme krav til eDNA-metoden og den efterfølgende modellering samt inkludering af usikkerhedsestimater på alle niveauer som for de andre beskrevne bilagsarter.

Sammenfatning

Det vurderes vanskeligt at benytte eDNA til påvisning af sortpletet blåfugl i overvågningen grundet dens levevis. Mediet skulle være jord eller plantemateriale indsamlet i udvalgte områder. Metoden vil kræve udvikling både af indsamlingsdesign samt primere og verifikation (tabel 3 - http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

Natlyssværmer, *Proserpinus proserpina*

Formål med overvågning

”Formålet med overvågningen af natlyssværmer er at indsamle data om artens forekomst og udbredelse i Danmark. Da den ekstensive overvågning fokuserer på artens udbredelse, registreres det derfor primært, om arten er til stede eller ej på lokaliteten. Desuden omfatter overvågningen også registrering af relevante baggrundsoplysninger i det omgivende miljø” (Therkildsen m.fl. 2017).

Overvågningsmetode i NOVANA

Natlyssværmer er endnu kun påvist på tørre biotoper såsom sandede brakmarker og udyrkede sandede arealer og ruderaer i Danmark, men kan findes på en lang række andre biotoper som skovrydninger, skovrande samt langs vandløb og lysåbne lerholdige næringsrige arealer. Dens foretrukne værtsplanter er gederams og dueurt, mere sjældent natlys. Den overvåges ved lyslokning, eftersøgning af individer på værtsplanterne og af larver ved visuelt check samt ved nedbankning af værtsplanterne (Therkildsen m.fl. 2017).

Overvågning på basis af eDNA

Natlyssværmer afsætter meget lidt DNA grundet dens levevis. Som for sortpletet blåfugl kan den evt. eftersøges med eDNA fra jordprøver eller værtsplante efter et omhyggeligt tilrettelagt indsamlingsdesign. Jordprøverne kan evt. udtages i områder med kendt udbredelse omkring de forventede værtsplanter samt nærliggende områder, hvor arten kan forventes at forekomme. Der forefindes COI-primere fra et DNA barcoding-studie samt et fylogenetisk studie af arten (~500–658 bp, Hausmann m.fl. 2011, Mutanen m.fl. 2016). Disse

primere kan benyttes til artsbestemmelse efter videreudvikling af en qPCR-metode med et kortere DNA-fragment end det ~500-658 bp lange fragment.

Arten blev observeret første gang i Danmark i 2015 på Lolland og Falster (Therkildsen m.fl. 2017), og spørgsmålet er, om den har været til stede i DK før 2015 og blot er overset, eller om den er en ny art i DK. Er det sidste tilfældet, vil det være interessant at undersøge, hvorfra arten er indvandret. Dette vil være muligt med populationsgenetiske analyser, hvor der er indhentet prøver fra formodede basispopulationer.

Der er ikke fundet dokumenteret brug af eDNA til overvågning af arten og før en evt. artsspecifik påvisning af arten med eDNA, skal metoderne udvikles og verificeres i felten. Som for de andre bilagsarter er der tilsvarende krav til eDNA-metoden og den efterfølgende modellering, dvs. usikkerhedsestimater skal inkorporeres på alle niveauer.

Sammenfatning

Det vurderes vanskeligt at benytte eDNA til påvisning af natlyssværmer i overvågningen grundet dens levevis. Mediet skulle være jord indsamlet i udvalgte områder. Metoden vil kræve udvikling både af indsamlingsdesign samt primere og verifikation

(tabel 3 http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

Grøn kølleguldsmed, *Ophiogomphus cecilia*

Formål med overvågning

Overvågningen af grøn kølleguldsmed er en "ekstensiv overvågning af artens udbredelse, og det registreres derfor primært, om arten er til stede eller ej på lokaliteten, suppleret med hvor mange individer der eventuelt registreres ved eftersøgningen af arten" (Søgaard 2017).

Overvågningsmetode i NOVANA

Det er en art, der yngler i hurtigt strømmende og iltrige, rene vandløb, hvor den hovedsagelig forekommer i de nedre dele af å-systemerne (Søgaard 2017). Larverne lever nedgravet i bunden af vandløbet, mens de voksne befinder sig tæt på vandløbet (Søgaard 2017). Den registreres ved "eftersøgning/visuel observation af voksne individer i flyvetiden suppleret med eventuelle fund af exuvier (afskudte larvehude) som dokumentation for yngleforekomst. Det registreres, hvilke 10x10 UTM-kvadrater der er positive for arten, hvilke den er forsvundet fra, og hvilke den er indvandret til" (Søgaard 2017).

Overvågning på basis af eDNA

Grundet artens levevis, dels at voksne individer opholder sig ved vandløbene, dels at larverne er nedgravet i sedimentet, kan det forventes, at arten kan påvises i eDNA indsamlet via vandprøver eller sedimentprøver. Det har dog ikke været muligt at finde rapporter eller artikler, der har udviklet en eDNA-metode til at påvise arten. Primere til opformering af COI-, 12 S rRNA- og 16S rRNA-gener er publiceret i en fylogenetisk artikel (Ware m.fl. 2017). En afprøvning af disse primere og en efterfølgende videreudvikling af metoden i laboratoriet samt afprøvning i felten ville afgøre, om det er muligt at påvise arten med eDNA. Er forsøgene succesfulde, er det næste skridt at afprøve metodens begrænsninger som for alle andre arter, fulgt af modellering af usikkerheder m.m. på alle niveauer for at inkludere disse i modelleringen af forekomst som beskrevet for odder og andre arter.

Sammenfatning

Det vurderes, at eDNA fra vandprøver eller sedimentprøver indsamlet i udvalgte områder måske kan benyttes som screeningsværktøj. Metoden kræver dog udvikling af både indsamlingsdesign og primere samt verifikation (tabel 3 - http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

Grøn mosaikguldsmed, *Aeshna viridis*

Formål med overvågning

Overvågningen af grøn mosaikguldsmed er en "ekstensiv overvågning der fokuserer på artens udbredelse, og det registreres derfor primært, om arten er til stede eller ej på lokaliteten, suppleret med hvor mange individer der eventuelt registreres ved eftersøgningen" (Therkildsen 2018).

Overvågningsmetode i NOVANA

Grøn mosaikguldsmed yngler i vandhuller, søer, damme, moser og kanaler med forekomst af planten krebseklo (*Stratiotes aloides*), der benyttes til æglægning. Der er dog ikke en stringent symbiose mellem grøn mosaikguldsmed og krebseklo (Mogens Holmen pers. medd., Therkildsen 2018). Den registreres ved "eftersøgning/visuel observation af voksne individer i flyvetiden suppleret med eventuelle fund af exuvier (afskudte larvehuder) som dokumentation for yngleforekomst" (Therkildsen 2018). Det registreres, hvilke 10x10 UTM-kvadrater, der er positive for arten, hvilke den er forsvundet fra, og hvilke den er indvandret til (Therkildsen 2018).

Overvågning på basis af eDNA

Da grøn mosaikguldsmed er tilknyttet vand og fortrinsvis lægger æg på krebseklo i vandet, og da larverne forefindes i vandet efter klækning, kan det forventes, at arten kan påvises i eDNA indsamlet via vandprøver, evt. udtaget mellem forekomst af krebseklo. Der er publiceret primere til opformering af COI (Folmer m.fl. 1994) og rDNA (18S, ITS1,2, Dumont m.fl. 2007) i et fylogenetisk studie af Aeshnidae (Schneider m.fl. 2015). En videreudvikling af primerne i laboratoriet og afprøvning i felten ville afgøre, om det er muligt at påvise arten med eDNA baseret på disse markører. Herder m.fl. (2014) har påvist arten i et pilotprojekt med eDNA fra vandprøver, dog er selve primerne, der blev benyttet, ikke nævnt. I pilotprojektet viste eDNA metoden en detektionssandsynlighed på 78 % (N=9), hvilket blev baseret på antallet af vandhuller, hvor forekomsten af arten var kendt i forhold til antallet af vandhuller, hvor eDNA-metoden påviste den (Herder m.fl. 2014). Der var ikke inkluderet usikkerheder i forbindelse med eDNA-metoden. Forudsat ovennævnte forsøg er succesfulde, vil det næste skridt være at afprøve metodens begrænsninger som for alle andre arter, fulgt af modellering af usikkerheder m.m. på alle niveauer.

Sammenfatning

Det vurderes, at eDNA fra vandprøver indsamlet i udvalgte områder måske kan benyttes som screeningsværktøj. Metoden kræver dog udvikling både af indsamlingsdesign og primere samt verifikation (tabel 3 - http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

Stor kærguldsmed, *Leucorrhinia pectoralis*

Formål med overvågning

”Den ekstensive overvågning er overvågning af artens udbredelse, og det registreres derfor primært, om arten er til stede eller ej på lokaliteten suppleret med, hvor mange individer der eventuelt registreres ved eftersøgningen af arten” (Søgaard & Holmen 2017b).

Overvågningsmetode i NOVANA

Stor kærguldsmed er tilknyttet moser og små vandhuller, der er omgivet af hængesæk, hvilket besværliggør selve overvågningen af arten. Som for grøn kølleguldsmed eftersøges exuvier fra larverne, der lever i vandet, mens voksne individer observeres visuelt. Arten forventes at befinde sig i nærheden af mosen fra omkring midt i juni og frem. Det registreres, hvilke 10x10 UTM-kvadrater der er positive for arten, hvilke den er forsvundet fra, og hvilke den er indvandret til (Søgaard & Holmen 2017b).

Overvågning på basis af eDNA

Thomsen m.fl. (2012) påviste arten i eDNA fra ni ud af 11 vandhuller/moser med en artsspecifik qPCR-analyse, hvor en sekvens af COI i mitokondriet blev opformuleret. De komplementerede eDNA-metoden med den konventionelle metode beskrevet i den tekniske anvisning for at verificere anvendeligheden af eDNA.

Det vurderes, at den artsspecifikke påvisning med qPCR vil kunne benyttes som overvågningsmetode, men den konventionelle metode i det beskrevne studie fandt flere positive vandhuller/moser sammenlignet med eDNA-metoden. Metoden er ikke dokumenteret anvendt som overvågningsmetode i andre EU-lande. I tilfælde af at eDNA metoden indføres, bør den eksisterende laboratoriemetode udvides med monitorering af usikkerheden i forbindelse med kontamineringsrisici på alle niveauer, og disse usikkerhedsestimater bør inkluderes i modelleringen af artens forekomst som beskrevet for flere af de andre bilagsarter.

Sammenfatning

Det vurderes, at eDNA fra vandprøver indsamlet i udvalgte områder kan benyttes som screeningsværktøj. Metoden kræver yderligere verifikation før implementering i overvågningsprogrammet (tabel 3 - http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

4.5 Biller og mosskorpioner

Eremit, *Osmoderma eremita*, og Stellas mosskorpion, *Anthrenochernes stellae*

Formål med overvågning

”For begge arter gælder det, at overvågningen er ekstensiv, dvs. der registreres ændringer i deres udbredelse ved at monitere, hvor mange 10 x 10 UTM-kvadrater de forekommer i, forsvinder fra og indvandrer til” (Søgaard m.fl. 2015a, Søgaard m.fl. 2015b).

Overvågningsmetode i NOVANA

Eremit og Stellas mosskorpion bliver eftersøgt i hulheder med træsmuld i træer, stormfaldne træer samt nedfaldne grene på kendte og potentielle lokaliteter (Søgaard m.fl. 2015a, Søgaard m.fl. 2015b).

Overvågning på basis af eDNA

Da begge arter lever i træsmuld i hulheder i træer, der evt. kan findes på jorden under hulningerne, kunne eDNA fra arterne måske findes i dette træsmuld. Der er dog ikke fundet dokumentation for, at dette er muligt, eller at eDNA-metoden er forsøgt benyttet sammen med den konventionelle metode med henblik på verifikation. Der eksisterer primere, der opformerer en ~1550 bp lang skevens af COI (cytochrom oxidase I, Audisio m.fl. 2009), der kan benyttes til at artsbestemme eremit. Hendrich m.fl. (2015) benyttede andre COI-primere (CLepFolF, CLepFolR) til at opformere en ~300-500 bp lang sekvens til at artsbestemme eremit. Disse primere skal formodentlig udvikles, så et mindre DNA-fragment bliver opformeret, for at øge sandsynligheden for at påvise eremit fra smuldet.

Om disse primere også ville opformere DNA fra Stellas mosskorpion er uvist, da der så vidt vides ikke er foretaget DNA-undersøgelser af denne art. Der er ikke observeret sekvenser i NCBI-gendatabasen GenBank. Stellas mosskorpion tilhører chernetidae-familien, hvor der er foretaget enkelte fylogenetiske DNA-studier (eller barcoding) af nærtbeslægtede arter (Ohira m.fl. 2018) baseret på opformering med generelle COI-primere (Folmer m.fl. 1994). Disse primere ville formodentlig også kunne benyttes til artsbestemmelse af Stellas mosskorpion. Andre mere generelle insekt-COI-primere, der opformerer ~200bp af COI-genet (Zeale m.fl. 2011) til eDNA metabarcoding-studier af insektfaunaen kunne eventuelt også bruges.

Laboratorieteknisk vil det være muligt at udvikle et primersystem, der kan benyttes til at påvise forekomsten af begge arter ved hjælp af eDNA fra træsmuld, hvilket kræver en videreudvikling og verifikation af primersystemet/-systemerne. Dertil kommer usikkerhedsestimaterne, der skal inkluderes på de forskellige trin og til sidst i modelleringen af forekomst og udbredelse, som det er beskrevet tidligere.

Sammenfatning

Det vurderes vanskeligt, men ikke umuligt at benytte eDNA fra træsmuld som muligt screeningsværktøj til at påvise forekomsten af eremit og Stellas mosskorpion. Metoden kræver udvikling af primere til eremit og især Stellas mosskorpion, og dernæst skal metoden verificeres (tabel 3 - http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

Vandkalve: lys skivevandkalv, *Graphoderus bilineatus* og bred vandkalv, *Dytiscus latissimus*

Formål med overvågning

”Formålet med denne tekniske anvisning er at angive en standardiseret og reproducerbar metode til at gennemføre overvågning og indsamle data om arternes forekomst og udbredelse. Denne tekniske anvisning omfatter overvågning af danske vandkalve omfattet af habitatdirektivets bilag II og IV. Der er tale om to arter: lys skivevandkalv (*Graphoderus bilineatus*) (bilag II og IV) og bred vandkalv (*Dytiscus latissimus*) (bilag II og IV)” (Søgaard & Holmen 2017a).

Overvågningsmetode i NOVANA

Overvågningen er ekstensiv, dvs. forekomsten af arterne registreres, og dette skal foregå på lokaliteter, hvor forekomsten er kendt fra tidligere overvågninger, samt på andre nye lokaliteter, hvor de kan formodes at forekomme. Disse lokaliteter er områder med søer, der vurderes at være egnede levesteder for arterne, og hvor en af arterne er blevet påvist efter 1998. Det registreres, hvilke

10x10 UTM-kvadrater, der er positive for arterne, hvilke de er forsvundet fra, og hvilke de er indvandret til. Den mest effektive målrettede metode til påvisningen er rusefangst og ketsjefangst i henholdsvis maj og september (Søgaard & Holmen 2017a).

Overvågning på basis af eDNA

Amphi-Consult (2016) har kortlagt forekomsten af bl.a. lys skivevandkalv ved hjælp af eDNA indsamlet med vandprøver i 29 udvalgte tørvegrave og sammenlignet resultatet med den konventionelle overvågning, der blev foretaget samtidigt. Som positiv kontrol blev der benyttet en balje med et kendt antal lys skivevandkalve. Ved hjælp af artsspecifikke primere, der opformer en sekvens på COI-genet (cytochrome oxidase I, GrabilCO1), der blev udviklet til formålet, men som ikke er offentligt tilgængelig, var det muligt med qPCR at påvise forekomst af lys skivevandkalv i fire af de 29 tørvegrave. Der blev observeret et svagt signal i yderligere to, som blev betragtet som "måske positiv", dvs. en tvivlsom forekomst. Det var ikke muligt at give estimater for populationstætheder med metoden. Den konventionelle metode påviste forekomst i tre af de 29 tørvegrave, hvoraf der var et overlap med den ene 'måske positiv'-påvisning fra eDNA-analyserne i den ene tørvegrav. I den anden tørvegrav med positiv forekomst ifølge den konventionelle metode, blev arten ikke påvist med eDNA. I den tredje tørvegrav, hvor den blev påvist med den konventionelle metode, blev arten ikke påvist med eDNA i tre vandhuller, der var naboer til vandhullet. Arten er vanskelig at registrere med den konventionelle metode også, hvilket kan være årsag til det manglende overlap mellem de to metoder.

Grundet utilstrækkelig information i rapporten er det ikke muligt at vurdere resultaterne af eDNA-analyserne. Dette skyldes manglende definition/kriterier for, hvornår et vandhul var hhv. positivt, måske positivt eller negativt, samt manglende information om, hvor mange af de tre tekniske replikater, der blev anvendt i qPCR-analyserne, skulle være positive, for at vandhullet blev betragtet som positivt.

For bred vandkalv findes flere COI-primere (Serjeant 2013, Bilton & Ribera 2017), men der er endnu ikke publiceret rapporter eller artikler, der dokumenterer, at det er muligt at påvise forekomst af arten med eDNA. Koese m.fl. (2013) rapporterer, at de er i gang med at udvikle et artsspecifikt qPCR-system baseret på opformeringen af COI-fragmenter, der kan detektere bred vandkalv med eDNA, men primerne er ikke offentligt tilgængelige.

På baggrund af ovenstående rapporter og publikationer vil det efter en videreudvikling sandsynligvis være muligt at benytte eDNA til monitoring af forekomst af begge arter under forudsætning af, at usikkerheder, der er forbunden med brugen af eDNA, modelleres. Dernæst bør usikkerhedsestimaterne for de forskellige trin inkluderes i modelleringen af selve forekomsten og udbredelsen, som er udviklet og beskrevet af Ficetola m.fl. (2016), Guillera-Arroita (2017), Guillera-Arroita m.fl. (2017) og Brost m.fl. (2018).

Sammenfatning

Det vurderes, at eDNA fra vandprøver indsamlet i bestemte områder og bestemte steder i vandsøjlen kan benyttes som screeningsværktøj for bred vandkalv og lys skivevandkalv. Metoden skal udvikles og optimeres samt verificeres før implementering i overvågningsprogrammet (tabel 3 - http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

4.6 Snegle og muslinger

Kildevældsvindelsnegl, *Vertigo geyeri*, sumpvindelsnegl, *Vertigo moulinsiana*, og skæv vindelsnegl, *Vertigo angustior*

Formål med overvågning

”Formålet med overvågningen er at indsamle data, der kan danne grundlag for en vurdering af arternes bevaringsstatus i henhold til habitatdirektivet. Dette indebærer en i første omgang ekstensiv overvågning af artens forekomst og udbredelse” (Søgaard 2012).

Overvågningsmetode i NOVANA

Den tekniske anvisning omfatter overvågning af danske vindelsnegle omfattet af habitatdirektivets bilag II. Der er tale om tre arter: kildevældsvindelsnegl, *Vertigo geyeri*, sumpvindelsnegl, *Vertigo moulinsiana*, og skæv vindelsnegl, *Vertigo angustior*. Ud fra kendte lokaliteter registreres, hvilke 10x10 UTM-kvadrater der er positive for arterne, hvilke de er forsvundet fra, og hvilke de er indvandret til. Selve overvågningen foregår fra april til september og udføres ved at eftersøge arterne direkte i de habitater, hvor de forventes at være til stede, dvs. i områder med kalkrig bund under sten og på plantedele, hvor alle tre arter forekommer. Det er dog sumpvindelsnegl, der er lettest at påvise på denne måde, hvorimod blade/planterester rystes over en bakke for en efterfølgende artsbestemmelse af de to andre snegle. Antallet af de forskellige arter indsamlet i 90 minutter opgøres efterfølgende (Søgaard 2012).

Overvågning på basis af eDNA

Som muligt medie til ekstraktion af eDNA fra de tre arter kunne der indsamles udvalgte tuer med stargræs samt blade nær jorden eller jordprøver på udvalgte lokaliteter. Disse kan efterfølgende transporteres til laboratoriet, hvor dyrene udrystes og homogeniseres, DNA ekstraheres, og dernæst vil DNA-metabarcoding kunne benyttes til påvisning af arterne. Dermed er det DNA fra væv, der vil blive benyttet. Der er udviklet primere for *Vertigo*-arterne, der opformerer en ca. 700bp lang sekvens af de to nukleære gener ITS1 og ITS2, samt primere, der opformerer en ca. 600-700 bp lang sekvens af dels cytochrom B, dels 16sRNA-genet i mitokondriet. Disse primere kan benyttes til at påvise de tre arter (Nekola m.fl. 2018). Metoden kræver udvikling mht. indsamlingsdesign, hvor der fx tages hensyn til forskellige miljøvariable som fugtighed og temperatur. Temperatur er vigtig, da det er vist, at både skæv vindelsnegl og sumpvindelsnegl er mest aktive omkring en temperatur på 11°C (Książkiewicz-Parulska 2017). Ligeledes skal det undersøges, i hvilket medie der er størst sandsynlighed for at påvise arterne, og hvor indsamlingen er mindst invasiv. Laboratorieteknik skal primerne videreudvikles for at opformere en kortere sekvens, der stadig kan differentiere mellem de tre arter, og derudover skal metoden verificeres. Metoden vil kunne detektere arterne, men sandsynligvis ikke kvantificere dem.

Såfremt den beskrevne metode fungerer, vil det sandsynligvis være muligt at benytte eDNA til monitoring af forekomsten af de tre sneglearter. Dette er stadig under forudsætning af, at usikkerheder, der er forbundet med brugen af eDNA, bliver inkluderet i forbindelse med modelleringen og tolkningen af resultaterne som beskrevet af Ficetola m.fl. (2016), Guillera-Arroita (2017), Guillera-Arroita m.fl. (2017) og Brost m.fl. (2018).

Sammenfatning

Det vurderes vanskeligt, men ikke umuligt at benytte eDNA metabarcoding som muligt screeningsværktøj til at påvise forekomsten af de tre vindelsneglearter. Metoden kræver meget udvikling både mht. til primere, hvilket medie og hvilke miljøvariable der er optimale for indsamlingen, samt en verifikation i felten (tabel 3 - http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

Tykskallet malermusling, *Unio crassus*

Formål med overvågning

“Formålet med overvågningen er at indsamle data om artens samlede forekomst (nationale udbredelse), herunder dens forekomst i de habitatområder, hvor den er en del af udpegningsgrundlaget. Data danner grundlag for en vurdering af artens bevaringsstatus i henhold til habitatdirektivet” (Wiberg-Larsen 2015).

Overvågningsmetode i NOVANA

Den tykskallede malermusling lever i vandløb på få lokaliteter i Danmark. Da den konventionelle overvågning af arten er intensiv, skal der vurderes, om der sker ændringer i udbredelsen af populationen samt populationsstørrelse og alderssammensætningen. Dette gøres ud fra kendte lokaliteter, hvor arten monitoreres direkte ved brug af vandkikkert samt registrering af elritse, der fungerer som spredning af den tykskallede malermuslings larver (Wiberg-Larsen 2015).

Overvågning på basis af eDNA

Tykskallet malermusling er umiddelbart en oplagt art at overvåge med eDNA. Den er vandlevende og udskiller dermed DNA kontinuerligt. Der er flere undersøgelser, der har benyttet eDNA til påvisning af ferskvandsmuslinger. Eksempelvis har Deiner & Altermatt (2014) undersøgt, om eDNA fra bl.a. *Unio tumidus* kunne påvises i vandprøver fra vandløb, og hvor langt eDNA kunne påvises nedstrøms fra kildepopulationen. De benyttede artsspecifik påvisning og konventionel PCR i deres forsøg, dvs. de designede primere fra COI- (cytochrom I) genet fra mitokondriet, der specifikt ville opformere DNA fra *Unio tumidus* i prøven. Resultatet viste, at det var muligt at påvise DNA fra arten ca. 9.1 km fra kilden, og samtidig at det var sæsonafhængigt, hvornår eDNA'et kunne påvises. Det har dog ikke været muligt at finde dokumentation for, at metoden er blevet benyttet til påvisning af den tykskallede malermusling. Der er enkelte genetiske studier, hvor den tykskallede malermusling indgår, og disse har haft fokus på det fylogenetiske slægtskab mellem ferskvandsmuslinger (Källersjö m.fl. 2005). For selve arten har man mere specifikt undersøgt, hvilken betydning det meget specielle mitokondrielle nedarvningsmønster har for kønsbestemmelsen, foretaget analyser af artens fylogeografiske sammenhæng (Mioduchowska m.fl. 2016) samt studeret den evolutionære historie for de to forskellige kønsspecifikke mitokondrier, der findes i arten (Burzyński m.fl. 2017). I langt de fleste tilfælde for vertebrater nedarves mitokondriet maternelt, dvs. fra mor til afkom, og faderens mitokondrie nedarves ikke. Hos den tykskallede malermusling og andre unoider foregår nedarvningen af mitokondriet fra begge forældre – en nedarvningsmodel, der kaldes ”doubly uniparental model (DUI)” (Zourus 2013). Det betyder, at der findes to genetisk forskellige mitokondrielinjer, en maternal (F-linje) og en paternel linje (M-linje). Den materielle linje nedarves fra mor til alle afkom, dvs. den ”normale” nedarvningsmodel, mens den paternelle linje udelukkende nedarves fra far til søn. Det betyder, at hunner udelukkende har F-linjen, som forekommer både i det somatiske væv og i gonaderne, mens hanner har både F- og M-linjen, hvor F-linjen forekommer i det somatiske

væv, og M-linjen hovedsagelig findes både i det somatiske væv og i gonaderne (Zourus 2013, Mioduchowska m.fl. 2016). Eftersom de genetiske markører, der oftest benyttes til påvisning af arter med eDNA, sidder i mitokondriet, er viden om det specielle nedarvningsmønster vigtig i forbindelse med udviklingen af primere, der kan påvise tilstedeværelsen af den tykskallede malermusling med eDNA. Ideelt burde der udvikles primere, der kunne påvise både F- og M-linjen eller sekvenser på kerne-DNA'et, som kan adskille unoiderne. En sådan markør kunne fx være en sekvens i ITS rDNA- (ribosomal internal transcribed spacer region) regionen, hvor der er fundet genetiske forskelle mellem flere unoider (Källersjö m.fl. 2005). Problemet her kan være, at koncentrationen af kerne-DNA er meget lav, forventeligt meget lavere end koncentrationen af mitokondrie-DNA i en eDNA-vandprøve, da der findes flere mitokondrier i en celle og kun én kerne. Derfor vil påvisningen baseret på disse markører i højere grad være påvirket af stokastisitet og formodentlig ligge meget tæt på grænsen for, hvad qPCR-metoden kan detektere.

På denne baggrund vil brugen af eDNA til påvisning af tykskallet malermusling i overvågningen skulle udvikles laboratorieteknisk samt verificeres. Med hensyn til kvantificering af populationen ville dette eventuelt kunne gøres relativt på en meget grov skala, fx lav-middel-høj, ud fra eDNA-analyseresultater fra kendte populationer med tilgængelige basisinformationer som populationsstørrelse. Dette vil dog yderligere kræve forsøg med, hvorvidt qPCR- eller NGS eDNA-metoden skal benyttes, samt en kalibrering med resultaterne fra de velkendte populationer. eDNA-metoden kan ikke give information om aldersfordelingen af populationen som en sidste faktor til vurdering af artens bevaringsstatus, som er beskrevet i den tekniske anvisning (Wiberg-Larsen 2015).

Når de laboratorietekniske forsøg og verifikationer er udført med succes, vil der i en eventuel implementering af metoden i overvågningen også skulle modelleres usikkerheder på feltniveau, i laboratoriet og i modelleringen af forekomst og udbredelse (Ficetola m.fl. 2016, Guillera-Aroita 2017, Guillera-Aroita m.fl. 2017, Brost m.fl. 2018, Cristescu & Hebert 2018).

Sammenfatning

Det vurderes, at eDNA fra vandprøver indsamlet i bestemte områder og på bestemte steder i vandsøjlen kan benyttes som screeningsværktøj for tykskallet malermusling. Metoden skal udvikles og optimeres samt verificeres før implementering i overvågningsprogrammet. Den kan ikke erstatte den konventionelle metode fuldstændigt, da der med jævne mellemrum bør foretages fiskning efter arten for at verificere dens forekomst og populationens alderssammensætning og vækstforhold samt rekruttering af nye muslinger (tabel 3 - http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

Flodperlemusling, *Margaritifera margaritifera*

Formål med overvågning

”Formålet med overvågningen er at indsamle data om artens samlede forekomst (nationale udbredelse), herunder dens forekomst i de habitatområder, hvor den er en del af udpegningsgrundlaget. Data danner grundlag for en vurdering af artens bevaringsstatus i henhold til habitatdirektivet” (Wiberg-Larsen 2012).

Overvågningsmetode i NOVANA

Flodperlemusling er sjælden i Danmark og lever i få vandløb. Overvågningen af arten er koncentreret om disse lokaliteter og foretages ved en fysisk undersøgelse af bunden med undervandsvideo, hvor arten forventes at forekomme.

Flodperlemuslingens bevaringsstatus vurderes ud fra ændringer i forekomst, populationsstørrelser samt alderssammensætning som hos den tykskallede malermusling. Som minimum skal overvågningen angive forekomsten af arten i Danmark (Wiberg-Larsen 2012).

Overvågning på basis af eDNA

Et par studier har påvist tilstedeværelsen af flodperlemusling med eDNA og artsspecifikke primere samt qPCR-amplifikation (Andersen & Wiberg-Larsen 2017, Stoeckle m.fl. 2015). Stoeckle m.fl. (2015) benyttede en sekvens i 16S rRNA-genet i mitokondriet til at påvise arten. De udviklede artsspecifikke primere og benyttede en semi-nestet qPCR-metode til selve analysen. I denne opformeredes først en længere 16S rRNA-gensekvens (~499 basepar), som blev benævnt den eksterne qPCR-opformering, hvor det var DNA fra væv, der blev opformeret. Dernæst blev den ene af disse to primere placeret længere inde på den sekvens, som den eksterne qPCR-metode opformerede. Derved blev en kortere sekvens på 132 bp opformeret, og denne blev benævnt den interne qPCR-metode, og den blev også foretaget med DNA fra væv. Den sidste qPCR-metode Stoeckle m.fl. (2015) benyttede, benævnt den intern-nestet qPCR-metode, blev foretaget med de samme primere, der opformerede den ovenfor beskrevne 132 bp-sekvens; blot benyttede de her som template selve det qPCR-produkt, der var resultatet af den første opformering, i stedet for DNA fra væv. Derved påviste de, at den interne PCR-metode, der opformerede den korte sekvens på 132 bp og DNA som template, var 100 gange så følsom som den eksterne qPCR-metode, der opformerede den lange sekvens på ~499bp. Den intern-nestede qPCR-metode, hvor de benyttede qPCR-produktet fra den interne qPCR-metode i stedet for DNA som template, var 10.000 gange mere følsom end den eksterne qPCR- og 100 gange mere følsom end den interne qPCR-metode.

Vandprøverne til eDNA-ekstraktionen blev indsamlet op- og nedstrøms (25m, 500m og 1000m) fra populationer med kendte tætheder fra 100 til 20.000 individer. Analyserne viste, at den eksterne qPCR-metode kunne påvise arten i 16,7 % af PCR-replikaterne, i eDNA-prøver indsamlet i vandløb med store populationer (~17.000). Den interne-nestede meget følsomme qPCR-metode (hvor qPCR-produktet fra den første opformering af selve eDNA'et fra prøverne blev benyttet som template) kunne påvise 44 % positive qPCR-replikater i vandløbet med en størrelse på > 2000 individer. I vandløbet med en populationsstørrelse <= 1000 individer blev der påvist 16,7 % positive qPCR-replikater, og endelig blev der påvist 7,4 % positive qPCR-replikater i et vandløb, hvor arten skulle være uddød. Der blev ikke observeret kontaminering i nogen af analyserne, der blev monitoreret både ved ekstraktion af eDNA og med negative qPCR-kontroller under qPCR-opsætningen, dvs. hvor der ikke blev tilsat DNA eller qPCR-produkt. Det var ikke muligt at påvise arten 500m eller 1000m nedstrøms på nogen af lokaliteterne. Observationen af arten i vandløbet, hvor den menes at være uddød, kunne evt. forklares ved nedgravede, levende individer, der ikke var påvist med den konventionelle metode. Det kunne evt. også forklares ved, at døde skaller afgiver DNA, eller at DNA bundet til sedimentet kunne blive genopløst i vandet og give signal. Geist m.fl. (2008) har vist, at skaller fra flodperlemusling, der knuses i laboratoriet, indeholder DNA. En nylig undersøgelse, foretaget med et "Common Garden" forsøg, hvor flodperlemuslinger samt skaller blev placeret i kunstige strømrender, har vist, at det ikke er muligt at detektere flodperlemuslinge-DNA fra døde skaller (Rasmussen m.fl. 2020- in prep) Endelig kunne det skyldes kontaminering (Stoeckle m.fl. 2015) på trods af, at state-of-the art var benyttet til at monitorere dette.

I et andet studie (Andersen & Wiberg-Larsen 2017) blev qPCR med artsspecifikke primere, der opformerer en ~93bp lang sekvens af COI-genet i mitokondriet, benyttet til at påvise forekomsten af flodperlemusling i Varde Å i Danmark. Der blev også her indsamlet vandprøver i vandløb med en kendt stor tæthed og i vandløb med en kendt lille tæthed af arten. Disse sidste indsamlinger blev foretaget i Blekinge, Sverige. I Danmark blev arten indsamlet dels i Varde Å, hvor den er observeret tidligere år, dels i vandløb, hvor den aldrig er observeret. Fremgangsmåden var en ordinær qPCR-metode, hvor COI-sekvensen blev opformeret fra eDNA ekstraheret fra vandprøverne. Den blev påvist i såvel vandprøver som sedimentprøver taget på to lokaliteter i Varde Å samt de to sydsvenske lokaliteter, men ikke i de øvrige danske vandløb bortset fra en åbenlys falsk positiv vandprøve fra Odense Å, hvor arten aldrig er forekommet. Her blev den påvist i en vandprøve taget i 2015, men ikke i en vandprøve taget i 2016, hvorfor den betragtes som falsk positiv. Kontamineringen blev monitoreret med 72 negative kontroller, hvoraf der blev observeret signal i tre, svarende til en kontamineringsrate på 4,2 %, hvilken dog forventes at være lavere, da resultaterne fra analyserne med signaler i de negative kontroller ikke blev medtaget ved vurderingen af påvisning (Andersen & Wiberg-Larsen 2017). Det var ikke muligt at give den præcise udbredelse af populationen i Varde Å eller informationer om individernes aldersfordeling og dermed rekruttering. Ud fra vandføring og potentielt udskilt eDNA i hhv. Varde Å og de to svenske vandløb var populationsstørrelsen sandsynligvis ikke helt ubetydelig. Resultatet af påvisningen af tilstedeværelsen af flodperlemuslingen med eDNA i Varde Å understøttes af, at der i 2000 blev fanget et 102 mm langt levende eksemplar.

De to studier viser, at det er muligt at benytte eDNA til at påvise forekomst af flodperlemusling, mens det ikke er muligt at angive størrelse og alderssammensætning med eDNA. Dog er der stadig behov for optimering af metoden ved bl.a. optimering af mængden af eDNA, der indsamles, hvilket kan gøres ved filtrering af et større vandvolumen end det, der blev benyttet i de to studier. Ligeledes bør muligheden for kvantificeringen af populationen udvikles som beskrevet for den tykskallede malermusling. I forbindelse med implementering i overvågningen skal de usikkerheder, der er forbundet med metoden på de forskellige niveauer, inkorporeres i den endelige modellering af forekomst og udbredelse (Ficetola m.fl. 2016, Guillera-Arroita 2017, Guillera-Arroita m.fl. 2017, Brost m.fl. 2018, Cristescu & Hebert 2018) samt i populationsestimaterne. Dog vurderes det, at eDNA-metoden skal suppleres med traditionelle undersøgelser for at belyse især populationens alderssammensætning og vækstforhold samt rekruttering af nye muslinger.

Sammenfatning

Det vurderes, at eDNA fra vandprøver indsamlet i bestemte områder og bestemte steder i vandsøjlen kan benyttes som screeningsværktøj for flodperlemusling. Metoden skal optimeres og verificeres yderligere før implementering i overvågningsprogrammet, hvilket er igang. Den kan ikke erstatte den konventionelle metode fuldstændigt, da der med jævne mellemrum bør foretages fiskning efter arten med henblik på verificering af dens forekomst og populationens alderssammensætning og vækstforhold samt rekruttering af nye muslinger (tabel 3 - http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

Karplanter og mosser

Mygblomst, *Liparis loeselii*

Formål med overvågning

”Formålet med overvågningen af mygblomst er at dokumentere artens nationale udbredelse og status” (Wind & Nygaard 2017c).

Overvågningsmetode i NOVANA

Mygblomst er flerårig og menes at kunne leve op til otte år (Berlogrudova m.fl. 2012). Artens voksesteder er på nøgen jordbund eller i mosdækket i ekstremrigkær. Den formerer sig generativt ved blomster og frøsætning og vegetativt ved deling af det underjordiske organ (Wind & Nygaard 2017c). Det vil sige, at to eller flere individer, der står tæt, kan være fra samme plante/individ. Den monitoreres ved at indsamle data om populationsstørrelse og -sammensætning, om populationsudbredelse samt om de fysiske forhold og økologiske kår på voksestederne (levestedsdata) (Wind & Nygaard 2017c).

Overvågning på basis af eDNA

Mygblomsts levested er ekstremrigkær, og det vil sandsynligvis være muligt at påvise artens tilstedeværelse i eDNA fra vandprøver indsamlet her. Flere forskellige studier har fundet genetiske markører med variation, som kan benyttes til populationsgenetiske undersøgelser. Eksempelvis har Pillon m.fl. (2007) benyttet variation i DNA-fragmentlængder (AFLP) fra tilfældigt udvalgte områder i genomet til at undersøge genetisk diversitet og populationsstruktur i mygblomst indsamlet i det vestlige Frankrig og UK. Her blev genetisk variation påvist, selv om mygblomst både er selvbestøvende og klonal. Pillon m.fl. (2007) observerede, at populationer fra fugtige klitlavninger (”dune slacks”) og moser var genetisk forskellige, hvorimod geografisk adskilte populationer var genetisk mere ens. Wiland-Szymańska m.fl. (2016) benyttede DAMD- (direct amplification of minisatellite DNA regions)-markører, en anden type genetiske markør med repetitive DNA-sekvenser, til at undersøge det genetiske slægtskab hos mygblomst i Polen. De undersøgte også, hvilke barcodes der var karakteristiske for mygblomst. Her benyttede de tre chloroplast-regioner (matK, rbcL og trnL-F) og en nukleær region, ITS2. For de to plantebarkode-områder, matK og rbcL, blev de generelle primere angivet af Kress & Erickson (2007) benyttet, mens trnL og ITS2 blev opformuleret med primerne angivet af Taberlet m.fl. (1991). Barcode-sekvenserne for rbcL (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit) og matK (maturase K) var identiske med sekvenser uploadet til Barcode of Life-databasen (BOLD) for mygblomst. Wiland-Szymańska m.fl. (2016) observerede ligeledes genetisk variation i 13 DAMD-markører, og på denne baggrund blev der foretaget en populationsstrukturanalyse. Resultatet påviste en genetisk forskel mellem Rodlachian og alle Silesian-populationerne samt mellem Kuźnica Warczyńska og alle Silesian-populationerne i Polen. Et tredje genetisk studie, baseret på AFLP-markører (Vanden Broeck m.fl. 2014), har vist, at der tilsyneladende foregår langdistancespredning af frø. Dette understøtter resultaterne om lille genetisk differentiering mellem geografisk adskilte populationer rapporteret af Pillon m.fl. (2007). Samtidig foregår der en lokal tilpasning til det nye habitat uden mygblomst, hvor frøene spredes til, gennem en koloniserings-effekt (founding effekt), hvor de få frø, der spirer, danner kloner.

Resultatet af disse studier viser, at det laboratorieteknisk vil være muligt at udvikle qPCR- eller metabarcoding-detektionssystemer med artsspecifikke primere, der vil kunne benyttes til påvisning af eDNA i vandprøver fra loka-

liteter, hvor arten formodes at forekomme med de forbehold, der angives under odder. eDNA-metoden vil ikke kunne benyttes til at kvantificere antallet af individer af arten i et givent område.

Sammenfatning

eDNA fra vandprøver i udvalgte områder vil kunne benyttes, og primere til påvisning kan udvikles. Om metoden er fordelagtig sammenlignet med den konventionelle metode, hvor de enkelte individer findes og tælles i felten, er tvivlsom. En populationsgenetisk undersøgelse af de danske mygblomstpopulationer foretaget med fx AFLP- eller DAMD-markører, der har vist at kunne påvise genetiske variation i arten, ville være fordelagtig i forhold til vurdering af artens bevaringsstatus

(tabel 3 - http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

Gul stenbræk, *Saxifraga hirculus*

Formål med overvågning

”Formålet med overvågningen af gul stenbræk er at dokumentere artens nationale udbredelse, status og krav til voksested” (Wind & Nygaard 2017b).

Overvågningsmetode i NOVANA

Gul stenbræk er en sjælden, flerårig plante, der er vegetativ og generativ formerende. Den sætter typisk én til to blomster og frugtstande pr. individ, samtidig med at individet danner overjordiske udløbere. Disse er genetisk identiske med moderplanten, og der dannes derved en klon af identiske individer. Den vokser i moslaget i kildevæld (Wind & Nygaard 2017b). Grundet dens mulige formeringsformer er det vanskeligt at afgøre antallet af individer i et vegetationstæppe af gul stenbræk. Arten monitoreres ved at indsamle data om populationernes størrelse og udstrækning samt om de fysiske forhold og økologiske kår på voksestederne (levestedsdata) (Wind & Nygaard 2017b).

Overvågning på basis af eDNA

Baseret på artens levevis vil den sandsynligvis kunne påvises i eDNA fra vandprøver fra kildevæld. Der forefindes primere for de to chloroplastgener/markører *rbcl* (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit) og *matK* (maturase K) for gul stenbræk (de Vere m.fl. 2012, Saarela m.fl. 2013, Wirta m.fl. 2016). Baseret på disse to sekvenser og den geografiske variation, som de forskellige sekvenser i GenBank angiver, vil det laboratorietechnisk formodentlig være muligt at udvikle genetiske markører, der kan påvise arten, såfremtforholdsreglerne vedr. estimering og assignment af usikkerheder i forbindelse med metoden, som tidligere er nævnt, også implementeres. Der er yderligere udviklet microsatellitprimere til individbestemmelse samt evaluering af indavlsniveau for arten (Beatty m.fl. 2014). For at afgøre, om disse kan benyttes på eDNA fra vandprøver, så arten kan påvises, kræves en verifikation af metoden. Såfremt der foreligger bladprøver vil det sandsynligvis være muligt at bruge disse markører til at afgrænse antallet af individer i et givet vegetationstæppe af gul stenbræk, såfremt der foretages en omhyggeligt designet indsamling. Det vil dog også afhænge af, om der er tilstrækkeligt med variation i de foreliggende seks microsatellitmarkører.

Sammenfatning

Det vurderes, at eDNA fra vandprøver indsamlet i kildevæld i områder med formodet eller historisk forekomst af stenbræk muligvis kan benyttes som screeningsværktøj i overvågningen. Metoden kræver meget udvikling både med hensyn til indsamlingsdesign og primere samt verifikation. Det vil være

relevant at undersøge indavlsniveauet i de eksisterende populationer ud fra bladmateriale samt at undersøge afgrænsningen af individer i forhold til den konventionelle metode (tabel 3 - http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

Enkelt månerude, *Botrychium simplex*

Formål med overvågning

”Formålet med overvågningen af enkelt månerude er at dokumentere artens nationale udbredelse, status og krav til voksested” (Wind & Nygaard 2012).

Overvågningsmetode i NOVANA

Månerude er en sukkulent, flerårig urt, der formerer sig ved sporer, så hver plante er et individ. Den vokser på nøgen jordbund og i lavt vegetationsdække som fx strandoverdrev, overdrev og våde enge. Der findes sporehusbærende og vegetative planter. Sporene modnes i midt-juni, hvorefter planten visner, og selve sporene spirer i symbiose med svampemykorrhiza. Den monitoreres intensivt årligt i juni-juli måned ved fastlæggelse af populationens udbredelse samt størrelse og sammensætning, samtidig med at de fysiske forhold og økologiske kår på voksestederne (levestedsdata) også indsamles (Wind & Nygaard 2012).

Overvågning på basis af eDNA

Baseret på artens levevis vil den formodentlig kunne påvises i eDNA fra jord og evt. vandprøver fra enge. Et indsamlingsdesign baseret på data om artens udbredelse skulle udvikles for bedst muligt at præcisere, hvor prøverne skulle indsamles. Laboratorieteknik forefindes primere til det ikke-kodende chloroplast locus, *trnHGUG-psbA* (Tate & Simpson 2003. Dauphin m.fl. 2017). Ud fra disse vil det være muligt at designe et primersæt, der opformerer en kort sekvens på ~100bp, der genetisk kan adskille enkelt månerude, almindelig månerude (*Botrychium lunaria*), kamillebladet månerude (*Botrychium matricariifolium*) og stilk-månerude (*Botrychium multifidum*). Primerne skal udvikles og valideres til en artsspecifik påvisning, og ligeledes skal indsamlingsdesignet fra de to medier valideres og verificeres for at afgøre, hvorvidt det er muligt at påvise arten i mediet. På nuværende tidspunkt er det ikke muligt at kvantificere antal individer på baggrund af den foreslåede eDNA-metode. Den kan benyttes som et screeningsværktøj i et område, hvor der har været højt græsningstryk, og hvor arten formodes at forekomme, men ikke kan findes grundet nedgræsningen. Metoden skal som for de andre bilagsarter også her udvikles til at inkludere usikkerhedsestimater på alle niveauer.

Sammenfatning

Det vurderes, at eDNA fra vandprøver eller jord indsamlet i udvalgte områder måske kan benyttes som screeningsværktøj i overvågningen. Metoden kræver meget udvikling både med hensyn til indsamlingsdesign og primere samt verifikation (tabel 3 - http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

Fruesko, *Cypripedium calceolus*

Formål med overvågning

”Formålet med overvågningen af fruesko er at dokumentere artens nationale udbredelse, status og krav til levested” (Wind & Nygaard 2011).

Overvågningsmetode i NOVANA

Fruesko vokser på overdrev og i anden kalkholdig, veldrænet jordbund i fx lysåben bøgeskov. Den har en kønnet og også en vegetativ formering, da den

har en krybende underjordisk stængel, der kan sætte flere skud. Det kan derfor være vanskeligt at erkende de enkelte individer af fruesko, og i overvågningen tælles skuddene enkeltvis. Arten monitoreres ved at indsamle data om populationsstørrelse og sammensætning, om individfordeling og levestedernes udstrækning samt om de fysiske forhold og økologiske kår på levestederne (levestedsdata) (Wind & Nygaard 2011).

Overvågning på basis af eDNA

Fruesko er en forholdsvis stor orkidé, som morfologisk er nem at bestemme. Arten har kun ét kendt levested i Danmark. Laboratorieteknisk findes genetiske markører, der kan påvise arten. I et fylogeografisk populationsgenetisk studie af fruesko i det nordvestlige Europa blev der i alt inkluderet seks individer fra to danske populationer. Der blev observeret 23 forskellige haplotyper i hele det nordvestlige Europa. Disse blev defineret ud fra kombinationen af alleler fra 14 forskellige loci i chloroplast-genet, der indeholdt hypervariable basepar-sekvenser svarende til microsatelliter (Fay m.fl. 2009). De to danske populationer indeholdt ens haplotyper (H16), hvilket tyder på en lav genetisk variation. Et andet nyere studie har benyttet variation i 11 nukleære microsatelliter til at analysere populationsstrukturen i estiske fruesko-populationer samt påvise eventuelle forskelle mellem populationer i forskellige habitater, der yderligere havde en variabel sammensætning af kloner (Gargiulo m.fl. 2018). Spørgsmålet er, hvor høj nukleær genetisk diversitet (dvs. hvor indavlede de er) de to danske populationer/kloner har, og hvordan de afgrænses genetisk inden for det undersøgelsesområde, der er defineret som en population ud fra den benyttede konventionelle metode.

Sammenfatning

Det vurderes, at det umiddelbart ikke vil det give mening at forsøge at benytte eDNA fra jordprøver til påvisning af arten i Danmark, og at eDNA ikke er relevant til overvågningen. Der forefindes dog primere, der kan udvikles til dette, såfremt det ønskes. Det er mere relevant for overvågningen at påvise den genetiske diversitet i de to danske populationer samt populationernes afgrænsning (tabel 3 - http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

Vandranke, *Luronium natans*

Formål med overvågning

”Formålet med overvågningen af vandranke er at dokumentere artens nationale udbredelse, status og krav til levestedet” (Johansen m.fl. 2011).

Overvågningsmetode i NOVANA

Vandranke er en sjælden vandplante, der lever i stilleløbende vandløb samt vandhuller/små søer. Den er flerårig og vintergrøn og kan findes på op til 4m's dybde. Den har kønnet forering med blomstrende skud, mens den vegetative forering sker via krybende eller flydende stængler, der kan spredes med strømmen. Derved består en population af kloner. Udstrækningen af dens levested kan udvise temporære variationer. Den monitoreres ved at indsamle data om populationstæthed og levestedernes udstrækning samt om de fysiske forhold og økologiske kår på levestederne (levestedsdata) (Johansen m.fl. 2011).

Overvågning på basis af eDNA

Artens levevis muliggør, at den sandsynligvis kan overvåges via eDNA fra vandprøver. Der forefindes fx barcode-sekvenser for de to chloroplastgener/markører *rbcL* (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit) og *matK* (maturase K) (Les & Tippery 2013, de Vere m.fl. 2012), der

formodentlig vil kunne benyttes til artsspecifik identificering med eDNA ved en videreudvikling af primerne, så de opformerer en kortere sekvens. Alternativt foreligger der sekvenser fra forskellige mitokondriegenere (Cuenca m.fl. 2012, Cuenca m.fl. 2016) og nukleære gener (ITS, Les & Tippery 2013), som eventuelt også vil kunne benyttes laboratorieteknisk. Som for alle de andre arter skal metoderne verificeres, forholdsreglerne med hensyn til estimering og assignment af usikkerheder i forbindelse med metoden skal implementeres.

Sammenfatning

Det vurderes, at eDNA fra vandprøver indsamlet i stilleløbende vandløb samt vandhuller/små søer på et bestemt sted i vandsøjlen muligvis kan benyttes som screeningsværktøj i overvågningen. Metoden kræver meget udvikling både med hensyn til indsamlingsdesign og primere samt verifikation (tabel 3 - http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

Liden najade, *Najas flexilis*

Formål med overvågning

”Formålet med overvågningen af liden najade er at dokumentere artens nationale udbredelse, status og krav til levestedet”. (Johansen & Wind 2018).

Overvågningsmetode i NOVANA

Liden najade er en meget sjælden, lille enårig urt, der findes i søer. Den har adskilte han- og hunblomster på hvert individ. Frøene kan overleve i flere år, før de spirer under de rette betingelser. Det betyder, at planten ikke nødvendigvis findes på lokaliteten hvert år. ”Arten monitoreres ved at indsamle data om populationstæthed, populationens dybdeudbredelse, gennemsnitlige højde og levestedernes udstrækning samt om de fysiske forhold og økologiske kår på levestederne (levestedsdata)” (Johansen & Wind 2018).

Overvågning på basis af eDNA

Liden najades levevis på bunden af søer samt de temporære udsving i spiringsfrekvensen gør den forholdsvis vanskelig at monitorere. Derfor ville brugen af eDNA som screeningsværktøj til påvisning af arten foretaget på vandprøver indsamlet fra søer med formodet forekomst være effektiv. Peredo m.fl. (2013) sekventerede hele chloroplastgenomet fra liden najade indsamlet på to geografisk forskellige steder, i Skotland og i Connecticut, USA. Plastidgenomet var ~156329bp langt og cirkulært. Den har ingen NADH-dehydrogenasegener, der er funktionelle, og nogle er helt forsvundet. Denne viden kan benyttes laboratorieteknisk til at udvikle artsspecifikke primere og en artsspecifik qPCR-metode til påvisning af arten fra vandprøver indsamlet som beskrevet ovenfor. Derved kunne man undgå at benytte 16S rRNA-genprimere til påvisning. Adskillige 16S rRNA-genprimere udviklet til mikroorganismer har vist også at kunne opformere DNA-sekvenser på planter (Maitra m.fl. 2015), hvilket vil kunne give falske positive for fx liden najade i en vandprøve. Dette kunne undgås ved at sekventere det opnåede PCR-produkt, hvilket altid bør foretages ved artsspecifikke PCR-/qPCR-analyser. Liden najade kan hybridisere med guppygræs, *Najas guadalupensis* (Les m.fl. 2010), der bruges som akvarieplante. Om dette ville kunne forekomme i DK i forbindelse med udslip fra akvarier, vides ikke. Det er muligt at udvikle en eDNA-metode, der kan påvise forekomsten af arten i fx et screeningsforsøg, dog skal metoden verificeres, og samtidig skal forudsætningerne og forbeholdene som angivet for de andre bilagsarter imødekommes.

Sammenfatning

Det vurderes, at eDNA fra vandprøver indsamlet i søer på et bestemt sted i vandsøjlen muligvis kan benyttes som screeningsværktøj i overvågningen. Metoden kræver meget udvikling både med hensyn til indsamlingsdesign og primere samt verifikation

(tabel 3 - http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

Grøn buxbaumia, *Buxbaumia viridis*

Formål med overvågning

”Formålet med overvågningen af grøn buxbaumia er at dokumentere artens nationale udbredelse, status og krav til voksesteder. Der indsamles data om populationsstørrelse samt om de fysiske forhold og økologiske kår på voksestederne (levestedsdata)” (Wind & Nygaard 2017a).

Overvågningsmetode i NOVANA

Grøn buxbaumia er en sjælden mos, der hovedsagelig vokser på sur jordbund på steder, der er forholdsvis fugtige og beskyttede mod sol og vind, samt på lysåbne arealer uden meget vegetationsdække. I Danmark findes den på gamle skovvejsskrænter og aldrende granstubbe i ældre bøgeskov, hvor der forekommer rød- eller ædelgran-bevoksninger, dvs. i gamle skove, og den er registreret på liggende, døde granstammer, på nedbrudte grannåle og nøgen mineraljord (Wind & Nygaard 2017a). Planten vokser på omsat organisk materiale, der har karakter af smuld eller humus.

Der findes han- og hunplanter. Sporehusene og deres stilke er det eneste observerbare af artens livscyklus, og det er svært at afgøre, om et sporehus udgør et individ, eller om forkimet (protonemaet) sætter flere sporehuse, hvilket betyder, at antallet af sporehuse, der tælles i felten, bliver et indirekte mål for størrelsen på populationen (Wind & Nygaard 2017a).

Overvågning på basis af eDNA

Ud fra artens voksesteder ville mediet, hvor der evt. kunne påvises eDNA fra grøn buxbaumia, være jord eller førne indsamlet på udvalgte steder. Hele mitokondriesequensen (mitogenomet) på rundkapslet buxbaumia (*Buxbaumia aphylla*) (Liu m.fl. 2014) samt forskellige chloroplastgener for forskellige buxbaumiaer findes i GenBank-databasen (Wahrmund m.fl. 2009, Wahrmund m.fl. 2010, Liu m.fl. 2012). Ud fra en sammenligning mellem rbcl- og rsp4-sekvenser, der sidder i chloroplastgenomet for *Buxbaumia viridis* og *Buxbaumia aphylla*, der forefindes i GenBank, er det muligt at adskille de to arter genetisk. Det vil derfor laboratorieteknisk være muligt at udvikle artsspecifikke markører, der kan påvise grøn buxbaumia i førne/jord indsamlet på formodede voksesteder for arten under forudsætning af, at metoden, som beskrevet for de andre bilagsarter, udvikles til at inkludere usikkerhedsestimater på alle niveauer.

Sammenfatning

Det vurderes, at eDNA fra jord eller førne indsamlet i udvalgte områder muligvis kan benyttes som screeningsværktøj i overvågningen. Metoden kræver meget udvikling både med hensyn til indsamlingsdesign og primere samt verifikation (tabel 3 - http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

Blank seglmos, *Hamatocaulis vernicosus*

Formål med overvågning

”Formålet med overvågningen af blank seglmos er at dokumentere artens nationale udbredelse og den samlede bestandsstørrelse. Dette gøres ved en stikprøvebaseret indsamling af data om bestandsstørrelse af blank seglmos for alle kendte forekomster og i udvalgte undersøgelsesområder” (Goldberg m.fl. 2019).

Overvågningsmetode i NOVANA

Blank seglmos er en flerårig mos, der vokser i mineralrige kær (dog ikke ekstremrig kær/kalkkær), især i vældområder med en konstant grundvandsgennemstrømning. Den har både kønnet og vegetativ formering. Ved den kønnede formering dannes sporer, der spredes, når de er modne, enten med vinden eller ved at falde til jorden. Der har ikke været observeret sporehuse siden begyndelsen af 1900-tallet, og det antages derfor, at formeringen kun foregår vegetativt. Arten formerer sig ved forgrening, og det sammenhængende tæppe antages at repræsentere en klon. Den spredes formodentlig ved, at fragmenter af planten trampes i stykker af dyr og spredes via disse, og også via smeltevand. Det er derfor vanskeligt at erkende individer i felten, og bestandsstørrelse opgøres derfor som antal skud (Goldberg m.fl. 2019).

Overvågning på basis af eDNA

Arten antages at kunne udgøre et kryptisk artskompleks, da der findes to genetisk forskellige clader af arten – også i Danmark (clade 1 ved Viborg, Vinge Mølle og clade 2 ved Viborg, Kvorning Møllesø) (Hedenäs & Eldenäs 2007). Claderne er baseret på sekvensforskelle i bl.a. ITS-genet (se Rydin m.fl. 2004 og Hedenäs & Eldenäs 2007). Tilsyneladende foregår der ikke en krydsning mellem individer fra clade 1 og clade 2, hvorfor de antages at tilhøre forskellige arter, selv om de endnu ikke kan adskilles morfologisk (Hedenäs & Eldenäs 2007). Denne artshypotese ville kunne undersøges i de danske populationer i forbindelse med den næste NOVANA-overvågning, hvor der kunne indsamles prøver (enkelte blade) efter et omhyggeligt tilrettelagt indsamlingsdesign. Det første trin ville være at bestemme, hvilke clader populationerne tilhører. Dette kan gøres ved PCR af ITS-sekvensen, efterfulgt af skæring af sekvensen med et restriktionsenzym, der skelner de to clader (Manukjanová m.fl. 2018). Såfremt både clade 1 og clade 2 findes i samme population, kunne man teste artshypotesen ved at indsamle populationen mere intensivt og sekventere denne for at undersøge, om der forekommer rekombination mellem de to clader.

Arterne findes ved kildebække og formodes hovedsageligt at spredes vegetativt, da sporer forekommer meget sjældent. En artsspecifik (qPCR) eDNA-metode kunne baseres på vandprøver fra disse kildebække. Laboratorieteknik vil det være muligt at udvikle den artsspecifikke markør fra de publicerede ITS-sekvenser på en sådan måde, at clade1 og clade 2 formodentlig ville kunne adskilles. Som for de andre bilagsarter skal der også her inkluderes usikkerhedsestimater, såfremt metoden fungerer og var verificeret.

Sammenfatning

eDNA fra vandprøver i udvalgte kildebække vil kunne benyttes, og primere til påvisning kan udvikles. Det er dog tvivlsomt, om der kan påvises DNA. En populationsgenetisk undersøgelse baseret på bladprøver vil være relevant for overvågningen for at undersøge, om de to fundne clader kan krydse, og hvordan de er fordelt i Danmark

(tabel 3 - http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf).

5 Diskussion

eDNA som monitoringsmetode i den nationale overvågning er en del af fremtidens værktøjskasse. Som det fremgår af gennemgangen af bilagsarterne, er der nogle arter, hvor metoden med fordel kan implementeres efter lidt udvikling. Den kan benyttes med fordel, hvor overvågningen er ekstensiv og kun en registrering af forekomst af en art, dvs. hvor forekomsten i et nyt 10X10 UTM-kvadrat skal registreres. For arter, hvor mere detaljerede informationer om populationsstørrelser, demografi m.m. skal registreres for at vurdere bevaringsstatus, er eDNA-metoderne endnu ikke tilstrækkeligt raffinerede. I langt de fleste tilfælde vil eDNA-monitoring således ikke kunne erstatte de konventionelle overvågningsmetoder, men den vil kunne fungere som et supplement til de konventionelle metoder. Ved at benytte eDNA som screeningsværktøj vil det formodentlig i mange tilfælde være muligt at effektivisere den konventionelle metode i overvågningen.

En væsentlig forudsætning for både enkeltarts-overvågningen med eDNA og eDNA-metabarcoding til biodiversitetsmonitoring er, at der forefindes tilgængelige referencebiblioteker over de pågældende arters DNA. Biblioteket skal også gerne omfatte korte DNA-sekvenser (metabarcoder), der er særligt væsentlige for identifikationen af eDNA, der typisk består af meget korte, ofte nedbrudte stykker DNA (Taberlet m.fl. 2012, Taberlet m.fl. 2018). En anden forudsætning er, at sampling-design og prøve antal og frekvens er omhyggeligt tilrettelagt. eDNA-koncentrationen fra en given art kan variere over året grundet forskellige både biotiske og abiotiske faktorer. Eksempelvis er det mht. eDNA-sporing i vandprøver vigtigt, om arten er akvatisk, semi-akvatisk eller terrestrisk og drikker af vandet. Dette har betydning for antallet af prøver, der bør indsamles. Davis m.fl. (2018) benyttede eDNA til påvisning af domesticerede vilde grise (*Sus scrofa*) – et terrestrisk pattedyr – i vandprøver. På baggrund af deres resultater anbefaler de et samplingdesign, hvor der indsamles mindst 10, gerne 20, vandprøver pr. lokalitet/vandhul eller kilde, og hvorefter arbejdsmængden i laboratoriet reduceres ved at køre proceduren igennem for enkelte prøver ad gangen indtil påvisning af den første positive vandprøve. Yderligere viste de, at ved en pH, der ikke er neutral, skal der indsamles flere vandprøver, og samtidig skal der tages højde for den sæsonmæssige variation, der er knyttet til artens adfærd for at øge sandsynligheden for en positiv vandprøve. De anbefaler, at der udføres feltforsøg for at undersøge, hvilke faktorer der påvirker påvisningen på selve lokaliteten af arten, og endelig at der udvikles multi-scale occupancy-modeller, der inkorporerer de forskellige faktorer, som derefter benyttes til at forudsige forekomsten af arten for derigennem at designe effektive indsamlingsprotokoller. Disse behøves formodentlig kun at blive foretaget én gang for den pågældende art (Davis m.fl. 2018).

Akvatiske arter frigiver DNA i vandet kontinuerligt, men formodentlig ikke i en konstant mængde. Dette afhænger af mange faktorer og ikke blot af størrelsen på individerne af den pågældende art, men formodentlig også af individernes stressniveau (Wilcox m.fl. 2016). En anden vigtig faktor, der påvirker sandsynligheden for påvisningen med eDNA, er, hvor prøverne bliver indsamlet i forhold til, hvor arten befinder sig, hvilket afspejles af eDNA-koncentrationen i vandprøven. Denne er betinget af transportafstanden af eDNA, som bl.a. afhænger af partikelstørrelsen. eDNA varierer i partikelstørrelse og forekommer også som større aggregerede klumper, der opfører sig forskelligt

i miljøet. eDNA-partiklerne kan også adsorbere til sedimentet, hvilket yderligere giver ophav til aggregater med varierende transport- og eksistens/nedbrydningstid (Wilcox m.fl. 2016). Det er alle faktorer, der påvirker koncentrationen af eDNA i vandet, og som antyder, at eDNA ikke er homogent fordelt i det vandige miljø. Derfor har volumen af den indsamlede vandprøve og mængden af vand, der filtreres, stor indflydelse på sandsynligheden for en positiv påvisning af arten. Eksempelvis viste Wilcox m.fl. (2016), at sandsynligheden for ikke at kunne påvise fem fisk 200 m opstrøms var 0,027 i en 5 l vandprøve, mens denne steg til 0,484, hvis der blev indsamlet 1 l vand.

Det er dog stadig uklart, hvordan fx vandløbets hydrologi og geomorfologi (slyngninger, topologi, sedimentets kornstruktur m.m.) påvirker eDNA-transport, tilbageholdelse og overlevelse. Fremier m.fl. (2019) undersøgte dette ved at udlede kontrollerede mængder vand med eDNA indsamlet fra en vandtank med 30kg hvid stør (*Acipenser transmontanus*) i fem forskellige vandløb, hvor arten ikke forekom. Vandløbene blev kortlagt og beskrevet (topologi, vandføring, slyngninger m.m.), og vandprøverne blev indsamlet på bestemte tidspunkter langs vandløbet. Resultatet viser, at eDNA-tilbageholdelsen i vandløbene varierer mellem vandløb. eDNA tilbageholdelsen (retentionen) kontrolleres af, hvor lang tid vandet opholder sig et bestemt sted samt af vandflowet i overfladen, hvilket betyder, at eDNA formodentlig tilbageholdes gennem adsorption til biofilm og andre overflader i flodlejet. Den bedste geomorfe proxy for eDNA-tilbageholdelsen i vandløbet er hældningen (vandspejlsfaldet) nedstrøms. Undersøgelsen viser de mange usikkerheder/uvisheder omkring transporten, tilbageholdelsen og resuspensionen af intercellulær eDNA i vandløb, som påvirker påvisningen af en art med eDNA. Det viser også, at selve antallet af prøver bør øges i vandløb med lav hældning eller i vandløb, hvor der er stor forskel i strømhastigheden mellem overflade og bund, for at kompensere for tilbageholdelsen af eDNA i den bentiske zone, og det bør i sådanne tilfælde overvejes, om der skal tages prøver af sedimentet i flodlejet (Fremier m.fl. 2019).

DNA-metoderne stiller også særlige krav til analysefaciliteter og 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.

På denne baggrund vurderes det, at såfremt eDNA-metoderne skal finde anvendelse i den eksisterende artsovervågning under NOVANA-programmet, vil det i første omgang være som et bidrag til den ekstensive overvågning af arternes udbredelse. Den intensive overvågning kan dog også drage nytte af DNA-metoderne, der kan anvendes 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/småsøer for forekomst af enkeltarter (Thomsen m.fl. 2012, Sigsgaard m.fl. 2015). Det er dog ikke kun eDNA i vandprøver, der kan være relevante at overveje i NOVANA-overvågningen. Der er også mulighed for at benytte eDNA til identifikation af arter i jord-, dynd-/sediment- og vegetationsprøver (Andersen m.fl. 2011, Alsos m.fl. 2018). Indsamlingen af eDNA kan også ske fra alternative nicher, fx er der for nylig publiceret resultater vedrørende identifikation af pollen afsat af insekter i planter (Thomsen & Sigsgaard 2019), og omvendt er pollen indsamlet af bier også anvendt til at detektere planter (Potter m.fl. 2019). eDNA fra honning indsamlet fra forskellige områder er anvendt til at undersøge an-

tallet af bladlusarter i området (Utzeri m.fl. 2018). Samtidig åbner DNA-metoderne også op for muligheden for at identificere arter, der er vanskelige at artsbestemme. De kan således give mere pålidelige data for artssammensætningen, hvilket fx kan styrke beregningen af faunaindeks og artsindeks, samt inddrage arter, vi endnu har været tilbageholdende med at medtage i overvågningen, fordi de stiller særlige krav til artsbestemmelsen.

6 Konklusion

Vurderingerne af, hvor det er muligt at benytte eDNA-metoden – enten arts-specifikt eller ved metabarcoding – er angivet i tabel 3 (http://dce2.au.dk/pub/SR367_tabel3.pdf). For den semiakvatiske art odderen har især den målrettede eDNA-metode, hvor ekskrementer benyttes som DNA-kilde, vist sig at være brugbar til både identifikation på arts- og individ-niveau. For eDNA-baseret overvågning fra vandprøver mangler udvikling af en sampling-procedure. For de vandlevende arter, stor vandsalamander og dyndsmørling benyttes artsspecifik eDNA i overvågningen af stor vandsalamander i UK og formodentlig også i andre europæiske lande, men der er ikke fundet dokumentation af dette. Dyndsmørlingen kan påvises med arts-specifikke primere og eDNA, og der pågår en feltverifikation af metoden i Danmark, og det samme er gældende for flodperlemusling. Andre arter, for hvilke den artsspecifikke eDNA-metode vurderes at kunne udvikles baseret på den eksisterende viden uden de store omkostninger og med et meget omhyggeligt sampling-design, er pigsmørling, grøn mosaikguldsmø, stor kærguldsmø, bred vandkalv, lys skivevandkalv og tykskallet malermusling. For paddernes og flagermusenes vedkommende vil en metabarcoding-metode være oplagt. For de resterende habitatarter på bilag II og IV vurderes det, at der skal udvikles laboratorieprocedurer, herunder primer-afprøvning m.m., for at afgøre, hvilke medier der er størst sandsynlighed for at påvise arterne i. Derudover skal der udvikles samplingprocedurer, før det kan afgøres, om det er muligt at påvise arterne med eDNA.

Et scenarie for brugen af eDNA kunne være at udtrække en artsliste fra NOVANA-overvågningen fra et 10x10 UTM-kvadrat og undersøge, hvilke bilag II- og IV-arter der findes i det pågældende kvadrat. Ud fra artslisten kan man vurdere, hvilke medier – vand, jord eller andet – hvorfra der skulle indsamles eDNA for at dække arterne. Derudfra kan der udvikles en eDNA metabarcoding-protokol, der dækker artssammensætningen. Denne protokol kan benyttes til at undersøge de nærliggende UTM-kvadrater med lignende natur for forekomsten af arterne. Påvises de, og er det et nyt UTM-kvadrat, skal den konventionelle metode rulles ud for at eftersøge den pågældende art. I princippet skal der måske blot udvikles få eDNA metabarcoding-protokoller for at dække artssammensætningen for alle bilag II- og IV-arterne. Denne tilgang vil kræve et større afprøvningsprojekt for at vurdere anvendeligheden.

Stadig mangler der dog mere forskning i forskellige aspekter af eDNA-metoden før brug. Herunder:

- Kan eDNA antages at være homogent fordelt i vandige miljøer- og hvilke faktorer påvirker dette?
- Hvilke abiotiske faktorer har betydning for eDNA's holdbarhed, herunder fx pH og vandløbsmorfologi? eDNA kan enten nedbrydes i mindre fragmenter, hvilket vanskeliggør påvisningen til art pga. en meget kort sekvens, og det kan nedbrydes kemisk eller adsorbere til andre partikler.
- Udvikling af standardprocedurer til håndtering af usikkerheder ved de forskellige stadier i processen, dvs. samplingdesign og prøvetagning, feltindsamling, laboratoriehåndtering, PCR-opformering etc., samt kvantificering af disse usikkerheder og sammenligning med usikkerhederne forbundet med de konventionelle overvågningsmetoder.

- Udvikling af standardprocedurer for bioinformatikken, den statistiske analyse og modellering af data, fx hvor stringent skal man være i forbindelse med at filtrere sekvenser væk, der kun forekommer få gange? Det kunne jo være sjældne arter og ikke sekventeringsfejl.

7 Referencer

Alsos IG, Lammers Y, Yoccoz NG, Jørgensen T, Sjögren P, Gielly L, Edwards ME. 2018. Plant DNA metabarcoding of lake sediments: How does it represent the contemporary vegetation. Plos One. doi.org/10.1371/journal.pone.0195403

Amphi-Consult. 2016. Kortlægning af stor kærguldsmed og lys skivevandkalv i Holmegaard Mose. Udarbejdet til projekt LIFEraisedbogs, LIFE14 NAT/DK/000112.

Andersen JH, Kallenbach E, Hesselsøe M, Knudsen SW, Rask Møller P, Bekkevold D, Klitgaard Hansen B, Thaulow J. 2016. Steps toward nation-wide monitoring of non-indigenous species in Danish marine waters under the Marine Strategy Framework Directive. NIVA rapport L. nr. 7022-2016 DK3, appendix B.

Andersen K, Bird KL, Rasmussen M, Haile J, Breuning-Madsen H, Kjær KH, Orlando L, Gilbert MTP, Willerslev E. 2011. Meta-barcoding of 'dirt' DNA from soil reflects vertebrate biodiversity. Molecular Ecology. Doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05261.x

Andersen LW. 2019. DNA/-analyse af formodede odder-ekskremerter og blodprøver fra udsatte oddere i Vestsjælland. Notat fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi Dato: 27. februar 2019.

Andersen LW, Søgaard B. 2017a. DNA-analyse af mulige odder-ekskremerter indsamlet på Fyn. 2017. Notat fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi Dato: 12. juni 2017.

Andersen LW, Søgaard B. 2017b. DNAanalyse af mulige odder-ekskremerter indsamlet på Sjælland. Notat fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi Dato: 7. august 2017.

Andersen LW, Wiberg-Larsen P. 2017. Undersøgelse af forekomsten af flodperlemusling (*Margaritifera margaritifera*) i Varde Å ved brug af eDNA. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 28 s. - Videnskabelig rapport fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi nr. 224.

Andersen LW, Søgaard B, Johansson LS, Wiberg-Larsen P. 2012. Anvendelse af eDNA-metoder i NOVANA-artsovervågningen: Muligheder og begrænsninger. Notat fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi Dato: 5. juni 2012. 22 s.

Andersen LW, Søgaard B, Therkildsen OR, Madsen AB. 2018. Pilotprojekt: Spring af forekomst af odder, *Lutra lutra*, ved anvendelse af eDNA. Notat fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi: 13 s.

Andres C, Franke F, Bleidorn C, Bernhard D, Schlegel M. 2014. Phylogenetic analysis of the *Lacerta agilis* subspecies complex. Systematics and Biodiversity 12: 43-54.

Anonymous. 1992. Directive 92/43 of the Council of the European Community on the Conservation of habitats and wild fauna and flora. Brussels, European Community.

Audisio P, Brustel H, Carpaneto GM, Coletti G, Mancini E, Trizzino M, Antonini G, De Biase A. 2009. Data on molecular taxonomy and genetic diversification of the European Hermit beetles, a species complex of endangered insects (Coleoptera: Scarabaeidae, Cetoniinae, Osmoderma). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 47: 88–95.

Baagøe HJ, Jensen TS (eds.), 2007. *Dansk Pattedyratlas*. Gyldendal. 392 s.

Beatty GE, Reid N, Provan J. 2014. Retrospective genetic monitoring of the threatened Yellow marsh saxifrage (*Saxifraga hirculus*) reveals genetic erosion but provides valuable insights for conservation strategies. *Diversity and Distributions* 20: 529–537.

Belogradova I, Grauda D, Jakobsone G, Rashal I. 2012. Usability of retrotransposone-based molecular marker system to assess genetic diversity of *Liparis loeselii*. *Acta Biologica Universitatis Daugavpiliensis* 12: 40-43.

Biggs J, Ewald N, Valentini A, Gaboriaud C, Dejean T, Griffiths RA, Foster J, Wilkinson JW, Arnell A, Brotherton P, Williams P, Dunn F. 2015. Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation* 183: 19–28.

Bilton DT, Ribera I. 2017. A revision of *Meladema* diving beetles (Coleoptera, Dytiscidae), with the description of a new species from the central Mediterranean based on molecules and morphology. *ZooKeys* 702: 45–112.

Blackman RC, Mächler E, Altermatt F, Arnold A, Beja P, Boets P, Egeter B, Elbrecht V, Filipe A, Jones J, Macher J, Majaneva M, Martins F, Murria C, Meissner K, Pawlowski J, Schmidt Yanez P, Zizska V, Leese F, Price B, Deiner K. 2019. Advancing the use of molecular methods for routine freshwater macroinvertebrate biomonitoring—the need for calibration experiments. *Metabarcoding and Metagenomics* 3: 49–57.
<https://doi.org/10.3897/mbmg.3.34735>

Blank M, Jürss K, Bastrop R. 2008. A mitochondrial multigene approach contributing to the systematics of the brook and river lampreys and the phylogenetic position of *Eudontomyzon mariae*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 65: 2780-2790.

Blom LB. 2017. The use of environmental DNA (eDNA) in biological monitoring of the Natterjack toad (*Epidalea calamita*). Projekt udført på Ekoll AB and Lund University, Department of Biology, Sweden. 32 s.

Bohmann K, Gopalakrishnan S, Nielsen M, Bay Nielsen LDS, Jones G, Streicker DG, Gilbert MTP. 2018. Using DNA metabarcoding for simultaneous inference of common vampire bat diet and population structure. *Molecular Ecological Resources* 00: 1–14.

Böhme MU, Fritz U, Kottenko T, Liubisavlevic K, Tzankov N, Berendonk TU. 2007. Phylogeography and cryptic variation within the *Lacerta viridis* complex (Lacertidae, Reptilia). *Zoologica Scripta* 36: 119–131.

Bonk M, Bury S, Hofman S, Szymura JM, Pabijan M. 2012. A reassessment of the northeastern distribution of *Rana dalmatina* (Bonaparte, 1840). *Herpetology Notes* 5: 345-354.

- Bright PW, Morris PA. 1990. Habitat requirements of dormouse *Muscardinus avellanarius* in relation to woodland management in Southwest England. *Biological Conservation* 54: 307–326.
- Brost BM, Mosher BA, Davenport KA. 2018. A model-based solution for observational errors in laboratory Studies. *Molecular Ecology Resources* 18: 580–589.
- Burzyński A, Soroka M, Mioduchowska M c, Kaczmarczyk A, Sell J. 2017. The complete maternal and paternal mitochondrial genomes of *Unio crassus*: Mitochondrial molecular clock and the overconfidence of molecular dating. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 107: 605–608.
- Buxton AS, Groombridge JJ, Zakaria NB, Griffiths RA. 2017. Seasonal variation in environmental DNA in relation to population size and environmental factors. *Scientific Reports* 7: 46294.
- Cristescu ME, Hebert PDN. 2018. Uses and Misuses of Environmental DNA in Biodiversity Science and Conservation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 49: 209–230.
- Cserkés T, Aczél-Fridrich Z, Hegyeli Z, Sugár S, Czabán D, Horváth O, Sramkó G. 2015. Rediscovery of the Hungarian birch mouse (*Sicista subtilis trizona*) in Transylvania (Romania) with molecular characterisation of its phylogenetic affinities. *Mammalia* 79(2): 215–224.
- Cuenca A, Petersen G, Seberg O, Jahren AH. 2012. Genes and processed paralogs co-exist in plant mitochondria. *Journal of Molecular Evolution* 74: 158–169.
- Cuenca A, Ross TG, Graham SW, Barrett CF, Davis JI, Seberg O, Petersen G. 2016. Localized Retroprocessing as a Model of Intron Loss in the Plant Mitochondrial Genome. *Genome Biology and Evolution* 8(7): 2176–2189.
- Culling MA, Côté IM. 2005. Genetics and Ecology of Spined Loach in England: Implications for Conservation Management. Environment Agency Science Report Series No. SC000026/SR.
- Culling MA, Janko K, Boron A, Vasil'ev VP, Côté IM, Hewitt GM. 2006. European Colonization by the Spined Loach (*Cobitis taenia*) from Ponto Caspian Refugia Based on Mitochondrial DNA Variation. *Molecular Ecology*, 15: 73–190. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02790.x>
- Dauphin B, Farrar DR, Maccagni A, Grant JR. 2017. A worldwide molecular phylogeny provides new insight on cryptic diversity within the moonworts (*Botrychium* s.s., Ophioglossaceae). *Systematic Botany* 42. <http://dx.doi.org/10.1600/036364417X696483>.
- Davis AJ, Williams KE, Snow NP, Pepin KM, Piaggio AJ 2018. Accounting for observation processes across multiple levels of uncertainty improves inference of species distributions and guides adaptive sampling of environmental DNA. *Ecology and Evolution* 8:10879–10892. Doi: 10.1002/ece3.4552
- de Vere N, Rich TCG, Ford CR, Trinder SA, Long C, Moore CW, Satterthwaite D, Davies H, Allainguillaume J, Ronca S, Tatarinova T, Garbett H, Walker K, Wilkinson MJ. 2012. DNA barcoding the native flowering plants and conifers of Wales. *Plos One* 7: e37945.

Degani G, Goldberg T, Gasith A, Elron E, Nevo E. 2013. DNA variations of the green toad *Pseudepidalea viridis* (syn. *Bufo viridis*) from various habitats. *Zoological Studies* 52 (18): 1–15.

Deiner K, Altermatt F. 2014. Transport Distance of Invertebrate Environmental DNA in a Natural River. *Plos One* 9, 2: e88786.

Dejean T, Valentini A, Miquel C, Taberlet P, Bellemain E, Miaud C. 2012. Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog, *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology* 49 (4): 953–959.

Docker MF, Youson JH, Beamish RJ, Devlin RH. 1999. Phylogeny of the lamprey genus *Lampetra* inferred from mitochondrial cytochrome b and ND3 gene sequences. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56: 2340–2349.

Dolgener N, Schröder C, Tiedemann R. 2012. Genetic population structure of the Fire-bellied toad *Bombina bombina* in an area of high population density: implications for conservation. *Hydrobiologia* 689: 111–120.

Dumont HJ, Vierstraete A, Vanfleteren JR. 2007. A revised molecular phylogeny of the Calopteryginae (Zygoptera: Calopterygidae). *Odonatologica* 36: 365–372.

Elia G, Decaro N, Martella V, Cirone F, Lucente MS, Lorusso E, Di Trani L, Buonavoglia C. 2006. Detection of canine distemper virus in dogs by real-time RT-PCR. *Journal of Virological Methods* 136: 171–176.

Elmeros M, Bussenius N. 2002. Influence of selection of bank side on standard method otter surveys. – IUCN Otter Specialist Group Bulletin, 19: 67–74.

Elmeros M, Dahl Møller J, Søgaard B, Therkildsen OR. 2019. Overvågning af birkemus, *Sicista betulina*. Teknisk anvisning til ekstensiv overvågning fra DCE's Fagdata-center for Biodiversitet og Terrestrisk natur; Nr. A03, Ver.2. Revideret 27.02.2019. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2019. 10 s.

Espanhol R, Almeida PR, Alves MJ. 2007. Evolutionary history of lamprey paired species *Lampetra fluviatilis* (L.) and *Lampetra planeri* (Bloch) as inferred from mitochondrial DNA variation. *Molecular Ecology* 16: 1909–1924.

Fay MF, Bone R, Cook P, Kahandawala I, Greensmith J, Harris S, Pedersen HÆ, Ingrouille MJ, Lexer C. 2009. Genetic diversity in *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae) with a focus on northwestern Europe, as revealed by plastid DNA length polymorphisms. *Annals of Botany* 104: 517–525.

Ficetola GF, Taberlet P, Coissac E. 2016. How to limit false positives in environmental DNA and metabarcoding? *Molecular Ecology Resources* 16: 604–607.

Fijarczyk A, Nadachowaska K, Hofman S, Litvinchuk SN, Babik W, Stuglik M, Gollmann G, Šcholeva L, Cogălniceanu D, Vukov T, Džukić G, Szymyra JM. 2011. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the European fire-bellied toads *Bombina* and *Bombina variegata* supports their independent histories. *Molecular Ecology* 20: 3381–3398.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3: 294–299.

Foote AD, Thomsen PF, Sveegaard S, Wahlberg M, Kielgast J, Kyhn LA, Salting AB, Galatius A, Orlando L, Gilbert MTP. 2012. Investigating the Potential Use of Environmental DNA (eDNA) for Genetic Monitoring of Marine Mammals. *Plos One* V. 7, Is. 8: e41781

Fremier AK, Strickler KM, Parzych J, Powers S, Goldberg CS. 2019 Stream transport and retention of environmental DNA pulse releases in relation to hydrogeomorphic scaling factors. *Environmental Science & Technology* 53: 6640–6649. Doi: 10.1021/acs.est.8b06829

Frosch C, Kraus RHS, Angst C, Allgöwer R, Michaux J, Teubner J, Nowak C, Canestrelli D. 2014. The genetic legacy of multiple beaver reintroductions in Central Europe. *PLoS One* 9(5):e97619. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097619>

Galan M, Pons J-B, Tournayre O, Pierre E, Leuchtmann M, Pontier D, Charbonnel N. 2017. Metabarcoding for the parallel identification of several hundred predators and their prey: Application to bat species diet analysis. *Molecular Ecology Resources* 18: 474–489.

Gargiulo R, Ilves A, Kaart T, Fay MF, Kull T. 2018. High genetic diversity in a threatened clonal species, *Cypripedium calceolus* (Orchidaceae), enables long-term stability of the species in different biogeographical regions in Estonia. *Botanical Journal of the Linnean Society* 186: 560–571.

Geist J, Wunderlich H, Kuehn R. 2008. Use of mollusk shells for DNA-based molecular analyses. *Journal of Molluscan Studies* 74: 337-343.

Goldberg I, Wind P, Ejrnæs R, Nygaard B, Damgaard C. 2019. Overvågning af blank seglmos, *Hamatocaulis vernicosus*. Teknisk anvisning til intensiv overvågning fra DCE's Fagdata-center for Biodiversitet og Terrestrisk natur; Nr. A41, Ver.3. Revideret 14.03.2019. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2019. 16 s.

Guillera-Arroita G. 2017. Modelling of species distributions, range dynamics and communities under imperfect detection: advances, challenges and opportunities. *Ecography* 40: 281–295. Doi: 10.1111/ecog.02445

Guillera-Arroita G, Lahoz-Monfort JJ, van Rooyen AR, Weeks AR, Tingley R. 2017. Dealing with false-positive and false-negative errors about species occurrence at multiple levels. *Methods in Ecology and Evolution* 8: 1081–1091.

Gullberg A, Tegelstrom H, Olsson M. 1997. Microsatellites in the Sand Lizard (*Lacerta agilis*): Description, Variation, Inheritance, and Applicability. *Biochemical Genetics* 35(7/8): 281–295.

Gustavson MS, Collins PC, Finarelli JA, Egan D, Conchúir RÓ, Wightman GD, King JJ, Gauthier DT, Whelan K J, Carlsson EL, Carlsson J. 2015. An eDNA assay for Irish *Petromyzon marinus* and *Salmo trutta* and field validation in running water. *Journal of Fish Biology* 87: 1254–1262.

- Gvoždík V, Moravec J, Klütsch C, Kotlík P. 2010. Phylogeography of the Middle Eastern tree frogs (*Hyla*, Hylidae, Amphibia) as inferred from nuclear and mitochondrial DNA variation, with a description of a new species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 1146–1166.
- Hall EM, Crespi EJ, Goldberg CS, Brunner JL. 2016. Evaluating environmental DNA-based quantification of ranavirus infection in wood frog populations. *Molecular Ecology Resources* 16: 423–433.
- Hammond JA, Pomeroy PP, Hall AJ, Smith VJ. 2005. Identification and real-time PCR quantification of Phocine distemper virus from two colonies of Scottish grey seals in 2002. *Journal of General Virology* 86: 2563–2567.
- Hammond JA, Pomeroy PP, Hall AJ, Smith VJ. 2005. Identification and real-time PCR quantification of Phocine distemper virus from two colonies of Scottish grey seals in 2002. *Journal of General Virology* 86: 2563–2567.
- Harper LR, Handley LL, Hahn C, Boonham N, Rees HC, Lewis E, Adams IP, Brotherton P, Phillips S, Hänfling B. 2019a. Generating and testing ecological hypotheses at the pondscape with environmental DNA metabarcoding: a case study on a threatened amphibian. *Environmental DNA*: 1–16. Doi: 10.1002/edn3.57
- Harper LR, Handley LL, Carpenter AI, Ghazalid M, Di Muria C, Macgregor CJ, Logan TW, Law A, Breithaupt T, Read DS, McDevitt AD, Hänfling B. 2019b. Environmental DNA (eDNA) metabarcoding of pond water as a tool to survey conservation and management priority mammals. *Biological Conservation* 238: 108225. Doi: 10.1016/j.biocon.2019.108225.
- Hausmann A, Haszprunar G, Segerer AH, Speidel W, Behounek G, Hebert PDN. 2011. Now DNA-barcoded: the butterflies and larger moths of Germany (Lepidoptera: Rhopalocera, Macroheterocera). *Spixiana* 34 1: 47–58.
- Hauswaldt JS, Schröder C, Tiedemann R. 2007. Nine new tetranucleotide microsatellite markers for the fire-bellied toad (*Bombina orientalis*). *Molecular Ecology Notes* 7: 49–52.
- Hawlitschek O, J. Morinière J, Dunz A, Franzen M, Rödder D, Glaw F, Haszprunar G. 2016. Comprehensive DNA barcoding of the herpetofauna of Germany. *Molecular Ecology Resources* 16: 242–253.
- Hedenäs L, Eldenäs P. 2007. Cryptic speciation, habitat differentiation, and geography in *Hamatocaulis vernicosus* (Calliergonaceae, Bryophyta). *Plant Systematics and Evolution* 268: 131–145.
- Heers T, van Neer A, Becker A, Gross S, Anderson Hansen K, Siebert U, Abdulmawjood A. 2018. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as a confirmatory and rapid DNA detection method for grey seal (*Halichoerus grypus*) predation on harbour porpoises (*Phocoena phocoena*). *Journal of Sea Research* 140: 32–39.
- Hendrich L, Morinière J, Haszprunar G, Hebert PD, Hausmann A, Köhler F, Balke M. 2015. A comprehensive DNA barcode database for Central European beetles with a focus on Germany: adding more than 3500 identified species to BOLD. *Molecular Ecology Resources* 15: 795–818.

Herder JE, Valentini A, Bellemain E, Dejean T, van Delft JJCW, Thomsen PF, Taberlet P. 2014. Environmental DNA - a review of the possible applications for the detection of (invasive) species. Stichting RAVON, Nijmegen. Report 2013-104.

Herr J, Schley L. 2009. Barbed wire hair traps as a tool for remotely collecting hair samples from beavers (*Castor sp.*) *Lutra* 52(2): 123–127.

Hofman S, Szymura JM. 2007. Limited mitochondrial DNA introgression in a *Bombina* hybrid zone. *Biological Journal of the Linnean Society* 91: 295–306.

Hume B. 2013. The evolutionary ecology of lampreys (Petromyzontiformes). PhD thesis.

Igawa T, Kurabayashi A, Nishioka M, Sumida M. 2006. Molecular phylogenetic relationship of toads distributed in the Far East and Europe inferred from the nucleotide sequences of mitochondrial DNA genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38: 250–260.

Jerde CL, Mahon AR, Chadderton WL, Lodge DM. 2011. “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters* 4 (2): 150–157.

Johansen LS, Wind P. 2018. Overvågning af Liden Najade (*Najas flexilis*). Teknisk anvisning til overvågning fra DCE's Fagdata-centre for Ferskvand og for Biodiversitet og Terrestrisk natur; Nr. S11, Ver.2. Revideret 19.06.2018 Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2018. 14 s.

Johansen LS, Wiberg-Larsen P, Wind P. 2011. Overvågning af vandranke (*Luronium natans*). Teknisk anvisning til overvågning fra DCE's Fagdata-centre for Ferskvand og for Biodiversitet og Terrestrisk natur; Nr. S12, Ver.1. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2011. 19 s.

Joyce DA, Pullin AS. 2001. Phylogeography of the marsh fritillary *Euphydryas aurinia* (Lepidoptera: Nymphalidae) in the UK. *Biological Journal of the Linnean Society* 72: 129–141.

Källersjö M, Proschwitz T, Lundberg S, Eldanäs P, Erséus C. 2005. Evaluation of ITS rDNA as a complement to mitochondrial gene sequences for phylogenetic studies in freshwater mussels: an example using Unionidae from north-western Europe. *Zoologica Scripta* 34: 415–424.

Kalyabina SA, Milto KD, Ananjeva NB, Legal L, Joger U, Wink M. 2001. Phylogeography and systematics of *Lacerta agilis* based on mitochondrial cytochrome b gene sequences: First results. *Russian Journal of Herpetology* 8: 149–158.

Koelewijn HP, Pérez-Haro M, Jansman HAH, Boerwinkel MC, Bovenschen J, Lammertsma DR, Niewold FJJ, Kuiters AT. 2010. The reintroduction of the Eurasian otter (*Lutra lutra*) into the Netherlands: hidden life revealed by non-invasive genetic monitoring. *Conservation Genetics* 11: 601–614.

Koese B, Smit JT, Colijn E, Heijerman Th, Noordijk J, Kleukers R, Vorst O, Beentjes K. 2013. Urgent bedreigde typische ongewervelden in het NEM in 2013. – EIS-Nederland, Leiden.

Korb SK, Bolshakov LV, Fric ZF, Bartanova A. 2016. Cluster biodiversity as a multidimensional structure evolution strategy: checkerspot butterflies of the group *Euphydryas aurinia* (Rottemburg, 1775) (Lepidoptera: Nymphalidae). *Systematic Entomology* 41: 441–457.

Kress WJ, Erickson DL. 2007. A two-locus global DNA barcode for land plants: the coding *rbcL* gene complements the non-coding *trnH-psbA* spacer region. *Public Library of Science ONE*, e508. Doi: 10.1371/journal.pone.0000508.

Książkiewicz-Parulska Z. 2017. The impact of temperature on activity patterns of two Vertiginid micro-molluscs (Mollusca: Gastropoda) in conditions of high, constant humidity. *American Malacological Bulletin* 35(2): 170–174.

Lacoursière-Roussel A, Dubois Y, Normandeau E, Bernatchez L. 2016. Improving herpetological surveys in eastern North America using the environmental DNA method. *Genome* 59: 991–1007.

Lampa S, Mihoub J-B, Gruber B, Klenke R, Henle K. 2015. Non-Invasive Genetic Mark-Recapture as a means to study population sizes and marking behaviour of the elusive Eurasian otter (*Lutra lutra*). *Plos One*. Doi: 10.1371/journal.pone.0125684.

Leese F, Altermatt F, Bouchez A, Ekrem T, Hering D, Meissner K, Mergen P, Pawlowski J, Piggott J, Rimet F, Zimmermann J (2016) DNAqua-Net: Developing new genetic tools for bioassessment and monitoring of aquatic ecosystems in Europe. *Research Ideas and Outcomes* 2: e11321.

<https://doi.org/10.3897/rio.2.e11321>

Les DH, Sheldon SP, Tippery NP. 2010. Hybridization in Hydrophiles: Natural Interspecific hybrids in *Najas* (Hydrocharitaceae). *Systematic Botany* 35(4): 736–744.

Les DH, Tippery NP. 2013. In time and with water ... the systematics of alismatid monocotyledons. In: *Early events in Monocot Evolution*. Ed. Paul Wilkin. Publisher: Cambridge University Press.

<https://doi.org/10.1017/CBO9781139002950.007>

Liu Y, Cox CJ, Wang W, Goffinet B. 2014. Mitochondrial phylogenomics of early land plants: Mitigating the effects of saturation, compositional heterogeneity, and codon-usage bias. *Systematic Biology* 63: 862–878.

Liu Y, Moskwa NL, Goffinet B. 2012. Development of eight mitochondrial markers for funariaceae (Musci) and their amplification in other mosses. *American Journal of Botany*: e62–e65.

Lorch JM, Meteyer CU, Behr MJ, Boyles JG, Cryan PM, Hicks AC, Ballmann AE, Coleman JTH, Redell DN, Reeder DM, Blehert DS. 2011. Experimental infection of bats with *Geomyces destructans* causes white-nose syndrome. *Nature* 480: 376–379. Doi: 10.1038/nature10590

Lopes CM, Sasso T, Valentini A, Dejean T, Martins M, Zamudio KR, Haddad CFB. 2017. eDNA metabarcoding: a promising method for anuran surveys in highly diverse tropical forests. *Molecular Ecology Resources* 17: 904–914.

Lugg WH, Griffiths J, van Rooyen AR, Weeks AR, Reid Tingley R. 2018. Optimal survey designs for environmental DNA sampling. *Methods in Ecology and Evolution* 9: 1049–1059.

Mai S, Weinhardt M, Allgöwer R, Merker S. 2018. Recolonizing lost habitat—how European beavers (*Castor fiber*) return to south-western Germany. *Mammal Research* 63: 255–265.

Maitra SS, Kumar B, Ghosh SK, Tiwary BK. 2015. Cross-reactivity of prokaryotic 16S RNA gene-specific primers with genomes from eukaryotic organisms from marshlands. *Journal of Biology and Nature* 2(2): 58–68.

Manukjanová A, Košnar J, Kučera J. 2018. Microsatellite primers for the cryptic species of the moss *Hamatocaulis vernicosus* and methods for their quick barcoding. *Journal of Bryology* 40: 302–305.

Martin EA, Heurich M, Müller J, Bufka L, Oleg Bublik O, Fickel J. 2017. Genetic variability and size estimates of the Eurasian otter (*Lutra lutra*) population in the Bohemian Forest Ecosystem. *Mammalian Biology* 86: 42–47.

Mioduchowska M, Kaczmarczyk A, Zając K, Zając T, Sell J. 2016. Gender-Associated mitochondrial DNA heteroplasmy in somatic tissues of the endangered freshwater mussel *Unio crassus* (Bivalvia: Unionidae): Implications for sex identification and phylogeographical studies. *Journal of Experimental Zoology Part A Ecological Genetics and Physiology* 325: 610–625.

Mouton A, Mortelliti A, Grill A, Sara M, Kryštufek B, Juškaitis R, Latinne A, Amori G, Randi R, Büchner S, Schulz B, Ehlers S, Lang J, Adamik P, Verbeylen G, Dorenbosch M, Trout R, Elmeros M, Aloise G, Mazzoti S, Matur F, Poitevin F, Michaux JR. 2017. Evolutionary history and species delimitations: a case study of the hazel dormouse, *Muscardinus avellanarius*. *Conservation Genetics* 18: 181–196.

Mucci N, Randi E. 2007. Sex identification of Eurasian otter (*Lutra lutra*) non-invasive DNA samples using ZFX/ZFY sequences. *Conservation Genetics* 8: 1479–1482.

Mutanen M, Kivelä SM, Vos RA, Doorenweerd C, Ratnasingham S, Hausmann A, Huemer P, Dincă V, Van Nieuwerkerken EJ, Lopez-Vaamonde C, Vila R, Aarvik L, Decaëns T, Efetov KA, Herbert PDN, Johnsen A, Karsholt O, Pentinsaari M, Rougerie R, Segerer A, Tarmann G, Zahiri R, Godfray CJ. 2016. Species-Level Para- and Polyphyly in DNA Barcode Gene Trees: Strong Operational Bias in European Lepidoptera. *Systemic Biology* 65: 1024–1040.

Møller JD. 2012. Forvaltningsplan. Beskyttelse og forvaltning af birkemus, *Sicista betulina*, og dens levesteder i Danmark. - Miljøministeriet, Naturstyrelsen. 29 s.

Møller JD, Baagøe HJ, Degn HJ. 2013. Forvaltningsplan for flagermus. Naturstyrelsen, Miljøministeriet: 147s. ISBN978-87-7279-407-5 (WEB)

Møller JD, Asbirk S, Baagøe HJ, Håkansson B & Jensen TS 2011. Projekt Birkemus. - Naturhistorisk Museum, Århus. 76 s.

Nekola JC, Chiba S, Coles BF, Drost CA, von Proschwitz T, Horsák M. 2018. A Phylogenetic Overview of the Genus *Vertigo* O. F. Müller, 1773 (Gastropoda: Pulmonata: Pupillidae: Vertigininae). *Malacologia* 62(1): 21–161.

Ohira H, Sato K, Tsutsumi T, Kaneko S, Choi H-J. 2018. DNA barcoding suggested the existence of cryptic species and high biodiversity of South Korean pseudoscorpions (Arachnida, Pseudoscorpiones). *Journal of Asia-Pacific Biodiversity*. <https://doi.org/10.1016/j.japb.2018.04.005>.

Özdemir N, Gül S, Poyarkov Jr. NA, Kurtup B, Tosunoğlu M, Doglio S. 2014. Molecular systematics and phylogeography of *Bufotes variabilis* (syn. *Pseudepidalea variabilis*) (Pallas, 1769) in Turkey. *Turkish Journal of Zoology* 38: 412-420.

Parsons KM, Everett M, Dahlheim M, Park L. 2018. Water, water everywhere: environmental DNA can unlock population structure in elusive marine species. <http://rsos.royalsocietypublishing.org/> on August 10, 2018.

Peredo EL, King UM, Les DH. 2013. The plastid genome of *Najas flexilis*: adaptation to submersed environments is accompanied by the complete loss of the NDH complex in an aquatic angiosperm. *PLoS One* 8, e68591

Pereira AM, Almada VC, Doadrio I. 2011. Genetic relationships of brook lamprey of the genus *Lampetra* in a Pyrenean stream in Spain. *Ichthyological Research* 58: 278–282.

Pillon Y, Qamaruz-Zaman F, Fay MF, Hendoux F, Piquot Y. 2007. Genetic diversity and ecological differentiation in the endangered fen orchid (*Liparis loeselii*). *Conservation Genetics* 8: 177–184.

Potter C, de Vere N, Jones LE, Ford CR, Hegarty MJ, Hodder KH, Diaz A, Franklin EL. 2019. Pollen metabarcoding reveals broad and species-specific resource use by urban bees. *PeerJ* 7:e5999. DOI 10.7717/peerj.5999

Prigioni C, Remonti L, Balestrieri A, Sgrosso S, Priore G, Mucci N, Randi E. 2006. Estimation of European Otter (*Lutra lutra*) population size by fecal DNA typing in southern Italy. *Journal of Mammalogy* 87: 855–858.

Rahbari R, Tannahill K, Tobin C, Robotham P, Nicholl ID. 2017. The identification of a novel, high frequency variant in the Cytochrome b gene in an isolated population of a rare fish, spined loach, *Cobitis taenia*, in England: A population worth protecting? *Open Journal of Ecology* 7: 193–198. Doi 10.4236/oje.2017.73014.

Reed JZ, Tollit DJ, Thompson PM, Amos W. 1997. Molecular scatology: the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to seal faeces. *Molecular Ecology* 6: 225–234.

Reuther C, Dolch D, Green R, Jahl J, Jefferies DJ, Krekemeyer A, Kucerova M, Madsen AB, Romanowski J, Roche K, Ruiz-Olmo J, Teubner J, Trindade A. 2000. Surveying and monitoring distribution and population trends of the Eurasian otter (*Lutra lutra*). *Habitat* 12. 148 pp.

Rougemont Q, Gagnaire P-A, Perrier C, Genthon C, Besnard A-L, Launey S, Evanno G. 2017. Inferring the demographic history underlying parallel genomic divergence among pairs of parasitic and nonparasitic lamprey ecotypes. *Molecular Ecology* 26: 142162.

Rusin M, Lebedev V, Matrosova V, Zemlemrova E, Lopatina N, Bannikova A. 2018. Hidden diversity in the Caucasian mountains: an example of birch mice (Rodentia, Sminthidae, Sicista). *HYSTERIX* 23/01/18.

Rydin C, Pedersen KR, Friis EM. 2004. On the evolutionary history of Ephedra: Cretaceous fossils and extant molecules. *Proceedings of the National Academy of Science* 101: 16571–16576.

Saarela JM, Sokoloff PC, Gillespie LJ, Consaul LL, Bull RD. 2013. DNA Barcoding the Canadian Arctic Flora: Core Plastid Barcodes (rbcL + matK) for 490 Vascular Plant Species. *Plos One* 8: e77982.

Salvidio S, Oneto F, Ottonello D, Braida L, Ferravante C, Grasselli E, Vecchione G, Canessa S, Arillo A, Cardelli M. 2014. Conservation of the Apennine yellow-bellied toad *Bombina variegata pachypus* in Liguria (NW Italy). *Herpetological Facts Journal* 1, SSN 2256-0327. Supplement 1: Proceedings of the 2nd international Scientific Conference –Workshop “Research and conservation of European herpetofauna and its environment: *Bombina*, *Emys orbicularis*, and *Coronella austriaca*”.

SAMBAH FINAL report. 2016. LIFE08 NAT/S/000261 Final Report covering the project activities from 01/01/2010 to 30/09/2015. Reporting Date 29/02/2016 LIFE+ PROJECT NAME or Acronym SAMBAH.

Schneider T, Schneider E, Schneider J, Dumont HJ. 2015. *Aeshna vercanica* sp. nov. from Iran with a new insight into the *Aeshna cyanea*-group (Odonata: Aeshnidae). *Odonatologica* 44(1/2): 81–106.

Schreiber A, Engelhorn R. 1998. Population genetics of a cyclostome species pair, river lamprey (*Lampetra fluviatilis* L.) and brook lamprey (*Lampetra planeri* Bloch). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research* 36: 85–99.

Senn H, Ogden R, Frosch C, Syruckova A, Campbell-Palmer R, Munclinger P, Durka W, Kraus RHS, Saveljev AP, Nowak C, Stubbe A, Stubbe M, Michaux J, Lavrov V, Samiya R, Ulevicius A, Rosell F. 2014. Nuclear and mitochondrial genetic structure in the Eurasian beaver (*Castor fiber*) – implications for future reintroductions. *Evolutionary Applications* 7: 654–663

Senn H, Ogden ROB, Cezard T, Gharbi K, Iqbal Z et al. 2013. Reference-free SNP discovery for the Eurasian beaver from restriction site-associated DNA paired-end data. *Molecular Ecology* 22: 3141–3150.

Serjeant AF. 2013. The ecology of great diving beetles (*Dytiscus spp.*) in the Somerset levels and moors. Ph.D. thesis, University of Sussex. 254 pp.

Sigaard P, Pertoldi C, Madsen AB, Sogaard B, Loeschcke V. 2008. Patterns of genetic variation in isolated Danish populations of the endangered butterfly, *Euphydryas aurinia*. *Biological Journal of the Linnean Society* 95: 677–687.

Sigsgaard EE, Carl H, Møller PR, Thomsen PF. 2015. Monitoring the near-extinct European weather loach in Denmark based on environmental DNA from water samples. *Biological Conservation* 183: 46–52.

Smee MR, Pauchet Y, Wilkinson P, Wee B, Singer MC, French-Constant RH, Hodgson DJ, Mikheyev AS. 2013. Microsatellites for the marsh fritillary butterfly: DeNovo transcriptome sequencing, and a comparison with amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. *Plos One* 8, e54721.

Stöck M, Dubey S, Klütsch C, Litvinchuk SN, Scheidt U, Perrin N. 2008. Mitochondrial and nuclear phylogeny of circum-Mediterranean tree frogs from the *Hyla arborea* group. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 49: 1019–1024.

Stoeckle BC, Kuehn R, Geist J. 2015. Environmental DNA as a monitoring tool for the endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera* L.): a substitute for classical monitoring approaches? *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*: 1–9.

Stukas H, Tiedemann R. 2006. Eight new microsatellite loci for the critically endangered fire-bellied toad *Bombina bombina* and their cross-species applicability among anurans. *Molecular Ecology Notes* 6: 150–152.

Swift JF, Lance RF, Guan X, Britzke ER, Lindsay DL, Edwards CE. 2018. Multifaceted DNA metabarcoding: Validation of a noninvasive, next-generation approach to studying bat populations. *Evolutionary Applications* 11: 1120–1138.

Søgaard B. 2012. Overvågning af vindelsnegle: Sumpvindelsnegl *Vertigo moulinsiana*, skæv vindelsnegl *Vertigo angustior* og kildevæld-svindelsnegl *Vertigo geyer*. Teknisk anvisning til ekstensiv overvågning fra DCE's Fagdata-center for Biodiversitet og Terrestrisk natur; Nr. A25, Ver.1. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2012. 8 s.

Søgaard B. 2017. Overvågning af grøn kølleguldsmed. Teknisk anvisning til ekstensiv overvågning fra DCE's Fagdata-center for Biodiversitet og Terrestrisk natur; Nr. A06, Ver.2. Revideret 18.04.2017. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2017. 9 s.

Søgaard B, Adrados L. 2014. Overvågning af markfirben, *Lacerta agilis*. Teknisk anvisning til ekstensiv overvågning fra DCE's Fagdata-center for Biodiversitet og Terrestrisk natur; Nr. A16, Ver.1. 01.02.2014. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2014. 8 s.

Søgaard B, Asferg T. (red.) 2007: Håndbog om arter på habitatdirektivets bilag IV – til brug i administration og planlægning. Danmarks Miljøundersøgelser, Aarhus Universitet. – Faglig rapport fra DMU nr. 635. 226 s.
<http://www.dmu.dk/Pub/FR635.pdf>

Søgaard B, Elmeros M. 2018. Overvågning af hasselmus, *Muscardinus avellanarius*. Teknisk anvisning til ekstensiv overvågning fra DCE's Fagdata-center for Biodiversitet og Terrestrisk natur; Nr. A02, Ver.3. Revideret 01.02.2018. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2018. 21 s.

Søgaard B, Fog K. 2018. Overvågning af klokkefrø. Teknisk anvisning til intensiv overvågning fra DCE's Fagdata-center for Biodiversitet og Terrestrisk natur; Nr. A15, Ver.3. Revideret 06.06.2018. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2018. 7s.

Søgaard B, Helsing F. 2017. Overvågning af Sortpletlet blåfugl, *Maculinea arion*. Teknisk anvisning til ekstensiv overvågning fra DCE's Fagdata-center for Biodiversitet og Terrestrisk natur; Nr. A10, Ver.2. Revideret 18.04.2017. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2017. 8 s.

Søgaard B, Holmen M. 2017a. Overvågning af bred vandkalv, *Dytiscus latissimus* og lys skivevandkalv, *Graphoderus bilineatus*. Teknisk anvisning til ekstensiv overvågning fra DCE's Fagdata-center for Biodiversitet og Terrestrisk natur; Nr. A05, Ver.3. Revideret 08.04.2017. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2017. 16 s.

Søgaard B, Holmen M. 2017b. Overvågning af stor kærguldsmed. Teknisk anvisning til ekstensiv overvågning fra DCE's Fagdata-center for Biodiversitet og Terrestrisk natur; Nr. A12, Ver.2. Revideret 18.04.2017. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2017. 11 s.

Søgaard B, Therkildsen OR. 2019. Overvågning af bæver, *Castor fiber*. Teknisk anvisning til intensiv/ekstensiv overvågning fra DCE's Fagdata-center for Biodiversitet og Terrestrisk natur; Nr. A14, Ver.1. 01.03.2019. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2019. 23 s.

Søgaard B, Adrados LC, Fog K. 2018a. Overvågning af padde. Teknisk anvisning til ekstensiv overvågning fra DCE's Fagdata-center for Biodiversitet og Terrestrisk natur; Nr. A17, Ver.2. Revideret 17.04.2018. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2018. 18 s

Søgaard B, Elmeros M, Baagøe HJ. 2018b. Overvågning af flagermus, Chiroptera sp. Teknisk anvisning til ekstensiv overvågning fra DCE's Fagdata-center for Biodiversitet og Terrestrisk natur; Nr. A04, Ver.3. Revideret 30.05.2018. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2018. 18 s.

Søgaard B, Elmeros M, Madsen AB. 2017. Overvågning af odde, *Lutra*. Teknisk anvisning til ekstensiv overvågning fra DCE's Fagdata-center for Biodiversitet og Terrestrisk natur; Nr. A01, Ver.1.3. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2017. 11 s.

Søgaard B, Høye TT, Helsing F, Therkildsen OR. 2019. Overvågning af hedepletvinge, *Euphydryas aurinia*. Teknisk anvisning til ekstensiv overvågning fra DCE's Fagdata-center for Biodiversitet og Terrestrisk natur; Nr. A09, Ver.3. Revideret 09.01.2019. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2019. 8 s.

Søgaard B, Martin O, Jørum P, Thomsen PF. 2015a. Overvågning af eremit, *Osmoderma eremita*. Teknisk anvisning til ekstensiv overvågning fra DCE's Fagdata-center for Biodiversitet og Terrestrisk natur; Nr. A07, Ver.2. Revideret 01.05.2015. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2015. 16 s.

- Søgaard B, Martin O, Jørum P, Thomsen PF. 2015b. Overvågning af stellas mosskorpion, *Anthrenochernes stellae*. Teknisk anvisning til ekstensiv overvågning fra DCE's Fagdata-center for Biodiversitet og Terrestrisk natur; Nr. A08, Ver.2. Revideret 01.05.2015. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2015. 16 s.
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.
- Taberlet P, Coissac E, Hajibabaei M, Rieseberg LH. 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21: 1789–1793. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x.
- Taberlet P, Bonin A, Zinger L, Coissac E. 2018. Environmental DNA for biodiversity research and monitoring. Oxford University Press. Doi:10.1093/oso/978019875220.001.0001.
- Tate, J. A. and B. B. Simpson. 2003. Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Systematic Botany* 28: 723–737.
- Teilmann J, Galatius A. 2018. Artsovervågning af sæler. Teknisk anvisning til overvågning fra DCE's Marine Fagdata-center; Nr. M16, Ver.2. Revideret 04.01.2018. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2018. 7 s.
- Teilmann J, Sveegaard S. 2012. Artsovervågning af marsvin. Teknisk anvisning til overvågning fra DCE's Marine Fagdata-center; Nr. M15, Ver.1. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2012. 7 s.
- Therkildsen OR, Helsing F, Søgaard B. 2017. Overvågning af natlyssværmer, *Proserpinus proserpina* (Pallas, 1772). Teknisk anvisning til ekstensiv overvågning fra DCE's Fagdata-center for Biodiversitet og Terrestrisk natur; Nr. A11, Ver.1. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2017. 10 s.
- Therkildsen OR. 2018. Grøn mosaikguldsmed, *Aeshna viridis*. Teknisk anvisning til ekstensiv overvågning fra DCE's Fagdata-center for Biodiversitet og Terrestrisk natur; Nr. A13, Ver.2. Revideret 22.02.2018. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2018. 7 s.
- Thomsen PF, Sigsgaard EE. 2019. Environmental DNA metabarcoding of wild flowers reveals diverse communities of terrestrial arthropods. *Ecology and Evolution* 9:1665–1679. Doi: 10.1002/ece3.4809
- 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.
- Turner CR, Uy KL, Everhart RC. 2015. Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biological Conservation* 183: 93–102.
- Ugelvig LV, Nielsen PS, Boomsma JJ, Nash DR. 2011. Reconstructing eight decades of genetic variation in an isolated Danish population of the large blue butterfly *Maculinea arion*. *BMC Evolutionary Biology* 11:201.

Ugelvig LV, Andersen A, Boomsma JJ, Nash DR. 2012. Dispersal and gene flow in the rare, parasitic Large Blue butterfly *Maculinea arion*. *Molecular Ecology* 21: 3224–3236.

Urdaci MC, Taverny C, Élie A-M, Élie P. 2014. A genetic method to differentiate *Petromyzon marinus* ammocoetes from those of the paired species *Lamprolaima fluviatilis* and *L. planeri*. *Cybium* 38: 3–7.

Utzeri VA, Schiavo G, Ribani A, Tinarelli S, Bertolini F, Bovo S, Fontanesi L. 2018. Entomological signatures in honey: an environmental DNA metabarcoding approach can disclose information on plantsucking insects in agricultural and forest landscapes. *Scientific Reports* 8:9996. Doi: 10.1038/s41598-018-27933-w

Valentini A, Taberlet P, Miaud C, Civade R, Herder J, Thomsen PF et al. 2016. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 25: 929–942.

van der Kooij J, Møller JD. 2017. Bjørkemus *Sicista betulina* i Bergslagen, Sverige: videreutvikling av påvisningsmetoder. – Naturformidling van der Kooij. 79 s.

Vanden Broeck A, Van Landuyt W, Cox K, De Bruyn L, Gyselings R, Oostermeijer G, Valentin B, Bozic G, Dolinar B, Illyés Z, Mergeay J. 2014. High levels of effective long-distance dispersal may blur ecotypic divergence in a rare terrestrial orchid. *BMC Ecology* 14:20.

Vergara M, Ruiz-González A, López de Luzuriaga J, Gómez-Moliner BJ. 2014. Individual identification and distribution assessment of otters (*Lutra lutra*) through non-invasive genetic sampling: Recovery of an endangered species in the Basque Country (Northern Spain). *Mammalian Biology* 79: 259–267.

Vörös J, Alcobendas M, Martínez-Solano I, García-París M. 2006. Evolution of *Bombina* and *Bombina variegata* (Anura: Discoglossidae) in the Carpathian Basin: a history of repeated mt-DNA introgression across species. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 38: 705–718.

Wahrmund U, Quandt D, Knoop V. 2010. The phylogeny of mosses – Addressing open issues with a new mitochondrial locus: Group I intron cob1420. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 417–426.

Wahrmund U, Rein T, Müller KF, Groth-Malonek M, Knoop V. 2009. Fifty mosses on five trees: comparing phylogenetic information in three types of non-coding mitochondrial DNA and two chloroplast loci. *Plant Systematics and Evolution* 282: 241–255.

Walker FM, Williamson CHD, Sanchez DE, Sobek CJ, Chambers CL. 2016. Species From Feces: Order-Wide Identification of Chiroptera From Guano and Other Non-Invasive Genetic Samples. *PLOS ONE* | Doi: 10.1371/journal.pone.0162342

Ware EL, Pilgrim E, May ML, Donnelly TW, Tennessen K. 2017. Phylogenetic relationships of North American Gomphidae and their close relatives. *Systematic Entomology* 42: 347–358.

White S, O'Neill D, O'Meara DB, Shores C, O'Reilly C, Harrington AP, Weyman G, Sleeman DP. 2013. A non-invasive genetic survey of otters (*Lutra lutra*) in an urban environment: A pilot study with citizen scientists. IUCN Otter Specialist Group Bulletin 30: 103–111.

Wiberg-Larsen P. 2012. Artsovervågning af flodperlemusling (*Margaritifera margaritifera*). Teknisk anvisning fra DCE's Fagdatacenter for Ferskvand; Nr. V12, Ver.1. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2012. 20 s.

Wiberg-Larsen P. 2014. Artsovervågning af lampretter. Teknisk anvisning fra DCE's Fagdatacenter for Ferskvand; V08, Ver.2. Revideret 01.08.2014. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2014. 27 s.

Wiberg-Larsen P. 2015. Artsovervågning af tykskallet malermusling, *Unio crassus*. Teknisk anvisning fra DCE's Fagdata-center for Ferskvand; Nr. V13, Ver.2. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2015. 21 s.

Wiberg-Larsen P, Johansson LS, Kristensen EA.2013a. Artsovervågning af dyndsmerling (*Misgurnus fossilis*). Teknisk anvisning fra DCE's Fagdatacenter for Ferskvand; Nr. S16/V02, Ver.3. Revideret 15.11.2013. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2013. 21 s.

Wiberg-Larsen P, Johansson LS, Kristensen EA.2013b. Artsovervågning af pigsmerling (*Cobitis taenia*). Teknisk anvisning fra DCE's Fagdatacenter for Ferskvand; Nr. S15/V09, Ver.2. Revideret 15.11.2013. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2013. 22 s.

Wiland-Szymańska J Buczkowska K Drapikowska M, Maślak M, Bączkiewicz A, Czylok A. 2016. Genetic structure and barcode identification of an endangered orchid species, *Liparis loeselii*, in Poland. Systematics and Biodiversity 14(4): 345–354.

Wilcox TM, McKelvey KS, Young MK, Sepulveda AJ, Shepard BB, Jane SF, Whiteley AR, Lowe WH, Schwartz MK. 2016. Understanding environmental DNA detection probabilities: A case study using a stream-dwelling char *Salvelinus fontinalis*. Biological Conservation 194: 209–216.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocon.2015.12.023>

Wilhelmsen H. 2004. Konsekvens vurdering i forhold til påvirkning af hasselmusen i forbindelse med motorvejsafslutning i Svendborg. Notat til Vejdirektoratet, 23 s.

Wilhelmsen H. 2011.Forvaltningsplan. Beskyttelse og forvaltning af hasselmusen, *Muscardinus avellanarius* og dens levesteder i Danmark. Naturstyrelsen, Miljøministeriet 2011, 48 s.

Wind P, Nygaard B. 2011. Overvågning af Fruesko (*Cypripedium calceolus*). Teknisk anvisning til intensiv overvågning fra DCE's Fagdata-center for Biodiversitet og Terrestrisk natur; Nr. A32, Ver.1. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2011. 13 s.

Wind P, Nygaard B. 2012. Overvågning af enkelt månerude (*Botrychium simplex*). Teknisk anvisning til intensiv overvågning fra DCE's Fagdata-center for Biodiversitet og Terrestrisk natur; Nr. A30, Ver.1. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2012. 13 s.

Wind P, Nygaard B. 2017a. Overvågning af grøn buxbaumia (*Buxbaumia viridis*). Teknisk anvisning til intensiv overvågning fra DCE's Fagdata-center for Biodiversitet og Terrestrisk natur; Nr. A40, Ver.3. Revideret 31.03.2017. Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2017. 14 s.

Wind P, Nygaard B. 2017b. Overvågning af gul stenbræk (*Saxifraga hirculus*). Teknisk anvisning til intensiv overvågning fra DCE's Fagdata-center for Biodiversitet og Terrestrisk natur; Nr. A31, Ver.2. Revideret 01.06.2017 Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2017. 19 s.

Wind P, Nygaard B. 2017c. Overvågning af mygblomst (*Liparis loeselii*). Teknisk anvisning til intensiv overvågning fra DCE's Fagdata-center for Biodiversitet og Terrestrisk natur; Nr. A33, Ver.2. Revideret 01.06.2017 Aarhus Universitet, DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, 2017. 18 s.

Winding A, Bang-Andreasen T, Hansen LH, Panitz F, Krogh PH, Krause-Jensen D, Stæhr P, Nicolaisen M, Hendriksen NB, Sapkota R, Santos S, Andersen LW. 2019. eDNA in environmental monitoring. Aarhus University, DCE – Danish Centre for Environment and Energy, Technical Report No. 133. 40 pp.

Wirta H, Várkonyi G, Rasmussen C, Kaartinen R, Schmidt NM, Herbert PDN, Barták M, Blagoev G, Disney H, Ertl S, Gjelstrup P, Gwiazdowicz DJ, Huldén L, Ilmonen J, Jakovlev J, Jaschhof M, Kahanpää J, Krogh PH, Labbee R, Lettner C, Michelsen V, Nielsen SA, Nielsen TR, Paasivirta L, Pedersen S, Pohjoism J, Salmela J, Vilkamaa P, Väre H, Von Tschirnhaus M, Roslin T. 2016. Establishing a community-wide DNA barcode library as a new tool for arctic research. *Molecular Ecology Resources* 16: 809–822.

Zancolli G, Foote A, Seymour M, Creer S. 2018. Assessing lamprey populations in Scottish rivers using eDNA: proof of concept. *Scottish Natural Heritage Research Report No. 984*.

Zeale MRK, Butlin RK, Barker GLA, Lees DC, Jones G. 2011. Taxon-specific PCR for DNA barcoding arthropod prey in bat faeces. *Molecular Ecology Resources* 11: 236–244.

Zimmermann M, Wahlberg N, Descimon H. 2000. Phylogeny of euphydryas checkerspot butterflies (Lepidoptera: Nymphalidae) based on mitochondrial DNA sequence data. *Annals of the Entomological Society of America* 93(3): 347–355.

Zinger L, Bonin A, Alsos IG, Balint M, Bik H, Boyer F, Taberlet P. 2019. DNA metabarcoding-Need for robust experimental designs to draw sound ecological conclusions. *Molecular Ecology*: 1-6. doi:10.1111/mec.15060.

Zouros E. 2013. Biparental inheritance through uniparental transmission: The Doubly Uniparental Inheritance (DUI) of mitochondrial DNA. *Evolutionary Biology* 40: 1–31.

OVERVÅGNING AF BILAG II- OG IV-ARTER BASERET PÅ EDNA

– muligheder og begrænsninger

Rapporten er en opdatering og præcisering af et tidligere notat (Andersen m.fl. 2012) omhandlende "Anvendelsen af eDNA (miljø DNA) i overvågningen". Notatet belyste de teoretiske muligheder og begrænsninger for at operationalisere anvendelsen af eDNA til identifikation af arter i NOVANA overvågningen af arter og naturtyper. I den foreliggende rapport er formålet at gennemgå de teoretiske muligheder for at benytte eDNA-monitering til overvågning af bilag II- og IV-arter på habitatdirektivet. Denne overvågning kan både foregå med eDNA indsamlet i forskellige medier som fx jord og vand eller med eDNA fra en målrettet indsamling af fx ekskrementer, hår eller urin, eller DNA udtaget fra selve arten.