

## Genetisk studie av uttrar

Genetisk studie av vävnadsprover och spillning från uttrar från Västernorrland och Småland



Länsstyrelsen Västernorrland avdelningen för miljö och natur

## **Genetisk studie av uttrar**

Genetisk studie av vävnadsprover och spillning från uttrar från Västernorrland och Småland

LÄNSSTYRELSEN VÄSTERNORRLAND  
Avdelningen för miljö och natur  
Telefon växel: 0611-34 92 00  
Internet: [www.lansstyrelsen.se/vasternorrland](http://www.lansstyrelsen.se/vasternorrland)

ISSN 1403-624X

Text: Naturhistoriska Riksmuseet, Enheten för miljögiftsforskning

**Petra Gustafsson och Anna Roos.**

Framsida: Utter (Foto: Anna Roos)

## Förord

Heltäckande spillningsinventeringar av utter, i Västernorrlands län, har utförts vid två tillfällen 1989-1990 samt 2002-2003 (Bisther & Norrgrann 2008). Spillningsinventeringar utförs på barmark och visar på förekomst av djur men ger ingen antalsuppskattning. För att få en uppfattning av antalet djur och föryngring genomförs normalt tidskrävande kompletterande vinterspårningar i anslutning till dessa spillningsinventeringar.

Förhoppning är att genetiska analyser av insamlad utterspillning skall göra det möjligt att övervaka uttern mera tidseffektivt men även att övervakningen kan ske på en noggrannare nivå. Populationsstrukturen och dess utveckling är viktig att förstå och kunskap om könsfördelning, släktskap, genetisk variation, ärftliga sjukdomar, nivå av bioackumulerande miljögifter, födoval, m.m. ökar möjligheterna till en adekvat bedömning av utterns situation i Västernorrland. Denna studie var ett pilotförsök i samarbetet med Naturhistoriska Riksmuseet där vi undersökte möjligheterna till att använda genetiska analyser inom miljöövervakningen. Uttern är en av länets indikatorer för miljömålet *Levande sjöar och vattendrag*. Övervakning av utter ingår i Programområde Sötvatten, Delprogram: Artövervakning i sötvattensmiljöer (Y12) (Olofsson 2009).

Frans Olofsson  
Samordningsansvarig för regionala miljöövervakningen  
Länsstyrelsen Västernorrland



## Innehållsförteckning

Förord .....	4
English summary .....	6
Inledning .....	6
Material.....	8
2.1 Muskelprov .....	10
2.2 Spillning .....	10
Metoder.....	10
3.1 Analysmetod (muskel och spillning).....	10
3.2 Databearbetning .....	10
Resultat .....	10
Diskussion.....	12
Referenser .....	13



## English summary

This study examined genetic variation in two populations of otter (*Lutra lutra*), using eight microsatellite loci, in two geographically different areas of Sweden; Västernorrland in the north and Småland in the south. Tissue samples collected during the time period 2000-2010 and faecal samples collected from both areas during the autumn of 2010 were genotyped at eight polymorphic microsatellite loci. Genetic diversity was found to be significantly higher in Västernorrland, demonstrated by higher allelic richness. Moreover, the observed  $F_{ST}$  value and the presence of two distinct groups from the population assignment test indicate that the two populations are highly differentiated. The difference in genetic diversity and the observed degree of genetic differentiation might be the result of the general bottleneck for otters in Sweden (and most other parts of Europe) during the 1950's to the 1980's. This bottleneck would in that case have had a more severe impact on the southern parts of the country than in the north. Furthermore, the species identification method used in this study on the faecal samples, proved to be successful in distinguishing between otters and minks, whose faeces can be misidentified during collection in the field.

## Inledning

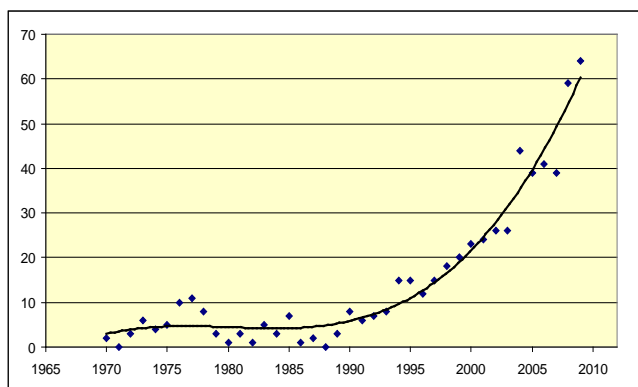
Uttern har tidigare varit vanlig i Sverige och fanns i hela landet, förutom på Gotland. Efter 1950-talet blev de dock mycket ovanliga, inte bara i Sverige utan i många europeiska länder (MacDonald 1991, Dallas & Pierny 1998). År 1968 fredades uttern i Sverige, med undantag för problemuttrar vid fiskeodlingar. Året efter, 1969, totalfredades den.

I Sverige fanns utter på 1980-talet bara i spridda områden i framför allt Norrland, Uppland och Småländska höglandet. Enstaka djur fanns i norra Bohuslän, södra Småland och i Södermanland (Olsson & Sandegren 1983, Olsson m.fl. 1984, 1988). Stora delar av sydvästra Sverige var så gott som helt tomma på utter, inklusive Skåne där Sam Erlinge gjorde delar av sina omfattande utterstudier på 1950-60-talen (Erlinge 1971). En liknande minskning av utter rapporterades från stora delar av västra Europa, med undantag för de nordöstra delarna såsom Nordnorges västkust. De områden som fortfarande höll en utterstam som inte minskade var västra och östra Europa samt i norra Skandinavien (MacDonald 1991).

När uttern var på sin lägsta numerär (slutet av 1980-talet) beräknades att det fanns ca 500 djur i Sverige, varav ett 50-tal i södra Sverige. Därefter har stammen ökat i antal. Det ses inte bara i inventeringar utan även i antalet döda uttrar som inkommer till Naturhistoriska riksmuseet (NRM) som har ökat de senaste 20 åren (Figur 1). Det indikerar att uttern ökar i antal.

Uttern tillhör lagparagrafen Statens vilt, och om en utter påträffas död ska det rapporteras till polisen. Polisen skickar den sen till Naturhistoriska riksmuseet i Stockholm, eller Statens Veterinärmedicinska anstalt. Antalet döda uttrar som skickats in till NRM har ökat markant sedan 1990, något som indikerar en ökning av populationen. Inventeringar i olika delar av landet visar på samma positiva trend.

Alla uttrar som inkommer till riksmuseet får ett unikt accessionsnummer och prover av olika organ tas och sparas i museets miljöprovvbank, inklusive prover för genetiska studier.



**Figur 1.** Antalet uttrar avlidna 1970-2010 och rapporterade till NRM (September 2011. Data NRM.)

Vid inventering av uttrar kan man konstatera förekomst av arten (i form av spillning) eller frånvaro, men inte hur många individer som finns. Genom spårning (ffa snöspårning) kan man i och för sig följa olika individer och beräkna hur många som finns, om det är hona med ungar till exempel, men det är tidskrävande och väderberoende.

Genom genetisk analys av döda uttrar och/eller spillning från uttrar kan man bland annat beräkna hur många individer det finns inom ett område. Spillning innehåller – förutom DNA från bytesdjuren – även DNA från uttern själv. Detta DNA är av mindre bra kvalitet än det som man kan extrahera ur organ, men det går att använda. Mellan 20-40% av spillningsprover från uttrar brukar gå att använda, men aldrig 100% som de från muskel eller andra organ. Analsekret brukar vara lättare att extrahera användbart DNA från än vanlig spillning (Lampa mfl 2007, Hajkova mfl 2006).

Det finns olika typer av DNA: mitokondriellt DNA (mtDNA) finns i cellplasman och ärvs endast från modernet. I denna rapport har mtDNA använts för artidentifikation av spillningsproverna.

Kärn-DNA, eller nukleärt DNA, ärvs från bägge föräldrarna. Här används endast en liten del av det nukleära DNA:t, s.k mikrosatelliter. Mikrosatelliter är korta (1-6 baspar) DNA-sekvenser som repeteras i en lång följd. Mutationshastigheten i dessa segment är hög, och därför lämpar de sig bra för studier av genetisk variation. Mikrosatelliter kan användas för t.ex. studier av släktskap, populationsstruktur och identifiering av individer.

Både mikrosatelliter och mtDNA extraheras först från proverna och därefter tillsätts s.k. primers. Primers är korta DNA-fragment som bara passar på vissa platser i en viss arts DNA. Där fastnar de och initierar en kopiering av efterliggande DNA-sekvens. Detta DNA amplifieras sedan i stora mängder med hjälp av PCR (Polymerase Chain Reaction) så att man kan använda det i analyser. Ibland är det för lite av DNA-fragmentet man vill åt för att det ska bli tillräckliga mängder för analys. Man ser då inte allelen i fråga i analysen fast den egentligen finns i individens DNA. Detta kallas allelic dropout.

För att minimera problemet med allelic dropout behövs flera replikat göras. Detta är dock väldigt tids- och resurskrävande. Hur många som krävs för ett pålitligt resultat beror på graden av allelic dropout. I denna studie fanns tid och resurser endast för 2 replikat per prov.

Insamling av spillningsprover brukar ske under vintern eftersom låg temperatur verkar konserverande, och inom 12h efter att uttern har lämnat spillning för att så lite DNA-degradering som möjligt ska hinna ske (Hajkova m fl. 2007). I denna studie samlades dock proverna in under hösten, och även äldre prover inkluderades, eftersom ett av studiens huvudsyften var att undersöka om sådana prover kan utgöra grunden för en pålitlig genetisk analys.

Syftet med denna studie var att beräkna den genetiska variationen hos uttern i två populationer i Sverige: uttrar från Västernorrland och uttrar från Småland, och studera den genetiska skillnaden mellan uttrar från de två områdena. Detta har gjorts genom analys av muskelvävnad från uttrar från Naturhistoriska riksmuseets miljöprovbank. Dessutom har spillning samlats in och analyserats med avseende på att identifiera art genom analys av mitokondriellt DNA, samt individidentifikation med hjälp av mikrosatelliter.

## Material

Vi valde att jobba utifrån två områden där vi har god kunskap om utterns förekomst, tillgång till prover i miljöprovbanken samt bra kontakter att få hjälp från: Västernorrland och norra Småland (Vimmerby kommun med omnejd) (Figur 2 med områdena inringade)



**Figur 2.** Karta över Sverige med insamlingsområdena inringade.





Figur 3. Kartor Detaljkarta över Västernorrlands insamlingsområde.

## 2.1 Muskelprov

Muskelprov från 42 uttrar i Naturhistoriska riksmuseets miljöprovbanks, insamlade mellan år 2000 och 2010 har analyserats. Uttrarna kom från Västernorrland (n=19) och Småland (n=23). De flesta uttrarna var trafikdödade. Muskelproverna för genetisk analys togs i samband med den rutinprovtagning som görs av alla uttrar som inkommer till NRM, och proverna har förvarats i 70% etanol i -25°C fram till analys.

## 2.2 Spillning

Hösten 2010 samlades spillningsprover in från ett område i Västernorrland och ett i Småland (se figur 2). Områdena inventerades vardera två gånger, under cirka en vecka per tillfälle, med 2-5 veckors mellanrum.

Under första inventeringen insamlades 50 spillningsprover från Västernorrland och 23 från Småland, och under andra omgången 56 prover i Västernorrland och 35 i Småland. Proverna lades antingen i uppmärkta plastpåsar eller i rör med kiselgel. Prover som bedömdes vara färska och med säkerhet var från utter lades i rör med kiselgel, medan dubbelprover och mindre säkra/färska prover lades i plastpåsar. Detta skedde på grund av att det inte fanns tillräckligt med rör med kiselgel för att alla prover skulle kunna förvaras i sådana. Efter provtagningen frystes proverna i väntan på extraktion.

# Metoder

## 3.1 Analysmetod (muskel och spillning)

DNA extraherades från alla prover med en GeneMole DNA-extraktionsrobot och dess vävnadsprotokoll.

Det extraherade DNA:t amplifierades med hjälp av flera olika primers, en för mtDNA och 12 primers för mikrosatelliter. Dessa primers har tidigare använts för andra genetiska studier av uttrar (Dallas och Piertny 1998, Arrendal mfl 2007, Mucci mfl 2010, Hansen och Jacobsen 2000).

Eftersom mtDNA återfinns i stort antal i varje cell är det lättare att extrahera användbara mängder än nukleärt DNA. Därför genomfördes mtDNA-testerna först. MtDNA användes för att identifiera vilken art spillningsproverna kom från. I Sverige är det framför allt minkspillning som kan förväxlas med utterspillning i fält.

Tolv primers för mikrosatelliter som har använts i andra utterstudier valdes ut och användes för muskelproverna i detta arbete. (Dallas och Piertny 1998, Arrendal mfl. 2007). Alla muskelprover analyserades med dessa tolv primers två gånger. Spillningsproverna analyserades två gånger vardera med endast åtta av dessa primers, eftersom diversiteten i muskelproverna för de resterande fyra primers inte var tillräckligt hög för att vara användbara.

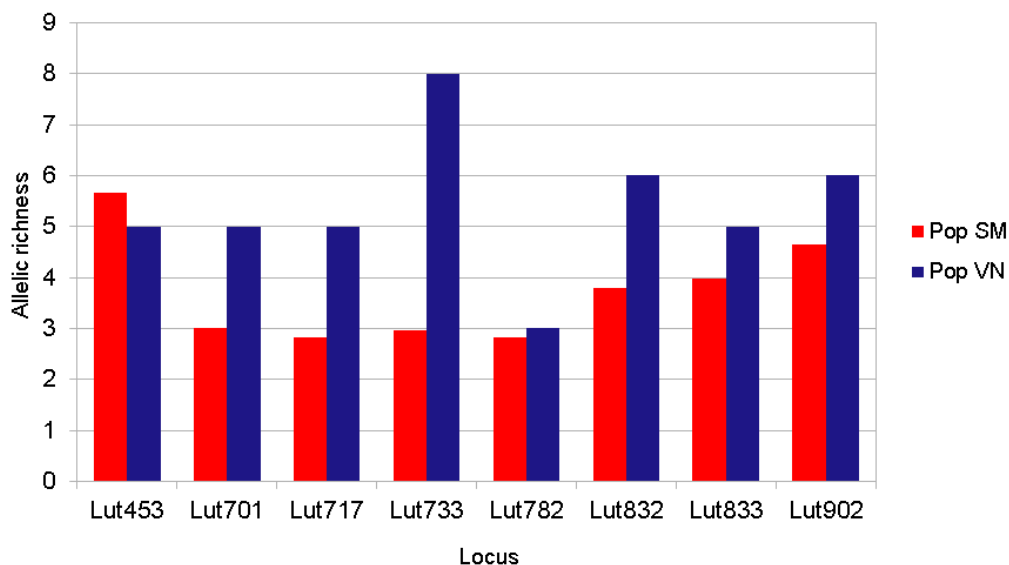
## 3.2 Databearbetning

Mikrosatelliterna identifierades med GeneMapper version 4.1. Populationsparametrarna beräknades med Arlequin version 3.01 och GraphPad användes för att utföra t-tester.

# Resultat

Av 164 insamlade spillningsprover (106 från Västernorrland och 58 från Småland) så gick det att få ut användbart mtDNA från 136 prover. Av dessa var 132 st från utter (86 från Västernorrland och 46 från Småland) och fyra var från mink (tre från Småland och en från Västernorrland).

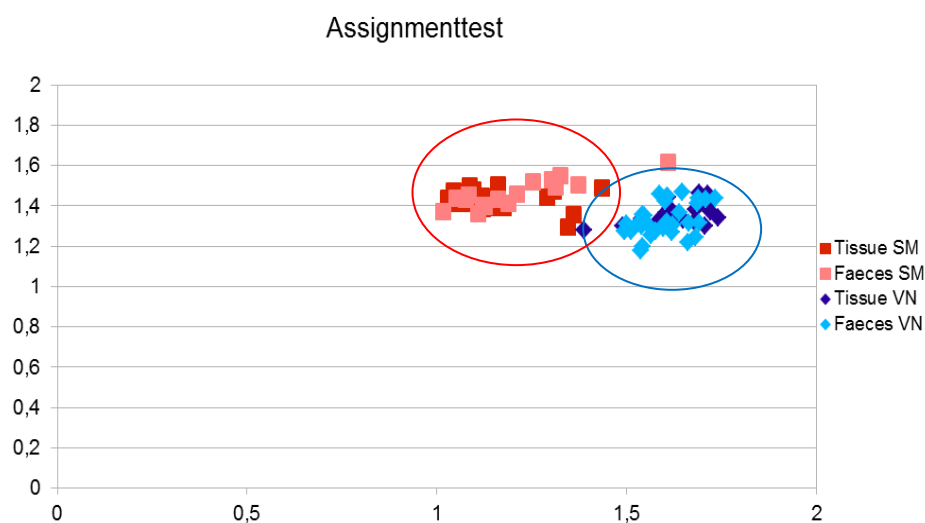
Från analys av muskelprover visade det sig att uttrarna från Västernorrland hade en större variation av alleler än de från Småland (Figur 4). Den genetiska skillnaden mellan de två populationerna hade  $F_{ST}$ -värdet 0.179, vilket var statistiskt signifikant ( $p < 0.05$ ).



**Figur 4.** Nukleärt DNA extraherat från muskel av uttrar från Småland (SM, n=23) och Västernorrland (VN, n=19). Den genetiska variationen sedd genom antal alleler är högre i Västernorrland för alla loci utom ett.

Av spillningsproverna så fungerade sammanlagt 48 prover för fyra eller fler mikrosattelliter (Västernorrland, n=31 och Småland, n=17). Det var vanligt förekommande med allelic dropout, 19.7% i genomsnitt. För muskelproverna upptäcktes ett fall av allelic dropout på 48 prover.

Utifrån både muskel- och spillningsprov gick det att identifiera vilket område ett visst prov kom från, med hjälp av ett assignment test (Excoffier mfl. 2005) (Figur 5). Ett par sk. outliers är närvarande (ett spillningsprov från SM och ett muskelprov från VN). Detta är inte ovanligt i naturen, som en följd av den variation som förekommer i populationer.



**Figur 5.** Proverna från de två områdena skiljer sig åt. Här har de analyserats med ett assignment test. Axlarna visar den logaritmerade sannolikheten för att den specifika genotypen förekommer i en viss population.

För både prover insamlade i Småland och Västernorrland gav förvaring i rör med kiselgel högre andel lyckade analyser av mikrosattelliter än vad förvaring i plastpåse; 37.1% resp 32.4% lyckade prover för SM resp VN vid förvaring i rör med kiselgel, samt 17.4% resp 17.1% lyckade prover vid förvaring i plastpåsar.

## Diskussion

Från analys av muskelprover visade det sig att uttrarna från Västernorrland hade en större variation av alleler än de från Småland. Detta kan vara en följd av att stammen i Småland när den var som minst på 1980-talet utgjordes av färre individer än stammen i Västernorrland. De två populationerna var också tydligt genetiskt åtskilda, vilket det relativt höga  $F_{ST}$ -värdet (0.179) indikerar.

Spillningsproverna samlades in under hösten, och inte vintern vilket rekommenderas (Hajkova *et al.* 2006, Lampa *et al.* 2008). Trots detta gick det att extrahera DNA ur flertalet av spillningsproverna. De flesta kunde identifieras (83%), och för 29% av spillningsproverna kunde nukleärt DNA utvinnas i tillräckliga mängder för analys med mikrosattelliter. Förvaring i rör med kiselgel efter insamling gav högre andel användbara spillningsprover än om de förvarades i plastpåsar. Detta kan dock vara en konsekvens av att de prover som bedömdes som färskast förvarades i rören med kiselgel.

Trots relativt många spillningsprover som kunde analyseras med mikrosattelliter kunde ingen populationsuppskattning genomföras, eftersom det var en hög grad av allelic dropout. Detta leder till att endast två replikat av proverna inte räcker för att uppskatta hur många individer som det finns i områdena. För att få pålitliga resultat måste proverna analyseras fler gånger.

Att det ändå var möjligt att få fram nukleärt DNA ur prover insamlade under hösten visar att det skulle vara genomförbart med en sådan studie, som då skulle kunna dra användning av erfarenheterna från denna studie. Detta skulle vara intressant att göra bland annat eftersom tidigare studier i Sverige har genomförts under vintern, då uttern kan ha ett annat aggregationsmönster än under resten av året, men också för att kunna göra en uppskattning av populationsstorleken i ett område.

I denna studie ingick inte könsbestämning av proverna. Detta är dock fullt möjligt att göra och är ett bra komplement till en sådan studie. Pga svårigheter med tidskrävande optimering av laborationsmetoder fanns inte tid till detta inom ramen för detta examensarbete.

Vår förhoppning är att erfarenheterna från denna studie kan ligga till grund för framtida studier och inventeringar av utterpopulationer i Sverige.

## Referenser

- Arrendal, Vilá & Björklund (2007) *Reliability of noninvasive genetic census of otters compared to field censuses*. Conservation Genetics 8:1097-1107
- Bisther, M. & Norrgrann, O. (2008) Uttern I Västernorrland – resultat från inventeringar 1989-2005. Länsstyrelsen Västernorrland. Rapport 2008:7.
- Dallas & Piertny (1998) *Microsatellite primers for the Euroasian otter*. Molecular Ecology 7:1248-1251.
- Excoffier, Guillaume & Schneider (2005) *Arlequin (version 3.0) An integrated software package for population genetics data analysis*. Evol Bioinform Online 1:47-50
- Hajkova et al (2006) *Factors affecting success of PCR amplification of microsatellite loci from otter faeces*. Molecular Ecology Notes 6:559-562
- Hansen & Jacobsen (1999) *Identification of mustelid species: otter (Lutra lutra), American mink (Mustela vison) and polecat (Mustela putorius) by analysis of DNA from faecal samples*. J. Zool. Lond. 247:177-181
- Lampa, S., Gruber, B., Henle, K. och Hoehn, M. (2008). *An optimisation approach to increase DNA amplification success of otter faeces*. Conservation Genetics 9:201-210
- MacDonald, S. (1991) *The status of the otter in Europe*. In: Reuther, C. & Röchert, R (ed.): *Proceedings of the V. International Otter Colloquium, Hankensbüttel 1989*. Habitat 6:1-3, 1991.
- Mucci et al (2010) *Genetic Diversity and landscape genetic structure of otter (Lutra lutra) populations in Europe*. Conservation Genetics 11:583-599
- Olofsson, F. (2009) Länsprogram för den regionala miljöövervakningen 2009-2014 i Västernorrlands län. Länsstyrelsen Västernorrland. Rapport 2009:14.
- Olsson, M., Rosendal, E. och Sandegren, F. (1984) *Utterinventering av delar av Ljusnans och Dalälvens avrinningsområden, September 1984*. Rapport till Statens Naturvårdsverk 1984-11-14, 1984.
- Olsson, M. and Sandegren, F. (1983). *The otter situation in Sweden and the Småland-Södermanland otter surveys of 1983*. Proceedings from the 3rd International Otter Symposium, Strasbourg, November 24-27, 1983.
- Olsson, M., Sandegren, F. & Sjöåsen, T. (1988). *Utterinventering, Norrland 1986-87*. Rapport från Naturhistoriska riksmuseet och Svenska Jägareförbundet till Vattenfall, WWF, Statens naturvårdsverk och länsstyrelser, 1988-10-24.

Länsstyrelsen Västernorrland avdelningen för miljö och natur

## Genetisk studie av uttrar

Genetisk studie av vävnadsprover och spillning från uttrar från Västernorrland och Småland



LÄNSSTYRELSEN  
VÄSTERNORRLAND

ISSN 1403-624X

Länsstyrelsen Västernorrland 871 86 Härnösand

Besöksadress: Nybrogatan 15 och Pumpbacksgatan 19 Tel: 0611-34 90 00 Fax: 0611-34 93 72

[www.lansstyrelsen.se/vasternorrland](http://www.lansstyrelsen.se/vasternorrland)

