



Danmarks Miljøundersøgelser
Miljøministeriet

Anvendelse af molekylær- genetiske markører i naturforvaltningen

Faglig rapport fra DMU, nr. 539



[Tom side]



Danmarks Miljøundersøgelser
Miljøministeriet

Anvendelse af molekylær- genetiske markører i naturforvaltningen

Faglig rapport fra DMU, nr. 539
2005

Liselotte Wesley Andersen
Vibeke Simonsen
Bjarne Søgaard
Aksel Bo Madsen
DMU

Cino Pertoldi
Århus Universitet

Peter Wind
Stefan Pihl
DMU

Kåre Fog
Konsulent

Christian F. Damgaard
DMU

Datablad

Titel:	Anvendelse af molekylærgenetiske markører i naturforvaltningen
Forfattere:	Liselotte Wesley Andersen ¹ , Vibeke Simonsen ² , Bjarne Søgaard ¹ , Aksel Bo Madsen ¹ , Cino Pertoldi ³ , Peter Wind ¹ , Stefan Pihl ¹ , Kåre Fog ⁴ og Christian F. Damgaard
Afdelinger:	¹ Afdeling for Vildtbiologi og Biodiversitet, ² Afdeling for Terrestrisk Økologi, ³ Århus Universitet, Afdeling for Genetik og Økologi, ⁴ Løjesøvej 15, 3670 Veksø.
Serietitel og nummer:	Faglig rapport fra DMU nr. 539
Udgiver:	Danmarks Miljøundersøgelser© Miljøministeriet
URL:	http://www.dmu.dk
Udgivelsestidspunkt:	Maj 2005
Redaktionen afsluttet:	April 2005
Faglig kommentering:	Karsten Laursen
Finansiel støtte:	Ingen ekstern finansiering
Bedes citeret:	Andersen, L.W., Simonsen, V., Søgårds, B., Madsen, A.B., Pertoldi, C., Wind, P., Pihl, S., Fog, K. & Damgaard, C.F. 2005: Anvendelse af molekylærgenetiske markører i naturforvaltningen. Danmarks Miljøundersøgelser. 66 s. -Faglig rapport fra DMU nr. 539. http://faglige-rapporter.dmu.dk
	Gengivelse tilladt med tydelig kildeangivelse.
Redaktion:	Karsten Laursen
Korrektur:	Else-Marie Nielsen
Layout:	Hanne Thorhauge Hansen
Tegninger:	Grafisk værksted, Silkeborg
Omslagsfoto:	Løvfrø, Aqua Consult; Odder, Axel Bo Madsen; Mygblomst, Peter Wind
ISBN:	87-7772-869-6
ISSN (elektronisk):	1600-0048
Sideantal:	66
Internet-version:	Rapporten findes kun som PDF-fil på DMU's hjemmeside http://www2.dmu.dk/1_viden/2_Publikationer/3_fagrapporter/rapporter/FR539.pdf
Købes hos:	Miljøministeriet Frontlinien Rentemestervej 8 2400 København NV Tel. 70 12 02 11 frontlinien@frontlinien.dk www.frontlinien.dk

Indhold

Forord 5

Sammenfatning 7

English summary 9

1 Indledning 11

- 1.1 EF-Habitatdirektivet 11
- 1.2 Gunstig bevaringsstatus 11

2 Kriterier for gunstig bevaringsstatus 13

- 2.1 Genetiske analyser af arter omfattet af EF-habitatdirektivet 13

3 Biodiversitet 15

- 3.1 Biodiversitet på økosystem-niveau 16
- 3.2 Biodiversitet på arts-niveau 16
- 3.3 Biodiversitet på gen-niveau 17
 - 3.3.1 Levedygtige bestande (minimum viable population size) 18

4 Menneskeskabte effekter på genetisk variation 21

- 4.1 Habitatfragmentering 21
- 4.2 Bæredygtig udnyttelse af naturlige ressourcer 22
- 4.3 Domesticering 22
- 4.4 Udsætning af arter, bestandsophjælpning og indslæbte arter 23
- 4.5 Miljøfremmede stoffer 24

5 Genetiske undersøgelser af tre arter omfattet af EF-habitatdirektivet 25

- 5.1 Mygblomst (*Liparis loeselii* (L.) L.C.M. Richard) 25
 - 5.1.1 Introduktion 25
 - 5.1.2 Materiale og metoder 26
 - 5.1.3 Resultater og diskussion 26
 - 5.1.4 Bevaringsstatus 27
 - 5.1.5 Kriterier for gunstig bevaringsstatus 27
 - 5.1.6 Forvaltningsmæssige aspekter 27
- 5.2 Odder (*Lutra lutra*) 29
 - 5.2.1 Introduktion 29
 - 5.2.2 Metode og materialer 30
 - 5.2.3 Resultater og diskussion 30
 - 5.2.4 Bevaringsstatus 32
 - 5.2.5 Kriterier for gunstig bevaringsstatus 32
 - 5.2.6 Forvaltningsmæssige aspekter 33

5.3	Løvfrø (<i>Hyla arborea</i>)	34
5.3.1	Introduktion	34
5.3.2	Metode og materialer	37
5.3.3	Resultater og diskussion	37
5.3.4	Bevaringsstatus	45
5.3.5	Forslag til kriterier for gunstig bevaringsstatus	46
5.3.6	Forvaltningsmæssige aspekter	47

6 Fremtidige genetiske undersøgelser 49

7 Molekylærgenetiske metoder 51

7.1	Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism	54
-----	--	----

8 Ordforklaring 58

9 Referencer 63

Danmarks Miljøundersøgelser

Faglige rapporter fra DMU

Forord

Den naturlige genetiske variation er en forudsætning for biodiversitet. Inden for de sidste årtier er der udviklet flere nye metoder som har revolutioneret kortlægningen af den naturlige genetiske variation og dermed givet kendskab til mangfoldighed inden for en art og mellem arter. For at udnytte disse metoder har Danmarks Miljøundersøgelser (DMU) etableret et isozym- og DNA-laboratorium. Nogle af de første undersøgelser i laboratoriet har omfattet undersøgelser af den genetiske variation hos arterne mygblomst, odder og løvfrø, som alle forekommer på EF-Habitatdirektivets bilag II og/eller IV.

Det er en kendsgerning at fragmentering af landskabet opsplitter bestande i mindre genetiske enheder. I dag kender vi ikke svaret på de langsigtede konsekvenser af denne fragmentering. Men genetiske analyser kan give en vurdering af størrelsen af den genetiske variation, der findes i dele af arternes bestande. Det kan give information om graden af slægtskab mellem delbestande og benyttes til beregninger af størrelsen af lokale bestande ved fangst-gefangst metoder. En viden der er værdifuld, når der skal tages stilling til om der f.eks. bør sikres forbindelsesmuligheder mellem de adskilte bestande for at sikre den genetisk variation og dermed bevare levedygtige lokale bestande.

Denne rapport giver en kort gennemgang af begrebet biodiversitet med hovedvægt på genetisk variation. Dernæst præsenteres resultater af genetiske undersøgelser af henholdsvis mygblomst, odder og løvfrø, og resultaterne sættes i sammenhæng med arternes bevaringsstatus og forvaltning. Desuden er der et oplæg til fremtidige genetiske undersøgelser af nogle arter med ugunstig/usikker bevaringsstatus i følge EF-Habitatdirektivets bilag II og IV. Sidst i rapporten findes en ordliste, der forklarer de tekniske udtryk som forekommer i rapporten.

Forvaltning af landskabet drejer sig i høj grad om at bevare alsidighed i plante- og dyresamfund. Desuden drejer det sig om at bevare og pleje forskellige biotoptyper i det danske landskab og få disse lokaliteter knyttet sammen ved etablering af korridorer. Rapporten kan anvendes af medarbejdere i kommuner, amter, styrelser og interesseorganisationer i den konkrete forvaltning af de tre omtalte arter. Men med disse tre arter som eksempel kan rapporten også give ideer til genetiske undersøgelser af andre arter, som har brug for en aktiv forvaltning for at kunne opretholde deres genetiske variation, og dermed bidrage til en stor biodiversitet i det danske landskab. For at kunne give den nødvendige rådgivning på dette område, er det nødvendigt at forøge vores viden om de enkelte arters eller artsgrupperes behov for spredningskorridorer og til en minimum arealstørrelse af deres habitater.

[Tom side]

Sammenfatning

Formålet med denne faglige rapport er at vise, hvorledes molekylær-genetiske markører kan anvendes i naturforvaltningen. EF-Habitatdirektivet pålægger Danmark at sikre overlevelse af en række arter, der på nuværende tidspunkt er sårbare eller truede. Ved forvaltning af denne opgave er der mange hensyn at tage til arternes krav til føde (mængde og kvalitet) og plads til forskellige formål (jagt, parringsadfærd og yngelpleje). Blandt de større trusler mod en arts overlevelse er reduktion i bestandsstørrelse, der kan medføre indavl, og vanskelighed ved at tilpasse sig et dynamisk miljø. Konsekvensen af reduktion i bestandsstørrelse og af indavl er ofte en reduceret genetisk variation og dermed en forøgelse af genetisk ensartethed af individerne i bestanden. Det kan føre til reduceret levedygtighed og i værste fald medføre at bestanden uddør. Konsekvensen af en lav genetisk variation er også en reduceret evne til at tilpasse sig et dynamisk miljø hvilket kan føre til en reduceret evne til at modstå angreb fra bakterier, vira eller pesticider, som arten ikke tidligere har været udsat for. Nøglen til et individs evne til at kompensere for påvirkninger udefra er individets genom (det samlede genetiske materiale). Jo mere varieret genomet er, desto bedre er chancen for, at individet overlever. Hvis en bestand har en høj grad af genetisk variation forøger det bestandens chance for at overleve. Derfor er det nødvendigt at inddrage bestandens genetiske sammensætning, når det skal vurderes, om en art er levedygtig i et givet område. Rapporten redegør kortfattet for den molekylær-genetiske variation og dens betydning for en bestands evne til at overleve. Desuden beskrives det hvordan, menneskeskabte effekter kan påvirke en bestand.

Undersøgelser af mygblomst, odder og løvfrø belyser hvordan arternes genetiske sammensætning kan udnyttes i naturforvaltningen. For mygblomst blev der ikke påvist genetisk variation med de benyttede teknikker, og på det grundlag var det ikke muligt at komme med anvisninger på plejemetoder, som kan forbedre mygblomsts overlevelse i Danmark. For odder var det muligt ud fra museumsmateriale at inddrage et tidsperspektiv i vurderingen af den genetiske variation. Resultatet viste overraskende at den genetiske variation i nutidens oddere kun var lidt reduceret i forhold det historiske materiale. Der var antydninger af, at odderbestanden i Danmark er genetisk differentieret, og at der tidligere var sket drastiske bestandsreduktioner. Materialet tyder på, at nutidens oddere har fortsat en negativ udvikling i mængden af den genetiske variation, som sandsynligvis startede forhistorisk i tid. Naturligvis vil mulighed for migration mellem områder reducere den negative udvikling, men det er næppe sandsynligt, at migration kan standse udviklingen. Løvfrø er undersøgt ved at sammenligne bestande, der tidligere er vurderet til at have en gunstig bevaringsstatus med bestande, der havde en ugunstig bevaringsstatus. Undersøgelsen viste at bestande med gunstig bevaringsstatus havde større genetisk variation end bestande med ugunstig bevaringsstatus. Desuden blev det påvist, at hovedparten af løvfrøerne var meget stedtro. Men det kunne også påvises at en del individer vandrede fra et kildevandhul til nyetablerede vandhuller

eller til nabo-vandhuller som lå op til fem km borte. Desuden kunne det påvises at der var sket en kunstig introduktion forårsaget af mennesker i et af vandhullerne. Frøerne i dette vandhul var tættere beslægtede med frøer fra et fjerntliggende vandhul ca. 20 km borte end med frøer i et nabo-vandhul. Effekten af genetisk drift (tilfældigt tab af genetisk variation) og indavl blev påvist i isolerede vandhuller, hvor der blev fundet en reduceret overlevelse af haletudser. Bestandsstørrelsen i de enkelte vandhuller blev målt ved optællinger af kvækkende hanner. Der blev påvist en positiv sammenhæng mellem antal kvækkende hanner og den genetiske variation, dvs. des flere hanner, jo mere genetisk variation. Resultaterne viste at de genetiske undersøgelser afspejlede hvilke bestande der har en gunstig bevaringsstatus, og hvilke der har en ugunstig status.

De forvaltningsmæssige konsekvenser af de genetiske analyser af de tre arter antyder, at der på baggrund af de herværende genetiske undersøgelser af mygblomst ikke er indikationer af, at f.eks. spredningskorridorer eller anden form for udveksling af genetiske materiale vil forbedre artens levedygtighed. De genetiske analyser af odder antyder, at odderen i Jylland bør forvaltes som en sammenhængende bestand. For at opretholde i det mindste den moderate genetiske variation anbefales en effektiv bestandsstørrelse på 500 kønsmodne individer, hvilket betyder at bestandsstørrelsen for odder bør være på 1.200 til 1.600 voksne individer. Den lille bestand på Sjælland bør forvaltes så den får mulighed for at vokse. De genetisk analyser af løvfrø viser en signifikant sammenhæng mellem antal kvækkende hanner og mængden af genetisk variation i det enkelte vandhul. Påvisningen af vandringsretningen hos løvfrø gør det muligt at afgøre hvilke bestande der er isolerede og dermed rette forvaltningsindsatsen specifikt mod en sikring af spredningsmuligheder indenfor grupper af delbestande. Det vil give en stabil eller stigende bestandsstørrelse af løvfrøer og vil muliggøre at der opnås en gunstig bevaringsstatus for alle grupper.

Afslutningsvis er der med udgangspunkt i EF-Habitatdirektivets bilag II og IV givet en kort gennemgang af arter, hvis bevaringsstatus er usikker eller ugunstig og hvor undersøgelser af deres genetiske variation med fordel kan inddrages i deres forvaltning.

English summary

The objective of the report is to demonstrate how molecular genetic markers can be applied in nature management. The EU-Habitat Directive imposes on Denmark to ensure the survival of species that presently are vulnerable or threatened. The management of this obligation involves many considerations to be taken in order to fulfil the species demands from food availability, quantity and quality to space for different purposes like hunting, mating behaviour and parental care. Amongst the biggest threats to species survival is a reduction in population size, which can result in inbreeding and difficulties to adapt to a changing environment. The consequence of a reduction in population size and inbreeding is often reduced genetic variation, resulting in an increased genetic homogeneity among the individuals in the population. This can cause a reduction in viability and in the worse case result in extinction of the population. Another consequence of a low genetic variation as mentioned above is a reduction in the ability to adapt to changing environment. This can lead to a reduced ability to endure attacks from bacteria, virus or pesticides that are new to the species. The key to the species ability to compensate negative influence from outside is the individual's genome. The more variable the genome is the better is the chance for the individual to survive. If a population has a high level of genetic variation the chances to survive is higher. It is therefore necessary to include the genetic composition of the population in the evaluation of the chances for a species to survive in a given area. The report shortly reviews the molecular genetic variation and its importance for the ability of the population to survive. Furthermore, it is described how human made effects can influence a population.

Investigations of fen orchid, the European otter and the European tree frog illustrates how the genetic composition of populations of the species can be applied in nature management. For fen orchid, the used techniques were not able to detect genetic variation. On this background, it was not possible to suggest management advice that would improve the survival of fen orchids in Denmark. For the European otter, the use of museum material made it possible to include a temporal perspective in the evaluation of the genetic variation. The results surprisingly demonstrated that the genetic variation in the present-day otters only was slightly reduced compared to the historic material. There were indications of genetic differentiation in the Danish otter population and that serious reduction in the population sizes had happened in former times. The material indicates that the recent otters have continued a negative development of genetic variation, which probably started in prehistoric time. Of course, migration between areas will reduce the negative development, but it is hardly likely that migration can stop the development. The European tree frog is analysed by comparing populations that former were assessed as having a favourable conservation status to populations having an unfavourable conservation status. The study showed that populations with favourable conservation status had a higher level of genetic variation than populations with unfavourable conservation

status. Furthermore, it was shown that the tree frogs showed some degree of site fidelity. But the results also indicated that some individuals migrated from a source pond to new established ponds or nearby ponds located up to 5 km from the source pond. In one pond, a man-made artificial introduction of tree frogs was detected. The tree frogs in this pond were more closely related to tree frogs in a pond 20km away than to the frogs in the neighbour pond. In some isolated ponds a reduced survival of larva was detected which could be ascribed to an effect of genetic drift (random loss of genetic variation) and inbreeding. The population size in each pond was estimated counting calling males. A positive correlation between the number of calling males and the genetic variation was shown, i.e. the higher the number of calling males the higher the level of genetic variation. The results indicated that the genetic investigations did reflect the populations with favourable and the populations with unfavourable conservation status.

The implications for management reflected by the genetic analysis of the three species indicate that on the basis of the presented genetic analysis of fen orchid no dispersal corridors or other kinds of genetic exchanges would seem to improve the survival of the species. The genetic analysis of the European otter indicates that in Jutland the otter should be managed as one coherent population. To sustain the moderate genetic variation observed, an effective population size of 500 mature individuals is recommended, which indicates that the population size for the European otter ought to be 1,200 to 1,600 adults. The small population on Zealand should be managed in ways that allows the size to increase. For the European tree frog the genetic analyses indicate a significant correlation between the number of calling males and the level of genetic variation in the single pond. The detection of migration direction makes it possible to identify which populations are isolated and consequently direct the management effort specifically towards ensuring dispersal possibilities between groups of sub-populations. This will stabilise or increase the population size of the tree frogs and make it feasible for all groups to achieve a favourable conservation status.

Finally, a short review of the species on the EU-Habitat Directive Annex II and IV with unknown or unfavourable conservation status in Denmark is presented for which it would be beneficial to include analyses of the genetic variation in their management.

1 Indledning

1.1 EF-Habitatdirektivet

EF-Habitatdirektivets formål er at bidrage til sikring af den biologiske mangfoldighed gennem bevarelse af naturtyper samt plante- og dyrearter der har betydning inden for medlemsstaternes områder.

Det vigtigste redskab til at sikre opfyldelse af direktivets formål er oprettelsen af et europæisk system af bevaringsværdige områder, det såkaldte Natura 2000-netværk. Dette netværk omfatter dels de særlige områder, som er udpeget efter EF-habitatdirektivet, dels områder udpeget efter EF-fuglebeskyttelsesdirektivet og Ramsar konventionen.

I henhold til Habitatdirektivet har Danmark udpeget i alt 254 habitatområder til Natura 2000. Udpegningen her i landet er foretaget på grundlag af forekomsten af i alt ca. 60 naturtyper på Habitatdirektivets bilag I og ca. 40 arter på bilag II. Danmark er ligesom de øvrige EU-medlemsstater forpligtet til dels at overvåge og vurdere disse naturtypers og arters bevaringsstatus, dels at afrapportere resultaterne af overvågningen til Fællesskabet hvert sjette år.

For Natura 2000-områderne gælder generelt, at de skal medvirke til at sikre og beskytte forskellige dele af naturen og den biologiske mangfoldighed både på nationalt og europæisk plan. Kravene i de to direktiver og konventionen kan sammenfattes til en bevaringsmål-sætning om at fastholde eller genoprette "gunstig bevaringsstatus" for de arter og naturtyper, som områderne er udpeget for (Søgaard *et al.* 2003).

1.2 Gunstig bevaringsstatus

Habitatdirektivet angiver en række kriterier, som skal være opfyldt for, at en naturtype eller art kan siges at have gunstig bevaringsstatus.

En arts bevaringsstatus anses for "gunstig", når:

- "data vedrørende bestandsudviklingen af den pågældende art viser, at arten på langt sigt kan opretholde sig selv som en levedygtig bestanddel af dens naturlige levesteder", og
- "artens naturlige udbredelsesområde hverken er i tilbagegang, eller der er sandsynlighed for, at det inden for en overskuelig fremtid vil blive mindsket", og
- "der er og sandsynligvis fortsat vil være et tilstrækkeligt stort levested til på langt sigt at bevare dens bestande" (Søgaard *et al.* 2003).

Arternes naturlige udbredelsesområde defineres i Danmark som arternes faktiske udbredelsesområder.

På baggrund af de generelle kriterier foretog Danmarks Miljøundersøgelser i samarbejde med Skov- og Naturstyrelsen og amterne i 2000 en indledende og foreløbig vurdering af bevaringsstatus for naturtyper og arter, som er omfattet af Habitatdirektivet (Pihl *et al.* 2000). En af denne rapportes hovedkonklusion var, at det eksisterende viden- og datagrundlag ikke var tilstrækkeligt til en endelig vurdering af bevaringsstatus for hovedparten af de pågældende naturtyper og arter.

2 Kriterier for gunstig bevaringsstatus

For at lave bevaringsmålsætninger for Natura 2000-områderne har Danmarks Miljøundersøgelser udarbejdet kriterier for gunstig bevaringsstatus for Skov- og Naturstyrelsen. Kriterierne udgør et vigtigt udgangspunkt for naturovervågning, naturplanlægning, naturforvaltning, VVM-vurderinger (vurdering af virkninger på miljø) samt det nationale overvågningsprogram for Vandmiljø og Natur (NO-VANA).

Kriterierne for gunstig bevaringsstatus er udarbejdet for at præcisere, hvornår bevaringsstatus for en naturtype eller art er gunstig. Kriterierne omfatter relevante biologiske egenskaber for arten og dens levested og indeholder tærskelværdier som skal være opfyldte for at der kan opnås gunstig bevaringsstatus. For arterne medfører det, at kriterierne omfatter indikatorer, der siger noget om bestande, levested, udbredelsesområde samt størrelse og kvalitet af levestederne. De nationale kriterier for en art indeholder netop disse indikatorer.

De foreløbige vurderinger af bevaringsstatus for arter med ugunstig bevaringsstatus i Danmark (Pihl *et al.* 2000) er baseret på at bestande, udbredelsesområde og størrelse af levesteder generelt skal være stigende før bevaringsstatus kan ændres til gunstig for den pågældende art (Søgaard *et al.* 2003). Der er angivet tærskelværdier for hvornår dette menes at være tilfældet for nogle arter (Pihl *et al.* 2000, Søgaard *et al.* 2003), men for andre arter er det på baggrund af eksisterende data og viden ikke muligt at præcisere disse. For arter med gunstig bevaringsstatus skal indikatorerne mindst være stabile. For arter med ukendt eller usikker bevaringsstatus gælder ligeledes at der på baggrund af et manglende data og videngrundlag ikke er muligt at sige noget om hvorvidt udviklingen i bestandsstørrelser, udbredelsesområder og levesteder er stigende eller stabil. For disse arter afventes tilvejebringelsen af de data der er nødvendige for en vurdering af bevaringsstatus.

2.1 Genetiske analyser af arter omfattet af EF-habitatdirektivet

Genetiske markører og deres statistiske fordelinger i formodede bestande er en vigtig metode, der kan støtte vurderingsprocessen i forbindelse med bevaringsstatus for arterne. Genetiske analyser kan give en vurdering af mængden af den genetiske variation, der findes i de pågældende arters bestande. De kan give information om graden af sammenhæng mellem bestande/delbestande og om migrationsretningen mellem disse og derved give et estimat for en bestands udbredelse. Ved at benytte DNA fra museums eksemplarer kan de give information om tidsændringer i den genetiske variation, samt give et billede af det evolutionære slægtskab mellem bestande eller arter. Kendskab til flere mikrosatellit markører for en art kan benyttes som identifikation af individer ved f.eks. fangst-genfangst analyser og kan derved benyttes til beregninger af bestandens faktiske størrelse (census bestandsstørrelser).

I samspillet mellem arter og deres bestande kan genetiske markører give information om flere arter på en gang ved at analysere DNA-profilen fra hår eller fæces indsamlet i et givent område. Derved er det muligt at sammenligne udbredelse og hyppighed for flere lignende arter.

På individ niveau kan genetiske analyser benyttes til at udrede forældreskab. Det vil sige at mulige fædre eller mødre kan påvises ud fra kendskabet til genotyperne for enten mor eller far og afkom. Ligeledes kan søskende-grupper identificeres i sociale grupper. I de tilfælde hvor de genetiske markører, kun sidder på et af køns-kromosomerne, kan de benyttes til kønsbestemmelse. Hvor det ikke er tilfældet kan andre analyser for køns-specifikke sekvenser benyttes.

Sådanne genetiske analyser er endnu ikke udført for de fleste arter på Habitatdirektivets bilag II og IV, hvilket betyder at de eksisterende vurderinger af gunstig bevaringsstatus (Pihl *et al.* 2000, Søgaard *et al.* 2003) er baseret på kortlægning og optællinger, hvor det var muligt. Sammenhængen mellem lokale bestande eller bestandsstørrelser er for mange arter ikke kendt.

Danmarks Miljøundersøgelser har et isozym- og et DNA-laboratorium hvor der er foretaget genetiske analyser af mygblomst og løvfrø. Disse arter er anført på Habitatdirektivets bilag II og/eller IV. Desuden er de genetiske forhold undersøgt for odder (Habitatdirektivets bilag II og IV) i samarbejde med Danmarks Fiskeriundersøgelser og Århus Universitet.

3 Biodiversitet

Begrebet "biodiversitet" - eller "biologisk mangfoldighed" - blev introduceret i en større sammenhæng i 1992 ved natur- og miljøkonferencen i Rio de Janeiro i 1992. Ved konferencen blev Biodiversitetskonventionen vedtaget (også kaldet Rio-konventionen), som har til formål at beskytte biodiversitet. Danmark har ratificeret konventionen, og har derved påtaget sig en forpligtelse til at bevare sin nationale biodiversitet. Men hvad dækker dette begreb egentlig?

I Rio-konventionen opereres der med biodiversitet på tre niveauer:

- Økosystem-niveau
- Arts-niveau
- Genetisk niveau (gen niveau)

Den velkendte del af disse tre niveauer er artsdiversiteten – mangfoldigheden af planter og dyr - som udgør det mellemste niveau. De to øvrige niveauer er dels et overordnet niveau af økosystemer eller habitater, og dels et underliggende niveau som omhandler den genetiske biodiversitet – arternes genetiske variations-bredde. Økosystemer indgår, fordi det selvsagt ikke er tilstrækkeligt, at arten overlever, hvis dens levesteder forsvinder. Variation på gen-niveau kan være af afgørende betydning for at sikre artens fortsatte overlevelse.

Biodiversitet må nødvendigvis omfatte andet end arternes mangfoldighed, nemlig opretholdelse af det økosystem de pågældende arter lever i. Lobelie er en plante som lever i næringsfattige søer. Planten har endda givet navn til denne type af søer – lobelie-søer. Søerne er karakteriseret ved klart, næringsfattigt vand og kun få arter er knyttet til dem. Antallet af arter i et sådant område kunne meget nemt øges, f.eks. ved næringsstofftilførsel fra intensivt dyrkede områder. Det ville give anledning til opformering af flere arter, og skønt nogle af de oprindelige arter i søen ville forsvinde, ville det samlede antal stige. Hvis biodiversitet alene var beskrevet ud fra artsdiversitet, ville man have øget biodiversiteten. Dette er naturligvis ikke formålet. I det fiktive eksempel er økosystemet ødelagt og biodiversiteten for det pågældende økosystem har lidt et tab.

Ligeså nødvendigt er det at inddrage den genetiske variation, da arternes mulighed for at overleve alvorlige sygdomme eller ændringer i miljøet ligger gemt her. F.eks. er det vist hos tre vertebrater at jo mindre beslægtede et forældrepar er jo flere afkom fik de sammenlignet med det gennemsnitlige antal afkom for den pågældende art (Amos *et al.* 2001). I en undersøgelse af californiske søløver fandt Acevedo-Whitehouse *et al.* (2003) at individer, hvis forældre var tættere beslægtede med hinanden end gennemsnittet af forældreparrene, var inficerede med et højere antal forskellige sygdomsvoldere.

3.1 Biodiversitet på økosystem-niveau

Til bestemmelse af biodiversitet på økosystem niveau anvendes forskellige indeks for på en relativ simpel måde at skabe et overblik over mangfoldigheden i et område. Ved et økosystem forstås f.eks. en heide, sandklit eller højmose. Magurran (1988) har givet et overblik over, hvilke indeks der indtil nu er udviklet, og hvorledes de bruges. Fælles for dem alle er, at de forudsætter et godt artskenndskab samt en veldefineret metode til indsamling af data.

Et andet mål, som har relation til arterne i et økosystem, er en empirisk lovmæssighed som indgår i øbiogeografi-teorien (Wilcox 1980). Lovmæssigheden beskriver sammenhængen mellem en lokalitets størrelse og det antal arter, der kan leve på lokaliteten. Konsekvensen af denne sammenhæng er, at artsantallet i et givet område er næsten konstant, forudsat at områdets miljøtilstand er konstant. Det skal påpeges, at lovmæssigheden ikke siger noget om, at det er de samme arter, der til stadighed findes i det pågældende område. Der kan ske udskiftning af arter, således at en art med en given biologi kan udskiftes med en anden art med en tilsvarende biologi, f.eks. kan en frøspisende fugl erstattes af en anden fugl, der kan spise den samme slags frø. Øbiogeografi er senere blevet udbygget med metapopulations-konceptet (Levins 1970).

En metapopulation består af et antal delbestande (subpopulationer), der udveksler individer i større eller mindre grad, altså immigration til en bestemt delbestand og emigration fra samme, og som er udsat for lokal ekstinktion og rekolonisering. Spredningen mellem delbestandene er afhængig af afstanden mellem de egnede levesteder, de mellemliggende områder samt organismens spredningspotentiale. Ikke overraskende er der større udveksling indenfor samme gruppe af delbestande end mellem grupperne af delbestande (Hanski 1991). Idet det antages, at et levested rummer en bestand, medfører det, at et lille levested understøtter en mindre bestand end et større levested. En lille bestandsstørrelse medfører en øget sandsynlighed for, at bestanden uddør (Soulé 1987).

De populationsgenetiske konsekvenser af sådanne gentagne ekstinktioner/rekolonisationer er komplekse (Hedrick 1996). Modellering kan til en vis grad forudsige de genetiske konsekvenser.

3.2 Biodiversitet på arts-niveau

Bestemmelse af biodiversitet på arts-niveau kan foretages i velafgrænsede områder, som består af flere økosystemer eller være en del af et økosystem. Ved estimering af biodiversitet på arts niveau benyttes de samme indeks som beskrevet af Magurran (1988). Data for arter kan samles i rødlistor, som er lister over forsvundne og truede arter. Listerne følger et bestemt paradigme, som er blevet færdigudviklet af The World Conservation Union (IUCN) i 2001. IUCN udarbejder en global rødliste for alle arter i samarbejde med interesseorganisationer. Rødlistor udarbejdes også nationalt, og i Danmark følges IUCN's koncept. Seneste danske rødliste fra 1997 (Stoltze & Pihl 1998) er dog udarbejdet efter et ældre koncept. I Rødliste 1997 (Stolt-

ze & Pihl 1998) er status vurderet for næsten 11.000 af de ca. 30.000 arter, der formodes at leve i Danmark. Ca. 3.000 af de 11.000 arter anses for at være truede, sårbare eller sjældne.

3.3 Biodiversitet på gen-niveau

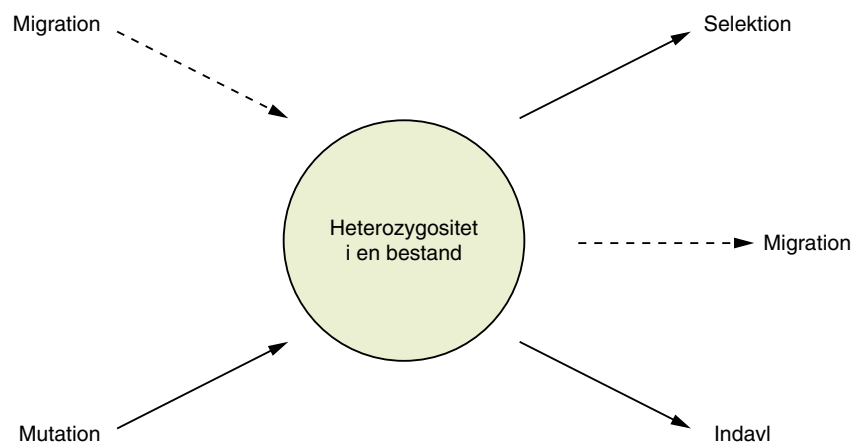
Diversiteten på gen-niveau også kaldet genetisk variation er en forudsætning for, at en bestand fortsat kan tilpasse sig ændrede miljøforhold og medvirke til, at bestanden er modstandsdygtig overfor sygdomme. Til bestemmelsen af genetisk variation anvendes en række molekylære analysemetoder som vigtige redskaber. Beskrivelsen af de molekylære metoder vil blive præsenteret i et følgende afsnit.

Et mål for den genetiske variation hos arter, der ikke er selvreproducerende som f.eks. selvbestøvende planter, er heterozygositet (og antal alleler) i modsætning til homozygositet. Populært udtrykt har et individ to gener for den samme egenskab, og de to gener udgør individets genotype for den pågældende egenskab. Er de to gener forskellige, er individet heterozygot for egenskaben, og er de to gener ens, er individet homozygot. Man siger, at et gen kan forekomme i forskellige allele former, eller kortfattet udtrykt som at et gen kan have forskellige alleler. Begrebet heterozygositet kan udvides til at omfatte mange gener hos alle undersøgte individer i en bestand og dermed kan heterozygositet bestemmes på bestandsniveau. Jo højere heterozygositeten er, desto større sandsynligheden for, at en bestand kan tilpasse sig ændringer i miljøet. Der skelnes mellem to former for heterozygositet, observeret og forventet. Den observerede heterozygositet (H_o) er hyppigheden af de faktisk forekommende heterozygote individer i bestanden. Den forventede heterozygositet (H_e) er hyppigheden af heterozygote individer, hvis parringen blandt individer foregår tilfældigt og uden påvirkning udefra (se mere i ordlisten under heterozygositet og Hardy-Weinberg loven). Denne skelnen mellem H_o og H_e er væsentlig for mange af de beregningsmetoder, som anvendes i populationsgenetik.

Forskellige effekter kan have indflydelse på en bestands heterozygositet. Den primære faktor er bestandens størrelse, jo flere individer, des flere gener, og dermed også mulighed for større variation blandt generne. Af øvrige faktorer kan nævnes migration (indvandring fra andre bestande), mutation (ændring af det genetiske materiale), indavl (parring mellem nærtbeslægtede individer) og selektion (udvælgelse af individer med en favorable genotype). Effekten på en bestands heterozygositet af de fire faktorer er illustreret i Figur 1. Mutation har kun betydning på lang sigt, da mutationsraten for et gen ligger i niveauet $10^{-6} - 10^{-4}$ pr. generation.

Migration kan såvel forøge den genetiske variation i bestanden som reducere den. Det afhænger af forskellen mellem den genetiske sammensætning i bestanden, hvortil indvandringen foregår, og blandt de individer, der kommer til bestanden og bidrager til den næste generation.

Figur 1 Skematisk oversigt over forskellige faktorerers indflydelse på opretholdelse af genetisk variation (heterozygositet) i en bestand. Pile ind i boksen giver forøgelse af den genetiske variation, og pile ud giver reduktion af genetisk variation.



Selektion og indavl påvirker også bestandens genetiske variation. Selektion fører i mange tilfælde til reduktion i antallet af alleler og i værste fald til en reduktion i heterozygositeten. Indavl fører til en øget homozygositet, da indavlede individer har en fælles forfar og dermed en begrænset mængde alleler til rådighed. Ofte er indavl skadelig, da det fører til en øget sandsynlighed for at skadelige alleler optræder i dobbelt dosis og dermed reducerer individets levedygtighed. På den anden side er der en række arter, der formerer sig ved selvbefrugtning (en art som byg har næsten udelukkende selvbestøvning), så indavl er ikke altid skadelig.

Genetisk variation er som nævnt også afhængig af bestandens størrelse, og det fører til en uddybning af begrebet en levedygtig bestand, se nedenfor.

3.3.1 Levedygtige bestande (minimum viable population size)

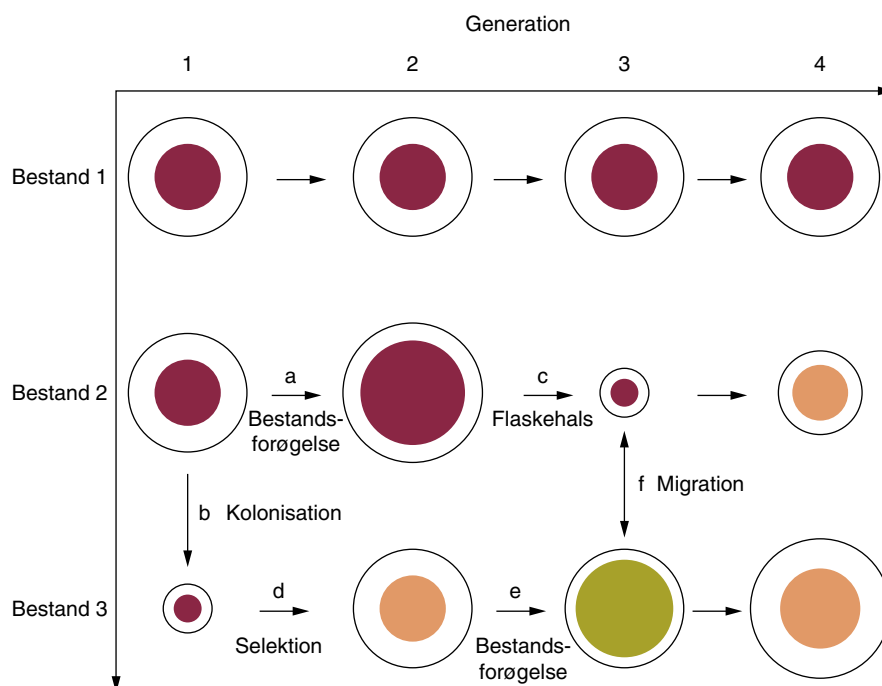
Til at vurdere sandsynligheden for at en art overlever i en vis tid, anvendes den mindste levedygtige bestandsstørrelse (MVP, "minimum viable population" (Shaffer 1981)). MVP kan bestemmes ud fra stokastiske modeller, der ikke inddrager bestandens demografi, eller ud fra demografiske modeller. De sidstnævnte er ret komplekse og artsspecifikke, og de kræver et indgående kendskab til den pågældende arts biologi. Ved at anvende disse modeller findes et skøn over den mindste bestandsstørrelse, der giver en art 99 % sandsynlighed for at overleve i et vist antal år f. eks. 100 eller 1000 år. Rødlistning af dyr og planter bliver bl.a. foretaget på baggrund af sådanne sandsynligheds-estimer.

En grundlæggende forudsætning for at en bestand kan overleve er naturligvis, at bestanden har den nødvendige plads og føde, mulighed for at producere afkom og tilpasse sig ændrede livsbetingelser på levestedet. Sagt på en anden måde, både omgivelser (miljø) og bestanden i sig selv (gener) er nødvendige for bestandens overlevelse.

Bestandsstørrelse kan vurderes på to måder, nemlig som den totale bestandsstørrelse N (census) og som den effektive bestandsstørrelse N_e . N_e er den mest interessante for bevarelse af heterozygositet, da N_e er det antal individer, der bidrager til den næste generation, altså producerer levedygtigt afkom. "Minimum viable population size"

(MVP) eller den mindste effektive bestandsstørrelse er det mindste tal, som N_e kan antage for at bestanden kan overleve i en vis periode, f. eks. 100 år.

Figur 2 Skematisk oversigt over bestandsstørrelser på forskellige tidspunkter (generationer) og på forskellige lokaliteter (bestande). De hvide cirkler repræsenterer det antal individer der kan optælles (N) og de udfyldte cirkler det antal individer der faktisk bidrager til formeringen (N_e).



Bestandsstørrelse udvikler sig over tid (generationer) og tilgængeligheden af egnede levesteder. En sådan udvikling er vist i Figur 2. Modellen for denne skematiske udvikling af en bestandsstørrelse er en enårig plante.

Bestand 1 lever på et sted, hvor miljøfaktorernes påvirkning på bestanden er ens fra generation til generation. Såfremt bestanden har en passende størrelse, vil heterozygositeten blive bevaret. Ud fra teoretiske overvejelser anbefales $N_e > 50$ for at holde mængden af indavl på 1 % pr. generation og for at undgå, at letale (skadelige) alleler ophobes (Soulé 1987). For overlevelse på lang sigt anbefales $N_e > 500$ for at reducere tabet af alleler ved genetisk drift (tilfældige påvirkninger som følge af begrænset bestandsstørrelse) med den genetiske variation, der fremkommer ved mutation (Franklin 1980). De to tal er naturligvis ikke gældende for alle arter, da arternes biologi er af stor betydning i denne sammenhæng.

Bestand 2 lever sandsynligvis i et miljø, der ændres jævnligt. Ved at gå fra generation 1 til 2 (pil a) ses det, at såvel N som N_e er øget. Det kan ske ved, at hvert individ producerer mere levedygtigt afkom, hvilket kan skyldes forbedrede livsbetingelser. Fra generation 2 til 3 (pil c) passerer bestanden en flaskehals (bottleneck), som reducerer N og N_e betragteligt og dermed øger sandsynligheden for at heterozygositeten bliver reduceret, idet der bliver færre gener i bestanden. Risikoen for at miste sjældne alleler bliver øget. Sandsynligheden for at miste en allel med hyppigheden 0,01 (1 %) i en bestand med $N_e = 50$ er 0,37 eller 37 % i løbet af en enkelt generation (Hansen 1995). Det betyder, at selv med en effektiv bestandsstørrelse på 50, vil der være et betragteligt tab af alleler, der kan have betydning for bestandens fremtidige overlevelse. Den minimale effektive bestands-

størrelse for den art bestemmes af, hvor megen variation der ønskes bevaret (dvs hvor mange alleler man ønsker at bevare). Ønsker man at bevare alleler med en hyppighed på 1 % og at den pågældende allel må gå tabt med en sandsynlighed på 1 %, skal den effektive bestandsstørrelse være 230 pr. generation (Hansen 1995).

Effekten af en flaskehals kan reduceres ved en migration fra en anden bestand angivet med pil f. Det kan føre til en øget mængde individer i generation 4, en øget heterozygositet og dermed kompensere for effekten af flaskehalsen. Ved migration kan spørgsmålet stilles: Hvor stor skal genspredningen være, før en gruppe af delbestande kan betragtes som en sammenhængende bestand? Genspredning kan måles på flere måder, men metoderne til disse estimater giver blot et fingerpeg om differentieringen og ikke noget direkte estimat for det faktiske antal individer, der udveksles mellem bestandene (Hansen *et al.* 2001).

Erkendelsen af delbestande kan være vanskelig, men med en såkaldt lighedsundersøgelse (assignment-test), som sammenligner en gruppe individers variation i genetiske markører med variationen i andre grupper af individer, kan delbestande identificeres. Gennem disse sammenligninger er det muligt at få en idé om antallet af delbestande i et område. Resultatet af sådan undersøgelser er også påvirket af artens sociale struktur f.eks. om arten er knyttet til et begrænset område eller er vidt udbredt, dvs dens spredningsevne.

Bestand 3 er opstået fra bestand 2 ved at et begrænset antal individer er udvandret fra bestand 2 (pil b). Bestand 3 har dermed passeret en koloniserings-effekt (founder-effekt). Såfremt de udvandrede individer er nært beslægtede, kan indavl også spille ind. Det er svært at vurdere, hvor meget indavl naturligt forekommende arter kan tåle, men en tilvækst på 1 % pr generation for indavlskoefficienten er formodentlig den øvre grænse. Effekten af en indavl på 1 % vil være specifik for den enkelte art, ligesom en bestands historie er vigtig for effekten. Pil d viser, at bestanden bliver etableret, men kan være under indflydelse af indavl eller selektion på grund af det nye levested. Bestanden formår at komme op i antal (pil e) og bidrage til bestand 2 gennem migration. Denne udveksling er afhængig af artens evne til at spredes og af de levesteder, der findes mellem to bestande, samt af artens parringsmåde og reproduktion. Generne selv kan ikke spredes, men spredes via de individer, der bærer dem. Så gen-spredning kan kun foregå ved, at individer flytter sig fra et levested til et andet og producerer afkom på det nye levested.

Eksemplet i Figur 2 viser at de vigtigste faktorer for vurderingen af gunstig bevaringsstatus er den effektive bestandsstørrelse, den pågældende arts historie, dvs om den har været igennem en kraftig reduktion i bestandsstørrelsen (bottleneck eller flaskehals) for nylig samt adskillelses-graden af de enkelte bestande (dvs udvekslingen mellem dem (migrationen)). Disse informationer kan hentes fra populationsgenetiske analyser baseret på undersøgelser af genetiske markører som beskrives i de følgende afsnit.

4 Menneskeskabte effekter på genetisk variation

Den genetiske variation kan deles i den naturlige og den menneske-påvirkede genetiske variation. Den første form for genetisk variation findes i bestande, hvor mennesket ikke har foretaget nogen udvælgelse af bestemte individer. Den anden form skyldes i vid udstrækning den selektion, som mennesket har skabt ved at indføre/indslæbe individer fra andre områder, ved at foretage indgreb i naturen (udretning af åer, udbygning af veje, anvendelse af pesticider) eller ved at udvælge individer med ønskede egenskaber. Landbruget har formået at øge udbyttet mange gange hos både kulturplanter og husdyr i sammenligning med udbyttet fra det oprindelige materiale, også når man ser bort fra forbruget af kunstgødning og pesticider.

4.1 Habitatfragmentering

Kendskab til genetiske forskelle mellem bestande og oplysning om, i hvor høj grad disse bestande udveksler individer med hinanden, er af stor betydning i forbindelse med bevaring af biodiversitet. Den voksende udnyttelse af naturen fører til stadig øget fragmentering af levesteder for mange arter. Dette betyder, at artstætheden falder samtidig med, at bestandene indenfor de enkelte arter splittes op i mindre bestande, hvorved den naturlige genetiske variation mindskes. Ligeledes bliver afstanden mellem de små bestande stadig øget, og arten kan dermed forsvinde.

Hurtige og ekstreme miljømæssige forandringer påvirker fragmenterede bestande negativt, dels fordi de har en begrænset mulighed for at undslippe forandringerne og dels fordi bestandene ofte er små og dermed har en lav genetisk variation. Den eneste mulighed for bestandene er at tilpasse sig det ændrede miljø ved en "plastic response" fordi bestande under en vis effektiv bestandsstørrelse har så lidt variation tilbage at bestandene ikke kan reagere på selektion i en evolutionær forstand (Lynch 1996).

For grævling og ræv er effekten af habitat-fragmentering undersøgt på den naturlige genetiske variation i den danske natur. Materialet for grævlingsens vedkommende blev indsamlet i Jylland og udviste relativ lav genetisk variation. Undersøgelsen viste også, at der var en differentiering mellem bestandene fra de fem undersøgte områder, som til dels var under indflydelse af den jyske motorvej (Pertoldi *et al.* 2001b). For rævens vedkommende var det overraskende at finde at både målinger af kranier og analyse af den genetiske variation viste, at de københavnske ræve var forskellige fra ræve fra det øvrige Sjælland (Simonsen *et al.* 2003). Rævene fra det øvrige Sjælland og Jylland var desuden også ens.

4.2 Bæredygtig udnyttelse af naturlige ressourcer

Generelt ønskes en bæredygtig udnyttelse af naturlige ressourcer som fisk og vildt og for disse arter er det vigtigt at kende til den genetiske bestandsstruktur for at fastsætte kvoter. Udnyttelsen af de naturlige ressourcer kan i nogle tilfælde medføre utilsigtet indvirkning på andre arter. I sådanne tilfælde er det ligeledes nødvendigt at analysere bestandsstrukturen hos den eller de arter, der bliver høstet utilsigtet. Kun derved kan man vurdere den biologiske betydning af utilsigtede indgreb for de pågældende arter og efterfølgende planlægge de nødvendige forvaltningstiltag for arterne.

Et eksempel på utilsigtet høst af en art i forbindelse med udnyttelse af naturlige ressourcer er bifangst af marsvin (*Phocoena phocoena*) ved fiskeriet af pighvar og torsk i Nordsøen (Vinther 1999). Denne bifangst blev estimeret til at udgøre 7.000-8.000 marsvin om året. For at vurdere den biologiske betydning af denne bifangst for bestandene af marsvin i Nordsøen er det vigtigt at kende til bestandsstrukturen. Hvis en gruppe marsvin ved en fejltagelse antages at tilhøre en adskilt bestand mens de i realiteten tilhører en større sammenhængende bestand vil betydningen af bifangsten blive overvurderet og resultatet kunne være en unødigt restriktion i fiskeriet. På den anden side vil betydningen blive undervurderet hvis en adskilt bestand ikke erkendes. Den yderste konsekvens af dette er, at bestanden uddør. En genetisk analyse (DNA mikrosatelliter) af marsvine-bestandene i Nordsøen og i de indre danske farvande har vist, at der eksisterer flere delbestande, der er genetisk adskilte. Således er der én delbestand i den danske del af Nordsøen, én i den engelske del af Nordsø, én i de indre danske farvande, én omkring Irland, én langs den norske vestkyst og én i vest Grønland (Andersen *et al.* 2001). På baggrund af denne oplysning om den genetiske differentiering vil det nu være muligt at få et bedre estimat for bestandsstørrelserne i de enkelte områder og vurdere bifangstens betydning for disse.

4.3 Domesticering

Et andet felt, hvor man igennem årtier har været bevidst om vigtigheden af at bevare naturlig genetisk variation som genressource, er i forædlingen af dyr og planter. Landbruget har formået at øge udbyttet mange gange hos både kulturplanter og husdyr i sammenligning med udbyttet fra det oprindelige materiale, også uden at øge forbruget af kunstgødning og plantebeskyttelsesmidler. Dette har kunnet lade sig gøre, fordi der i udgangsmaterialet har været en tilstrækkelig stor naturlig genetisk variation til, at den kunstige selektion har medført øget produktion. Som følge af denne forædling, der oftest foregår på basis af en lille bestandsstørrelse, er den naturlige genetiske variation blevet kraftig reduceret dels på grund af den lille bestandsstørrelse og dels på grund af en meget kraftig selektion. Det betyder også at muligheden for at selekttere yderligere for bestemte træk er reduceret. Tilsvarende har bestande med en lille effektiv bestandsstørrelse reducerede evner (lav genetisk variation) til at reagere på selektion ved tilpasning til miljøændringer.

En konsekvens af reduktionen i den naturlige genetiske variation er også en øget sårbarhed overfor sygdomsfremkaldende bakterier og svampe eller en øget risiko for medfødte sygdomme, som man ser det i kvægavl herhjemme, hvor der fornylig blev fundet en gendefekt, der medfødte en kraftig øget kalvedødelighed. Denne gendefekt kunne henføres til én bestemt tyr, der har været benyttet i en stor del af kvægavlen ikke blot i Danmark men også internationalt. Bevaring af genressourcer dvs. bevaring af naturligt forekommende eller nærtbeslægtede arter af kulturplanter og husdyr er af enorm betydning, hvis man ønsker at kunne genindføre f.eks. en resistens mod en given sygdomsfremkaldende svamp eller om muligt øge den genetiske variation i husdyravlen for at fremavle andre egenskaber end de eksisterende.

4.4 Udsætning af arter, bestandsophjælpning og indslæbte arter

Et tredje felt hvor kendskab til den genetiske bestandsstruktur og det genetiske slægtskab er en forudsætning er ved udsætning af en art for at ophjælpe bestanden eller ved reintroduktion af tidligere forekommende arter. For at kunne vurdere, hvorvidt der udsættes arter eller geografiske bestande, der ikke er naturligt hjemmehørende i den danske natur, og ligeledes hvis man vil undgå genetisk forurening af danske delbestande af de pågældende arter, må man have et forhåndskendskab til den eksisterende genetiske bestandsstruktur af den pågældende art. Et sådant kendskab er ligeledes nødvendigt ved en vurdering af indslæbte arters betydning for biodiversiteten i den danske natur. Specielt ved reintroduktion af en art skal man overveje størrelsen af den bestand, der udsættes (se afsnittet om levedygtige bestande). Der anbefales ofte en effektiv bestandsstørrelse på 500 individer (Franklin 1980) for at sikre bestandens overlevelse på lang sigt, men arternes biologi bør også inddrages i vurderingen.

Udsætning af ørreder i danske vandløb er et eksempel på ophjælpning af en bestand. Hansen (2002) undersøgte, hvorvidt der kunne påvises en langtids-effekt af udsætninger af domesticerede ørreder fra samme dambrug på den genetiske sammensætning af vilde ørreder i to bestande. Resultatet viste, at i den ene bestand, Karup Å, var der et meget lille genetisk bidrag (ca 6 %) til den oprindelige bestand og få individer var en krydsning mellem domesticerede og vilde ørreder. Ud fra antallet af udsatte fisk og under antagelse af at der ikke er nogen forskel i overlevelse og reproduktion mellem de vilde og udsatte fisk, ville det forventede genetiske bidrag til den vilde ørredbestand være 64 % i Karup Å. I den anden bestand, Skjern Å, var der derimod et større genetisk bidrag fra de udsatte domesticerede ørreder (mellem 57 og 88 %) både i afkom, der mentes at komme fra den vilde bestand og i selve den vilde bestand. Denne introduktion af genetisk materiale skyldtes sandsynligvis, at der var en lille oprindelig bestand i Skjern Å i forhold til antallet af de udsatte ørreder, og at afkommet fra de udsatte ørreder har været en krydsning af vilde og domesticerede ørreder, samt at de har overlevet i åen (Hansen 2002). Den store forskel på effekten af de udsatte ørreder i de to bestande skyldtes formodentlig, at bestandsophjælpning med vilde ørreder er sket samtidig med udsætning af domesticerede ørreder i Skjern Å.

Bestands-ophjælpning foregår altid udfra fangster af vilde ørreder og krydsningerne er formodentlig sket ved tilfældig opfiskning af domesticerede ørreder sammen med oprindelige ørreder, der siden er benyttet som permanent opdræt af udsætnings-ørreder i Skjern Å. Et sådant permanent opdræt til udsætning findes ikke i Karup Å (Hansen 2002).

Den amerikanske mink (*Mustela vison*), der blev indført omkring 1930 af den voksende pelsindustri, er et eksempel på en art, der i dag er ved at etablere sig i den danske natur pga. undslupne dyr fra minkfarme. Hvorvidt de fritlevende mink har etableret sig som reproducerende enheder i form af delbestande og derved danner egentlige vilde bestande af mink i Danmark vides ikke, men er undersøgt ved hjælp af genetiske markører (Møller *et al.* 2004). Da mink fra minkfarmene stammer fra indavlede linier, og vilde mink formodes at parres tilfældigt, vil man forvente at der eksisterer genetiske forskelle mellem den vilde delbestand og farmmink bestanden. De foreløbige resultater fra denne genetiske undersøgelse (Møller *et al.* 2004) tyder på, at en stor del af de fritlevende mink faktisk er undslupne farmmink. Samtidig viser resultaterne, at det ikke er muligt at påvise eksistensen af en vild delbestand af mink pga. den store immigration fra de omgivende farme i det undersøgte område. Den foreløbige konklusion på den genetiske undersøgelse er, at der tilsyneladende ikke eksisterer fritlevende, selvstændigt reproducerende grupper af mink i det undersøgte område, og at der har været et kontinuerligt udslip af mink fra de omkringliggende farme.

4.5 Miljøfremmede stoffer

Der findes adskillige eksempler på effekt af forurening (metal, olie, pesticider o. a.) på bestande. Nogle bestande er i stand til at overleve en given påvirkning, mens andre bestande af den samme art bukker under. Årsagen hertil er, at de forskellige bestande ikke er genetisk identiske, og dermed er nogle af dem i stand til at nedbryde, indkapsle eller på anden vis uskadeliggøre den forurenende komponent. Fænomenet blev allerede beskrevet af Baird *et al.* (1991) for dafnien *Daphnia magna*. Deres forsøg illustrerede klart, at det var ikke ligegyldigt, hvilke gener et individ bar for dets evne til at håndtere en forurenende komponent.

Ligeledes har der inden for de sidste 10 år været flere rapporter om kønsændringer hos fisk (De Metrio *et al.* 2003), padder (Hayes *et al.* 2002a, Hayes *et al.* 2002b) og krybdyr (Guillette *et al.* 1999). Hos isbjørne har man set et stigende antal tilfælde af pseudohermafroditisme, hvor der er rapporteret hun-isbjørne med penis-lignende gevækster. For at verificere hvorvidt dette var en genetisk bestemt defekt har man kønsbestemt isbjørnene ved hjælp af køns-specifikke DNA markører. Resultatet viste at pseudohermafroditerne var hunner, hvilket betyder at det kan være udefrakommende faktorer som hormonlignende stoffer i miljøet, der påvirker isbjørnene (Wiig *et al.* 1998). Hvordan dette påvirker isbjørnenes reproduktion vides endnu ikke.

5 Genetiske undersøgelser af tre arter omfattet af EF-habitatdirektivet

Fælles for mygblomst og odder er, at de er optaget på EF-Habitatdirektivets bilag II og IV, mens løvfrø er optaget på bilag IV. Herved er Danmark forpligtet til at følge arternes bestandsudvikling for at kunne redegøre for deres bevaringsstatus.

5.1 Mygblomst (*Liparis loeselii* (L.) L.C.M. Richard)

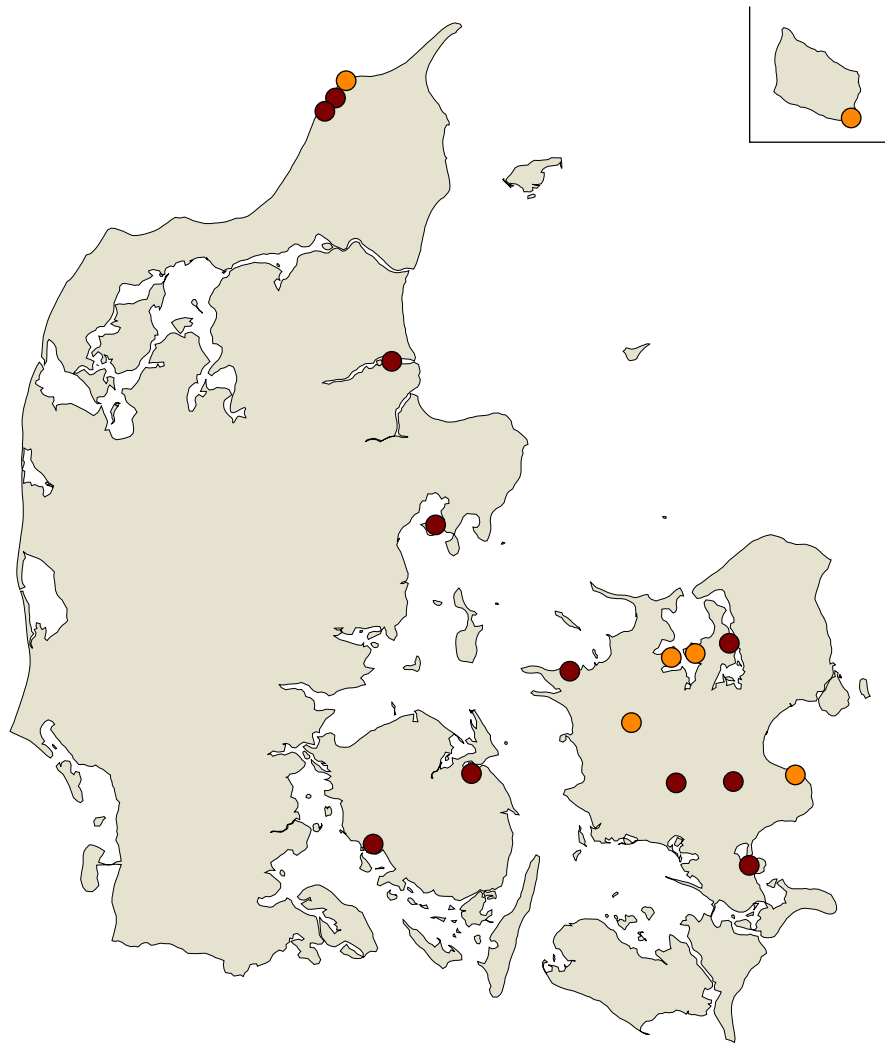
5.1.1 Introduktion

Samspillet mellem de fysiske faktorer og de biologiske forhold i et område er væsentlige for opretholdelsen af levedygtige plantebestande i naturen. For planter, der er bundet til det sted, hvor de slår rod, er disse forhold af afgørende betydning for arternes overlevelse og reproduktion. En ændring i miljøet kan betyde ændret levevilkår for bestanden, og hvis arterne har en stor plasticitet, d.v.s. stor bredde i den genetiske og dermed den fysiologiske variation, er der en øget chance for, at bestanden kan tilpasse sig nye forhold. For forvaltning af plantebestande er det vigtigt at vide, om bestandens bæredygtighed forudsætter en udveksling af genetisk materiale. Udveksling af genetisk materiale mellem bestande kan foregå ved frø- eller pollen-spredning, altså udvekslingen kan foregå på individ- eller gamet-niveau.

Mygblomst har vegetativ formering og er overvejende selvbestøver (Hagerup 1941, Wind 2002). Dens blomster er uden særskilt duft og nektar, så insektbestøvning har kun en lille betydning. Mygblomst er i lighed med andre orkidéarter en pionerplante der etablerer sig på en nyopstået lokalitet, hvor forholdene tilgodeser frøenes krav til spiring. Når forholdene ændres f.eks. ved tilgroning, reduceres dens muligheder for overlevelse, da arten er lyskrævende.

Mygblomst forekommer i det nordøstlige Nordamerika, i Nord- og Centraleuropa, samt i den vestlige del af Sibirien (Luer 1975 i Catling 1980). Den er i tilbagegang i Danmark (Wind 2002), England (Wheeler *et al.* 1998), Nordtyskland og Sydsverige. Udbredelsen i Danmark fremgår af Figur 3. For opretholdelsen af en levedygtig bestand er det nødvendigt at vide, hvilke faktorer arten kræver af voksestedet, næringsstoffer etc., og sammenholde dette med dens formeringsstrategi og genetik. For at belyse det sidste er der udført genetiske undersøgelser af danske bestande af mygblomst. Disse resultater kan give en forklaring på årsagerne til artens tilbagegang, og om det er muligt at standse den. Hvis der kan påvises en genetisk differentiering i bestandene, vil dette kunne benyttes til at styrke mindre og svage bestande, da en 'krydsningsfrodighed' (heterosis-effekt) kan forventes.

Figur 3 Udbredelsesområde for mygblomst i Danmark. Registreret forekomst i perioden 1997-1999 (sorte cirkler) og i 1985-1995 (grå cirkler) (efter Pihl *et al.* 2000).



5.1.2 Materiale og metoder

I sommeren 2001 blev der indsamlet bladspidser fra tre bestande i Nørlev og Vandplasken ved Hirtshals og Urup Dam på Fyn. Der blev indsamlet bladspidser fra henholdsvis 100, 96 og 87 individer. Der blev udført to analyser. I analyse 1 blev 15 enzymer afprøvet med stivelseselektroforese. Til elektroforesen blev benyttet en 12 % stivelse i kombination med forskellige buffere, og af de 15 afprøvede enzymer var de ni anvendelige. Analyse 2 blev udført efter den såkaldte RAPD-PCR metode hvor 27 primere blev afprøvet og fem gav brugbare resultater.

5.1.3 Resultater og diskussion

I analyse 1 viste ingen af de ni anvendelige enzymer genetisk variation. I alt 12 loci blev analyseret i de to stikprøver fra Nørlev og Vandplasken, men kun otte i bestanden fra Urup Dam på grund af prøvematerialets kvalitet. Ingen af de undersøgte loci udviste genetisk variation, og der var ikke forskel i forekomsten af alleler i de tre stikprøver. I analyse 2 blev der ligeledes fundet en lav genetisk variation. Antallet af undersøgte individer er lavt (24-30), men da den genetiske variation er meget lille er det ikke sandsynligt at en forøgelse af datamaterialet vil ændre resultatet. Det konkluderes derfor at den ge-

netiske variation for mygblomst er lav, da det ikke har været muligt ved de genetiske undersøgelser at påvise variation hverken inden for de undersøgte bestande eller imellem bestandene. Den lave genetiske variation kan skyldes, at arten har en lav genetisk variation eller at de benyttede metoder er uegnede til påvisning af genetisk variation hos mygblomst.

5.1.4 Bevaringsstatus

Den nationale bevaringsstatus for mygblomst er foreløbig vurderet som ugunstig, bl.a. fordi arten generelt har haft tilbagegang gennem hele 1900-tallet og på grund af mange af de nuværende bestandes beskedne størrelser og negative bestandsudvikling (Pihl *et al.* 2000). Før 1950 er arten med sikkerhed fundet på ca. 100 lokaliteter nord og øst for isens hovedopholdsline og fortrinsvis på øerne (Wind 2002).

I 1997-1999 blev mygblomst eftersøgt på 18 lokaliteter, hvor arten har været registreret inden for de sidste 10 år. Den blev genfundet på 11 lokaliteter med en samlet bestand på ca. 5.000 individer (Wind 1999, Wind 2002, Pihl *et al.* 2000).

5.1.5 Kriterier for gunstig bevaringsstatus

Nationalt niveau

Gunstig bevaringsstatus for mygblomst i Danmark forudsætter bl.a., at arten findes inden for den kontinentale region herunder i den nordlige- og østlige del af Jylland, på Fyn og Sjælland/Lolland/-Falster, og i hvert af de fire områder i én til flere levedygtige bestande (Søgaard *et al.* 2003). Bestandsstørrelsen skal nationalt være stigende.

Gunstig bevaringsstatus forudsætter endvidere, at der sker en forøgelse af antallet af bestande af mygblomst. Det er ikke muligt fagligt at begrunde et bestemt antal bestande af mygblomst, da et sådant vil afhænge af vegetationens udvikling på de eksisterende lokaliteter. Desuden skal arealet af de nuværende og potentielle voksesteder for mygblomst være stigende.

Lokalt niveau

Kriterier for gunstig bevaringsstatus er også defineret på lokalt niveau. Her forudsættes det, at individantallet i den enkelte bestand skal være stabil eller stigende. På voksestederne skal der opretholdes eller skabes gode etablerings- og levevilkår for arten udtrykt ved indikatorer som vegetationshøjde, tilgroning og blotlagt jordbund samt ved de hydrologiske forhold (Søgaard *et al.* 2003).

5.1.6 Forvaltningsmæssige aspekter

På grundlag af de foreliggende genetiske undersøgelser er der intet belæg for at lave større forvaltningstiltag som f.eks. at etablere spredningskorridorer eller på anden måde at forøge muligheden for udveksling af genetiske materiale mellem bestande af mygblomst for at forbedre deres levedygtighed. Det skal påpeges, som nævnt tidligere, at andre genetiske metoder måske vil afsløre en forskel mellem bestandene og dermed hjælpe til med at finde en bedre strategi for forvaltningen af mygblomst.

Konstateringen af en lav genetisk variation indebærer, at begrebet "levedygtighed" i de nationale bevaringskriterier for mygblomst (Søgaard *et al.* 2003) ikke kan defineres ud fra den mindste effektive bestandsstørrelse på grundlag af de genetiske undersøgelser. En stor bestand er muligvis mere robust end en lille bestand i forhold til en række tilfældige ydre fysiske påvirkninger, men bestandsstørrelsen er ikke afgørende for at opretholde den genetisk variation i mygblomst, der trods alt er til stede. Dette forhold bør indgå i den førstkommande revision af kriterierne for gunstig bevaringsstatus for mygblomst på nationalt niveau.

Forvaltningsmæssigt skal indsatsen derfor ikke rettes mod at opretholde store bestande af hensyn til genetisk "levedygtighed", men det skal tilstræbes, at mygblomst skal forekomme på flere lokaliteter/voksesteder for at arten kan overleve på lang sigt, da risikoen for lokal udryddelse i Danmark på grund sygdom eller miljøændringer mindskes. Mange spredte bestande af mygblomst er en forvaltningsmæssig bedre strategi end at opretholde færre bestande med højt individantal.

En tiltagende (stigende) bestandstørrelse er i sig selv ikke nok til, at mygblomst kan opnå gunstig bevaringsstatus uden at der samtidig sker en stigning i antallet af bestande, sådan som kriterierne for gunstig bevaringsstatus nu er fastlagt (jf. Søgaard *et al.* 2003). I bevaringskriterierne er antallet af bestande sat til minimum 20 uden, at det kan begrundes rent biologisk. Faktisk kan en stigende bestandstørrelse, som baserer sig på ganske få lokaliteter være udtryk for en meget sårbar bestand der udvikler sig i ugunstig retning, da den genetiske differentiering måske er meget lav. Derved kan arten vanskeligere tilpasse sig til en ændring i miljøet.

For at opnå gunstig bevaringsstatus for mygblomst i Danmark skal der derfor skabes flere potentielle voksesteder for mygblomst. Det indebærer, at der på såvel de eksisterende voksesteder som potentielle evt. tidligere voksesteder skal skabes/opretholdes gunstige levestedsvilkår, som er defineret i bevaringskriterierne for mygblomst på lokalt niveau. Disse kriterier kan uden videre lægges til grund for en plejeplan for såvel eksisterende som potentielle voksesteder for mygblomst.

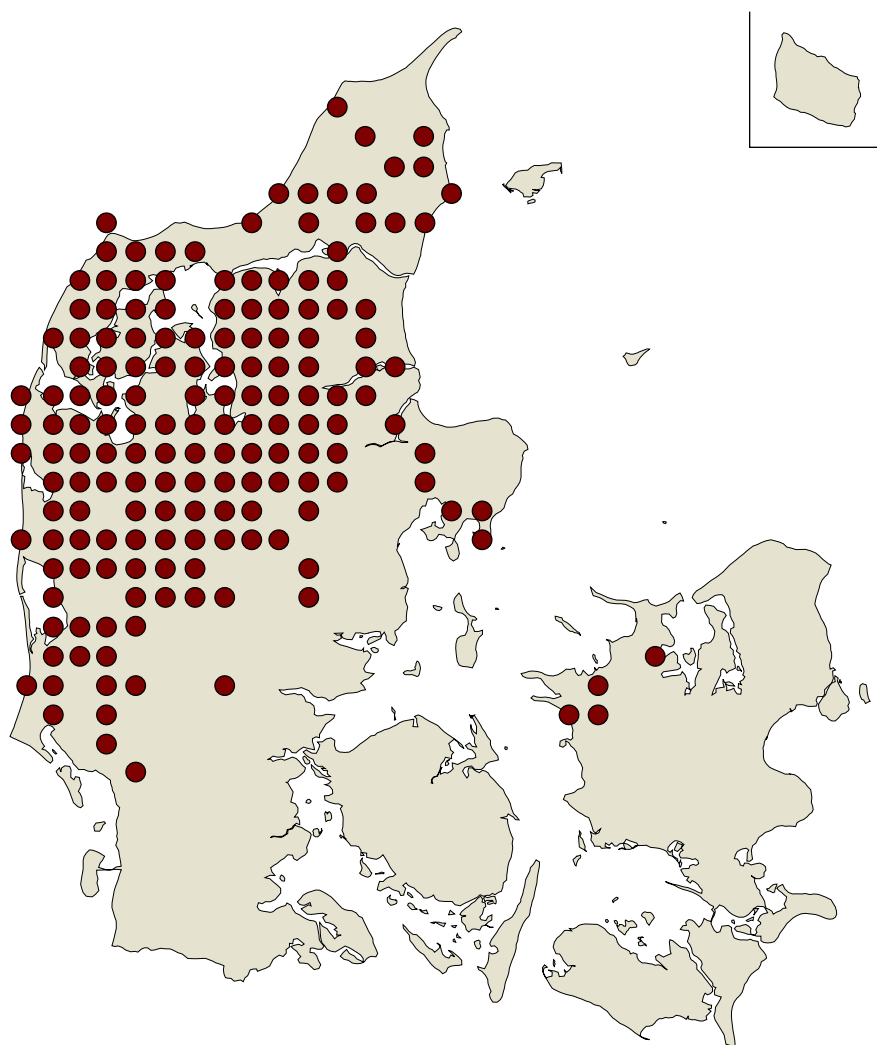
For at forøge mygblomsts muligheder for spredning, bør deres egenkab som pionérart tilgodeses. Det kunne gøres ved at 5-50 % af jordbunden som udgangspunkt blotlægges ved afgræsning af kreaturer, da det forøger frøenes muligheder for at spire på potentielle voksesteder. De potentielle voksesteder bør udvælges geografisk, så de ligger indenfor frøenes realistiske spredningsafstand i forhold til artens eksisterende voksesteder, da vegetationsspredning i praksis kun forekommer på artens voksesteder.

5.2 Odder (*Lutra lutra*)

5.2.1 Introduktion

Den europæiske odder (*Lutra lutra*) var vidt udbredt i vådområder i Europa til slutningen af 1800-tallet. I løbet af det 20. århundrede er arten gået kraftigt tilbage i den centrale og nordlige del af Sverige (Sjöåsen *et al.* 1997) og Danmark (Madsen 1996). Fragmenterede bestande overlevede i det østlige Tyskland, Frankrig, vestlige Spanien, sydlige England og Italien (MacDonald & Mason 1994, Ruiz-Olmo & Delibes 1998). I Irland, Skotland og de baltiske lande overlevede sunde bestande mens bestandene i Belgien og Holland forsvandt (MacDonald & Mason 1994). Årsagerne til tilbagegangen skyldes ødelæggelse af habitater, kemisk forurening og en direkte forfølgelse af odderne i det centrale og vestlige Europa (MacDonald & Mason 1994).

Figur 4 Udbredelsesområde for odder i Danmark. Registreret forekomst i Danmark 1993-2000 vist for kvadrater af 10 x 10 km (efter Pihl *et al.* 2000)



Odderen var tidligere vidt udbredt i Danmark. Den danske vildtudbyttestatistik viser et drastisk fald fra ca. 500 nedlagte oddere i 1941 til 100 dyr i 1967, det sidste år hvor arten kunne jages (Strandgaard & Asferg 1980). Kortlægning af oddere i 1980'erne viste, at arten stort set var forsvundet fra Sjælland og Fyn og udelukkende fandtes i det nordlige og vestlige Jylland omkring Limfjorden (Fig 4). I 1990'erne

blev der konstateret en fremgang i bestanden i Midt- og Nordjylland og i den vestlige del af Sjælland (Madsen 1996). Ved den nationale overvågning i 2004 viste resultatet en betydelig fremgang for arten på landsplan (Søgaard et al. 2004) (Figur 4).

Der er foretaget to undersøgelser af hvilke genetiske konsekvenser den tidligere bestandstilbagegang har haft på den danske odderbestand (Mucci *et al.* 1999, Pertoldi *et al.* 2001a).

5.2.2 Metode og materialer

I undersøgelse 1 var formålet at påvise de genetiske effekter af den tidligere isolation af odderbestandene i Danmark og desuden påvise en eventuel "flaskehalseffekt" (Mucci *et al.* 1999). Flaskehalseffekter og genetisk drift forventes at have en kraftig effekt på DNA'et i mitokondrie, da dette nedarves maternelt (nedarves fra mor til datter). I alt blev der indsamlet væv fra 30 døde oddere i perioden 1990-1994.

I undersøgelse 2 var et af formålene at påvise eventuelt tab af genetisk variation i odderbestandene ved hjælp af variation i mikrosatellit loci, og om der kunne påvises en "flaskehalseffekt". Ligeledes ville man analysere det genetiske slægtskab mellem den overlevende Limfjords-bestand og oddere fra områder, hvor de tidligere havde været i Danmark. Spørgsmålet var om den tilbageværende odderbestand var en del af en større bestand, der var gået tilbage, eller om der eksisterede genetisk forskellige dele af bestanden tidligere, som Limfjordsbestanden havde været en del af. Bestandsstørrelsen af oddere i Limfjords området blev i 1980'erne estimeret til 200 (Madsen 1996), men den effektive bestandsstørrelse har formodentlig været væsentlig lavere (Frankham 1995).

I denne undersøgelse blev der ekstraheret DNA fra frisk væv og fra museums individer ved at fjerne rovdyrstanden fra kraniet og bore tandroden ud (Pertoldi *et al.* 2001a). Tandroden og lidt af tanden blev benyttet til DNA ekstraktion i følge Nielsen *et al.* (1997). Der blev benyttet 11 mikrosatellit markører (Dallas & Piertney 1998). Der blev analyseret 67 kranier, som repræsenterede det historiske prøvesæt dækkende tidsperioden fra 1880'erne til 1960'erne fra henholdsvis Sjælland og Jylland, og 58 vævsprøver fra recente oddere indsamlet i Limfjords-området.

5.2.3 Resultater og diskussion

Undersøgelse 1

Genetisk variation og bestandsnedgang baseret på mtDNA-variation.

Den genetiske variation hos de 30 oddere viste sig at være meget lav (Mucci *et al.* 1999). I alt 29 oddere delte den samme genetiske haplotype, mens én viste en variant type med blot én base-mutation over 952 basepar. En lignende lav variation er observeret i andre rovdyrbestande, der ligeledes har undergået drastiske fald i bestandsstørrelserne (Hoelzel *et al.* 1993, Randi *et al.* 1994). Dette tydede på, at den lave haplotype-diversitet observeret i de danske oddere, kunne forklares ved bestandsnedgang og "flaskehalseffekt". Hvis man antager, at genetiske forandringer i mitokondriet hos rovdyr sker med en ha-

stighed på 5-10 % per million år (Hoelzel *et al.* 1993), kunne den observerede mutation mellem de to odder typer være opstået i løbet af 10.000 år eller siden den sidste istid (Maarleveld 1976), hvor odderne formodentlig koloniserede Danmark fra de sydeuropæiske refugier. Odderne som koloniserede Danmark kunne allerede have haft en lav genetisk variation på grund af de gentagne bestandsnedgange og eventuelle "flaskehalseffekter", de måtte have været udsat for som følge af klimaforandringerne i Pleistocene. Dog skal man tolke den lave diversitet med forsigtighed, da den kunne være et resultat af en mere konservativ udvikling hos oddere og dermed være et naturligt forekommende fænomen. En lignende lav variation i kontrolregionen i mtDNA blev observeret hos andre odderbestande i Sverige, Irland, England, Spanien og Tyskland (Randi *et al.* 2003), mens en analyse af den genetiske variation baseret på DNA-mikrosatellitter i nogle af de nævnte bestande udviste variation på et niveau observeret i andre pattedyr (Dallas & Piertney 1998).

Undersøgelse 2

Genetisk variation og bestandsnedgang baseret på mikrosatellitvariation.

Der blev kun observeret få indikationer af et recent tab af genetisk variation i mikrosatellit DNA hos den eksisterende odderbestand sammenlignet med de historiske prøver. Testen for en eventuel forskel i mængden af genetisk variation (forventede heterozygositet) mellem det recente og det sammenlagte historiske prøvesæt var ikke signifikant. Der blev ikke påvist en "flaskehalseffekt" eller forskelle i heterozygositet som indikation for en reduceret genetisk variation.

I undersøgelse 1 blev der observeret en meget lav genetisk variation (Mucci *et al.* 1999), og dette var ligeledes tilfældet i en undersøgelse af tyske oddere (Effenberger & Suchentrunk 1999), hvilket indikerer, at den genetiske variation i den nordeuropæiske odderbestand er lav. Undersøgelse 2 antyder, at den genetiske variation baseret på mikrosatellit markører var lav før det recente store fald i odderbestandene fandt sted (Pertoldi *et al.* 2001a). Testen for en bestands-ekspansion eller recession (Beaumont 1999) viste, at bestandsstørrelserne var faldet drastisk til ca. 1-3 % af den oprindelige størrelse. Dette fald er formodentlig foregået over en lang tidsperiode. Hvis det antages, at det eksisterende effektive kromosomantal N_0 er 100 og en generationstid på 3 år, vil det betyde, at tilbagegangen startede for ca. 2000-3000 år siden. Denne tilbagegang over en længere tidsskala end den der var dækket af de analyserede prøver, blev observeret både i det recente prøvesæt og de historiske prøver fra 1880'erne og 1940'erne. Starten på tilbagegangen for ca. 2000 år siden falder i øvrigt sammen med, at den europæiske bæver (*Castor fiber*) forsvandt fra Danmark for ca. 2500 år siden formodentlig på grund af menneskeskabt habitat-ødelæggelse eller jagt (Aaris-Sørensen 1988). Dog skal resultaterne af Beaumont's (1999) metode tolkes forsigtigt, da den antager, at mikrosatellitterne muterer i følge den stepvise mutations model, hvilket ikke helt gælder for disse markører.

Den lave genetiske variation i de danske oddere kunne også forklares ved en koloniserings hændelse efter den sidste istid for 10.000 år siden. Denne forklaring understøttes af Cassens *et al.* (2000) der under-

søgte oddere fra det østlige Tyskland og centrale Europa. I de fleste tilfælde blev den samme genetiske haplotype observeret sammen med få sjældnere lokale haplotyper, der var afledt fra den almindelige haplotype med en enkelt mutation. De to forklaringer udelukker ikke hinanden, men givet det kraftige signal om et drastisk fald over lang tid i bestandsstørrelsen blev det antaget, at den historiske bestandsreduktion har været en vigtig årsag til den observerede lave genetiske variation i de nulevende danske oddere.

En direkte sammenligning af recent og historisk genetisk variation i Limfjordsbestanden ville have været at foretrække frem for den gennemførte undersøgelse. Men der var for få prøver til, at det kunne gøres. På trods af begrænsningerne viser de præsenterede resultater, at den eksisterende odderbestand ikke har tabt meget genetisk variation i nyere tid, og at der stadig var levn fra tidligere tiders geografiske variation. Resultaterne antydede desuden, at der havde fundet en drastisk bestandsreduktion sted, men at denne var foregået over en tidsskala der dækker fra 100 til flere tusinde år. Dette indikerer, at reduktionen i den eksisterende odderbestand blot repræsenterer en acceleration af en i forvejen negativ udvikling i bestanden, der måske kan dateres så langt tilbage som forhistorisk tid.

5.2.4 Bevaringsstatus

I forhold til det øvrige Europa er den danske odderbestand meget isoleret (Mitchell-Jones *et al.* 1999) og har en bestandsstørrelse, der gør det usikkert, om den genetiske variation kan opretholdes. Den nationale bevaringsstatus for odder er derfor foreløbig vurderet som usikker (Pihl *et al.* 2000). De seneste år er der observeret en ekspansion af odderen i både Øst- og Sønderjylland (Søgaard *et al.* 2003, Elmeros 2000), hvilket gør, at arten vurderes at være godt på vej til at opnå gunstig bevaringsstatus i Danmark.

Menneskelige faktorer som f.eks. belastning af miljøfremmede stoffer bl.a. cadmium, bly, kviksølv, organoklorerede pesticidrester og polyklorerede bifenylter (PCB) er tilsyneladende ikke et problem for den danske odderbestand, da arten indeholder lave koncentrationer af disse stoffer sammenlignet med andre odderbestande i Europa (Madsen & Søgaard 2001).

Dog er antallet af dødfundne oddere steget igennem 1990'erne på trods af etablering af faunapassager for at undgå trafikdrab ved veje og påbud om stopriste i fiskernes åleruser for at undgå drukning. Der blev i perioden 1995-1999 indleveret 25-35 døde oddere til Skov- og Naturstyrelsen. Dyrene stammede hovedsageligt fra trafikdrab (Madsen & Søgaard 2001).

5.2.5 Kriterier for gunstig bevaringsstatus

Nationalt niveau

Gunstig bevaringsstatus for odder i Danmark forudsætter blandt andet, at arten i Jylland skal forekomme i en levedygtig bestand på mindst 1.200 individer (se Søgaard *et al.* 2003). Bestanden skal desuden såvel nationalt som inden for de atlantiske og kontinentale regioner være stabil eller stigende. Arten skal også findes inden for den

atlantiske region og den kontinentale region i både Jylland og på Sjælland samt i alle de 20 interesseområder, som er udpeget i den nationale forvaltningsplan for arten (Søgaard *et al.* 2003). Antallet af vandløbssystemer med forekomst af odder skal være stabilt eller stigende og der skal være en stigende længde af vandløb og areal af søer med egnede levesteder for odder (Søgaard *et al.* 2003).

Lokalt niveau

”På nuværende og egnede levesteder for odder skal der opretholdes eller skabes gode levevilkår for arten, og der skal på de nuværende levesteder være indikationer på, at bestanden er stabil eller stigende. Foruden tilstrækkelige fødemuligheder (vandløb/søer med fiskevandsmålsætning) skal der på levestederne findes uforstyrrede lokaliteter (fristeder), som giver odderne yngle- og tilflugtsmuligheder. Menneskeskabte mortalitetsfaktorer som trafikdrab og drukning i fiskeruser skal reduceres ved information om og kontrol af anvendelsen af spærreanordninger i ruser samt ved, at der etableres faunapasager, hvor trafikerede veje krydser levestedet/vandløbssystemet. Desuden skal der som en forudsætning for en bevaring eller forøgelse af artens forekomst og bestandstæthed være stabile eller stigende strækninger med egnede levesteder for odder” (Søgaard *et al.* 2003).

5.2.6 Forvaltningsmæssige aspekter

I en undersøgelse af de europæiske oddere viste den genetiske variation baseret på 11 mikrosatellit markører at være lavest hos de danske oddere (Randi *et al.* 2003). Ligeledes viste den genetiske undersøgelse af et oddermateriale for perioden 1883-1993 baseret på ni markører, at der historisk også var en lav genetisk variation hos odderen i Danmark (Pertoldi *et al.* 2001a). Der blev ikke påvist et tab af genetisk variation (flaskehalseffekt) ved en sammenligning mellem historiske og recente prøvesæt. Det vil sige, at der ikke kunne påvises et tab af genetisk variation som et resultat af den lave bestandsstørrelse i 1980'erne. Undersøgelsen antydede også, at tabet af variation sandsynligvis er et resultat af en koloniserings-effekt (dvs. at få dyr grundlagde bestanden), da odderen indvandrede til Danmark, samt af en menneskeskabt habitat-ødelæggelse eller jagt, der kan dateres til at have fundet sted for ca. 2000 år siden. På dette tidspunkt forsvandt bæveren også fra det danske landskab (Aaris-Sørensen 1988). De genetiske analyser viste også at der eksisterer mindst to genetisk forskellige bestande i Danmark, (mindst) én i Limfjords-området og én på Sjælland.

På baggrund af disse resultater bør odderen i Jylland forvaltes som en sammenhængende bestand. For at opretholde i det mindste den observerede moderate genetiske variation (Pertoldi *et al.* 2001a, Randi *et al.* 2003) anbefales en effektiv bestandsstørrelse på 500 kønsmodne individer (Frankham *et al.* 2002), hvilket betyder at census bestandsstørrelse for odderen bør være på 1.200-1.600 voksne individer (Shaffer 1981, Wansink & Ringenaldus 1991). Bestanden på Sjælland er meget lille og bør ligeledes forvaltes separat, og som i Jylland bør der også her tilstræbes at bestanden så vidt muligt vokser, gerne til samme niveau som i Jylland.

Forvaltningen af bestanden i Jylland er af særlig interesse på såvel nationalt som på europæisk plan. For at arten kan opnå gunstig bevaringsstatus indebærer det, at den skal sprede sig til tidligere levesteder i hele Jylland og være vidt udbredt i de udpegede interesseområder for arten. Forudsætningen herfor er udpegning af økologiske spredningskorridorer på landskabsniveau, som modvirker den tiltagende habitatfragmentering som især stammer fra udbygning af vejnettet. Udpegning af spredningskorridorer er i de senere år blevet en integreret del af amternes naturplaner og de har bidraget til spredning af odderbestanden.

De forvaltningsmæssige bestræbelser har resulteret i, at der på nationalt plan nu vurderes at være skabt et sammenhængende netværk af levesteder for oddere i Jylland nord for en linie fra Ribe-Esbjerg til Århus-Djursland, hvorimellem der kan ske udveksling af individer og dermed genetisk materiale. Bestanden synes desuden at sprede sig mod den sydøstlige del af Jylland og vil formentlig i løbet af en mindre årrække være fremme ved den dansk-tyske grænse over en bred front. I et europæisk perspektiv betyder det, at den danske forvaltningsindsats for odderen bidrager positivt til etableringen af et sammenhængende europæisk, økologisk net af særlige bevaringsområder for arter omfattet af EF-Habitatdirektivet, også kaldet Natura 2000.

Siden 1998 er der på Europæisk plan arbejdet på at udpege et særligt netværk af levesteder for odder, det såkaldte "Otter Habitat Network Europe" (TEN 2000, Reuther & Krekemeyer 2004). Baggrunden er den generelle tilbagegang i de central- og vesteuropæiske odderbestande, som har bevirket en fragmentering af tidligere forbundne bestande og bl.a. efterladt et område med ringe eller ingen forekomst af odder i Centraleuropa. I netværks-planen er kerneområder og potentielle områder udpeget for odder i Europa samt mulige spredningskorridorer til indbyrdes at forbinde disse for herigennem at skabe mulighed for spredning og udveksling af individer og genetisk materiale.

Den danske bestand i Jylland er i den forbindelse udpeget som en kernebestand som via en vestlig spredningskorridor over den dansk-tyske grænse via Slesvig-Holsten tænkes forbundet med en ekspanderende bestand fra Mecklenburg-Vorpommern i det tidligere Østtyskland (Reuther 2001). Udveksling af genetisk materiale vil på sigt kunne få indflydelse på den genetiske variation og levedygtighed i bestandene i Danmark og Nord- og Vesttyskland og måske i et længere perspektiv være en medvirkende faktor for en fortsat ekspansion i Europa.

5.3 Løvfør (*Hyla arborea*)

5.3.1 Introduktion

Løvfør er udbredt over det meste af Europa fra Spanien i vest til Kaukasus i øst. Nordgrænsen går over Holland, Danmark, Skåne, og videre østpå langs Polens nordgrænse (ganske få forekomster i Litauen og muligvis Letland), og derfra mod sydøst igennem Hviderusland. Uden for Europa findes den i dele af Tyrkiet (Fog 1997).

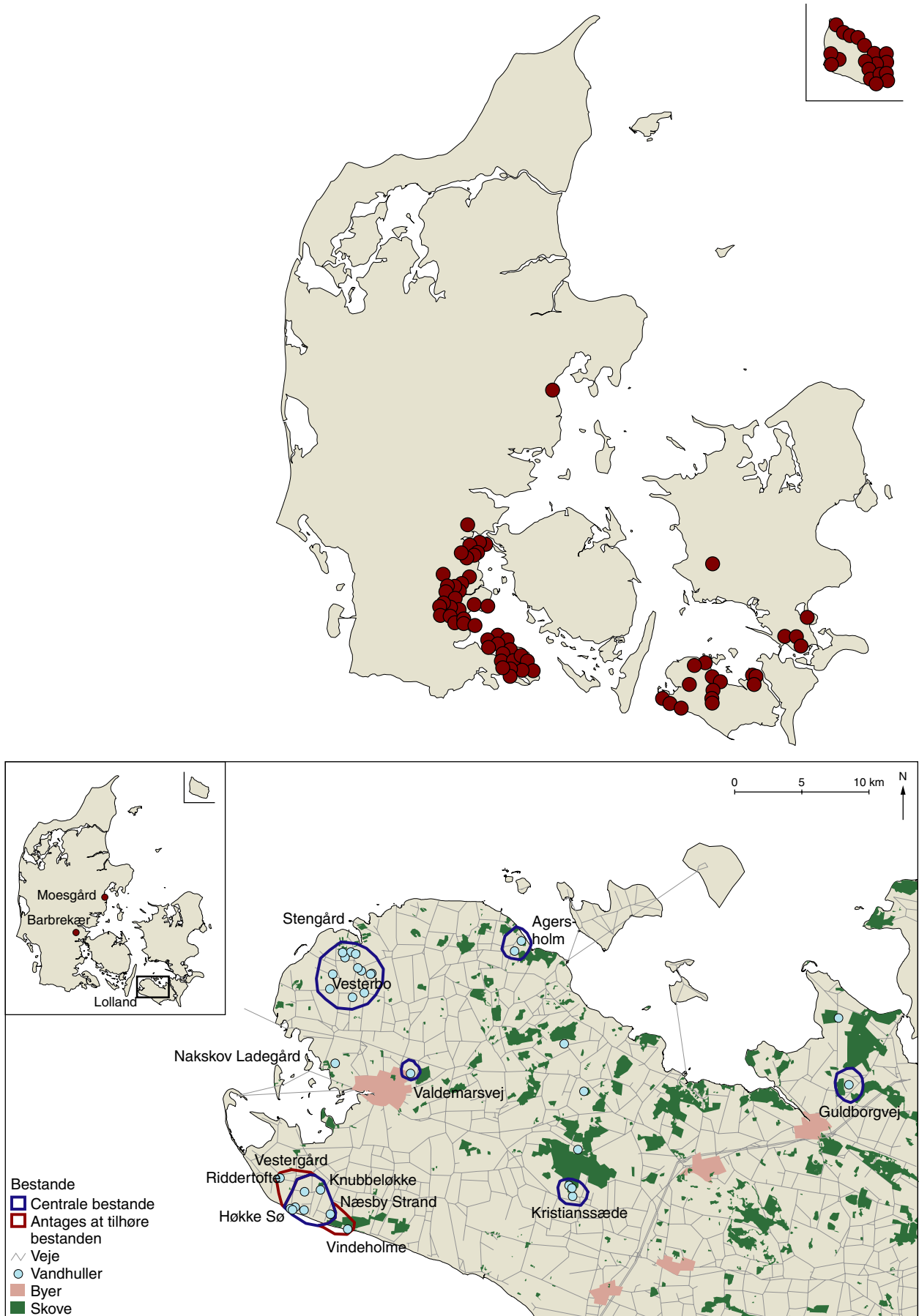
Der findes en del oplysninger om artens levesteder i Danmark, især fra første halvdel af 1900-tallet, men også fra 1800-tallet og helt tilbage til 1782 (Fog 1988). Oplysninger fra tiden før 1976-1986 viser, at den nordligste forekomst har været ved $56^{\circ} 18'$. Det svarer til bredden for den nordligste, sikre forekomst i Sverige (nær Kullen) (Edenhamm 1996), og svarer muligvis også til den tidligere udbredelses-grænse i Baltikum.

Den tætteste forekomst har været på Bornholm, men der har også været tætte forekomster på Lolland-Falster og i Øst-Sønderjylland. Forekomsterne på øerne i det sydfynske Øhav, på Fyn og på Sjælland har været ret spredte.

Ud fra en atlasundersøgelse er løvfrøen generelt vidt udbredt i Syd-østjylland, Als, Vestlolland og Bornholm, især på den sydlige del af øen (Figur 5). På Sjælland og Lolland er bestandene blevet fragmenteret og bestandsstørrelserne har været så lave at bestandene flere steder har været udsat for en flaskehalseffekt (Fog 1997). Generelt har udviklingen været sådan at enten er en større, sammenhængende forekomst bevaret, eller også er den forsvundet. Tendensen i hele landet har været en markant tilbagegang i løbet af 1980'erne.

De genetiske undersøgelser af danske løvfrøer har fokuseret på bestande fra det østlige Jylland, Vejle- og Århus området samt Lolland (Figur 5 a,b). I 1988 var bestanden syd for Vejle faldet til 55-75 kvækkende hanner fordelt på 11 vandhuller, men i 2001 var dette estimat steget til 800 kvækkende hanner fordelt på 76 vandhuller (Skriver 2001). Fra 1985-1987 blev der fra bestanden ved Vejle indsamlet 6000 små løvfrøer som blev udsat ved Århus (Moesgård), hvor arten var forsvundet (Skriver 1988). I årene efter reproducerede denne bestand sig selv (Skriver 1988, Skriver pers. komm.).

På Lolland blev den første intensive kortlægning af løvfrøerne udført i 1981 og igen i 1991 (Fog 1992). I 1991 var antallet af vandhuller med løvfrøer faldet til 32 fra 100 i 1981, hvilket svarer til et fald i antal kvækkende hanner fra 500 til 225-250 (Fog 1992). Tidligere sammenhængende forekomster var opdelt i isolerede enkeltforekomster. I adskillige isolerede vandhuller var antallet af kvækkende hanner nede på 2-5 individer. I 1991 påbegyndtes en intensiv redningsindsats, hvor et stort antal vandhuller blev oprenset, og dette arbejde er fortsat siden. Dette har resulteret i at arten har overlevet i mange af de små bestande, som var isolerede i 1991.



Figur 5 Udbredelsesområde for løvfør i Danmark (a) samt detail kort med lokaliteter på det vestlige Lolland (b) (efter Pihl *et al.* 2000 og Andersen *et al.* 2004).

De genetiske aspekter af denne fragmenterings proces er ikke tidligere analyseret. Bestande, der har været udsat for fragmentering og derved har haft en bestands-nedgang, har en stor sandsynlighed for at miste genetisk variation på grund af genetisk drift (dvs. tilfældigt tab af gener) og tabet af sammenhæng mellem delbestande (Tempelton *et al.* 1990). En af konsekvenserne af dette kan være en øget sandsynlighed for indavl i vandhullerne og en lav genetisk variation grundet en flaskehalseffekt. Dette vil man sandsynligvis kunne påvise ved en genetisk undersøgelse af frøerne i de forskellige vandhuller.

5.3.2 Metode og materialer

Indsamling af materiale

I alt blev der indsamlet og ekstraheret DNA (se Andersen *et al.* 2004) fra 494 haletudse-haler fra 13 vandhuller på Lolland og to vandhuller fra Jylland. I Jylland repræsenterede ét vandhul (Moesgård) en kunstig introduceret bestand, og ét vandhul (Barbrekær) fra Viuf Skov syd for Vejle repræsenterede den bestand, hvor de nævnte løvfrøer blev indsamlet fra (Figur 5 a,b) (Skriver pers. komm., Skriver 2001).

Bestandsstørrelser og bevaringsstatus

På Lolland blev antallet af kvækkende hanner talt intensivt i perioden fra 1991-2001, i Barbrekær fra 1985-2001 og i Moesgård fra 1987-2001 (Fog pers. komm., Fog 1992, Skriver pers. komm.).

Ved vurderingen af bevaringsstatus blev der foretaget et skøn over hvilke bestande, der var isolerede. Bevaringsstatus blev antaget at være gunstig, når den effektive bestandsstørrelse $N_e > 50$ individer og i fremgang eller når $N_e > 500$ individer, og bestanden (gruppen af delbestande) er voksende (Pihl *et al.* 2000). Da forholdet mellem N_e og N (census bestandsstørrelse) for løvfrøer ikke kendes, blev det antaget at hvis antallet af kvækkende hanner var 50 eller 500, var antallet af voksne i bestanden (gruppen af delbestande) henholdsvis 100 eller 1000.

Definition af makropopulation

Da løvfrøer kan vandre ca. 4 km pr. år (Stumpel & Hanekamp 1986, Fog 1993) blev samlinger af vandhuller som ligger indenfor en afstand af op til 4 km anset for at repræsentere bestande, der udveksler individer og måske udgør genetiske enheder. Disse genetiske enheder blev defineret som en "makropopulation". Antallet af kvækkende hanner i "makropopulationen" er derved defineret som det totale antal kvækkende hanner i alle vandhuller i det givne område og ikke blot det vandhul, hvorfra der er taget prøver.

5.3.3 Resultater og diskussion

Genetisk variation

De 494 haletudser blev analyseret med 11 arts-specifikke mikrosatellit markører (Arens *et al.* 2000), samt en ikke-artsspecifik markør (Call &

Hallett 1998). Antal alleler observeret i de 12 markører varierede fra 6 til 21 (Andersen *et al.* 2004).

Den genetiske variation i form af den gennemsnitlige H_e for hvert vandhul (Tabel 1) varierede fra 0,35 i området ved Guldborgvej på øst Lolland til 0,53 i området ved Brabæk ved Vejle. Denne variation ligger på højde med den gennemsnitlige genetiske variation angivet for den almindelige og vidt udbredte butsnudede frø, *Rana sylvatica* ($H_e = 0,44-0,50$) baseret på 5 loci (Newman & Squire 2001) og lidt højere sammenlignet med en lille britisk relikv bestand af *Bufo calamita* (strandtudse) ($H_e = 0,242-0,386$) (Rowe *et al.* 1998) baseret på 8 loci. I tidligere genetiske undersøgelser af den europæiske løvfrø baseret på allozym variation, blev der fundet en lav genetisk variation. I to græske bestande blev der fundet en $H_e = 0,13$ og $0,14$ (Kyriakopoulou-Sklavounou *et al.* 1992), mens Edenhavn *et al.* (2000) ikke fandt genetisk variation i svenske løvfrøer.

Tabel 1 Gennemsnitlige genetiske variation udtrykt ved H_e (forventede heterozygotitet) (Nei 1987), F_{IS} (indavls-koefficient) (Goudet 1995) der ligeledes er et estimat for afvigelse fra Hardy-Weinberg-forventningerne (Raymond & Rousset 1995) for 12 mikrosatellit markører.

	H_e (genm.)	SE	F_{IS} (over alle loci) HWE	F_{IS} (genm.)
Lolland				
Vesterbo	0,435	0,260	0,101	0,192
Stengård	0,474	0,284	-0,001	-0,007
Agersholm	0,420	0,240	0,155*	0,198
Riddertoft	0,443	0,201	0,035	0,085
Høkke Sø	0,471	0,236	0,121	0,155
Vindeholme	0,370	0,254	0,203*	0,214
Kristianssæde	0,395	0,284	0,046	0,091
Guldborgvej	0,351	0,183	0,205*	0,265
Nakskov L,	0,461	0,237	0,105	0,203
Valdemarsvej	0,497	0,293	0,117	0,225
Jylland				
Barbræk	0,534	0,212	0,070	0,131
Moesgård	0,513	0,197	0,111	0,138
F_{IS} total			0,105*	

*Significant på 5 % niveau efter sekvensvis Bonferroni korrektion (Rice 1989).

En signifikant afvigelse fra Hardy-Weinberg-forventningerne (HWE) blev observeret i vandhullerne ved Agersholm, Vindeholme og Guldborgvej (Tabel 1), hvilket indikerer et underskud i genetisk variation ($F_{IS} > 0$ angiver en afvigelse fra Hardy-Weinberg-forventningerne i form af et underskud af heterozygoter), der kunne skyldes indavl (parring mellem nært beslægtede individer) eller eksistensen af flere delbestande i de enkelte vandhuller.

Observation af løvfrø bestande over en 9-årig periode tydede på, at bestandene på Lolland har været udsat for kraftige svingninger i bestandsstørrelserne og har været nede på få kvækkende hanner flere

steder. En lille bestandsstørrelse over en længere periode forventes at kunne afspejle sig i en reduktion af den genetiske variation på grund af genetisk drift (flaskehalseffekt) og øge indavl i vandhullerne (Avise 1994, Frankham 1998), forudsat at vandhullerne har været isoleret fra hinanden.

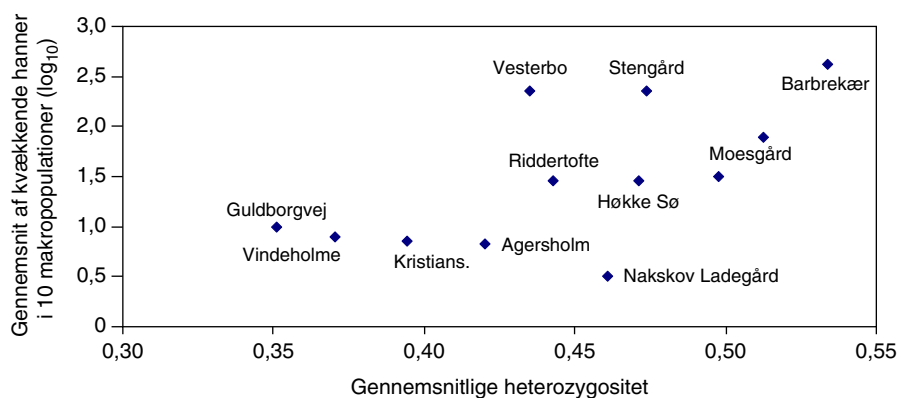
I vandhullerne ved Agersholm og Vindeholme (hvor $F_{IS} > 0$) var bestandsstørrelserne meget små. Dette betød også, at der var en stor risiko for utilsigtede bror-søster parringer, hvilket kunne føre til lav fertilitet og lav overlevelse af haletudserne (reduceret fitness). Derved kan der opstå en korrelation mellem lille genetisk variation og overlevelse. Indsamlinger over flere år gav meget varierende overlevelse, i nogle prøver var der sunde æg og larver og i andre var æggene ikke sunde. Denne observation understøttede, at indavl var en sandsynlig årsag til den observerede reduktion i den genetiske variation (heterozygoter) i disse vandhuller. På den anden side kan eksistensen af flere delbestande i et vandhul opstå ved, at løvfrøerne vandrer mellem nærtliggende vandhuller, der er indbyrdes genetisk differentierede. Variationen i de omgivende miljøfaktorer som påvirker vandhullerne vil også være med til at forme det genetiske mønster og kunne give den samme effekt, især hvis der i forvejen er en indavls-effekt i vandhullerne. Dette var sandsynligvis forklaringen på afvigelsen fra en forventet fordeling i vandhullet ved Guldborgvej, hvor frøerne i tidligere år var fordelt på flere forskellige vandhuller adskilt ved en afstand på 1,8 km, men i selve indsamlingsåret var løvfrøerne samlet i ét vandhul.

Genetisk variation og bestandsstørrelse

Teorien forudsiger at mængden af genetisk variation stiger med stigende bestandsstørrelse (Soulé 1976, Frankham 1996). Den genetiske variation hos de danske løvfrøer var signifikant positiv korreleret med det (harmoniske) gennemsnitlige antal hanner i makropopulationerne (Spearman's $\rho = 0,639$; $p = 0,025$) (Figur 6). Bestandsstørrelserne for de forskellige vandhuller i makropopulationerne kan under antagelse af, at de hanner, der kvækker, også er de hanner, der aktivt deltager i parringerne, siges at være et udtryk for den effektive hanlige bestandsstørrelse for en bestand med populationsfluktuationer over tid. Dermed antydede undersøgelsen at jo højere den effektive hanlige bestandsstørrelse var, jo mere genetisk variation var der i bestanden.

Den observerede positive sammenhæng mellem genetisk variation og bestandsstørrelse er også observeret hos strandtudse (*Bufo calamita*) (Rowe *et al.* 1999) baseret på variation i DNA-mikrosatellitter. Her blev der observeret signifikante forskelle i mængden af genetisk variation imellem én geografisk region og tre andre geografiske regioner. Forskellen kunne formodentlig skyldes, at der havde eksisteret flere delvist isolerede bestande i den ene region, hvilket har betydet, at en kraftig reduktion i bestandsstørrelsen i en af bestandene i regionen (som det f.eks. var sket i efteristids-perioden i Storbritannien) har haft en mindre betydning for niveauet af den genetiske variation i regionen.

Figur 6 Genetiske variation hos løvfrøer og bestandsstørrelse estimeret som et (harmonisk) gennemsnit af kvækkende hanner over ni år for makropopulationerne på Lolland og i Jylland.



Hos butsnudede frø (*Rana temporaria*) og skruptudse (*Bufo bufo*) (Sep-pä & Laurila 1999) blev der ikke observeret en positiv sammenhæng mellem bestandsstørrelse og genetisk variation. Undersøgelsen var baseret på variation i allozymer, hvilket måske kunne forklare den manglende, forventede sammenhæng, da mikrosatellitter hos mange organismer er mere variable end allozymer (Streiff *et al.* 1998, Andersen *et al.* 1998, Andersen *et al.* 2001).

Testen for en flaskehalseffekt hos løvfrøer på Lolland og Jylland (Tabel 2) viste en signifikant reduktion i den genetiske variation forårsaget af den observerede nedgang i bestandsstørrelserne på Lolland. Reduktionen blev observeret både i vandhullerne med en ugunstig bevaringsstatus samt i vandhullerne Riddertoft og Høkke Sø fra makropopulationen i SV Lolland. Høkke Sø er et vandhul, som er koloniseret for nylig; derfor er antydningen af en flaskehalseffekt her et udtryk for en founder (kolonisering) hændelse. Løvfrøerne i Riddertoft er præget af en flaskehalseffekt, men er i fremgang.

Den højere genetiske variation observeret i løvfrø-bestandene i Jylland sammenlignet med Lolland kunne skyldes forskel i niveauet af habitat-fragmenteringen. Selve hastigheden, hvormed der blev tabt egnede habitater for løvfrøerne, var den samme op til 1990 både i Jylland og på Lolland (Fog 1997), men mønstret, hvormed fragmenteringen foregik, var forskelligt. Løvfrøerne i Jylland blev koncentreret i stadig mindre sammenhængende kerneområder, mens løvfrø-bestandene på Lolland blev opdelt i mange små fragmenter, hvilket har været medvirkende til den signifikante observerede genetiske reduktion i alle de undersøgte vandhuller.

Tabel 2 Tests for flaskehalseffekt (M) (Garza and Williamson 2001) hos løvfrøer i vandhullerne baseret på det gennemsnitlige antal kvækkende hanner for makropopulationerne.

Lokaliteter	M	P
Vesterbo	0,714	0,024
Stengård	0,736	0,040
Riddertoft	0,660	0,0003*
Høkke Sø	0,670	0,001*
Vindeholme	0,680	0,002*
Guldborgvej	0,702	0,003*
Agersholm	0,692	0,001*
Kristianssæde	0,634	0,0001*
Nakskov	0,716	0,004*
Valdemarsvej	0,671	0,001*
Barbrekær	0,747	0,122
Moesgård	0,753	0,032

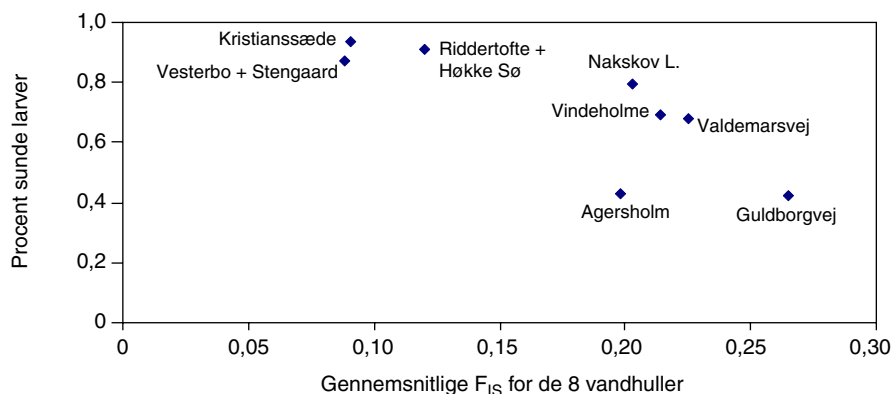
* signifikant efter Bonferroni korrektion ($\alpha = 5\%$) (Rice 1989).

Genetisk variation og overlevelse

I forbindelse med ophjælpsningen af de små, isolerede lollandske bestande af løvfrøer blev der foretaget optællinger af sunde æg og larver i mange vandhuller for at undersøge om en evt. indavl førte til et tab i overlevelse. I alt otte vandhuller indgik i den genetiske undersøgelse. Der blev observeret en signifikant, negativ sammenhæng mellem larve-overlevelse og den gennemsnitlige indavl (F_{IS}) (Spearman's rho = -0,786; $p = 0,021$) (Figur 7) i de otte vandhuller, dvs. jo højere indavlskoefficient jo lavere var den procentvise larve-overlevelse. Den negative sammenhæng indikerede, at løvfrøerne i nogle af makropopulationerne på Lolland bar præg af indavl og faktisk udviste indavlsdepression. Fra gamle, upublicerede optegnelser fra Zoologisk Museum, København mærket 'Møller 1942', fremgår det, at løvfrøerne på Lolland sandsynligvis har udviklet sig fra en fælles bestand for få generationer siden (> 25). Således var løvfrøerne på Lolland før 1950 kontinuert udbredt over hele øen. Den observerede indavlsdepression er formodentlig et forholdsvist nyt fænomen, der er opstået i forbindelse med den beskrevne habitatfragmenterings proces og dannelse af små bestande med få individer. Til sammenligning observerede Edenhamn (Edenhamn 1996, Edenhamn *et al.* 2000) en bedre overlevelse hos æg og larver fra svenske løvfrøer, hvor bestandene var meget større og mere sammenhængende end på Lolland.

Andre undersøgelser (Keller & Waller 2002) har ligeledes påvist indavls-effekter både hos planter og dyr ved hjælp af molekylær teknikker. Niveauet for indavl varierer meget, men det er ofte så alvorlig, at det påvirker overlevelsen af såvel individer som bestande. Hos andre padde som strandtudse observerede Rowe *et al.* (1999) en reduktion i den genetiske variation, der var relateret til en lav vækstrate hos larver i den mindste og mest isolerede bestand i undersøgelsen. Undersøgelser af drosselrørsanger (Hansson *et al.* 2001) viste også at en indavls depression påvirkede rekrutteringen af nye individer til den lokale bestand.

Figur 7 Sammenhæng hos løvfrøer mellem indavlskoefficienten (F_{IS}) og procent sunde larver fra otte vandhuller.



Genetiske enheder

Undersøgelse af genetiske forskelle mellem bestande omfattede individer fra 15 vandhuller; hvoraf frøer fra 12 vandhuller er brugt i de tidligere analyser, samt frøer fra tre vandhuller fra sydvest Lolland med hver en lille prøvestørrelse (Vestergård, Knubbeløkke og Næsby Strand, Tabel 3, Figur 5b). Sandsynligheden for at et individ, der var indsamlet i Jylland genetisk lignede individer fra Lolland og vice versa, var meget lille. Tilsvarende var der en lille sandsynlighed for at et individ indsamlet i en makropopulation på Lolland lignede individer fra en anden makropopulation på Lolland. Dette indikerede en klar genetisk forskel mellem løvfrøer i Jylland og på Lolland, samt at makropopulationerne på Lolland var genetisk unikke enheder med hver deres karakteristiske DNA-profil.

Tabel 3 Gennemsnitlig sandsynlighed (Paetkau *et al.* 1995) for at løvfrøerne fra de 11 vandhuller på Lolland og 2 i Jylland stammer fra det vandhul hvor de blev indsamlet. Yderligere 2 vandhuller, Knubbeløkke og Næsby Strand, der er koloniseret for nylig blev henvist som ukendte.

Lokaliteter/Lokalitets nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Vesterbo (1)	0,4646	0,1740	0,012	0,0113	0,0047	0,0007	0,0263	0,0049	0,0013	0,1194	0,0021	0,0002	-
Stengård (2)	0,0955	0,4576	0,0002	0,0005	0,0029	-	0,0001	0,0006	0,0001	0,0249	0,0043	-	-
Riddertoft (3)	0,0013	0,0084	0,4694	0,3625	0,0199	0,0155	0,0458	0,0001	0,0368	0,0075	0,0093	0,0042	0,0001
Høkke Sø (4)	0,0022	0,0050	0,1902	0,5130	0,1081	0,0016	0,0404	0,0028	0,0007	0,0020	0,0008	0,0092	0,0003
Vestergård (5)	0,0021	0,0021	0,0028	0,0194	0,2374	0,0018	0,0070	-	0,0001	0,0020	0,0007	0,0170	0,0142
Guldborgvej (6)	0,0005	0,0008	0,0129	0,0144	0,0044	0,5581	0,0002	0,0001	-	0,0001	0,0013	0,0001	-
Vindeholme (7)	0,0335	0,0088	0,0644	0,1524	0,0475	0,0006	0,4827	0,0049	0,0004	0,0033	0,002	0,0264	0,0035
Agersholm (8)	0,0063	0,0101	0,0051	0,0239	0,0005	0,0025	0,0024	0,4411	0,0090	0,0005	0,0001	0,0001	-
Kristianssæde (9)	0,0058	0,0008	0,0213	0,0375	0,0008	0,0026	0,0005	-	0,4792	0,0017	0,0006	-	-
Nakskov Ladegård (10)	0,0868	0,0012	0,0049	0,0015	0,0001	-	0,0021	0,0001	0,0003	0,4777	0,0002	0,0001	-
Valdemarsvej (11)	0,0009	0,0127	0,0002	0,0001	-	0,0001	0,0002	-	-	0,0001	0,4167	-	-
Barbrekær (12)	-	-	-	0,0005	-	-	-	-	-	0,0001	-	0,4218	0,179
Moesgård (13)	-	-	0,0001	0,0014	0,0019	-	0,0001	-	-	-	-	0,3724	0,4441
Nyligt koloniserede vandhuller													
Næsby Strand	0,0063	0,0039	0,3672	0,4259	0,1744	0,0144	0,1668	0,0011	0,0023	0,0057	0,0234	0,0223	0,0014
Knubbeløkke	0,1645	0,0595	0,0146	0,0179	0,0012	0,0035	0,0255	0,0071	0,0005	0,0196	0,0001	0,0012	-

Stedfasthed

Når individer genetisk lignede individer fra et andet vandhul end det hvorfra de var indsamlet, var der ofte tale om individer fra et vandhul, der var en del af den pågældende makropopulation. Selv inden for makropopulationerne var der genetiske forskelle mellem de enkelte vandhuller, hvilket kunne tyde på, at løvfrøer var temmelig stedfaste og at de vendte tilbage til det samme vandhul år efter år. Denne stedfasthed er også demonstreret med fangst-genfangst forsøg (van Gelder *et al.* 1978, Stumpel & Hanekamp 1986, Tester 1990, Borgula 1990, Friedl & Klump 2002). I Holland havde kun 6 % af løvfrøerne af 1000 genfangster skiftet vandhul mellem første og anden fangst (Stumpel & Hanekamp 1986). I en lignende undersøgelse i Sverige skiftede kun 2-12 % af individerne ophold mellem vandhuller indenfor en sæson og 22-31% af individerne skiftede vandhul fra det ene år til det næste (Edenhamn pers. komm.).

Kilde-vandhuller

Undtagelsesvis var der genetiske ligheder mellem nogle individer fra Nakskov Ladegård og individer fra Vesterbo og vice versa (Figur 5b). Dette tydede på, at Nakskov Ladegård var blevet en del af makropopulation på nordvest Lolland. Dette understøttes af den korte afstand mellem de to vandhuller på blot 5 km, hvor der desuden er et vandhul i mellem, som kan støtte en vandring. En anden forholdsvis svag forbindelse blev antydnet mellem løvfrøerne fra Vindeholme og Riddertoft. Forbindelsen var forventet på grund af en kort afstand mellem de to vandhuller (4,2 km) og den kendsgerning, at der for få år tilbage havde eksisteret et vandhul imellem de to, hvor der også havde været løvfrøer.

Løvfrøerne i Høkke Sø, tæt ved Riddertoft, repræsenterede en succesfuld, naturlig kolonisering, der havde fundet sted fra 1993 og frem. Undersøgelse af de genetiske forskelle viste, at de fleste af individerne i Høkke Sø havde større lighed med hinanden, end med individer fra nabo-vandhullerne. Det betød at Høkke Sø tilsyneladende havde sin egen karakteristiske DNA-profil eller en blandings DNA-profil fremkommet ved hybridisering mellem individer fra Riddertoft, den nærmest mulige kilde til kolonisationen (afstand 0,8 km) og Vestergård (afstand 3,1 km). Den gennemsnitlige forventede genetiske variation var lidt højere i Høkke Sø (nye vandhul) sammenlignet med Riddertoft (gamle vandhul), og samtidig blev der observeret et større antal alleler i 8 af de 12 analyserede markører i Høkke Sø i forhold til Riddertoft. Dette understøttede, at Høkke Sø ikke kun var blevet koloniseret fra Riddertoft, men også fra vandhuller længere væk som Vestergård. Muligvis har vandrende individer fra f.eks. Vestergård undgået Riddertoft, hvor koret af kvækkende hanner har antydnet, at pladsen allerede var "fuld optaget". I stedet formodes de at have vandret til et nabo-vandhul som Høkke Sø, hvor koret var mindre intenst. På denne måde kan et satellit vandhul blive mere genetisk diverst end den nærmeste kilde-bestand.

Knubbeløkke og Næsby Strand på Sydvest-Lolland var ligeledes nye vandhuller med løvfrøer, men deres individer har en ukendt oprindelse. Næsby Strand indeholdt kun løvfrøer i 2001, hvor der blev hørt

to hanner. Undersøgelse af den genetiske forskel viste, at løvfrøerne i Næsby Strand lignede individer fra Høkke Sø, Riddertoft, Vestergård og Vindeholme, mens frøerne i Knubbeløkke lignede individer fra Vesterbo, Stengård (nordvest Lolland) og Vindeholme. Vandhullet ved Næsby Strand ligger ikke langt fra Høkke Sø, Riddertoft og Vindeholme og må anses for at tilhøre denne makropopulation på sydvest Lolland. Individerne med DNA-profiler karakteristisk for Vestergård kan være kommet via Høkke Sø. Vandhullet ved Knubbeløkke ligger med en afstand på mere end 20 km fra Vesterbo og Stengård på nordvest Lolland. Ligheden mellem individer fra Knubbeløkke og disse to vandhuller var derfor overraskende på trods af, at der var en mistanke om, at den pludselige kolonisation af Knubbeløkke var et resultat af en menneskeskabt introduktion. Denne mistanke er senere blevet verificeret.

Koloniseringen af vandhuller ved Moesgård i Jylland skete på en anden måde sammenlignet med vandhullerne ved Høkke Sø og Næsby Strand. Her var koloniseringen kunstig og foregik ved en menneskeskabt selektion af de individer, der grundlagde bestanden. For at overføre den maksimale mængde genetisk variation skete udsætningen med et stort antal haletudser (> 6.000), som var opfostret fra > 150 ægklumper (Skriver 1988). Analysen af den genetiske variation 15 år efter udsætningen viste, at den genetiske variation i Moesgård var omtrent lige så stor som i kilde-bestanden fra Barbrekær ved Vejle. Antallet af alleler i bestande fra Moesgård var en anelse lavere end i bestanden fra Barbrekær. Undersøgelse af den genetiske forskel viste, at de fleste individer fra Moesgård kunne være kommet fra Barbrekær vandhullet, hvorimod forholdsvis færre individer fra Barbrekær kunne være kommet fra Moesgård. Dette antyder, at den genetiske variation i den nyligt dannede bestand ved Moesgård sandsynligvis kun havde en del-mængde af variationen i kilde-bestanden.

Gunstig-ugunstig bevaringsstatus

Der blev ikke observeret en signifikant forskel i den genetiske variation mellem makropopulationer med gunstig bevaringsstatus sammenlignet med makropopulationer med ugunstig bevaringsstatus. Bestande i vandhuller klassificeret med en gunstig bevaringsstatus er Barbrekær, Vesterbo, Stengård, Riddertoft og Høkke Sø, mens bestande med en ugunstig bevaringsstatus er Agersholm, Vindeholme, Kristianssæde, Guldborgvej, Valdemarsvej og Nakskov Ladegård (Pihl *et al.* 2000). Bestanden ved Moesgård kunne ikke vurderes, da dens bevaringsstatus var ukendt. Resultatet af de genetiske undersøgelser tyder på, at mængden af bestandenes genetiske variation ikke reflekteres i den foreslåede bevaringsstatus for makropopulationerne (Fog 1992). Denne konklusion forudsætter dog, at makropopulationerne var defineret korrekt (indeholder bestande fra de rigtige vandhuller).

Det fremgår imidlertid af den genetiske undersøgelse af bestanden i vandhullet ved Nakskov Ladegård har forbindelse med makropopulationene på nordvest Lolland, hvilket gør den til en del af en så stor bestand at dens bevaringsstatus må ændres fra ugunstig til gunstig. Forudsat at bestanden ved Nakskov Ladegård fik en anden bevaringsstatus blev mængden af den genetiske variation fundet i

makropopulationer med gunstig bevaringsstatus sammenlignet med makropopulationer med ugunstig bevaringsstatus og analyseret igen. Det nye resultat viste en signifikant forskel (ANOVA: $F = 5,12$, $p = 0,049$, $df = 1$), hvilket betyder at mængden af genetisk variation i vandhullerne nu afspejlede hhv. en gunstig og ugunstig bevaringsstatus.

Konklusion

Mængden af genetisk variation hos bestande af løvfrøer fra hhv. Jylland og Lolland var på samme niveau eller højere sammenlignet med andre undersøgte padder. Der blev observeret en signifikant højere genetisk variation i makropopulationer, hvor bevaringsstatus var klassificeret som gunstig i forhold til makropopulationer, hvor bevaringsstatus var klassificeret som ugunstig. Dette forudsatte dog at det blev antaget at vandhullet Nakskov Ladegård tilhørte den nordvest lollandske makropopulation. Som forventet blev der observeret en signifikant sammenhæng mellem genetisk variation og gennemsnittet af antal kvækkende hanner i henholdsvis de enkelte vandhuller og makropopulationerne.

Den lave genetiske variation observeret i vandhullerne Agersholm og Vindeholme på Lolland kunne sandsynligvis tilskrives indavl efter en flaskehalseffekt. Denne indavl blev antydnet af den signifikante sammenhæng mellem lav genetiske variation og en lav larveoverlevelse i de to vandhuller.

Undersøgelse af genetiske forskelle mellem bestande antydede, at løvfrøer er stedtro, dvs. de benyttede det samme vandhul år efter år. Resultaterne viste også, at makropopulationerne var genetisk unikke enheder og antydede migrations-mønstret mellem de vandhuller hvorfra bestandene stammer og vandhuller, der var etableret for nylig enten ved naturlig indvandring eller ved kunstig introduktion.

Undersøgelserne bekræftede mistanken om, at flere af individerne i et nyligt etableret vandhul, Knubbeløkke, var blevet kunstigt introduceret fra et vandhul, der viste sig at tilhøre den nordvest lollandske makropopulation.

De genetiske analyser viste, at på trods af at den procentvise tilbagegang var lige alvorlig for bestandene i Jylland og Lolland op til 1990, har den mere udtalte fragmenterings proces, der har fundet sted på Lolland, reduceret den genetiske variation sammenlignet med Jylland. Det har resulteret i tab af fitness (larveoverlevelse) hos løvfrøerne i nogle af makropopulationerne. Denne reduktion skyldtes sandsynligvis reduktionen i den hanlige bestandsstørrelse i makropopulationerne ("flaskehals"), hvilket har forøget den genetiske drift, der igen har forøget indavls effekten, da udveksling mellem makropopulationerne og mellem de enkelte vandhuller var begrænset.

5.3.4 Bevaringsstatus

Den nationale bevaringsstatus for løvfrø er foreløbig vurderet som usikker (Pihl *et al.* 2000). Af ca. 90 delbestande vurderes 2 at være i tilbagegang ca. 35 at være stabile og ca. 50 at være i fortsat fremgang.

Totalt regnes med mindst 16.000 hanner i Danmark, svarende til ca. 25.000 dyr inklusive hunner.

5.3.5 Forslag til kriterier for gunstig bevaringsstatus

Kriterier for gunstig bevaringsstatus er ikke defineret for løvfrø, idet disse kriterier foreløbigt kun er udarbejdet for arter på EF-habitatdirektivets bilag II (Søgaard *et al.* 2003).

For løvfrø er kriterierne for gunstig bevaringsstatus på nationalt og lokalt niveau baseret dels på den eksisterende viden om løvfrø og dels på de genetiske analyser af løvfrøer fra tre delregioner (Østjylland, Sydjylland og Lolland), som er beskrevet i denne rapport. Det betyder, at der på baggrund af de genetiske analyser er ekstrapoleret til de resterende angivne delregioner med forekomster af løvfrø, så det antages, at der ligeledes her eksisterer flere grupper af delbestande, som endnu ikke er kortlagt og afgrænset genetisk (se Figur 5).

Løvfrøs udbredelse i landet er klumpet og vurderes at kunne være samlet i seks delregioner (Edenhamn *et al.* 2000). Inden for hver delregion er der et stort antal delbestande. En delbestand defineres som individer i en samling af vandhuller der indbyrdes ligger med en maximal afstand på 4 km, som er den mest almindelige maximale vandringsafstand for løvfrøer (Stumpel & Hanekamp 1986). Disse delbestande indenfor en delregion vil forventes at være tættere genetisk beslægtede med hinanden end med grupper af delbestande i andre delregioner.

Nationalt niveau

Gunstig bevaringsstatus for løvfrø i Danmark forudsætter bl.a., at arten skal findes inden for den kontinentale biogeografiske region, nærmere bestemt i delregionerne Østjylland, Syd- og Sønderjylland (herunder Als), Sjælland/Lolland og på Bornholm. De i alt 90 delbestande skal være stabile eller i fremgang. De samlede bestande i de seks delregioner skal være stabile eller stigende dvs. at arten i samtlige delbestande har ynglesucces de fleste år.

Lokalt niveau

På lokalt niveau er kriterierne for gunstig bevaringsstatus for løvfrø at individantallet i de enkelte delbestande skal være stabilt eller stigende, og at der opretholdes en forbindelse mellem vandhullerne i delbestandene, der sikrer en spredningsvej for individerne. Dvs. at egnede vandhuller skal ligge med en maksimal afstand på 4 km. For at vandhuller er egnede for løvfrøer og kan bruges til at yngle i skal de være rene, solbeskinnede med varmt vand, uden fisk og med gode opvækst- og fourageringsmuligheder. Der skal som minimum være ynglesucces i tre vandhuller. Samtidig skal der indenfor en afstand af 500 m fra vandhullerne være levende hegn, skove, skovbryn, eller haver, der fungerer som opholdssteder eller overvintringssteder for individer udenfor ynglesæsonen.

5.3.6 Forvaltningsmæssige aspekter

De genetiske analyser af bestande af løvfrøer på Lolland og i Jylland viser en tydelig genetisk forskel både mellem individer fra de to hovedregioner og mellem individer fra de enkelte grupper af delbestande, mens differentieringen indenfor delbestandene var mindre tydelige. Forskellen i genetisk variation mellem de to hovedregioner kan formodentlig tilskrives forskellen i graden af habitatfragmentering i de to områder. Der var ikke forskel i selve hastigheden hvorved vandhullerne forsvandt i løbet af 1980'erne i de to områder, men selve fragmenterings-effekten var forskellig (Fog 1997).

På Lolland kom vandhuller med løvfrøer til at ligge mere spredt dvs. mere isoleret fra hinanden sammenlignet med løvfrø-vandhullerne i Vejle-området (Skriver 2001), hvorved afstanden blev større end løvfrøerne kunne vandre. Effekten af denne isolation viste sig dels ved en lavere genetisk variation blandt individerne i de vandhuller, der var mest isolerede på Lolland sammenlignet med andre mindre isolerede vandhuller, og dels ved en antydning af en indavls-effekt. Denne effekt viste sig ved en ringere overlevelse af haletudser i disse vandhuller. Jo højere indavls-niveau jo dårligere overlevelse.

Begrebet "levedygtighed" i de nationale bevaringskriterier for løvfrø defineres ud fra begrebet om den mindste effektive bestandsstørrelse. Det antages, at bevaringsstatus for løvfrøer er gunstig, når de effektive bestandsstørrelse er over 50 individer og i fremgang eller når bestanden er over 500 individer og voksende (Pihl *et al.* 2000). De foreløbige genetiske analyser af løvfrøer fra Lolland og Jylland antyder, at grupperne af delbestande indenfor disse regioner udgør en samlet genetisk enhed. Desuden viser resultaterne, at der er en signifikant sammenhæng mellem en højere bestandsstørrelse målt ved antal kvækkende hanner og en højere genetisk variation. Denne sammenhæng understøtter brugen af den mindste effektive bestandsstørrelse hos løvfrø i de nationale bevaringskriterier, der dog ikke er estimeret for løvfrø.

På Lolland blev der påvist otte grupper af delbestande, hvoraf to, én på nordvest Lolland og én på sydvest Lolland blev antaget at have en gunstig bevaringsstatus. Den estimerede hanlige bestandsstørrelse for disse var begge lavere end den anbefalede på en effektiv bestandsstørrelse på hhv. 50 og 500 individer. Men i begge vandhuller er det totale antal kvækkende hanner i fremgang. Et af vandhullerne, Naskov Ladegård, viste sig genetisk at tilhøre bestanden på nordvest Lolland, mens seks vandhuller tilhørte andre grupper af delbestande. Vandhullet ved Vindeholme havde tidligere været en del af gruppen på sydvest Lolland, men var blevet isoleret herfra. Denne isolation viste sig ved en lav procentvis overlevelse af haletudser og en lav genetisk variation, hvilket tydede på indavl. Lignende effekt blev påvist hos individer i vandhullet ved Agersholm, i den nordøstlige del af det vestlige Lolland samt hos individer i vandhullet ved Guldborgvej på den østlige del af Lolland.

Resultaterne af den genetiske analyse viser også hvilke delbestande, der udgør en gruppe og dermed mellem hvilke vandhuller frøerne vandrer. Derfor er det muligt at rette forvaltningsindsatsen specifikt mod en sikring af spredningsmuligheder indenfor grupperne af del-

bestande. Det vil give en stabil eller stigende bestandsstørrelse af løvfrøer indenfor grupperne og vil muliggøre en gunstig bevaringsstatus for alle grupper. Konkret betyder dette f.eks. at spredningsmuligheden mellem individer fra vandhullet ved Nakskov Ladegård og bestanden i nordvest Lolland bør forbedres ved etablering af et eller flere vandhuller med en afstand på 2 km i et terræn hvor løvfrøen har mulighed for at vandre. Ligeledes vil etablering af et vandhul mellem Vindeholme og bestanden på sydvest Lolland øge bestandsstørrelsen for denne gruppe og eventuelt hindre at løvfrøerne i vandhullet ved Vindeholme forsvandt. Lignende tiltag bør overvejes for de øvrige grupper af løvfrøer i vandhuller på Lolland. De genetiske forskelle mellem Jylland og Lolland er så markante at der ikke bør udveksles individer mellem de to landsdele. I Jylland er bestandsstørrelsen for begge grupper af delbestande i fremgang. Senere analyser af den genetiske forskel mellem løvfrøer fra de øvrige delregioner vil belyse, hvilke forvaltningstiltag der kan overvejes her.

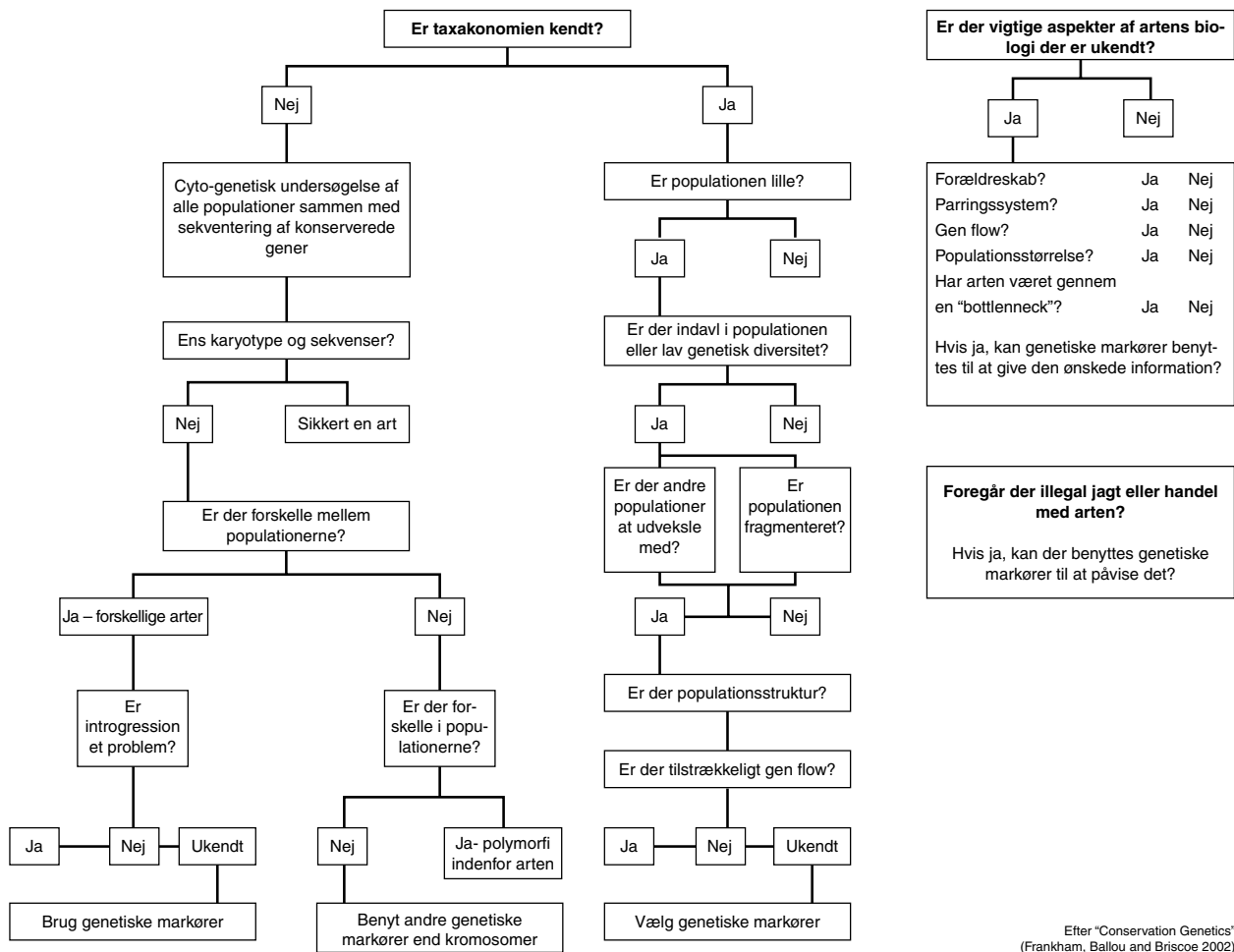
6 Fremtidige genetiske undersøgelser

Ud fra kendskabet til genetiske markører er de 51 arter på EF-Habitatdirektivets bilag II og bilag IV vurderet, som har en usikker eller ugunstig bevaringsstatus (Pihl *et al.* 2000, Søgaard *et al.* 2003), og for hvilke det formodes at være fordelagtigt at foretage genetiske undersøgelser som led i en fremtidig forvaltning. Formålet med denne forvaltning skulle være at forbedre arternes status fra en usikker eller ugunstig status til en gunstig bevaringsstatus. Det vil bl.a. ud fra de genetiske undersøgelser være muligt at estimere den effektive populationsstørrelse hos de pågældende arter, hvilket er en vigtig parameter ved vurdering af deres bevaringsstatus. Baseret på en faglig vurdering (Pihl *et al.* 2000) og en vurdering af tilgængelighed af arterne, er der foretaget en prioritering af de 51 arter, og syv er udvalgt som dem man med fordel kunne indlede genetiske undersøgelser af (Tabel 4).

Ved en vurdering af behovene for genetisk overvågning af truede arter, eller arter hvor bestandsstørrelsen er faldende, er der tre grupper af hovedspørgsmål der bør overvejes eller besvares, når man søger at forvalte de pågældende arter. De tre spørgsmål er opstillet i Figur 8 (Frankham *et al.* 2002).

Tabel 4 Udvalgte arter fra EF-Habitatdirektivets bilag II og IV, som har en usikker eller ugunstig bevaringsstatus. For disse arter vurderes det, at undersøgelser af deres genetiske forhold vil kunne bidrage til en bedre forvaltning i fremtiden. Genetiske undersøgelser vil kunne give en sikker artsbestemmelse og viden om bestandsstruktur og effektive bestandsstørrelser.

Art	Bilag II	Bilag IV	Rødliste	Bevaringsstatus	Bestandsstørrelse	Antal bestande	Lokalitet
Klokkefrø							
Bombina bombina	x	x	akut truet	usikker/ugunstig	1750	10	Fyn/Sjælland
Strandtudse							
Bufo calamita		x		ugunstig	10000?	ca 105	Østdanmark, Himmerland og Østjylland kraftigt tilbage
Damflagermus							
Myotis dasycneme	x	x	sårbar	gunstig?	2000-3000	52	Midt/Øst Jylland
Hasselmus							
Muscardinus avel.		x	sårbar	usikker	ukendt	56	
Hedepletvinge							
Euphydryas aurinia	x		akut truet	ugunstig	?	22	Nordjylland
Birkemus							
Sicista betulina		x	sjælden	ukendt	ukendt	ukendt	
Fruesko							
Cypripedium calceolus	x	x	sjælden	usikker	445	2	Himmerland



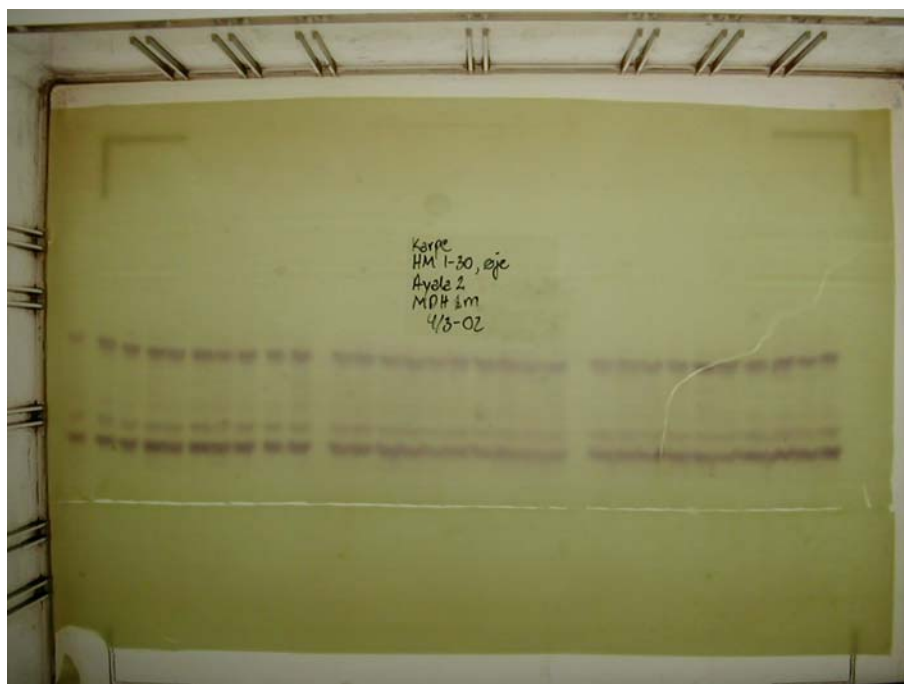
Figur 8 Diagram til identifikation af behovene for genetisk overvågning af truede arter, eller arter hvor bestandsstørrelsen er faldende. Der angives tre grupper af hovedspørgsmål der bør overvejes eller besvares inden man vil forvalte eller overvåge de pågældende arter. Disse er opstillet i diagram 1 (efter "Conservation Genetics" (Frankham *et al.* 2002).

7 molekylærgenetiske metoder

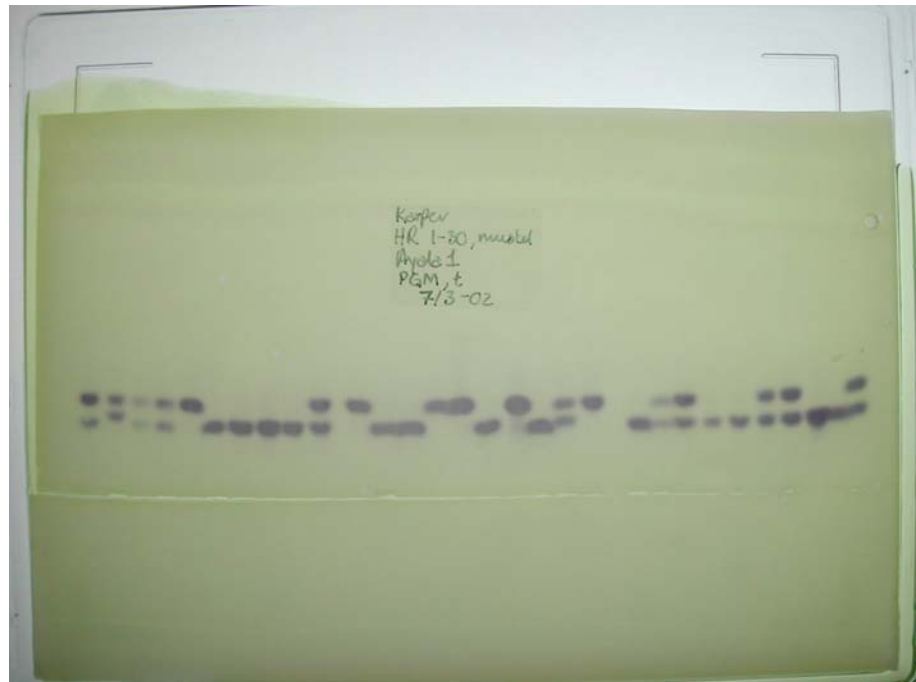
Isozymer

Proteiner er genprodukter. Med kendskabet til proteiner kan man få information om gener og dermed DNA. Proteiner er opbygget af ca. 20 forskellige aminosyrer, som ved hjælp af peptid-bindinger er forbundet i lange protein-kæder, der kan bestå af flere hundreder aminosyrer. En del af proteinerne har katalytiske egenskaber, dvs. at de kan få en bestemt kemisk reaktion til at foregå. Hvis det er tilfældet, tilhører proteinet gruppen enzymer. Da proteiner er elektrisk ladede på grund af aminosyrerne, vil de i et elektrisk felt være i stand til at vandre afhængig af deres ladning og deres form. Ved at udnytte enzyms elektriske ladning og dets katalytiske egenskab kan enzymet påvises på en gel (Figur 9). Hvis enzymet forekommer i flere elektriske former, taler man om isozymer. I Figur 9 vises et zymogram for ti forskellige individer. I det viste tilfælde er der ingen genetisk variation. Hvis enzymet forekommer i mere end én form og det observerede zymogram kan forklare som resultatet af et gen med flere alleler, så taler man om allozymer. Dette er vist i Figur 10.

Figur 9 Zymogram af enzymet malat dehydrogenase for ti individer.



Figur 10 Zymogram af enzymet phosphoglucosmutase for ti individer.



Polymerase chain reaction (PCR)-metoden

Opdagelsen af polymerase chain reaction (PCR) metoden i midten af firserne gjorde det muligt at anvende DNA som genetisk markør. Hidtil havde der været begrænsninger på grund af den mængde prøvemateriale, der var nødvendig for ekstraktionen af DNA. Med PCR-metoden kan bestemte DNA segmenter opformeres fra små mængder prøvemateriale.

Metoden består i:

1. DNA isoleres, selv få molekyler er tilstrækkelige.
2. Det isolerede dobbeltstrengede DNA (template DNA) tilsættes de fire nucleotider som DNA er opbygget af, polymerase enzym som kan sætte nucleotider sammen til en DNA streng og diverse ioner for at reaktionen kan foregå samt to såkaldte primere (korte DNA-sekvenser), der skal starte processen.
3. Blandingen opvarmes til ca. 94°C, så template DNA bliver separeret i to enkelte strenge, se Figur 11.
4. Derefter sænkes temperaturen til ca. 50°C (annealing temperatur) hvorved de to primere binder sig til det enkeltstrengede DNA, se Figur 11.
5. Så hæves temperaturen til ca. 72°C, og polymerasen sætter nucleotider på primerne i en orden, der svarer til template DNA. Det korte stykke DNA, der opformeres, kaldes target DNA.

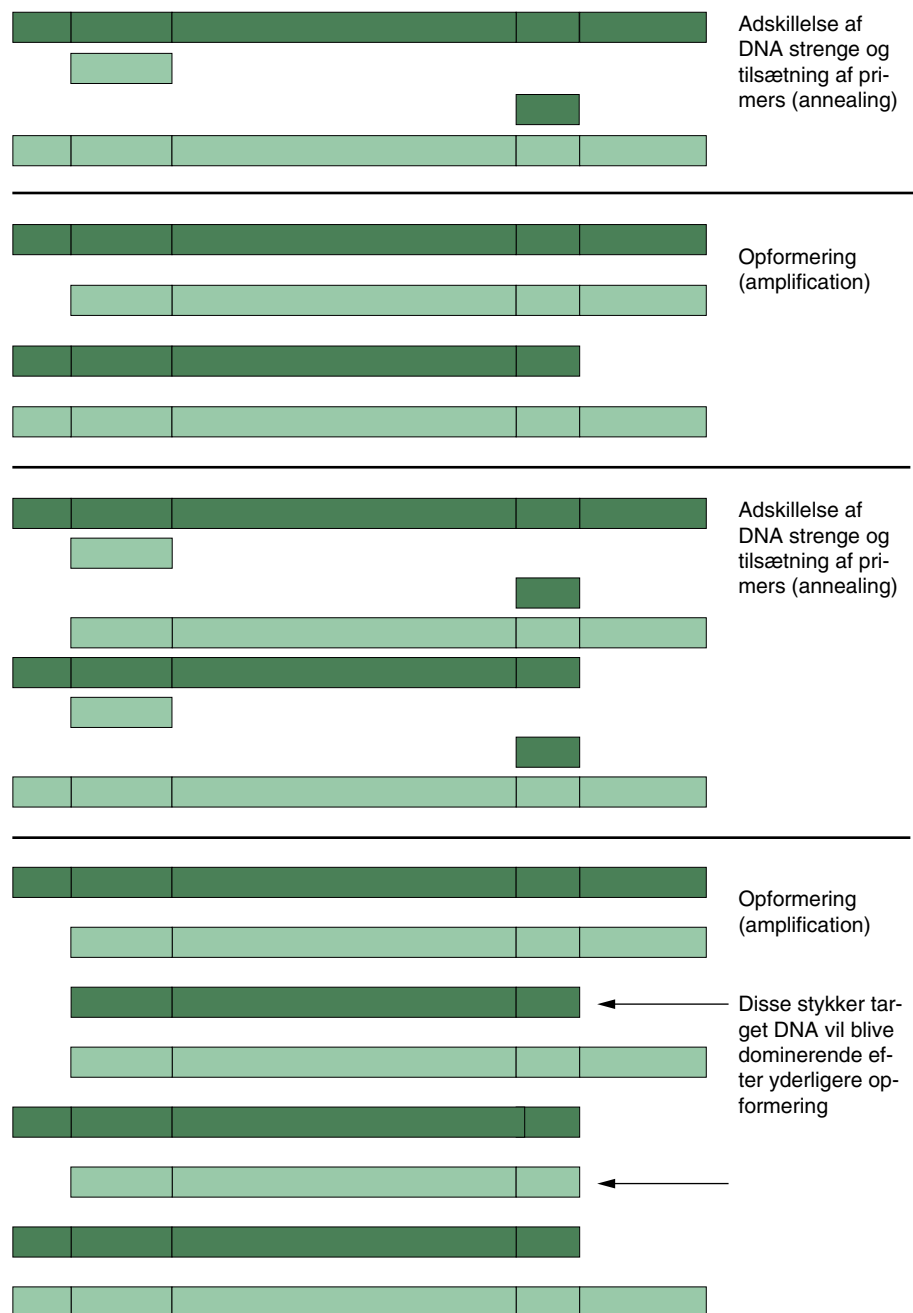
Ved at gentage procedurans trin 3-5 ca. 30-35 gange, vil target DNA (den genetiske markør) blive opformeret knapt en milliard gange.

Random amplified polymorphic DNA (RAPD)

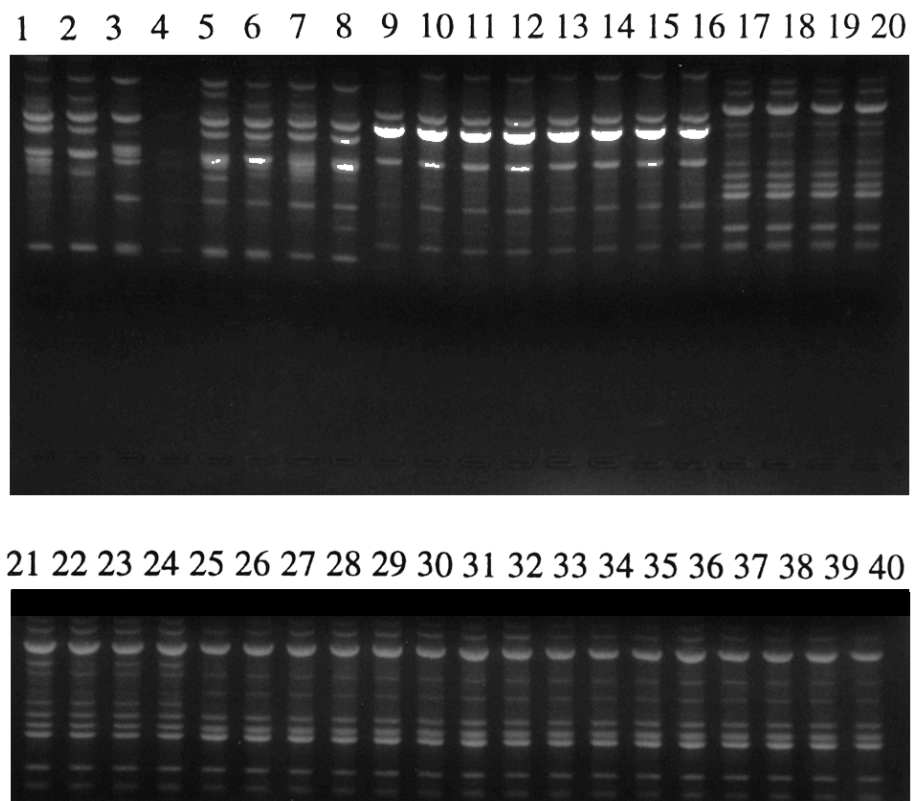
RAPD er en PCR-baseret DNA analyseteknik. Til amplificeringen af DNA benyttes en tilfældig som oftest en 10 base primer, en decamer, som ikke er specifik for noget bestemt gen. De PCR-produkter, der fås med denne metode, kan separeres på en agarose gel og gøres syn-

lig med ethidiumbromid eller andre stoffer der kan binde sig til DNA. Et resultat kan se ud som vist på Figur 12. Nedarvningen af RAPD er dominant, hvilket medfører, at heterozygoter ikke kan erkendes.

Figur 11 PCR-reaktion og opformering af target DNA.



Figur 12 Billede af RAPDs for 40 individer. Individ 1-3 tilhører hver sin gruppe, individ 4 mangler og individ 5-8 tilhører en anden gruppe. Individ 9-16 tilhører en gruppe og individ 17-40 tilhører en tredje gruppe.



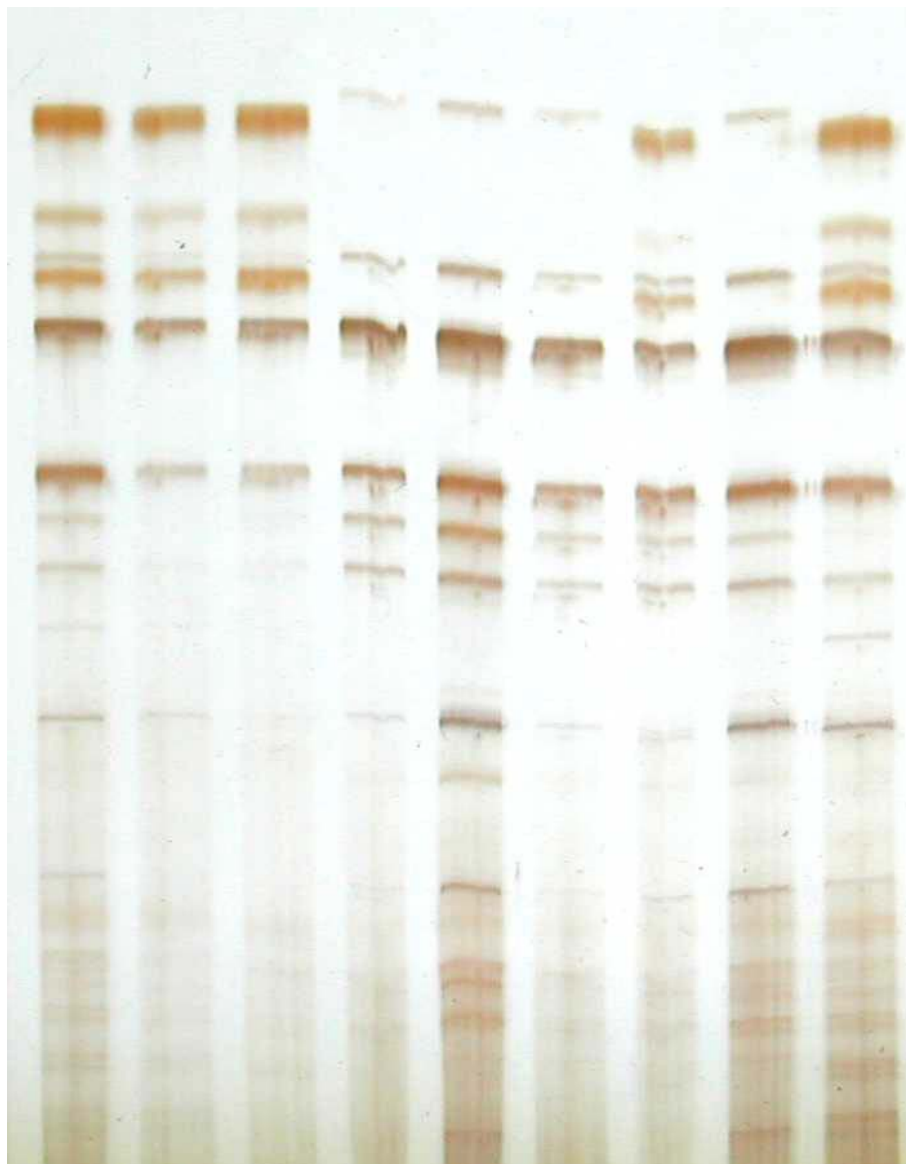
7.1 Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism

ISSR er også en PCR-baseret metode, men der benyttes en primer, som består af adskillige (ofte syv) simple repeats. I den ene ende er primeren forsynet med forskellige kombinationer af baser, gerne i en sekvens af tre. Det giver en øget sandsynlighed for, at primeren kan hæfte sig flere steder, og at vedhæftningen er mere stabil pga. den længere sekvens af simple repeats. Metoden hævdes at påvise mere variation end RAPD og at være mere pålidelig (Reddy et al. 2002). PCR-produkterne kan som for RAPD separeres på en agarose gel eller på en polyacrylamidgel og påvises med enten ethidiumbromid eller sølvfarvning. Et resultat kan ses på Figur 13. Nedarvningen af ISSR er hovedsagelig dominant.

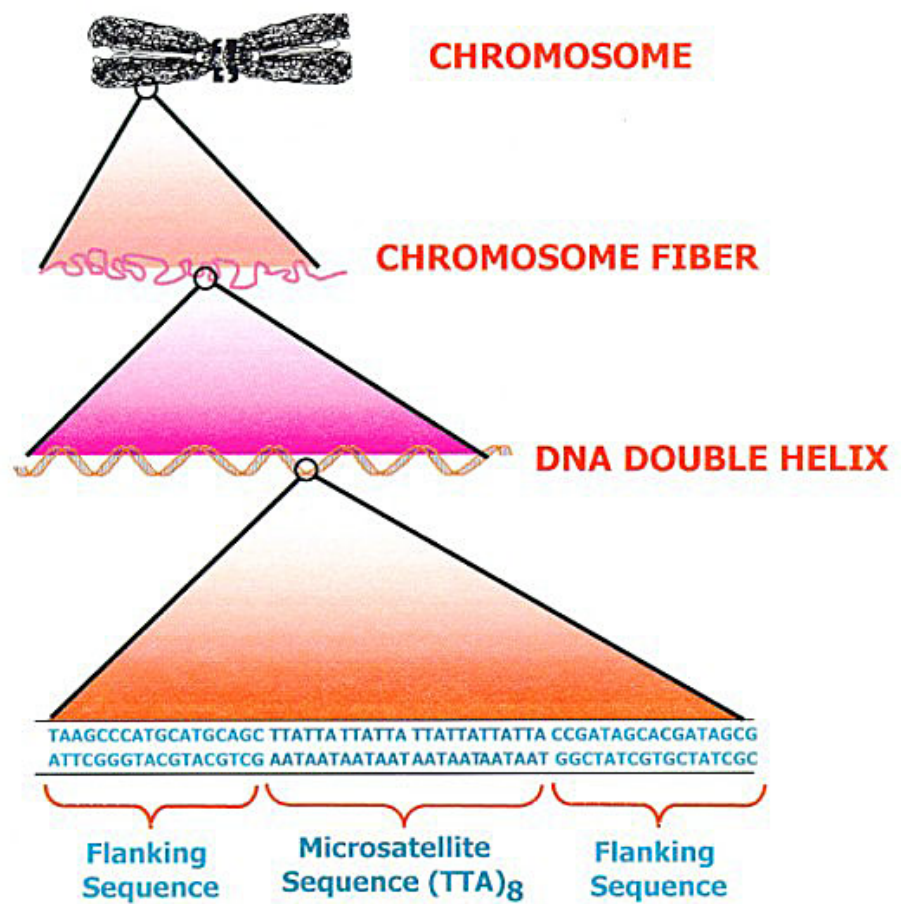
Mikrosatellitter

Mikrosatellitter er DNA markører, der oftest er ikke-kodende, dvs. de ikke danner basis for et genprodukt, der kan påvises som f.eks. proteiner. De er korte sekvenser, der består af gentagne basepar, der er sammensat af 2-6 baser (f.eks. GTGTGTGTGTGTGT eller GTCGTCGTCGTCGTCGTCGTC), der gentages op til 70 gange. De er hyppige i det eukaryote genom og sidder på kromosomerne (Figur 14). Mikrosatellitter ændres (muterer) ved forandringer i antal gange baseparrene gentages. Den mest almindelige mutation er forandring af en gentagelse.

Figur 13 Frø af rapssorten Express iblandet en anden sort, individ 1-3, 7 og 9 er sorten Express, 4-6 og 8 er en ukendt sort.

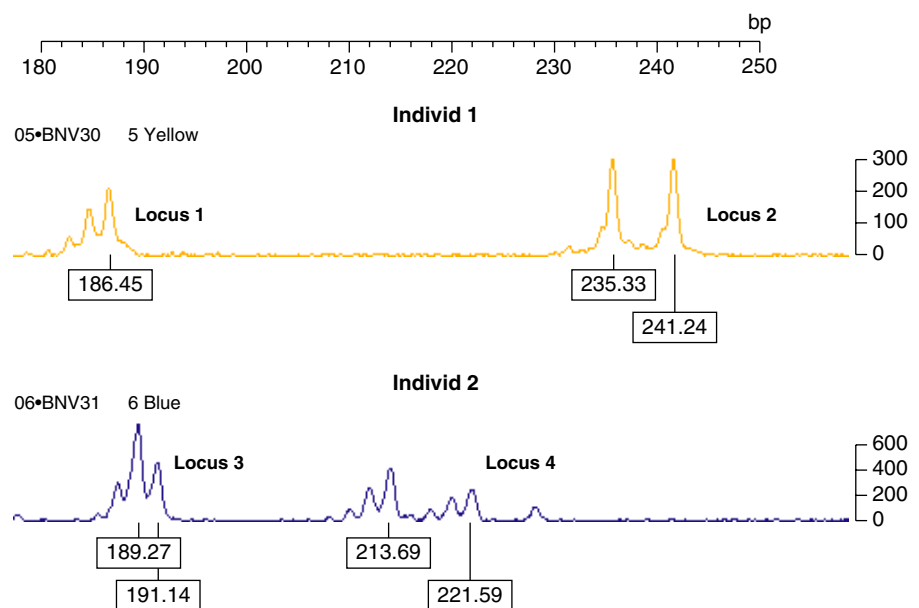


Figur 14 DNA-mikrosatellit anatomi (efter www.asioaquaticmarkers.com).



Mikrosatellitterne opformeres ved hjælp af PCR metoden, hvorved der opnås tilstrækkeligt med kopier af mikrosatellitterne, så de kan påvises ved elektroforese. Påvisningen kan ske automatisk på en sekvenserings maskine. Primerne, der benyttes er mærket med fluorescerende farvestoffer. Farvestofferne udsender en bestemt bølgelængde ved laserlys-påvirkning, der opfanges af et digitalt kamera i sekvenserings maskinen. På denne måde kan de enkelte mikrosatellitter påvises som toppe (Figur 15).

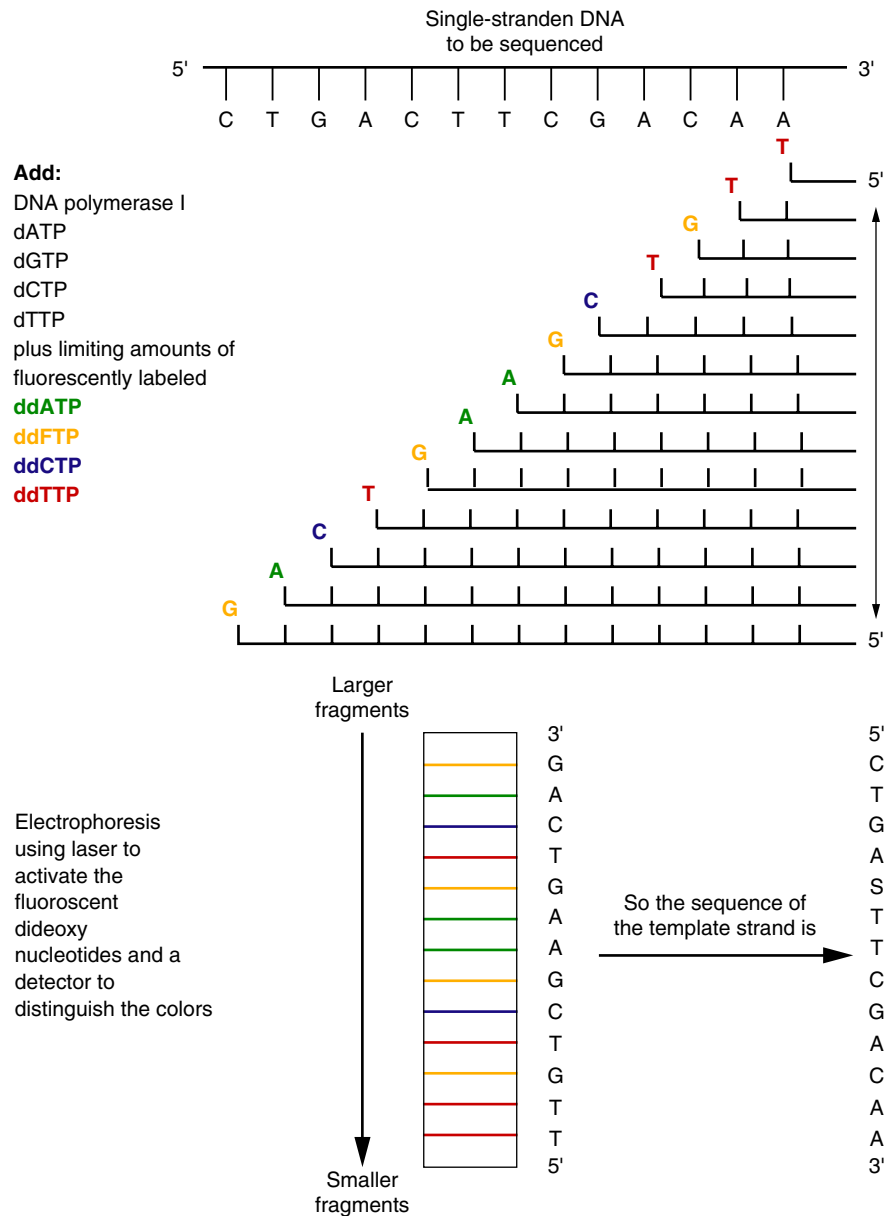
Figur 15 Fragment-analyse. Individ 1 er homozygot for locus 1 og heterozygot for locus 2. Individ 2 er heterozygot for locus 3 og locus 4.



Sekvensering af D-loop i mitokondrie DNA

Ved sekvensering bestemmes den eksakte sekvens af baser eller nukleotider i DNA (Figur 16), i dette tilfælde i D-loopen (kontrol-regionen) i mtDNA. Mitokondrie DNA (mtDNA) genomet er et lille stykke cirkelformet DNA, der kun er ca. 16-18 tusind basepar langt. Genomet nedarves fortrinsvis kun fra moderen. D-loopen er en bestemt sekvens i mtDNA'et der ikke koder for et produkt, hvor mutations-hastigheden, dvs. ændringen af en base i sekvensen, siges at være høj og dermed variabel. Ved direkte sekvensering af D-loopen benyttes PCR-metoden til at opformere et bestemt stykke af D-loopen ved hjælp af specifikke primere. Når D-loop sekvensen er opformeret, bliver rækkefølgen af baserne påvist ved hjælp af en automatisk sekvenser som beskrevet under mikrosatellitter. Her er det de fire nucleotider, A,C,G, og T der er fluorescens mærket. De mærkede nucleotider udsender bølglængder med hver sin farve når de bliver påvirket af laser-lyset. Variationen opstår ved udskiftning af en base med en anden. Det er ændringerne i baserne der giver ophav til nye typer af D-loop sekvenser (haplotyper) (Hillis *et al.* 1996).

Figur 16 Sekvensering (efter www.ncbi.nlm.nih.gov).



8 Ordforklaring

Ordlisten er baseret på Siegismund 1993 og Frankham *et al.* 2002.

Allel: En bestemt form af et bestemt gen et bestemt sted (locus) på kromosomet. Nye alleler opstår ved mutation af eksisterende alleler.

Allelfrekvens: En allels hyppighed i en given bestand eller art.

Allozym: Et produkt, som oftest et enzym eller et protein, betinget af en specifik allel.

Annealing temperatur: Den optimale temperatur hvorved en primer for et bestemt stykke DNA (f. eks. mikrosatellit) bindes til DNA-strengen fra en organisme.

Assignment test: En statistisk metode der henviser individer til deres mulige kildebestand baseret på deres "assignment indices" (feks. DNA-profiler) der defineres som de forventede genotypehyppigheder i de pågældende bestande.

Bestandsstørrelse

Census bestandsstørrelse (N) er den størrelse som bestanden faktisk har dvs. den kan tælles direkte. Denne er ofte meget større end den effektive, se effektiv bestandsstørrelse.

Effektiv bestandsstørrelse (N_e): Størrelsen på en hypotetisk bestand der har samme tilvækst i indavl som den naturlige bestand dvs. de antal individer i bestanden der bidrager med gameter til den næste generation (indavls N_{ef} (MVP $N_e = 50$)). Dvs. N_{ef} er hovedsagelig følsom overfor antallet af forældre og deres reproduktive karakteristisk og forudsiger ændringer i heterozygositeten.

Varians effektive bestandsstørrelse (varians N_{ev} (MVP $N_e = 500$)) er størrelsen på en hypotetisk bestand som ville have den samme allelfrekvens varians som den pågældende bestand. Dvs. N_{ev} er hovedsagelig følsom overfor antallet af afkom og deres egenskaber og forudsiger ændringer i den genetiske varians.

Der er flere faktorer der påvirker den effektive bestandsstørrelse så som naturlige fluktuationer i bestandsstørrelsen, kønsratioen ($N_e = (4N_m * N_f) / (N_m + N_f)$), alderen ved reproduktion (overlappende generationer), den rumlige fordeling af bestanden ($N_e = 4\pi\sigma^2\delta$) samt variation i familiestørrelsen.

Bottleneck: Se "flaskehals".

Decamer primer: DNA-stykke der har en længde på 10 baser (nukleotider).

D-loop: D (displacement)-loop er en region hvor replikationen af mtDNA begynder. En kort RNA-streng parres med den ene DNA-streng og erstatter den oprindelige DNA-streng i regionen.

DNA: Deoxyribonucleinsyre. Stort molekyle der bærer den genetiske information i form af rækkefølgen af de fire nukleotider A, C, G og T.

DNA-profil: Sammensætningen af samtlige de genetiske markører (f. eks. mikrosatellitter) der analyseres i det pågældende individ, hvilket for det meste er unikt for individet. Dette afhænger dog af antallet af genetiske markører (mikrosatellitter) der analyseres og af hvor mange forskellige alleler der er i hver markør (mikrosatellit).

Elektroforese: Adskillelse af molekyler i et elektrisk felt. Adskillelsen skyldes forskellig ladning og/eller forskellig størrelse af molekylerne.

F_{IS} : (Indavlskoefficienten) den del af den genetiske varians i en delbestand, der er indeholdt i et individ. Dvs. sandsynligheden for at et individ med nært beslægtede forældre modtager to gener der er kopier af det samme gen fra en tidligere generation. Hvis F_{IS} er høj antyder det indavl. (Delen af den totale indavl i en bestand der skyldes indavl i delbestandene).

Fitness: Et individs evne til at overleve og reproducere i forhold til de øvrige individer i bestanden.

Flaskehalseffekt: En bestand hvis størrelse har været kraftig reduceret gennem flere generationer siges at have været gennem en flaskehals. Dette har medført et fald i den genetiske variation i bestanden på grund af sammenhængen mellem genetisk drift og bestandsstørrelse. Jo mindre bestandsstørrelse jo højere genetisk drift. Dvs. reduktionen i den effektive bestandsstørrelse har reduceret antallet af alleler hurtigere end heterozygositeten er faldet, hvilket gør at den observerede heterozygositet er højere end den heterozygositet der vil være forventet ud fra det observerede antal alleler ved en mutations-genetisk drift ligevægt.

Forventede heterozygositet (H_e): En individuel parameter eller en bestands-parameter. Defineret ved den del af loci der forventes at være heterozygote i et individ (defineret mellem 0 og 1) eller en bestand.

H_O (observerede heterozygositet) er det observerede gennemsnitlige antal heterozygoter over loci.

H_e (forventede heterozygositet) benævnes også genetisk diversitet (variation).

Founder-effekt: Se "koloniserings-effekt"

F_{ST} : Er den del af den totale genetiske varians der er indeholdt i en delbestand i forhold til den genetiske varians i total bestanden. F_{ST} er defineret mellem 0 og 1. En høj F_{ST} antyder en høj grad af genetisk differentiering mellem bestandene. Dvs. et mål for hvor beslægtede individer er indenfor en bestand i forhold til en anden bestand. (Delen af total indavl i bestanden der skyldes differentiering mellem delbestandene).

Genprodukt: Det biokemiske materiale, enten RNA eller protein der er resultatet af et gen. Mængden af genproduktet kan bruges til at måle hvor aktivt genet er.

Genetisk differentiering: Genetisk forskel mellem bestande.

Genetisk drift: En kraft der reducerer den genetiske variation (heterozygositeten) ved tilfældige tab af alleler. Dvs. i en bestand med en begrænset bestandsstørrelse vil den genetiske sammensætning fluktuere tilfældigt fra generation til generation p.g.a genetisk drift.

Genetisk variation: Mængden af heterozygoter og homozygoter samt allel-antal i en given organisme.

Genetisk markør: Ethvert træk, der benyttes som en markør for genetisk variation i og mellem individer, bestande, arter og taxa. Trækene inkluderer fænotypiske træk (f.eks. øjenfarve), proteiner (allozymer, albuminer) og DNA-segmenter. Man kan benytte en bestemt genetisk markør som et diagnostisk træk som f.eks. når man vil undersøge om en person bærer en arvelig genetisk sygdom. Man kan benytte dem som et værktøj i forvaltningen af arter og m.m. Forskellige genetiske markører (som mikrosatellitter, mtDNA, allozymer, RAPD) har forskellige analysemuligheder (grove eller fine skalerede) og forskellige fordele og ulemper (som specificitet, økonomi, lethed hvormed data kan analyseres og fortolkes).

Gen-flow: Bevægelse af gener fra en bestand til en anden hvilket forårsager at de bliver genetisk mere ens. Genetisk migration er den primære kilde til gen-flow.

Genotype: Den genetiske sammensætning af en organisme. Genotype refererer enten til det samlede antal gener som organismen bærer eller til allelerne i et enkelt locus. Information om genotyperne kommer fra allozym-alleler, mikrosatellit-alleler eller sekvens information fra f.eks. D-loopen i mtDNA. I det sidste tilfælde bliver de benævnt haplotyper.

Haplotype: Et sæt tæt koblede alleler fra forskellige steder (loci) på det samme kromosom, der nedarves samlet (koblede).

Haplotype- frekvens: En haplotypes hyppighed i en bestand.

Hardy-Weinberg forventningerne: (Forkortet HWE) En lovmæssighed der siger at allelfrekvenserne (genfrekvenserne) forbliver konstante fra generation til generation når der er tilfældig parring i en uendelig stor bestand uden selektion, migration og mutation. I sådanne tilfælde kan genotypefrekvenserne i den uendelige store bestand forudsiges fra to allelfrekvenser p og q ud fra formelen:

$$p^2 + 2pq + q^2$$

En bestand vil opfylde Hardy-Weinberg forventningerne efter en enkelt generation (såfremt alle de listede forudsætninger er opfyldt). Man tester for HWE ved at sammenligne de observerede med de forventede genotypefrekvenser (forventede og observerede heterozygositet). En stor del af populationsgenetikken er centreret omkring hvordan og hvorfor bestande afviger fra HWE.

Heterosis: (Krydsningsfrodighed) Når individer fra to indavlede grupper krydses, vil afkommet ofte have en øget overlevelse og fertilitet i forhold til forældrene, hvilket kaldes heterosis.

Heterozygositet: Se forventede heterozygositet.

Heterozygot: Et diploidt individ der bærer to forskellige alleler i et givet lokus

Homozygositet: se forventede heterozygositet.

Homozygot: Et diploidt individ der bærer to ens alleler i et givet lokus.

Indavl: Parring mellem individer der er beslægtede. Dvs. et individ er indavlet når det har modtaget to gener, der er kopier af det samme gen fra en tidligere generation som f.eks. bror-søster parringer eller kusine-fætter parringer.

Indavlsdepression/udavlsdepression: Indavlede individer vil ofte have en reduceret reproduktion eller overlevelse (indavlsdepression). Ved en udavlsdepression sker der en nedsat overlevelse/reproduktion når individer fra to geografisk forskellige bestande (underarter eller arter) krydses.

Isozym: Alternative former af et protein påvist ved elektroforese. Isozymer kan skyldes protein-forskelle specificeret af alleler fra et enkelt locus eller fra forskellige loci.

Koloniserings-effekt (Founder-effekt): Tab af genetisk variation i forbindelse med nydannelsen af en bestand ud fra en lille gruppe individer. I en periode vil genetisk drift have en stor effekt fordi den ny-etablerede bestand er lille.

Locus (flertal: Loci): Et gens plads på kromosomet /DNA-segmentet.

Makropopulation: Her defineret som en samling af løvfrø-vandhuller med en maksimal afstand på 4 km.

Metapopulation: En gruppe af klart adskilte bestande af samme art, der er mere beslægtet indbyrdes end med andre metapopulationer. Metapopulationer kan være udsat for lokal ekstinktion og rekolonisering.

Migration: I populationsgenetik betyder migration den permanente bevægelse af gener ind og ud af bestande. Dvs. en migrerende fugl der bevæger sig fra sit yngle-område til et overvintringsområde og tilbage for at yngle det samme sted er ikke migration i denne forstand. Processen kaldes også for gen flow.

Mikrosatellit: Korte gentagne sekvenser af 2, 3, eller 4 baser (AC, ACG eller AGTG) et antal gange (> 8). Antallet af gentagelser karakteriserer mikrosatellit-allelerne. De er oftest ikke-kodende dvs. de ikke koder for et genprodukt og er tilfældigt fordelt over hele genomet. Alternativt kaldes de også SSTR (Simple sequence tandem repeat).

Mitokondrie: Organel i celler hos eukaryote organismer der er selv-reproducerende, dvs. det indeholder sit eget DNA.

mtDNA: Mitokondrie DNA se mitokondrie.

Mutation: Tilfældig genetisk forandring.

MVP (minimum viable population size): Den mindste størrelse en bestand skal have for at overleve på lang sigt, dvs. med en overlevelses-sandsynlighed på 1 % i 1000 år eller 10 % i 100 år.

Naturlig selektion: Proces hvor individer afhængig af deres genetiske sammensætning har forskellig overlevelses-sandsynlighed og chance for at parre sig og få afkom.

N: Se bestandsstørrelse

N_e : Se effektiv bestandsstørrelse

Nukleotid (ACTG): A (adenin), C (cytosin), G (guanin), T (thymin) er de fire nukleotider et DNA molekyle er opbygget af.

PCR: Polymerase kæde reaktion. En teknik der benyttes til at opformere bestemte DNA-sekvenser ved hjælp af primere.

Primer: Kort enkelt-strengt polynucleotid-kæde hvorpå nye nukleotider påsættes ved hjælp af DNA-polymerase. En primer bindes til DNA'et af organismen der analyseres og fremmer kopieringen af DNA-strengen (template) startende fra primer-siden. For at opformere mikrosatelliter benyttes et 'forward' og en 'reverse' primer par.

Sekvensere: Påvise nukleotid-sammensætningen i en DNA-sekvens.

Target DNA: DNA fra den organisme der analyseres.

9 Referencer

- Aaris-Sørensen, K. 1988. Danmarks forhistoriske dyreverden. Fra istid til vikingetid.- Copenhagen, Gyldendals Forlag.
- Acevedo-Whitehouse, K., Gulland, F., Grieg, D. & Amos, W. 2003. Disease susceptibility in California sea lions.- *Nature* 422 (6), 35.
- Amos, W., Wilmer, J.W., Fullard, K., Burg, T.M., Croxall, J.P., Bloch, D. & Coulson, T. 2001. The influence of parental relatedness on reproductive success.- *Proc. R. Soc. Lond. B*, 268, 2021-2027.
- Andersen, L.W., Born, E.W., Gjertz, I., Wiig, Ø., Holm, L.-E. & Bendixen, C. 1998. Population structure and gene flow of the Atlantic walrus (*Odobenus rosmarus rosmarus*) in the eastern Atlantic Arctic based on mitochondrial DNA and microsatellite variation.- *Molecular Ecology* 7, 1323-1336.
- Andersen, L.W., Fog, K. & Damgaard, C. 2004: Habitat fragmentation causes bottlenecks and inbreeding in the European tree frog (*Hyla arborea*). - *Proceedings of the Royal Society. Biological Sciences* 271(1545): 1293-1302.
- Andersen, L.W., Ruzzante, D., Walton, M., Berggren, P., Bjørge, A. & Lockyer, C. 2001. Conservation genetics of harbour porpoises, *Phocoena phocoena*, in eastern and central North Atlantic.- *Conservation Genetics* 2, 309-324.
- Arens, P., Van't Westende, W., Bugter, R., Smulders, M.J.M. & Vosman, B. 2000. Microsatellite markers for the European tree frog *Hyla arborea*.- *Molecular Ecology* 9, 1944-1946.
- Avise, J.C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*.- Chapman and Hall, New York.
- Baird, D.J., Barber, I., Braidley, M., Soares, & Calow, P. 1991. A comparative study of genotype sensitivity to acute toxic stress using clones of *Daphnia magna* Straus. - *Ecotoxicology and Environmental Safety* 21, 257-265.
- Beaumont, M.A. 1999. Detecting population expansion and decline using microsatellites.- *Genetics* 153, 2013-2029.
- Borgula, A. 1990. *Naturschutzorientierte Untersuchungen beim Laubfrosch (Hyla arborea); Bestandsentwicklung, Laichhabitat, Verhalten während der Laichperiode, Gefährdung und Schutz*. 100 pp. Lizentiatsarbeit, Ethologische Station Hasli, Zoologisches Institut, Universität Bern.
- Call, D.R., Hallett, J. 1998. PCR primers for microsatellite loci in the anurans *Rana luteiventris* and *Hyla regilla*.- *Molecular Ecology* 7, 1083-1090.

- Cassens, I., Tiedemann, R., Suchentrunk, F., Hartl, G.B. 2000. Mitochondrial DNA variation in the European otter (*Lutra lutra*) and the use of spatial autocorrelation analysis in conservation.- J. Heredity 91, 31-35.
- Catling, P.M. 1980. Rain-assisted autogamy in *Liparis loeselii* (L.) L. C. Rich. (Orchidaceae).- Bulletin of the Torrey Botanical Club 107, 525-529.
- Dallas, J.f., Piertney, S.B. 1998. Microsatellite primers for the Eurasian otter. - Molecular Ecology 7, 1248-1251.
- De Metrio, G., Corriero, A.A., Desantisa, S., Zubania, D., Cirillo, F., Deflorio, M., Bridges, C.R., Eickert, J., de la Sernac, J.M., Megalofonou, P., Kimee, D.E. 2003. Evidence of a high percentage of intersex in the Mediterranean swordfish (*Xiphias gladius* L.). - Marine Pollution Bulletin 46 (3), 358-361.
- Edenhamn, P. 1996. Spatial dynamics of the European tree frog (*Hyla arborea* L.) in a heterogeneous landscape. 129 pp. Ph.D. dissertation, Uppsala ISBN 91-576-5127-2.
- Edenhamn, P., Höggren, M., Carlson, A. 2000. Genetic diversity and fitness in peripheral and central populations of the European tree frog *Hyla arborea*. - Hereditas 133, 115-122.
- Effenberger, S., Suchentrunk, F. 1999. RFLP analysis of the mitochondrial DNA of otters (*Lutra lutra*) from Europe, implications for conservation of a flagship species. - Biol. Conserv. 90, 229-234.
- Elmeros, M. 2000: Undersøgelse af odderens forekomst i Ribe Amt 1998-2000. - Ribe Amt. Naturovervågningskontoret. 20 sider.
- Fog, K. 1988. Reinvestigation of 1300 amphibian localities recorded in the 1940s. - Memoranda Societatis pro Fauna et Flora Fennica 64 (3), 134-135.
- Fog, K. 1992. Løvfrøer og andre padde på Lolland 1991. Rapport om registrering og vandhulspølse (European tree frogs and other amphibians on Lolland. Report on monitoring and pond restoration, in Danish) 35 pp. Technical administration, Storstrøms County, Denmark.
- Fog, K. 1993. Migration in the tree frog *Hyla arborea*. In: Ecology and conservation of the European Tree frog. (eds. Stumpel HP & Tester U) DLO Institute for Forestry and Nature Research, Wageningen Netherlands.
- Fog, K. 1997. A survey of the results of pond projects for rare amphibians in Denmark. - Memoranda Societas pro fauna et flora Fennica 73 (3-4), 91-100.
- Frankham, R. 1995. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. - Genet. Res. 66, 95-107.
- Frankham, R. 1996. Relationship of genetic variation to population size in wildlife. - Conservation Biology 10 (6), 1500-1508.

- Frankham, R. 1998. Inbreeding and extinction: Island populations. - *Conservation Biology* 12 (3), 665-675.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press Cambridge, UK.
- Franklin, L.R. 1980. Evolutionary change in small populations. In *Conservation Biology: an evolutionary perspective*. Eds Soulé ME & Wilcox A. Sinauer, Sunderland, MA, pp 135.
- Friedl, T.W.P., Klump, G.M. 2002. The vocal behaviour of male European tree frogs (*Hyla arborea*): Implications for inter- and intrasexual selection. - *Behaviour* 139, 113-136.
- Garza, J.C., Williamson, E.G. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. - *Molecular Ecology* 10, 305-318.
- Goudet, J. 1995. FSTAT, version 2.9.3.1: a computer program to calculate F statistics. - *Journal of Heredity* 86, 485-486.
- Guillette, L.J., Woodward, A.R., Crain, D.A., Pickford, D.B., Rooney, A.A., Percival, H.F. 1999. Plasma concentrations and male phallus size in juvenile alligators from seven Florida Lakes. - *General and Comparative Endocrinology* 116, 356-372.
- Hagerup, O. 1941. Bestøvning hos *Liparis* og *Malaxis*. *Bot. Tidsskr.* 45, 396-402.
- Hansen, M.M. 1995. Grundlaget for fiskeudsætninger i Danmark. Danmarks Fiskeriundersøgelser 59s. Faglig rapport fra DFU, nr. 28-96.
- Hansen, M.M. 2002. Estimating the long-term effects of stocking domesticated trout into wild brown trout (*Salmo trutta*) populations: an approach using microsatellite DNA analysis of historical and contemporary samples. - *Molecular Ecology* 11, 1003-1015.
- Hansen, M.M., Kenchington, E., Nielsen, E.E. 2001. Assigning individual fish to populations using microsatellite DNA markers: Methods and applications. - *Fish and Fisheries*, 2, 93-112.
- Hansson, B., Bensch, S., Hasselquist, D., Åkesson, M. 2001. Microsatellite diversity predicts recruitment of sibling great reed warblers. - *Proceedings of the Royal Society London B* 268, 1287-1291.
- Hanski, I. 1991. Single-species metapopulation dynamics – concepts, models and observations. - *Biol. Jour. Linnean Soc.* 42(1-2), 17-38.
- Hayes, T., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A.A., Vonk, A. 2002a. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecological relevant doses. - *PNAS* 89 (8), 5476-5480.
- Hayes, T., Haston, K., Tsui, M., Hoang, A., Haeffele, C., Vonk, A. 2002b. Feminization of male frogs in the wild. - *Nature* 419, 895-896.

- Hedrick, P.W. 1996. Bottleneck(s) or Metapopulation in Cheetahs. - *Conserv. Biol.* 10, 897- 899.
- Hillis, D.M., Moritz, C., Mable, B.K. (eds.)1996. *Molecular Systematics*, second edition, Sinauer Associates Inc., Sunderland. Antal sider 655.
- Hoelzel, A.R., Halley, J., O'Brian, S.J. 1993. Elephant seal genetic variation and the use of simulation models to investigate historical population bottlenecks. - *J. Heredity* 84, 443-449.
- Keller, L.F., Waller, D.M. 2002. Inbreeding effects in wild populations. - *Trends in Ecology & Evolution* 17 (5), 230-241.
- Kyriakopoulou-Sklavounou, P., Karakousis, Y., Alexiou, B. 1992. A morphometric and electrophoretic study of two populations of *Hyla arborea* L. in Greece. - *Comparative Biochemical Physiology* 103b (3), 715-179.
- Levins, R. 1970. Extinction. I Gerstenhaber, M (ed) *Some Mathematical Questions in Biology*. - *Lectures on Mathematics in Life Sciences*, Vol. II , 77-107.
- Lynch, M. 1996. A quantitative genetic perspective on conservation issues. In: *Conservation Genetics: Case histories from Nature*. Eds. JC Avise, JL Hamrick. Chapman Hall, New York, 457-501.
- Maarleveld, G.C. 1976. Periglacial phenomena and the mean annual temperature during the last glacial time in the Netherlands. - *Biuletyn Peryglacjalny* 26, 57-78.
- MacDonald, S.M., Mason, C.F. 1994. Status and conservation needs of the otter (*Lutra lutra*) in the western Palaearctic. - *Nat. Environ.* 67, 1-54.
- Madsen, A.B. 1996. The ecology and conservation of the otter (**Lutra lutra**) in Denmark. Ph.D. thesis, Danish National Environmental Research Institute.
- Madsen, A.B., Søgaard, B. 2001. Development and Implementation of the National Otter Action Plan for Denmark. - *In: Reuther, C. & Santiapillai, C. (Eds.); How to Implement the Otter Action Plan?. –Proceedings Workshop IUCN/SSC Otter Specialist Group Hankens-büttel 2000. GN- Gruppe Naturschutz GmbH. – HABITAT. Arbeitsberichter AKTION FISCHOTTERSCHUTZ e.V.* 13, 54-60.
- Magurran, A.E. 1988. *Ecological diversity and its measurement*. University Press, Cambridge, 179 pp.
- Mitchell-Jones, A.J., Amori, G., Bogdanowicz, W., Reinders, P.J.H., Spitzenberger, F., Stubbe, M., Thissen, J.B.M., Vohralík, V., Zima, J. 1999. *The Atlas of European Mammals*. Academic Press, London, 484 pp.
- Mucci, N., Pertoldi, C., Madsen, A.B., Loeschcke, V., Randi, E. 1999. Extremely low mitochondrial DNA control-region sequence variation

- in the otter (*Lutra lutra*) population of Denmark. - *Hereditas* 130, 331-336.
- Møller, T.B., Pertoldi, C., Madsen, A.B., Asferg, T., Frydenberg, J., Hammershøj, M. & Loeschcke, V. 2004. Genetic variability in Danish polecats *Mustela putorius* as assessed by microsatellites. - *Wildlife Biology* 10(1), 25-33.
- Nei, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia Univ. Press, New York.
- Newman, R.A., Squire, T. 2001. Microsatellite variation and fine-scale population structure in the wood frog (*Rana sylvatica*). - *Molecular Ecology* 10, 1087-1100.
- Nielsen, E.E., Hansen, M.M., Loeschcke, V. 1997. Analysis of microsatellite DNA from old scale samples of Atlantic salmon: a comparison of genetic composition over sixty years. - *Molecular Ecology* 6, 487-492.
- Paetkau, D., Calvert, W., Stirling, I., Strobeck, C. 1995. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. - *Molecular Ecology* 4, 347-354.
- Pertoldi, C., Hansen, M.M., Loeschcke, V., Madsen, A.B., Jacobsen, L., Baagøe, H. 2001a. Genetic consequences of population decline in the European otter (*Lutra lutra*): an assesment of microsatellite DNA variation in Danish otters from 1883 to 1993.- *Proc. B. Soc. Lond. B.* 268, 1-7.
- Pertoldi, C., Loeschcke, V., Madsen, A.B., Randi, E., Mucci, N. 2001b. Effects of habitat fragmentation on the Eurasian badger *Meles meles* subpopulations in Denmark. - *HYSTRIX*. - *Italian Journal of Mammology* 8, 9-15.
- Pihl, S., Søgaard, B., Ejrnæs, R., Aude, E., Nielsen, K.E., Dahl, K., Laursen, J.S. 2000. Habitat and Species Covered by the EEC Habitats Directive. A Preliminary Assessment of Distribution and Conservation Status in Denmark. NERI Technical report no. 365, 121 p.
- Randi, E., Gentile, L., Boscagli, G., Huber, D., Roth, H.U. 1994. Mitochondrial DNA sequence divergence among some west European brown bear (*Ursus actos*) populations. Lessons for conservation. - *Heredity* 73, 480-489.
- Randi, E., Davoli, F., Pierpaoli, M., Pertoldi, C., Madsen, A.B., Loeschcke, V. 2003. Genetic structure in otter (*Lutra lutra*) populations in Europe: implications for conservation. - *Animal Conservation* 6, 1-10.
- Raymond, M., Rousset, F. 1995. GENEPOP (version 3.1): population genetics software for exact tests and ecumenicism. - *J. Heredity* 86, 248-249.
- Reddy, M. P., N. Sarla, Siddiq, E .A. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128(1), 9-17.

- Reuther, C. 2001. Fischotterschutz in Schleswig-Holstein. – Ministerium für Umwelt; Natur und Forsten des Landes Schleswig-Holstein. Kiel, 25 s.
- Reuther, Krekemeyer 2004. On the Way Towards an Otter Habitat Network Europe (OHNE). Habitat no. 15 (Editors Reuther, C., Kölsch, O. & Jansen, W.) GN Gruppe Naturschutz GmbH, Sudendorfallée 1, D-29386 Hankensbüttel.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. - *Evolution* 43, 223-225.
- Rowe, G., Beebee, T.J.C., Burke, T. 1998. Phylogeography of the natterjack toad *Bufo calamita* in Britain: genetic differentiation of native and translocated populations. - *Molecular Ecology* 7, 751- 760.
- Rowe, G., Beebee, T.J.C., Burke, T. 1999. Microsatellite heterozygosity, fitness and demography in natterjack toads *Bufo calamita*. - *Animal Conservation* 2, 85-92.
- Ruiz-Olmo, J., Delibes, M. 1998. La nutria en España. Sociedad Española para la Conservación y Estudio de los Mamíferos (SECEM) Group Nutria. Spain: Barcelona, Seville and Malaga.
- Seppä, P., Laurila, A. 1999. Genetic structure of island populations of anurans *Rana temporaria* and *Bufo bufo*. - *Heredity* 82, 309-317.
- Shaffer, M.L. 1981. Minimum population sizes for species conservation. - *Bio-Science* 31, 131-134.
- Siegismund, H.R. 1993. Naturbevaring og genetik. Nordisk Arbejdsrapport udgivet af Nordisk Ministerråd, Danmark.
- Simonsen, V., Pertoldi, C., Madsen, A.B., Loeschcke, V. 2003. Genetic differentiation of foxes (*Vulpes vulpes*) analysed by means of craniometry and isozymes. - *J. of Nature Conservation* 11, 109-116.
- Sjöåsen, T., Ozolins, J., Greyerz, E., Osson, M. 1997. The otter (*Lutra lutra*). Situation in Latvia and Sweden related to PCB and DDT levels. - *Ambio* 26, 196-201.
- Skriver, P. 1988. A pond restoration project and a tree-frog (*Hyla arborea*) project in the municipality of Aarhus. - *Memoranda Societas pro fauna et flora Fennica* 64 (3), 146-147.
- Skriver, P. 2001. Overvågning af løvfrølokaliteter mellem Vejle og Kolding (Monitoring European tree frog localities between Vejle and Kolding in Jutland, Denmark, in Danish). 6pp Rapport til Vejle Amt (Report to Vejle County, Denmark).
- Soulé, M.E. 1976. Allozyme variation, its determinants in space and time. In: *Molecular evolution* (ed. Ayala FJ) Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 60-77.
- Soulé, M.E. 1987. Viable populations for conservation. Cambridge University Press, Cambridge.

Stoltze, M., Pihl, S. (Red.) 1998. Rødliste 1997 over planter og dyr i Danmark. - Miljø- og Energiministeriet, Danmarks Miljøundersøgelser og Skov- og Naturstyrelsen, 219 sider.

Strandgaard, H., Asferg, T. 1980. The Danish Bag Record II. Fluctuations and trends in the game bag record in the years 1941-1976 and the geographical distribution of the bag in 1976. - Danish Rev. Game Biol. 11, 1-12.

Streiff, R., Labbe, T., Bacilieri, R. *et al.* 1998. Within population genetic structure in *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. assessed with isozymes and microsatellites. - Molecular Ecology 7, 317-328.

Stumpel, A.H.P., Hanekamp, G. 1986. Habitat ecology of *Hyla arborea* in the Netherlands. In: Studies in Herpetology (ed. Rocek Z) Proceedings of 3rd meeting of S.E.H., Praha 1985, 409-411.

Søgaard, B., Skov, F., Ejrnæs, R., Nielsen, K.E., Pihl, S., Clausen, P., Laursen, K., Bregnballe, T., Madsen, J., Baattrup-Pedersen, A., Søndergaard, M., Lauridsen, T.L., Fredshavn, J., Aude, E., Nygaard, B., Møller, P.F., Riis-Nielsen, T., Buttenschøn, R.M. 2003. Kriterier for gunstig bevaringsstatus. Naturtyper og arter omfattet af EF-habitatdirektivet & fugle omfattet af EF-fuglebeskyttelsesdirektivet. Faglig rapport fra DMU, nr. 457, 2. udgave, pp 462.

Søgaard, B., Madsen, A.B., Elmeros, M. & Hammershøj, M. 2004. Den danske bestand af odder er i fremgang. Notat fra Danmarks Miljøundersøgelser, Fagdatacentret for Biodiversitet og Terrestrisk Natur. (<http://www.dmu.dk/Dyr+og+planter/Dyr/Oddere/>)

Tempelton, A.R., Shaw, K., Routman, E., Davis, S.K. 1990. The genetic consequences of habitat fragmentation. - Annals of the Missouri Botanical Garden 77, 13-27.

TEN 2000. 4th Quarterly Report of the TEN project, March 2000. An Interreg IIc project of the European Community - networks of wetlands and watersystems. Oldenburg, Germany, 32 s.

Tester, U. 1990. Artenschuetzerisch relevante Aspekte zur Oekologie des Laubfroschs (*Hyla arborea*). Thesis, Universität Basel. 291 pp.

van Gelder, J.J., van den Broek, J.G.J., Stortelder, L.J.M., Kelleners, P.B. 1978. De boomkikker, *Hyla arborea*, in Nederland. II. Migratie. - Levende Natuur 81 (5), 200-205.

Vinther, M. 1999. Bycatches of harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) in Danish set-net fisheries. - Journal of Cetacean Management 1, 123-136.

Wansink, D.E.H., Ringenaldus, F. 1991. Restoring the Dutch population using the minimum viable population concept. - Proceedings of the V. International Otter Colloquium. - Habitat No. 6, 243-248.

Wheeler, B.D., Lambley, P.W., Geeson, J. 1998. *Liparis loeselii* (L.) Rich. in eastern England: constraints on the distribution and population development. - Botanical Journal of the Linnean Society 126, 141-158

Wiig, O., Derocher, A.E., Cronin, N.M., Skaare, J.U. 1998. Female pseudohermaphrodite polar bears at Svalbard. - *Journal of Wildlife Diseases* 34(4), 792-796

Wilcox, B.A. 1980. Insular ecology and conservation. I Soulé, M.E. & Wilcox, B.A. (eds) *Conservation Biology, an Evolutionary Ecological Perspective*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, 95-117.

Wind, P. 1999. Karplanter. - I: Wind, P., Stoltze, M., Fog, K., Christensen, D.G., Briggs, L. & Rybacki, M. 1999: *Overvågning af rødlistede arter 1998. Danmark. – Danmarks Miljøundersøgelser, Arbejdsrapport fra DMU, nr. 110, 8-64.*

Wind, P. 2002. Mygblomst (*Liparis loselii* (L.) L.C.M. Richard) –status og bevaring i Danmark. - *Flora og Fauna* 108 (2), 33-48.

Danmarks Miljøundersøgelser

Danmarks Miljøundersøgelser – DMU – er en forskningsinstitution i Miljøministeriet.
DMU's opgaver omfatter forskning, overvågning og faglig rådgivning inden for natur og miljø.

Henvendelser kan rettes til:

URL: <http://www.dmu.dk>

Danmarks Miljøundersøgelser
Frederiksborgvej 399
Postboks 358
4000 Roskilde
Tlf.: 46 30 12 00
Fax: 46 30 11 14

*Direktion
Personale- og Økonomisekretariat
Forsknings-, Overvågnings- og Rådgivningssekretariat
Afd. for Systemanalyse
Afd. for Atmosfærisk Miljø
Afd. for Marin Økologi
Afd. for Miljøkemi og Mikrobiologi
Afd. for Arktisk Miljø*

Danmarks Miljøundersøgelser
Vejlsøvej 25
Postboks 314
8600 Silkeborg
Tlf.: 89 20 14 00
Fax: 89 20 14 14

*Forsknings-, Overvågnings- og Rådgivningssekretariat
Afd. for Marin Økologi
Afd. for Terrestrisk Økologi
Afd. for Ferskvandsøkologi*

Danmarks Miljøundersøgelser
Grenåvej 12-14, Kalø
8410 Rønne
Tlf.: 89 20 17 00
Fax: 89 20 15 15

Afdeling for Vildtbiologi og Biodiversitet

Publikationer:

DMU udgiver populærfaglige bøger ("MiljøBiblioteket"), faglige rapporter, tekniske anvisninger samt årsrapporter.
Et katalog over DMU's aktuelle forsknings- og udviklingsprojekter er tilgængeligt via World Wide Web.
I årsrapporten findes en oversigt over det pågældende års publikationer.

Faglige rapporter fra DMU/NERI Technical Reports

2004

- Nr. 496: Velfærdsøkonomiske forvridningsomkostninger ved finansiering af offentlige projekter. Af Møller, F. & Jensen, D.B. 136 s. (elektronisk)
- Nr. 497: Air Quality Monitoring Programme. Annual Summary for 2003. By Kemp, K. & Palmgren, F. 36 pp. (electronic)
- Nr. 498: Analyse af højt NO₂ niveau i København og prognose for 2010. Af Berkowicz, R. et al. 30 s. (elektronisk)
- Nr. 499: Anvendelse af Vandrammedirektivet i danske vandløb. Af Baattrup-Pedersen, A. et al. 145 s. (elektronisk)
- Nr. 500: Aquatic Environment 2003. State and Trends - technical summary. By Andersen, J.M. et al. 50 pp. , 100,00 DDK
- Nr. 501: EUDANA - EUtrofieri af Dansk Natur. Videnbehov, modeller og perspektiver. Af Bak, J.L. & Ejrnæs, R. 49 s. (elektronisk)
- Nr. 502: Samfundsøkonomiske analyser af ammoniakbufferzoner. Udredning for Skov- og Naturstyrelsen. Af Schou, J.S., Gyldenkerne, S. & Bak, J.L. 36 s. (elektronisk)
- Nr. 503: Luftforurening fra trafik, industri og landbrug i Frederiksborg Amt. Af Hertel, O. et al. 88 s. (elektronisk)
- Nr. 504: Vingeindsamling fra jagtsæsonen 2003/04 i Danmark. Af Clausager, I. 70 s. (elektronisk)
- Nr. 505: Effekt af virkemidler på kvælstofudvaskning fra landbrugsarealer. Eksempel fra oplandet til Mariager Fjord. Thorsen, M. 56 s. (elektronisk)
- Nr. 506: Genindvandring af bundfauna efter iltsvindet 2002 i de indre danske farvande. Af Hansen, J.L.S., Josejson, A.B. & Petersen, T.M. 61 s. (elektronisk)
- Nr. 507: Sundhedseffekter af luftforurening - beregningspriser. Af Andersen, M.S. et al. 83 s. (elektronisk)
- Nr. 508: NOVANA. Det nationale program for overvågning af vandmiljøet og naturen. Programbeskrivelse - del 2. Af Svendsen, L.M. et al. 2005. 126 s., 100,00 kr.
- Nr. 509: Persistent organic Pollutants (POPs) in the Greenland environment - Long-term temporal changes and effects on eggs of a bird of prey. By Sørensen, P.B. et al. 124 pp. (electronic)
- Nr. 510: Bly i blod fra mennesker i Nuuk, Grønland - en vurdering af blyhagl fra fugle som forureningskilde. Af Johansen, P. et al. 30 s. (elektronisk)
- Nr. 511: Fate of mercury in the Arctic (FOMA). By Skov, H. et al. 54 pp. (electronic)
- Nr. 512: Krondyr, dådyr og sika i Danmark. Forekomst og jagtlig udnyttelse i jagtsæsonen 2001/02. Af Asferg, T., Olesen, C.R. & Andersen, J.P. 41 s. (elektronisk)
- Nr. 513: Marine områder 2003 - Miljøtilstand og udvikling. NOVA 2003. Af Ærtebjerg, G. et al. 121 s. (elektronisk)
- Nr. 514: Landovervågningsoplande 2003. NOVA 2003. Af Grant, R. et al. 118 s. (elektronisk)
- Nr. 515: Søer 2003. NOVA 2003. Af Jensen, J.P. et al. 85 s. (elektronisk)
- Nr. 516: Vandløb 2003. NOVA 2003. Af Bøgestrand, J. (red.) 54 s. (elektronisk)
- Nr. 517: Vandmiljø 2004. Tilstand og udvikling - faglig sammenfatning. Af Andersen, J.M. et al. 100,00 kr.
- Nr. 518: Overvågning af vandmiljøplan II - Vådområder. Af Hoffmann, C.C. et al. 103 s. (elektronisk)
- Nr. 519: Atmosfærisk deposition 2003. NOVA 2003. Af Ellermann, T. et al. 45 s. (elektronisk)
- Nr. 520: Atmosfærisk deposition. Driftsrapport for luftforurening i 2003. Af Ellermann, T. et al. 78 s. (elektronisk)
- Nr. 521: Udvikling og afprøvning af metoder til indsamling af flora og fauna på småstenede hårbundshabitater. Af Dahl, K. et al. 85 s. (elektronisk)
- Nr. 522: Luftkvalitet langs motorveje. Målekampagne og modelberegninger. Af Jensen, S.S. et al. 67 s. (elektronisk)
- Nr. 523: ExternE transport methodology for external cost evaluation of air pollution. Estimation of Danish exposure factors. By Jensen, S.S. et al. 44 pp. (electronic)
- Nr. 525: Screening of "new" contaminants in the marine environment of Greenland and the Faroe Islands. By Vorkamp, K. et al. 97 pp. (electronic)

2005

- Nr. 526: Effekter af fiskeri på stenrevs algevegetation. Et pilotprojekt på Store Middelgrund i Kattegat. Af Dahl, K. 16 s. (elektronisk)
- Nr. 527: The impact on skylark numbers of reductions in pesticide usage in Denmark. Predictions using a landscape-scale individual-based model. By Topping, C.J. 33 pp. (electronic)
- Nr. 528: Vitamins and minerals in the traditional Greenland diet. By Andersen, S.M. 43 pp. (electronic)
- Nr. 529: Mejlgrund og lillegrund. En undersøgelse af biologisk diversitet på et lavvandet område med stenrev i Samsø Bælt. Af Dahl, K., Lundsteen, S. & Tendal, O.S. 87 s. (elektronisk)
- Nr. 530: Eksempler på økologisk klassificering af kystvande. Vandrammedirektiv-projekt, Fase IIIa. Af Andersen, J.H. et al. 48 s. (elektronisk)
- Nr. 531: Restaurering af Skjern Å. Sammenfatning af overvågningsresultater fra 1999-2003. Af Andersen, J.M. (red.). 94 s.
- Nr. 532: NOVANA. Nationwide Monitoring and Assessment Programme for the Aquatic and Terrestrial Environments. Programme Description - Part 1. By Svendsen, L.M. & Norup, B. (eds.). 53 pp., 60,00 DKK.

[Tom side]

Danmarks Miljøundersøgelser
Miljøministeriet

ISBN 87-7772-869-6
ISSN 1600-0048