

SPECIALE PROJEKT, 2025

DEPARTMENT OF CHEMISTRY AND BIOSCIENCE, AAU

AF ANDREAS MØLGAARD ANDERSEN



**UDFORSKNING AF INTERAKTIONER
MELLEM LEDDYR OG VILDE BLOMSTER I OVERDREV
VED HJÆLP AF MILJØ-DNA METABARCODING**



AALBORG UNIVERSITET
STUDENTERRAPPORT

Sjette Studieår

Biologi

Fredrik Bajers Vej 7H

9000 Aalborg

Titel:

Udforskning af interaktioner
mellem leddyr og
vilde blomster i
overdrev ved hjælp af
miljø-DNA metabarcoding

Projekt:

Speciale projekt, 30 ect

Projektperiode:

01/09/2025 – 22/12/2025

Deltagere:

Andreas Mølgaard Andersen

Vejledere:

Jonas Wesselt
Laus Gro-Nielsen
Michael Ørsted
Torsten Nygård Kristensen

Sidetal: 45

Sider appendiks: 55

Afsluttet: 22/12-2025

Abstract:

This study investigates the potential of environmental DNA (eDNA) metabarcoding as a complementary tool to traditional vegetation-based assessments of protected grassland habitats (§3 areas) in Denmark. Using flower samples from four sites with contrasting biological quality, eDNA was extracted and sequenced to identify arthropod communities and plant–arthropod interactions. Across 27 samples, 72 arthropod species from 11 orders were detected, revealing substantial taxonomic diversity and interaction networks. Contrary to expectations, no significant difference in arthropod species richness was found between sites of high and low vegetation-based quality indices, suggesting that local arthropod diversity may be influenced of something else rather than by plant diversity alone. Interaction networks showed no clear structural differences between sites, and connectance and robustness metrics remained similar across conditions. However, eDNA analyses captured fine-scale spatial variation and detected taxa often overlooked by conventional monitoring, including nocturnal and microscopic species. These findings highlight eDNA metabarcoding as a promising, non-invasive method for documenting biodiversity and ecological interactions, offering functional insights beyond species presence. Methodological challenges such as incomplete reference databases, standardization of sampling protocols, and quantification of DNA abundance must be addressed before practical implementation in national monitoring programs.

Rapportens indhold er frit tilgængeligt, men offentliggørelse (med kildeangivelse) må kun ske efter aftale med forfatterne.

Indholdsfortegnelse

Kapitel 1 Indledning	1
1.1 Naturovervågning & Naturbeskyttelse	1
1.2 Naturtypen Overdrev	2
1.3 Naturbesigtigelse	4
1.3.1 Strukturindekset	5
1.3.2 Artsindekset	5
1.3.3 Artsscore og økologisk kompleksitet	6
1.4 Interaktionsnetværk i terrestriske habitater	6
1.5 Miljø-DNA metabarcoding	7
Kapitel 2 Problemformulering	10
2.1 Underspørgsmål	10
Kapitel 3 Metode	12
3.1 Undersøgelsesområder	13
3.1.1 Artsindeks	14
3.1.2 Overdrevenes driftshistorik	15
3.2 Fremgangsmåde	16
3.2.1 Indsamling af feltprøver	16
3.2.2 Ekstraktion	17
3.3 Metabarcoding	18
3.3.1 PCR amplifikation	18
3.3.2 Library preparation og sekvensering	19
3.3.3 Library preparation	19
3.3.4 Data processering og bioinformatik	20
3.3.5 Rarefaction analyse	21
3.3.6 Konventering af OTU'er til arter	21
3.4 Statistik	21
Kapitel 4 Resultater	23
4.1 Fordeling af arter mellem overdrene	23
4.1.1 Artsrigdommen i gode vs. ringe overdrev	25
4.1.2 PCA-biplot: Overlap og afstand mellem overdrev	26
4.1.3 Sørensen's dissimilaritetsindeks	29
4.1.4 Artsscoren og antal leddyrarter	32
4.1.5 Interaktionsnetværk	33
Kapitel 5 Diskussion	37
5.1 Identifikation af terrestriske leddyr via miljø-DNA	37
5.1.1 Miljø DNA som supplement til artsindeks	37

5.2	Ingen forskel i artsrigdom af leddyr mellem godt og ringe overdrev	38
5.2.1	Regional artspulje som mulig forklaring på lokal artsrigdom	38
5.2.2	Tendens til højere artsrigdom i ringe overdrev	39
5.2.3	Græsningsintensitetens betydning for leddyrdiversitet	39
5.3	Tætliggende overdrev har ikke større overlap af leddyrarter end fjerntliggende overdrev	40
5.3.1	Miljø-DNA kan udnyttes til at detektere spatiale signaler	40
5.4	Artsscore og unikke leddyrarter	41
5.5	Interaktionsnetværkene for overdrevne viser ingen strukturelle forskelle	42
5.5.1	Connectance som indikatorværdi for naturtilstand	42
5.5.2	Indsamlingsintensitet og artsrigdom påvirker Connectance	42
5.5.3	Robustness og dens fortolkning	42
Kapitel 6	Konklusion	44
6.1	Perspektivering	45
Kapitel 7	Appendiks	55
7.1	Udregning af artsindeks for det ringe overdrev i Hjørring	55
7.2	Amplifikations protokol	56
7.3	Besigtigelser	62
7.3.1	Hjørring ringe	63
7.3.2	Hjørring godt	69
7.3.3	Nørlev ringe	75
7.3.4	Nørlev godt	80
7.4	Presence/absence data af interaktion mellem leddyrart og planteart	87
7.5	Nørlev ringe overdrev	90
7.6	Feltundersøgelse af vilde bier i Nørlev.	91
7.7	Fordeling af unikke arter pr overdrev	95

1.1 Naturovervågning & Naturbeskyttelse

Danmarks naturovervågning bygger på en lang tradition for naturbeskyttelse. I 1917, gennem naturfredningsloven, blev det muligt at frede naturarealer og var i lang tid den eneste måde at beskytte og bevare natur på i Danmark (5% af Danmarks landareal er i dag fredet) [Styrelsen for Areal Grøn Arealomlægning og Vandmiljø, ndc]. Først i 1992 kom naturbeskyttelseslovgivningen til, der beskytter udvalgte naturtyper under §3 som; søer, vandløb, moser, ferske enge, strandenge, heder og overdrev med et samlet areal $\geq 2500 m^2$, men også skove og vandløb. Den seneste registrering og udvidelse af §3 -arealerne fra 2016 dækker 10,3% af Danmarks land areal. Disse områder er beskyttet mod tilstandsændringer og enhver ændring kræver dispensation fra kommunen [Styrelsen for Areal Grøn Arealomlægning og Vandmiljø, ndb; Miljø- og Ligestillingsministeriet, 2025].

Danmark har dertil forpligtet sig gennem EU's fugledirektiv (1972) og habitatdirektiv (1992) til at udpege Natura 2000 områder, som skal beskytte truede, sjældne dyre- og plantearter og naturtyper. Tilsammen udgør Natura 2000 områderne i Danmark hhv. 9 % af landarealet og 28 % af havarealet [European Environment Agency, nd]. De forskellige typer beskyttede naturarealer overlapper i høj grad med hinanden. 41 % af det samlede §3-areal ligger i Natura 2000-områder, mens 23 % af §3-arealerne ligger i fredede områder [Levin, 2016]. Derudover har Danmark forpligtet sig gennem internationale konventioner som Ramsarkonventionen i 1978 der beskytter vådområder [Ramsar The Convention on Wetlands, nd] og Biodiversitetskonventionen af FN i 1994 [Convention on Biological Diversity, ndb]. Sidstnævnte forpligter verdens lande til at bevare den biologiske mangfoldighed og fremme bæredygtig udnyttelse af naturens ressourcer og sikre en retfærdig fordeling af udnyttelsen af genetiske ressourcer. Biodiversitet skal her forstås som den variation, der er indenfor alle organismer og økosystemer på Jorden, samt de økologiske kompleksiteter de indgår i. Det inkluderer diversiteten indenfor arterne, mellem arter og økosystemerne [Convention on Biological Diversity, nda].

For at sikre et tilstrækkeligt datagrundlag til afrapportering til EU-lovgivning, nationale lovgivning og forvaltningsmæssige behov og internationale konventioner overvåges naturen, hvor en af metoderne er Det Nationale Overvågningsprogram for Vandmiljø og Natur (NOVANA), der varetages af Styrelsen for Grøn Arealomlægning og Vandmiljø (SGAV) [Hansen et al., 2024]. Derudover er hver enkelt kommune forpligtet til løbende at foretage en opdatering af den fysiske afgræsning af § 3-arealerne, undersøge uoverensstemmelser og registrering af ny natur. Denne opdatering sker gennem 10 årige perioder, hvoraf den første forløb fra 2015-2024 [Styrelsen for Areal Grøn Arealomlægning og Vandmiljø, nde]. En metode som kommunerne kan gøre brug af, til overvågning af § 3-arealerne, er besigtigelser. Det er en frivillig og standardiseret måde hvorpå naturdata kan registreres. Her gælder det først at afgrænse arealet, bestemme naturtyper og evt.

undertype, registrere strukturindikatorer og registrere plantearter [Jesper Fredshavn, 2010].

1.2 Naturtypen Overdrev

Den lysåbne natur i Danmark som er beskyttet af §3 udgør vigtige levesteder for mange arter af den danske flora og fauna [Ellemann et al., 2001], hvor over 40 % er rødlistede [Ejrnæs et al., 2014]. Et vigtig levested for mange af Danmarks rødlistede arter, er overdrevene, en lysåben naturtype, som bl.a. dagsommerfugle, krybdyr og karplanter tilhører [Nygaard et al., 2021]. Naturtypen er også beskyttet under habitatdirektivet og kategoriseres som et Natura 2000 område [European Environment Agency, nd]. Den seneste bevaringsstatus fra habitatdirektivets artikel 17 i 2025 viser at alle danske overdrevstyper er i stærk eller moderat ugunstig bevaringsstatus [Fredshavn et al., 2025].

Overdrev er som et biologisk begreb, lysåben natur med en urtedomineret vegetation med en veldrænet bund uden anden kulturpåvirkning end græsning, ifølge [Bruun & Ejrnæs, 1998]. Overdrev har før i tiden været en udbredt naturtype i langt højere grad end i dag. Tidligere var der ikke nogen præcis angivelse af arealdækningen af overdrev, men op mod 75% af den danske natur bestod af lysåben natur i begyndelse af 1800-tallet, i dag dækker de 9% [Lundsgaard et al., 2022; Ellemann et al., 2001].

Der skelnes mellem menneskeskabte overdrev og naturlige overdrev. De naturlige overdrev findes i kuperet terræn på dalsider, randmoræner og nuværende og tidligere kystskrænter, hvor vedplanter har haft svært ved at etablere sig (Figur 1.1, 1.2). Menneskeskabte overdrev har sin oprindelse i kulturhistorien. Overdrev har betydet områder uden for landsbyens opdyrket marker, som var uopdyrkelige og derfor blev brugt til græsningsarealer til kvæg indtil 1800 tallet [Bruun & Ejrnæs, 1998; Buttenschön, 1993].



Figur 1.1. Overdrev i Nørlev. Aug 2025.



Figur 1.2. Overdrev i Hjørring Bjerger. Aug 2025.

I de sidste 200 år har overdrev været i tilbagegang, op mod en 90 % reduktion. De første 150 år skyldes det primært opdyrkning og skovplantning af nåletræer og i de seneste 50 år er det intensiveret, hvor landbrugets anvendelse af gødning har ført til omlægning, gødskning og ophør af græsning på overdrev. Tidligere brakmarker udvikler sig nu sjældent til hede eller græsland, da jorden er for næringsrig og hurtigt overtages af få konkurrencesterke arter. Samtidig er botaniske spredningskilder som hegn, diger og vejkanter forsvundet, og de tilbageværende naturområder påvirkes af forurening og eutrofiering fra luftbåren kvælstof og

svovl. De vigtigste trusler mod overdrev er idag ophør af græsning og næringsforurening [Ejrnæs et al., 2021]. Uden græsning vil overdrevsvegetation gå mod høje urter og vedplanter og arealet forandres gennem succession og levesteder vil gå tabt for en lang række varme- og lyskrævende dyr [Bruun & Ejrnæs, 1998; Fredshavn et al., 2025]. Mange af overdrevets insekter kræver høje temperaturer tæt ved jordoverfladen, hvor de jager eller spiser af værtsplanterne. Når vegetationen bliver for høj og tæt, så falder temperaturen og det tåler insekterne dårligt [Ejrnæs et al., 2009]. Næringsforureningen favoriserer kvælstofelskende plantearter, særligt græsser, og forringer dermed konkurrencevilkårene for de lavtvoksende og nøjsomme arter, som halvgræsser, laver, mosser og urter [Fredshavn et al., 2025].

Vegetationen på overdrev er dominerende af lyselskende, tørkeelskende, langsom voksende og nøjsomme urter og græsser [Ejrnæs et al., 2009; Bruun & Ejrnæs, 1998; Buttenschön, 1993; Moeslund, 2024]. Urte- og græsvegetation er artsrig og dækker for det meste hele arealet, men enkelte buske og træer kan dukke op ved pauser mellem græsninger og ved varierende græsningstryk. Grønsværen består af flerårige græsser og urter, der er græsningstålelige. Dvs. krybende planter, planter med bladrosetter tæt ved jorden, og planter der formerer sig ved udløber i stedet for ved frøspiring. Overdrevets jordbundsforhold er grundlaget for en strukturel mangfoldighed. Jordbundens surhedsgrad varierer fra pH 4 til 8 og skaber derved stor variation i plante- og dyrelivet. På sandede, nordvendte skråninger giver udvaskningen og forsuring kølige stabile levesteder for mosser, svampe og tørkefølsomme planter. Sydvendte skrænter på kalkrige jorde er derimod varme og tørre med løs jord, hvilket fremmer laver, varmeelskende insekter og krybdyr. Disse mikroklimatiske variationer giver ophav til en høj artsdiversitet blandt dyr og planter [Nygaard et al., 2021].

Et gunstigt overdrev rummer vigtige levesteder for dagsommerfugle (Figur 1.3), krybdyr, bier, karplanter, svampe, græshopper, natsommerfugle og torbister, løbebiller, edderkopper, fugle, laver, mosser, svirrefluer, snudebiller og bladbiller [Nygaard et al., 2021]. Over 50% af Danmarks rødlistede dagsommerfugle er tilknyttet overdrevene og er samtidig det sted med flest rødlistede karplanter i Danmark [Nygaard et al., 2021].



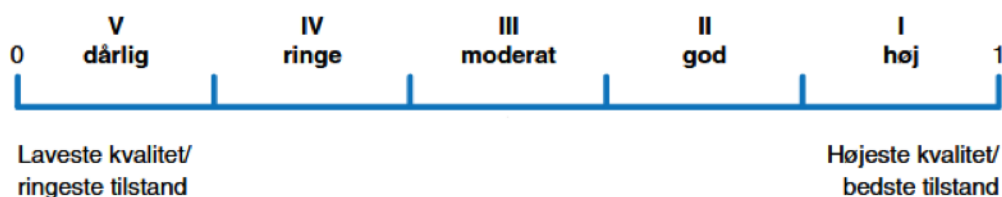
Figur 1.3. Nældens takvinge på overdrev i Nørlev i aug 2025.

I dag findes overdrev mest på skrænter ved kysten, ådale og randmorænelandskaberne, hvor jorden aldrig har været dyrket, samt på græsarealer, som er taget ud af drift, med græssende dyr. Overdrene er betinget af tilbagevendende forstyrrelser, oftest i form af græsning [Ejrnæs et al., 2009]. I dag er 34.054 hektar overdrev beskyttet under naturbeskyttelsesloven, men er små og fragmenteret og truet af ophørt græsning, tilgroning og næringstilførsel [Styrelsen for Areal Grøn Arealomlægning og Vandmiljø, nda]. De har en gennemsnitlig størrelse på 1,8 ha og 38% af overdrene er mellem 1 - 3 ha store [Levin, 2016]. Nye overdrev kan udvikles, men processen tager typisk 30-50 år efter endt drift og afhænger af den botaniske sammensætning [Styrelsen for Areal Grøn Arealomlægning og Vandmiljø, ndd]. Overdrene er kategoriseret i flere undertyper; kalk, sure, tørre og sandede overdrev, hvor nogle er omfattet af habitatdirektivet og inkluderet i Natura 2000 netværket [Ejrnæs et al., 2009]. Den seneste NOVANA undersøgelse viser at meget følsomme vegetative arter på sure overdrev er faldet signifikant i perioden 2004-2022, samtidig udgør næringselskende arter en stigende andel af vegetationen [Else Vihlborg Staalsen, 2024]. Dette understreger en fortsat truet tilstand, forværret af tidligere mulighed for gødskning af §3-arealer og manglende beskyttelse mod ophør af græsning [Folketinget, 2019]. Samlet set er overdrene under pres, og uden målrettet pleje og forvaltning risikerer vi at miste en af Danmarks mest artsrige naturtyper.

1.3 Naturbesigtigelse

Tilstandsvurderingssystemet, besigtigelse, er et værktøj til vurdering af naturtilstanden i §3 områder under naturbeskyttelsesloven. Metoden blev udviklet efter strukturreformen i 2007 for at sikre en ensartet og reproducerbar overvågning på tværs af kommuner. Den giver et øjebliksbillede af naturtilstanden og bruges i naturforvaltning, husdyrgodkendelsesloven samt planlægning og pleje af Natura 2000 områder. Den er tæt korreleret med måden hvorpå vurderinger foretages i Natura 2000 områder [Fredshavn et al., 2010]. Alt data fra besigtigelserne lagres i Danmarks Naturdata [Danmarks Miljøportal, nd].

Naturtilstanden baserer sig på den dominerende naturtype, en række strukturelle indikatorer (Strukturindeks), samt forekomsten af karplanter og karsporeplanter i et dokumentationsfelt (Artsindeks). Disse indeks oversættes til samme referenceskala, en kontinueret skala mellem 0 og 1 (Figur 1.4). Den kontinueret skala er opdelt i 5 klasser, som opfatter alle naturtilstande, med V som værende den af dårligste kvalitet og I som værende den af højeste kvalitet [Fredshavn et al., 2010]. Hver tilstandsklasse er nærmere defineret i tabel 1 i *Naturtilstand på terrestriske naturarealer - besigtigelser af §3-arealer* [Fredshavn et al., 2010].



Figur 1.4. En kontinueret skala mellem 0 og 1 til vurdering af tilstandsklasse i kommunale besigtigelser. Figuren er modificeret og hentet fra Fredshavn et al. [2010]

1.3.1 Strukturindekset

Strukturindekset udregnes på baggrund af fire indikatorgrupper for struktur: 1) Vegetationsstruktur, 2) afgræsning og drift, 3) naturtypekarakteristiske strukturer og 4) hydrologi og kystsikring. Det er alle let erkendelige og målbare indikatorer, som vægtes forskelligt i beregningen, alt efter hvilken hovednaturtype og undertype der er angivet [Fredshavn et al., 2010]. Denne rapport beskæftiger sig primært med artsindekset, da udvælgelsen af områderne i undersøgelsen baserer sig netop på forskellen i artsindekset, hvorfor strukturindeks og naturtilstand ikke nærmere beskrives. En detaljeret gennemgang af strukturindeks og naturtilstands udregningen kan findes i [Fredshavn et al., 2010].

1.3.2 Artsindekset

Artsindekset er baseret på en identifikation af arter af alle karplanter og karsporeplanter i et dokumentationsfelt med en radius på 5 m. Dokumentationsfeltet lægges i et upåvirket eller det mindst upåvirkede område med samme drift og historik, da det her kan afspejle de muligheder den vegetative artssammensætning har udnyttet i den gældende naturtype. Hvilke arter som er til stede, kan give en indikation af naturtype/undertype og som mål for den forhenværende og nuværende naturtilstand. Naturens tilstand afhænger oftest af tidligere drift (pløjning, gødskning, dræning, ophør af græsning), som påvirker den vegetative artssammensætning, især hos lavmobile arter. Arterne fundet i dokumentationsfeltet er delt op i bidragsarter, nularter og problemarter [Fredshavn et al., 2010].

Hver art tildeles en score der går fra -1 til 7, hvor 7 er de arter der er ekstrem følsom over for påvirkninger, der forringer naturtilstanden. -1 er for de arter der er begunstiget af forringet naturtilstand. De arter som har positiv score kaldes for bidragsarter mens problemarter og invasive arter har en negativ score. Nularter som er indslæbte eller indførte arter (landbrugs- og haveplanter) vil ikke, under naturlige forhold, optræde i de forskellige udgaver af naturtyperne, derfor sættes de til en nulværdi i beregningen uden at have reel indflydelse på artsindekset. Pointscoren er baseret på de samme artslistes med tilsvarende pointtildelinger som i Natura 2000 områder [Fredshavn et al., 2010]. Artsscorelisten findes i bilag 1 i Fredshavn & Ejrnæs [2009] og er udarbejdet og kalibreret på grundlag af feltdata om karplanter i dokumentationscirkler indsamlet i perioden 2004–2008 i danske habitatområder, lagret i Danmarks Naturdata [Fredshavn & Ejrnæs, 2009].

Beregningsmetoden til udregning af artsindekset præsenteres i Fredshavn & Ejrnæs [2007] og artsindekset udregnes på baggrund af en vægtet middelværdi af to delindeks.

$$A = 0,75A_s + 0,25A_d$$

Artsscoreindekset (A_s) beregnes ud fra arternes gennemsnitlige artsscore i dokumentationsfeltet og den gennemsnitlige middelscore for naturtypen med en sigmoid omsætningsfunktion til en værdi en mellem 0 og 1. Den er uafhængig af hvor mange arter der er, hvilket gør det muligt at sammeligne naturtyper med naturligt forskellige artsantal [Fredshavn et al., 2010].

$$A_s = \frac{1}{(1 + e^{ma}) * (e^{1,6(1-m)})}$$

Artsdiversitetsindekset (A_d) beregnes ud fra summen af arternes artsscore og omsætter artssummen til en værdi mellem 0 og 1, hvilket er justeret for naturtypens gennemsnitlige

artdiversitet Fredshavn & Ejrnæs [2009]. Artsdiversitetsindekset er afhængig af antallet af arter og deres artsscore, hvilket gør det velegnet til at følge udviklingen i naturtilstanden over tid, da følsomme arter forsvinder først ved en forringelse af naturtilstanden [Fredshavn et al., 2010].

$$A_d = \frac{a_b}{a_t} * (1 - e^{\frac{s}{d}})$$

Et eksempel på en udregning af artsindekset ses i appendiks (Appendiks 7.1).

1.3.3 Artsscore og økologisk kompleksitet

Artsindekset er baseret på karplanter og karsporeplanter, dels fordi de af praktiske årsager kan erkendes fra forår til efterår, og fordi planterne er rangeret i en artsscoreliste. I princippet kan alle flora og fauna arter indgå i beregningen, hvis de er tildelt point. Leddyr vil for eksempel kunne indgå i beregningen, men er svære at finde og artsidentificere, end planter, og vil oftest kræve en specialist viden for dette. For nuværende kan leddyr registreres i besigtigelsen og indgå som værdifuld information i forvaltningsmæssige beslutninger [Fredshavn et al., 2010].

Samlet set giver anvendelsen af karplanter og karsporeplanter som grundlag for artsindekset, en praktisk, ensartet og reproducerbar metode til vurderingen af naturtilstanden. Metoden er udviklet med henblik på at sikre en sammenlignelig dataindsamlingen på tværs af kommuner og tid, uden behov for særlig specialiseret artskenndskab. Dette understøtter dermed kommunernes forpligtede overvågning og vedligeholdelse af § 3-arealerne [Fredshavn et al., 2010].

1.4 Interaktionsnetværk i terrestriske habitater

Et overset element i naturovervågning gennem besigtigelser er arternes interaktioner mellem hinanden (Figur 1.5). Tabet af interaktioner mellem arter forekommer netop i en højere hastighed end tabet af arter for et naturområde [Valiente-Banuet et al., 2015]. Det indikerer en skjult degradering og tab af arternes funktionalitet, som en måling af plantearternes tilstedeværelse ikke giver et indblik i. For arternes roller og relationer mellem hinanden danner et komplekst netværk og danner grundlag for mange af de økosystemtjenester som planterne gør brug af. Særligt er leddyr og plante interaktioner vigtige, fordi leddyr er blandt de vigtigste bestøvere og herbivorer for planterne [Schaffers et al., 2008; Haddad et al., 2009]. En introduktion af en invasiv herbivorer eller et tab af vigtig bestøvere i økosystem kan have ødelæggende konsekvenser for hele plantesamfundet [Valiente-Banuet et al., 2015; Myers & Sarfraz, 2016].

Mange af de rødlistede invertebrater er ofte tilknyttet græsland (heder, overdrev, enge) og hvor de ofte er tæt knyttet til specifikke værtsplanter. Pollen og nektar er centrale fødekilder for sommerfuglene, bier og svirrefluer i deres imago stadie, som eksempelvis den orange jordbi (*Andrena marginata*) og guldbuksebi (*Dasypoda suripes*) der kun tager pollen fra planter i kartebollefamilien (Dipsacaceae) og den rødbrun snerremåler (*Epirrhoe galiata*), der lever af gul snorre (*Galium verum*). Derudover lever mange blomsterbesøgende insekter deres larvestadie på specifikke plantearter, fx Hedepletvinge (*Euphydryas aurinia*), hvis larver kun lever på djævelsbid (*Succisa pratensis*) [Nygaard et al., 2021].

Den mest brugte repræsentation af disse interaktioner er gennem føde netværk, som er en strukturel og funktionel repræsentation af de trofiske niveaues energioverførsel i et økosystem [McDonald-Madden et al., 2016]. Et fødenetværk giver et helhedsbillede af økosystemets struktur

og funktion, og kan bruges til at analysere biodiversitet, energiomsætning og økosystemstabilitet [Dunne et al., 2002]. Hver art er forbundet gennem deres fødeinteraktioner. Det antages ofte at jo flere interaktioner der er, jo mere robust er netværket, men kvaliteten og funktionen af interaktionerne har også betydning for økosystemets robusthed [Allesina et al., 2009].

Interaktionerne kan deles op i funktionelle og redundante forbindelser. De funktionelle forbindelser bidrager positivt til økosystemets robusthed, mens de redundante forbindelser kan siges at være overflødige. Langt de fleste forbindelser er dog funktionelle i et netværk, og hvis en art forsvinder, falder antallet af funktionelle forbindelser og dermed økosystemets robusthed [Allesina et al., 2009].

For at kvantificere netværkets egenskaber anvendes strukturelle mål som Robusthed og Connectance. Robusthed angiver netværkets evne til at modstå sekundær uddøen, når arter fjernes, typisk beregnet som den andel af arter, der kan fjernes, før hele netværket kolliderer. Connectance beskriver, hvor tæt forbundet netværket er, og beregnes som forholdet mellem det faktiske antal interaktioner og det maksimale antal mulige interaktioner. Disse mål giver et indblik i, hvor stabilt og sammenhængende et økosystem er, og kan bruges til at sammenligne forskellige naturtyper eller følge ændringer over tid [Gilbert, 2009]. Habitater med høj biologisk værdi forventes at have en høj forbundethed og dermed høj robusthed overfor sekundær uddøen [Dunne et al., 2002].



Figur 1.5. En humlebi interagerer med Rød kløver i overdrev i Nørlev. Aug 2025.

Men at måle en interaktion kan være vanskelig med traditionelle fangstmetoder (Malaise- og faldfælder) og videomonitoring, da en observation af eksempelvis en dagsommerfugl ikke er en direkte indikation på en interaktion med en planteart. Det kan blot være en forbipasserende. Desuden har mange leddyr kun et kortvarigt imago-stadium, hvilket øger risikoen for, at interaktioner i andre livsstadier overses [Gardarin et al., 2018]. Hertil kommer, at morfologisk artsbestemmelse kræver omfattende taksonomisk ekspertise, som er en ressource, der er i tilbagegang [Hopkins & Freckleton, 2002]. For at imødegå denne udfordring, er der derfor fokus på udvikling af andre metoder til overvågning af leddyr samfund, hvor udviklingen af ny teknologi har fremmet muligheden for miljø-DNA analyser [Weber et al., 2024; Thomsen & Sigsgaard, 2019].

1.5 Miljø-DNA metabarcoding

Når et leddyr interagerer med en plante, efterlader den stykker af sit DNA på overfladen eksempelvis igennem tygning af plantemateriale i form af spyt og defækation lige så vel som slim og blod [Ruppert et al., 2019]. Denne type DNA kaldes miljø-DNA (eDNA) [Thomsen & Willerslev, 2015; Ruppert et al., 2019]. Miljø-DNA metabarcoding beskrives i litteraturen, som en ny metode til at analysere biodiversitet på, hvor ved DNA-prøver er ekstraheret fra miljøet via vand, sedimenter, overflader eller luft. Efterfølgende amplificeres DNA'et gennem generelle eller universelle primers ved polymerase chain reaction (PCR) og sekvenseres ved hjælp af next-generation sekvensering, der generer tusindvis af reads [Ruppert et al., 2019].

DNA fundet på overfladen af planter vil derfor primært komme fra taksonomiske grupper, der

interagerer med planten og ikke af forbipasserende [Weber et al., 2024]. I løbet af de seneste årtier, er det blevet muligt at identificere og artsbestemme disse arters miljø-DNA i en stor størrelsesorden. Kombinationen, kaldet metabarcoding, af teknikken DNA barcoding [Hebert et al., 2003] og High-throughput sequencers [Reuter et al., 2015] gør det muligt at karakterisere og kvantificere biodiversitet i et omfang der ikke er set før. Metoderne er nærmere beskrevet i Afsnit 3.3.

Et studie af Weber et al. [2024] sammenlignede traditionelle metoder til indsamling af leddyr med miljø DNA metabarcoding, hvor miljø-DNA fra leddyr var indsamlet fra planters overflade. Eksperimenterne viste at de leddyrssamfund, der identificeres via miljø-DNA og traditionelle metoder, kun delvist overlapper, men at miljø-DNA metabarcoding identificerer flere unikke arter. Den afslører også samfundsvariation af leddyr mellem individuelle planter, endda mellem forskellige dele af samme plante. Især specialiserede planteædere identificeres bedre med miljø-DNA [Weber et al., 2024].

Ligeledes viste et eksperiment af Thomsen & Sigsgaard [2019] potentialet for vilde blomster som kilde til miljø-DNA fra leddyr. Omend eksperimentet ikke er udtømmende, viste resultaterne at terrestriske leddyr efterlader DNA på de planter de interagerer med, og studiet indsamlede miljø-DNA fra mindst 135 arter af leddyr i 67 familier og 14 ordener, der tilsammen repræsenterer bestøvere, parasitter, galle inducerende, rovdyr og fytofage arter.

Miljø-DNA metabarcoding er stadig en forholdsvis ny metode under udvikling [Ruppert et al., 2019]. Den er interdisciplinær og kan ses som en komplementært metode til traditionelle feltbaserede metoder og databehandlingsværktøjer, der kan detektere forskellige leddyrarter, opfange større diversitet og øge det taksonomiske niveau [Ruppert et al., 2019], ligesom det er en ikke-invasiv indsamlingsmetode [Thomsen & Willerslev, 2015]. Dette er kvaliteter, der kan afhjælpe nogle af de udfordringer, som de traditionelle metoder har jf. afsnit 1.4. Hvor nogle traditionelle metoder netop risikerer at forstyrre og ødelægge habitater, og derudover har svært ved opfange små og sky arter, hvilket gør estimering af interaktioner umuligt [Ruppert et al., 2019]. Weber et al. [2024] argumenterer endda for at metoden kan stå i stedet for traditionelle metoder når der skal vurderes økologisk status, fordi den opsamler de overordnet diversitetsmønstre af leddyrssamfund i et habitat [Weber et al., 2024].

Som et stadig udviklende forskningsområde, er der begrænsninger og udfordringer ved miljø-DNA analyser. En begrænsning er, at det genetiske materiale nedbrydes i naturen, hvorfor mængderne af miljø-DNA ofte er små, dette er særligt en udfordring i varme tropiske egne [Ruppert et al., 2019]. En anden udfordring er størrelsen på databaser til identifikation af arter, der indeholder et ufuldstændigt antal af kendte sekvenser på leddyr, hvilket kan lede til forkert og manglende identifikation af arter. Identifikation af arter kan ikke være bedre end den database der anvendes [Ruppert et al., 2019; Thomsen & Willerslev, 2015; Thomsen & Sigsgaard, 2019]. En af de vigtigste overvejelser ved miljø-DNA metabarcoding er i følge Ruppert et al. [2019], designet af primer, da forskellige primers er forskellige i dækningsgrad og taksonomisk tildeling. Hvilken primer der anvendes risikere bl.a. at medføre et bias, hvor nogle sekvenser amplificeres i højere grad end andre ligesom det risikeres at amplificere ikke-relevante regioner [Ruppert et al., 2019].

I følge Thomsen & Willerslev [2015] er kontaminering en af de mest kritiske faldgrupper ved miljø-DNA analyser, da det kan risikere at give falsk positive. Kontamineringen kan ske i alle led fra indsamling i felten til analyse i laboratoriet. Ved undersøgelser, der indsamler prøver fra

flere lokationer kan der ydermere risikeres krydskontaminering [Thomsen & Willerslev, 2015]. Særligt er det kritisk ved laboratorisk kontaminering, da miljø-DNA studier anvender PCR, som genererer tusinder kopier af DNA, der let kan spredes i det lukkede laboratorie [Thomsen & Willerslev, 2015]. Af yderligere udfordringer nævner Thomsen & Willerslev [2015], inhibering af PCR reaktioner, fejl i DNA sekvensering, kritisk fortolkning af resultater samt skepsis blandt praktikere overfor miljø-DNA metabarcodings validitet [Thomsen & Willerslev, 2015].

På trods af sine begrænsninger er miljø-DNA metabarcoding et stærkt værktøj til at påvise arters tilstedeværelse, påvise interaktioner mellem organismer og forstå rumlige dynamikker i leddyrssamfund [Ruppert et al., 2019; Sahu et al., 2025]. Som vist i studiet af Thomsen & Sigsgaard [2019], er det muligt at indsamle information om forskellige leddyrssamfund via miljø-DNA metabarcoding fra vilde blomster i Danmark [Thomsen & Sigsgaard, 2019]. Nærværende undersøgelse bygger videre på de observationer med det formål at undersøge, hvordan miljø-DNA undersøgelser kan supplere naturovervågningen i Danmark.

Problemformulering 2

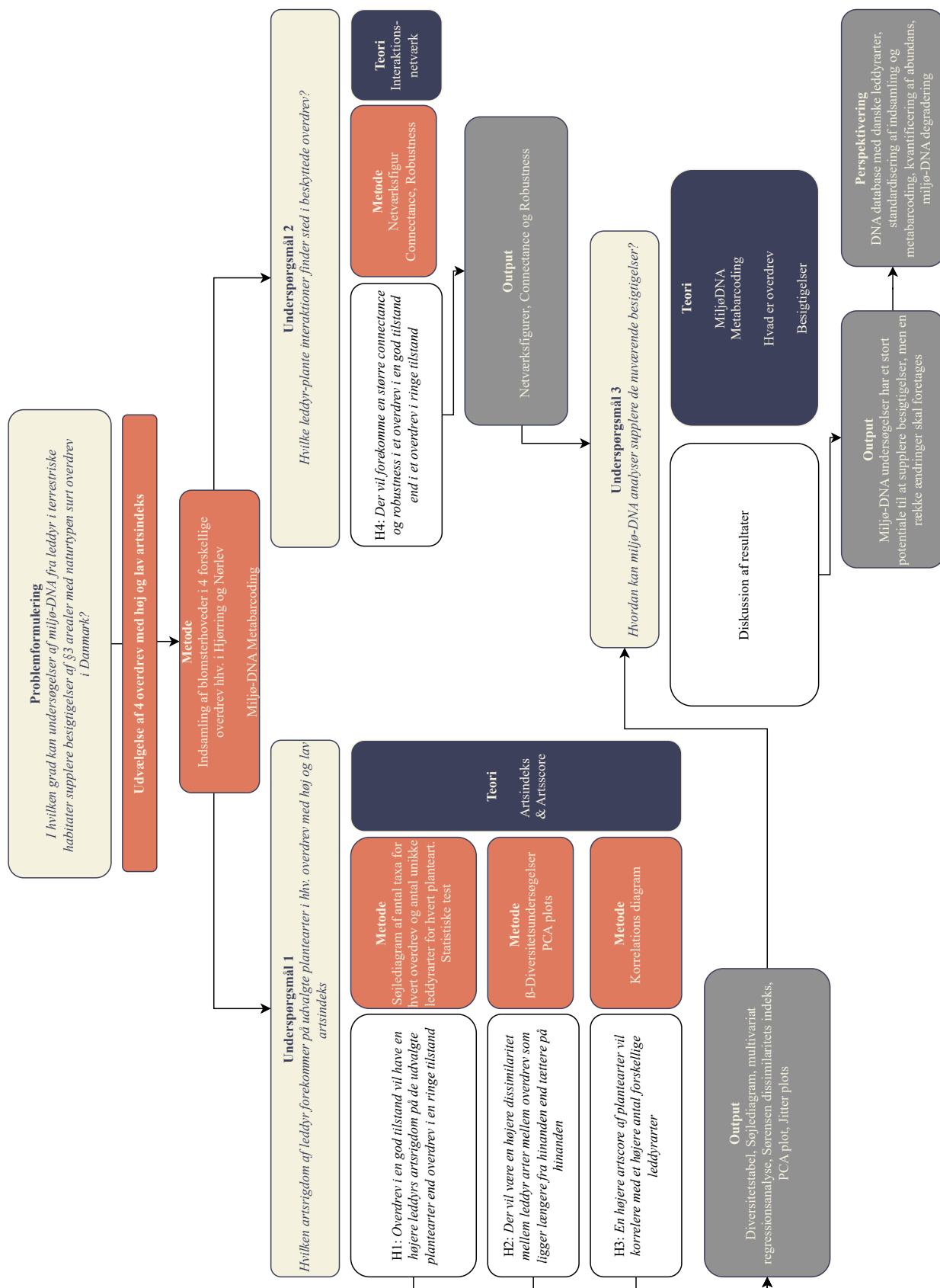
I hvilken grad kan undersøgelser af miljø-DNA fra leddyr i terrestriske habitater supplere besigtigelser af §3 arealer med naturtypen surt overdrev i Danmark?

2.1 Underspørgsmål

Til at besvare ovenstående problemformulering, har undersøgelsen tre underspørgsmål:

1. Hvilke artsrigdom af leddyr forekommer på udvalgte plantearter i hhv. overdrev med høj og lav artsindeks?
2. Hvilke leddyr-plante interaktioner finder sted i beskyttede overdrev?
3. Hvordan kan miljø-DNA analyser supplere de nuværende besigtigelser?

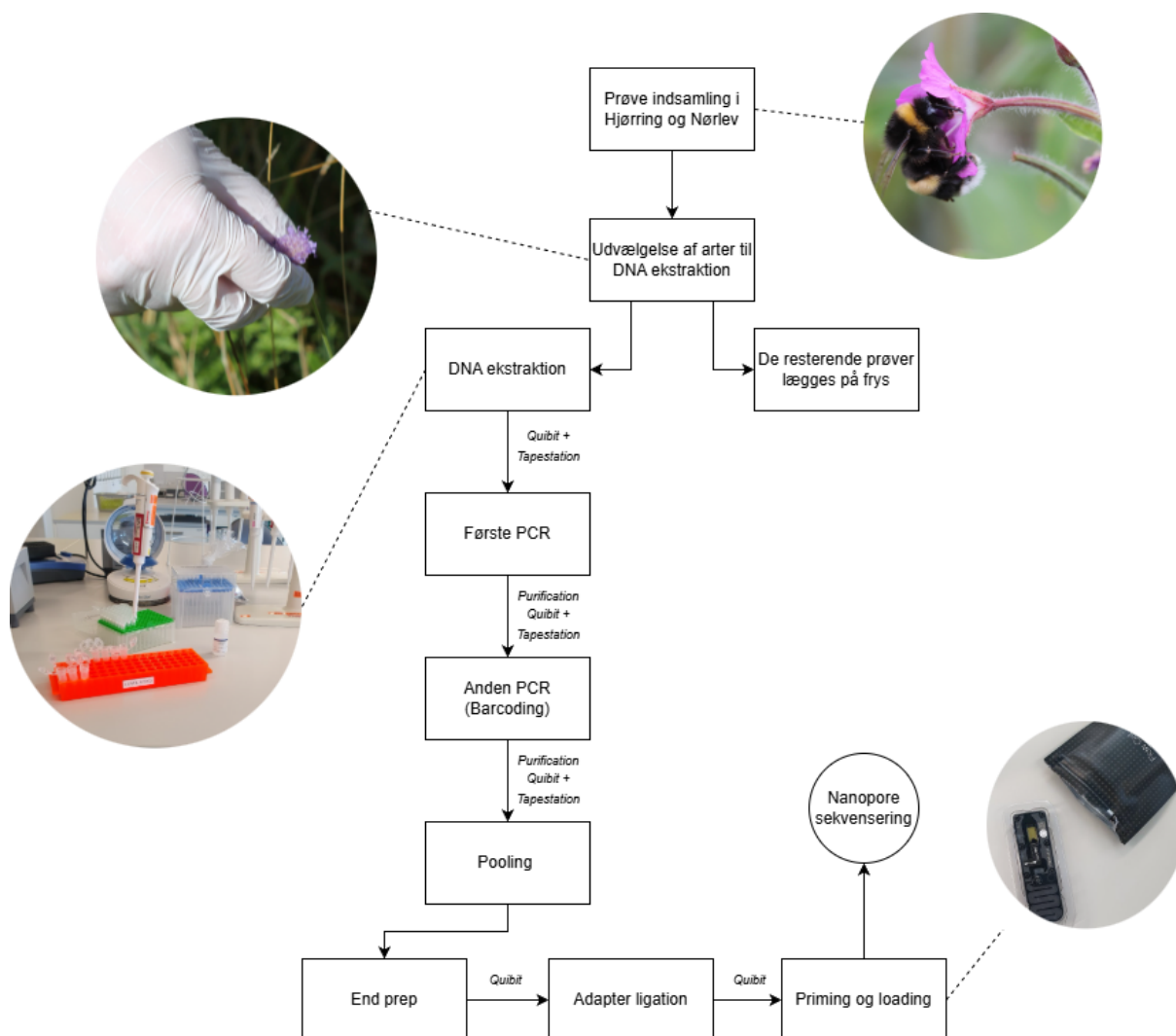
En præsentation af hypoteser og en mere uddybende gennemgang af hvordan problemformuleringen undersøges i denne undersøgelse ses i figur 2.1.



Figur 2.1. Flowdiagram af hvordan problemformuleringen undersøges i denne undersøgelse.

Metode 3

Undersøgelsen blev gennemført i samarbejde med Hjørring Kommune, hvor feltprøver blev indsamlet på kommunale arealer samt på et privat ejet område. Den anvendte metode kombinerer feltbaseret indsamling af miljø-DNA med nanopore-sekventering, hvilket muliggør identifikation af leddyrssamfund baseret på DNA fragmenter. Figur 3.1 illustrerer den overordnede proces fra prøveindsamling til sekventering.



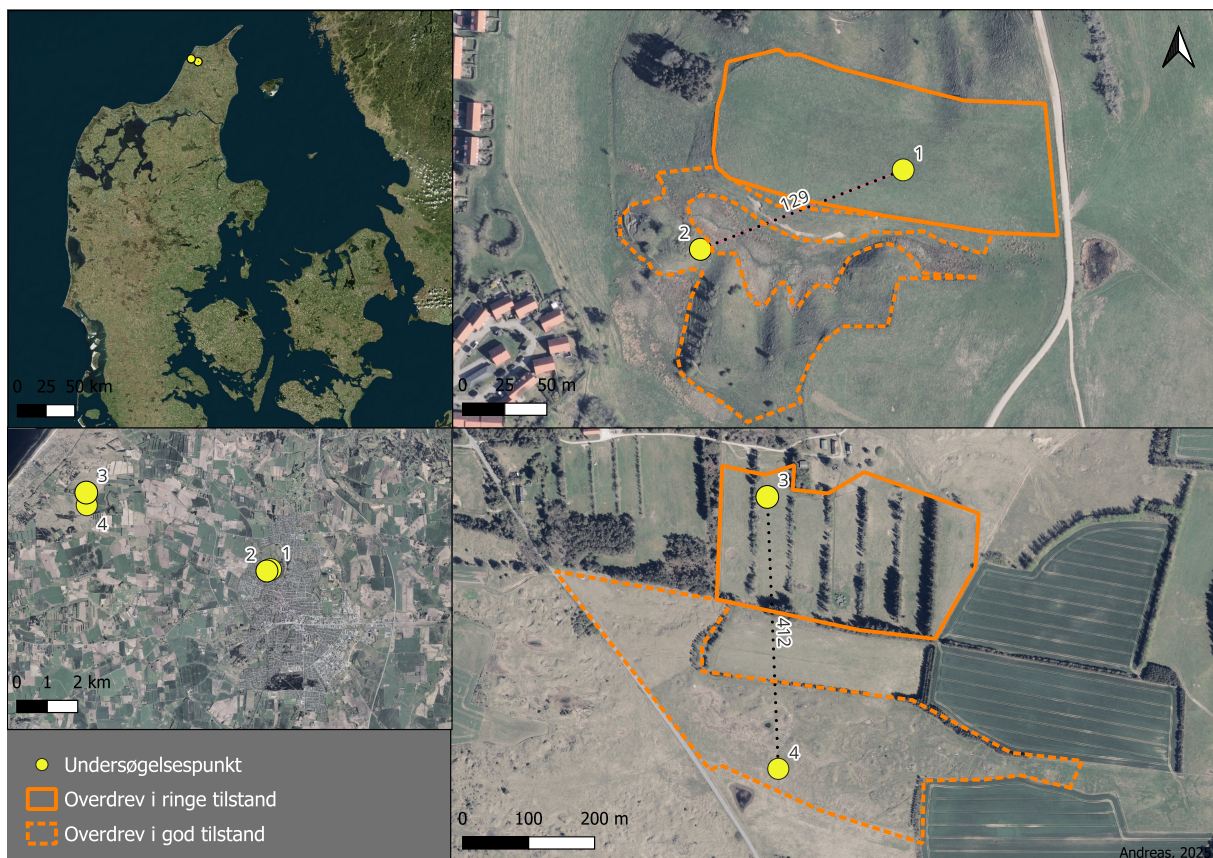
Figur 3.1. Flowdiagram fra indsamlingen af feltprøverne til nanopore sekvenseringen.

3.1 Undersøgelsesområder

De to udvalgte områder ligger hhv. i Hjørring ($57^{\circ}28'16.8''\text{N}$ $9^{\circ}58'42.4''\text{E}$) og Nørlev ($57^{\circ}29'45.4''\text{N}$ $9^{\circ}52'43.7''\text{E}$) i Nordjylland (Figur 3.2). Alle overdrev udvalgt i undersøgelsen er af §3 undertypen surt overdrev (naturkode 6230) (Appendiks 7.3). Det er formålet at udvælge overdrev der repræsenterer hver sin biologisk værdi, fordi der dermed kan undersøges hvordan tilstanden af overdrevet påvirker leddyrartsrigdommen og plante-leddyr interaktionsstrukturen.

Områderne er derfor udvalgt på baggrund af deres artsindeks, fra deres seneste besigtigelse, da denne afspejler den nuværende biologiske værdi [Fredshavn et al., 2018]. Det er desuden praksis i Hjørring Kommune at bruge artsindekset i sagsbehandlingen, som proxy for naturtilstanden, da artsindekset er relativt stabil over tid sammenlignet med strukturindekset, som kan variere fra år til år afhængig af driftspraksis (Laus Gro Nielsen, pers.kom. Hjørring Kommune).

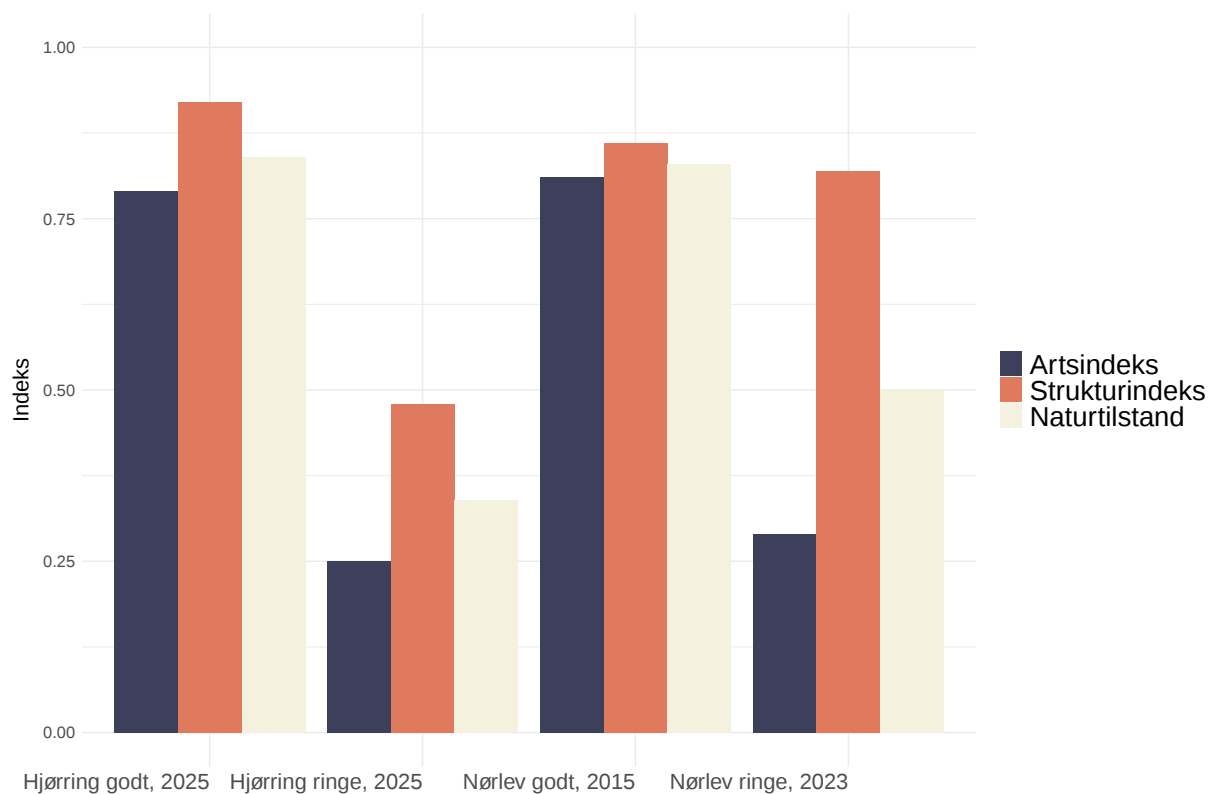
I Hjørring er der 129 meter imellem hvert undersøgelsespunkt, og i Nørlev er der 412 meter i mellem hvert undersøgelsespunkt (Figur 3.2). I rapporten betragtes Hjørring overdrevene som overdrev der ligger tæt på hinanden og Nørlev overdrevene betragtes som overdrev der ligger længere fra hinanden.



Figur 3.2. Oversigtskort over de fire overdrev hhv. i Hjørring og Nørlev. De gule punkter er områderne hvor indsamlingen af blomsterhoveder blev foretaget (Hjørring: pkt 1 + 2 og Nørlev: pkt 3 + 4). Den sorte stiplede linje er afstanden mellem punkterne i meter. Ortofoto: Forår 2025 fra Dataforsyningen [Geodanmark, 2020].

3.1.1 Artsindeks

Søjlediagrammet (Figur 3.3) viser artsindeks, strukturindeks og naturtilstandsværdierne fra områdernes seneste besigtigelser. Her ses artsindeks værende lave for de to overdrev i ringe tilstand, mens de to overdrev af bedre kvalitet er i enten høj eller god tilstandsklasse.



Figur 3.3. Histogram af artsindeks, strukturindeks og naturtilstands på tværs af de 4 udvalgte overdrev. Værdierne kommer fra områdets seneste besigtigelse i hhv. 2025, 2015 og 2023 (Appendiks 7.3). Prædikaterne *ringe* og *godt* henviser til et høj artsindeks (godt) eller et lavt artsindeks (ringe).

3.1.2 Overdrevenes driftshistorik

Ejerskabs- og driftshistorikken varierer mellem lokaliteterne. For Nørlev gælder det, at området ejes dels af Hjørring Kommune og dels af en privat lodsejer. Overdrevet i ringe tilstand har været opdyrket fra midten af 90'erne til 2012 til græsproduktion, med omlæggelse, gødskning og sprøjtning årligt (Appendiks 7.5) (Laus Gro-Nielsen, pers. kom., Hjørring Kommune). Overdrevet har siden 2012 ikke været dyrket, og afgræsses i dag af heste, der blev tilskudsfodret indtil 2020 (Laus Gro-Nielsen, pers. kom., Hjørring Kommune). Overdrevet i god tilstand er en del af et større fredet område, *Skallerup indlandsklit*. Et område som har været fredet siden 1963 og overdrevet har derfor ikke været dyrket siden da [Fredningsnævnet for Nordjylland, 1963]. Overdrevet afgræsses i dag af køer (Laus Gro-Nielsen, pers. kom., Hjørring Kommune).

I Hjørring er de to overdrev en del af større bynært naturområde, Hjørring bjerge [Hjørring Kommune, 2021]. Overdrevet i ringe tilstand har været opdyrket mark indtil 2019, men bliver nu græsset af køer. Området bærer i dag tydelige spor af den tidligere landbrugsdrift. Nedenfor de tidligere marker på skrænter ligger overdrevet i god tilstand. De har været uopdyrkelige og naturen har derfor stået uberørt i lang tid [Hjørring Kommune, 2021].

Antallet af blomstrende urtearter varierede ikke markant mellem overdrevene ved feltindsamlingen i august 2025, hvilket nok skyldes indsamlingstidspunktet. Forventningen vil være at antallet af forskellige urtearter vil være højere for de gode overdrev sammenlignet med de ringe overdrev, hvis indsamlingen foregik tidligere på sæsonen. Denne forskel kan også ses i artslisten i besigtigelserne Hjørring godt og Hjørring ringe, som blev foretaget i juni 2025 (Appendiks 7.3.1, 7.3.2).

Tabellen (3.1) viser en opsummering af relevante ligheder og forskelle mellem overdrevene.

	Hjørring godt	Hjørring ringe	Nørlev godt	Nørlev ringe
§3 - undertype (6230)	Surt overdrev	Surt overdrev	Surt overdrev	Surt overdrev
Artsindeks	0,79	0,25	0,81	0,29
Naturtilstandsklasse	God	Ringe	Høj	Ringe
Urter ved besigtigelser	29 (juni 2025)	16 (juni 2025)	15 (juli 2015)	7 (juni 2023)
Urter ved feltindsamling	14	11	13	10
Drift	Ikke tidligere dyrket. Afgræsses af køer.	Dyrket indtil 2019. Afgræsses af køer.	Ikke dyrket siden 1963. Afgræsses af køer.	Dyrket indtil 2012. Afgræsses af heste.

Tabel 3.1. Sammenligning af overdrev med hensyn til naturtype, artsindeks, tilstandsklasse, antallet af blomstrende urter (registreret i august 2025) samt driftspraksis [Hjørring Kommune, 2021]. Informationen er hentet fra besigtigelserne (Appendiks 7.3). Dyrket skal forstås som dyrkelse af afgrøder med gyllespredning og maskinkørsel.

3.2 Fremgangsmåde

3.2.1 Indsamling af feltprøver

Med udgangspunkt i undersøgelsesfeltet fra besigtigelserne, blev der indsamlet blomsterhoveder fra alle blomstrende urter der var tilstede i august 2025 (pkt 1: 57°28'19.9308"N 9°58'44.4216"E, pkt 2: 57°28'18.5556"N 9°58'37.0236"E, pkt 3: 57°29'44.7288"N 9°52'43.1112"E, pkt 4: 57°29'31.2792"N 9°52'43.5864"E) (Figur 3.2).

Der blev plukket mindst 10 blomsterhoveder fra hver planteart med sterile og UV-behandlede nitrilhandsker. Blomsterhovederne fra en given plante blev overført til et 15 mL sterilt Greinerrør i et forsøg på at dække den interne variation mellem individuelle blomster. Blomsterhovederne kom fra et varierende antal individer, da nogle urter havde mange blomsterhoveder, mens andre havde få. Der blev for hver art indsamlet mindst 10 mL løst pakket plantemateriale for at sikre at både små og store blomsterhoveder bidrog med en sammenlignelig mængde plantemasse. Blomsterne blev indsamlet med udgangspunkt i centrum for besigtigelsens undersøgelsesfelt (se overstående koordinater) og dækkede over et cirkelformet område med en radius på 50-75 m. Størrelsen af indsamlingsområdet varierede mellem lokationerne, for at sikre at der blev indsamlet nok plantemateriale. For at undgå krydskontaminering, blev indsamlingsområdet ikke betrædt før indsamling begyndte, samt blev der gjort brug af bestemte ruter for at undgå blomsterrige områder. Før indsamlingen, blev blomsterhovederne visuelt undersøgt for at sikre, at de ikke havde synlige leddyr på sig.

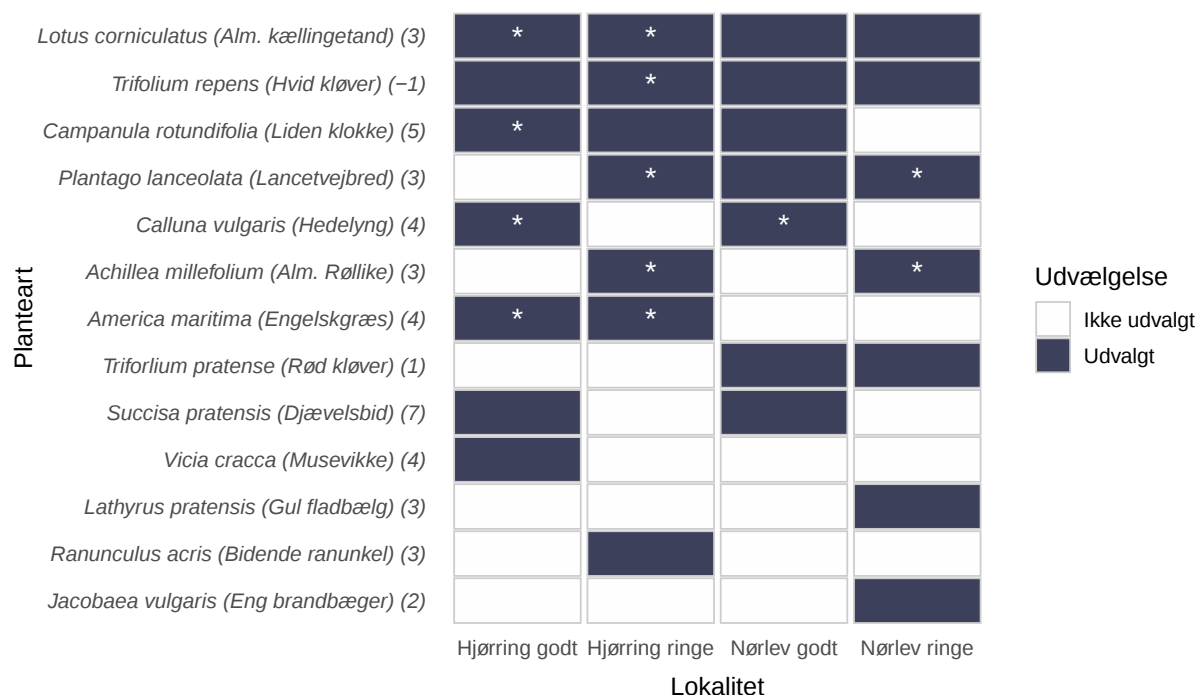
På hver lokation blev der lavet en fieldblank, for at kontrollere for kontaminering fra feltudstyr,

luftbårne partikler og DNA fra andre kilder end det undersøgte miljø. Dette blev gjort ved at bevæge et stykke sterilt og UV-behandlet filtermateriale på 7x7 cm gennem hele indsamlingsområdet i 10-15 cm højde over vegetationen. Efter indsamlingen blev prøverne med det samme lagt i en boks med kølelementer indtil hjemkomst hvor blev de opbevaret ved -18°C indtil DNA-ekstraktion.

3.2.2 Ekstraktion

Da artslisten af de indsamlede blomsterhoveder varierede mellem lokationerne, blev arter der forekom i flest mulige lokationer prioriteret over arter der kun forekom i en eller få lokationer. Det vil sige at ud af de blomsterhoveder der blev indsamlet i felten blev kun en mindre del udvalgt til ekstraktion af miljø-DNA, med prioritering af de plantearter der forekom i flest mulige overdrev samtidig. Dette blev gjort for at muliggøre en senere sammenligning mellem de samme arter på tværs af lokationer kunne finde sted (Figur 3.4). I figuren er artsscoren også fremvist for hver planteart. I alt blev 28 prøver analyseret parallelt med en field blank per lokation (32 i alt).

Ekstraktionen af DNA blev foretaget ved brug af Qiagen DNeasy ® Blood & Tissue Kit med mindre modifikationer. DNA-ekstraktionen blev foretaget over flere dage delt op i randomiserede grupper. For hver gruppe blev der udtaget en ekstraktionskontrol (i alt 5). Prøver blev inkuberet ved 56°C og 300 RPM i 3 timer under lysis. Det ekstraherede lysat volumen (500–1000 µL) varierede da plantearter med relativt store blomsterhovederne kunne suge mere væske til sig og resulterede i en mindre lysat volume efter inkubering. Derfor blev de prøver med meget lave lysat volumener, centrifugeret ved 4600g i 5 min, som dog ikke resulterede i en større lysat volume. Derfor blev den efterfølgende tilføjelse af ethanol og ATL buffer justeret for at opnå ækvivalente forhold for hver gruppering af prøverne. For at undgå mindst mulig krydskontaminering blev



Figur 3.4. Udvalgte planter for hver lokation. Tallene i parentes ud for hver planteart angiver artscoren [Fredshavn & Ejrnæs, 2009] * markerer at arten også er fundet i artslisten fra besigtigelsen for hver af overdrevene (Appendiks 7.3)

mængden af lysat-mixturen, der skulle vaskes igennem membranfiltret, justeret ned fra 700 µL til 600 µL, da lågene på rørene kunne sprøjte væske op ved lukningen af dem. DNA ekstraktionerne, med en endelig volumen på 50 µL, blev opbevaret ved -18 °C.

Efterfølgende blev prøverne delt op i 3 tekniske replikater.

3.3 Metabarcoding

Efter ekstraktionen af DNA'et er målet nu at amplificere en bestemt region af DNA'et, for at kunne artsbestemme DNA prøverne. Den region der amplificeres afgøres af valget af primeren. Primeren består af en kendt DNA sekvens på omkring 20 bp og det er DNA sekvensen mellem de to primerpar som er regionen der kaldes amplikonet. Denne region skal være identisk mellem arter, men variabel nok til at adskille arter [Ruppert et al., 2019]. En sådan region er COI gen regionen, som er en særlig konserveret protein-kodende region i det mitokondrielle genom i dyr. Folmer et al. [1994] viste at variationer i COI genets positioner af nukleotider kan bruges til at skelne mellem nært beslægtede arter på tværs af invertebrater, herunder leddyr (Arthropoda) [Folmer et al., 1994].

Amplificering foregår via en proces, kaldet *polymerase chain reaction* (PCR). PCR er en cyklus og består af en denaturering, annealing og elongering. Ideen er at udnytte DNA-polymerase til at kopiere en bestemt DNA-sekvens gennem gentagne cyklusser. Den dobbeltstrengede DNA sekvens opvarmes og denatureres til enkeltstrengt DNA. I annealing (temperaturen nedsættes) vil de to tilsatte primere binde sig til de to originale DNA streng, der løber i hver sin retning, og påbegynde en ny komplementær DNA streng. I elongeringsfasen hæves temperaturen, hvor DNA-polymerase binder sig til primerne og bygger videre på den komplementære DNA streng ift. den originale DNA streng. DNA-polymerasen bygger videre så længe temperaturen forbliver konstant eller når enden af amplikonet og indtil temperaturen hæves igen til den anden cyklus, hvor denaturering igen begynder. Dette resulterer i en eksponentiel stigning af kopier af de ønskede sekvenser [Khehra et al., 2025].

3.3.1 PCR amplifikation

Før amplifikation blev DNA koncentrationen i alle ekstrakter kvantificeret ved brug af Qubit dsDNS HS kit på en Qubit® 3.0 Fluorometer (Thermo Fischer Scientific, MA, USA). Prøverne >5 ng/ µL blev fortyndet ned til 5 ng/ µL før amplifikation. Amplifikation blev udført jf. protokollen (Appendiks 7.2).

Primerparret fwhF2 -min og fwhR2n-min F: 5'-GGDACWGGWTGAACWGTWTAYCCHCC - 3'; R: 5'- GTRATWGCHCCDGCTARWACWGG-3'; blev udvalgt på baggrund af Elbrecht et al. [2019], fordi den er ideel til at amplificere degraderede DNA fragmenter fra terrestriske leddyr. Dette primer par er også jævnlgt brugt i lignende studier [Kestel et al., 2023; Newton et al., 2024] og amplificere et 205 bp fragment fra cytochrome c oxidase I (COI) gen region. Primeren blev mærket med en nanopore adapterer, for senere at kunne tilføje unikke barcoding sekvenser.

Der blevet lavet en master mix, bestående af PCRBIO 2x Ultramix, primer working solution (400 nM) og nuklease frit vand. 2 µL af DNA ekstraktionen blev tilført med PCR pladen med mastermixen. Her blev der også tilføjet 4 positive og 4 negative kontroller, fordelt rundt på PCR pladen. De positive kontroller består af ekstraheret DNA fra *Coccinella transversoguttata*, *Delia*

fabricii, *Pegomya sp.*, *Ichneumon natobilis*, *Botanophila profuga* med en koncentration på 1 ng/ μ L pr art og delt op i fire replikater. For at kontrollere for evt. kontaminanter af reagenser, proces eller udstyr var 4 negative kontroller inkluderet i analysen, bestående af UV-behandlet 2 uL nuklease fri vand.

PCR cyklusserne foregik på VWR®[®], Thermal Cyclers, UNO96 (Avantor, PA, USA) og forløb således:

- 95 °C i 10 min (initiale denaturering).
- 35 cyklusser af; 95 °C i 30 sek (denaturering).
- 50 °C i 30 sek (annealing),
- 72 °C i 1 min og 30 sek (elongering).
- Den sidste elongering var på 72 °C i 10 min.

Efterfølgende blev amplikonet oprenset med beads. Kvantificeringen af amplikon blev udført gennem koncentrationsmåling ved Quibit og udvalgte prøver ($n = 6$) fik yderligere undersøgt længden af amplikon fragmenterne ved brug af en D1000 screen tape på en TapeStation 4150 (Agilent Technologies, CA, USA) (Appendiks 7.2 for protokol til brug af tapestation).

3.3.2 Library preparation og sekvensering

Denne del af metabarcoding består af at klargøre DNA fragmenterne til sekvensering. Det første trin er få prøverne igennem anden runde af PCR, kaldet PCR barcoding. PCR barcoding indebærer, at hver prøve får tilføjet en unik DNA-stregkode (barcode) via primers. Under PCR bliver både den målrettede DNA-sekvens og den unikke barcode amplificeret, hvilket gør det muligt at identificere og adskille prøverne efter sekvensering.

Det efterfølgende trin, end-prep, er for at fosforylere 5' enden og tilføje en A nukleotid til 3' enden (dA-tailed ends) af DNA fragmenterne. Dette gøres for at adapterne kan binde sig til DNA fragmenterne ved adapter ligering. Adapterne muliggør binding af et motor protein, som sikrer en ensrettet forskydning af nukleotiderne i nanoporen. Desuden binder adaptoren sig til kæder (tethers) ved nanoporen og placerer DNA-fragmenterne tæt ved nanoporen [Jain et al., 2016; Reuter et al., 2015].

Når prøverne er klargjort skal de sekvenseres ved at føre DNA-fragmenterne igennem en Nanopore. Det foregår ved, at et motor protein bryder dobbeltbindingen af dobbeltstrenget DNA til en enkeltstrenget, for at kunne passere igennem nanoporen - først for den ene streng dernæst for den komplementære streng. I nanoporen flyder en ionisk strøm, som ændres alt efter hvilket nukleotid der passer igennem nanoporen. Disse signalændringer i strømmen detekteres af en sensor, som registrerer varigheden, amplituden og variansen af signalet. Disse signaler bliver afkodet af *basecalling* algoritmer til sekvenser af baser af programmet Dorada [Jain et al., 2016; Oxford Nanopore Technologies plc, nd].

3.3.3 Library preparation

De efterfølgende trin inden sekvenseringen blev udført jf. Ligation sequencing V14 - PCR Barcoding (SQK-LSK114 with EXP-PBC096) med mindre modifikationer. Trin 4 og 5 under *Library preparation* blev forbigået. Prøverne blev fortyndet ned til 200 fmol til en volume på 20 μ L for at gøre klar til den efterfølgende barcoding. Til mastermixen blev der brugt 25 μ L

PCRBIO 2X i stedet for LongAmp Hot Start Taq 2X Master Mix (NEB, M0533). Derfor blev PCR cyklusserne også ændret til:

- 94 °C i 3 min (initiale denaturering).
- 18 cyklusser af; 94 °C i 15 sek (denaturering).
- 56 °C i 15 sek (nedkøling), 72 °C i 1 min (elongering).
- Den sidste elongering var på 72 °C i 10 min.

Dette blev efterfulgt af et purification step med 0,8x volumen af AMPure XP beads. Dertil kvalitetstjekkes prøverne ved Quibit og Tapestation. Efterfølgende blev prøverne fortyndet og sammenlagt til 50 µL, dog blev prøverne fortyndet ned til 789,9 ng fremfor protokollens foreskrevne 1000 ng. Den sammenlagte prøve består af tre tekniske replikater af hver blomsterprøve ($n = 84$), ekstraktions- ($n = 2$), positive- ($n = 2$) og negative kontroller ($n = 4$). *Final library* er på 12 µL. (0,818 µL prøve med 11,182 µL).

Efterfølgende blev *Final library* tilføjet en flowcell (MinION, Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK).

3.3.4 Data processing og bioinformatik

Kvalitetsfiltrering af sekvenser

Det råsekvenseringsdata blev generet og demultiplekseret ved basecalling under sekvenseringen, ved brug af Dorado v.0.6.0 (<https://github.com/nanoporetech/dorado>). De demultiplekserede data gennemgik efterfølgende kvalitetskontrol i NanoPlot v1.38 og blev filtreret til den forventede længde interval (200-300 bp) med NanoFilt v2.6.0 [De Coster et al., 2018] ved brug af en minimum q-score på 20. Primere blev fjernet og sekvenserne blev formateret til efterfølgende analyse i VSEARCH.

OTU dannelse og taksonomi tildeling

De filtrerede reads blev efterfølgende denoised og samlet i klynger af operationelle taksonomiske enheder (OTU'er), med en 97% sekvensenssimilaritet med VSEARCH v2-13-4 (Rogers et al 2016). OTU'er med under 8 reads blev filtreret fra. OTU'erne blev tildelt taksonomi med BLAST v2.2.0 (Altschul et al 1990) via databasen Barcode of Life Data Systems (BOLD) [Ratnasingham & Hebert, 2007]. Taksonomi blev kun tildelt OTU'er med mindst >97% sekvenslighed og 60% dækning af DNA-fragmenterne [Zenker et al., 2020]. Taksonomi tildelingen er således kun på artsniveau.

Eksklusion af kontaminanter og ikke-leddyr OTU'er

For at producere et konservativt estimat af diversiteten opnået gennem taksonomi tildeling til OTU'erne, blev OTU'er under 50 reads ekskluderet fra. Prøven med Liden klokke fra det gode overdrev i Nørlev blev ekskluderet fra analysen på grund af en formodet kontaminering. OTU'er der ikke tilhørte rækken *Arthropoda* blev filtreret fra. De bestod primært af svampe. Dertil blev slægterne *Odontothrips loti*, *Nabis limbatus*, *Depressaria depressana* fjernet fra OTU tabellen, da de var formodede kontaminanter fra ekstraktions kittet.

Filtrering af ikke-interaktioner

For at sikre, at kun DNA-sekvenser med reel interaktion med planterne blev inkluderet, blev alle reads, der havde et lavere antal end det, der blev fundet i field blank prøven for det pågældende område, sat til 0. Dette fjernede potentiel baggrundsstøj.

For at undgå bias i læsningen af DNA-mængder (abundans bias) blev antallet af reads konverteret til tilstede/ikke-tilstede (presence/absence). Et taxon blev registreret som tilstedeværende, hvis der var mindst én read i to tekniske replikater. Omvendt blev et taxon registreret som fraværende, hvis der var nul reads i mindst to tekniske replikater.

3.3.5 Rarefaction analyse

For at verificere sekvenseringsdybden blev rarefactions kurver dannet. De viste at sekvenseringsdybden var tilstrækkelig, da kurverne observeres til at være asymptote (Appendiks 7.1).

3.3.6 Konvertering af OTU'er til arter

For at opnå en meningsfuld konvertering er OTU'er med identisk taksonomi blevet aggregeret. Denne fremgangsmåde gør det mere hensigtsmæssigt at arbejde på artsniveau frem for at skelne mellem underarter, der kun adskiller sig ved mindre variationer i DNA-sekvensen (Appendiks 7.1).

3.4 Statistik

Alle statistiske og visuelle analyser blev udført i R (v.4.5.1) [R Core Team, 2020] med brug af pakkerne Ampvis2 (v.2.8.11) [Andersen et al., 2018], vegan (v.2.7.2) [Oksanen et al., 2025], bipartite (v.2.23) [Dormann et al., 2007], ggplot2 (v.4.0.1) [Wickham et al., nd], devtools (v.2.4.6) [Wickham et al., 2025b], dplyr (v.1.1.4) [Wickham et al., 2025a], tidyr (v.1.3.1) [Wickham et al., 2025c], rcompanion(v.2.5.0) [Mangiafico, 2025] og tibble (v.3.3.0) [Müller & Wickham, 2025]. R koden brugt i analysen er uploadet til github [Andersen, 2025].

For at undersøge forskelle i artsrigdommen af leddyrarter mellem overdrevene er der foretaget en non-parametrisk Kruskal-Wallis test, da antagelser om normalitet ikke blev mødt. For at yderligere undersøge hvordan flere faktorer som tilstand og planteart havde indflydelse på antallet af interaktioner, blev der foretaget en non-parametrisk Scheirer Ray Hare test [Mangiafico, nd].

For at undersøge om afstanden har betydning i en forskel i artssammensætningen af leddyr mellem overdrevene blev et Principal Component Analyses generet med funktionen amp-ordinate og R-pakken vegan og visualiseret i et biplot ved brug af R-pakken ggplot2. PCA biplottet er baseret på binominalt data for antallet af forskellige interaktioner af leddyr. Endvidere for at undersøge dissimilariteten mellem artssammensætningen af leddyr mellem overdrevene blev den inverse version af Sørensens indeks brugt. Nærmere bestemt blev den binominale version af bray indekset, som er identisk med den inverse version af Sørensens indeks, brugt fra funktionen vegdist fra R-pakken vegan, $\frac{A+B-2J}{A+B}$ [Oksanen et al., nd]. Der er desuden udregnet et gennemsnit af den interne dissimilaritet af alle indeksværdierne for de parvise sammenligninger mellem planterne i hhv. Hjørring og Nørlev.

For at undersøge relationen mellem Artsscore og antal leddyrarter, er der lavet et jitterplot ved brug af R-pakken ggplot2, for at visualisere eventuelle sammenhænge. En Kruskal-Wallis test blev foretaget for at undersøge for eventuelle signifikante forskelle i antal leddyrarter mellem artsscorekategorierne.

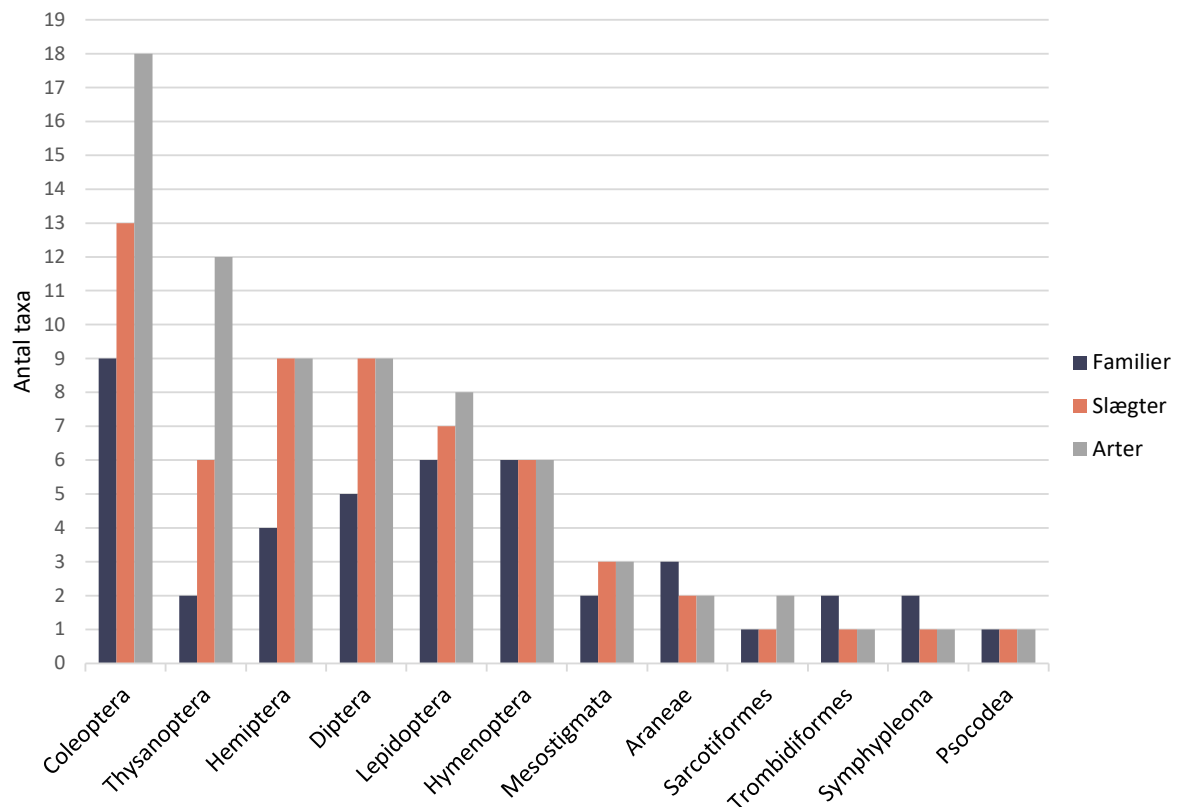
For at visualisere interaktioner mellem leddyr og planter, blev et interaktionsnetværk, bipartite plot, genereret gennem R-pakken bipartite. Derudover blev forskellige indekssværdier for interaktionsnetværkene udregnet, herunder Connectance ($\frac{L}{S^2}$) og Robustness. Robustness blev udregnet på baggrund af en arts udryddelses kurve ved brug af funktionen second.extinct, hvor der blev fjernet leddyr i tilfældig rækkefølge ved 100 gentagelser.

Resultater 4

4.1 Fordeling af arter mellem overdrevene

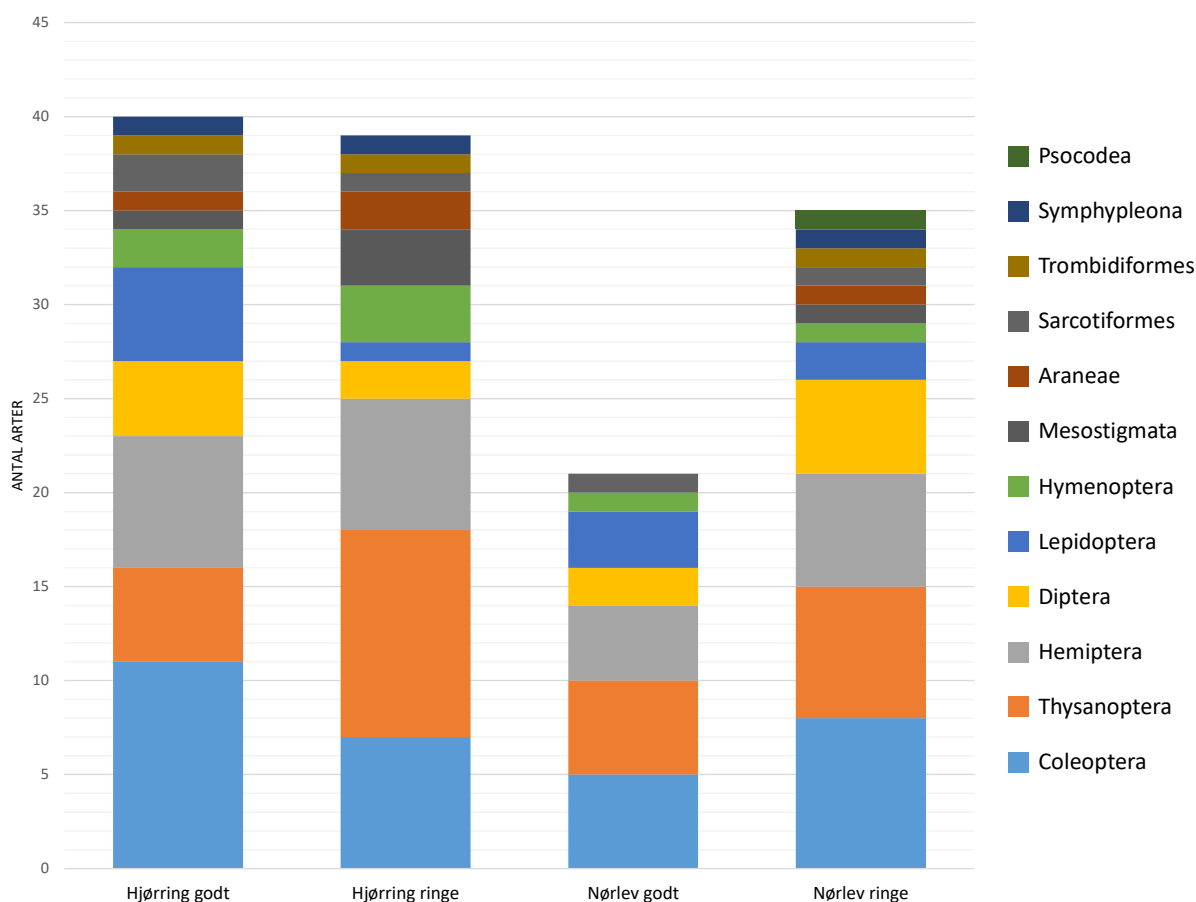
Resultaterne viser interaktioner fordelt på 27 prøver fra i alt fire overdrev (Hjørring godt, Hjørring ringe, Nørlev godt, Nørlev ringe) (Figur 3.2). I alt blev 387 OTU'er identificeret, hvilket resulterede i 72 unikke arter (Appendiks 7.1). De 72 arter fordeler sig på 11 forskellige ordner, 43 familier og 50 slægter (Figur 4.1). 2/3 dele af arterne er fordelt på ordnerne Coleoptera, Thysanoptera, Hemiptera, Diptera. Den mest familierige og artsrige orden er Coleoptera og den næstmest artsrige orden er Thysanoptera. Den mest artsrige familie er familien Thripidae. Kun 12 ud af de 72 arter er rødlistet vurderet [Aarhus Universitet, 2024], og der ikke denne ikke undersøgelse ikke fundet nogen truet danske leddyrarter.

Betegnelserne Hjørring godt og Nørlev godt i søjlediagrammet, bruges igennem hele resultatafsnittet og refererer til overdrev i hhv. Hjørring og Nørlev med et højt artsindeks. Hjørring ringe og Nørlev ringe refererer til overdrev i hhv. Hjørring og Nørlev med et lavt artsindeks.



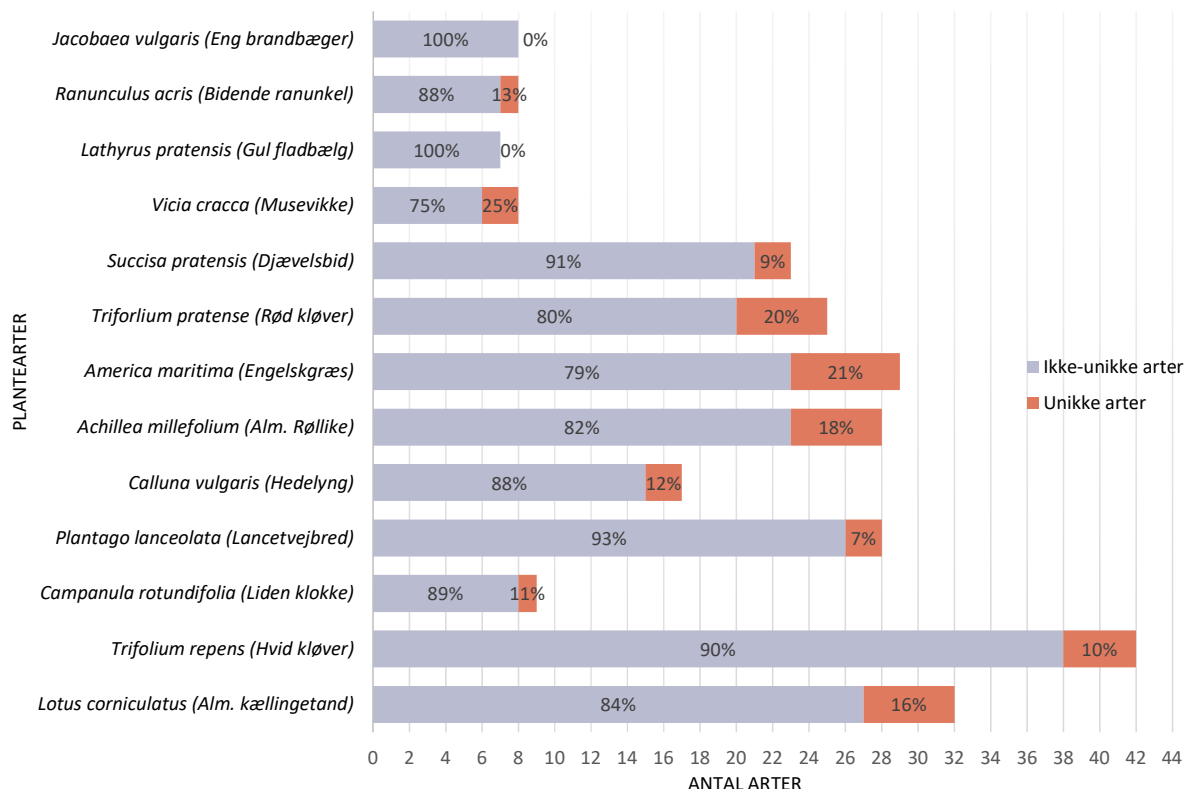
Figur 4.1. Søjlediagram der viser antallet af forskellige familier, slægter og arter inden for de 11 ordner.

For at få et indblik i hvordan arterne fordeler sig i ordnerne i de fire overdrev, er der vist et gruppéret søjlediagram som viser det samlede artsantal for hvert overdrev og hvordan artsrigdommen er sammensat taksonomisk (Figur 4.2). Der ses nærmest ingen forskel i den samlede antal arter for overdrevene i Hjørring. Derimod ses der større forskel i det samlede antal arter for overdrevene i Nørlev, hvor Nørlev ringe indholder flere arter og arter fra ordner som ikke er tilstede i Nørlev godt.



Figur 4.2. Søjlerne viser antal arter inden for 11 ordner fordelt på de fire overdrev. Hjørring godt og Nørlev godt er overdrev med et højt artsindeks. Hjørring ringe og Nørlev ringe er overdrev med et lavt artsindeks.

Søjlediagrammet viser fordelingen af leddyrarter på tværs af plantearter og illustrerer, hvor stor en andel af disse arter der er unikke for den enkelte planteart (Figur 4.3). En art betragtes som unik, hvis den kun forekommer på en planteart på tværs af alle overdrev hvordan arterne fordeler sig på tværs af plantearterne og hvor mange arter der er unikke for den planteart. Søjlediagrammet giver et overblik over graden af værts-specialisering og artsoverlap mellem plantearterne og tydeliggør hvilke plantearter som tiltrækker flest unikke arter. Rød kløver, Engelskgræs og Musevikke er de plantearter som tiltrækker flest unikke arter, mens Gul fladbælg og Eng brandbæger ikke tiltrækker nogen unikke arter. Søjlediagrammet kan dog skjule lokale forskelle i fordelingen af arter på plantearterne indenfor samme overdrev. Derfor er der også lavet et søjlediagram for andelen af leddyrarter på hver planteart indenfor samme overdrev, og som illustrerer hvor stor en andel af disse arter der er unikke for den enkelte planteart (Appendiks 7.7).



Figur 4.3. De lyseblå søjler repræsenterer leddyrarter, der deles med andre plantearter (ikke-unikke arter), mens de orange søjler viser antallet af leddyrarter, der er unikke for den pågældende planteart. I søjlerne er der angivet den procentvise andel af den samlede antal leddyrarter, der er tilknyttet hver planteart.

4.1.1 Artsrigdommen i gode vs. ringe overdrev

For at kunne besvare hypotese 1 - *Overdrev i en god tilstand vil have en højere artsrigdom af leddyr på de udvalgte plantearter end overdrev i en ringe tilstand*, blev det undersøgt om der var en forskel i antallet af arter mellem overdrev i en god eller ringe tilstand. Da der ikke er fundet de samme planter i hvert overdrev, er det her valgt at undersøge forskellen i antal arter fordelt på de fire plantearter (Alm kællingetand, Hvid kløver, Liden klokke, Engelskræs), som Hjørring overdrevene har tilfælles. Ligeledes er det undersøgt mellem de fire plantearter (Alm kællingetand, Hvid kløver, Lancetvejbred, Rødkløver), som Nørlev overdrevene har tilfælles (Tabel 4.1). Undersøgelsen viser at overdrevene i ringe tilstand har en tendens til at have flere arter end overdrevene i god tilstand. Den største forskel vises mellem overdrevene i Nørlev. Kruskal-Wallis testen viste ingen signifikant forskel mellem overdrevene i Hjørring ($n = 8$, $\chi^2 = 0$, $df = 1$, $p = 1$). Samme resultat er gældende for forskellen i antal arter mellem overdrevene i Nørlev ($n = 8$, $\chi^2 = 1,37$, $df = 1$, $p = 0,24$).

Multivariat regressionsanalyse

Da antallet af arter er afhængig af flere faktorer som tilstand og planteart foretages en multivariat regressionsanalyse, her en non-parametrisk Scheirer Ray Hare test [Mangiafico, nd]. For begge områder fandtes ingen effekt af hverken tilstand, planteart eller tilstand x plante interaktionen på antallet af interaktioner (Tabel 4.2).

Tabel 4.1. Tabel for antallet af arter for hver plante pr område. P-værdierne er fra en Kruskal wallis test for forskellen mellem median af antal arter pr overdrev.

Planteart	Hjørring	Hjørring	Nørlev	Nørlev
	godt	ringe	godt	ringe
<i>Lotus corniculatus</i> (Alm. kællingetand)	4	11	7	10
<i>Trifolium repens</i> (Hvid kløver)	16	10	4	12
<i>Campanula rotundifolia</i> (Liden klokke)	4	7	-	-
<i>Plantago lanceolata</i> (Lancetvejbred)	-	-	9	10
<i>America maritima</i> (Engelskræs)	14	15	-	-
<i>Trifolium pratense</i> (Rød kløver)	-	-	13	12
Sum	38	43	33	44
Forskel mellem tilstande	p = 1		p = 0,24	

Tabel 4.2. Tabelværdier for multivariat regressionsanalysen (Scheirer Ray Hare) [Mangiafico, nd] for antal arter i overdrevene i Hjørring og Nørlev,

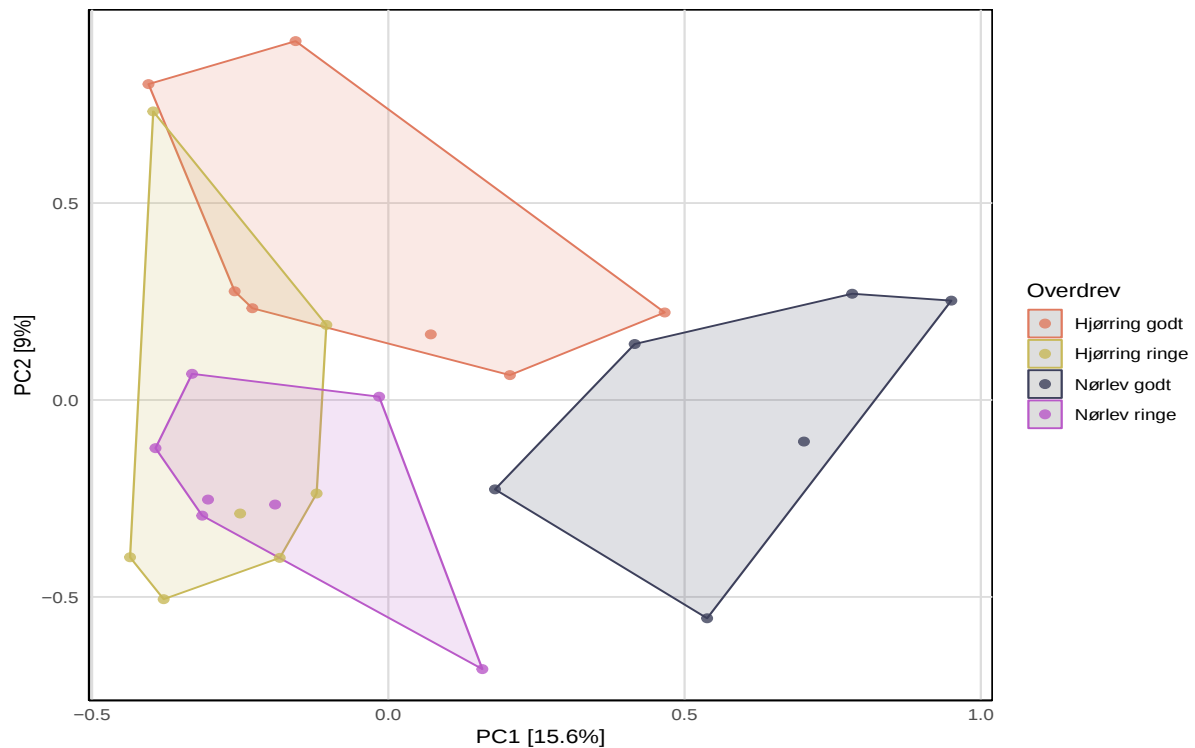
Hjørring			Nørlev	
Faktor	H-værdi	P-værdi	H-værdi	P-værdi
Tilstand	0,08	0,77	1,37	0,24
Planteart	4,34	0,23	3,50	0,32
Tilstand:planteart	2,57	0,46	2,13	0,55

4.1.2 PCA-biplot: Overlap og afstand mellem overdrev

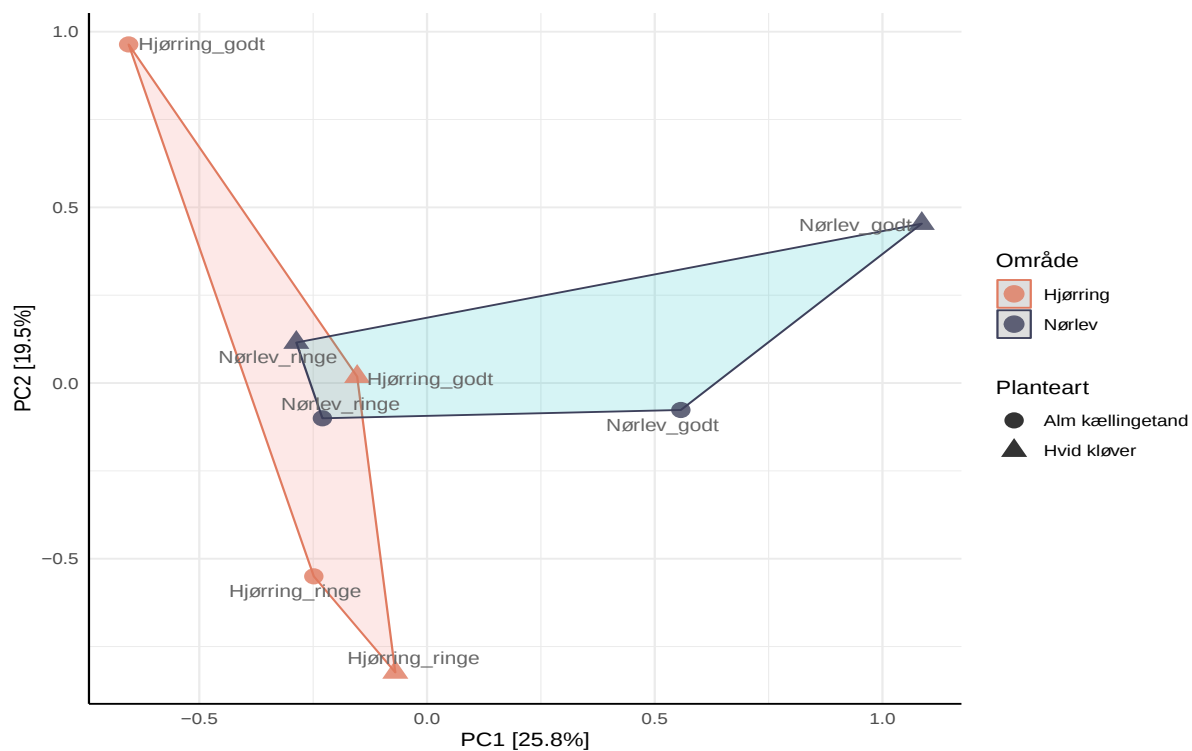
For at undersøge om afstanden mellem overdrevene i hvert område har betydning for forskelle i artspuljer af leddyrarter, er der indledningsvist lavet et PCA biplot der viser hvordan planterarterne for hvert overdrev gruppér sig (Figur 4.4). Der ses som det første at de to overdrev i Hjørring overlapper en smule, mens de to overdrev i Nørlev ikke overlapper. Dette kan indikere at den større afstand mellem overdrevene i Nørlev har betydning for forskellen mellem overdrevene. Samtidig ses der at det ringe overdrev i Nørlev overlapper med det ringe overdrev i Hjørring, mens de to gode overdrev ikke overlapper. Dette kan tyde på at de ringe overdrev minder mere om hinanden end de gode overdrev gør.

Dog er plantearterne ikke ens på tværs af overdrevene, hvilket kan skævvride de synlige forskelle mellem overdrevene. Derfor er der lavet et PCA plot med kun de to plantearter som alle overdrev har tilfælles (Figur 4.5). Her ses der først og fremmest at forskellen mellem det gode og ringe overdrev i Nørlev bedst forklares ved 1. akse, mens forskellen mellem det gode og ringe overdrev i Hjørring bedst forklares af 2. akse. Dette indikerer at forskellen på de gode og ringe overdrev mellem områderne ikke forklares af den samme kilde til variation. Der ses

også at artssammensætningen af leddyr på Hvid kløver i det gode overdrev i Hjørring minder om artssammensætningen af leddyr på Hvid kløver og Alm kællingetand i det ringe overdrev i Nørlev. Generelt ses der, at Hvid kløver og Alm kællingetands leddyrartssammensætning minder mere om hinanden i ringe overdrev, mens de er mere forskellige fra hinanden i gode overdrev.



Figur 4.4. PCA biplot, hvor i alt 24,6% af variansen er forklaret. Hvert punkt er en planteart fundet i de fire overdrev baseret på binormalt data af tilstedeværelsen af forskellige leddyr på planten. De fire overdrev er kategoriseret i farvet polygoner: Hjørring godt (rød), Hjørring ringe (gul), Nørlev godt (blå), Nørlev ringe (lyserød).



Figur 4.5. PCA plot, hvor i alt 45,3% af variansen er forklaret. Hvert punkt er enten Hvid kløver (trekant) eller Alm kællingetand (cirkel) og er enten fra et godt (Hjørring-/Nørlev-godt) eller ringe (Hjørring-/Nørlev-ringe) overdrev, baseret på binormalt data af tilstedeværelsen af forskellige leddyr på planten. De farvet polygoner markerer Hvid kløver og Alm kællingetand indenfor samme område, hvor Hjørring er rød og Nørlev er blå.

4.1.3 Sørensens dissimilaritetsindeks

For direkte at udregne dissimilariteten mellem artspuljerne for overdrevene, er der lavet en matrix (28x28) med parvise sammenligninger baseret på den inverse af Sørensen-similaritetsindeks, som måler forskelle i de leddyrarter, hver plante har (Figur 4.3, 4.4). Disse parvise sammenligninger afslører en række interessante tendenser.

Dissimilariteten mellem Hvid kløver og Alm kællingetand i det ringe overdrev i Hjørring er på 0,46, mens det mellem Hvid kløver og Alm kællingetand i det gode overdrev i Hjørring er på 0,71. Dette følger den beskrevne tendens at de ringe overdrev minder mere om hinanden end de gode overdrev, som ses på PCA biplottet (Figur 4.5). Det er modsat gældende i Nørlev, da dissimilariteten mellem de to plantearter i det ringe overdrev er på 0,50, mens det i det gode overdrev er på 0,37. I Nørlev er der altså en større forskel mellem arterne i det ringe overdrev end i det gode overdrev.

For at kunne svare på hypotese 2 - *Der vil være en højere dissimilaritet mellem leddyr arter mellem overdrev om ligger længere fra hinanden end tættere på hinanden*, er der i de markerede gule felter i tabellerne (Tabel 4.3, 4.4) vist at der for Hvid kløver er en noget nær ens dissimilaritet omend det er i Hjørring eller Nørlev. De markerede felter viser at der for Alm kællingetand i Hjørring er en dissimilaritet på 0,71, mens der for Alm kællingetand i Nørlev er en dissimilaritet på 0,38. Denne større forskel viser i modsætningen til Hvid kløver at dissimilariteten er større for områder tættere på hinanden end længere væk fra hinanden. Når man samtidig beregner gennemsnittet for den interne dissimilaritet for interaktionerne i Hjørring (0,63) og Nørlev (0,61) viser de en ens intern dissimilaritet, hvilket indikerer, at den geografiske afstand mellem overdrevene ikke i sig selv medfører en større intern dissimilaritet.

		Nørlev											
		Ringe						Godt					
Nørlev	R i n g e	Alm Røllike	Hvid kløver	Alm kællingetand	Rød kløver	Eng brandbæger	Gul fladbælg	Lancetvejbred	Alm kællingetand	Djævelsbid	Hvid kløver	Rød kløver	Lancetvejbred
		Alm Røllike			0.52	0.53	0.38	0.57	0.52	0.44	0.67	0.55	0.48
		Hvid kløver	0.61		0.50	0.52	0.52	0.38	0.50	0.50	0.70	0.68	0.53
		Alm kællingetand	0.52	0.50			0.41	0.50	0.33	0.38	0.68	0.65	0.50
		Rød kløver	0.53	0.52	0.48		0.50	0.52	0.55	0.48	0.77	0.67	0.45
		Eng brandbæger	0.38	0.52	0.41	0.50		0.52	0.41	0.39	0.64	0.60	0.52
		Gul fladbælg	0.57	0.38	0.50	0.52	0.52		0.50	0.50	0.68	0.73	0.54
		Lancetvejbred	0.52	0.50	0.33	0.55	0.41	0.50		0.46	0.68	0.65	0.56
		Alm kællingetand	0.44	0.50	0.38	0.48	0.39	0.50	0.46		0.52	0.37	0.29
		Djævelsbid	0.67	0.70	0.68	0.77	0.64	0.68	0.68	0.52		0.44	0.63
Hjør	G o d t	Hvid kløver	0.55	0.68	0.65	0.67	0.60	0.76	0.65	0.37	0.44		0.44
		Rød kløver	0.48	0.53	0.50	0.45	0.52	0.54	0.56	0.29	0.63	0.44	
		Lancetvejbred	0.56	0.67	0.64	0.72	0.68	0.73	0.57	0.50	0.39	0.24	0.47
		Hedelyng	0.64	0.76	0.83	0.75	0.70	0.88	0.83	0.58	0.44	0.25	0.52
		Lancetvejbred	0.48	0.47	0.57	0.72	0.60	0.55	0.43	0.58	0.57	0.52	0.60
		Bidende ranunkel	0.54	0.66	0.48	0.57	0.50	0.62	0.56	0.39	0.82	0.70	0.52
		Alm kællingetand	0.63	0.60	0.50	0.52	0.60	0.45	0.57	0.50	0.83	0.81	0.67
		Alm Røllike	0.51	0.60	0.68	0.64	0.60	0.63	0.63	0.53	0.76	0.68	0.60
		Engelsgræs	0.65	0.57	0.60	0.50	0.50	0.59	0.54	0.55	0.80	0.54	0.51
		Liden klokke	0.71	0.58	0.64	0.65	0.58	0.63	0.55	0.56	0.88	0.80	0.67
Nørlev	G o d t	Hvid kløver	0.63	0.60	0.57	0.66	0.52	0.64	0.50	0.50	0.83	0.81	0.67
		Musevlikke	0.67	0.63	0.60	0.54	0.64	0.47	0.68	0.62	0.80	0.67	0.48
		Hvid kløver	0.59	0.35	0.54	0.44	0.56	0.52	0.49	0.55	0.87	0.71	0.46
		Djævelsbid	0.56	0.59	0.57	0.58	0.47	0.55	0.57	0.52	0.63	0.60	0.49
		Hedelyng	0.61	0.59	0.56	0.45	0.59	0.62	0.63	0.50	0.56	0.52	0.41
		Engelsgræs	0.68	0.41	0.56	0.52	0.52	0.46	0.50	0.57	0.78	0.76	0.59
		Liden klokke	0.65	0.54	0.58	0.60	0.52	0.56	0.50	0.50	0.89	0.53	0.54
		Alm kællingetand	0.91	0.76	0.65	0.67	0.80	0.76	0.65	0.79	1.00	1.00	0.84

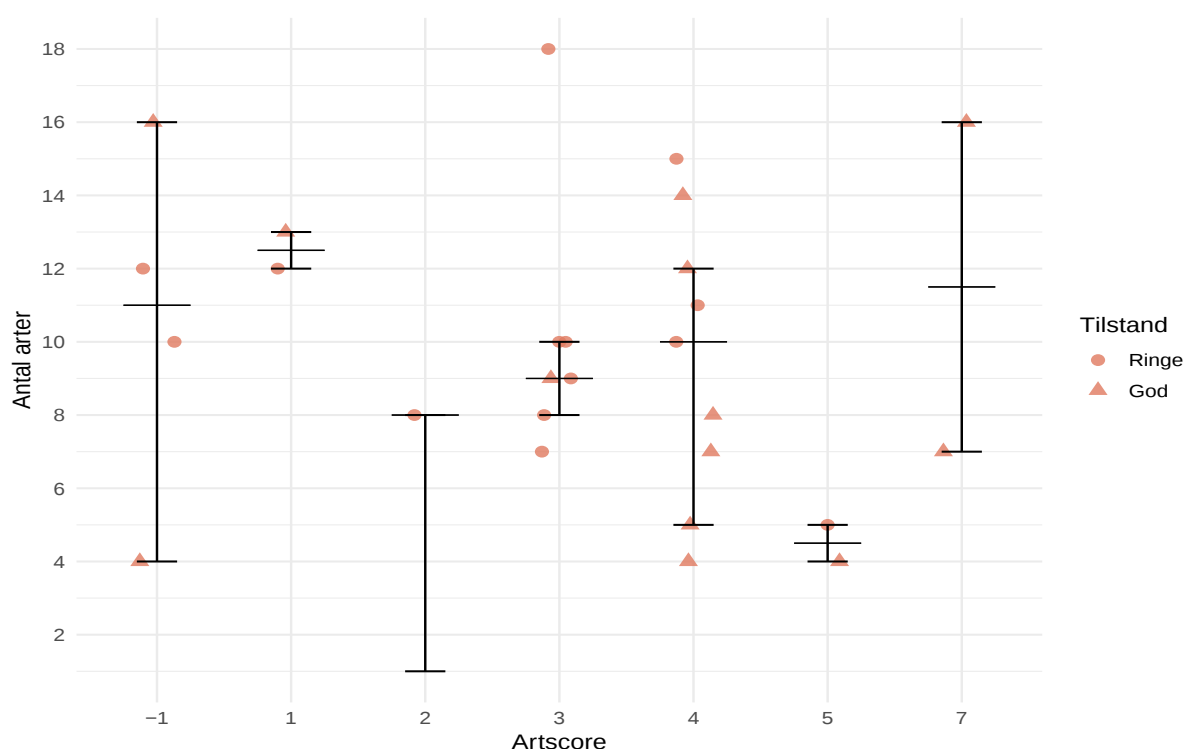
Tabel 4.3. Tabel med parvise Sørensen dissimilaritets indekstal. Her vist med kolonnenavnene for planter fundet i Nørlev. Rækker og kolonner indeholder plantenaavnene fundet i Hjørning og Nørlev. De gule felter markerer den parvise sammenligning mellem Alm kællingetand og Hvid kløver i hhv. Nørlev ringe og Nørlev godt. De røde nuancer markerer høje indekstal, mens de blå nuancer markerer lave indekstal.

		Hjørring													
		Ringe							Godt						
		Lancetvejbred	Bidende ranunkel	Alm kællingetand	Alm Røllike	Engelskgræs	Liden klokke	Hvid kløver	Musevikke	Hvid kløver	Djævelsbid	Hedelyng	Engelskgræs	Liden klokke	Alm kællingetand
N ø r l e v	R i n g e	0.48	0.54	0.63	0.51	0.65	0.71	0.63	0.67	0.59	0.56	0.61	0.68	0.65	0.91
	Hvid kløver	0.47	0.66	0.60	0.60	0.57	0.58	0.60	0.63	0.35	0.59	0.56	0.41	0.54	0.76
	Alm kællingetand	0.57	0.48	0.50	0.68	0.60	0.64	0.57	0.60	0.54	0.57	0.56	0.56	0.58	0.65
	Rød kløver	0.72	0.57	0.52	0.64	0.50	0.65	0.66	0.54	0.44	0.58	0.45	0.52	0.60	0.67
	Eng brandbæger	0.60	0.50	0.60	0.60	0.50	0.58	0.52	0.64	0.56	0.55	0.59	0.52	0.52	0.80
	Gul fladbælg	0.55	0.62	0.45	0.63	0.59	0.63	0.64	0.47	0.52	0.55	0.62	0.46	0.56	0.76
	Lancetvejbred	0.43	0.56	0.57	0.63	0.54	0.55	0.50	0.68	0.49	0.57	0.63	0.50	0.50	0.65
	Alm kællingetand	0.58	0.39	0.50	0.53	0.55	0.56	0.50	0.62	0.55	0.52	0.50	0.57	0.50	0.79
	Djævelsbid	0.57	0.82	0.83	0.76	0.80	0.88	0.83	0.80	0.87	0.63	0.56	0.78	0.89	1.00
	Hvid kløver	0.52	0.70	0.81	0.68	0.64	0.60	0.60	0.81	0.67	0.71	0.60	0.52	0.76	0.53
H j ø r r i n g	Rød kløver	0.60	0.52	0.70	0.60	0.51	0.67	0.67	0.48	0.46	0.49	0.41	0.59	0.54	0.84
	Lancetvejbred	0.38	0.68	0.85	0.72	0.70	0.70	0.77	0.74	0.76	0.60	0.53	0.73	0.64	1.00
	Hedelyng	0.62	0.80	0.90	0.81	0.71	0.87	0.90	0.78	0.79	0.67	0.36	0.84	0.76	1.00
	Lancetvejbred	0.52	0.52	0.62	0.56	0.58	0.60	0.62	0.74	0.58	0.66	0.60	0.60	0.64	0.90
	Bidende ranunkel	0.52	0.44	0.44	0.60	0.56	0.68	0.44	0.64	0.63	0.59	0.59	0.66	0.62	0.60
	Alm kællingetand	0.62	0.44		0.61	0.58	0.70	0.46	0.57	0.52	0.71	0.67	0.67	0.64	0.71
	Alm Røllike	0.56	0.60	0.61		0.49	0.67	0.67	0.70	0.58	0.69	0.70	0.60	0.69	0.81
	Engelskgræs	0.58	0.56	0.58	0.49		0.63	0.58	0.60	0.50	0.50	0.51	0.57	0.59	0.79
	Liden klokke	0.60	0.68	0.70	0.67	0.63		0.80	0.76	0.63	0.72	0.83	0.58	0.38	0.73
	Hvid kløver	0.62	0.44	0.46	0.67	0.58	0.80		0.74	0.64	0.66	0.73	0.73	0.73	0.81
G o d t	Musevikke	0.74	0.64	0.57	0.70	0.60	0.76	0.74		0.60	0.53	0.56	0.63	0.58	0.78
	Hvid kløver	0.58	0.63	0.52	0.58	0.50	0.63	0.60	0.80		0.52	0.57	0.41	0.52	0.71
	Djævelsbid	0.66	0.59	0.71	0.69	0.66	0.72	0.63	0.66	0.52		0.49	0.49	0.61	0.80
	Hedelyng	0.60	0.59	0.67	0.70	0.51	0.83	0.73	0.56	0.57	0.49		0.65	0.69	0.68
	Engelskgræs	0.60	0.66	0.67	0.60	0.57	0.58	0.73	0.63	0.41	0.49	0.65		0.54	0.76
	Liden klokke	0.64	0.62	0.64	0.69	0.59	0.38	0.58	0.73	0.52	0.61	0.69	0.54		0.65
	Alm kællingetand	0.90	0.60	0.71	0.81	0.79	0.73	0.81	0.78	0.71	0.80	0.68	0.76	0.65	

Tabel 4.4. Tabel med parvise Sørensens dissimilaritets indekstal. Her vist med kolonnenavne for planter fundet i Hjørring. Række og kolonner indeholder plantenaevne fundet i Hjørring og Nørlev. De gule felter markerer den parvise sammenligning mellem Alm kællingetand og Hvid kløver i hhv. Hjørring ringe og Hjørring godt. De røde nuancer markerer høje indekstal, mens de blå nuancer markerer lave indekstal.

4.1.4 Artsscoren og antal leddyrarter

For at besvare hypotese 3 - *En højere artsscore vil korrelere med et højere antal forskellige arter*, er der lavet et jitterplot, for visuelt at kunne undersøge hvordan artsscore korrelere med antal leddyrarter fundet på hvert plantearter indenfor artsscorekategorierne (Figur 4.6). Jitter plottet viser en høj varians af det totale antal leddyrarter indenfor hver kategori af artsscoren. Antallet af leddyrarter varierer mellem 4 og 18 og nogle artsscorekategorier som (1) og (3) har en mindre spredning af antallet af leddyrarter end andre, mens (-1) og (7) har en større spredning af antallet af leddyrarter. Djævelsbid med artsscoren (7) og Hvid kløver med artsscoren (-1) har begge et højt antal arter og en høj spredning indenfor samme interval (4-16). Denne ens spredning indenfor samme interval mellem den lavest rangerede og højst rangerede artsscore viser umiddelbart at artsscore alene ikke kan forudsige antallet af leddyrarter, samtidig viste Kruskal-Wallis testen ingen signifikant forskel mellem antallet af leddyrarter for hver artsscore ($n = 27$, $\chi^2 = 5,67$, $df = 6$, $p = 0,46$).



Figur 4.6. Jitter plot der viser antallet af leddyrarter fundet på plantearter med forskellige artsscore i overdrev med hhv. høj (trekant) og lav (cirkel) artindeks. Fordelingen er vist med median og CI 95 % ved bootstrap for hver artsscore.

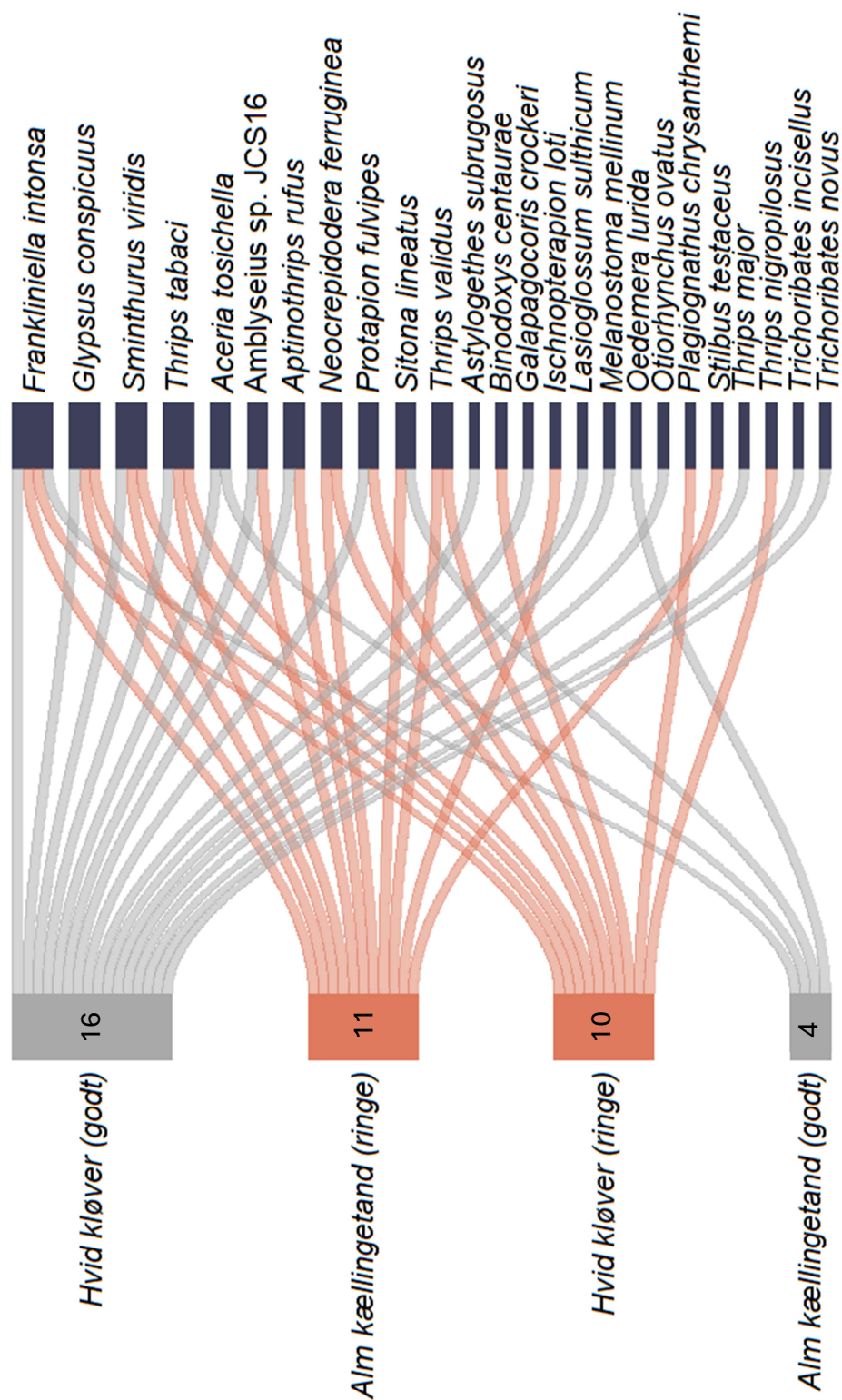
4.1.5 Interaktionsnetværk

For at kigge nærmere på hvilke leddyrarter der er fundet på Hvid kløver og Alm kællingetand i de fire overdrev, er der dannet interaktionsnetværk, der visualiserer interaktionen mellem disse plantearter og de detekterede leddyrarter (Figur 4.7, 4.8). Dernæst er der udregnet indekssværdier for disse netværk, herunder Connectance og Robustness, for at kvantificere netværkets forbundethed og stabilitet.

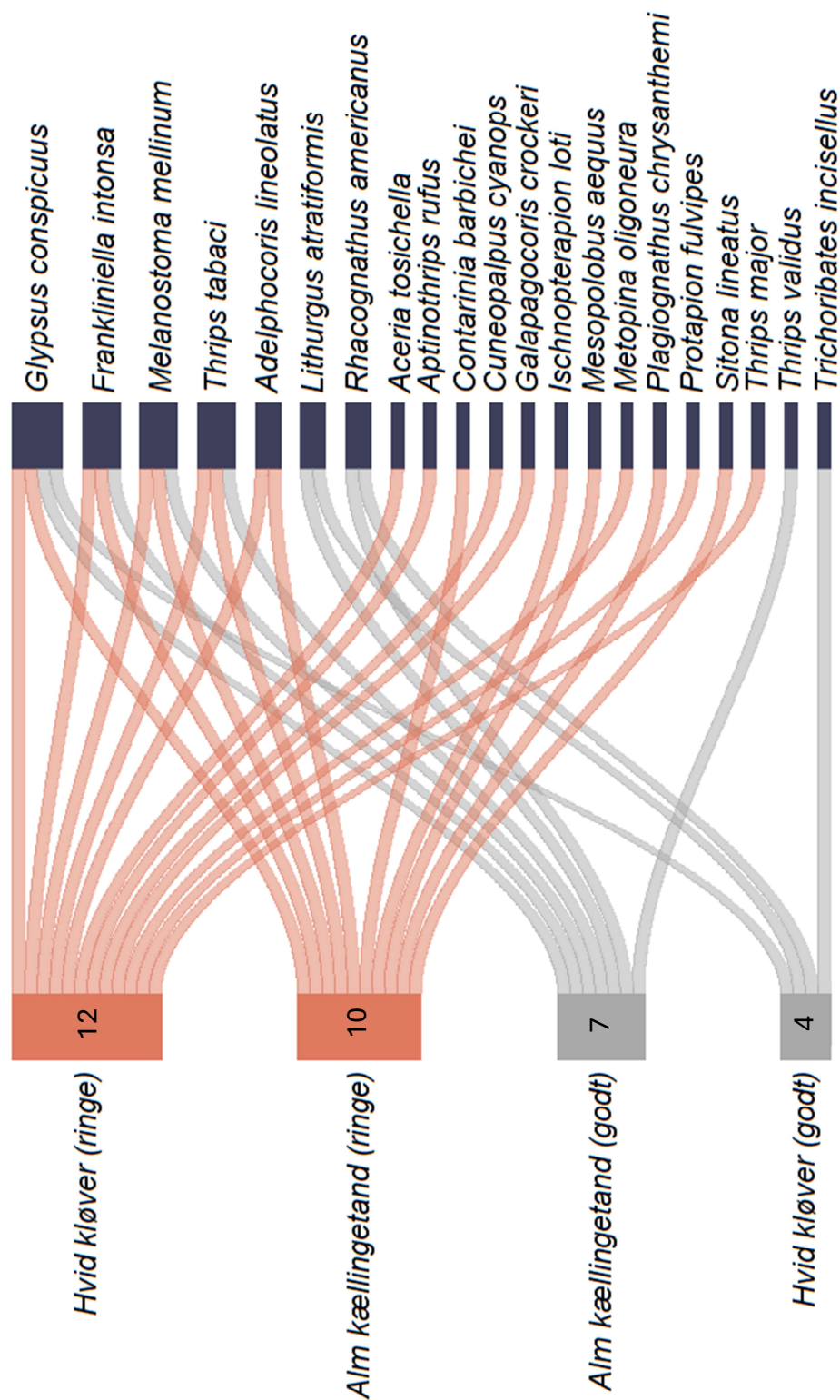
Figur 4.7 illustrerer, at Hvid kløver i det gode overdrev ved Hjørring har det højeste antal interaktioner. Plantearten indgår i flere unikke forbindelser, herunder med slægten *Trichoribates* (pansermider) og *Astylogethes subrugosus* (glansbille). I kontrast hertil har Alm. kællingetand, som udviser det laveste antal interaktioner, en unik forbindelse til *Oedemera lurida* (Lille solbille). Antallet af interaktioner for Hvid kløver er mere end dobbelt så højt som for Alm. kællingetand i det gode overdrev. I det ringe overdrev er antallet af interaktioner mellem disse to plantearter derimod omtrent ens. Det leddyr med flest interaktioner er *Frankliniella intonsa* (en kosmopolitisk thrips-art med udbredelse i Danmark [Naturbasen, 2018], efterfulgt af *Sminthurus viridis* (springhale), som ligeledes er udbredt i hele Danmark [Naturbasen, 2013].

I figur 4.8 fremgår det, at Hvid kløver i det ringe overdrev i Nørlev har flest interaktioner. Plantearten har flere unikke interaktioner, blandt andet med *Cuneopalpus cyanops* (tykbladet barklus) og *Protapion fulvipes* (Hvidkløversnudebille), en udbredt art i Danmark og rødlistet vurderet til at være ikke truet. Det leddyr, med flest interaktioner i Nørlev og med mange interaktioner i Hjørring, er *Glypsus conspicuus* fra familien Pentatomidae. Arten forekommer primært i Afrika [iNaturalist, 2025] og er ikke kendt fra Danmark, hvilket tyder på enten fejldetermination eller kontaminering. En anden hyppigt forekommende art er *Melanostoma mellinum* (Almindelig græssvirreflue), som er udbredt i hele Danmark [Aarhus Universitet, 2024].

I Nørlev er det både Alm kællingetand og Hvid kløver i det ringe overdrev, der har flest interaktioner. Dette står i kontrast til Hjørring, hvor Hvid kløver i det gode overdrev har det højeste antal interaktioner. Samtidig har Hvid kløver i det gode overdrev i Nørlev færrest interaktioner. Det er modsat det mønster af det, der blev observeret i Hjørring.



Figur 4.7. Interaktionsnetværk for Hvid kløver (*Trifolium repens*) og Alm kællingetand (*Lotus corniculatus*) i Hjørring enten fra et overdrev i god tilstand (grå) eller ringe tilstand (rød) med leddyr. Antallet af interaktioner er angivet inde i hver boks for planterne.



Figur 4.8. Interaktionsnetværk for Hvid kløver (*Trifolium repens*) og Alm kællingetand (*Lotus corniculatus*) i Nørlev enten fra et overdrev i god tilstand (grå) eller ringe tilstand (rød) med leddyr. Antallet af interaktioner er angivet inde i hver boks for planterne.

Indeksværdier for interaktionsnetværkene

For at besvare hypotese 4 - *Der vil forekomme en større Connectance og Robustness i et overdrev i god tilstand end i et overdrev i ringe tilstand*, er der udregnet Connectance og Robustness for i alt otte interaktionsnetværk (Tabel 4.5).

I Hjørring: fire interaktionsnetværk

- To interaktionsnetværkt, et for hvert overdrev, for interaktionen mellem plantearterne: Alm kællingetand, Hvid kløver, Engelskgræs, Liden klokke og de detekterede leddyrarter.
- To interaktionsnetværk, et for hvert overdrev, baseret på alle plantearter i hvert overdrev.

I Nørlev: fire interaktionsnetværk

- To interaktionsnetværkt, et for hvert overdrev, for interaktionen mellem plantearterne: Alm kællingetand, Hvid kløver, Lancetvejbred, Rød kløver og de detekterede leddyrarter.
- To interaktionsnetværk, et for hvert overdrev, baseret på alle plantearter i hvert overdrev.

For Connectance, som angiver andelen af mulige interaktioner, der faktisk forekommer, ses ingen fremtrædende forskel mellem lokalitet og tilstande. Dog med en tendens til at Nørlev godt har en lidt større forbundethed end de andre overdrev har.

For Robustness, som måler netværkets modstandsdygtighed over for tab af arter, er værdierne nærmest identiske, hvilket indikerer at interaktionsnetværkene bevarer sin tolerance overfor tab af leddyrarter, selv når naturtilstanden forringes. Hvis der istedet fjernes plantearter fra interaktionsnetværkene så er robustheden markant lavere overfor tab af plantearter. Dette indikerer at leddyrarterne er mere afhængige af planterne end planterne er overfor dem.

Tabel 4.5. Tabel med udregnet Connectance og Robustness for hvert overdrev med forskellige plantearter. *Udvalgte* er for Hjørring Alm kællingetand, Hvid kløver, Engelskgræs og Liden klokke. For Nørlev er det Alm kællingetand, Hvid kløver, Lancetvejbred og Rød kløver. *Alle* er for Hjørring eller Nørlev alle planterarter udvalgt i Hjørring eller Nørlev i hhv. overdrev med et højt artsindeks (Godt) og overdrev med et lavt artsindeks (Ringe).

	Connectance		Robustness	
	Hjørring	Nørlev	Hjørring	Nørlev
Godt, udvalgte	0,40	0,46	0,85	0,90
Ringe, udvalgte	0,38	0,46	0,86	0,92
Godt, alle	0,27	0,36	0,89	0,89
Ringe, alle	0,28	0,29	0,88	0,92

5.1 Identifikation af terrestriske leddyr via miljø-DNA

Undersøgelsens resultater demonstrerer, at sekvensering af miljø-DNA fra blomster på overdrev kan benyttes til at identificere terrestriske leddyr. Analysen afslører taksonomisk information for op til 11 forskellige ordener med 49 forskellige familier. De mest familierige og artsrige ordener i rangeret rækkefølge er Coleoptera, Thysanoptera, Hemiptera og Diptera. Familien Thripidae (orden: Thysanoptera) er den mest artsrige af alle familier og arterne *Frankliniella intonsa* og *Thrips tabaci* (Nelliketrips), er arter med mange interaktioner i alle fire overdrev. Thysanoptera er en yderst artsrig og slægtsrig orden, med 111 arter fordelt på 45 slægter alene i Danmark [Kobro, 2011]. Begge arter er udbredte skadedyr på afgrøder i Danmark [Nielsen et al., 2021].

Traditionelt har bestøvningsstudier primært fokuseret på bier, svirrefluer og sommerfugle [Ollerton, 2017]. Denne undersøgelse viser med fund af andre leddyrgrupper (thrips, biller, næbmunde, møl), at de også spiller en rolle som blomsterbesøgende og potentielle bestøvere. Thrips (Thysanoptera) er dokumenteret som vigtige bestøvere [Eliyahu et al., 2015], biller (Coleoptera) bidrager ligeledes til bestøvning [Muinde & Katumo, 2024], og næbmunde (Hemiptera) kan fungere som bestøvere [Garcia et al., 2023]. Derudover er møl (Lepidoptera) globalt set den mest artsrige gruppe af bestøvere [Ollerton, 2017], hvilket også understreges i studiet [Thomsen & Sigsgaard, 2019], der indsamler miljø-DNA fra plantearter på græsland i Danmark, der ligeledes finder mange arter indenfor ordenen Lepidoptera. Samlet set understøtter dette at blomsterbesøg er meget udbredt blandt leddyr, som stemmer overens med Wardhaugh [2015], som estimerer at 30 % af alle leddyr hyppigt besøger blomster [Wardhaugh, 2015].

5.1.1 Miljø DNA som supplement til artsindeks

Artsindekset anvendes af kommunerne som metode til at vurdere den biologiske tilstand af en naturtype, hvilket dog er forbundet med visse begrænsninger. Det opfanger ikke interaktioner mellem leddyrarter og planter, hvilket er afgørende for at forstå økosystemets robusthed og kvalitet [Valiente-Banuet et al., 2015]. For selvom flere leddyrarter knytter sig til specifikke værtsplanter [Nygaard et al., 2021], så kan alene tilstedeværelsen af plantearter ikke bekræfte om disse leddyrarter er til stede. Derfor er det vigtigt at dokumentere leddyrenes interaktion med planterne. Netop her har denne miljø-DNA-undersøgelse sin styrke det bekræfter interaktioner og overkommer mange af de udfordringer, der er forbundet med de traditionelle fangstmetoder jf. afsnit 1.5.

Først og fremmest finder undersøgelsen interaktioner mellem blomster og bestøvere som oftest overses, herunder nataktive møl (Lepidoptera) og små organismer som thrips (Thysanoptera). Det skal naturligvis pointeres, at der ikke er fuldt overlap mellem de plantearter, som er registreret

i besigtigelsen og de plantearter, der blev fundet i overdrevene på indsamlingstidspunktet. Det skyldes formentlig indsamlingstidspunktet for undersøgelsen, hvor besigtigelserne foregik tidligere på sæsonen og i nogle tilfælde flere år forinden. Planter blomstrer på forskellige tidspunkter af sæsonen, hvor nogle blomster i maj måned, mens andre som *Succia pratensis* (Djævelsbid) blomstrer i august/september måned. Derudover så er plantearterne i undersøgelsen ikke udvalgt på baggrund af deres lighed med artslisten i besigtigelserne, men i stedet udvalgt på baggrund af deres forekomst i flest mulige overdrev. Derfor repræsenterer de udvalgte plantearter ikke direkte de beregnede artsindeks, men miljø-DNA'et indsamlet fra planterne afspejler i stedet leddyr-plant interaktionerne, der er kendetegnende for overdrev med enten høj eller lav artsindeks.

5.2 Ingen forskel i artsrigdom af leddyr mellem godt og ringe overdrev

Denne undersøgelse viser at artsrigdommen af leddyr i overdrev, fundet med vores metode på blomster, placeret i to forskellige tilstandsklasser (et overdrev med et højt artsindeks og et overdrev med et lavt artsindeks) ikke er signifikant forskellige. Artsindekset, herunder artsscoren, vægter plantearter der er særlig følsomme overfor negative påvirkninger (fx pesticidsprøjtning) højest. Derfor vil uberørte overdrev kunne tilegne sig en højere artsscore og dermed et højere artsindeks, fordi plantearter med en høj artsscore er til stede der [Fredshavn & Ejrnæs, 2009]. Uberørte overdrev vil ofte vise en større planterigdom [Török et al., 2024], der kan understøtte en større artsrigdom for leddyr [Brunbjerg et al., 2018]. Derfor er det imod forventningen at der ikke udvises en større artsrigdom for leddyr i de gode overdrev end i de ringe overdrev.

5.2.1 Regional artspulje som mulig forklaring på lokal artsrigdom

En mulig forklaring på undersøgelsens observation er, at den lokale artsrigdom er medieret af en større regional artspulje af leddyr [Gaston, 2000]. En regional artspulje af leddyr er den totale mængde af leddyrarter som er til stede i større område. Lokale artssamfund er ofte åbne for kolonisering og etablering af organismer fra den regionale artspulje [Gaston, 2000]. Et rigt artsreservoir øger muligheden for gentagne udvekslinger mellem habitater, hvilket kan opretholde arter lokalt. Nogle taxa, primært mobile arter, overlever netop på grund af landskabets heterogenitet [Tscharntke et al., 2012]. Derfor er det muligt at artsrigdommen i Hjørring og Nørlev bestemmes af en større regionalpulje af leddyr i højere grad end af plantediversiteten på overdrevene. Det skal dog pointeres, at den målte artsrigdom i denne undersøgelse, ikke repræsenterer den fulde diversitet af interaktioner der forekommer mellem planterne og leddyrerne i overdrevene, da det kun er et udvalg af planterne, der er medtaget. Blomsterbesøgende arter repræsenterer heller ikke den fulde leddyrdiversitet i habitaterne [Oertli et al., 2005; Vessby et al., 2002]. Desuden finder studiet Weber et al. [2024] at størstedelen af miljø-DNA ikke findes på blomsterne men langs stænglen og bladene [Weber et al., 2024]. Det understreger igen at denne undersøgelse ikke måler den fulde leddyr diversitet i overdrevene, da der kun er indsamlet DNA fra blomsterhovederne.

5.2.2 Tendens til højere artsrigdom i ringe overdrev

I undersøgelsen viste der sig en tendens til at, at det ringe overdrev i Nørlev havde en større artsrigdom af leddyr end det gode overdrev. En feltundersøgelse af Arne Kiis i årene 2022-2023 i Nørlev af vilde bier viser, at der er observeret langt flere arter af vilde bier og i langt større antal på et tidligere dyrket overdrev, lige nord for det gode overdrev i Nørlev, sammenlignet med det gode overdrev i Nørlev. Feltundersøgelsen er vedlagt i Appendiks (Appendiks 7.6). Forfatteren påpeger selv at overdrevet med mange vilde bier, rummer flere nektarkilder hen over sæsonen og bedre ynglemuligheder i form af bart sand til udgravning af ynglehuller. Den seneste besigtigelse fra dette overdrev, viser et artsindeks på 0,26 og dermed klassificeret som *ringe* [Hjørring Kommune, 2024]. Dette viser at et lavt artsindeks ikke nødvendigvis afspejler et rigt leddyrssamfund, i det her tilfælde af vilde bier. Forfatteren fra feltundersøgelsen nævner desuden at en af årsagerne til det lave antal individer og arter af vilde bier i det gode overdrev i Nørlev er manglende naturlig forstyrrelse.

5.2.3 Græsningsintensitetens betydning for leddyrdiversitet

En vedvarende forstyrrelse i form af græsning er en betingelse for overdrevets eksistens som naturtype [Ejrnæs et al., 2009], men et review af van Klink et al. [2015] viser at diversiteten af leddyrssamfundet på græsland generelt påvirkes negativt hvis græsningstrykket fra større græssende dyr er for stort. Studiet viser, at leddyrdiversiteten kun kan forøges hvis græsning øger den biotiske og abiotiske heterogenitet. En vegetation der bliver bidt ned, blotlægger bar jord, som kan opvarmes af solens stråler, hvilket er nødvendigt for udvikling af larvestadiet for græshopper og sommerfugle. Bar jord giver også muligheden for vilde bier at lave ynglehuller. Samtidig giver en høj vegetation ly for store temperatursvingninger og holde mikroklimaet fugtigt under tørre perioder. Høj vegetation vil også kunne bruges som struktur til edderkoppernes spindelvæv, som i høj grad blev observeret i det ringe overdrev i Nørlev. Dette vil være eksempler på en abiotisk heterogenitet. En biotisk heterogenitet omhandler blandt andet variationen i plantearter og tilstedeværelsen af møg fra græssende dyr. Derudover er det vigtigt at den øgede heterogenitet kan udnyttes af nye immigrerende arter fra den regionale artspulje, for at leddyrdiversiteten forøges [van Klink et al., 2015].

Græssende dyr indtager leddyr, når de spiser vegetation, som et biprodukt, hvilket kan øge mortaliteten blandt nogle leddyrarter [van Klink et al., 2015]. Dette ses studiet af van Noordwijk et al. [2012] hvor mortaliteten for larver af sommerfuglearten *Melitaea cinxia* blev øget betragteligt ved et højt græsningstryk sammenlignet med et lavt græsningstryk. Samtidig viser flere studier at blomsterbesøgende leddyr bedst drager fordele af et intermediært græsningstryk, da det bidrager mest mulig variation i plantearter [Yoshihara et al., 2008; Vulliamy et al., 2006]. van Klink et al. [2015] foreslår derfor at de positive effekter af græssende dyr for leddyrssamfundet er højest ved lave densiteter, når effekten af den direkte mortalitet er minimal [van Klink et al., 2015].

I besigtigelserne vurderes græsningsintensiteten og ved ingen af de fire overdrev nævnes dette som for højt eller for lavt, udover Hjørring godt hvor det bliver nævnt som et tilpas græsningstryk. Umiddelbart kan den fysiske højde af vegetationen, som græsningsintensiteten vurderes ud fra, ikke forklare den ikke signifikante forskel i artsrigdommen mellem overdrevene. Når miljø-DNA analysen samtidig viser en manglende forskel i artsrigdommen mellem de gode og ringe overdrev, kan det være et signal om græsningstrykket ikke er optimalt i de gode overdrev. Miljø-DNA kan

derfor anvendes som en indikator for en tilpas græsningsintensitet, fordi det afspejler leddyrenes respons fremfor vegetationens respons.

5.3 Tætliggende overdrev har ikke større overlap af leddyrarter end fjerntliggende overdrev

I denne undersøgelse indikerer resultaterne for dissimilaritet, at der ikke er nogen entydig tendens til, at overdrev beliggende tættere på hinanden (som ved Hjørring) har en mere ensartet artssammensætning af leddyr end overdrev med større indbyrdes afstand (som ved Nørlev).

Det er en kendt teori at similariteten af arter falder med stigende afstande. Det kaldes for distance-decay relationen, som primært skyldes at den miljømæssige similaritet forventes at falde med stigende afstande mellem områder, hvilket forventes at føre til ændringer i den biotiske artssammensætning [Nekola & White, 1999]. Studiet [Arribas et al., 2021] viser eksempelvis at similariteten for leddyr samfund, der lever i jordbunden (biller, mider, springhaler), falder med stigende geografisk afstand. I dette tilfælde drives Distance-decay relationen af arternes begrænsende evne til at sprede sig [Arribas et al., 2021]. I studiet er faldet i similariteten først mere udbredt ved 2 kilometers afstand, hvor der i denne undersøgelse kun arbejdes med forskelle i afstande af nogle få 100 meter. Derfor er det nærliggende at tænke at denne forskel i geografisk afstand ikke giver nævneværdige forskelle i ligheden mellem de overdrev som undersøges her. Ligeledes er det kendt at nogle bestøvere flyver op til flere kilometer for at fouragere [Osborne et al., 2008], selvom nogle bestøvere foretrækker at flyve kortere afstande, hvis der er tilstrækkelige fourageringsmuligheder i nærheden [Redhead et al., 2016]. Derfor kan det tænkes at bestøvere i det ringe overdrev i Nørlev sagtens vil kunne flyve til det gode overdrev i Nørlev, på samme måde som bestøvere vil gøre det mellem overdrevene i Hjørring, hvor der er en kortere afstand.

Om bestøvere også flyver mellem Hjørring og Nørlev, hvor der er en afstand på 6,5 km, vides ikke. Resultaterne indikerer dog at der er en forskel i artssammensætning af leddyr på Hvid kløver i Hjørring mellem Hvid kløver i Nørlev. Det kan tyde på at artssammensætning af leddyr på blomster også er stedsspecifik og at de ikke flyver mellem områderne. En yderligere undersøgelse af om der er unikke leddyrarter i Nørlev som ikke er at finde i Hjørring, er nødvendig for at påvise dette.

5.3.1 Miljø-DNA kan udnyttes til at detektere spatiale signaler

I denne undersøgelse viser resultaterne for den interne dissimilaritet i Hjørring (0,63) og Nørlev (0,61) at de er relativt høje. Dette indikerer at der er en betydelig variation i artssammensætningen af leddyr på blomster, både mellem planter indenfor samme naturtype og på tværs af forskellige tilstandsklasser. PCA biplottene understøtter dette, ved at vise en forskelligartet gruppéring af plantearterne, som også indikerer, at variationen i artssammensætning af leddyr på blomsterne er at finde mellem planter indenfor samme tilstandsklasse. Det underbygges ved at der er fundet unikke leddyr på hver sin planteart indenfor samme overdrev.

Andre studier understøtter denne fortolkning. Kestel et al. [2024] har vist, at det er muligt at detektere spatiale miljø-DNA signaler på en fin skala. De kunne detektere forskelle i interaktioner mellem leddyr og blomsterstande på frugttræer, afhængigt af om de befandt sig i øverste eller

nederste kronedække [Kestel et al., 2024]. Ligeledes har [Søderdahl, 2025] vist at også indsamling af luftbåren miljø-DNA er sensitiv nok til at kunne fange distinkte spatiotemporale signaler i et habitat [Søderdahl, 2025].

Det kan altså udledes ud fra undersøgelsen og de nævnte studier, at Miljø-DNA undersøgelser er i stand til at opfange den variabilitet der kendetegner leddyrssamfund på overdrev, som ikke opfanges i en kvantificering af plantearter i besigtigelsen, og som er vigtig at forstå for at bevare og beskytte leddyrssamfund på overdrev.

5.4 Artsscore og unikke leddyrarter

Undersøgelsen viser ingen klar sammenhæng mellem antallet af leddyrarter og plantearternes artsscore. Spredningen af antal leddyrarter er stor og der er ingen signifikante forskelle mellem artsscorene. Hvid kløver med artsscoren (-1) har et højere antal leddyrarter end for mange af de andre planter med en anden artsscore og omtrent et lige så højt antal leddyrarter som Djævelsbid med artsscoren (7). Hvid kløver kategoriseres som en problemart og bidrager negativt til artsindekset, fordi den i Danmark har været dyrket siden 1700 tallet og derfor ikke er en naturlig forekommende planteart på overdrev [Mathiesen, 2022]. En lav artsscore er dog ikke ensbetydende med en lav diversitet af leddyr arter, for artsscoren fortæller kun noget om i hvor høj grad naturtypen er udsat for en forringelse. Hvid kløver trives på forstyrrede overdrev og har et rigt indhold af nektar og proteinholdig pollen og danner fødekilde for mange bier, sommerfugle og snudebiller [Mathiesen, 2022; Fredshavn & Ejrnæs, 2009]. Rapportens resultater underbygger dette ved at finde at *Apion fulvipes* (Hvidkløversnudebille) og *Melanostoma mellinum* (Alm. græssvirreflugt) interagerer med Hvid kløver og 10 % af det samlede antal leddyrarter fundet derpå er unikke leddyrarter, der ikke er fundet på andre plantearter på tværs af de undersøgte overdrev. Det er således ikke *problemarter*, som Hvid kløver der påvirker diversiteten af leddyr negativt, hvilket underbygges i studiet af Farrell et al. [2015] der finder at græsning har større betydning for artsrigdommen af leddyr end dominansen af problem planter [Farrell et al., 2015].

Det er vigtigt at understrege, at artsscoren aldrig har haft til formål at forklare variationen i leddyrdiversitet tilknyttet planterne, men derimod at fortælle om naturtypens tilstand. Der ses ikke en større koncentration af unikke leddyrarter på planter med en høj artsscore, hvilket understreger, at unikke leddyrarter og artsscoren er to forskellige ting. Det interessante i denne undersøgelse er derfor ikke manglen på sammenhæng, men at forskellige plantearter tiltrækker unikke leddyrarter uafhængigt af naturtypens tilstand.

Et interessant resultat er, hvordan leddyr sammensætning adskiller sig mellem planter som er nært beslægtet og morfologisk ens (Rød kløver og Hvid kløver). Det vises blandt andet ved at 20 % af det samlede antal leddyrarter fundet på *Trifolium pratense* (Rød kløver) er unikke og når kløverplanterne er til stede på samme overdrev, viser de også en forskelligartet leddyr sammensætning. Den umiddelbare morfologiske forskel mellem de to arter er, at Rød kløver har et lidt længere nektarfylt kronrør end Hvid kløver, hvorfor langsnablede humlebier i højere grad bestøver Rød kløver fremfor Hvid kløver [Mathiesen, 2022]. Et andet studie har desuden vist, at forskellige arter af bier udviser præference for enten Hvid kløver eller Rød kløver [Kanduth et al., 2021], hvilket understøtter undersøgelsens fund af variationen i leddyrssammensætningen mellem kløver arterne. Dette viser hvordan resultaterne af miljø-DNA analysen kan give et vigtigt supplement til besigtigelsen, ved at afdække plantearternes

funktionelle rolle for leddyrssamfundet.

En vigtig pointe er at indsamlingsintensiteten (sampling effort) varierer mellem plantearterne, hvilke har en betydning for fortolkningen af andelen af unikke leddyrarter fundet på planterne. Plantearterne der er indsamlet flere steder, som Hvid kløver, har en større chance for at få registreret unikke arter end Rød kløver er fundet færre steder.

5.5 Interaktionsnetværkene for overdrevene viser ingen strukturelle forskelle

Nærværende undersøgelse giver ikke kun et indblik i tilstedeværelsen af arter, men også overdrevets interaktionsnetværk og leddyr arternes funktionelle rolle som bestøvere, hvilket er centralt for at forstå og bevare truede økosystemer [Valiente-Banuet et al., 2015].

5.5.1 Connectance som indikatorværdi for naturtilstand

Undersøgelsen viser at der ikke findes nogen stor forskel mellem overdrevne for Connectance for interaktionsnetværkene. Det stemmer overens med Heleno et al. [2012], der ikke finder tilstrækkelig empirisk evidens for en klar sammenhæng mellem connectance og graden af habitat degradering. Denne relation viser sig i stedet at være stærkt kontekstafhængig og studiet mener ikke at værdien af Connectance alene kan være indikator for habitatets bevaringsværdi [Heleno et al., 2012]. Connectance bliver ofte tæt knyttet til økosystemets robusthed, fordi en høj grad af forbundethed indikerer en større modstandsdygtighed overfor sekundær uddøen [Gilbert, 2009]. Nyere studier har sidenhen ikke fundet nogen klar sammenhæng mellem disse to indeksværdier [Canning & Death, 2018].

5.5.2 Indsamlingsintensitet og artsrigdom påvirker Connectance

En forklaring på hvorfor der ikke er nogen stor forskel mellem overdrevene for Connectance, er at indeksværdien er stærkt influeret af indsamlingsintensiteten (sampling effort), altså hvor omhyggelig indsamlingen af interaktionerne har været [Blüthgen, 2010]. I denne undersøgelse blev der indsamlet 10 blomsterhoveder pr planteart, hvilket ikke repræsenterer det fulde billede af alle interaktioner for plantearterne i området. Alligevel er antallet af leddyr arter forskellig mellem overdrevne og det har direkte betydning for udregningen af Connectance. Flere arter resulterer i flere mulige interaktioner, men det overstiger oftest de observerede interaktioner omvendt proportionalt, hvilket resulterer i at netværk med flere arter har en lavere Connectance end netværk med færre arter [Blüthgen, 2010].

5.5.3 Robustness og dens fortolkning

Værdierne for Robustness i nærværende undersøgelse er relativt ens på tværs af områder og tilstande, hvilket indikerer at netværkene er robuste overfor sekundær uddøen, selv når tilstanden forringes. Men indeksværdien er særlig følsom overfor hvilken måde udregningen af værdien bliver gjort på. Robusthed beregnes som interaktionsnetværkets evne til at modstå sekundær uddøen, når arter fjernes fra netværket. I denne undersøgelse blev leddyrerne fjernet. Det udtrykkes som den andel af arter, der kan fjernes, før det medfører komplet kollaps gennem sekundær uddøen. Ved at udrydde plantearter fremfor leddyrarter, ses der en langt lavere robusthed,

hvilket indikerer at leddyrarterne er mere afhængige af plantearter fremfor det omvendte tilfælde. Dernæst er interaktionerne i netværkene i denne undersøgelse ikke vægtet. Dvs. at hver interaktion mellem plante og leddyr tillægges samme betydning og energiflowet antages at være ens. I et realistisk interaktionsnetværk vil interaktioner ikke være lige vigtige og beregningen af Robustness på et ikke vægtet netværk vil føre til en overestimering af netværkets robusthed sammenlignet med et vægtet netværk [Ståhl et al., 2025].

Derudover så vil en arts forsvinden i netværk kunne føre til en *rewiring*, altså hvor leddyrarter vil kunne skifte til nye planter efter tab af en interaktionspartner. Dette vil stabilisere robustheden i et netværk [Thierry et al., 2011] og det vil derfor kunne lede til underestimering af netværkets robusthed når der ikke tages hensyn til det i den simulerede udryddelse.

Interaktionerne i denne undersøgelse er ikke vægtet og derfor har rækkefølgen hvori arter vælges udryddet i simuleringen ingen betydning. Dog vil vægtede netværk oftest bestå af flere svage interaktioner og få stærke [Emmerson & Yearsley, 2004] og være mere robuste overfor tilfældig fjernelse af arter end ikke vægtede netværk [Ståhl et al., 2025]. Vægtet netværk med mange specialiserede leddyr vil dog være særlig sårbar overfor en tilfældig fjernelse af arter og føre til en lavere robusthed. I modsætning til netværket i denne undersøgelse, hvor hver interaktion er lige stærke, så vil dette føre til en lavere eller højere Robustness end der reelt vil være, hvis det var blevet vægtet.

Konklusion 6

Rapportens hovedformål er at analysere i hvilken grad undersøgelser af miljø-DNA fra leddyr i terrestriske habitater kan supplere besigtigelser af §3 arealer med naturtypen surt overdrev i Danmark. Derfor er repræsentanter af overdrev med forskellige biologiske værdier sammenlignet, for at undersøge hvordan tilstanden af et overdrev påvirker leddyrartsrigdommen og plante-leddyr interaktionsstrukturen.

Rapportens resultater viser imod forventning, ingen forskel i artsrigdommen af leddyr mellem overdrev i forskellige tilstandsklasser. Det kan tyde på at den lokale leddyrdiversitet i højere grad afspejles af en regional artspulje end den lokale plantediversitet og tilstandsklasse. Den målte artsrigdom repræsenterer dog ikke den fulde leddyrdiversitet, da kun et begrænset udvalg af plantearter og plantedele er undersøgt, hvilket også kan være en forklaring på hvorfor artsrigdommen ikke er signifikant forskellig mellem de gode og ringe overdrev.

Dissimilaritetsanalyserne afslører en udtalt variation i artssammensætningen af leddyr selv på små geografiske skalaer, men ingen tydelig stigning i dissimilaritet mellem overdrev med større indbyrdes afstand. Dette kan forklares ved at de undersøgte afstande er relativt små, da flyvende leddyr er i stand til at flyve flere kilometer for at fouragere. Dette bekræfter, at miljø-DNA kan opfange subtile spatiale signaler fra artssammensætningen af leddyr på blomsterne.

Artsscoreanalysen viser ingen klar sammenhæng mellem antallet af leddyrarter og plantearternes artsscore. Spredningen af antal leddyrarter er stor og der er ingen signifikante forskelle mellem artsscorene. Det vigtige fund i analysen er, at uanset tilstanden på overdrevet vil plantearterne tiltrække forskellige leddyrarter, samt at nært beslægtet og morfologiske lignende plantearter viser forskelle i artssammensætningen af leddyr, der er tilknyttet.

Interaktionsnetværkene viser ingen klare forskelle i Connectance eller Robustness mellem overdrevne. Udregningen af Robustness med ikke-vægtede interaktioner og tilfældige fjernelse af arter medfører en forsimpling, som kan over- eller underestimere netværkets reelle robusthed.

Miljø-DNA metoden benyttet her kan til en vis grad supplere den nuværende kommunale besigtigelse, da miljø-DNA analysen giver et mere nuanceret indblik i naturtypens biologiske tilstand, som den nuværende naturovervågning ikke giver. Den detekterer samtidig leddyrarter som oftest overses i traditionelle bestøvningsstudier, såsom nataktive bestøvere og mikroskopiske organismer. Samtidig bekræfter analysen interaktioner mellem leddyr og plante, hvilket giver et funktionelt indblik på biodiversiteten, interaktionsnetværket og dets respons på eventuel forringelse af den biologiske værdi af et område. Der er dog metodiske udfordringer, som pt. begrænser dens praktiske anvendelighed i kommunernes naturovervågning.

6.1 Perspektivering

For at gøre metoden mere anvendelig er det nødvendigt med en række ændringer og forbedringer. I nedenstående er listet forslag til hvordan metoden kan forbedres og gøres mere anvendelig til at være en del af den kommunale naturovervågning.

Udarbejdelse af en reference database med danske leddyrarter

Det er nødvendigt at udarbejde en reference database med kendte DNA sekvenser fra leddyrarter i Danmark for en bredere og mere præcis og lokal artsidentifikation. Nuværende databaser har en lav dækningsgrad af kendte leddyrarter og er skævvredet mod leddyrarter som enten har en negativ eller positiv indvirkning på mennesker [Leandro et al., 2024]. Det gør databaserne ude af stand til at detektere den fulde diversitet af leddyrarter som er til stede i den danske natur.

Standardisering af metode fra indsamling til analyse i laboratoriet

Det er nødvendigt at udarbejde en national protokol for indsamling til analyse i laboratoriet. Som Leandro et al. [2024] pointerer, er miljø-DNA analyser i terrestriske habitater et nyt forskningsområde og de fleste studier på området omhandler nye metodiske tilgange. Det er derfor vigtigt at standardisere proceduren for hvordan miljø-DNA fra planterne indsamles, herunder hvilke dele af planten der indsamles, og på hvilket tidspunkt indsamlingen sker, og hvor ofte, da leddyr udviser sæsonmæssige og døgnmæssige variationer i hvor de opholder sig. Dertil bør proceduren omfatte valg af regioner der amplificeres, valg af primer, kriterier for dannelse af OTU'er og taksonomisk tildeling. På denne måde sikres der en ensartet procedure der kan sammenligne resultater nationalt og dermed øge kvaliteten af naturovervågning i Danmark.

Kvantificering af abundansen af DNA fragmenter

I denne undersøgelse blev antallet af DNA reads konverteret til presence/absence data, fordi det endnu ikke er muligt at konvertere DNA-fragmenter indsamlet fra planten til antal individer der har besøgt planten. Selvom et studie med dybhavsfisk viser at det er muligt at kvantificere abundansen af miljø-DNA [Thomsen et al., 2016], så er det endnu ikke undersøgt med DNA fra terrestriske leddyr. Hvis det blev muligt at estimere antal individer fra miljø-DNA prøver, ville det gøre det muligt at estimere alfa diversitet og bestandstørrelser for leddyr, som vil være vigtig information der kan udnyttes i forvaltningen af naturområder.

Undersøge hvor længe DNA forbliver detekterbart på planten

Det er nødvendigt at undersøge, hvor længe miljø-DNA forbliver på plantens overflade for at kunne fastlægge det tidsinterval, hvori leddyr kan detekteres. Et studie af Valentin et al. [2020] viser, at detekterbarheden af miljø-DNA fra insekter på blade er mindre end én uge. Det betyder, at detektionen kun repræsenterer en meget kort periode efter, at leddyret har efterladt DNA-fragmenter. Den korte tidsperiode kan gøre det svært at detektere mindre frekvente leddyrarter, som rødlistede arter. Der er dog fortsat et behov for at undersøge, hvordan DNA binder til forskellige overflader, og hvordan faktorer som sollys, vind og nedbør påvirker nedbrydningen.

Målrettet indsamling af truede arter

Når overstående forbedringspunkter er udarbejdet, vil en målrettet indsamling af miljø-DNA fra plantearter som er kendt for at have tilknyttet sjældne leddyrarter, kunne kortlægge udbredelsen af sjældne truede arter på en ikke invasiv måde. Det vil gøre det muligt at foretage bedre og mere kvalificerede valg i naturforvaltningen af beskyttede naturområder.

Litteratur

- Aarhus Universitet (2024). *Den danske Rødliste*.
<https://ecos.au.dk/forskningraadgivning/temasider/redlist/soeg-en-art>.
Downloadet: 18.11.2025.
- Allesina, S., Bodini, A., & Pascual, M. (2009). Functional links and robustness in food webs. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 364(1524):1701–1709, ISSN: 0962-8436, DOI: 10.1098/rstb.2008.0214.
- Andersen, A. M. (2025). R kode til speciale 2025. *Github*,
<https://github.com/andander96-cpu/R-kode-for-data-analyse-til-milj--DNA-analyse-af-leddyr-fra-vilde-blomster-p-overdrev.git>.
- Andersen, K. S., Kirkegaard, R. H., Karst, S. M., & Albertsen, M. (2018). ampvis2: an R package to analyse and visualise 16s rrna amplicon data. *bioRxiv*,
<https://doi.org/10.1101/299537>.
- Arribas, P., Andújar, C., Salces-Castellano, A., et al. (2021). The limited spatial scale of dispersal in soil arthropods revealed with whole-community haplotype-level metabarcoding. *Molecular ecology*, 30(1):48–61, DOI: 10.1111/mec.15591.
- Blüthgen, N. (2010). Why network analysis is often disconnected from community ecology: A critique and an ecologist's guide. *Basic and Applied Ecology*, 11(3):185–195, DOI: 10.1016/j.baae.2010.01.001.
- Brunbjerg, A. K., Bruun, H., Dalby, L., et al. (2018). Vascular plant species richness and bioindication predict multi-taxon species richness. *Methods in Ecology and Evolution*, 9:2372–2382, DOI: 10.1111/2041-210X.13087.
- Bruun, H. H. & Ejrnæs, R. (1998). *Overdrev - en beskyttet naturtype*. Miljø- og Energiministeriet, Skov- og Naturstyrelsen, ISBN: 87-7279-102-0.
- Buttenschön, R. M. (1993). *Naturplejebogen: en håndbog i pleje af naturområder og kulturlandskab*, chapter 9 Overdrev. Miljøministeriet, Skov- og Naturstyrelsen, ISBN: 978-87-601-3945-1.
- Canning, A. D. & Death, R. G. (2018). Relative ascendancy predicts food web robustness. *Ecological research.*, 33(5), DOI: 10.1007/s11284-018-1585-1.
- Convention on Biological Diversity (n.d.a). *Article 2. Use of Terms*.
<https://www.cbd.int/convention/articles/default.shtml?a=cbd-02>. Accessed: 10.10.2025.
- Convention on Biological Diversity (n.d.b). *Country Profiles*.
<https://www.cbd.int/countries>. Accessed: 06.10.2025.

-
- Danmarks Miljøportal (n.d). *Danmarks Naturdata*.
<https://miljoeportal.dk/systemer/danmarks-naturdata/>. Downloadet: 08.11.2025.
- De Coster, W., D’Hert, S., Schultz, D. T., et al. (2018). Nanopack: visualizing and processing long-read sequencing data. *Bioinformatics*, 34(15):2666–2669, DOI: 10.1093/bioinformatics/bty149.
- Dormann, C. F., Fruend, J., Gruber, B., et al. (2007). bipartite: Visualising bipartite networks and calculating some (ecological) indices. *R package version 4.5.2*,
<https://github.com/biometry/bipartite>.
- Dunne, J. A., Williams, R. J., & Martinez, N. D. (2002). Network structure and biodiversity loss in food webs: robustness increases with connectance. *Ecology Letters*, 5(4):558–567, ISSN: 1461-0248, DOI: 10.1046/j.1461-0248.2002.00354.x.
- Ejrnæs, R., Nygaard, B., & Fredshavn, J. R. (2009). *Overdrev, enge og moser: håndbog i naturtypernes karakteristik og udvikling samt forvaltningen af deres biodiversitet*. Danmarks Miljøundersøgelser, ISBN: 978-87-7073-109-6.
- Ejrnæs, R., Nygaard, B., Kjær, C., et al. (2021). Danmarks biodiversitet 2020. tilstand og udvikling. *Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi*, (465):270.
- Ejrnæs, R., Petersen, A. H., Bladt, J., et al. (2014). Biodiversitetskort for danmark. *Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi*, (112):96.
- Elbrecht, V., Braukmann, T. W., Ivanova, N. V., et al. (2019). Validation of COI metabarcoding primers for terrestrial arthropods. *PeerJ*, 7:e7745, DOI: 10.7717/peerj.7745.
- Eliyahu, D., McCall, A. C., Lauck, M., et al. (2015). Journal of pollination ecology. *Minute pollinators: The role of thrips (Thysanoptera) as pollinators of pointleaf manzanita, Arctostaphylos pungens (Ericaceae)*, (16):64–71, DOI: 10.26786/1920-7603(2015)10.
- Ellemann, L., Ejrnæs, R., Reddersen, J., & Fredshavn, J. (2001). Det lysåbne landskab. *Miljø- og Energiministeriet Danmarks Miljøundersøgelser, Faglig rapport fra DMU*, (372):112.
- Else Vihlborg Staalsen (2024). *Tilstand og udvikling 2004-2022*. <https://novana.au.dk/naturtyper/overdrev/surt-overdrev-6230/tilstand-og-udvikling>. Downloadet: 08.11.2025.
- Emmerson, M. & Yearsley, J. M. (2004). Weak interactions, omnivory and emergent food-web properties. *Proceedings of the Royal Society B : Biological Sciences*, 271(1537):397–405, DOI: 10.1098/rspb.2003.2592.
- European Environment Agency (n.d.). *The Natura 2000 protected areas network*.
<https://www.eea.europa.eu/themes/biodiversity/natura-2000/the-natura-2000-protected-areas-network>. Downloadet: 09.11.2025.
- Farrell, K. A., Harpole, W. S., Stein, C., et al. (2015). Grassland arthropods are controlled by direct and indirect interactions with cattle but are largely unaffected by plant provenance. *PloS one*, 10(7):e0129823, DOI: 10.1371/journal.pone.0129823.
-

-
- Folketinget (2019). *Forslag til Lov om ændring af lov om naturbeskyttelse, 2019/1 LSV 164*. <https://www.retsinformation.dk/eli/ft/201913L00164>. Accessed: 08.11.2025.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., et al. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit i from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 3(5):294–299.
- Fredningsnævnet for Nordjylland, n. d. (1963). *Udskrift af Overfredningsnævnets kendelsesprotokol*. <https://www2.blst.dk/nfr/02763.00.pdf>. Downloadet: 24.11.2025.
- Fredshavn, J., Nygaard, B., Ejrnæs, R., et al. (2025). Bevaringsstatus for naturtyper og arter – 2025. habitatdirektivets artikel 17-rapportering. *Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energ*, (673):51.
- Fredshavn, J. R. & Ejrnæs, R. (2007). Beregning af naturtilstand ved brug af simple indikatorer 2. udgave. *Danmarks Miljøundersøgelser - Faglig rapport fra DMU*, (599):90.
- Fredshavn, J. R. & Ejrnæs, R. (2009). *Naturtilstand i habitatområderne: Habitatdirektivets lysåbne naturtyper*. Danmarks Miljøundersøgelser, ISBN: 978-87-7073-117-1.
- Fredshavn, J. R., Nygaard, B., & Ejrnæs, R. (2010). *Naturtilstand på terrestriske naturarealer - besigtigelser af § 3-arealer*. Danmarks Miljøundersøgelser, 2. udgave edition, ISBN: 978-87-7073-186-7.
- Fredshavn, J. R., Nygaard, B., & Ejrnæs, R. (2018). *Teknisk anvisning til besigtigelse af naturarealer omfattet af Naturbeskyttelseslovens §3 mv. Version 1.05, Oktober 2018*. https://ecos.au.dk/fileadmin/ecos/Temasider/Raadgivning/TA-besigtigelse_af_naturarealer-105.pdf. Downloadet: 24.11.2025.
- Garcia, L., Gould, J., & Eubanks, M. (2023). Bugs carry pollen too: Pollination efficiency of plant bug pseudatomoscelis seriatus (hemiptera: Miridae) visiting cotton flowers. *The Florida entomologist*, 106(2):122–128, DOI: 10.1653/024.106.0209.
- Gardarin, A., Plantegenest, M., Bischoff, A., & Valantin-Morison, M. (2018). Understanding plant–arthropod interactions in multitrophic communities to improve conservation biological control: useful traits and metrics. *Journal of Pest Science*, 91:943–955, DOI: 10.1007/s10340-018-0958-0.
- Gaston, K. (2000). Global patterns in biodiversity. *Nature*, 405:220–227, DOI: 10.1038/35012228.
- Geodanmark (2020). Forårsbilleder ortofoto - geodanmark. *Dataforsyningen - klimadatastyrelsen*, <https://dataforsyningen.dk/data/981>.
- Gilbert, A. (2009). Connectance indicates the robustness of food webs when subjected to species loss. *Ecological Indicators*, 9:72–80, DOI: 10.1016/j.ecolind.2008.01.010.
- Haddad, N. M., Crutsinger, G. M., Gross, K., et al. (2009). Plant species loss decreases arthropod diversity and shifts trophic structure. *Ecology letters*, 12(10):1029–1039, DOI: 10.1111/j.1461-0248.2009.01356.x.
-

-
- Hansen, A. S., Fredshavn, J., Uldal, C., et al. (2024). VANDMILJØ OG NATUR 2023 NOVANA. Tilstand og udvikling - faglig sammenfatning. *Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi*, (635):88.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & deWaard, J. R. (2003). Biological identifications through dna barcodes. *Proc Biol Sci*, 270(1512):313–21, DOI: 10.1098/rspb.2002.2218.
- Heleno, R., Devoto, M., & Pocock, M. (2012). Connectance of species interaction networks and conservation value: Is it any good to be well connected? *Ecological Indicators*, 14(1):7–10, DOI: 10.1016/j.ecolind.2011.06.032.
- Hjørring Kommune (2021). *Hjørring Bjerger folder*. <https://hjoerring.dk/Media/637594300118626681/Hj%C3%B8rring%20Bjerger%202021.pdf>. Downloadet: 11.08.2025.
- Hjørring Kommune (2024). §3 besigtigelser (alle naturtyper, 2010-). *Kommunal besigtigelse*, <https://naturereport.miljoeportal.dk/1021037>.
- Hopkins, G. W. & Freckleton, R. P. (2002). Declines in the numbers of amateur and professional taxonomists: implications for conservation. *Animal Conservation*, 5(3):245–249, DOI: 10.1017/S1367943002002299.
- iNaturalist (2025). *Glypsus conspicuus*. <https://www.inaturalist.org/taxa/745941-Glypsus-conspicuus#map-tab>. Downloadet: 10.12.2025.
- Jain, M., Olsen, H. E., Paten, B., & Akeson, M. (2016). The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biology*, 17(1):239, DOI: 10.1186/s13059-016-1103-0.
- Jesper Fredshavn (2010). Besigtigelse af §3-natur strandeng, hede, overdrev, fersk eng og mose. *DMU, Aarhus Universitet*, 1:4.
- Kanduth, L., Chartier, M., Schönenberger, J., & Dellinger, A. S. (2021). Red and white clover provide food resources for honeybees and wild bees in urban environments. *Nordic Journal of Botany*, 39(3):e03005, DOI: 10.1111/njb.03005.
- Kestel, J. H., Bateman, P. W., Field, D. L., et al. (2023). eDNA metabarcoding of avocado flowers: ‘hass’ it got potential to survey arthropods in food production systems? *Molecular Ecology Resource*, 23(7):1540–1555, DOI: 10.1111/1755-0998.13814.
- Kestel, J. H., Bateman, P. W., Field, D. L., et al. (2024). Spatio-temporal variation in arthropod-plant interactions: A direct comparison of edna metabarcoding of tree crop flowers and digital video recordings. *Ecological Indicators*, 169:112827, DOI: 10.1016/j.ecolind.2024.112827.
- Khehra, N., IS, P., & M., Z. (2025). *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK589663/>. Downloadet: 08-11-2025.
- Kobro, S. (2011). Checklist of nordic thysanoptera. 58:20–26.
-

-
- Leandro, C., Jay-Robert, P., & Pétillon, J. (2024). eDNA for monitoring and conserving terrestrial arthropods: Insights from a systematic map and barcode repositories assessments. *Insect Conservation and Diversity*, 17(4):565–578, DOI: 10.1111/icad.12726.
- Levin, G. (2016). Geografiske analyser af § 3-registrerede arealer. *Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi*.
- Lundsgaard, R., Nygaard, T., Schjelde, J. B., et al. (2022). *Sådan ligger landet 2022 – tal om landbruget*. https://www.dyrenesbeskyttelse.dk/sites/dyrenesbeskyttelse.dk/files/publikationer/S%C3%A5dan%20ligger%20landet/SLL_2022_Digital%20.pdf. Downloadet: 08.11.2025.
- Mangiafico, S. (2025). rcompanion: Functions to support extension education program evaluation. *R package version 2.5.1*, <https://cran.r-project.org/web/packages/rcompanion/index.html>.
- Mangiafico, S. (n.d.). *Scheirer Ray Hare test*. <https://search.r-project.org/CRAN/refmans/rcompanion/html/scheirerRayHare.html>. Downloadet: 21.11.2025.
- Mathiesen, C. (2022). *Planterne i Danmark - Naturhistorie og kulturhistorie*. Stibo Complete, ISBN: 978-87-972518-2-9.
- McDonald-Madden, E., Sabbadin, R., Game, E. T., et al. (2016). Using food-web theory to conserve ecosystems. *Nature Communications*, 7(1):10245, DOI: 10.1038/ncomms10245.
- Miljø- og Ligestillingsministeriet (2025). *Bekendtgørelse af lov om naturbeskyttelse, LBK nr 927 af 28/06/2024*. <https://www.retsinformation.dk/eli/lta/2024/927>. Accessed: 06.10.2025.
- Moeslund, J. E. (2024). *Græsland og hede*. <https://ecos.au.dk/forskningraadgivning/temasider/redlist/roedliste-2030/levesteder/graesland-og-hede>. Downloadet: 01.11.2025.
- Muinde, J. & Katumo, D. M. (2024). Beyond bees and butterflies: The role of beetles in pollination system. *Journal for Nature Conservation*, 77:126523, DOI: 10.1016/j.jnc.2023.126523.
- Myers, J. H. & Sarfraz, R. M. (2016). Impacts of insect herbivores on plant populations. *Annual Review*, 62:207–230, DOI: 10.1146/annurev-ento-010715-023826.
- Müller, K. & Wickham, H. (2025). tibble: Simple data frames. *R package version 3.3.0*, <https://tibble.tidyverse.org>.
- Naturbasen (2013). *Sminthurus viridus*. <https://www.naturbasen.dk/art/14421/sminthurus-viridis>. Downloadet: 01.12.2025.
- Naturbasen (2018). *Frankliniella intonsa*. <https://www.naturbasen.dk/observationer/30877/frankliniella-intonsa>. Downloadet: 01.12.2025.
-

-
- Nekola, J. C. & White, P. S. (1999). The distance decay of similarity in biogeography and ecology. *Journal of biogeography*, 26(4):867–878, DOI: 10.1046/j.1365-2699.1999.00305.x.
- Newton, J. P., Paul Nevill, P. W. B., Campbell, M. A., & Allentoft, M. E. (2024). Spider webs capture environmental dna from terrestrial vertebrates. *iScience*, 27(2):2589–0042, DOI: 10.1016/j.isci.2024.108904.
- Nielsen, H., Sigsgaard, L., Kobro, S., et al. (2021). Species composition of thrips (thysanoptera: Thripidae) in strawberry high tunnels in denmark. *Insects*, 12(3):208, DOI: 10.3390/insects12030208.
- Nygaard, B., Moeslund, J. E., Ejrnæs, R., et al. (2021). De vigtigste levesteder for rødlistede arter i Danmark. *Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi*, (470).
- Oertli, S., Müller, A., Steiner, D., et al. (2005). Cross-taxon congruence of species diversity and community similarity among three insect taxa in a mosaic landscape. *Biological Conservation*, 126(2):195–205, DOI: 10.1016/j.biocon.2005.05.014.
- Oksanen, J., Simpson, G., Blanchet, F., et al. (2025). vegan: Community ecology package. *R package version 2.8-0*, <https://vegandevs.github.io/vegan/>.
- Ollerton, J. (2017). Pollinator diversity: Distribution, ecological function, and conservation. *Annual review of ecology, evolution, and systematics*, 48(1):353–376, DOI: 10.1146/annurev-ecolsys-110316-022919.
- Osborne, J. L., Martin, A. P., Carreck, N. L., et al. (2008). Bumblebee flight distances in relation to the forage landscape. *The Journal of animal ecology*, 77(2):406–415, DOI: 10.1111/j.1365-2656.2007.01333.x.
- Oskanen, J., Smith, T., Bedward, M., & Lahti, L. (n.d.). Dissimilarity indices for community ecologists. *R package version 2.6-6.1*, <https://search.r-project.org/CRAN/refmans/vegan/html/vegdist.html>.
- Oxford Nanopore Technologies plc (n.d.). *How basecalling works*. <https://nanoporetech.com/platform/technology/basecalling>. Downloadet: 09.11.2025.
- R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. *R Foundation for Statistical Computing. Adress: Vienna, Austria*, <https://www.R-project.org>.
- Ramsar The Convention on Wetlands (n.d.). *Denmark*. Downloadet: 06.10.2025.
- Ratnasingham, S. & Hebert, P. (2007). bold. the barcode of life data system. *Molecular Ecology Notes*, 7(3):355–364, DOI: 10.1111/j.1471-8286.2007.01678.x.
- Redhead, J. W., Dreier, S., Bourke, A. F., et al. (2016). Effects of habitat composition and landscape structure on worker foraging distances of five bumble bee species. *Ecological applications*, 26(3):726–739, DOI: 10.1890/15-0546.
- Reuter, J. A., Spacek, D. V., & Snyder, M. P. (2015). High-Throughput Sequencing Technologies. *Molecular Cell*, 58(4):586–597, DOI: 10.1016/j.molcel.2015.05.004.
-

-
- Ruppert, K. M., Kline, R. J., & Rahman, M. S. (2019). Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation*, 17:e00547, DOI: 10.1016/j.gecco.2019.e00547.
- Sahu, A., Singh, M., Amin, A., et al. (2025). A systematic review on environmental DNA (eDNA) Science: An eco-friendly survey method for conservation and restoration of fragile ecosystems. *Ecological indicators*, 173:113441, DOI: 10.1016/j.ecolind.2025.113441.
- Schaffers, A. P., Raemakers, I. P., Sýkora, K. V., & ter Braak, C. J. F. (2008). Arthropod assemblages are best predicted by plant species composition. *Ecology*, 89(3):782–794, DOI: 10.1890/07-0361.1.
- Styrelsen for Areal Grøn Arealomlægning og Vandmiljø (n.d.a). *Arealopgørelse over § 3-natur*. <https://sgavmst.dk/natur-og-jagt/naturbeskyttelse/3-beskyttede-naturtyper/arealopgoerelse>. Accessed: 06.10.2025.
- Styrelsen for Areal Grøn Arealomlægning og Vandmiljø (n.d.b). *Beskyttelse af §3-naturtyper*. <https://sgavmst.dk/natur-og-jagt/naturbeskyttelse/3-beskyttede-naturtyper/beskyttelse-af-3-naturtyper>. Accessed: 06.10.2025.
- Styrelsen for Areal Grøn Arealomlægning og Vandmiljø (n.d.c). *Fredninger*. <https://sgavmst.dk/natur-og-jagt/natur-og-biodiversitet/fredninger>. Accessed: 06.10.2025.
- Styrelsen for Areal Grøn Arealomlægning og Vandmiljø (n.d.d). *Ikke beskyttede arealer og naturpleje*. <https://sgavmst.dk/natur-og-jagt/natur-og-biodiversitet/naturplejeguiden/naturplejeguiden-platformen/ikke-beskyttede-arealer>. Accessed: 06.10.2025.
- Styrelsen for Areal Grøn Arealomlægning og Vandmiljø (n.d.e). *Vedligehold af § 3-registreringen*. <https://sgavmst.dk/natur-og-jagt/naturbeskyttelse/3-beskyttede-naturtyper/administration-af-3/vedligehold-af-3-registreringen>. Accessed: 06.10.2025.
- Ståhl, P. P. G., Riikka, P.-D., Zhang, L., et al. (2025). Food web robustness depends on the network type and threshold for extinction. *Oikos*, 2025(5):e11139, DOI: 10.1111/oik.11139.
- Søderdahl, A. S. (2025). Spatiotemporal characteristics of airborne edna detections of vertebrates. *Master's thesis*.
- Thierry, A., Beckerman, A. P., Warren, P. H., et al. (2011). Adaptive foraging and the rewiring of size-structured food webs following extinctions. *Basic and applied ecology*, 12(7):562–570, DOI: 10.1016/j.baae.2011.09.005.
- Thomsen, P. F., Møller, P. R., Sigsgaard, E. E., et al. (2016). Environmental dna from seawater samples correlate with trawl catches of subarctic, deepwater fishes. *PLOS ONE*, 11(11):1–22, DOI: 10.1371/journal.pone.0165252.

-
- Thomsen, P. F. & Sigsgaard, E. E. (2019). Environmental DNA metabarcoding of wild flowers reveals diverse communities of terrestrial arthropods. *Ecology and Evolution*, 9(4):1665–1679, DOI: 10.1002/ece3.4809.
- Thomsen, P. F. & Willerslev, E. (2015). Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 183:4–18, DOI: 10.1016/j.biocon.2014.11.019.
- Tscharntke, T., Tylianakis, J. M., Rand, T. A., et al. (2012). Landscape moderation of biodiversity patterns and processes - eight hypotheses. *Biological Reviews*, 87(3):661–685, DOI: 10.1111/j.1469-185X.2011.00216.x.
- Török, P., Teleki, B., Erdős, L., et al. (2024). Scale dependency of taxonomic and functional diversity in pristine and recovered loess steppic grasslands. *Science of The Total Environment*, 949:175110, DOI: 10.1016/j.scitotenv.2024.175110.
- Valentin, R. E., Fonseca, D. M., Gable, S., et al. (2020). Moving edna surveys onto land: Strategies for active edna aggregation to detect invasive forest insects. *Molecular ecology resources*, 20(3):746–755, DOI: 10.1111/1755-0998.13151.
- Valiente-Banuet, A., Aizen, M. A., Alcántara, J. M., et al. (2015). Beyond species loss: the extinction of ecological interactions in a changing world. *Functional Ecology*, 29(3):299–307, DOI: 10.1111/1365-2435.12356.
- van Klink, R., van der Plas, F., van Noordwijk, C. G. E. T., et al. (2015). Effects of large herbivores on grassland arthropod diversity. *Biological Reviews*, 90(2):347–366, DOI: 10.1111/brv.12113.
- van Noordwijk, C., Flierman, D., Remke, E., et al. (2012). Impact of grazing management on hibernating caterpillars of the butterfly *melitaea cinxia* in calcareous grasslands. *J Insect Conserv*, 16:909–920.
- Vessby, K., Söderström, B., Glimskär, A., & Svensson, B. (2002). Species-richness correlations of six different taxa in swedish seminatural grasslands. *Conservation biology*, 16(2):430–439, DOI: 10.1046/j.1523-1739.2002.00198.x.
- Vulliamy, B., G. Potts, S., & G. Willmer, P. (2006). The effects of cattle grazing on plant-pollinator communities in a fragmented mediterranean landscape. *Oikos*, 114(3):529–543, DOI: 10.1111/j.2006.0030-1299.14004.x.
- Wardhaugh, C. W. (2015). How many species of arthropods visit flowers? *Arthropod-plant interactions*, 9(6):547–565, DOI: 10.1007/s11829-015-9398-4.
- Weber, S., Mahla, M. S. A., Kripp, A., et al. (2024). Plant-derived environmental dna complements diversity estimates from traditional arthropod monitoring methods but outperforms them detecting plant–arthropod interactions. *Molecular Ecology Resources*, 24(2):e13900, DOI: <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13900>.
- Wickham, H., Chang, W., Henry, L., et al. (n.d.). ggplot2. *R package version 2.2.0*, <https://ggplot2.tidyverse.org>.
-

-
- Wickham, H., François, R., Henry, L., et al. (2025a). dplyr: A grammar of data manipulation. *R package version 1.1.4*, <https://dplyr.tidyverse.org>.
- Wickham, H., Hester, J., Chang, W., & Bryan, J. (2025b). devtools: Tools to make developing r packages easier. *R package version 2.4.6*, <https://devtools.r-lib.org>.
- Wickham, H., Vaughan, D., & Girlich, M. (2025c). tidyr: Tidy messy data. *R package version 1.3.1*, <https://tidyr.tidyverse.org>.
- Yoshihara, Y., Chimeddorj, B., Buuveibaatar, B., et al. (2008). Effects of livestock grazing on pollination on a steppe in eastern mongolia. *Biological Conservation*, 141(9):2376–2386, DOI: 10.1016/j.biocon.2008.07.004.
- Zenker, M., Specht, A., & Fonseca, V. (2020). Assessing insect biodiversity with automatic light traps in brazil: Pearls and pitfalls of metabarcoding samples in preservative ethanol. *Ecology and Evolution*, 10:2352–2366, DOI: 10.1002/ece3.6042.