



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap

Den hanliga utterns reproduktion i Sverige (*Lutra lutra*)

The reproduction of the male otter in Sweden (*Lutra lutra*)



Jannike Ring

*Uppsala
2019*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

Den hanliga utterns reproduktion i Sverige (*Lutra lutra*)

The reproduction of the male otter in Sweden (*Lutra lutra*)

Jannike Ring

Handledare: Sara Persson, Institutionen för kliniska vetenskaper, SLU

Biträdande handledare: Anna Roos, Enheten för miljöforskning och övervakning,
Naturhistoriska riksmuseet

Examinator: Ulf Magnusson, Institutionen för kliniska vetenskaper, SLU

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0869

Kursansvarig institution: Institutionen för kliniska vetenskaper

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2019

Elektronisk publicering: <https://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: Europeisk utter, *Lutra lutra*, reproduktion, hanlig, säsong

Key words: European otter, *Lutra lutra*, reproduction, male, season

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Den Europeiska utterns (*Lutra lutra*) reproduktion, i synnerhet den hanliga, har trots sin historia av troligtvis miljögiftsorsakade reproduktionsstörningar inte blivit grundligt studerad. I norra Sverige har en säsong varierad reproduktion men med en fysiologisk möjlighet att reproducera sig året runt som ytterligare riskreduktion observerats hos honorna. Studier av populationer i andra länder har visat att andelen honor som reproducerar sig en viss säsong varierar mellan olika habitat och populationer. De få studier som tidigare genomförts på hanar har visat på en spermieproduktion året runt. I detta arbete granskades koncentrationen av spermier över året för att undersöka om den hanliga uttern visar tecken på säsong varierad reproduktion.

Genom att homogenisera testikelvävnad från 41 st uttrar så analyserades koncentrationen av spermier. Metoden är sedan tidigare beprövad av Persson & Stålheim (2018) och utvecklades här genom att tillsätta formolsaline vid spädning, vilket möjliggjorde förvaring för senare analys. Antalet spermier per gram testikelvävnad varierade, men det fanns inget samband och kan inte förklaras med någon av följande variabler: säsong, kroppsindex (BCI), testikelvikt eller baculumlängd (som åldersindikator). Om variationen i spermiekoncentration är en normal individuell variation, eller om orsakande faktor går att finna *post mortem* t.ex. vävnadshantering, preparering, spädningens förvaringsegenskaper, eller om det är en följd av yttre faktorer *in vivo*, t.ex. hormonstörande ämnen som miljögifter eller läkemedelsrester, vore intressant och av betydande vikt att studera i framtiden.

SUMMARY

Although the reproduction of the European otter (*Lutra lutra*) has been suspected to be affected by environmental pollutants, studies of the male reproduction of the European otter are sparse. Amongst the female otters from northern Sweden, a seasonal reproduction but with a physiological possibility to reproduce year-round has been observed. Studies of populations in other countries have shown that the proportion of female seasonal breeders differs between habitats and populations. The scarce number of studies of male otter reproduction have indicated a year-round sperm production. The aim of this thesis is to investigate if the male otter has a seasonal reproduction pattern in Sweden as this has previously not been studied.

In this study the sperm concentration in 41 otters was analysed through homogenization of testicular tissue. The method, previously tested by Persson & Stålheim (2018) was developed further by using formolsaline for dilution, making storage for later analysis possible. The number of sperm per gram of testicular tissues varied but could not be explained by any of the following variables: season, body condition index (BCI), testicle weight or length of baculum (as an age indicator). Whether the variation of sperm concentration is a normal individual variation, or if the cause is *post mortem* factors such as tissue handling, preparation, storage abilities of the dilution or if it is a consequence of external factors *in vivo*, such as endocrine disrupting chemicals, would be of great interest and of considerable importance for future studies.

INNEHÅLL

Inledning.....	1
Litteraturöversikt.....	2
Reproduktion.....	3
Säsongsanpassad reproduktion.....	3
Reproduktion hos uttern.....	3
Tillgång på föda i förhållande till reproduktion.....	4
Laktation och energibehov.....	4
Hanlig reproduktion.....	5
Endokrinologi.....	5
Spermiebildning.....	5
Utförda studier på utterns hanliga reproduktion.....	5
Danmark.....	5
Ryssland och Vitryssland.....	6
Norge.....	6
Material och metoder.....	7
Insamling av material.....	7
Åldersgruppering.....	7
Kroppskonditionsindex (BCI).....	8
Könsorgan.....	8
Spermieutstryk.....	8
Kvantifiering av spermier.....	8
Beredning.....	8
Avläsning.....	9
Bearbetning av data.....	9
Statistik.....	9
Resultat.....	11
Provtagna uttrar.....	11
Åldersgruppering.....	11
Spermieförekomst.....	13
Kroppslängd, kroppsvikt och kroppskonditionsindex.....	13
Testikelvikter, baculum och spermiekoncentration.....	13
Variationer efter säsong hos adulta uttrar.....	15
Cystor på sädesledarna.....	16
Diskussion.....	17
Åldersgruppering.....	17
Kroppslängd.....	17
Spermieförekomst i utstryk.....	17
Spermiekoncentration.....	17
Variationer efter säsong.....	18
Spermiekoncentration.....	18
Testikelvikter.....	18
Kroppskonditionsindex.....	19
Miljögifter och läkemedelsrester.....	19

Slutsats	20
Tack.....	21
Populärvetenskaplig sammanfattning	22
Referenser	24

INLEDNING

Fram till 1940 frodades uttern i nästan hela landet, men under mitten av 1950-talet skedde en dramatisk förändring då utterstammen sjönk drastiskt i större delen av sin utbredning i Europa (Erling & Nilsson, 1976; Mason & Macdonald, 1992). Jakten misstänktes vara en del av orsaken och i Sverige fredades uttern 1968 (Erling & Nilsson, 1976). Men trots fredningen fortsatte utterstammen att minska i landet och detta gav en indikation på att fler orsaker än jakt påverkade populationen negativt (Erling & Nilsson, 1978). I de västra delarna av Europa var populationsnedgången störst och gemensamt för dessa områden var att de hade en hög grad av kontaminering från industrier och teorin om miljöföroreningar som orsak växte fram (Mason & Macdonald, 1992). Förutom miljöförorening och jakt tros ett flertal andra faktorer som habitatförstöring, artkonkurrens av minken och födobrist ha bidragit negativt till den redan utsatta populationen (Erling & Nilsson, 1976). Sandegren *et al.* (1980) och Olsson *et al.* (1981) var de första att föreslå miljögiftet PCB som specifik orsak till utterns försvinnande. Detta miljögift har även troligtvis orsakat reproduktionsstörningar hos gråsäl- och havsörnspopulationerna, vilka under samma tidsperiod var utrotningshotade (Roos *et al.*, 2012).

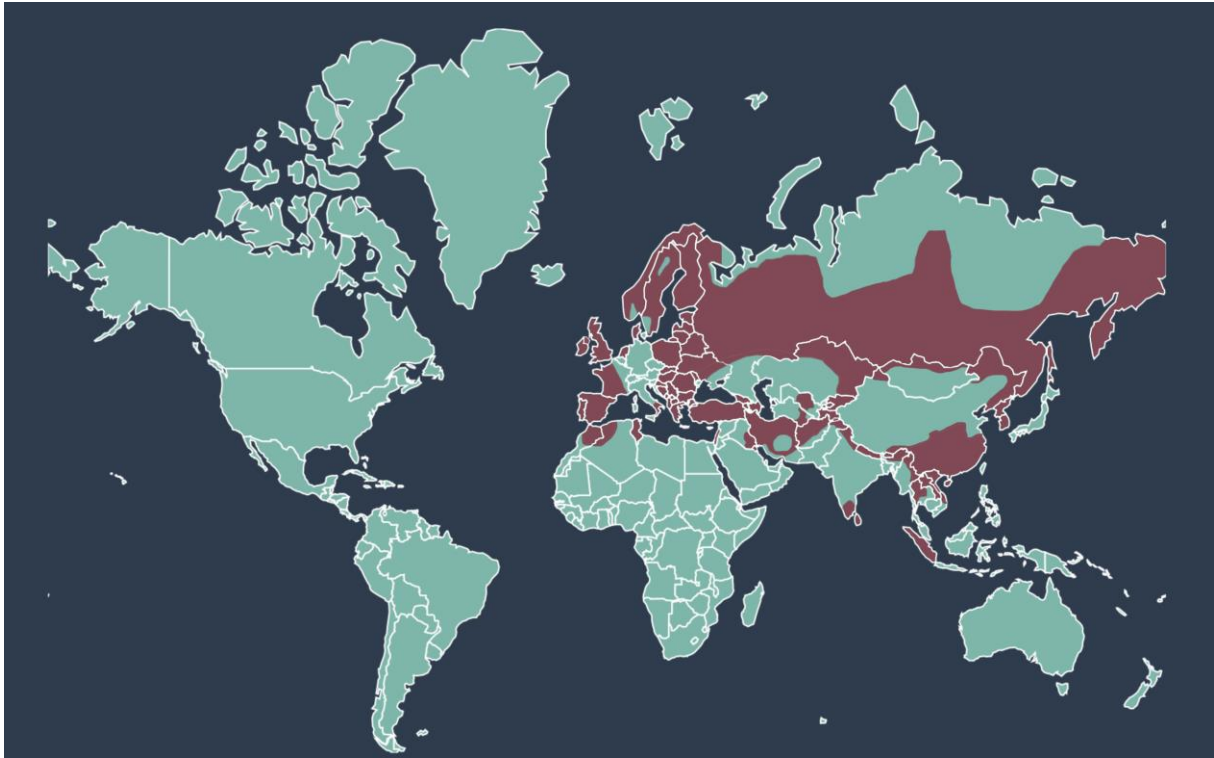
Uttern tillhör statens vilt (25§ jaktlagen [1988:534] och 33,36§ jaktförordningen [1987:905]) vilket innebär att alla uttrar som påträffas döda ska enligt lag rapporteras till polisen, som skickar uttrarna till Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) eller Naturhistoriska riksmuseet (NRM). På NRM sker en kontinuerlig miljöövervakning där alla uttrar som skickats in obduceras. Provmaterial från dessa har sedan 60-talet sparats i en miljöprovbanks, som senare kan användas för att bl.a. göra tidstrender och analyser av olika föroreningar (Roos, 2012; Bisther & Roos 2006). En förändring i utterstammen kan på så sätt härledas till exempelvis en förorening och signalera om en ohälsosam miljö för både djurliv och människa.

För att beskriva utterns normala hanliga reproduktion och därmed möjliggöra identifiering av avvikelser inom miljöövervakningen, fokuserar det här arbetet på att undersöka om vuxna utterhanar visar tecken på säsongsvarierad reproduktion genom att analysera koncentrationen av homogeniseringsresistenta spermatider och spermier i testikelvävnad *post mortem*.

Normala variationen i reproduktionsparametrar och huruvida variabler som kroppskondition eller geografiskt område (norra eller södra Sverige) hade en påverkan på spermieproduktionen undersöktes. Samband mellan spermieproduktion och andra reproduktionsparametrar såsom testikelvikt studerades.

LITTERATURÖVERSIKT

Europeisk eller Eurasisk utter (*Lutra lutra*), är den utterart som lever i Sverige och har störst utbredningen i världen; från Irland i väst till Kina i öst, Ryssland i norr till Indonesien i söder (se figur 1). Den är ett solitärt levande, semiakvatiskt mårddjur som spenderar en stor del av sitt liv nära eller i vatten (Chanin, 2013).



Figur 1. Den Europeiska utterns (*Lutra lutra*) utbredning. Baserad på utbredningskarta från IUCN.

Uttern är en karnivor och fisk utgör 65-90 % av födan. Den resterande andelen består av amfibier, kräfter, insekter och ibland även fågel, reptiler eller små däggdjur (Chanin, 2013). Dess kroppsstorlek har varierat över tid och geografiska områden (Yom-Tov *et al.*, 2010) men varierar även med kön då hanarna är större än honorna (Bisther & Roos, 2006). De fullvuxna hanarna väger mellan 7-11 kg och blir max 120 cm långa mätt från nosspegel till svanstipp. Honorna väger mellan 4-7 kg och blir max 100 cm långa (Bisther & Roos, 2006).

I naturen dör merparten av uttrarna i ung ålder. De flesta innan de blir 3 år gamla och endast någon procent blir över 10 år (Chanin, 2013). De når vuxen kroppsstorlek redan vid 1 års ålder och blir könsmogna då de är ungefär 2 år. En utterhane i fångenskap har dock fått en kull redan vid 17 månaders ålder (Chanin, 2013). Studier i Danmark visar att vilda utterhanar där i medeltal blir könsmogna vid 18 månaders ålder (Elmeros & Madsen, 1999).

I Europa separeras utterns utbredningsområde av en korridor som sträcker sig mellan centrala Danmark till centrala Italien via västra Tyskland, Nederländerna, Belgien, Luxemburg, östra Frankrike, Schweiz och västra delarna av Österrike. I denna korridor är uttrarna antingen utrotade eller starkt reducerade till den grad att de bildar isolerade populationer. År 2000 klassades den Europeiska uttern i den Internationella naturvårdsunionens (IUCN) röda lista över hotade djur som "sårbar" (Roos *et al.*, 2015), en kategori för vilka underkategoriserade

arter i vilt tillstånd löper en stor risk att dö ut (Gärdenfors, 2010). År 2004 omklassades Europeiska uttern som ”nära hotad” efter konstaterad återhämtning i västra Europa med en populationsminskning som inte längre överskred 30 % tre generationer tillbaka i tiden (Roos *et al.*, 2015). Arter grupperade under kategorin ”nära hotad” anses vara nära att uppfylla eller kommer sannolikt inom en nära framtid uppfylla kriterierna för kategorin ”sårbar” (Gärdenfors, 2010). Den Europeiska utterns population minskar dock fortfarande i sin helhet till följd av habitatförstöring i Kina och Indokina (Roos *et al.*, 2015).

Reproduktion

Däggdjur kan reproducera sig kontinuerligt året runt eller vara säsongbundet reproduktiva. En tredje typ av reproduktiv anpassning är opportunistisk reproduktion. Miljön, klimatmässiga förhållanden och beräknad livslängd är de faktorer som har störst betydelse för en arts utveckling och reproduktiva anpassning (Vasantha, 2016). De flesta däggdjur som lever i klimat med årlig säsongsmässig klimatförändring har också en strikt säsongsmässig reproduktion för att säkerställa att perioder av stort energibehov sammanfaller med hög tillgång på föda. I motsats ses oftast en kontinuerlig reproduktion hos däggdjur i habitat där klimatförhållanden är oförutsägbara (Negus & Berger, 1987).

Säsonganpassad reproduktion

För merparten av däggdjuren i den norra hemisfären där klimatet är tempererat och tillgången på föda varierar, äger reproduktionen rum en viss del av året för att öka avkommans chans för överlevnad (Amstislavsky & Ternovskaya, 2000). Den reproduktiva aktiveringen sker hos de flesta däggdjur vid en förändring av antal ljusstimmar vilket registreras av receptorer i ögat som triggar en endokrin process. Produktionen av melatonin i epifysen och således även kroppens dygnsrytm, regleras av nervsignaler från ögats receptorer. Vid ökat antal ljusstimmar minskar sekretionen av melatonin, vilket hos ”long day breeders” leder till en ökad produktion av GnRH som i sin tur leder till frisättning av gonadotropinerna FSH och LH i adenohipofysen, vilket i sin tur aktiverar gonaderna. Hos ”short day breeders” ökar istället produktionen av GnRH vid ökad sekretion av melatonin och vice versa. För opportunistiskt reproduktiva arter beror reproduktionssäsongens initierande signal inte på dagsljusets längd utan på andra faktorer som t.ex. tillgång på föda eller vatten (Sjaastad *et al.*, 2010).

Reproduktion hos uttern

Den Europeiska uttern är polyöstral (Mason & Macdonald, 2009 se Hung & Law, 2016) och typiskt för de flesta utterarter är att de har en säsongsmässig reproduktion med en reproduktionsfrekvens som toppar under en viss del av året (Estes, 1989). Hos den Europeiska uttern infaller denna reproduktiva topp övervägande under sommaren men beroende på population har den även observerats infalla under årets resterande säsonger (Conroy & Bacon, 2005). Eftersom toppen av reproduktiv period kan infalla året om, måste det vara andra faktorer som t.ex. fysiologisk kondition, mognad, nutrition eller födselsäsong som fungerar som reglerande faktorer för denna aktivering (Sidorovich & Tumanov, 1994). Även om en art är säsongsmässigt reproduktiv kan anpassningar efter andra faktorer än säsong ske (Parker, 1998).

Säsongbundenheten är olika för olika utterpopulationer och andelen som reproducerar sig inom tidsperioden för den reproduktiva toppen varierar (Kruuk *et al.*, 1987; Heggberget &

Christensen 1994; Beja, 1996; Elmeros & Madsen, 1999; Hauer *et al.*, 2002). Vissa populationer saknar en säsongsvariation helt och reproduktionen är då jämnt fördelad över hela året (Sidorovich & Tumanov 1994; Chadwick & Sherrad-Smith, 2010). Exempel på populationer som saknar säsongsvariation är de i Vitryssland, Ryssland, England och Wales samt hos uttrar i fångenskap (Trowbrige, 1983: se Conroy & Bacon, 2005; Sidorovich & Tumanov, 1994; Chadwick & Sherrad-Smith, 2010). Medan populationerna i Shetland, Norge, Portugal, Danmark och Tyskland har en säsongsanpassad reproduktion (Kruuk *et al.*, 1987; Heggberget & Christensen 1994; Beja, 1996; Elmeros & Madsen, 1999, Hauer *et al.*, 2002).

Tillgång på föda i förhållande till reproduktion

Utterns reproduktion verkar vara starkt påverkad av tillgång på föda och kan anpassa reproduktionen efter tider på året då tillgången på fisk är mer riklig (Kruuk *et al.*, 1987; Heggberget & Christensen, 1994). Två viktiga faktorer som visat sig påverka utterns födotillgång och därigenom anpassningen till när och under hur stor del av året reproduktionen sker är habitatets komplexitet och stabilitet. Ett mer komplext habitat med en miljö som är anpassad för fler arter ökar tillgången på fisk vilket har effekten att reproduktionen blir mer regelbunden året runt (Ruiz-Olmo & Jiménez, 2008). Uttrar som lever i en mindre stabil miljö med kraftigare fluktuationer i klimatet har en mer varierande kost över året och reproduktionen har därför anpassat sig till delar av året då deras prefererade föda fisk är som rikligast (Ruiz-Olmo & Jiménez, 2008). Till exempel har kustlevande populationer i Danmark en förhållandevis mer säsongsvarierad tillgång på fisk och således en mer strikt säsongsanpassad reproduktion än vad inlandslevande populationer har. Kustlevande populationer har dock även en högre pre- och postnatal mortalitet (Heggberget & Christensen, 1994; Elmeros & Madsen, 1999) och kullstorleken som för uttrar varierar mellan 1-5 ungar per kull (Chanin, 2013), är mindre hos de kustlevande populationerna. Som ytterligare en reproduktiv riskreduktion, utöver en anpassning till gynnsam del av året, möjliggör en fysiologisk förmåga att kunna reproducera sig året runt att den reproduktiva framgången ökar ytterligare. Detta bl.a. eftersom en hona med en prenatal förlust av en kull, åter kan bli dräktig inom samma år istället för att ett helt år går förlorat. Detta kan förklara varför reproduktiv aktivitet har observerats året runt även i populationer där reproduktionen har en tydlig anpassning efter säsong (Heggberget & Christensen, 1994).

Laktation och energibehov

Mjölkproduktion under ditiden är en mycket energikrävande process som ligger på mellan 150-200 kcal per dag för karnivorer, vilket innebär att en lakterande utterhona under den mest intensiva laktationen måste öka sitt dagliga energiintag med 150-300 %. För den Europeiska uttern infaller detta precis innan ungarna introduceras för fast föda (Ofstedal & Gittleman, 1989) vilket sker då ungarna tillsammans med modern lämnar deras gryt för första gången vid 8-10 veckors ålder (Chanin, 2013). Denna period har i populationer med mer markant säsongsanpassad reproduktion visat sig sammanfalla med perioden då tillgången på föda är rikligast i området (Kruuk *et al.*, 1987; Heggberget & Christensen, 1994; Elmeros & Madsen, 1999).

Hanlig reproduktion

Endokrinologi

Spermatogenesisen och produktionen av testosteron regleras framför allt av det gonadotropinfrisättande peptidhormonet GnRH som bildas i hypotalamus. GnRH stimulerar hypofysen till sekretion av gonadotropinerna FSH och LH. LH stimulerar i sin tur Leydigcellerna i testikeln till syntes av testosteron som i de närliggande Sertolicellerna stimulerar spermatogonier och spermatocytutveckling. Genom negativ feedback på neuronerna i hypotalamus hämmar testosteron, dess aktiva metaboliter och inhibin B, produktionen av GnRH och således även frisättningen av LH och FSH. Testosteron produceras även i binjurarna, men denna produktion är mycket liten och det är Leydigcellernas produktion av testosteron som stimulerar och reglerar spermieproduktionen i samspel med FSH och LH, samt ger den manliga könskaraktären (Sjaastad *et al.*, 2010)

Spermiebildning

I testikeln finns sädesgångar (*tubuli seminiferi*) som omges av ett interstitium med Leydigceller som sitter tätt anslutna till sädesgångarna. *Tubuli seminiferi* består av ett basalmembran av epitel- och Sertoliceller som sträcker sig mot lumen. Mellan sertolicellerna ligger stamceller som kallas spermatogonier, som genom mitos bildar primära spermatocyter som i sin tur bildar spermater genom meios. Spermater är omogna spermier som genomgår en strukturell omvandling och mognad i testikeln. Därefter transporteras de genom testikelns mediastinum och *ductuli efferentes* till bitestikelns långa vindlande gång där spermerna genomgår ytterligare strukturella och funktionella förändringar och lagras sedan som mogna spermier i bitestikel-svansen (Sjaastad *et al.*, 2010)

Utförda studier på utterns hanliga reproduktion

Danmark

I en dansk studie som genomfördes av Elmeros och Madsen (1999), samlades 242 danska uttrar från både kust och inland in mellan 1982 och 1996. Reproduktionen studerades och denna studie skiljer sig från merparten av tidigare studier då även utterns hanliga reproduktion undersöktes.

Hanarnas parade testikelvikt (inklusive bitestikeln) sammanställdes och testikelns densitet av spermier grupperades i ingen, låg eller hög densitet genom att i mikroskop undersöka utstryk från testikeln. Sambandet mellan testikelvikt, spermiedensitet, kroppskonditionsindex (BCI) och säsong undersöktes sedan.

Hos hanarna var den parade testikelvikten inkluderande bitestikeln signifikant högre hos de adulta hanarna jämfört med de juvenila och subadultas parade testikelvikter. Testikelvikt hade även ett signifikant positivt samband med spermiedensitet, men dessa parametrar varierade inom åldersgrupperna. Åtta av 59 adulta saknade helt spermier i utstryket, och variationen i spermiedensitet visade inget mönster efter säsong. Honor undersöktes efter reproduktiva tecken som placentaärr och gulkroppar och de juvenilas uttrarnas ålder estimerades. Utifrån de juvenilas fynddatum och estimerade ålder kunde månaden under vilken de juvenila uttrarna fötts tas fram. En distinkt säsongsmässig fördelning sågs där 82 % av födslarna inföll under

sommar och höst, vilket sammanföll med tillgången på fisk i området. Födslar noterades dock infalla året runt.

BCI var generellt god året runt vilket visa på en stadig tillgång på föda, med undantag för några adulta hanar vars testikelvikt även var låg. Dessa individer med lägre BCI och testikelvikt visades vara drabbade av infektiösa sjukdomar.

Ryssland och Vitryssland

Även i nordvästra Ryssland och Vitryssland observerades en variation i testikelvikt och spermieproduktion som studerades genom histologisk undersökning av testikeln. Men ett tydligt mönster i reproduktionsvariation efter säsong kunde inte ses hos varken hanar eller honor, och en osynkroniserad reproduktiv aktivitet mellan könen iaktogs (Sidorovich & Tumanov, 1994).

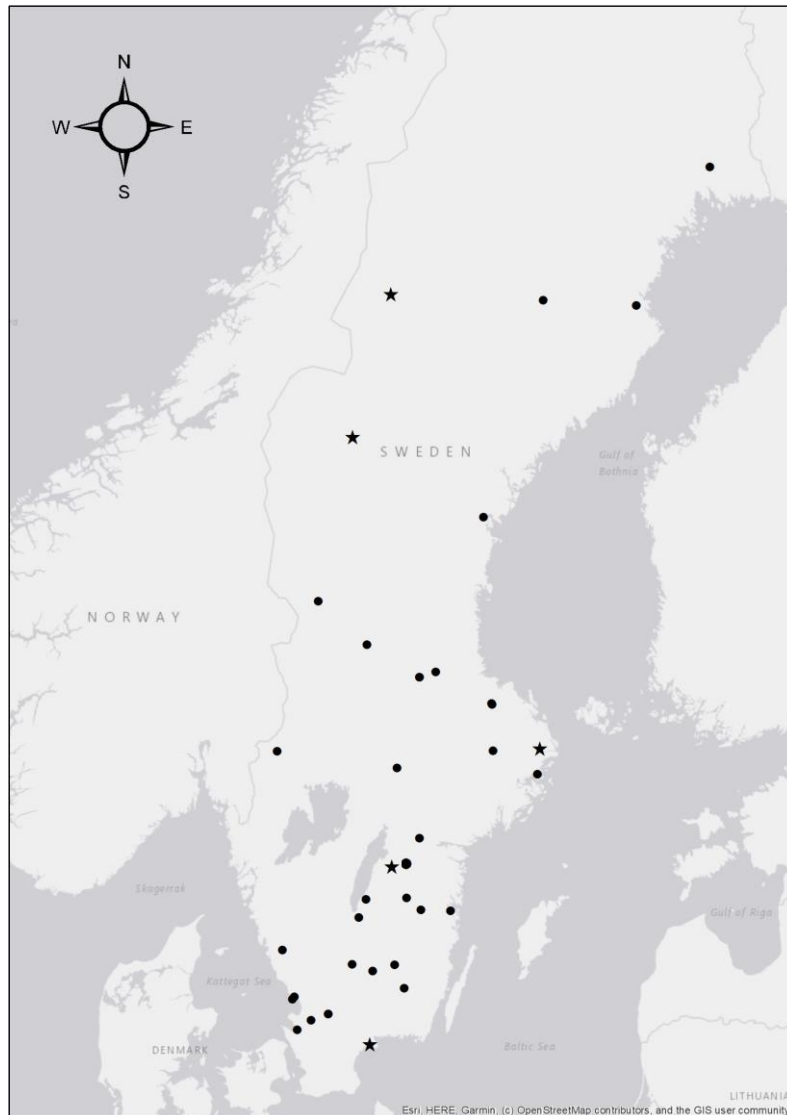
Norge

Heggberget och Christensen (1994) har utifrån studier gjorda på honor och juvenila uttrar indirekt dragit slutsatsen att hanar i den norska populationen har en fysiologisk möjlighet att reproducera sig året runt. Detta eftersom en tydlig säsong varierad reproduktion men även möjlighet till att reproducera sig året runt observerats hos honorna.

MATERIAL OCH METODER

Insamling av material

I samband med obduktion på NRM under hösten 2018, samlades testiklar från 41 st uttrar in. Dessa inkom till museet mellan 2011-2018 och har fram till obduktion hållits frysta i -20 C° . Uttrarna var slumpmässigt utvalda varför fyndplats och -datum varierar i denna studie.



Figur 2. Karta över provtagna uttrars insamlingsplats ($n=35$), resterande uttrar saknade detaljerad information. Baserad på koordinater uttagna från uppgifter angivna av insamlare. ★ = subadult, ● = adult.

Åldersgruppering

Den Europeiska uttern når adult storlek redan under subadult ålder (Chanin, 2013) vilket försvårar åldersgrupperingen. Säker åldersbestämning genom beräkning av årsringar i tandsnitt eller granskning av kraniets utveckling finns beskrivet av (Heggberget, 1984). Dessa metoder är dock mycket tidskrävande. Därför gjordes en sammanvägning mellan kroppsvikt, kroppslängd, parad testikelvikt och spermiekoncentration för åldersgruppering i detta arbete. Parametrarna granskades visuellt i diagram och grupperades därefter. Baculumets längd ökar med

åldern hos Nordamerikansk flodutter (*Lutra canadensis*) (Friley, 1949). Om detta även gäller för den Europeiska uttern testades således genom att statistiskt jämföra sambandet mellan åldersgrupp och baculumlängd. Baculumlängd användes även som indikator för hormonell påverkan (Sonne *et al.*, 2006). Längden uppmättes med en linjal i centimeter med en decimal.

Kroppskonditionsindex (BCI)

BCI visar på relationen mellan kroppslängd och kroppsvikt och utgör en indikator för eventuell nutritionell stress och/eller generell hälsa. BCI beräknades med en formel ur Kruuk *et al.* (1987).

$$BCI = \frac{\text{kroppsvikt}}{a \times \text{kroppslängd}^b}$$

Kroppslängden mättes från nosspegel till svanstipp med uttern liggandes på rygg med huvudet sträckt bakåt. Konstanterna a och b (a=5.87 och b=2.39) är framtagna genom linjär regression av logaritmisk transformerad kroppslängd i cm (se Kruuk *et al.*, 1987). Kroppsvikten i kg avrundades till en decimal.

Könsorgan

Testikel med bitestikel skars ut med tillhörande sädesledare och förekomst av cystor på sädesledaren dokumenterades. Bitestikeln separerades därefter från testikeln med hjälp av en sax, och sädesledaren avlägsnades från bitestikeln ca 2 mm proximalt om bitestikelns caput. Höger och vänster testikel vägdes var för sig på en decimalvåg och dess vikt i gram avrundades till två decimaler. Vikterna summerades för en parod testikelvikt. På samma sätt togs bitesticklarnas separata vikter.

Spermieutstryk

Ett spermieutstryk gjordes genom att med skalpell skära ett rutat mönster efter hela bitestikelns längd varefter bitestikelvätska skrapades upp med kortsidan av ett objektglas. Den uppskrapade bitestikelvätskan ströks ut i vallmönster på ett annat objektglas och när utstryket torkat studerades de i 40x förstoring i ljusmikroskop. Vid närvaro av spermier kategoriserades utstryket som positivt och då inga spermier kunde urskiljas kategoriserades det som negativt. Ett negativt utstryk innebär dock endast att inga spermier kunnat påvisas och inte att det inte fanns en spermieproduktion, medan ett positivt utstryk endast påvisat spermier men säger inget om koncentrationen eller spermieproduktionens omfattning.

Kvantifiering av spermier

Beredning

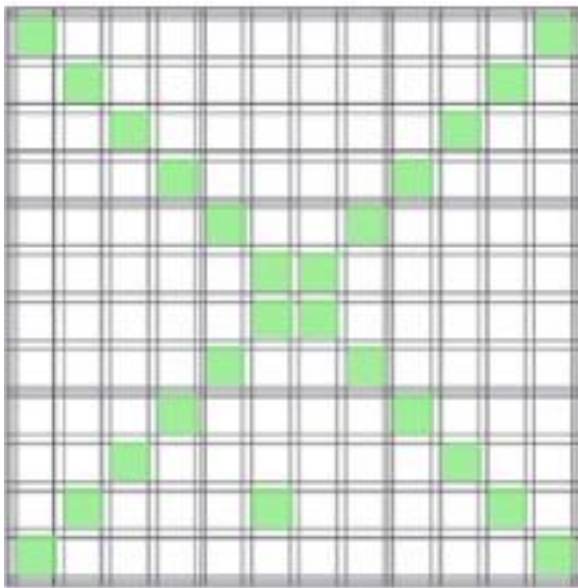
Testikelvävnad separerades från *tunica albuginea* med hjälp av skalpell, därefter mättes 1g ± 0,005 g upp. Testikelvävnaden homogeniserades på högsta hastighet (35 000 rpm) i 2 min och 15 sek i 10 ml tritonlösning som är en mixtur av destillerat vatten, NaCl och Triton-X Mix.

Vid homogeniseringen slås testikelns celler och stödjevävnad sönder. Spermatidernas och spermernas starkt kondenserade kärna gör dem homogeniseringsresistenta och dess huvuden förblir hela, vilket möjliggör räkning av dessa i mikroskop. 100 µl av homogenatet späddes

med 900µl formolsaline som är en blandning av $Na_2HPO_4 \times 2 H_2O$, KH_2PO_4 , $NaCl$, 37 % formalin. Spädningen av homogenatet förvarades sedan i kryorör i rumstemperatur i upp till 5 månader för senare avläsning. Hädanefter benämns de homogeniseringsresistenta spermatiderna och spermier som spermier.

Avläsning

Räkningen av spermier utfördes av KV-lab (Institutionen för kliniska vetenskaper SLU). Spädningen pipetterades ner i en Bürker-kammare direkt efter att det blandats med hjälp av en Votrex-mixer. Då provet tillåtit sätta sig under 1 minut räknades spermier i ett faskontrastmikroskop enligt ett förutbestämt mönster där 25 st rutor räknas transversalt enligt schema (se figur 3). För en mer detaljerad beskrivning se (Stålheim, 2018).



Figur 3. Schema för beräkning av spermatider i Bürker-kammare.

Bearbetning av data

Spermiekoncentrationen beräknades enligt formeln:

$$\frac{N \times S \times K}{a} = \text{antal spermier} \times 10^5 \text{ per g testikelvävnad}$$

N = antalet spermier

a = antal rutor räknade (25st)

S = spädningsgrad (76.67)

K = multiplikationsfaktorn (250)

Statistik

Jämförelse mellan kroppsstorlek och testikelparametrar tyder på att åtminstone fyra uttrar kan klassas som subadults (se figur 3 och 4). Dessa togs bort från beräkningarna, liksom en utter vars spermiekoncentration låg 10 standardavvikelse utanför de subadultas genomsnittliga spermiekoncentration och felaktig spädning inte kunde uteslutas. En utters ena testikel misstänktes genomgått en testikeldegeneration med bindvävsomvandling till följd av trauma.

Misstanken baserades på att denna till storlek var mindre än den andra, hade ljusare färg och hårdare konsistens med bindvävsstruktur. På samma utter kunde spår av läkta traumatiska skador även ses i ansiktet och i slagsmål biter ofta uttrar varandra i testikeln (Chanin, 2013). Testikelvikter samt spermiekoncentration för denna individ togs därför bort ur beräkningarna. En t-test (SAS, Milltown, USA) användes för att undersöka om subadulta uttrar hade kortare baculum än adulta.

Uttrarna delades upp om de kom från norra eller södra Sverige efter *Limes Norrlandicus*. T-test användes för att undersöka om kroppsstorleken (kroppsvikt och kroppslängd) eller BCI skiljde sig mellan norra och södra Sverige.

Totalantal spermier räknades ut för varje utter baserat på spermiekoncentration och parad testikelvikt. För att undersöka variationer i parad testikelvikt, relativ parad testikelvikt (testikelvikt dividerat med kroppsvikt), spermiekoncentration, totalantal spermier och BCI över året studerades figurer över medelvärden per månad och eventuella misstänkta skillnader i medelvärdena undersöktes med t-test. Samband mellan relativ parad testikelvikt, baculumlängd, spermiekoncentration, BCI och totala spermieantalet undersöktes med linjär regression (proc GLM, SAS). Resultat ansågs vara signifikanta om p-värdet var ≤ 0.05 .

RESULTAT

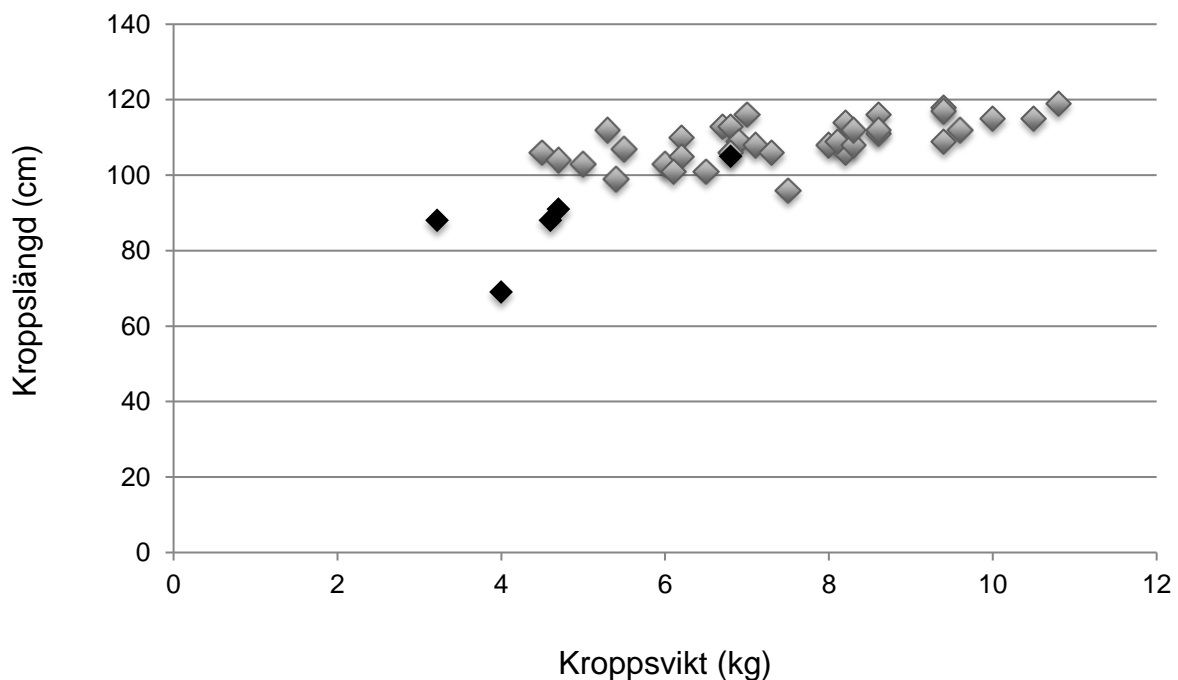
Provtagna uttrar

Av de 41 provtagna uttrarna var 28 st insamlade från södra Sverige och 13 st från norra Sverige. Sex uttrar saknade detaljerade insamlingsuppgifter och är därför inte utmärkta i figur 2.

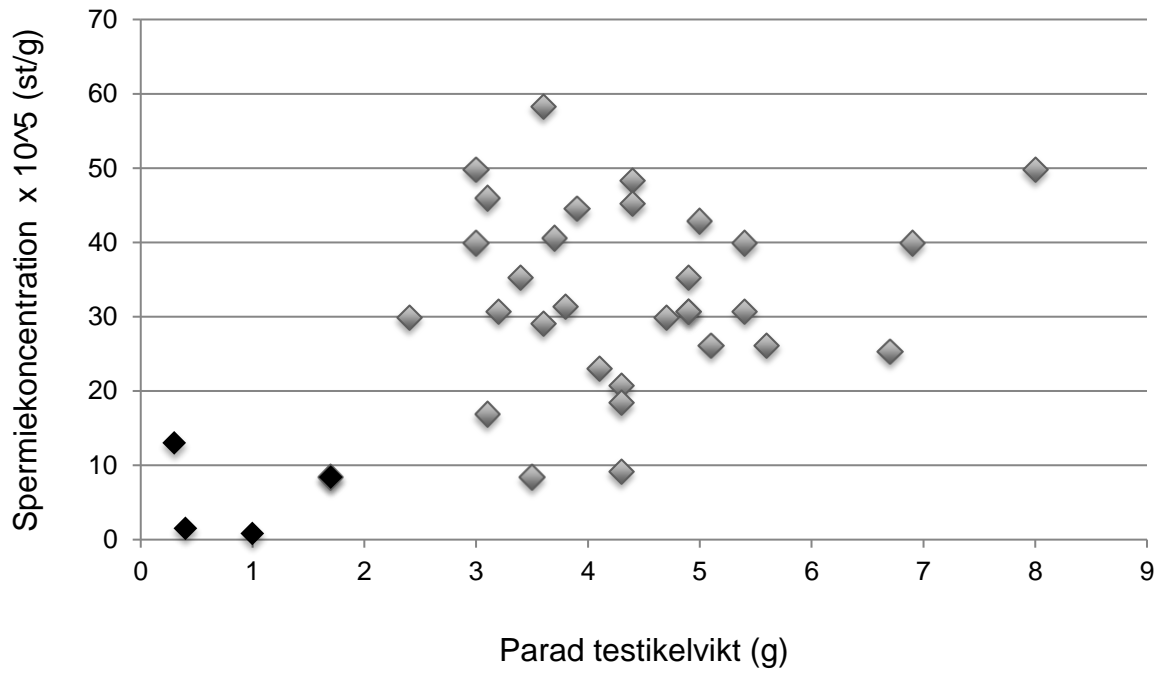
Åldersgruppering

Genom att jämföra kroppslängd och kroppsvikt (figur 4) och spermiekoncentration och parad testikelvikt (figur 5) identifierades 35 uttrar som adulta och 5 uttrar som subadulta, d.v.s. de hade ännu inte uppnått adult kroppsstorlek och testikelstorlek samt förmåga att producera spermier.

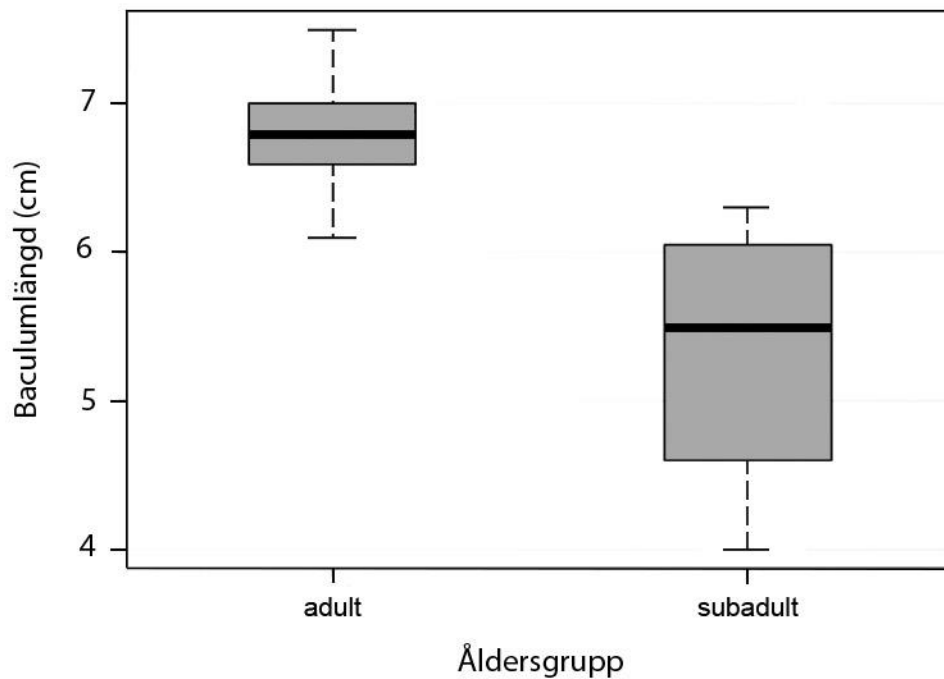
Utifrån den sammanvägning mellan kroppsvikt, kroppslängd, parad testikelvikt och spermiekoncentration som använts för åldersgruppering i detta arbete hade de subadulta uttrarna ett signifikant ($p < 0,001$) kortare baculum (medel 5,3cm, omfång 4,0-6,3 cm, $n=5$) än de adulta (6,7 cm omfång 5,8-7,5 cm, $n=33$) (se figur 6). Baserat på dessa värden kan följande värden användas för åldersgruppering: en subadult utter har en testikelvikt < 2 g och baculumlängd $< 5,5$ cm och en adult har en testikelvikt > 3 g och baculumlängd $> 6,5$ cm (se figur 5 och 6).



Figur 4. *Kroppslängd (cm) över kroppsvikt (kg) för hanliga uttrar från Sverige (n=40). Svart: subadult, grå: adult.*



Figur 5. Spermiekoncentrationen $\times 10^5$ (st) över parat testikelvikt (g) för hanliga subadulta ($n = 5$) och adulta ($n=31$) uttrar från Sverige. Svart: subadult, grå: adult. Två subadulta uttrar hamnar på samma punkt (1,7: 8,4).



Figur 6. Baculumlängd (cm), (medelvärde, median, kvartiler och omfång (min, max)) per åldersgrupp (subadult $n=5$ och adult $n=35$).

Spermieförekomst

En av de adulta uttrarna saknade spermieutstryk. Två av fem subadulta och övriga 34 adulta hade positiva utstryk (se tabell 1).

Tabell 1. Resultat av spermieutstryk (positivt eller negativt) från subadulta (n=5) och adulta (n=34) uttrar från Sverige

	<i>Positivt</i>	<i>Negativt</i>	<i>Totalt (st)</i>
Subadult	2	3	5
Adult	34	0	34

Kroppslängd, kroppsvikt och kroppskonditionsindex

Kroppsvikten och BCI hos uttrar från norra delen av Sverige skiljde sig inte signifikant från kroppsvikten ($p=0,078$) eller BCI ($p=0,39$) hos uttrar från södra delen av Sverige. Däremot när kroppslängdens medelvärde uppdelat mellan norra respektive södra Sverige jämfördes, var skillnaden signifikant ($p=0,052$), där medelvärdet från södra Sverige var högre (se tabell 2).

Tabell 2. *Kroppsvikt (kg), kroppslängd (cm) och kroppskondition (BCI) hos adulta uttrar från norra och södra Sverige (medel, standardavvikelse (SD) och omfång (min, max))*

	<i>Del av Sverige</i>	<i>Antal uttrar</i>	<i>Medel</i>	<i>SD</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>
Kroppsvikt (kg)	Norra	11	6,7	1,2	4,5	8,6
	Södra	24	7,8	1,8	4,7	10,8
Kroppslängd (cm)	Norra	11	107*	5,1	99	116
	Södra	23	110*	5,6	96	119
BCI	Norra	11	0,99	1,14	0,67	1,22
	Södra	24	1,05	0,20	0,69	1,41

*: Signifikant skillnad mellan norra och södra.

Testikelvikter, baculum och spermiekoncentration

Det fanns inget signifikant samband mellan spermiekoncentration och relativ parad testikelvikt ($p=0,21$). Ett samband kunde inte heller ses mellan spermiekoncentrationen och BCI ($p=0,69$), BCI och den relativa parade testikelvikten ($p=0,083$), totalantalet spermier och baculumlängd ($p=0,49$), eller mellan relativ parad testikelvikt och baculumlängd ($p=0,28$).

Tabell 3. Testikelvikter (parade, relativa och totala) i (g), baculumlängd (cm), spermiekoncentration $\times 10^5$ (st/g testikel) och totalantalet spermier $\times 10^5$ (st) hos adulta uttrar (n=34) från Sverige (medel, standardavvikelse (SD) och omfång (min, max))

	<i>Alla uttrar</i>	<i>Medel</i>	<i>SD</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>
Parad testikelvikt (g)	31	4,4	1,2	2,4	8,0
Relativ testikelvikt (g)	31	0,6	0,1	0,3	1,0
Parad bitestikelvikt (g)	31	2,2	0,5	1,0	3,4
Relativ bitestikelvikt (g)	31	0,3	0,1	0,1	0,5
Total testikelvikt ¹ (g)	31	6,6	1,7	4,3	11,4
Relativ total testikelvikt (g)	31	0,9	0,2	0,5	1,4
Baculumlängd (cm)	33	6,7	0,4	5,8	7,5
Spermiekoncentration per g testikelvävnad $\times 10^5$ (st)	34	33,2	12,1	8,4	58,4
Totalantal spermier ² $\times 10^5$ (st)	31	147,1	72,5	29,5	399,2

¹: Parad testikelvikt + parad bitestikelvikt, ²: spermiekoncentration \times parad testikelvikt.

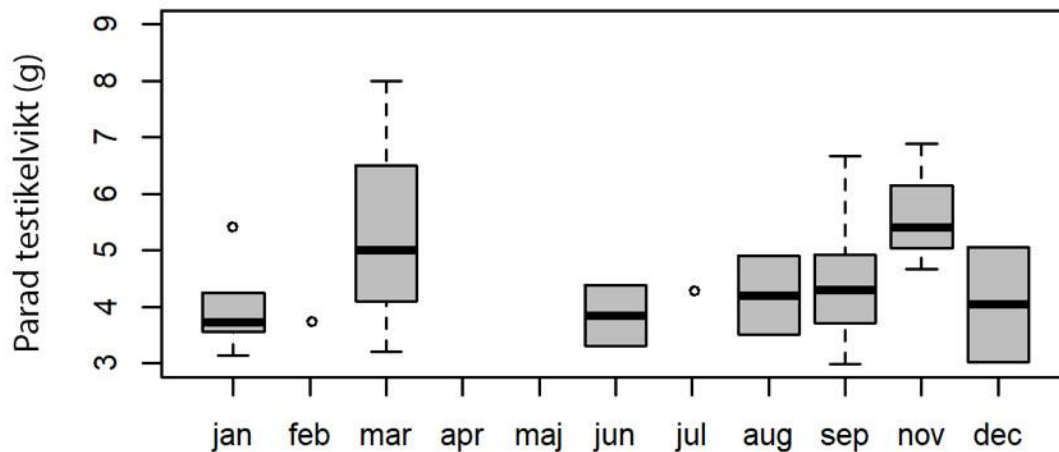
Tabell 4. Testikelvikter (parade, relativa och totala) i (g), baculumlängd (cm), spermiekoncentration $\times 10^5$ (st/g testikel) och totalantalet spermier $\times 10^5$ (st) hos subadulta uttrar (n=5) från Sverige (medel, standardavvikelse (SD) och omfång (min, max))

	<i>Alla uttrar</i>	<i>Medel</i>	<i>SD</i>	<i>Min</i>	<i>Max</i>
Parad testikelvikt (g)	5	1,0	0,7	0,3	1,74
Relativ testikelvikt (g)	5	0,2	0,1	0,1	0,4
Parad bitestikelvikt (g)	5	0,7	0,5	0,3	1,4
Relativ bitestikelvikt (g)	5	0,1	0,1	0,1	0,3
Total testikelvikt ¹ (g)	5	1,7	1,2	0,6	3,1
Relativ total testikelvikt (g)	5	0,3	0,2	0,2	0,6
Baculumlängd (cm)	4	5,3	1,0	4,0	6,3
Spermiekoncentration per (g) testikelvävnad $\times 10^5$ (st)	5	6,5	5,1	0,9	12,8
Totalantal spermier ² $\times 10^5$ (st)	5	7,0	7,2	0,7	14,8

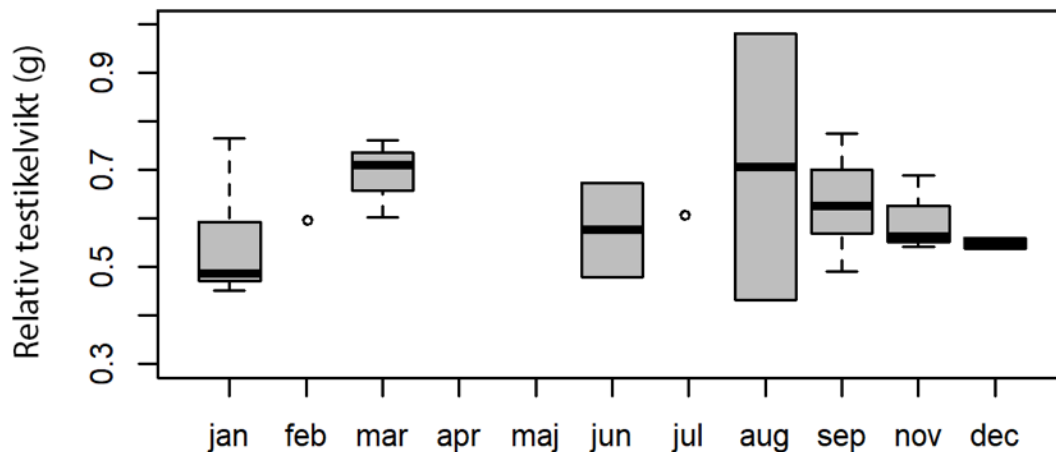
¹: Parad testikelvikt + parad bitestikelvikt, ²: spermiekoncentration \times parad testikelvikt.

Variationer efter säsong hos adulta uttrar

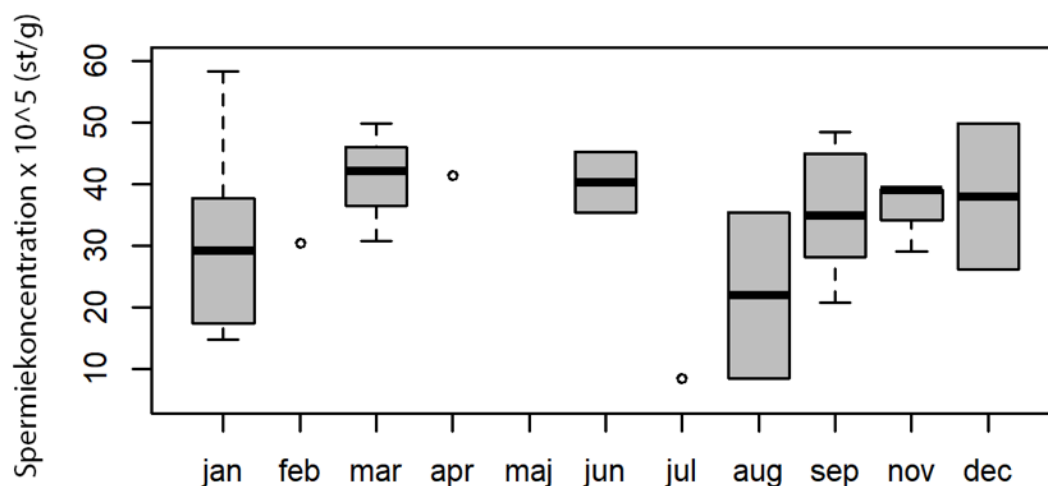
Inga mönster i säsongsvariation kunde upptäckas för parad testikelvikt, relativ testikelvikt eller för spermiekoncentrationen (se mönster i figur 7, 8 och 9 och $p > 0.05$ för majoriteten av de parvisa jämförelserna med t-test). Säsongsvariation kunde inte heller upptäckas för BCI ($p > 0.05$ för alla parvisa jämförelser), se figur 10.



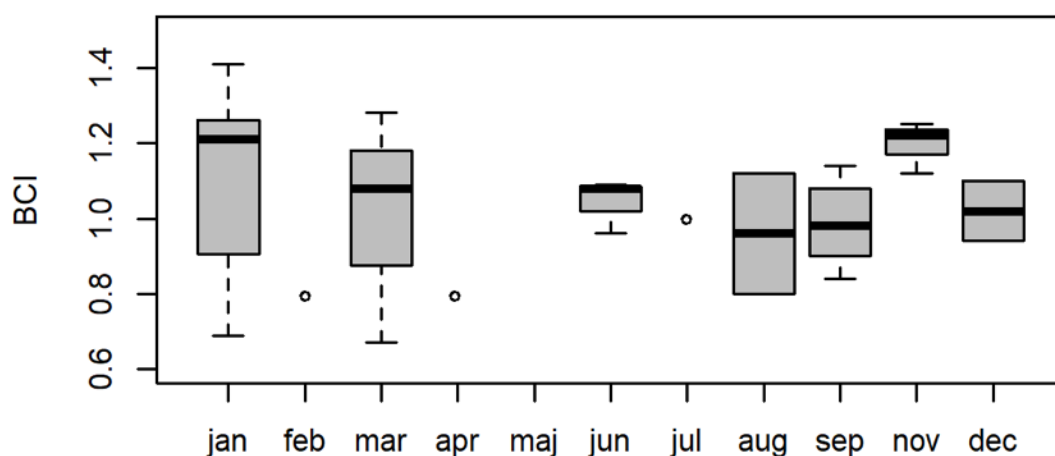
Figur 7. Parad testikelvikt (g), (medel, median, kvartiler och omfång (min, max)) hos adulta uttrar ($n=$) från Sverige över årets månader (januari - december). Antal uttrar per månad (st): januari: 6, februari: 1, mars: 3, april: 0, maj: 0, juni: 2, juli: 1, augusti: 2, september: 7, oktober: 4, november: 3, december: 2.



Figur 8. Relativ testikelvikt (g), (medel, median, kvartiler och omfång (min, max)) hos adulta uttrar ($n=31$) från Sverige över årets månader (januari - december). Antal uttrar per månad (st): januari: 6, februari: 1, mars: 3, april: 0, maj: 0, juni: 2, juli: 1, augusti: 2, september: 7, oktober: 4, november: 3, december: 2.



Figur 9. Spermiiekoncentrationen $\times 10^5$ (st per g testikelvävnad), (medel, median, kvartiler och omfång (min, max)) hos adulta uttrar ($n=34$) från Sverige över årets månader (januari - december). Antal uttrar per månad (st): januari: 7, februari: 1, mars: 3, april: 1, maj: 0, juni: 2, juli: 1, augusti: 2, september: 8, oktober: 4, november: 3, december: 2.



Figur 10. Fördelningen av BCI (medel, median, kvartiler och omfång (min, max)) hos adulta uttrar ($n=35$) från Sverige över årets månader (januari - december). Antal uttrar per månad (st): januari: 7, februari: 1, mars: 3, april: 1, maj: 0, juni: 3, juli: 1, augusti: 2, september: 8, oktober: 4, november: 3, december: 2.

Cystor på sädesledarna

En adult utter saknade uppgifter om cystor, 91 % (31 av 34) av de adulta och 40 % (2 av 5) av de subadulta hade cystor. Antalet subadulta var för få för att kunna studera skillnader i prevalens mellan åldersgrupperna.

DISKUSSION

Åldersgruppering

Vid obduktion kan testikelvikt och baculumlängd utgöra en enkel och användbar vägledning för åldersgruppering då dessa värden är mätbara. Värdena som erhöles i denna studie kan ge en fingervisning, men en större studie behövs för att kunna göra antaganden om populationen i stort. Det vore därför intressant att titta på baculumlängd och testikelvikt hos en större grupp för vilka en säker åldersbestämning genom tandsnittning eller granskning av kraniets utveckling enligt Heggberget (1984) även är utförd.

Kroppslängd

Uttrar från södra Sverige var något större än de från norra Sverige vilket överensstämmer med tidigare studier. Då förklarades denna storleksfördelning med ett varmare klimat i södra Sverige med färre dagar av istäckta sjöar och stabilare tillgång på föda (Yom-Tov *et al.*, 2010). Merparten uttrar i detta arbete är trafikdödade med frakturer på skalle, ryggrad och bäcken, vilket gör att den uppmätta kroppslängden blir godtycklig och utgör ett bias i beräkningar där kroppslängden ingår.

Spermieförekomst i utstryk

Elmeros och Madsen (1999) använde utstryk för att gradera spermieproduktionen. Flera faktorer kan påverka spermieförekomsten i ett utstryk som t.ex. vävnadshantering, utstrykmetod, vilken del av utstryket som avläses eller om djuret nyligen ejakulerat. Detta talar mot användandet av utstryk som metod för gradering av spermieproduktion. Men endast en detektion av spermier året runt, oberoende av koncentration, räcker för att styrka deras hypotes om en kontinuerlig spermieproduktion över året.

Samtliga adulta uttrar i detta arbete hade positiva utstryk vilket innebär att dessa har eller inom en nära anstående tidsperiod haft en spermieproduktion vilket överensstämmer med resultatet av homogenatanalyserna. Två subadulta uttrar hade positiva utstryk vilket kan förklaras med att könsmognad är en process under vilken spermieproduktionen ökar över tid. Detta gör att även en subadult testikel kan ha en förekomst och varierande koncentration av spermier.

Ett negativt utstryk betyder alltså inte att en utter inte har en spermieproduktion då flera felkällor som de ovan nämnda och risken att inte lyckas plocka upp spermier ur en bitestikel med låg spermiekoncentration finns. Spermieutstrykens användbarhet är således begränsad till att endast kunna påvisa en förekomst av spermier.

Spermiekoncentration

En nedsatt spermiekoncentration kan ha multipla bakomliggande faktorer. Det finns en naturlig variation av spermiekoncentration individer emellan och i vilken grad en procentuell minskning av koncentrationen påverkar fertiliteten är artspecifik. En råtta kan t.ex. ha en 90 % reducerad spermiekoncentration utan att deras fertilitet påverkas då de har en hög basalproduktion av spermier (Mably *et al.*, 1992 se: Pflieger-Bruss, Schuppe & Schill, 2004). Resultatet i detta arbete säger således inget om fertilitet eller om den observerade variationen är naturlig.

Metoden för att analysera spermiekoncentrationen i fryst testikelvävnad i olika förruttnelsegrad är beprövad och utvärderad (Persson & Stålheim, 2018). Men för att göra denna metod mer tidseffektiv och praktiskt genomförbar i en screening av en populations reproduktionsstatus, krävs det att proverna prepareras på ett sätt som gör förvaring över tid och analys vid ett senare tillfälle möjligt. Genom att späda homogenatet av testikelvävnad med formalsaline kunde räkningen av homogeniseringsresistenta spermater göras vid ett senare tillfälle.

Hantering av uttrarna under deras väg till NRM är oklar, angivna dödsdatum är ibland osäkra och graden av förruttnelse varierar. Förruttnelsegraden hos uttrarna i detta arbete varierade efter en lång skala. En betydande andel hade tecken på förruttnelse i form av bruna färgförändringar och sönderfallande konsistens vilket kan ha påverkat spermiekoncentrationsresultatet. Andelen spermater som klarar homogeniseringen påverkas alltså i hög grad av förgående vävnadshantering och de klarar av att frysas och tinas en gång, men vid upprepade frysningar reduceras antalet homogeniseringsresistenta spermater (Persson & Stålheim, 2018). Fryskedjan under uttrarnas väg till NRM och vävnaden förruttnelsegrad är därför felkällor man behöver ta hänsyn till.

Variationer efter säsong

Spermiekoncentration

Utterhonor i norra Sverige har en observerad säsongvariation där en klar majoritet av honorna reproducerar sig under våren. Men liksom i Norge har utterhonorna i Sverige visats ha en fysiologisk förmåga till reproduktion året runt (Elmeros & Roos, 2011) och därför borde även de hanliga uttrarna ha en spermieproduktion året runt. (Heggberget & Christensen, 1994). Men en population med basal spermieproduktion året runt, kan även ha säsonger eller omständigheter där en tillfälligt högre spermieproduktion och således högre spermiekoncentration lönar sig (Parker, 1998). Även om den varierande spermiekoncentrationen hos uttrarna i detta arbete inte visade ett mönster efter säsong kan fortfarande ett sådant mönster existera. En region som enhet kan visa ett resultat med en jämn fördelning av reproduktionen över hela året, medan ett mönster efter säsong eventuellt skulle göras synlig om man delade upp regionen efter mindre lokaler och olika slags habitat (Chadwick & Sherrad-Smith, 2010; Beja, 1996). Ett mönster skulle kanske även kunnat framträda om fler uttrar ingått i denna studie.

I en tidigare undersökning av 54 utterhonor i norra Sverige observerades dräktighet endast under vår och sommar (Elmeros & Roos, 2011). Med en dräktighetsperiod på 63 dagar (Chanin, 2013), skulle det förväntas att en säsongsmässigt reproduktivt anpassad hane skulle ha en ökad spermiekoncentration under senvinter till försommar. I detta arbete fanns inga uttrar från april och maj, så det gick därför inte att utvärdera den period då spermieproduktionen hos utterhanar från norra Sverige skulle förväntas vara ökad. Det skulle även varit intressant att dela upp uttrarna från södra och norra Sverige och testa om deras spermiekoncentration hade ett mönster efter säsong var för sig, men antalet uttrar i denna studie var för få för en sådan uppdelning.

Testikelvikter

Den totala parade testikelvikten med bitestikel inräknat skilde sig mellan denna studie och Elmeros och Madsens (1999), där de danska hanliga uttrarna som studerades hade en medelvikt på 10,8 g, min: 3,8 g, max: 17,4 g och SD 3,4. I detta arbete erhöles en medelvikt på 6,6 g, min:

4,3 g, max: 11,4 g och SD:1,7 vilket är anmärkningsvärt lägre resultat än för de danska uttrarna. Detta skulle kunna ha sin förklaring i att det i den danska studien ingick 59 uttrar mot denna studies relativ låga antal, där total parade testikelvikt från 31 uttrar ingick och slumpen kan därför ha orsakat denna skillnad. I den danska studien varierade testikelvikterna mer och standardavvikelsen för den totala parade testikelvikten var 3,4 jämfört med denna studies 1,7. Bitestikeln anatomiska avgränsning från sädesledaren kan vara svår att urskilja och platsen för var bitestikeln avlägsnas från sädesledaren kan ha också påverkat den totala testikelvikten. I likhet med denna studie kunde inte heller en variation i testikelvikt efter säsong ses.

Testikelvikterna för de ryska och vitryska uttrar som ingick i Sidorovich & Tumanovs studie 1994 var mer överensstämmande med detta arbetes erhållna vikter. Medelvärde för total testikelvikt med bitestikel inräknat var 7,3 g, max: 12,6 g, min: 2,1 g och hade också en lägre men fortfarande stor spridning med SD: 3,3. Antalet uttrar som ingick i deras studie var dock endast 22 st.

Ålder inom den adulta gruppen är en tänkbar faktor som därtill skulle kunna påverka testikelvikten, men detta samband har inte studerats i den danska eller ryska studien och en exakt åldersbestämning skulle krävas för en sådan jämförelse vilket inte var möjligt i detta arbete. Testikelvikter kan även tänkas variera med kroppsvikt, men inget sådant samband kunde ses för de svenska uttrarna, och sambandet har inte studerats i den danska eller ryska studien där kroppsvikt inte heller finns presenterade varför en sådan jämförelse inte kan göras. Medparten av uttrarna som ingick i denna studie var trafikdödade där förlust av blod och vävnad kan ha påverkat den riktiga kroppsvikten och maskerat ett eventuellt samband mellan kroppsvikt och testikelvikt.

Kroppskonditionsindex

Resultatet visar på generellt god kroppskondition med avsaknad av säsongmässiga fluktuationer. Detta talar för en hälsosam population med god och stabil tillgång på föda. Ett observandum är att uttrar med lågt BCI endast var funna under januari och mars, vilket kan tyda på att det är en tidsperiod på året då det är generellt svårare för uttern att behålla kroppskonditionen. Att variationen av BCI och spermieproduktionen inte hade ett samband tyder på att åtkomsten av föda under årets kallaste perioder inte är så låg att det förhindrar fysiologisk möjlighet till reproduktion som är en energikrävande process. Men för att kunna uttala sig huruvida detta gäller för populationen i stort, är en studie innefattande fler individer nödvändig.

Konstanterna i formeln för att beräkna BCI är uträknade för den shetländska populationen varför konstanter för den svenska populationen borde beräknas för ett mer tillförlitligt resultat. Eftersom kroppslängden används i beräkningen av BCI utgör denna ytterligare en möjlig felkälla då frakturer efter trafikskada kan göra kroppslängdsmätningen osäker.

Miljögifter och läkemedelsrester

Hormonstörande kemikalier som PCB och läkemedelsrester har visat ge upphov till en nedsatt och varierande spermieproduktion hos ett flertal arter (Pflieger-Bruss *et al.*, 2004). Även om PCB förbjöds på 70-talet har analyser av 48 uttrar från Sverige mellan år 2005-2011 visat att

en tredjedel har högre halter av PCB än de som visat ge reproduktionsstörningar hos mink (Roos, 2012).

Roos & Ågren (2013) rapporterade att 72 % av hanarna som kom in till NRM mellan 1999-2012 hade cystor på sädesledarna. Författarna misstänker att cystorna är rester av persisterade müllerska gångar (Meyers-Wallen *et al.*, 1993, se Roos & Ågren, 2013) som troligtvis inte påverkar fertiliteten då de inte ockluderar sädesledarna. De diskuterar också att det är möjligt att cystorna bildats på grund av en prenatal exponering av östrogenliknande substanser, då detta observerats i laboratorieförsök på möss utförda av Newbold *et al.* (1987).

2017 undersöktes läkemedelsrester i blod och urin från uttrar över hela landet. Denna rapport är ännu inte publicerad, men 20 % av uttrarna hade spår av östrogenlika substanser, 73 % av paracetamol och hos 50 % spår av risperidone (Roos A. Naturhistoriska Riksmuseet, pers. medd., 2019-08-13). Alla dessa substanser har visats ha hormonstörande egenskaper med en påverkan på det hanliga könet (Albert *et al.*, 2013; Mishra & Mohanty, 2010). Förutom PCB och läkemedelsrester står uttern inför flera nya potentiella hot bl.a. av poly- och perfluorerade ämnen (PFAS), varav halterna i utter för vissa av dessa visats vara mycket höga och kraftigt ökande (Roos & Benskin, 2016).

SLUTSATS

Utterhonorna i Sverige uppvisar en säsongsmässigt anpassad reproduktion men har en fysiologisk möjlighet till reproduktion året runt. För att reproduktion ska vara möjlig året runt måste också hanarnas spermieproduktion vara aktiv året runt, vilket även detta arbete tyder på. Ett säsongsmässigt mönster i den svenska populationens spermieproduktion kan dock finnas och möjligtvis synliggöras i en studie innefattande fler individer. Dessutom kan även skillnader mellan geografiska områden framträda i en större studie vilket kan jämföras med lokalisation av industrier och vattenreningsverk. Spermiekoncentrationen vore även intressant att jämföra med uppmätta halter av läkemedelsrester och miljögifter i blod, urin och vävnad hos den undersökta individen.

Den observerade variationen i spermiekoncentration kan bero på andra yttre faktorer som t.ex. läkemedelsrester och miljögifter eller *post mortem* faktorer som t.ex. vävnadshantering. Även testikelvikten varierade mycket. Därför bör en histologisk undersökning av testiklar genomföras. En utvärdering av spädningens förvaringsegenskaper över tid och vävnadshanteringen bör utföras innan metoden används i större skala.

Med anledning av utterns historia, de halter av miljögifter och läkemedelsrester som analyser av uttervävnad visat och den cocktaileffekt och de hormonstörande egenskaper dessa föroreningar kan ha är det av stor vikt att fortsätta övervakningen av uttern och dess reproduktion. Särskilt då en stor variation i spermiekoncentration som inte kunde förklaras med testade variabler observerades i detta arbete.

TACK

Stort tack till Annlouise Jansson på KV-lab (Institutionen för kliniska vetenskaper, SLU) för hjälp med räkning av spermier. Tack Sara Persson och Anna Roos för all hjälp med statistik, utlånande av litteratur, råd och inspiration. Tack Neele Doose på NRM för assistans i det praktiska arbetet, och slutligen Simon Kärverno för hjälp med karta och figurer.

POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING

Den Europeiska uttern finns idag i nästan hela landet men har en historia av populationskollaps både i Sverige och i större delarna av sin utbredning i Europa. En bidragande orsak till populationskollapsen skulle kunna vara de höga halter av miljögiften PCB som man har hittats i uttern, eftersom man har sett att detta miljögift kan ge reproduktionsstörningar hos minkar i kontrollerade experiment. Troligtvis orsakade PCB även problem hos sälar, som också var utrotningshotade under samma tidsperiod som uttern.

Trots att utterns reproduktion troligtvis varit påverkad av miljögifter har den hanliga utterns reproduktion i Sverige inte blivit grundligt studerad. Det är oklart om den reproducerar sig under en viss period av året, så kallad säsonganpassad reproduktion, eller om den kan reproducera sig året runt. I detta arbete granskades därför spermieproduktionens variation över året för att undersöka om den svenska hanliga uttern visar tecken på säsongsvärerad reproduktion.

Resultatet i denna studie pekade mot att utterhanar i Sverige inte har en reproduktion anpassad efter säsong, men antalet uttrar i studien skulle behövt vara större. Detta stämmer överens med tidigare studier gjorda på utterhonor i landet, som visade en viss säsongsvärerad reproduktion men med en kroppslig möjlighet till reproduktion året runt. Detta innebär att en hona som förlorat en kull kan reproducera sig igen samma år istället för att ett helt år ska gå förlorat i väntan på nästa parningssäsong. För att detta ska kunna ske måste det även finnas en reproduktivt aktiv hane redo för en lyckad reproduktion.

Spermieproduktionen hos uttrarna i denna undersökning visades dock variera mycket individer emellan. Även testikelvikten varierade mycket. Som tidigare nämnt kunde inget mönster efter säsong identifieras och variationen kunde inte heller förklaras med de övriga faktorer som undersöktes i detta arbete. De faktorer som undersöktes var kroppsliga mått, vilka förväntades kunna ha en påverkan på spermieproduktionen. En variation i spermieproduktion kan vara helt naturlig, men kan också vara orsakad av ett flertal andra orsaker, som till exempel exponering av miljögifter och läkemedelsrester under fosterutvecklingen eller senare i livet, eller hur vävnaden hanteras innan och under provtagning.

Uttern tillhör statens vilt vilket är en lagparagraf som innebär att en anträffad död utter måste rapporteras till polisen, som skickar uttern till Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) eller Naturhistoriska riksmuseet (NRM). På NRM sker en kontinuerlig miljöövervakning av uttern med fokus på miljögifter. I detta övervakningsarbete obduceras uttern och prover sparas för senare studier. Halter av miljögifter och föroreningar kan senare analyseras och visa samband med exempelvis förändringar som påträffas under obduktion. Uttern fungerar på så vis som en larmklocka för ohälsosamma förändringar i miljön, för både djur och människor. Resultatet av denna studie kan på så vis bidra till miljöövervakningen, då det är avgörande att känna till uttrarnas naturliga reproduktion för att en onaturlig förändring av reproduktionen ska kunna upptäckas.

För detta arbete studerades 41 uttrar som obducerades på NRM. Mått på kroppsliga faktorer som misstänktes kunna påverka spermieproduktionen dokumenterades. Ett gram testikelvävnad

från varje utter skars ut och homogeniserades var för sig. Homogenisering innebär att man med en homogenisator, som fungerar som en stavmixer, slår sönder testikelns celler och beståndsdelar, något som endast spermiernas huvuden klarar av och de förblir därför hela. Dessa kan därefter räknas i mikroskop och en koncentration erhålls genom att sätta in det beräknade spermieantalet i en matematisk formel.

Spermiekoncentrationen jämfördes med hjälp av statistik med de andra måtten som dokumenterades under obduktion för att identifiera faktorer som påverkar spermieproduktionen. Spermiekoncentrationens fördelning över årets månader studerades statistiskt och visuellt med hjälp av diagram för att identifiera en eventuell säsongsberoende variation. Samband mellan testikelvikt, spermiekoncentration, kroppslängd och kroppsvikt studerades även visuellt i diagram. Utifrån dessa åldersgrupperades uttrarna som vuxna eller ”tonåringar”. På så vis togs värden för de mått som kan fungera som vägledning för åldersgruppering under obduktion fram, vilket kan underlätta obduktionsarbetet i miljöövervakningen och styrka tidigare observationer.

Antalet uttrar som ingick i detta arbete var få och resultaten kan därför inte förväntas gälla för hela populationen utan endast ses som en fingervisning. Detta kan även ha maskerat ett eventuellt mönster av spermieproduktionens efter säsong, vilket möjligtvis skulle kunna synliggöras om fler individer ingått i studien. Även ett mönster efter geografiskt område skulle kunna framträda i en studie innefattande fler uttrar. Ett sådant mönster skulle därefter kunna jämföras med lokaliseringer av till exempel vattenreningsverk och industrier där halter av miljögifter och läkemedelsrester förväntas vara högre.

Med anledning av utterns historia, den observerade variationen av spermieproduktionen och de halter av miljögifter och läkemedelsrester som analyser av uttervävnad än idag visar, är det av stor vikt att fortsätta övervakningen av uttern och dess reproduktion. Särskilt då en reducerad spermieproduktion utan fastställd orsak har observerats för flera djurarter – inklusive människan.

REFERENSER

- Albert, O., Desdoits-Lethimonier, C., Lesné, L., Legrand, A., Guillé, F., Bensalab, K., Dejuq-Rainsford, N. & Légou, B. (2013). Paracetamol, aspirin and indomethacin display endocrine disrupting properties in the adult human testis in vitro. *Human Reproduction*, 28:1890–1898.
- Amstislavsky, S. & Ternovskaya, Y. (2000). Reproduction in mustelids. *Animal Reproduction Science*, 60-61:571-581.
- Beja, P.R. (1996). Seasonal breeding and food resources of otters, *Lutra lutra* (Carnivora mustelidae), in south-west Portugal: a comparison between coastal and inland habitats. *Mammalia*, 60:27-34.
- Bisther, M. & Roos, A. (2006). *Uttern i Sverige 2006*. Världsnaturfonden WWF.
- Chadwick, E.A. & Sherrad-Smith, E. (2010). Pregnancy among otters (*Lutra lutra*) found dead in England and Wales: Foetal development and lack of seasonality. *IUCN Otter Specialist Group Bulletin*, 27:1.
- Chanin, P. (2013). *Otters*. 2. ed. Essex: Whittet Books Ltd.
- Conroy, J.W.H. & Bacon, P.J. (2005). Seasonal breeding in Eurasian otters (*Lutra lutra*) with specific reference to Scotland. I: Conroy, J.W.H., Yoxon, G., Gutleb, A. C. & Ruiz-Olmo, J., *Return of the otter in Europe - where and how?* Sabhal Mor Ostaig: International Otter Survival Fund.
- Elmeros, M. & Madsen, A.B. (1999). On the reproduction of otters (*Lutra lutra*) from Denmark. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 64:193-200.
- Elmeros, M. & Roos, A. (2011). Reproductive timing in the Eurasian otter *Lutra lutra* along a climate gradient. *Hystrix Italian Journal of Mammology*, 11:54.
- Erlinge, S. & Nilsson, T. (1976). Hur skall det gå för uttern? *Svensk Jakt*, 11.
- Erlinge, S. & Nilsson, T. (1978). Nedslående inventeringsresultat: Uttern fortsätter att minska. *Svensk Jakt*, 3:154.
- Estes, J.A. (1989). Adaptations for aquatic living by Carnivores. I: Gittleman, J.L., *Carnivore Behavior, Ecology, and Evolution*, Knoxville: University of Tennessee, 242–282.
- Friley, C.E. (1949). Age determination, by use of the baculum, in the river otter, *Lutra c. canadensis*. *Journal of Mammalogy*, 30:102.
- Gärdenfors, U. (2010). *Manual och riktlinjer för rödlistning i Sverige 2010*. Uppsala: Artdatabanken, SLU.
- Hauer, S., Ansorge, H. & Zinke, O. (2002). Reproductive performance of otters *Lutra lutra* (Linnaeus, 1758) in Eastern Germany: low reproduction in a long-term strategy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 77:329-340.
- Heggberget, T.M. (1984). Age determination in the European otter *Lutra lutra lutra*. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 49:299-305.
- Heggberget, T.M. & Christensen, H. (1994). Reproductive timing in Eurasian otters on the coast of Norway. *Ecography*, 17:339-348.
- Hung, N., & Law, C.J. (2016). *Lutra lutra* (Carnivora: Mustelidae). *Mammalian Species*, 48(940), 109–122.
- Kruuk, H., Conroy, H.W. J. & Moorhouse, A. (1987). Seasonal reproduction, mortality and food of otters (*Lutra lutra* L.) in Shetland. I: Harris, S. *Mammal population studies*. Oxford: The Zoological Society of London, 263-277.

- Leonards, P. (1997). *PCBs in mustelids*. Amsterdam: Vrije Universiteit.
- Macdonald, S.M. & Mason, C.F. (1992). *Status and conservation needs of the otter (Lutra lutra) in the Western Palearctic*. Colchester: University of Essex.
- Meyers-Wallen, V.N., Lee, M.M., Manganaro, T.F., Kuroda, T., Maclaughlin, D. & Donahoe, P.K. (1993). Müllerian inhibiting substance is persistent in embryonic testes of dogs with persistent müllerian duct syndrome. *Biology of Reproduction* 48:1410-1418.
- Mishra, A.C. & Mohanty, B. (2010). Lactational exposure to atypical antipsychotic drugs disrupts the pituitary-testicular axis in mice neonates during post-natal development. *Journal of Psychopharmacology*, 24:1097–1104.
- Negus, N.C. & Berger, P. (1987). Mammalian reproductive physiology. I: Genoways, H.H. (ed.), *Current Mammalogy*, vol 1. New York: Plenum Publishing, 149-173.
- Newbold, R.R., Bullock, B.C. & McLachlan, J.A. (1987). Müllerian remnants of male mice exposed prenatally to diethylstilbestrol. *Teratogenesisi Carcinogenesis Mutagenesis*, 7:377-389.
- Oftedal, O.T. & Gittleman, J.L. (1989). Patterns of energy output during reproduction in carnivores I: Gittleman, J.L. *Carnivore, ecology and evolution*. Knoxville: University of Tennessee, 355-377.
- Parker, G.A. (1998). Sperm competition and the evolution of ejaculates: Towards a theory base. I: Birkhead, T.R. & Møller, A.P. (eds), *Sperm Competition and Sexual Selection*, London: Academic Press, 3–54.
- Persson, S. & Stålheim, C. (2018). Homogenization-resistant spermatids in testicular tissue stored under suboptimal conditions - effect of time and temperature. *Reproduction in Domestic Animals*, 53(6):1575-1579. doi:10.1111/rda.13307. [2019-09-16]
- Pflieger-Bruss, S., Schuppe, H.C. & Schill, W.B. (2004). The male reproductive system and its susceptibility to endocrine disrupting chemicals. *Andrologia*, 36(6):337–345.
- Roos A. (2012). *Uttern i Sverige. Miljögifter, dödsorsaker och rapporter 2005-2011*. Stockholm: Naturhistoriska Riksmuseet. (12:2012).
- Roos, A. & Benskin, J. (2016). *Perflourerade ämnen i utter från Sverige 1970-2015*. Stockholm: Naturhistoriska Riksmuseet. (1:2016).
- Roos, A.M., Bäcklin, B.M., Helander, B.O., Rigét, F.F. & Eriksson, U.C. (2012). Improved reproductive success in otters (*Lutra lutra*), grey seals (*Halichoerus grypus*) and sea eagles (*Haliaeetus albicilla*) from Sweden in relation to concentrations of organochlorine contaminants. *Environmental Pollution*, 170:268–275.
- Roos, A., Loy, A., de Silva, P., Hajkova, P. & Zemanová, B. (2015). *Lutra lutra*. (*The IUCN red list of threatened species*), Gland: The International Union for Conservation of Nature.
- Roos, A. & Ågren E.O. (2013). High prevalence of proposed Müllerian duct remnant cysts on the spermatic duct in wild Eurasian otters (*Lutra lutra*) from Sweden. *PLoS ONE*, 12: e84660.
- Ruiz-Olmo, J. & Jiménez, J. (2008). Diet diversity and breeding of top predators are determined by habitat stability and structure: a case study with the Eurasian otter (*Lutra lutra* L.). *European Journal of Wildlife Research*, 55:133-144.
- Sidorovich, V.E. & Tumanov, I.L. (1994). Reproduction in otters in Belarus and north-western Russia. *Acta Theriologica*, 39(1):59-66.
- Sjaastad, Ø.V., Sand, O. & Hove, K. (2010). *Physiology of domestic animals*. 2. ed. Oslo: Scandinavian Veterinary Press.

- Sonne, C., Leifsson, P.S., Dietz, R., Born, E.W., Letcher, R.J., Hyldstrup, L. & Muir, D.C.G. (2006). Xenoendocrine pollutants may reduce size of sexual organs in east Greenland polar bears (*Ursus maritimus*). *Environmental Science & Technology*, 40:5668–5674.
- Stålheim, C. (2018) *Effekt av tid och temperatur på homogeniseringsresistenta spermatiser*. Sveriges lantbruksuniversitet. Veterinärprogrammet (Examensarbete 2018:86).
- Vasantha, I. (2016). Physiology of seasonal breeding: A review. *Journal of Veterinary Science & Technology*, 7:3.
- Yom-Tov, Y., Roos, A., Mortensen, P., Wiig, Ø., Yom-Tov, S. & Heggberget, T.M. (2010). Recent changes in body size of the Eurasian otter *Lutra lutra* in Sweden. *AMBIO*, 39:496-503.