

Analysen av miljø-DNA for påvisning av elvemusling

På oppdrag fra Fylkesmannen i Rogaland

Frode Fossøy, Hege Brandsegg, Rolf Sivertsgård

Trondheim 21.01.2021

UPUBLISERT

TILGJENGELIGHET

Åpen

PROSJEKTLEDER

Frode Fossøy

ANSVARLIG FORSKNINGSSJEF

Ingeborg Palm Helland

OPPDRAGSGIVER(E)/BIDRAGSYTER(E)

Fylkesmannen i Rogaland

OPPDRAGSGIVERS REFERANSE

KONTAKTPERSON(ER) HOS OPPDRAGSGIVER/BIDRAGSYTER

Stig Sandring

Innhold

| | |
|---------------------------------------|----------|
| 1 Innledning..... | 3 |
| 1.1 Bakgrunn..... | 3 |
| 1.2 Formål..... | 3 |
| 2 Material og metode..... | 4 |
| 2.1 Prøvetaking..... | 4 |
| 2.2 Labanalyser | 5 |
| 3 Resultater og diskusjon..... | 5 |
| 4 Litteratur | 7 |

1 Innledning

1.1 Bakgrunn

Analysen av miljø-DNA er en ny metode for overvåking av arter og økosystemer der innsamling av prøver ikke er avhengig av langvarig innsats eller taksonomisk ekspertise i felt (Thomsen & Willerslev 2015, Valentini mfl. 2016). Denne metoden har vist seg å være svært effektiv med tanke på overvåking av truede arter samtidig som den muliggjør innsamling av prøver ved hjelp av publikum (Thomsen mfl. 2012b, Biggs mfl. 2015).

Metoden drar nytte av at alle organismer frigir DNA til omgivelsene sine. Dette er det dermed mulig å samle inn ved filtrering av vannprøver. Med arts-spesifikke genetiske markører er det mulig å påvise tilstedeværelsen av en enkelt art eller hele taksonomiske grupper. Da DNA brytes ned raskt i naturen, vil en påvisning av en eller flere arter indikere en stor sannsynlighet for at denne eller disse finnes på den undersøkte lokaliteten eller har vært i området innenfor en relativ kort periode. Metoden er svært sensitiv og det trengs i prinsippet kun en enkelt DNA-kopi for arten som ønskes undersøkt, for å kunne påvise tilstedeværelsen av denne. Derfor har metoden frem til nå primært vært brukt til å finne sjeldne arter (Thomsen mfl. 2012b) og/eller uønskete fremmede arter (Balasingham mfl. 2017). Sammenligning med konvensjonelle metoder har vist at miljø-DNA-metoden er mer sensitiv og finner flere arter (Thomsen mfl. 2012a).

NINA har i løpet av de siste årene utviklet både prøvetakingsutstyr og molekylære verktøy for analyser av miljø-DNA og har verifisert protokoller for mange akvatiske organismer (Fossøy mfl. 2017, Taugbøl mfl. 2017, Fossøy mfl. 2018, Taugbøl mfl. 2018, Fossøy mfl. 2019, Wacker mfl. 2019).

1.2 Formål

NINA har på bestilling fra Fylkesmannen i Rogaland undersøkt tilstedeværelse av elvemusling (*Margaritifera margaritifera*) ved hjelp av miljø-DNA.

2 Material og metode

2.1 Prøvetaking

Miljø-DNA-prøver ble samlet inn av oppdragsgiver (**Tabell 1**). Vann ble filtrert gjennom et NatureMetrics filter ved hjelp av en batteridrevet peristaltisk pumpe (Bürkle Vampire). Filtrene ble lagret i ATL-buffer (Qiagen) frem til videre analyser i lab.

Tabell 1. Oversikt over prøver innsamlet for påvisning av elvemusling i dette studiet.

| Løpnummer | Lokalitet | Stasjonsnummer | Kommune | Bredde-grad | Lengde-grad | Dato | Tidspunkt | Vannvolum | Vanntemperatur |
|-----------|----------------|----------------|-------------|-------------|-------------|------------|-----------|-----------|----------------|
| 1 | Steinsåna | 1A | Suldal | 6596193 | 354779 | 05.08.2020 | 20:50 | 6.0 | 13.1 |
| 2 | Steinsåna | 2A | Suldal | 6596458 | 354986 | 05.08.2020 | 21:35 | 6.0 | 13.1 |
| 3 | Steinsåna | 3A | Suldal | 6597127 | 355402 | 05.08.2020 | 22:20 | 6.0 | 12.3 |
| 4 | Oselva | 1A | Vindafjord | 6612207 | 320788 | 06.08.2020 | 09:45 | 6.0 | 12.9 |
| 5 | Oselva | 2A | Vinda fjord | 6611801 | 321019 | 06.08.2020 | 11:21 | 6.0 | 13.2 |
| 6 | Aurdalsåna | 1A | Vindafjord | 6605417 | 313689 | 06.08.2020 | 14:21 | 4.0 | 13.7 |
| 7 | Aurdalsåna | 1B | Vindafjord | 6605417 | 313689 | 06.08.2020 | 14:21 | 5.0 | 13.7 |
| 8 | Alvseikjeåna | 1A | Vindafjord | 6605350 | 313517 | 06.08.2020 | 15:10 | 5.0 | 15.1 |
| 9 | Alvseikjeåna | 1B | Vindafjord | 6605350 | 313517 | 06.08.2020 | 15:10 | 5.0 | 15.1 |
| 10 | Blikraåna | 1A | Vindafjord | 6602981 | 314035 | 06.08.2020 | 17:15 | 6.0 | 15.5 |
| 11 | Blikraåna | 1B | Vindafjord | 6602981 | 314035 | 06.08.2020 | 17:15 | 6.0 | 15.5 |
| 12 | Eltarvågbekken | 1A | Stavanger | 6558053 | 312274 | 07.08.2020 | 13:15 | 5.0 | 17.8 |
| 13 | Eltarvågbekken | 1B | Stavanger | 6558053 | 312274 | 07.08.2020 | 13:15 | 4.5 | 17.8 |
| 14 | Svinalibekken | 1A | Tysvær | 6590057 | 306246 | 17.08.2020 | 12:50 | 5.0 | 21.4 |
| 15 | Svinalibekken | 2A | Tysvær | 6589639 | 305966 | 17.08.2020 | 14:50 | 5.0 | 21.4 |
| 16 | Sagelva | 1A | Vindafjord | 6599779 | 309499 | 17.08.2020 | 15:20 | 3.0 | 22.3 |
| 17 | Sagelva | 1B | Vindafjord | 6599779 | 309499 | 17.08.2020 | 15:20 | 3.0 | 22.3 |
| 18 | Bjergaelva | 1A | Vindafjord | 6600879 | 310678 | 17.08.2020 | 17:15 | 5.0 | 19.4 |
| 19 | Hellelandselva | 1A | Egersund | 6492365 | 334903 | 16.09.2020 | 19:00 | 7.0 | 12.8 |
| 20 | Hellelandselva | 1B | Egersund | 6492365 | 334903 | 16.09.2020 | 19:00 | 7.0 | 12.8 |
| 21 | Hellelandselva | 2A | Egersund | 6490572 | 330889 | 16.09.2020 | 21:50 | 5.0 | 12.7 |
| 22 | Hellelandselva | 2B | Egersund | 6490572 | 330889 | 16.09.2020 | 21:50 | 6.0 | 12.7 |
| 23 | Hellelandselva | 3A | Egersund | 6488498 | 327705 | 16.09.2020 | 22:50 | 5.0 | 12.3 |
| 24 | Hellelandselva | 4A | Egersund | 6487219 | 327239 | 16.09.2020 | 23:50 | 5.0 | 12.7 |
| 25 | Hellelandselva | 5A | Egersund | 6486095 | 326854 | 17.09.2020 | 09:15 | 5.0 | 12.4 |
| 26 | Hellelandselva | 6A | Egersund | 6485841 | 326815 | 17.09.2020 | 10:50 | 3.5 | 12.4 |
| 27 | Hellelandselva | 7A | Egersund | 6483728 | 325171 | 17.09.2020 | 12:45 | 5.0 | 13.2 |
| 28 | Hellelandselva | 7B | Egersund | 6483728 | 325171 | 17.09.2020 | 13:25 | 5.0 | 13.2 |
| 29 | Bjerkreimselva | 1A | Egersund | 6486044 | 324861 | 17.09.2020 | 14:50 | 8.0 | 13.4 |

| | | | | | | | | | |
|----|----------------|----|------------|---------|--------|------------|-------|------|------|
| 30 | Bjerkreimselva | 1B | Egersund | 6486044 | 324861 | 17.09.2020 | 15:50 | 10.0 | 13.4 |
| 31 | Hommersåk | 1A | Sandnes | 6535800 | 318880 | 18.09.2020 | 11:30 | 8.0 | 13.7 |
| 32 | Vågselv | 1A | Vindafjord | 6610950 | 316049 | 27.09.2020 | 16:40 | 4.5 | 11.2 |
| 33 | Vågselv | 1B | Vindafjord | 6610950 | 316049 | 27.09.2020 | 16:40 | 3.0 | 11.2 |

2.2 Labanalyser

DNA ble isolert fra filterprøvene ved hjelp av en NucleoSpin Plant II (Machery-Nagel) protokoll. En arts-spesifikk markør for elvemusling (Carlsson mfl. 2017) ble analysert ved bruk av qPCR. En qPCR-analyse oppformerer en liten bit av DNA bestemt av den genetiske markøren man bruker ved hjelp av et varmesensitivt enzym og en maskin som justerer temperaturen opp og ned i mange repeterte sykler. En prøve regnes som positiv dersom man ser en klar økning av DNA-konsentrasjonen målt ved hjelp av fluorescens under PCR-analysen. C_T -verdien viser hvor mange PCR-sykler det tar før DNA-mengden gir et klart fluorescens signal, og vil sammen med en standardkurve basert på en kjent konsentrasjon av elvemusling-DNA inkludert i den samme analysen brukes til å angi konsentrasjonen av elvemusling-DNA i prøven. En lavere C_T betyr derfor høyere konsentrasjoner av DNA. Alle prøver ble kjørt i triplikater, sammen med en positiv kontroll av elvemusling-DNA og negative kontrollprøver. For å kunne karakterisere en prøve som positiv i en qPCR-analyse forventer vi at minst to av tre replikater skal være positive.

2.3 Resultater og diskusjon

Alle prøvene ble kjørt i triplikater for elvemusling på qPCR. **Tabell 2** viser hvor mange av triplikatene som ble positive, og gjennomsnittlig C_T -verdi for disse prøvene. En prøve ble karakterisert som positiv når minst to av triplikatene var positive.

I denne studien kunne vi påvise elvemusling i Eltarvågbekken, Sagelva, Bjergaelva, Hellelandselva og Bjerkreimselva (**Tabell 2**). I Sagelva og Bjerkreimselva var bare en av de to felprøvene positive. I Sagaelva var bare to av tre replikater positive, og C_T -verdien var svært høy, vi regner derfor dette resultatet som usikkert.

Falske positive resultater kan forekomme i miljøDNA-analyser, men man prøver å unngå disse ved å sette strenge kriterier. Vi kan likevel ikke helt utelukke at noen av de positive prøvene kan være falske positive. Det kan derfor være nødvendig å følge opp resultatet fra miljøDNA-prøvene ved å gjennomføre et tradisjonelt søk på lokalitetene ved vading i elveløpet og bruk av vannkikkert.

Usikkerheten rundt en negativ prøve er ikke kjent. At en art *ikke* blir påvist kan skyldes flere årsaker, som for eksempel vannkvalitet i lokaliteten, temperatur, tetthet av arten, prøvevolumet som ble innsamlet samt behandling og analysing av prøven på lab. En negativ miljø-DNA-prøve bør derfor ikke sees på som et endelig bevis for at arten ikke finnes i lokaliteten.

Tabell 2. Resultater fra qPCR-analyser av vannprøvene. Alle prøvene ble kjørt i PCR-triplikater, og en prøve ble karakterisert som positiv når minst to av triplikatene var positive (grønn farge).

| Løpnummer | Lokalitet | Stasjonsnummer | PCR | C_T Mean | C_T SD |
|-----------|-----------|----------------|-----|------------|----------|
| 1 | Steinsåna | 1A | 0/3 | | |
| 2 | Steinsåna | 2A | 1/3 | 41.03 | |
| 3 | Steinsåna | 3A | 0/3 | | |

| | | | | | |
|----|----------------|----|-----|-------|------|
| 4 | Oselva | 1A | 0/3 | | |
| 5 | Oselva | 2A | 0/3 | | |
| 6 | Aurdalsåna | 1A | 0/3 | | |
| 7 | Aurdalsåna | 1B | 0/3 | | |
| 8 | Alvseikjeåna | 1A | 0/3 | | |
| 9 | Alvseikjeåna | 1B | 0/3 | | |
| 10 | Blikraåna | 1A | 0/3 | | |
| 11 | Blikraåna | 1B | 0/3 | | |
| 12 | Eltarvågbekken | 1A | 3/3 | 37.13 | 0.78 |
| 13 | Eltarvågbekken | 1B | 3/3 | 37.73 | 1.40 |
| 14 | Svinalibekken | 1A | 0/3 | | |
| 15 | Svinalibekken | 2A | 0/3 | | |
| 16 | Sagelva | 1A | 0/3 | | |
| 17 | Sagelva | 1B | 2/3 | 40.06 | 0.11 |
| 18 | Bjergaelva | 1A | 3/3 | 31.77 | 0.24 |
| 19 | Hellelandselva | 1A | 0/3 | | |
| 20 | Hellelandselva | 1B | 0/3 | | |
| 21 | Hellelandselva | 2A | 0/3 | | |
| 22 | Hellelandselva | 2B | 0/3 | | |
| 23 | Hellelandselva | 3A | 0/3 | | |
| 24 | Hellelandselva | 4A | 0/3 | | |
| 25 | Hellelandselva | 5A | 3/3 | 30.72 | 0.07 |
| 26 | Hellelandselva | 6A | 3/3 | 30.72 | 0.07 |
| 27 | Hellelandselva | 7A | 3/3 | 35.76 | 0.19 |
| 28 | Hellelandselva | 7B | 3/3 | 36.82 | 0.45 |
| 29 | Bjerkreimselva | 1A | 3/3 | 38.46 | 0.50 |
| 30 | Bjerkreimselva | 1B | 0/3 | | |
| 31 | Hommersåk | 1A | 0/3 | | |
| 32 | Vågselv | 1A | 0/3 | | |
| 33 | Vågselv | 1B | 0/3 | | |

3 Litteratur

- Balasingham, KD, Walter, RP, Mandrak, NE & Heath, Daniel D. 2017. Environmental DNA detection of rare and invasive fish species in two Great Lakes tributaries. *Molecular Ecology* 27(1): 112-127.
- Biggs, J, Ewald, N, Valentini, A, Gaboriaud, C, Dejean, T, Griffiths, RA, Foster, J, Wilkinson, JW, Arnell, A, Brotherton, P, Williams, P & Dunn, F. 2015. Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation* 183(0): 19-28.
- Carlsson, JEL, Egan, D, Collins, PC, Farrell, ED, Igoe, F & Carlsson, J. 2017. A qPCR MGB probe based eDNA assay for European freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 27(6): 1341-1344.
- Fossøy, F, Dahle, S, Eriksen, LB, Spets, MH, Karlsson, S & Hesthagen, T. 2017. Bruk av miljø-DNA for overvåking av fremmede fiskearter - utvikling av artsspesifikke markører for gjedde, mort og ørekyt. Norsk institutt for naturforskning. NINA Rapport 1299.
- Fossøy, F, Thaulow, J, Anglès d'Auriac, M, Brandsegg, H, Sivertsgård, R, Mo, TA, Sandlund, OT & T., H. 2018. Bruk av miljø-DNA som supplerende verktøy for overvåking og kartlegging av fremmed ferskvannsfisk. Norsk institutt for naturforskning. NINA Rapport 1586.
- Fossøy, F, Brandsegg, H, Sivertsgård, R, Pettersen, O, Sandercock, BK, Solem, Ø, Hindar, K & Mo, TA. 2019. Monitoring presence and abundance of two gyrodactylid ectoparasites and their salmonid hosts using environmental DNA. *Environmental DNA* in press.
- Taugbøl, A, Dervo, BK, Bærum, KM, Brandsegg, H, Sivertsgård, R, Ytrehus, B, Miller, A & Fossøy, F. 2017. Første påvisning av den patogene soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) i Norge - Bruk av miljø-DNA for påvisning av fremmede arter. Norsk institutt for naturforskning NINA Rapport 1399: 25.
- Taugbøl, A, Dervo, BK, Sivertsgård, R, Brandsegg, H & Fossøy, F. 2018. Bruk av miljø-DNA til overvåking av små- og storsalamander. Norsk institutt for naturforskning NINA-Rapport 1476.
- Thomsen, PF, Kielgast, J, Iversen, LL, Møller, PR, Rasmussen, M & Willerslev, E. 2012a. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS ONE* 7(8): e41732.
- Thomsen, PF, Kielgast, JOS, Iversen, LL, Wiuf, C, Rasmussen, M, Gilbert, MTP, Orlando, L & Willerslev, E. 2012b. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology* 21(11): 2565-2573.
- Thomsen, PF & Willerslev, E. 2015. Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation* 183(0): 4-18.
- Valentini, A, Taberlet, P, Miaud, C, Civade, R, Herder, J, Thomsen, PF, Bellemain, E, Besnard, A, Coissac, E, Boyer, F, Gaboriaud, C, Jean, P, Poulet, N, Roset, N, Copp, GH, Geniez, P, Pont, D, Argillier, C, Baudoin, J-M, Peroux, T, Crivelli, AJ, Olivier, A, Acqueberge, M, Le Brun, M, Møller, PR, Willerslev, E & Dejean, T. 2016. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 25(4): 929-942.
- Wacker, S, Fossøy, F, Larsen, BM, Brandsegg, H, Sivertsgård, R & Karlsson, S. 2019. Downstream transport and seasonal variation in freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) eDNA concentration. *Environmental DNA* 10.1002/edn3.10.

Norsk institutt for naturforskning

NINA Hovedkontor

Postadresse: Postboks 5685 Torgarden, 7485 Trondheim

Besøks-/leveringsadresse: Høgskoleringen 9, 7034 Trondheim

Telefon: 73 80 14 00, Telefaks: 73 80 14 01

E-post: firmapost@nina.no

Organisasjonsnummer 9500 37 687

<http://www.nina.no>



Samarbeid og kunnskap for framtidens miljøløsninger