

Analyser av miljø-DNA for påvisning av elvemusling 2021

På oppdrag fra Statsforvalteren i Rogaland

Frode Fossøy, Hege Brandsegg, Rolf Sivertsgård

Trondheim 24.5.2022

UPUBLISERT

TILGJENGELIGHET

Åpen

PROSJEKTLEDER

Frode Fossøy

ANSVARLIG FORSKNINGSSJEF

Ingeborg Palm Helland

OPPDRAGSGIVER(E)/BIDRAGSYTER(E)

Statsforvalteren 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
2.3 Resultater og diskusjon.....	6
3 Litteratur	10

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 sjeldne arter samtidig som den muliggjør innsamling av prøver ved hjelp av publikum (Thomsen mfl. 2012b, Biggs mfl. 2015, Balasingham mfl. 2017).

Metoden drar nytte av at alle organismer frigir DNA til omgivelsene sine, som man dermed kan samle inn ved for eksempel filtrering av vannprøver. Gjennom analyser med ulike genetiske markører er det mulig å påvise tilstedeværelsen av en enkelt art eller beskrive artssamfunn i lokaliteten man tok prøver fra. Da DNA brytes ned raskt i naturen, vil en påvisning av en eller flere arter indikere at denne eller disse finnes på den undersøkte lokaliteten eller har vært i området innenfor en relativt kort periode. Metoden er svært sensitiv og det trengs i prinsippet kun en enkelt DNA-kopi for å kunne påvise tilstedeværelsen av en spesifikk art. Sammenligning med konvensjonelle metoder har vist at miljø-DNA-metoden ofte 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 Statsforvalteren i Rogland 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 oppdragsgiveren (**Tabell 1**) ved hjelp av NINAs miljø-DNA kit. Vann ble filtrert gjennom et NatureMetrics filter ved hjelp av en batteridrevet peristaltisk pumpe (Bürklee Vampire). Filtrene ble tilsatt ATL-buffer (Qiagen) for konservering frem til videre analyser i lab.

Tabell 1. Detaljer for miljø-DNA prøvene innsamlet i dette studiet. Se punkt 4. Vedlegg for GPS-koordinater, vannmengde og vanntemperatur.

Nummer	Lokalitet	Kommune	Breddegrad	Lengdegrad	Dato	Tid	Vann volum	Vann temperatur
1A	Trøsdalselva	Vindafjord	6599720	310233	16.08.2021	21:30	4.0	13.8
1B	Trøsdalselva	Vindafjord	6599720	310233	16.08.2021	22:00	4.0	13.8
1A	Muslandsåna	Tysvær	6584040	315277	17.08.2021	11:30	6.0	14.2
1B	Muslandsåna	Tysvær	6584040	315277	17.08.2021	12:00	6.0	14.2
1A	Klungtveitbekken	Tysvær	6582269	311547	17.08.2021	15:30	5.0	15
1B	Klungtveitbekken	Tysvær	6582269	311547	17.08.2021	16:00	6.0	15
2A	Bjergaelva	Vindafjord	6601196	310634	17.08.2021	17:30	4.0	16.3
2B	Bjergaelva	Vindafjord	6601210	310645	17.08.2021	18:00	5.0	16.3
1A	Håelva, Grapestad, bro	Time	6513594	311847	02.09.2021	10:30	4.0	15.1
1B	Håelva, Grapestad, bro	Time	6513594	311847	02.09.2021	10:30	4.0	15.1
2A	Håelva, Undheim bro, Undheimåna	Time	6509153	313202	02.09.2021	11:50	5.0	14.8
2B	Håelva, Undheim bro, Undheimåna	Time	6509153	313202	02.09.2021	11:50	4.0	14.8
3A	Håelva, Storemyr, Stormyråna, bro	Time	6506878	314084	02.09.2021	13:00	5.0	14.9
3B	Håelva, Storemyr, Stormyråna, bro	Time	6506878	314084	02.09.2021	13:00	5.0	14.9
4A	Håelva, Undehimssåna, bro	Time	6511033	313982	02.09.2021	14:00	4.0	15.4
4B	Håelva, Undehimssåna, bro	Time	6511033	313982	02.09.2021	14:00	4.0	15.4
5A	Håelva, Taksdal	Time	6511583	313693	02.09.2021	14:53	4.0	17.4
5B	Håelva, Taksdal	Time	6511583	313693	02.09.2021	14:53	4.0	17.4
6A	Håelva, Åna	Time	6512316	314934	02.09.2021	16:00	5.0	16.8
6B	Håelva, Åna	Time	6512316	314934	02.09.2021	16:00	5.0	16.8
7A	Håelva, Urdåna	Time	6511823	314947	02.09.2021	16:50	4.0	15
7B	Håelva, Urdåna	Time	6511823	314947	02.09.2021	16:50	4.0	15
2A	Bjerkreimselva, Søre Tengsdal bro	Bjerkreim	6491362	326817	08.09.2021	11:00	5.0	15
2B	Bjerkreimselva, Søre Tengsdal bro	Bjerkreim	6491362	326817	08.09.2021	11:00	5.0	15
3A	Bjerkreimselva, bor Kleivane	Bjerkreim	6492644	327441	08.09.2021	11:50	5.0	15
3B	Bjerkreimselva, bor Kleivane	Bjerkreim	6492644	327441	08.09.2021	11:50	5.0	15
4A	Bjerkreimselva, bor E39	Bjerkreim	6496259	3289387	08.09.2021	12:50	5.0	15

4B	Bjerkreimselva, bor E40	Bjerkreim	6496259	3289387	08.09.2021	12:50	5.0	15
5A	Bjerkreimselva, Gjedrem & Holmen kraftverk	Bjerkreim	6500133	331077	08.09.2021	15:00	5.0	15
5B	Bjerkreimselva, Gjedrem & Holmen kraftverk	Bjerkreim	6500166	331077	08.09.2021	15:00	5.0	15
6A	Bjerkreimselva, Hofreistæåni	Bjerkreim	6503600	332952	08.09.2021	16:20	5.0	15
6B	Bjerkreimselva, Hofreistæåni	Bjerkreim	6503600	332952	08.09.2021	16:20	5.0	15
7A	Bjerkreimselva, Moen	Bjerkreim	6508961	337223	16.09.2021	14:55	5.0	15.1
7B	Bjerkreimselva, Moen	Bjerkreim	6508961	337223	16.09.2021	14:55	5.0	15.1
8A	Bjerkreimselva, Storå	Bjerkreim	6503041	330763	16.09.2021	16:30	5.0	14
8B	Bjerkreimselva, Storå	Bjerkreim	6503041	330763	16.09.2021	17:00	5.0	14
1A	Ogna, bro Laksesvela	Bjerkreim	6499687	326392	16.09.2021	11:30	5.0	11.7
1B	Ogna, bro Laksesvela	Bjerkreim	6499687	326392	16.09.2021	12:00	5.0	11.7
2A	Ogna, bro Eikeland	Bjerkreim	6496854	324110	16.09.2021	13:00	4	12.5
3A	Ogna, kryss	Bjerkreim	6496143	323760	16.09.2021	13:40	4	12.6
2A	Eltervågbekken over byggefelt	Stavanger	6557982	312496	15.10.2021		4	10
2B	Eltervågbekken over byggefelt	Stavanger	6557982	312496	15.10.2021		4	10

2.2 Labanalyser

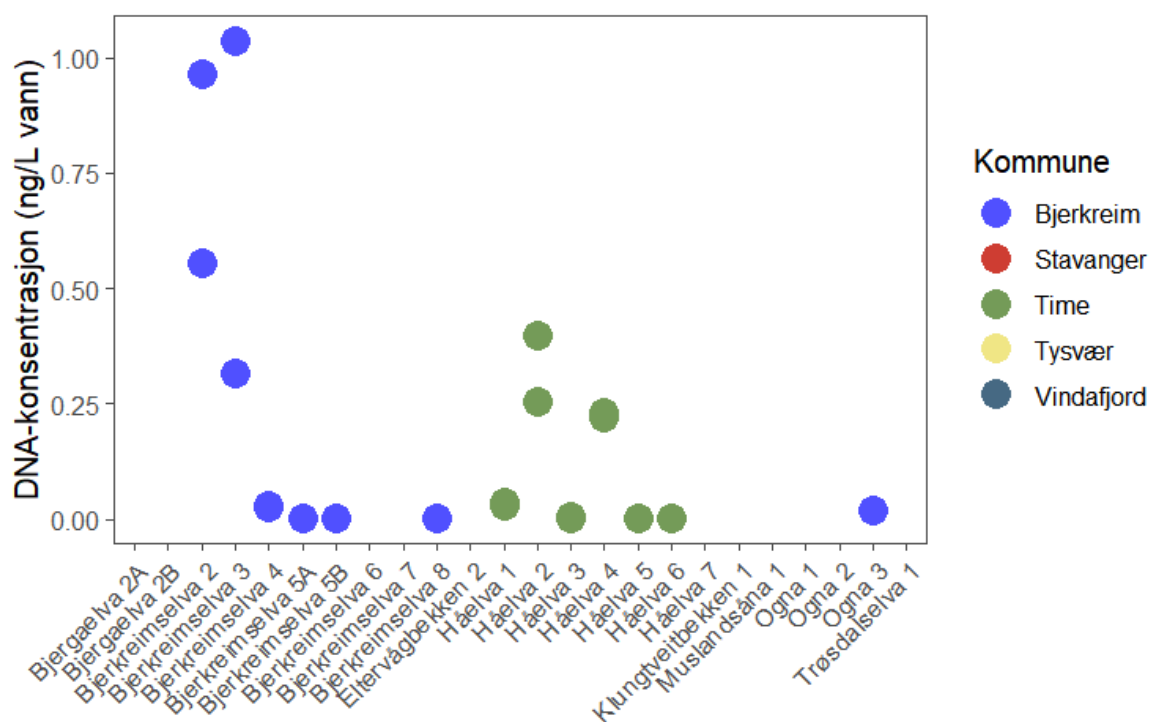
DNA ble isolert fra filterprøvene ved hjelp av en NucleoSpin Plant II (Machery-Nagel) protokoll. En arts-spesifikk markør for elvemusling (Carlsson mfl. 2017) ble analysert ved bruk av qPCR. En qPCR-analyse oppformerer en liten bit av DNA bestemt av den genetiske markøren man bruker ved hjelp av et varmesensitivt 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

Analysene viser at vi finner elvemusling i de fleste lokalitetene i Bjerkreimselva og i Håelva (Figur 1,

Tabell 2). Det er også en positiv lokalitet i Ogna (Ogna 3). I Bjerkreimselva viser resultatene at forekomst av elvemusling strekker seg lengre opp i hovedelva enn tidligere antatt, og påvises her helt opp til Vikeså, samt i «Storå», som er en innløpselv til Svelavatnet. I Håelva viser også resultatene at utbredelsen av elvemusling er større i øvre den enn tidligere antatt.

Falske positive resultater kan forekomme i miljø-DNA analyser, men vi 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. 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 analysering 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.



Figur 1. DNA konsentrasjon av elvemusling for hver lokalitet.

Tabell 2. Resultater fra qPCR-analyser for påvisninga av elvemusling fra miljø-DNA prøver. «PCR» viser andel positive replikater mens «C_T mean» viser hvor mange PCR-sykluser det tok i gjennomsnitt før DNA-mengden gav et definert fluorescens signal. En lavere C_T betyr derfor høyere konsentrasjoner av DNA. Vi forventer at minst 2/3 PCR-replikater skal være positive for å konkludere med at prøven er positiv for elvemusling. Vi merker likevel resultater med 1/3 positive replikater i gult da dette kan være lokaliteter med svært lave tettheter av elvemusling, og som dermed kanskje bør undersøkes nærmere.

Nummer	Lokalitet	Kommune	Antall PCR	Positiv PCR	Konklusjon	C _T	C _T SD	DNA-konsentrasjon Gjennomsnitt (ng/μL)	DNA-konsentrasjon SD (ng/μL)
2A	Bjergaelva	Vindafjord	3	0	NEGATIVE				
2B	Bjergaelva	Vindafjord	3	0	NEGATIVE				
2A	Bjerkreimselva, Søre Tengsdal bro	Bjerkreim	3	3	POSITIVE	27.62	0.28	0.00483	0.00086
2B	Bjerkreimselva, Søre Tengsdal bro	Bjerkreim	3	3	POSITIVE	28.43	0.18	0.00278	0.00034
3A	Bjerkreimselva, bor Kleivane	Bjerkreim	3	3	POSITIVE	27.51	0.19	0.00519	0.00066
3B	Bjerkreimselva, bor Kleivane	Bjerkreim	3	3	POSITIVE	29.26	0.17	0.00158	0.00019
4A	Bjerkreimselva, bor E39	Bjerkreim	3	3	POSITIVE	32.93	0.25	0.00013	0.00002
4B	Bjerkreimselva, bor E40	Bjerkreim	3	3	POSITIVE	32.73	0.40	0.00015	0.00004
5A	Bjerkreimselva, Gjedrem & Holmen kraftverk	Bjerkreim	3	3	POSITIVE	36.69	0.51	0.00001	0.00000
5B	Bjerkreimselva, Gjedrem & Holmen kraftverk	Bjerkreim	3	3	POSITIVE	36.67	0.37	0.00001	0.00000
6A	Bjerkreimselva, Hofreistæåni	Bjerkreim	3	1	NEGATIVE				
6B	Bjerkreimselva, Hofreistæåni	Bjerkreim	3	0	NEGATIVE				
7A	Bjerkreimselva, Moen	Bjerkreim	3	0	NEGATIVE				
7B	Bjerkreimselva, Moen	Bjerkreim	3	0	NEGATIVE				
8A	Bjerkreimselva, Storå	Bjerkreim	3	2	POSITIVE	37.93	0.63	0.00000	0.00000
8B	Bjerkreimselva, Storå	Bjerkreim	3	3	POSITIVE	37.14	0.62	0.00001	0.00000
2A	Eltervågbekken over byggefelt	Stavanger	3	0	NEGATIVE				
2B	Eltervågbekken over byggefelt	Stavanger	3	1	NEGATIVE				
1A	Håelva, Grapestad, bro	Time	3	3	POSITIVE	32.77	0.10	0.00015	0.00001
1B	Håelva, Grapestad, bro	Time	3	3	POSITIVE	32.45	0.19	0.00018	0.00002
2A	Håelva, Undheim bro, Undheimåna	Time	3	3	POSITIVE	28.92	0.08	0.00198	0.00011
2B	Håelva, Undheim bro, Undheimåna	Time	3	3	POSITIVE	29.58	0.16	0.00127	0.00014
3A	Håelva, Storemyr, Stormyråna, bro	Time	3	3	POSITIVE	37.79	0.51	0.00001	0.00000
3B	Håelva, Storemyr, Stormyråna, bro	Time	3	3	POSITIVE	34.88	0.41	0.00004	0.00001
4A	Håelva, Undehimssåna, bro	Time	3	3	POSITIVE	29.72	0.06	0.00115	0.00005
4B	Håelva, Undehimssåna, bro	Time	3	3	POSITIVE	29.78	0.11	0.00111	0.00008
5A	Håelva, Taksdal	Time	3	2	POSITIVE	36.18	0.93	0.00002	0.00001
5B	Håelva, Taksdal	Time	3	3	POSITIVE	37.62	0.44	0.00001	0.00000
6A	Håelva, Åna	Time	3	3	POSITIVE	35.72	0.46	0.00002	0.00001

6B	Håelva, Åna	Time	3	3	POSITIVE	37.55	0.31	0.00001	0.00000
7A	Håelva, Urdåna	Time	3	0	NEGATIVE				
7B	Håelva, Urdåna	Time	3	0	NEGATIVE				
1A	Klungtveitbekken	Tysvær	3	0	NEGATIVE				
1B	Klungtveitbekken	Tysvær	3	0	NEGATIVE				
1A	Muslandsåna	Tysvær	3	0	NEGATIVE				
1B	Muslandsåna	Tysvær	3	0	NEGATIVE				
1A	Ogna, bro Laksesvela	Bjerkreim	3	0	NEGATIVE				
1B	Ogna, bro Laksesvela	Bjerkreim	3	0	NEGATIVE				
2A	Ogna, bro Eikeland	Bjerkreim	3	1	NEGATIVE				
3A	Ogna, kryss	Bjerkreim	3	3	POSITIVE	33.41	0.21	0.00009	0.00001
1A	Trøsdalselva	Vindafjord	3	0	NEGATIVE				
1B	Trøsdalselva	Vindafjord	3	0	NEGATIVE				

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, 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.
- 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. NINA Rapport 1299. Norsk institutt for naturforskning.
- 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. NINA Rapport 1586. Norsk institutt for naturforskning.
- 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. NINA Rapport 1399. Norsk institutt for naturforskning: 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