

Analyser av miljø-DNA for påvisning av elvemusling

På oppdrag fra Statsforvalteren i Møre og Romsdal

Frode Fossøy, Narve Nikolai Opsahl, Rolf Sivertsgård

Trondheim 11.12.2023

UPUBLISERT

TILGJENGELIGHET

Åpen

PROSJEKTLEDER

Frode Fossøy

ANSVARLIG FORSKNINGSSJEF

Ingeborg Palm Helland

OPPDRAGSGIVER(E)/BIDRAGSYTER(E)

Statsforvalteren i Møre og Romsdal

OPPDRAGSGIVERS REFERANSE

KONTAKTPERSON(ER) HOS OPPDRAGSGIVER/BIDRAGSYTER

Geir Moen

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	6
4 Litteratur	8

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. 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 Møre og Romsdal 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 ved hjelp av NINAs miljø-DNA kit (**Tabell 1**). Vann ble filtrert gjennom et vannfilter (NatureMetrics) ved hjelp av en batteridrevet peristaltisk pumpe (Bürkle Vampire). Filtrene ble deretter tilsatt ATL-buffer (Qiagen) for konservering frem til videre analyser i lab.

Tabell 1. Oversikt over prøver innsamlet som del av dette prosjektet.

PrøveID	Dato	Tidspunkt	Nord	Øst	Lokalitet	Stasjonsnummer	Stasjonsnavn	Vannvolum	Vanntemperatur
3	26.09.2023	13:40	414463	6977389	Oselva	1	Osen	1.0	12.4
4	26.09.2023	13:55	414463	6977389	Oselva	1	Osen	3.0	12.4
5	26.09.2023	14:35	413842	6977341	Oselva	2	Oselvbrua ovenfor	2.0	12.3
6	26.09.2023	14:50	413842	6977341	Oselva	2	Oselvbrua ovenfor	2.0	12.3
7	26.09.2023	15:15	411469	6976730	Oselva	3	Stormyra	2.0	11.6
8	26.09.2023	15:30	411469	6976730	Oselva	3	Stormyra	2.0	11.6
9	28.09.2023	09:45	402143	6964557	Visa	4	Visa nedre	5.0	10.6
10	28.09.2023	10:05	402143	6964557	Visa	4	Visa nedre	5.0	10.6
11	28.09.2023	10:35	446002	6953959	Visa	5	Visa midtre	5.0	10.7
12	28.09.2023	11:00	446002	6953959	Visa	5	Visa midtre	5.0	10.7
13	28.09.2023	11:35	446587	6952629	Visa	6	Visa Bergsel	5.0	11.2
14	28.09.2023	11:45	446587	6952629	Visa	6	Visa Bergsel	5.0	11.2
15	28.09.2023	13:40	433184	6952840	Mittetelva	7	Mittetelva nedre	4.0	11.5
16	28.09.2023	14:05	433184	6952840	Mittetelva	7	Mittetelva nedre	4.0	11.5
17	28.09.2023	14:40	433381	6952347	Mittetelva	8	Mittetelva midtre	4.0	11.9
18	28.09.2023	14:55	433381	6952347	Mittetelva	8	Mittetelva midtre	4.0	11.9
19	28.09.2023	15:35	434053	6951300	Mittetelva	9	Mittetelva øvre	4.0	12
20	28.09.2023	15:50	434053	6951300	Mittetelva	9	Mittetelva øvre	4.0	12
21	31.10.2023	10:45	438422	6992571	Bolgvatnet	10	Bekk sørøst	2.5	2
22	31.10.2023	11:00	438422	6992571	Bolgvatnet	10	Bekk sørøst	2.8	2
23	31.10.2023	11:50	438228	6992481	Bolgvatnet	11	Bekk Sørvest	3.0	1.9
24	31.10.2023	12:20	438228	6992481	Bolgvatnet	11	Bekk Sørvest	3.0	1.9
25	31.10.2023	13:00	439987	6989763	Bolgvatnet	12	Freielva	1.8	1.7
26	31.10.2023	13:15	439987	6989763	Bolgvatnet	12	Freielva	1.8	1.7

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. 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 fluorescenssignal. En lavere C_T betyr derfor høyere konsentrasjoner av DNA. Alle prøver ble kjørt i triplikater, sammen med en positiv og negativ kontroll. For å kunne karakterisere en prøve som positiv i en qPCR-analyse forventer vi at minst to av tre replikater skal være positive. Vi merker likevel resultater med 1 av 3 positive replikater i gult da disse er usikre og kan representere lokaliteter med svært lav tetthet av målarten og muligens bør undersøkes på nytt.

3 Resultater og diskusjon

Miljø-DNA analysene påviste ingen positive påvisninger for elvemusling i denne undersøkelsen (**Tabell 2**). Resultatene fra de positive og negative kontrollprøvene var som forventet. 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.

Tabell 2. Resultater fra qPCR-analyser av miljø-DNA prøver. Analysene ble kjørt dobbelt med to ulike DNA-konsentrasjoner, der 5 µL eller 1 µL DNA ble tilsatt. Kolonnen «qPCR» viser andel positive replikater, der vi forventer at minst 2 av 3 PCR-replikater skal være positive for å konkludere med at prøven er teknisk positiv. Vi merker likevel resultater med 1 av 3 positive replikater i gult da disse er usikre og muligens bør undersøkes på nytt. Kolonnen «C_T Mean» viser hvor mange PCR-sykluser det tok i gjennomsnitt før DNA-mengden gav et definert fluorescenssignal. En lavere C_T betyr derfor høyere konsentrasjoner av DNA. Kolonnen «Ct SD» viser standard avvik av C_T mellom replikatene.

PrøveID	Lokalitet	Stasjonsnavn	1 µl DNA			5 µl DNA		
			qPCR	Ct Mean	Ct SD	qPCR	Ct Mean	Ct SD
3	Oselva	Osen	0/3			0/3		
4	Oselva	Osen	0/3			0/3		
5	Oselva	Oselvbrua ovenfor	0/3			0/3		
6	Oselva	Oselvbrua ovenfor	0/3			0/3		
7	Oselva	Stormyra	0/3			0/3		
8	Oselva	Stormyra	0/3			0/3		
9	Visa	Visa nedre	0/3			0/3		
10	Visa	Visa nedre	0/3			0/3		
11	Visa	Visa midtre	0/3			0/3		
12	Visa	Visa midtre	0/3			0/3		
13	Visa	Visa Bergsel	0/3			0/3		
14	Visa	Visa Bergsel	0/3			0/3		
15	Mittetelva	Mittetelva nedre	0/3			0/3		
16	Mittetelva	Mittetelva nedre	0/3			0/3		
17	Mittetelva	Mittetelva midtre	0/3			0/3		
18	Mittetelva	Mittetelva midtre	0/3			0/3		
19	Mittetelva	Mittetelva øvre	0/3			0/3		
20	Mittetelva	Mittetelva øvre	0/3			0/3		
21	Bolgvatnet	Bekk sørøst	0/3			0/3		
22	Bolgvatnet	Bekk sørøst	0/3			0/3		
23	Bolgvatnet	Bekk sørvest	0/3			0/3		
24	Bolgvatnet	Bekk sørvest	0/3			0/3		
25	Bolgvatnet	Freielva	0/3			0/3		
26	Bolgvatnet	Freielva	0/3			0/3		
Positiv DNA kontroll			1/1	22.590		1/1	20.592	
Negativ DNA kontroll			0/1			0/1		
Negativ PCR kontroll			0/1			0/1		

4 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