

Analysen av miljø-DNA for påvisning av elvemusling

På oppdrag fra Statsforvalteren i Innlandet og Nord-Aurdal kommune

Frode Fossøy, Ida-Pernille Øystese Andersskog, Rolf Sivertsgård

Trondheim 18.12.2023

UPUBLISERT

TILGJENGELIGHET

Åpen

PROSJEKTLEDER

Frode Fossøy

ANSVARLIG FORSKNINGSSJEF

Ingeborg Palm Helland

OPPDRAGSGIVER(E)/BIDRAGSYTER(E)

Statsforvalteren i Innlandet og Nord-Aurdal kommune

OPPDRAGSGIVERS REFERANSE

KONTAKTPERSON(ER) HOS OPPDRAGSGIVER/BIDRAGSYTER

Thor Bjørn Thorkildsen, Steinar Tvedt

Innhold

1 Innledning.....	3
1.1 Bakgrunn.....	3
1.2 Formål.....	3
2 Material og metode.....	4
2.1 Prøvetaking.....	4
2.2 Labanalyser	4
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 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 Innlandet og Nord-Aurdal kommune undersøkt tilstedeværelse av elvemusling (*Margeritifera margeritifera*) 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 prøvene innsamlet i dette prosjektet.

PrøveID	Dato	Nord	Øst	Lokalitet	Stasjonsnummer	Vannvolum (l)	Vanntemperatur (°C)
1	02.08.23	517102	6756294	Skåmane	7	2	16.6
2	02.08.23	521035	6753532	Aurdalsfjorden v/ Vestringslinna	8	5	16.7
3	02.08.23	522654	6752045	Aurdalsfjorden v/ nordgrense naturreservat	5	3	16.7
4	03.08.23	524180	6750247	Aurdalsfjorden v/ Askjer	6	5	16.7
5	04.08.23	528219	6743692	Reina	4	5	14
6	04.08.23	553091	6713793	Urula	1	3	15.8
7	04.08.23	553860	6719265	Tørsjøelva	2	3	18.3
8	04.08.23	549480	6722522	Buvasselva	3	3	18.2

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. 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-syklus 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 elvemusling i Tørrsjøelva og Buvasselva (**Tabell 2**). Analysene ble kjørt dobbelt med to ulike DNA-konsentrasjoner, der 5 μ L eller 1 μ L DNA ble tilsatt, og begge parallellprøvene var positive for høy og lav DNA-konsentrasjon. Den ene parallellprøven fra Aurdalsfjoden v /nordgrense naturreservat viser ett positivt replikat og dette regner vi som en usikker prøve. Dette kan representere en lav konsentrasjon av elvemusling-DNA i lokaliteten eller det kan være en falsk positiv. Vi kan dessverre ikke gi noe sikker konklusjon for denne prøven.

Det kan være verdt å merke seg at innsjøer ofte er vanskeligere å prøveta enn elver, da liten bevegelse i vannmassene og forekomst av sprangsjikt kan føre til mindre spredning av miljø-DNA i lokaliteten. Dette betyr at negative resultater fra innsjøer kan være vanskeligere å tolke.

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 «PCR» 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.

Prøve ID	Lokalitet	1 µl DNA			5 µl DNA		
		qPCR	Ct Mean	Ct SD	qPCR	Ct Mean	Ct SD
1	Skåmane	0/3			0/3		
2	Aurdalsfjorden v/ Vestringlinna	0/3			0/3		
3	Aurdalsfjorden v/ nordgrense naturreservat	1/1	37.607		0/3		
4	Aurdalsfjorden v/ Askjer	0/3			0/3		
5	Reina	0/3			0/3		
6	Urula	0/3			0/3		
7	Tørrsjøelva	2/3	36.731	1.077	3/3	35.802	0.278
8	Buvasselva	2/3	36.731	1.077	3/3	33.569	0.108
	Positiv DNA kontroll	1/1	15.211		1/1	12.815	
	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