

Analysen av miljø-DNA i Siljan-Farris vannområde

På oppdrag fra Siljan kommune

Frode Fossøy, Hege Brandsegg, Merethe Hagen Spets, Rolf Sivertsgård

Trondheim 07.04.2022

UPUBLISERT

TILGJENGELIGHET

Åpen

PROSJEKTLEDER

Frode Fossøy

ANSVARLIG FORSKNINGSSJEF

Ingeborg Palm Helland

OPPDRAGSGIVER(E)/BIDRAGSYTER(E)

Siljan kommune

OPPDRAGSGIVERS REFERANSE

KONTAKTPERSON(ER) HOS OPPDRAGSGIVER/BIDRAGSYTER

Steinar Tronhus

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
2.3 Resultater og diskusjon.....	5
3 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. 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 Siljan kommune undersøkt tilstedeværelse av elvemusling (*Margaritifera margaritifera*), edelkreps (*Astacus astacus*) og ål (*Anguilla anguilla*) ved hjelp av miljø-DNA.

2 Material og metode

2.1 Prøvetaking

Miljø-DNA-prøver ble samlet inn av oppdragsgiver (**Tabell 1**) ved hjelp av NINAs miljø-DNA kit. Vann ble filtrert gjennom et NatureMetrics filter ved hjelp av en batteridrevet peristaltisk pumpe (Bürkle 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.

Løpenummer	Dato	Tid	Lokalitet	Breddegrad	Lengdegrad	Vannvolum	Vanntemperatur
1	13.09.2021	10:00	Øverbøbekken-Nedstrøms	59.280882	009.7348919	5.0	16.4
2	13.09.2021	10:30	Øverbøbekken-Oppstrøms	59.280908	009.734262	3.0	16.4
3	13.09.2021	11:15	Sandåa-Nedstrøms	59.270014	009.767811	5.0	13
4	13.09.2021	11:45	Sandåa-Oppstrøms	59.271186	009.768200	5.0	13
5	13.09.2021	14:00	Fiskebekk-Nedstrøms	59.252203	009.689619	5.0	12.5
6	13.09.2021	14:30	Fiskebekk-Oppstrøms	59.252455	009.696679	2.5	12.5
7	14.09.2021	10:00	Siljanelva-Søndtvedt ned-strøms	59.3089175	009.6642719	5.0	12
8	28.10.2021	13:00	Siljanelva-Søndtvedt opp-strøms	59.300296	009.666080	3.5	8
9	14.09.2021	11:00	Kattebekk-Nedstrøms	59.285720	009.720197	5.0	11.6
10	14.09.2021	11:30	Kattebekk-Oppstrøms	59.285846	009.720390	5.0	11.6
11	14.09.2021	14:00	Svartangenbekk-Nedstrøms	59.229832	009.855047	5.0	16
12	14.09.2021	14:30	Svartangenbekk-Oppstrøms	59.230359	009.858931	4.0	16
13	24.09.2021	10:30	Kleppanebekken-Nedstrøms	59.113557	009.906412	5.0	11
14	24.09.2021	11:00	Kleppanebekken-Oppstrøms	59.112923	009.903896	5.0	11
15	24.09.2021	12:30	Okkungselta-Nedstrøms	59.165107	009.850423	2.5	11.8
16	24.09.2021	13:15	Okkungselta-Oppstrøms	59.165695	009.848342	3.0	11.8

2.2 Labanalyser

DNA ble isolert fra filterprøvene ved hjelp av en NucleoSpin Plant II (Machery-Nagel) protokoll. Arts-spesifikke markører for elvemusling (Carlsson mfl. 2017), edelkreps (Rusch mfl. 2020) og ål (Weldon mfl. 2020) 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 fra målararten 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. Analysene for elvemusling ble kjørt i to ulike DNA-konsentrasjoner er vi inkluderte 1 eller 5 mikroliter DNA i PCR-reaksjonen.

2.3 Resultater og diskusjon

Verken edelkreps eller ål ble påvist i denne undersøkelsen. Ingen av prøvene viste heller noen form for utslag og vi gir derfor ingen resultater for disse to artene. For begge markørene viste positivkontrollene (vevsprøve fra målararten) positive resultater og negative kontroller viste negative resultater. Vi anser derfor analysen som vellykket og resultatene som gyldige.

For elvemusling fant vi en sikker positiv prøve, dette gjelder prøve 10 Kattebekk-Oppstrøms. Her var 3 av 3 replikater positive (**Tabell 2**). For noen prøver fikk vi 1 av 3 positive replikater og disse er per definisjon negative. Disse resultatene var heller ikke konsistente mellom to ulike konsentrasjoner av DNA i analysen.

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 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. Alle prøvene ble kjørt to ganger, en med 5 mikroliter DNA og en med 1 mikroliter DNA i analysen.

Genlab ID	Løpenummer	Lokalitet	5 mikroliter DNA			1 mikroliter DNA		
			PCR	Ct Mean	Ct SD	PCR	Ct Mean	Ct SD
OVREB_21_001	1	Øverbøbekken-Nedstrøms	0/3			0/3		
OVREB_21_002	2	Øverbøbekken-Oppstrøms	1/3	40.93		0/3		
SANDA_21_003	3	Sandåa-Nedstrøms	0/3			1/3	38.64	
SANDA_21_004	4	Sandåa-Oppstrøms	0/3			1/3	39.72	
FISKE_21_005	5	Fiskebekk-Nedstrøms	0/3			0/3		
FISKE_21_006	6	Fiskebekk-Oppstrøms	1/3	38.50		0/3		
SILJA_21_007	7	Siljanelva-Søndtvedt nedstrøms	1/3	38.92		0/3		
SILJA_21_008	8	Siljanelva-Søndtvedt oppstrøms	0/3			0/3		
KATTE_21_009	9	Kattebekk-Nedstrøms	0/3			0/3		
KATTE_21_010	10	Kattebekk-Oppstrøms	3/3	38.30	0.601	0/3		
SVART_21_011	11	Svartangenbekk-Nedstrøms	1/3	38.70		0/3		
SVART_21_012	12	Svartangenbekk-Oppstrøms	0/3			1/3	39.44	
KLEPP_21_013	13	Kleppanebekken-Nedstrøms	0/3			0/3		
KLEPP_21_014	14	Kleppanebekken-Oppstrøms	0/3			0/3		
OKKUN_21_015	15	Okkungsella-Nedstrøms	1/3	38.58		0/3		
OKKUN_21_016	16	Okkungsella-Oppstrøms	0/3			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, 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.
- Rusch, JC, Mojžišová, M, Strand, DA, Svobodová, J, Vrålstad, T & Petrusek, A. 2020. Simultaneous detection of native and invasive crayfish and *Aphanomyces astaci* from environmental DNA samples in a wide range of habitats in Central Europe. *NeoBiota* 58.
- 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.
- Weldon, L, O'Leary, C, Steer, M, Newton, L, Macdonald, H & Sargeant, SL. 2020. A comparison of European eel *Anguilla anguilla* eDNA concentrations to fyke net catches in five Irish lakes. Environmental DNA 2(4): 587-600.

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