

Analyser av miljø-DNA for påvisning av elvemusling

På oppdrag fra Fylkesmannen i Rogaland

Frode Fossøy, Hege Brandsegg, Rolf Sivertsgård, Bjørn Mejdell Larsen
& Jon H. Magerøy

Trondheim 29.11.2019

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

Annette Fosså

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	9

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).

Miljø-DNA kan tilby en mer objektiv metode for overvåking av økosystemer der innsamling av prøver ikke er avhengig av langvarig innsats eller taksonomisk ekspertise i felt, og ikke vil være til skade for miljøet eller lokale arter. 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, Magerøy mfl. Und. arb.).

1.2 Formål

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

2 Material og metode

2.1 Prøvetaking

Miljø-DNA-prøver ble samlet inn av Fylkesmannen i Rogaland ved Annette Fosså i juli måned i 2019 (**Tabell 1**). To parallellprøver ble innsamlet på hver lokalitet. Fem eller 10 liter vann ble filtrert gjennom et 2.0 µm glassfiberfilter (Merck Millipore) 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 innsamling for påvisning av elvemusling i dette studiet.

Kommune	Lokalitet	Stasjon	Prøveid	Vannvolum	Temperatur	Dato prøvetaking	Koordinater
Bjerkreim	Soksåna/Saglandsbekken, Bjerkreim	1	SOKS19-001	5 L	19.8	23.07.2019	0329362/6495702
		1	SOKS19-002	5 L	19.8	23.07.2019	0329362/6495702
Forsand	Forsandåna oppstrøms Fv491	1	FORS19-001	5 L	14.3	22.07.2019	0335512/6531450
		1	FORS19-002	5 L	14.3	22.07.2019	0335512/6531450
Forsand	Forsandåna nær utløp sjø	2	FORS19-003	5 L	13.2	22.07.2019	0333110/6531665
		2	FORS19-004	5 L	13.2	22.07.2019	0333110/6531665
Gjesdal	Dirdalselva nordre løp	1	DIR19-001	5 L	14.7	24.07.2019	0344973/6518973
		1	DIR19-002	5 L	14.7	24.07.2019	0344973/6518973
Gjesdal	Dirdalselva søndre løp	2	DIR19-003	5 L	15.2	24.07.2019	0344888/6518760
		2	DIR19-004	5 L	15.2	24.07.2019	0344888/6518760
Sandnes	Storånavassdraget oppstrøms Stokkalandsvatnet	1	STORÅ19-001	10 L	14.7	21.07.2019	0311735/6525368
		1	STORÅ19-002	10 L	14.7	21.07.2019	0311735/6525368
Sandnes	Storånavassdraget nedstrøms Stokkalandsvatnet	2	STORÅ19-003	10 L	16.4	21.07.2019	0311495/6527592
		2	STORÅ19-004	10 L	16.4	21.07.2019	0311495/6527592
Sokndal	Bakkaåna, Sokndalsvassdraget	1	BAKK19-001	5 L	18.2	23.07.2019	0342359/6472259
		1	BAKK19-002	5 L	18.2	23.07.2019	0342359/6472259
Sokndal	Litleåna, Sokndalsvassdraget	1	LITL19-001	5 L	16.9	23.07.2019	0342807/6470202
		1	LITL19-002	5 L	16.9	23.07.2019	0342807/6470202
Sokndal	Roslandsåna, Sokndalsvassdraget	1	ROS19-001	5 L	17.6	23.07.2019	0342255/6471885
		1	ROS19-002	5 L	17.6	23.07.2019	0342255/6471885
Sokndal	Ålgårdselva oppstr. Sandbekk, Sokndalsvassdraget	1	ÅLG19-001	5 L	17.2	23.07.2019	0343781/6472195
		1	ÅLG19-002	5 L	17.2	23.07.2019	0343781/6472195
Sokndal	Ålgårdselva nedstr. Sandbekk, Sokndalsvassdraget	2	ÅLG19-003	5 L	17.5	23.07.2019	0342621/6470820
		2	ÅLG19-004	5 L	17.5	23.07.2019	0342621/6470820
Strand	Fjellsåna, Strand	1	FJELLS19-001	5 L	15.2	22.07.2019	0329018/6546539
		1	FJELLS19-002	5 L	15.2	22.07.2019	0329018/6546539
Strand	Tauåna søndre løp	1	TAU19-001	5 L	16.9	22.07.2019	0323516/6550823
		1	TAU19-002	5 L	16.9	22.07.2019	0323516/6550823
Strand	Tauåna nordre løp	2	TAU19-003	5 L	17.1	22.07.2019	0323563/6550842
		2	TAU19-004	5 L	17.1	22.07.2019	0323563/6550842

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 syklene. 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-syklene 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 fortyningsserie 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.

3 Resultater og diskusjon

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

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.

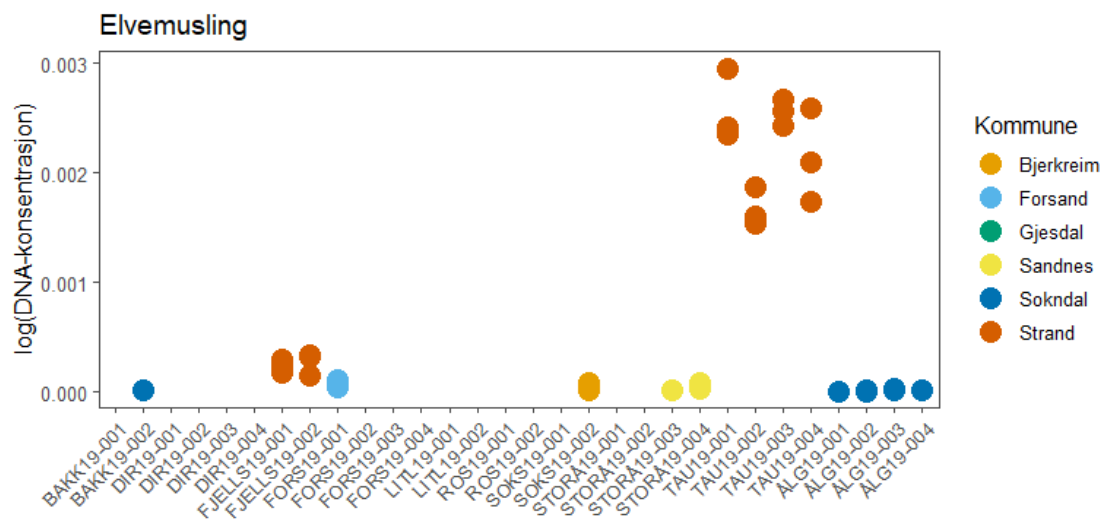
Kommune	Lokalitet	Prøveid	Stasjon	Resultat	PCR	C _T Mean	Quantity Mean
Sokndal	Bakkaåna, Sokndalsvassdraget	BAKK19-001	1	Negativ	1/3	39.7	
		BAKK19-002	1	Positiv	2/3	39.4	1.85E-05
Gjesdal	Dirdalselva nordre løp	DIR19-001	1	Negativ	0/3		
		DIR19-002	1	Negativ	0/3		
Gjesdal	Dirdalselva søndre løp	DIR19-003	2	Negativ	0/3		
		DIR19-004	2	Negativ	0/3		
Strand	Fjellsåna, Strand	FJELLS19-001	1	Positiv	3/3	35.62	2.38E-04
		FJELLS19-002	1	Positiv	3/3	35.45	2.77E-04
Forsand	Forsandåna oppstrøms Fv491	FORS19-001	1	Positiv	3/3	37.57	6.89E-05
		FORS19-002	1	Negativ	0/3		
Forsand	Forsandåna nær utløp sjø	FORS19-003	2	Negativ	1/3	39.14	
		FORS19-004	2	Negativ	0/3		
Sokndal	Litleåna, Sokndalsvassdraget	LITL19-001	1	Negativ	0/3		
		LITL19-002	1	Negativ	0/3		
Sokndal	Roslandsåna, Sokndalsvassdraget	ROS19-001	1	Negativ	0/3		
		ROS19-002	1	Negativ	0/3		
Bjerkreim	Soksåna/Saglandsbekken, Bjerkreim	SOKS19-001	1	Negativ	1/3	37.64	
		SOKS19-002	1	Positiv	3/3	37.93	6.21E-05
Sandnes	Storånavassdraget oppstrøms Stokkalandsvatnet	STORÅ19-001	1	Negativ	0/3		
		STORÅ19-002	1	Negativ	0/3		
Sandnes	Storånavassdraget nedstrøms Stokkalandsvatnet	STORÅ19-003	2	Positiv	3/3	39.32	1.98E-05
		STORÅ19-004	2	Positiv	3/3	37.98	5.35E-05
Strand	Tauåna søndre løp	TAU19-001	1	Positiv	3/3	32.03	2.58E-03
		TAU19-002	1	Positiv	3/3	32.68	1.67E-03
Strand	Tauåna nordre løp	TAU19-003	2	Positiv	3/3	32.04	2.56E-03
		TAU19-004	2	Positiv	3/3	32.32	2.14E-03
Sokndal	Ålgårdselva oppstr. Sandbekk, Sokndalsvassdraget	ÅLG19-001	1	Positiv	3/3	41.65	2.75E-06
		ÅLG19-002	1	Positiv	2/3	38.99	1.76E-05
Sokndal	Ålgårdselva nedstr. Sandbekk, Sokndalsvassdraget	ÅLG19-003	2	Positiv	3/3	38.68	2.12E-05
		ÅLG19-004	2	Positiv	3/3	38.95	1.75E-05

For Fjellsåna, Tauåna og Ålgårdselva ble alle prøvene karakterisert som positive (**Figur 1 og 2**), og vi anser det som ganske sikkert at det finnes elvemusling i disse vassdragene. I en oversikt over elvemuslinglokaliteter i Norge (Larsen & Magerøy 2019) er alle tre vassdragene registrert med levende elvemusling. Opplysningene fra Fjellsåna er mer enn tjue år gamle (Ledje 1996). I Tauåna er det funnet elvemusling nedstrøms prøvetakingsstasjonene (pers. obs., Irvin Kilde og Annette Fosså pers. med. i Ledje og Tysse (2015), Førland og Bruntveit (2015)), men hele elveløpet ovenfor stasjonene er undersøkt opp til Bjørheimsvatnet uten funn (pers. obs., Sandaas og Enerud (2017)). Det er heller ikke funnet elvemusling lenger oppe i vassdraget (Sandaas & Enerud 2017), men det bør undersøkes om det står elvemusling i utløpet av Bjørheimsvatnet. I Ålgårdselva i Sokndalsvassdraget ble det funnet en elvemusling i 2018 (John Kapstad pers. med. i Sandaas og Enerud (2018)), men ingen andre funn er kjent.

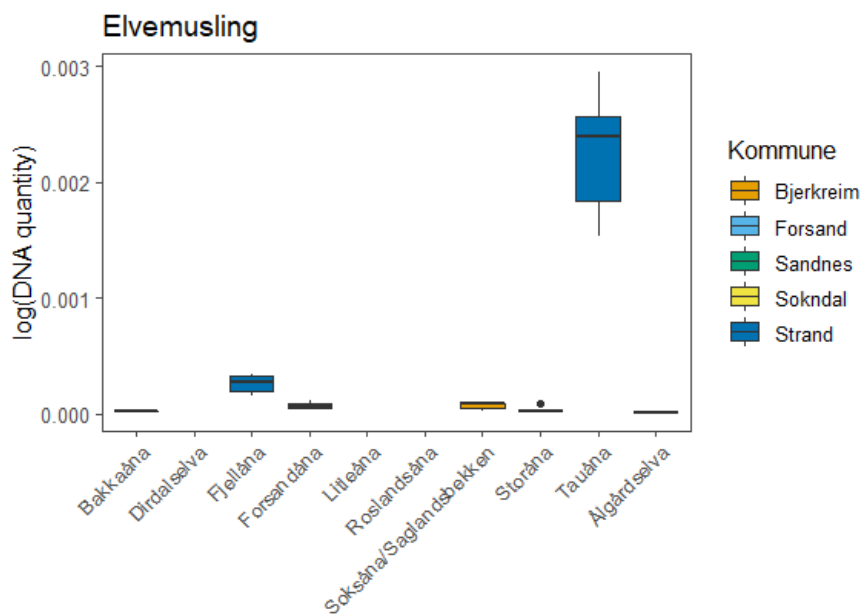
I Bakkaåna, Forsandåna, Soksåna/Saglandsbekken og Storånavassdraget ble det funnet positive prøver ved enkelte av stasjonene og/eller i enkelte av prøvene. I Bakkaåna i Sokndalsvassdraget ble en prøve negativ og en prøve positiv fra den samme stasjonen, men vi anser at denne elven sannsynligvis har elvemusling. Bakkaåna var ikke registrert som lokalitet for elvemusling tidligere (Larsen & Magerøy 2019). Det samme gjelder for lokaliteten Forsandåna oppstrøms Fv491, der vi også anser denne stasjonen som positiv basert på miljø-DNA. Nå ble den andre stasjonen fra Forsandåna negativ, selv om denne stasjonen er nedstrøms. Uten at vi kan si noe med sikkerhet kan vi anta at det finnes elvemusling oppstrøms Fv491, men at det er få eller ingen elvemuslinger mellom de to prøvepunktene. Forsandåna er ikke registrert som lokalitet for elvemusling tidligere. For Soksåna/Saglandsbekken ble også en prøve positiv og en negativ fra den samme stasjonen, og vi antar at det finnes elvemusling oppstrøms denne lokaliteten. Soksåna og Saglandsbekken er registrert med levende elvemusling, senest i 2007 da det ble funnet henholdsvis 19 og 1 levende individer (Elnan 2008). Storånavassdraget ovenfor og nedenfor Stokkalandsvatnet er bare oppgitt som en historisk lokalitet (utdødd) hos Larsen & Magerøy (2019). Det ble ikke påvist elvemusling ovenfor Stokkalandsvatnet i denne undersøkelsen, men nedenfor vatnet var begge prøvene positive. Det skulle bety at det fortsatt står noen levende elvemuslinger i Storånas nedre del.

Falske positive resultater kan forekomme i miljø-DNA-analyser, og vi prøver å unngå disse ved å sette strenge kriterier. Vi kan likevel ikke helt utelukke at noen av de positive prøvene er falske positive. Det kan derfor være nødvendig å bekrefte enkelte av funnene ved å gjennomføre et tradisjonelt søk på lokalitetene ved vading i elveløpet og bruk av vannkikkert.

Vi fant ingen positive prøver i Dirdalselva, Litleåna og Roslandsåna. Det finnes ingen opplysninger om elvemusling i Litleåna (undersøkt i 2016 uten funn; Sandaas og Enerud (2016)) eller Roslandsåna i Sokndalsvassdraget, men Dirdalselva står på oversikten over historiske lokaliteter (utdødd bestand; Larsen & Magerøy 2019). 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 arten ikke finnes i lokaliteten.



Figur 1. DNA-konsentrasjon av enkeltprøver innsamlet i Rogaland 2019 estimert fra qPCR analyser.



Figur 2. Oversikt over resultatene for elvene prøvetatt i Rogaland 2019.

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.
- Elnan, SD. 2008. Kartlegging av elvemusling i Rogaland 2007-2008. Ambio Miljørådgivning AS. Rapport 10027. .
- 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.
- Førland, OS & Bruntveit, I. 2015. Elvemusling (*Margaritifera margaritifera*) ved Krossvatnet, Tau. Notat til Strand kommune.
- Larsen, BM & Magerøy, JH. 2019. Elvemuslinglokaliteter i Norge. En beskrivelse av status som grunnlag for arbeid med kartlegging og tiltak i handlingsplanen for 2019-2028. Norsk institutt for naturforskning. NINA Rapport 1669.
- Ledje, UP. 1996. Kartlegging av utbredelsen av elvemusling (*M. margaritifera*) i Rogaland 1995. Del 2. - Rogaland Consultants a.s. Rapport nr. 24502-2. 47 s.
- Ledje, UP & Tysse, T. 2015. Konsekvenser for naturmangfold ved etablering av turvei ved østsiden av Krossvatnet, Strand kommune. Ecofact rapport 444
- Magerøy, J, Bækkelie, K, Mo, T, Brandsegg, H, Sivertsgård, R & Fossøy, F. Und. arb. Elvemusling i Aurskog-Høland og Nes kommuner. Lokalitetsfastsetting med miljø-DNA og oppfølgende vadesøk i Mangbekken, Haretonelva og Rabillfløyta. Norsk institutt for naturforskning. NINA Rapport 1707.
- Sandaas, K & Enerud, J. 2016. Kartlegging av elvemusling *Margaritifera margaritifera* i Sokna. Sokndal kommune, Rogaland fylke 2016. Naturfaglige konsulenttjenester. Rapport. 11 s.
- Sandaas, K & Enerud, J. 2017. Utbredelse og bestandsstatus for elvemusling i Tauåna og Spjodåna, Strand og Hjelmeland kommuner, Rogaland 2016. Naturfaglige Konsulenttjenester & Fisk- og Miljøundersøkelser, Rapport.
- Sandaas, K & Enerud, J. 2018. Utbredelse og bestandsstatus hos elvemusling *Margaritifera margaritifera* i Sokna, Soknedal kommune, Rogaland fylke 2018. Naturfaglige Konsulenttjenester & Fisk- og Miljøundersøkelser, Rapport.

- 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 overvåkning 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