

Overvåking og kartlegging av fremmed ferskvannsfisk og vasspest ved bruk av miljø-DNA



Hovedkontor

Gaustadalléen 21
0349 Oslo
Telefon (47) 22 18 51 00

NIVA Region Sør

Jon Lilletuns vei 3
4879 Grimstad
Telefon (47) 22 18 51 00

NIVA Region Innlandet

Sandvikaveien 59
2312 Ottestad
Telefon (47) 22 18 51 00

NIVA Region Vest

Thormøhlensgate 53 D
5006 Bergen
Telefon (47) 22 18 51 00

NIVA Danmark

Njalsgade 76, 4. sal
2300 København S, Danmark
Telefon (45) 39 17 97 33

Internett: www.niva.no

Tittel Overvåking og kartlegging av fremmed ferskvannsfisk og vasspest ved bruk av miljø-DNA	Løpenummer 7623-2021	Dato 29.04.2021
Forfatter(e) Anette Engesmo, Sonja Kistenich, Steen W. Knudsen, Guttorm Christensen, Martin Hesselsøe, Marc Anglès d'Auriac	Fagområde Overvåking	Distribusjon Åpen
	Geografisk område Norge	Sider 37 + vedlegg

Oppdragsgiver(e) Miljødirektoratet	Oppdragsreferanse Sunniva Aagaard
Oppdragsgivers utgivelse: Miljødirektoratet rapport M-2028 2021	Utgitt av NIVA Prosjektnummer 200130

<p>Sammendrag</p> <p>Tidligere publiserte molekylære deteksjonssystemer for fem invaderende fiskearter (pukkellaks, gjedde, ørekyt, sørv og suter) ble evaluert i henhold til Thalingers valideringsskala. Deretter ble det samlet miljø-DNA prøver fra åtte lokasjoner og disse ble analysert for de fem fremmede fiskeartene, samt vannplanten vasspest. Deteksjonssystemene for pukkellaks og gjedde viste seg artsspesifikke og ble validert for videre bruk i forvaltningen. Deteksjonssystemene for sørv og suter viste spesifisitetsproblemer, disse ble re-designet og re-optimalisert. Systemet for suter ble validert for videre bruk i forvaltningen. Det er fortsatt behov for videre optimalisering av systemet for sørv. Deteksjonssystemet for ørekyt viste store spesifisitetsproblemer og dette anbefales ikke for videre bruk i forvaltningsøyemed.</p>

<p>Fire emneord</p> <ol style="list-style-type: none"> Miljø-DNA Molekylær overvåking Fremmed ferskvannsfisk Miljøovervåking 	<p>Four keywords</p> <ol style="list-style-type: none"> eDNA Molecular monitoring Intrusive freshwater fish Environmental monitoring
--	--

Denne rapporten er kvalitetssikret iht. NIVAs kvalitetssystem og godkjent av:

Anette Engesmo
Prosjektleder

Markus Lindholm
Kvalitetssikrer

Ailbhe Macken
Forskningsleder

ISBN 978-82-577-7359-5
NIVA-rapport ISSN 1894-7948

© Norsk institutt for vannforskning og Miljødirektoratet. Publikasjonen kan siteres fritt med kildeangivelse.

**Overvåking og kartlegging av fremmed
ferskvannsfisk og vasspest ved bruk av
miljø-DNA**

2020

Forord

NIVA har på oppdrag av Miljødirektoratet evaluert bruk av miljø-DNA som overvåkningsmetode for spredning av fremmed ferskvannsfisk i Norge. Prosjektet startet i 2019 og oppdragsgiver valgte opprinnelig 12 fiskearter som var av spesielt høy interesse og hvor det var ønskelig med mulighet for molekylær overvåkning. Inneværende år har vi gått mer i dybden på fem av artene, som krevde mer utfyllende evaluering enn fjorårets prosjekt. Det er i tillegg, etter ønske fra oppdragsgiver, gjort en vurdering av metodikken for vasspest.

Prosjektet er gjennomført som et samarbeid mellom NIVA, Akvaplan-niva og NIRAS. Prosjektet har vært ledet av Anette Engesmo fra NIVA. Marc Anglès d'Auriac har vært ansvarlig for molekylær metodeutvikling og Sonja Kistenich har vært ansvarlig for molekylære analyser. Guttorm Christensen fra Akvaplan-niva har vært ansvarlig for feltinnsamling og fagansvarlig på fisk. Martin Hesselsøe fra NIRAS Danmark har vært fagansvarlig for filtrering. Han har i tillegg, sammen med Steen W. Knudsen (NIVA), fungert som løpende kvalitetssikrer av molekylære resultater. Rapporten er kvalitetssikret av Markus Lindholm (NIVA).

Det rettes en stor takk til Sunniva Aagaard hos Miljødirektoratet for stødig ledelse av prosjektet og for gode og konstruktive tilbakemeldinger gjennom prosjektperioden. Jarle Steinkjer, Steinar Sandøy og Hege Sangolt har også bidratt med innspill fra Miljødirektoratet.

Oslo, 14. April 2021

Anette Engesmo

Innholdsfortegnelse

1	Introduksjon.....	7
2	Metode	9
2.1	Feltinnsamling og områdebeskrivelser.....	9
2.2	Molekylære metoder	12
2.2.1	DNA-isolering.....	12
2.2.2	qPCR.....	12
2.2.3	Assay validering	14
2.2.4	Spesifisitetstesting.....	15
2.2.5	Definisjon av deteksjonsgrenser (LOD og LOQ).....	17
3	Resultater og diskusjon.....	18
3.1	Pukkellaks	18
3.2	Gjedde.....	20
3.3	Ørekyt	23
3.4	Sørv	26
3.5	Suter.....	29
3.6	Vasspest	31
4	Konklusjon	32
4.1	Viktige hensyn for å unngå krysskontaminering.....	34
5	Referanser.....	35

Sammendrag

NIVA har på oppdrag av Miljødirektoratet evaluert bruk av miljø-DNA for deteksjon av fremmed ferskvannsfisk i Norge. Prosjektet er en fortsettelse av prosjektet med samme navn i 2019 (Engesmo et al. 2020). I år har vi fokusert på fem arter hvor det var behov for videre utvikling etter fjorårets prosjekt. Disse fem er gjedde (*Esox lucius*), pukkellaks (*Oncorhynchus gorbusha*), ørekyt (*Phoxinus phoxinus*), sørv (*Scardinius erythrophthalmus*) og suter (*Tinca tinca*). Etter ønske fra oppdragsgiver har vi også inkludert vannplanten vasspest (*Elodea canadensis*).

Fjorårets prøvetakningsprotokoll har blitt benyttet for innsamling av vannprøver fra åtte forskjellige lokaliteter, fra henholdsvis Vestfold og Telemark fylke (Akersvannet, Aulielva- Ramnesbekken, Borrevannet, Hallevannet, Tuftdammen og Åletjønn), Viken fylke (Lyseren), og Troms og Finnmark fylke (Karpelva). Med unntak av Tuftdammen ble alle lokaliteter prøvetatt flere ganger i løpet av 2020, fra april til november. I Tuftdammen er det tatt prøver to påfølgende dager i november og prøvefisket etter suter.

Alle inkluderte deteksjonssystemer for fisk ble validert etter Thalingers evalueringsskala (Thalinger et al. 2021). Eksisterende qPCR-markører for gjedde og pukkellaks ble validert til nivå 4. Det ble funnet spesifisetsproblemer med markørene for ørekyt, sørv og suter. Deteksjonssystemet for ørekyt ble validert til nivå 1 og anbefales ikke videre brukt av forvaltningen. I dette prosjektet ble det utviklet og optimalisert nye markører for sørv og suter. Deteksjonssystemet for sørv ble validert til nivå 3 og her anbefales det videre utviklingsarbeid før det tas i bruk av forvaltningen. Deteksjonssystemet for suter ble validert til nivå 4. Valideringsnivået oppnådd av deteksjonssystemene for pukkellaks, gjedde og suter er tilstrekkelig høyt til at disse kan nyttes i forvaltningsøyemed.

Resultatene fra vannprøvene som ble samlet inn gjennom vekstsesongen ble satt i sammenheng med resultatene fra 2019 for å evaluere når på året det vil være mest hensiktsmessig med prøvetakning for å sikre deteksjon av de forskjellige målartene. I 2019 detekterte vi pukkellaks i Karpelva i oktober, etter at fisken hadde vandret opp for å gyte. I april 2020 kunne vi både finne yngel etter pukkellaksen og detektere denne med miljø-DNA-analyse. Vi ser videre at noe pukkellaks vandret opp i Karpelva også høsten 2020. Resultatene for gjedde viste at fisken er aktiv i de øvre vannmassene om våren og høsten. Det er lokale forskjeller, men våre resultater tyder på at prøvetakning for gjedde bør gjennomføres litoralt under gyteperioden om våren. Det var relativt høye konsentrasjoner av miljø-DNA fra sørv i prøvene hele året og prøvetakning kan sannsynligvis gjennomføres gjennom hele vekstsesongen. Resultatene for suter viste høye miljø-DNA nivåer i prøvene på vårsiden, i april og mai. Vi har også testet eksisterende qPCR-markører og protokoller for **vasspest**. Våre resultater kunne bekrefte forekomst av vasspest i Lyseren der planten har vært observert siden 2011, men kunne ikke påvise DNA i prøver fra Hallevannet, der den ble observert i 1967.

Artsspesifikke markører har i hovedsak blitt testet på miljø-DNA fra lokaliteter med kjent forekomst av målartene. Dette ble gjort for å validere metodikken og for å kunne bruke de innsamlede prøvene som testreferanser for hvilke arter vi bør detektere.

Summary

Title: Monitoring of invasive freshwater fish and invasive *Elodea canadensis* using environmental DNA (eDNA).

Year: 2021

Author(s): Anette Engesmo, Sonja Kistenich, Steen W. Knudsen, Guttorm Christensen, Martin Hesseløe and Marc Anglès d'Auriac

Source: Norwegian Institute for Water Research, ISBN 978-82-577-7359-5

On behalf of the Norwegian Environmental Agency (NVE), NIVA has evaluated the use of environmental DNA (eDNA) for the detection of invasive freshwater fish and water plague (*Elodea canadensis*) in Norway. The project is a continuation of the same project in 2019 (Engesmo et al. 2020). This year we have focused on five species where further development was needed after last year's project: pike (*Esox lucius*), pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*), minnow (*Phoxinus phoxinus*), rudd (*Scardinius erythrophthalmus*) and tench (*Tinca tinca*).

Last year's sampling protocol was used for the collection of water samples from eight different locations, from Vestfold and Telemark county (Akersvannet, Aulielva- Ramnesbekken, Borrevannet, Hallevannet, Tuftdammen and Åletjønn), Viken county (Lyseren), and Troms and Finnmark county (Karpelva). With the exception of Tuftdammen, all localities were tested several times during 2020, from April to November. In Tuftdammen, samples were collected on two consecutive days in November.

All fish assays were validated according to Thalinger's evaluation scale (Thalinger et al. 2021). Existing qPCR markers for pike and pink salmon were validated to level 4. Species specificity problems were found with the markers for minnow, rudd and tench. The minnow assay was validated to level 1 and is not recommended for further use in monitoring. New assays were developed for rudd and tench. The assay for rudd was validated to level 3 and further development work is recommended before it is implemented in monitoring. The detection system for tench was validated to level 4. The level of validation achieved by the assays for pink salmon, pike and tench is sufficiently high for these to be implemented into monitoring programs.

Results were evaluated to determine the optimal sampling time for the different species. In 2019 we detected pink salmon in the river Karpelva in October, after the fish had migrated up to spawn. In April 2020, we found fry and detected the species with eDNA. Our results also indicate that some pink salmon migrated up Karpelva in the autumn of 2020. The results for pike showed that the fish is active in the upper water masses in the spring and autumn. There were local differences, but our results suggest that sampling for pike should be carried out during the spring period when the fish spawns. There were relatively high concentrations of eDNA from rudd in samples from the whole season. The results for tench showed high eDNA levels in spring, mainly in April and May. We have also tested an existing qPCR assay for waterweed. Our results confirmed the presence of waterweed in Lyseren where the plant has been observed since 2011. All samples collected from Hallevannet were negative for waterweed, indicating that there is not a population of the plant in Hallevannet.

Species-specific markers have mainly been tested on environmental DNA from localities with known presence of target species. This was done to validate the methodology and to use the collected samples as test references for which species we should detect.

1 Introduksjon

De senere år har det skjedd omfattende metodeutvikling innenfor miljøovervåking. En av de nye metodene som stadig oftere tas i bruk er miljø-DNA. Prinsippet for deteksjon av miljø-DNA er at alle organismer har en unik genetisk signatur som vil «lekke» ut i miljøet, fordi DNA stadig skilles ut gjennom naturlige prosesser: For eksempel avskalling av epidermale celler og naturlige sekreter, og vevsrester knyttet til avføring, reproduksjon, smoltifisering, skade eller predasjon. Det er altså mulig å isolere den genetiske signaturen fra en fisk direkte fra en vannprøve. Miljø-DNA vil imidlertid brytes ned over tid og blir i akvatiske økosystemer borte i løpet av noen uker (Pillod et al. 2013; Barnes et al. 2014; Lacoursière-Roussel et al. 2016). Fordi det brytes ned relativt fort vil en molekylær deteksjon implisere at det har vært et levende individ av den aktuelle arten, i det følgende betegnet som 'målararten', til stede relativt nylig (Andruszkiewicz et al. 2017; Sigsgaard et al. 2017; Collins et al. 2018; Jo et al. 2019). Metoden er ikke-invasiv og forstyrrer ikke individene som prøvetas. Bruk av miljø-DNA har av disse årsakene vist seg å være spesielt egnet til oppdagelse og sporing av sjeldne eller innvandrende arter, ikke minst for deteksjon av uønskede arter. Et eksempel på dette er fremmede arter av fisk (se for eksempel Harper et al. 2018), der det bare er få individer til stede i etableringsfasen, og som derfor er tilsvarende vanskelige å spore opp ved tradisjonelle metoder. Introduksjon av fremmede arter i ferskvannssystemer kan føre til lokalt tap av biologisk mangfold og til økosystemiske endringer i innsjøer (Nunes et al. 2015). For å kunne begrense mulige skadevirkninger er det viktig å oppdage introduksjonen tidlig. Bruk av miljø-DNA til overvåking av fremmede ferskvannsfisk vil kunne bidra til at man raskere kan iverksette tiltak for å begrense skadene.

Kvaliteten på analyser av miljø-DNA vil aldri være bedre enn de innsamlede prøvene. Korrekt prøvetakningsprotokoll og enhetlig behandling av prøvene er en forutsetning for å lykkes. Sted, vanndybde og tidspunkt på året vil ofte være utslagsgivende for hvilke arter som detekteres. Erfaring viser at DNA-rester i vannmiljø spres effektivt hvis vannmassene blandes. I innsjøer kan derfor sen høst og tidlig vår, når innsjøer normalt sirkulerer, være spesielt egnet for prøvetakning. Sjukning i innsjøer, for eksempel assosiert med termoklin eller salinitet, kan motsatt bidra til redusert innblanding av miljø-DNA. Derfor er det også viktig å vurdere hvor i vannsøylen vannprøven bør tas. I tillegg vil det være sesongvariasjoner i mengden av miljø-DNA, avhengig av den aktuelle artens økologi og livssyklus. Særlig i forbindelse med fiskens gyteperiode kan man forvente større mengder av miljø-DNA i vannet (Sigsgaard et al. 2017; Angles d'Auriac et al. 2019). Få studier har undersøkt fordelingen av miljø-DNA i vannsøylen, men det er rimelig å anta at vannprøver tatt langs bunnen vil ha sterkere signaler fra bunnlevende arter. Det er altså nødvendig å kjenne målarartens økologi når man planlegger prøvetakinga, både for å evaluere hvor i vannet og når på året prøven bør samles. Det må også forventes sesongvariasjon av miljø-DNA konsentrasjoner i elver. Snøsmelting eller kraftig regn vil kunne øke vannstanden i vassdrag, noe som igjen påvirker hvor fort miljø-DNA vaskes bort. Få studier er publisert der man evaluerer påvirkningen vannføring har på miljø-DNA konsentrasjoner gjennom året. Derfor har vi i dette prosjektet valgt ut prøvetaknings-tidspunktene på bakgrunn av målartenes økologi og livssyklus. Prøvetakingen i Aulielva og Karpelva ble ikke gjennomført i perioder med flom.

Ved deteksjon av fremmede arter er det ønskelig å kunne detektere så lave populasjonsstørrelser som mulig, for å kunne detektere arten allerede tidlig i etableringsfasen. Av denne grunn blir det ofte trukket direkte paralleller mellom mengden filtrert volum og evnen til å detektere lave mengder av en målarart. Jo mer vann man får gjennom filteret, jo mer sannsynlig er det at man klarer å detektere arten man leter etter. Men dette er ikke nødvendigvis hele sannheten. Filterets porestørrelse

påvirker hvor mye vann det er mulig å filtrere før filteret tettes: Ved større porestørrelse vil man kunne filtrere større volum vann, men da risikerer man også at DNA-molekyler passerer gjennom filtret. I tillegg vil løst DNA (altså DNA som ikke lenger er bundet inne i en celle) ofte feste seg til noe annet, for eksempel løse partikler i vannet. Disse partiklene bidrar til å tette filteret, slik at mindre vannvolum kan filtreres, men fordi de kan ha DNA bundet til seg kan de likevel være viktige å ha med. På den andre siden kan disse partiklene også inneholde humusstoffer (særlig et problem i ferskvann), som igjen bidrar til å hemme selve PCR-prosessen (Goldberg et al. 2015). Dette er altså komplekse avveininger, der det er vanskelig å med sikkerhet avklare hva som er den beste løsningen i hvert enkelt tilfelle.

Falske positive og falske negative resultater er noe man ønsker å unngå. Falske negative resultater motvirkes ved å ha robuste deteksjonssystemer som likevel kan detektere lave mengder av DNA i prøvene. Det anbefales også å bruke et qPCR reagens som er spesielt utviklet for å håndtere de naturlige PCR-hemmende stoffene som finnes i vannprøver, fordi disse kan bidra til falske negativer. Falske positive prøver motvirkes blant annet ved kontinuerlig fokus på krysskontaminering, noe som drøftes både i denne og tidligere rapporter (Engesmo et al. 2020). En annen viktig prosedyre for å unngå falske positive prøver er validering av de molekylære deteksjonssystemene. Et deteksjonssystem består av korte, artsspesifikke DNA-sekvenser (markører), samt parametere knyttet til optimalisering av funksjonen til disse. Hver art har tre markører (to primere og en probe) som brukes til deteksjon av arten. Dersom disse ikke er godt nok tilpasset målarten kan man risikere å detektere flere arter enn den man er på jakt etter (Langlois et al. 2020, Thalinger et al. 2021, Wilcox et al. 2013). Dessverre er faglitteraturen ofte uspesifikk med hensyn til informasjon om hvordan molekylære artsspesifikke deteksjonssystemer er validert. Thalinger og kollegaer har derfor utviklet en valideringsskala som setter spesifikke kriterier for hvilke tester og optimaliseringssteg et deteksjonssystem skal ha vært gjennom, og hvilke parametere som skal rapporteres for de ulike nivåene i skalaen¹. Skalaen går fra nivå 1 til 5, det nivå 1 er ansett som «ufullstendig». På det nivået er det umulig å avgjøre med sikkerhet hvorvidt celler fra mål-arten er til stede eller ikke. Det er først på nivå 4 at det anbefales å bruke deteksjonssystemet i forvaltningen.

Krysskontaminering har vært et tilbakevendende problem ved bruk av miljø-DNA, og kan skje både ved prøvetaking, prøvebehandling og ved analyse. En av erfaringene fra dette prosjektet er at ved å bruke engangsprodukter for prøvetaking og ved å iverksette rigide vaskeprotokoller i lab, er det mulig å unngå krysskontaminering.

Denne utredningen ble utført på oppdrag fra Miljødirektoratet. Oppdraget var å *utvikle og teste ut et system for bruk av miljø-DNA som supplerende verktøy i overvåkning og kartlegging av fremmed ferskvannsfisk for forvaltningen*. Prosjektet er en fortsettelse av prosjektet med samme navn i 2019 (Engesmo et al. 2020), i år har vi fokusert på fem arter hvor det var behov for videre utvikling av analysene etter fjorårets prosjekt, disse er **pukkellaks** (*Oncorhynchus gorbuscha*), **gjedde** (*Esox lucius*), **ørekyt** (*Phoxinus phoxinus*), **sørv** (*Scardinius erythrophthalmus*) og **suter** (*Tinca tinca*). Etter ønske fra Miljødirektoratet har vi også inkludert vannplanten **vasspest** (*Elodea canadensis*). Det er valgt ut et mindre antall lokaliteter som er prøvetatt flere ganger for å identifisere optimalt tidspunkt for prøvetaking. Fordi valideringsnivået for de utvalgte fiskemarkørene var usikkert, ble deteksjonssystemene testet for spesifisitet. Resultatene ble vurdert opp mot den nevnte valideringsskalaen. Deteksjonssystemene for pukkellaks og gjedde ble validert til nivå 4. Sørv og suter kom først bare til nivå 1. Markørene ble derfor redesignet, og deteksjonssystemene optimalisert på nytt, deretter ble suter validert til nivå 4 og sørv til nivå 3. Deteksjonssystemet for ørekyt forble på nivå 1, og vi anbefaler ikke videre bruk av dette i forvaltningsøyemed.

¹ <https://edna-validation.com/>

2 Metode

Det følgende kapitlet gir en kort gjennomgang av arbeidet som er gjort og metodikken som ble anvendt. Mer grundige beskrivelser finnes i referansene, for eksempel Thomsen et al. (2012), Agersnap et al. (2017) og Knudsen et al. (2018; 2019), med unntak av endringer gjort i dette prosjektet, som er beskrevet i detalj.

2.1 Feltinnsamling og områdebeskrivelser

I 2020 ble det samlet inn prøver fra 23. april (Karpelva) til 10. november (Tuftdammen). Tuftdammen ble prøvetatt to påfølgende dager i november i forbindelse med prøvefiske på lokaliteten. Akersvannet, Aulielva, Hallevannet, Lyseren og Åletjønn ble prøvetatt tre ganger hver, mens Karpelva ble prøvetatt fem ganger. Prøvetakningen ble spredt ut gjennom sesongen med den hensikt å prøve å finne ut om det er noen tidspunkt på året som er bedre egnet enn andre. I Akersvannet, Hallevannet og Lyseren ble det tatt prøver fra flere stasjoner i litoral, og i Akersvannet også på ulike dyp i pelagial. Lokalitetene lå i hovedsak i Vestfold og Telemark, samt i Viken fylke (**Tabell 1, Figur 1, Vedlegg A**).



Figur 1. Prøvetakingsstasjoner på Østlandet. Det ble i tillegg tatt prøver i Karpelva i Sør-Varanger.



Figur 2. Filtrering av feltblank (foto: Akvaplan-niva).

Det ble samlet inn to prøver fra hver lokalitet ved hver prøvetaking. Disse er tatt fra samme sted, direkte etter hverandre. Ved prøvetaking ble 1,5 liter prøve fylt i sterile engangsposer ved hjelp av engangs plastikkbeger. Vannposen ble montert i en lukket filtreringsoppsats og oppsettet ble satt under trykk ved bruk av manuell pumpe eller elektrisk luftkompressor. Trykket ble satt til 3 bar. Til filtrering ble det benyttet Sterivex-filter som består av et 0,22 μm membranfilter montert i en kapsel som reduserer faren for krysskontaminering. Etter filtrering ble filteret umiddelbart fiksert med lysisbuffer (ATL) (samme ATL-buffer som er inkludert i 'DNeasy blood & tissue' DNA-ekstraksjons kit fra Qiagen) og forseglet med endestykker og parafilm.

Filtreringstid per prøve var 15–30 minutter, og vannvolum varierte fra 150 ml til 1200 ml, avhengig av partikkelmengde. Til feltblank ble det benyttet vann innkjøpt i butikk, der filtreringvolumet var 1000 ml. Filtrene ble fraktet i kjølebag til laboratoriet, der de ble oppbevart mørkt og kjølig frem til DNA-isolering.

Tabell 1. Oversikt over alle lokaliteter det er analysert miljø-DNA prøver i 2020.

Innsjø	Fylke	Kommune	Kilde	St.	Lat	Long	Analysert for	Prøvetatt
Akersvannet	Vestfold og Telemark	Stokke	F, FM	1	59.25235	10.32083	Gjedde, ørekyt, sørv	april, juni og juli
Akersvannet	Vestfold og Telemark	Stokke	F, FM	2	59.23462	10.32023	Gjedde, ørekyt, sørv	april, juni og juli
Akersvannet	Vestfold og Telemark	Stokke	F, FM	3	59.25239	10.33220	Gjedde, ørekyt, sørv	april, juni og juli
Akersvannet	Vestfold og Telemark	Stokke	F, FM	4	59.24185	10.33197	Gjedde, ørekyt, sørv	april, juni og juli
Aulielva (Ramnesbekken)	Vestfold og Telemark	Tønsberg	F, FM	1	59.34901	10.24800	Ørekyt	mai, august og oktober
Borre vannet	Vestfold og Telemark	Horten	F, FM	1	59.39910	10.44298	Gjedde, ørekyt, sørv og suter	april, mai og november
Halle vannet	Vestfold og Telemark	Larvik	F, FM, M	1	59.05849	9.90407	Vasspest, gjedde	april, august og oktober
Halle vannet	Vestfold og Telemark	Larvik	F, FM, M	2	59.06754	9.91431	Vasspest, gjedde	mai, august og oktober
Halle vannet	Vestfold og Telemark	Larvik	F, FM, M	3	59.06809	9.85630	Vasspest, gjedde	april, august og oktober
Halle vannet	Vestfold og Telemark	Larvik	F, FM, M	4	59.05412	9.87278	Vasspest, gjedde	april, august og oktober
Karpelva	Troms og Finnmark	Sør-Varanger	FM, r	1	69.66633	30.38614	Pukkellaks	april, juni, tidlig august, sent august og oktober
Lyseren	Viken	Enebakk	F, FM	1	59.70734	11.10192	Vasspest, gjedde, sørv	april, september og oktober
Lyseren	Viken	Indre Østfold	F, FM	2	59.68080	11.08327	Vasspest, gjedde, sørv	april, september og oktober
Lyseren	Viken	Enebakk	F, FM	3	59.71566	11.13768	Vasspest, gjedde, sørv	april, september og oktober
Tuftdammen	Vestfold og Telemark	Sande	FM, M	1	59.67189	10.24766	Sørv og suter	november
Åletjønn	Vestfold og Telemark	Sandefjord	F, FM	1	59.35602	10.06001	Ørekyt	mai, august og november

Kilder benyttet for bekreftelse av tilstedeværelse av mållart: F=fiskekart, FM=Fylkesmannen, r=Berntsen et al. 2018, M=muntlig lokalkjent

2.2 Molekylære metoder

2.2.1 DNA-isolering

Prøver ble fraktet direkte til Sharelab AS i Forskningsparken, hvor de ble oppbevart i kjøleskap frem til DNA ekstraksjon. Denne laben ble valgt for å hindre krysskontaminering inn i NIVAs hovedlab, der de senere qPCR-kjøringene ble utført. Filtrene ble ekstrahert med DNeasy blood & tissue kit fra Qiagen med protokoll i henhold til Spens et al. (2016).

2.2.2 qPCR

Alle qPCR-kjøringer er gjort ved NIVAs hovedlaboratorium i Oslo, med to CFX96 BIO-Rad qPCR-instrumenter. Primer- og probesekvenser (markører), samt sluttkonsentrasjonen av primer- og probe og nøkkelinformasjon om temperaturinstillinger og fragmentlengde for protokollene er oppsummert i **Tabell 2**. Alle qPCR-reaksjoner er kjørt med 5 µl templat og totalt reaksjonsvolum på 25 µl. Alle qPCR kjøringene er gjort med PerfeCTa qPCR ToughMix (QuantaBio). Alle prøver, samt positive og negative kontroller ble kjørt i tekniske triplikater. Ved qPCR-kjøringer av miljøprøver inkluderes alltid en positiv kontroll i 10x fortynningsrekke, som brukes som standardkurve. Den positive kontrollprøven er laget av kalibrert genomisk DNA fra mållarten. I tillegg inkluderes tre typer negative kontroller: I tre brønner tilsettes 5 µl rent vann (ddH₂O) til reaksjonen istedenfor templat. Disse brønnene forsegles først og fungerer som en kontroll mot krysskontaminering av reagensene. I midten av plata er det ytterligere tre «blanke brønner» hvor det også tilsettes 5 µl ddH₂O til reaksjonen. Disse forsegles sist og fungerer som kontroll for mulig krysskontaminering ved lasting av prøvene. Den tredje negative kontrollen er en blank filtreringskontroll tatt i felt (feltblank). Positive og negative kontroller benyttet i prosjektet er oppsummert i **Tabell 3**. Det ble også implementert ekstra strenge vaskerutiner på laben for å redusere muligheten for krysskontaminering: Alle overflater, samt pipetter, gjenbruksvarer og håndtak ble vasket før og etter bruk, først med 1 % klorløsning og deretter med EtOH.

Tabell 2. Markører og qPCR-protokoller for målarter inkludert i dette prosjektet. Kons. (nM) angir den optimale sluttkonsentrasjon av primere og probe.

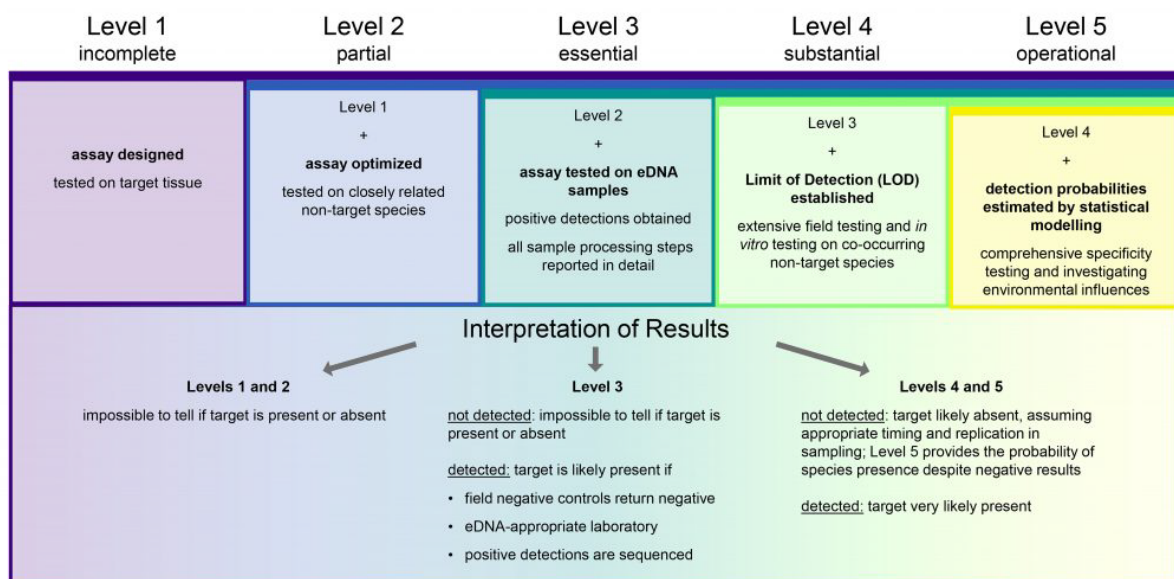
Art / markør	Sekvens navn	Sekvens (fram, reverse og probe)	Ta °C	Kons. (nM)	Amp. (bp)	Ref.
Gjedde (<i>Esox lucius</i>) / Cyt B	<i>EsolucCBL</i>	GGGACGTTAACTACGGCTGA	60	1200	84	Spens et al. (2016)
	<i>EsolucCBR</i>	CGGGCGATGTGTATGTAAA		800		
	<i>EsolucCBP</i>	FAM-CCGAAATATTCACGCTAACGGTGCA-BHQ1		300		
Ørekyt (<i>Phoxinus phoxinus</i>) / CTRL	Orekyt_CTRL_19-42_F	GGATGGCTAACCCATATCTCAACT	60	900	69	Fossøy et al. (2017)
	Orekyt_CTRL_68-88_R	GTCAAACCCCAAAAGCAAGGA		900		
	Orekyt_CTRL_51-64_P	FAM-CGCACGCTCTCGAA-MGB-EQ		250		
Pukkellaks (<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>) / COI	Oncgor_CO1_F09	TCCTTCCTCCTCCTCCTTC	60	400	163	Andersen et al. (2017)
	Oncgor_CO1_R06	TGGCCCCTAAAATTGATGAG		400		
	Oncgor_CO1_P06	FAM-CAGGGGCATCCGTGCGACTTAACTAT-BHQ-1		100		
Sørv (<i>Scardinius erythrophthalmus</i>) / Mitochondrial COI	Sørv#15c-445F25	TACTACAATTATTAATATGAAGCCC	59	500	102	Denne studien
	Sørv#15c-526R22	TAGTGATAGAAGTAGAAGGACA		500		
	Sørv#15c-493U19	FAM-ACCGCTGTTTGTATGAGCC-MGB		250		
Suter (<i>Tinca tinca</i>) / Mitochondrial COI	Suter-83bp-372F20	CCTCAGTAGACCTAACCAATT	59	500	83	Denne studien
	Suter-83bp-434R21	AGTTGTGGTGATAAAATTGAT		500		
	Suter-83bp-391L19	FAM-TGCTAGGTGAAGTGAGAAA-MGB		250		
Vasspest (<i>Elodea canadensis</i>) trnL-trnF intergenic spacer	EctrnL_F	TTTCTCCTTCATTGTATTCTTTCACA	58	500	105	Anglès d'Auriac et al. (2019a)
	EctrnL_R	TGTTGATTTCTATCTGTATTGTAGAC		500		
	EctrnL_P	FAM-TCCGAACAGAAATGCCTCTCTTATCC TexR-TCCGAACAGAAATGCCTCTCTTATCC-BHQ2		200		

Tabell 3. Oversikt over alle positive og negative kontroller som ble inkludert i alle qPCR-kjøringer.

Navn	Beskrivelse	Hvilken prøve	Hensikt
1 Positiv kontroll	5 µL kalibrert DNA av målarten	Ordinære prøvekjøringer	Standardkurve for målarten, inkludert i alle prøvekjøringer.
2 Negativ kontroll	5 µL ddH ₂ O brukes som prøve i 3 brønner per plate på alle prøvekjøringer.	Ordinære prøvekjøringer	Kontroll for krysskontaminering av reagenser, lastes og forsegles først.
3 Negativ kontroll	5 µL ddH ₂ O brukes som prøve i 3 brønner (i midten av plata) på alle prøvekjøringer.	Ordinære prøvekjøringer	Kontroll for krysskontaminering ved lasting av prøve. Disse brønnene forsegles sist.
4 Negativ kontroll	5 µL feltblank brukes som prøve i 3 brønner på alle prøvekjøringer.	Ordinære prøvekjøringer	Kontroll for krysskontaminering ved prøvetaking i feltet og transport tilbake til laboratoriet

2.2.3 Assay validering

For å avgjøre om det man detekterer med miljø-DNA virkelig er målarten, er det viktig at det molekylære deteksjonssystemet er validert før det tas i bruk av forvaltningen. Thalinger og kollegaer (2021) har som nevnt ovenfor utviklet en valideringsskala fra 1 til 5 som inkluderer kriterier og optimaliseringssteg, som må rapporteres sammen med deteksjonssystemet for at det skal kunne oppnå de forskjellige nivåene (**Figur 3**). Skalaen er additiv, det er derfor nødvendig å oppfylle minstekriteriene i både nivået man vil inn i, samt alle kriterier for de underliggende nivåene for å oppnå det ønskede valideringsnivået. Alle deteksjonssystemene som er inkludert i denne rapporten er validert i henhold til denne skalaen og oppnådd nivå er angitt i Kapittel 3. Spesifisitetstesting er beskrevet i kapittel 2.3.4, mens *in silico* evaluering og optimalisering er beskrevet i Engesmo et al. 2020.

**Figur 3.** Valideringsskala for molekylære deteksjonssystemer. Figur hentet fra edna-validation.com

Under følger en oppsummering av hva som må inkluderes for å oppnå de forskjellige valideringsnivåene.

Validering til **nivå 1 «assay designed»** krever:

- *In silico* analyse av deteksjonssystem-spesifisitet: genetiske forskjeller (mismatches) både innad i arten og mellom andre arter, samt potensielle problematiske arter i forhold til spesifisitet. Informasjon om databaser som er brukt for å hente frem sekvenser og programvare brukt for analysen.
- Primer- og probesekvenser, samt hvilket gen disse tilhører.
- Tekniske detaljer som qPCR syklus informasjon og hvilke reagenser som er benyttet.
- *In vitro* testet på vev av målarten. Geografisk opphav til dette vevet skal rapporteres.

Validering til **nivå 2 «assay optimalisert»** krever at alle parametere i nivå 1 er oppfylt. **I tillegg** skal følgende kriterier være oppfylt:

- *In silico* analyse av nært beslektede arter.
- Uttømmende tekniske detaljer om reagenser, qPCR kjøring, oppsett, og tekniske replikater.
- Optimalisering av PCR forhold eller protokoll oppgis.
- *In vitro* testing på nært beslektede arter.

Validering til **nivå 3 «assay testet på miljø-DNA prøver»** krever at alle ovenstående parametere er oppfylt. **I tillegg** skal følgende kriterier være oppfylt:

- *In silico* analyse av geografisk sameksisterende arter.
- Forholdsregler tatt i laboratoriet for å forhindre kontaminering av prøver.
- Innsamlingsmetodikk og ekstraksjonsmetode av miljø-DNA prøver.
- Konsentrasjon av miljø-DNA i prøver oppgitt.
- Positiv amplifisering av målarten i naturlige prøver.

Validering til **nivå 4 «Limit of detection (LOD) etablert»** krever at alle ovenstående parametere er oppfylt. **I tillegg** skal følgende kriterier være oppfylt:

- Etablert deteksjonssystemets deteksjonsgrense (LOD) og oppgitt hvordan denne er etablert.
- Uttømmende testing på miljø-DNA prøver fra forskjellige lokasjoner.
- Testet på lokasjoner hvor arten forventes funnet og hvor den ikke forventes funnet.
- *In vitro* testing på geografisk sameksisterende arter.

Validering til **nivå 5 «Økologisk validering»** krever at alle ovenstående parametere er oppfylt. **I tillegg** skal følgende kriterier være oppfylt:

- *In silico* uttømmende spesifisitetstesting av ikke nært beslektede arter eller ikke sameksisterende arter. Alle avvik må forsvares.
- Statistisk analyse av sannsynlighet for deteksjon.
- Forståelse av økologiske og fysiske faktorer for opphavet til miljø-DNAet fra målarten.

2.2.4 Spesifisitetstesting

Markørene for alle inkluderte fiskearter ble testet mot nært beslektede arter og relevante sameksisterende arter. Relevante arter ble valgt ved å sammenligne mitokondrielle DNA-sekvenser fra flere arter og velge ut de som lignet på målarten i det aktuelle området. Inkludert i analysene ble også alle nært beslektede arter vi hadde tilgang på, samt andre arter som ble vurdert relevante på grunn av overlappende utbredelse. Alt referansemateriale benyttet i spesifisitetstesting er listet i **Tabell 4**.

Tabell 4. Oversikt over referansemateriale brukt for spesifisitetstesting. Prøver med 'ZMUC' nummer er hentet fra museumssamlingen på 'Zoologisk Museum, Universitet i København' og kommer fra Danmark.

Art	Opphav	Prøve- type	DNA- kons.	Testet mot:				
				Pukkellaks	Ørekyt	Gjedde	Sørv	Suter
Ørret (<i>Salmo trutta</i>), hann	Driva	Vev	2 ng/μl	X				
Ørret (<i>Salmo trutta</i>), hunn	Driva	Vev	2 ng/μl	X				
Atlantisk laks (<i>salmo salar</i>), hann	Driva	Vev	2 ng/μl	X	X			
Atlantisk laks (<i>salmo salar</i>), hunn	Driva	Vev	2 ng/μl	X				
Sørv (<i>Scardinius erythrophthalmus</i>)	Hallevannet	Vev	7,8 ng/μL	X	X	X	X	X
Suter (<i>Tinca tinca</i>)	Kroktjern	Vev	6,3 ng/μL	X	X	X	X	X
Ørekyt (<i>Phoxinus phoxinus</i>)	Aulielva	Vev	7,6 ng/μL	X	X	X	X	X
Gjedde (<i>Esox lucius</i>)	Pasvikvassdraget	Vev	8,6 ng/μL	X	X	X	X	X
Pukkellaks (<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>)	Norge	Vev	13,1 ng/μL	X	X	X	X	X
Bekkerøye (<i>Salvelinus fontinalis</i>)	Gudenåsen, Danmark ZMUCP191980	Vev	0,3 ng/μL	X	X	X	X	X
Solabbor (<i>Lepomis gibbosus</i>)	Bårdsrudd	Vev	6,3 ng/μL	X	X	X	X	X
Karuss (<i>Carassius carassius</i>)	Ballerup, Danmark ZMUC P265763	Vev	1,5 ng/μL	X	X	X	X	X
Regnbueørret (<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	Gudenåsen, Danmark ZMUCP191985	Vev	0,6 ng/μL	X	X	X	X	X
Mort (<i>Rutilus rutilus</i>)	Glomma	Vev	5,5 ng/μL	X	X	X	X	X
Karpe (<i>Cyprinus carpio</i>)	Silkeborg, Danmark ZMUCP265736	Vev	2,5 ng/μL	X	X	X	X	X
Abbor (<i>Perca fluviatilis</i>)	Roskilde fjord, Danmark ZMUCP45438	Vev	8,1 ng/μL		X	X	X	X
Laue (<i>Alburnus alburnus</i>)	Glomma	Vev	9,9 ng/μL		X		X	X
Flire (<i>Blicca bjoerkna</i>)	Glomma	Vev	4,9 ng/μL		X		X	X
Brasme (<i>Abramis brama</i>)	Borrevannet	Vev	4,9 ng/μL		X		X	X

2.2.5 Definisjon av deteksjonsgrenser (LOD og LOQ)

Resultatet fra qPCR-analyser blir angitt i Ct-verdier. Ct står for «cycle threshold» og angir den amplifikasjonssyklusen der det er dannet nok DNA til å skille det fluorescerende signalet avgitt av proben fra bakgrunnsfluorescensen som alltid vil være til stede. Lav Ct-verdi gjenspeiler høy konsentrasjon av DNA i prøven, mens høy Ct-verdi angir lav konsentrasjon av DNA i prøven. Generelt er de kvantitative mulighetene for å tolke qPCR-resultater dårligere jo høyere Ct-verdien er. Dersom Ct-verdien er meget høy (typisk kommer denne grensen nærmere 40 sykler) vil qPCR resultatene være å anse som usikre. I dette avsnittet forklares grunnlaget for hvordan qPCR resultatene tolkes og klassifiseres.

Resultatene av qPCR-analysene er vurdert i henhold til minimumskrav for publikasjon av qPCR-eksperimenter (MiQE), som beskrevet i litteraturen (Bustin et al. 2009; Mauvisseau et al. 2019; Klymus et al. 2020).

I alle analysene ble det også inkludert en positiv kontroll, i form av DNA isolert fra vev av mållarten. Den positive kontrollen ble analysert i en fortytningsserie med kjent DNA-konsentrasjon, for å lage en standardkurve. Denne standardkurven ble benyttet til å gi et estimat for hvor mye miljø-DNA fra mållarten som var til stede i vannprøven. Konsentrasjonen av miljø-DNA i prøven fungerer som en grov proxy for artstetthet på den aktuelle stasjonen.

Standardkurven brukes videre til å fastslå LOD («limit of detection») og LOQ (limit of quantification) bør fastlegges for hver qPCR-plate. Hvis dette ikke er mulig, bør LOD og LOQ fastlegges separat for hvert av de artsspesifikke deteksjonssystemene. For å fastsette LOD korrekt, er det nødvendig å kjenne DNA-konsentrasjonen av den laveste fortytningen der det fortsatt er mulig å spore DNA i ett av replikatene. Alle repetisjoner av den mest fortynnede standarden bør derfor være negative. Hvis det ikke er mulig å fastsette LOD kan en tidligere LOD-verdi for samme artsspesifikke sporingssystem benyttes. Grensen for kvantifisering (LOQ) defineres ut fra den lavest reproduerbare standarden (alle tre tekniske replikater av en prøve amplifiserer og innen rimelig avstand fra hverandre). På bakgrunn av de negative kontrollene, LOD og LOQ, er resultatene i denne rapporten er delt inn i tre kategorier:

- 1) **Positive prøver** angir entydig qPCR amplifisering av mållarten.
- 2) **Usikre positive prøver** angir qPCR amplifisering av mållarten, men amplifiseringen kommer senere enn den laveste standarden, eller bare i en eller to av triplikatene.
- 3) **Negative prøver** angir manglende qPCR amplifisering av mållarten.

For prøvene som faller i den grønne kategorien (positive prøver) **og** er over LOQ, vil det være mulig å relatere resultatene fra miljø-DNA prøvene med den kjente konsentrasjonen i standardkurven. På denne måten kan man få et første grovt estimat av artens tetthet på stasjonen da prøven ble samlet. Kvantitative sammenligninger skal imidlertid alltid utføres innenfor samme qPCR-assay, og prøver som sammenlignes skal være behandlet likt.

3 Resultater og diskusjon

I dette prosjektet har vi utviklet og testet ut et system for bruk av miljø-DNA som supplerende verktøy i overvåkning og kartlegging av fremmed ferskvannsfisk for forvaltningen. Vi har benyttet den molekylære metoden qPCR og i det følgende presenterer vi resultatene fra miljø-DNA analysene for pukkellaks, gjedde, ørekyt, sørv og suter, samt vannplanten vasspest.

3.1 Pukkellaks

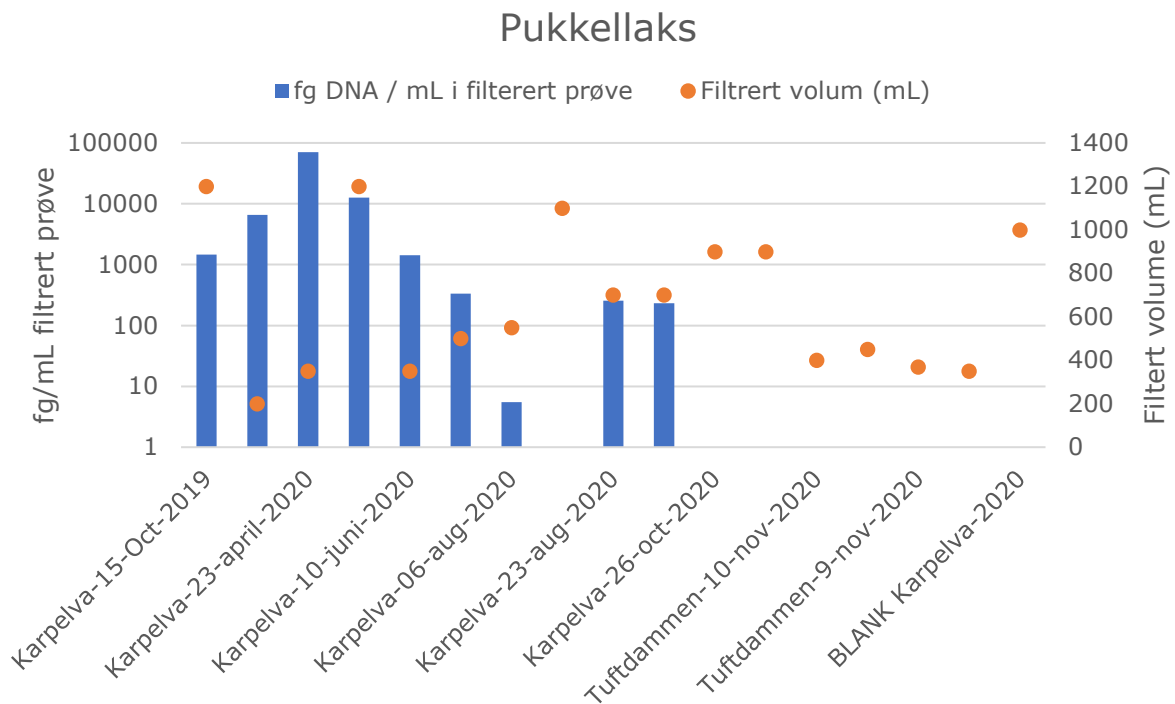


Figur 4. Stasjon for prøvetaking i Karpelva (venstre); yngel av pukkellaks nær stasjonen (høyre) (foto Akvaplan-niva).

Deteksjonssystemet ble spesifisitetstestet på sameksisterende laksefisk, samt en rekke andre arter (**Tabell 4**). Ved original publisering ble markørene også testet mot røye (Andersen et al. 2017), det ble ikke registrert noen kryssamplifisering i noen av studiene. Det ble analysert forventet positive prøver fra Karpelva i Finnmark og forventet negative prøver fra Tuftdammen i Vestfold og Telemark. Alle forventet negative prøver var negative.

Det ble samlet prøver fem ganger i 2020 (april, juni, tidlig august, sen august og oktober) i Karpelva (**Figur 4** og **Vedlegg A**), og analysert for pukkellaks. Oppgangen av pukkellaks i norske elver er klart størst i oddetallsår, men resultatene (**Figur 5**) viser at det også er mulig å detektere pukkellaks også i partallsår. Pukkellaksen gyter i august til oktober og yngelen klekkes i all hovedsak på våren året etter. I Karpelva ble det observert mye pukkellaks i 2019. Det ble registrert relativt høye nivåer av miljø-DNA i oktober 2019, etter oppvandring av pukkellaks. Første prøvetaking i 2020 ble gjort i april, da ble de høyeste miljø-DNA verdiene for pukkellaks i denne studien registrert, samtidig ble det også observert yngel av pukkellaks under isen og i råkene ved stasjonen (**Figur 4**). Det var fortsatt mulig å registrere miljø-DNA av pukkellaks i juni, men i begynnelsen av august har konsentrasjonen sunket betraktelig. Pukkellaskyngelen vandrer trolig ut i løpet av våren og sommeren, men resultatene viser at det ble detektert pukkellaks i Karpelva i august. Mengden DNA på filtrene var høyere i slutten av august enn i begynnelsen. Det ble ikke detektert pukkellaks-DNA i oktober. Resultatene indikerer oppvandring av pukkellaks i Karpelva i august 2020. Nye undersøkelser med bruk av miljø-DNA i 2021 vil kunne avdekke om gytingen høsten 2020 var vellykket. Feltblank fra Karpelva og prøver fra Tuftdammen var alle negative.

Deteksjonssystemet for pukkellaks ble validert etter kriteriene i Thalingers valideringskala til nivå 4 og vurderes derfor som klare til bruk av forvaltningen.



Figur 5. Resultater for pukkellaks fra Karpelva i Finnmark. Blå søyler viser mengde DNA fra pukkellaks i prøven, korrelert mot en standard kurve generert av vev fra norsk bestand av pukkellaks. Merk logaritmisk skala. Orange sirkler viser filtrert volum. To prøver fra Tuftdammen ble inkludert som ekstra negative kontroller. Merk logaritmisk skala.

3.2 Gjedde



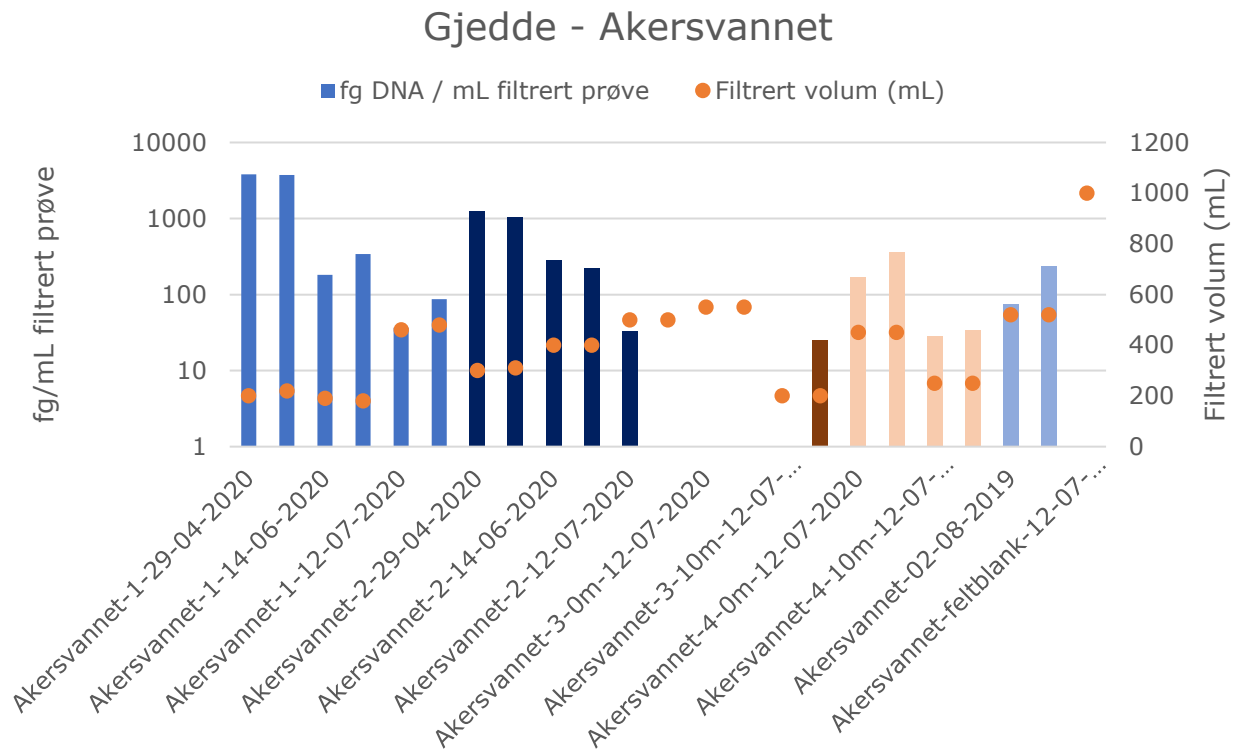
Figur 6. Gjedde betraktes som en regionalt fremmed art og det er ikke ønskelig at den spres til nye vassdrag (foto: Akvaplan-niva).

Deteksjonssystemet ble spesifisitetstestet mot en rekke sameksisterende arter (**Tabell 4**). Det er ingen nært beslektede arter av gjedde i norsk natur. Det ble ikke registrert noen kryssamplifisering.

Det ble samlet prøver for analyse av gjedde i Akersvannet (fire stasjoner), Halle vannet (fire stasjoner), Borrevannet (en stasjon) og Lyseren (tre stasjoner). Alle innsjøene ble prøvetatt tre ganger i løpet av året, se **Vedlegg A** for kart. Arten er ikke sikkert rapportert fra Halle vannet, men det er gjedde i mange nærliggende vassdrag. Samtlige prøver fra Halle vannet var negative (resultater ikke vist).

Akersvannet

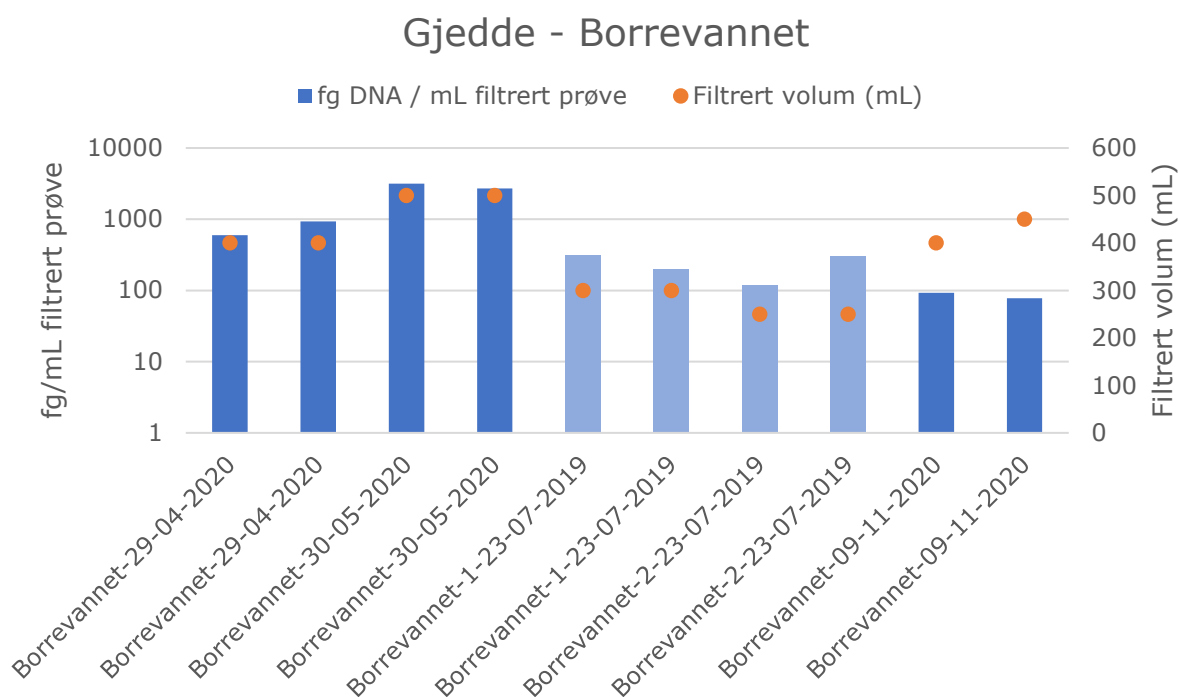
Fire stasjoner ble prøvetatt i Akersvannet i 2020. Stasjon 1 (Lågerød, sørenden) og stasjon 2 (Buer, nordvest) ble besøkt tre ganger, i april, juni og juli. Mens stasjon 3 (midt i innsjøen) og 4 (sørøst) kun ble besøkt i juli. Stasjon 3 og 4 ble prøvetatt med båt og det er analysert prøver fra overflaten og 10 meters dyp. Stasjon 1 er den samme prøvetakingsstasjonen som i 2019. Prøvene fra 2019 ble re-analysert i 2020, men det er sannsynlig at noe DNA har degradert i løpet av lagringstiden. Alle prøvene fra stasjon 1 og 2 var positive. Det var betydelig høyere nivåer av DNA fra gjedde til stede i april-prøvene enn i prøvene fra juni og juli (i juli var ett filter fra både stasjon 1 og 2 tydelig positiv og ett filter var usikkert positiv. I april var det også mye partikler i vannet, noe som førte til at lave prøvevolum ble filtrert. Det var ikke korrelasjon mellom konsentrasjon DNA fra gjedde og mengde filtrert vann i prøvene, derimot genererte ofte prøver med lavt filtrert volum de resultatene med høyest DNA-konsentrasjon per vannvolum (**Figur 7**). En sannsynlig forklaring på dette er at løst DNA i vannmassene har en tendens til å feste seg til partikler, og det er sannsynlig at dette gjorde at lave volum har høye konsentrasjoner av DNA (Anglès d'Auriac et al. 2019b). Ved stasjon 3, midt i innsjøen, var alle prøver negative, med unntak av ett filter fra 10 m dyp, som ga usikkert positivt resultat. Ved stasjon 4 ble det registrert gjedde både i overflaten og ved 10 m dyp (ved 10 m dyp var ett filter positivt i kategorien grønn og ett filter usikkert positivt). Gjedde gyter i litoral etter isløslingen om våren, og det er da man forventer de høyeste konsentrasjonene av DNA i prøver fra dette habitatet. Når temperaturen stiger om sommeren, vil deler av populasjonen trekke ut på dypere vann der temperaturen er lavere. Resultatene viser at det er mulig å detektere gjedde hele året, men at våren trolig er mest gunstig.



Figur 7. Resultater for gjedde i Akersvannet (stasjon 1 = blå, stasjon 2 = mørkeblå, stasjon 3 = mørk oransje, stasjon 4 = lys oransje, samt re-analyserte 2019-prøver = lyseblå), analysert for gjedde. Blå søyler viser mengde DNA fra gjedde i prøven, korrelert mot en standard kurve generert av vev fra norsk bestand av gjedde. Merk logaritmisk skala. Orange sirkler viser filtrert volum.

Borre vannet

I Borrevannet ble det prøvetatt en stasjon i 2020, og to stasjoner i 2019, resultater fra begge år er presentert i **Figur 8**. Stasjon 1 er på samme lokalitet i 2019 og 2020. Prøvene fra 2019 er re-analysert i 2020 og det må derfor anses som sannsynlig at noe DNA har degradert i løpet av året prøven har vært lagret. Alle analyserte prøver fra Borrevannet var positive for gjedde. Om våren var det generelt høyere nivåer enn om sommeren og høsten. Prøvene i 2020 ble tatt i litoral nær et kjent gyteområde for gjedde.

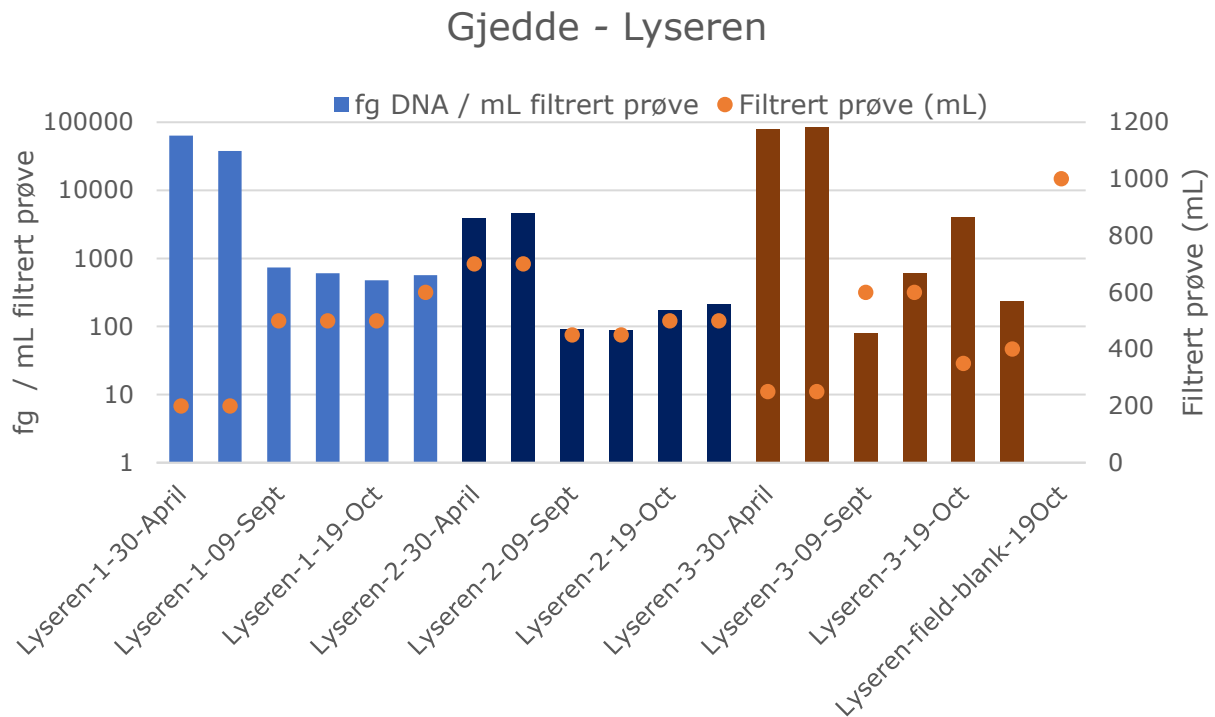


Figur 8. Resultater for gjedde fra Borrevannet i både 2019 (lyseblå) og 2020 (blå). Blå søyler viser mengde DNA fra gjedde i prøven, korrelert mot en standard kurve generert av vev fra norsk bestand av gjedde. Merk logaritmisk skala. Orange sirkler viser filtrert volum.

Lyseren

Det ble tatt prøver ved tre stasjoner i Lyseren, alle ga tydelige positivt resultat for gjedde gjennom hele året. Det var imidlertid store variasjoner i konsentrasjonen av detektert miljø-DNA gjennom året. På alle tre stasjoner ble den høyeste konsentrasjonen av miljø-DNA fra gjedde detektert i april, dette sammenfaller med at gjedda oppholder seg på grunt vann for å gyte om våren. Det ble også målt relativt høye konsentrasjoner i september og oktober. Det ble målt høyest konsentrasjoner ved stasjon 1 (Lyserbråten), men resultatene er relativt like gjennom året for alle tre stasjoner.

Markørene for gjedde er validert etter Thalingers valideringsskala til nivå 4 og vurderes derfor som klare til bruk av forvaltningen.



Figur 9. Resultater for gjedde fra Lyseren (stasjon 1 = blå, stasjon 2 = mørkeblå, stasjon 3 = mørk oransje). Blå søyler viser mengde DNA fra gjedde i prøven, korrelert mot en standard kurve generert av vev fra norsk bestand av gjedde. Merk logaritmisk skala. Orange sirkler viser filtrert volum.

3.3 Ørekyt



Figur 10. Ørekyt fra Ramnesbekken (Aulielva) (foto: Akvaplan-niva).

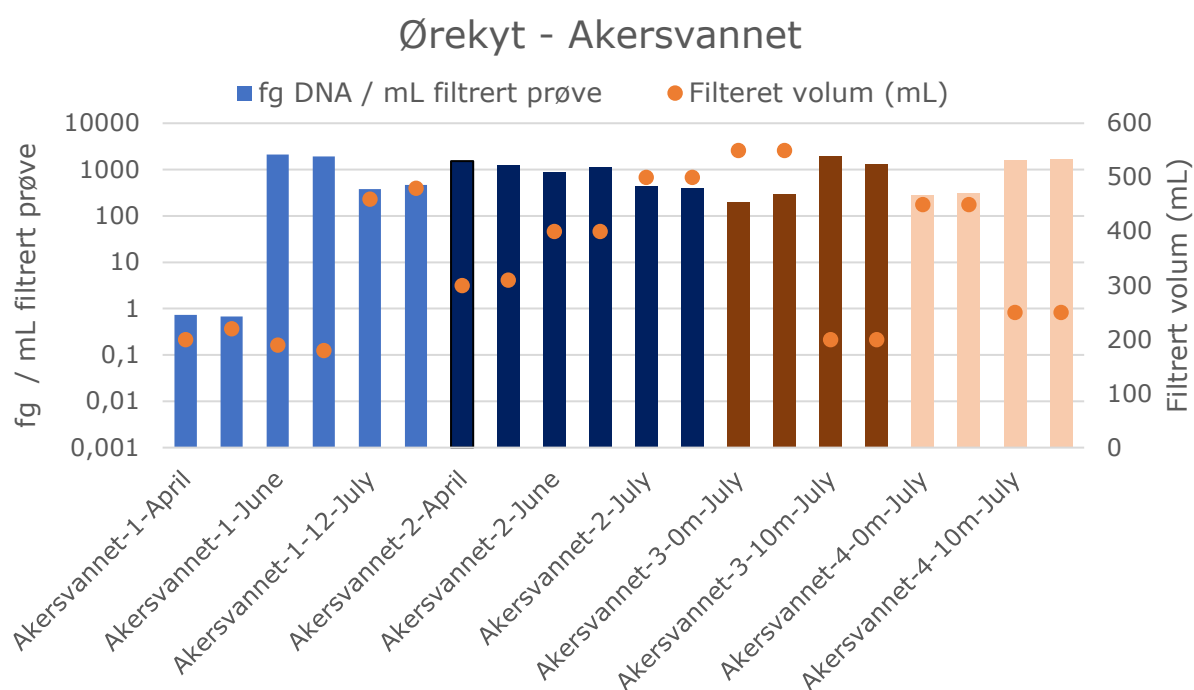
Markørene for ørekyt ble spesifisitetstestet mot vevsprøver fra en rekke nært beslektede og sameksisterende arter (**Tabell 4**). Det ble registrert betydelig kryssamplifisering mot mort, sørv og suter. Alle artene ble testet i fire 10x fortyninger og alle for alle fire var det kryssamplifisering ned til den lavest testede konsentrasjonen (mort=1,7 pg/μL, sørv 7 pg/μL og suter 6,4 pg/μL). Markørene er også tidligere spesifisitetstestet i Fossøy et al. (2018), der det ble registrert kryssamplifisering mot

krøkle, lagersild, lake og sik ved bruk av ddPCR. Ingen av disse artene var inkludert i våre tester, men det er sannsynlig at de også vil kryssamplifisere ved bruk av qPCR.

Det ble samlet prøver for analyse av ørekyt i Akersvannet (fire stasjoner), Aulivassdraget (en stasjon), Borrevannet (en stasjon) og Åletjønn (en stasjon), se **Vedlegg A** for kart. Alle stasjonene ble prøvetatt tre ganger i løpet av året. Bildet viser en kjønnsmoden ørekythann fra Ramnesbekken i Aulivassdraget (**Figur 10**). Fordi spesifisitetstesting av markørene viser betydelig kryssamplifisering med andre arter må alle resultatene under anses som usikre.

Akersvassdraget

Samtlige prøver fra Akersvannet var positive for ørekyt, og det er ingen tydelige trender verken over tid eller romlig (**Figur 11**). Ørekytbestanden i Akersvannet er rapportert av lokale sportsfiskere til å være tett.



Figur 11. Resultater for ørekyt fra Akersvannet (stasjon 1 = blå, stasjon 2 = mørkeblå, stasjon 3 = mørk oransje, stasjon 4 = lys oransje). Søylene viser mengde DNA fra ørekyt i prøven, korrelert mot en standard kurve generert av vev fra norsk bestand av ørekyt. Resultatene vises på logaritmisk skala. Orange sirkler viser filtrert volum.

Ramnesbekken i Aulielva

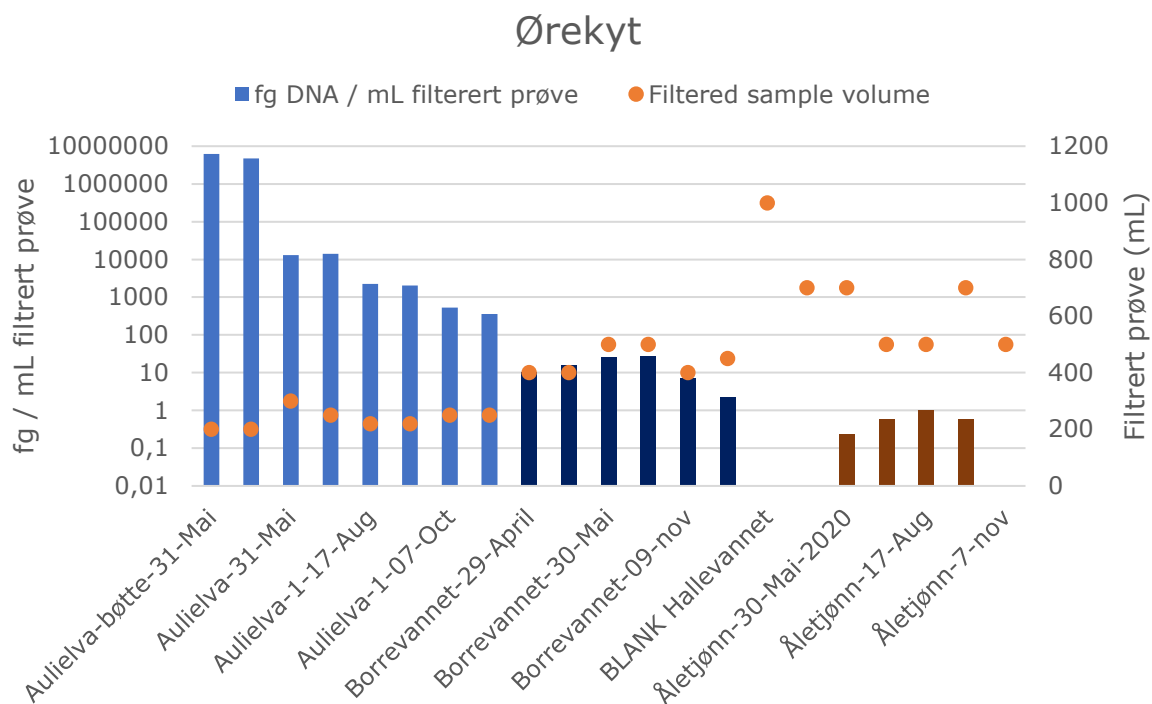
Alle prøver fra Ramnesbekken i Aulielva var positive for ørekyt (**Figur 12**). Det var relativt stabile mengder miljø-DNA gjennom året, men konsentrasjonene er høyest i mai og lavest i oktober. Det ble også tatt en «bøtteprøve» fra Aulielva, ved at 50 ørekyt ble elfisket og plassert i et kar med vann. Etter en time ble det tatt miljø-DNA-prøve fra dette karet. Motivet var å generere en sikker positiv prøve som likevel ikke var isolert fra vev. "Bøtteprøven" var den prøven med høyeste konsentrasjon av miljø-DNA i vann, på tross av at vi kun klarte å filtrere 200 mL.

Borrevannet

Alle prøver fra Borrevannet var positive for ørekyt (**Figur 12**). Det er jevnt lave konsentrasjoner av miljø-DNA fra ørekyt til stede ved alle prøvetakingstidspunkt.

Åletjønn

Dalle prøvene fra Åletjønn var enten usikre positive, eller negative for ørekyt (**Figur 12**). I mai og august var ett filter negativt, mens ett var usikker positivt, mens i november var det lav amplifisering fra begge filterene. Det er oppgitt fra flere kilder at det er ørekyt i Åletjønn, men størrelsen på bestanden er ukjent. Det ble ikke observert ørekyt ved prøvetaking.



Figur 12. Resultater for ørekyt fra Aulielva (blå), Borrevannet (mørkeblå) og Åletjønn (mørk oransje). Søylene viser mengde DNA fra målararten i prøven, korrelert mot en standard kurve generert av vev fra norsk bestand av ørekyt. Resultatene vises på logaritmisk skala. Orange sirkler viser filtrert volum.

Deteksjonssystemet for ørekyt ble validert i henholdt til Thalinger et al. (2021) til nivå 1. Valideringen settes til det laveste nivået fordi markørene både amplifiserer nært beslektede arter og sameksisterende arter. Grunnet usikkerheten knyttet til markørens spesifisitet anbefales det ikke videre bruk av disse i forvaltningsøyemed.

3.4 Sørv



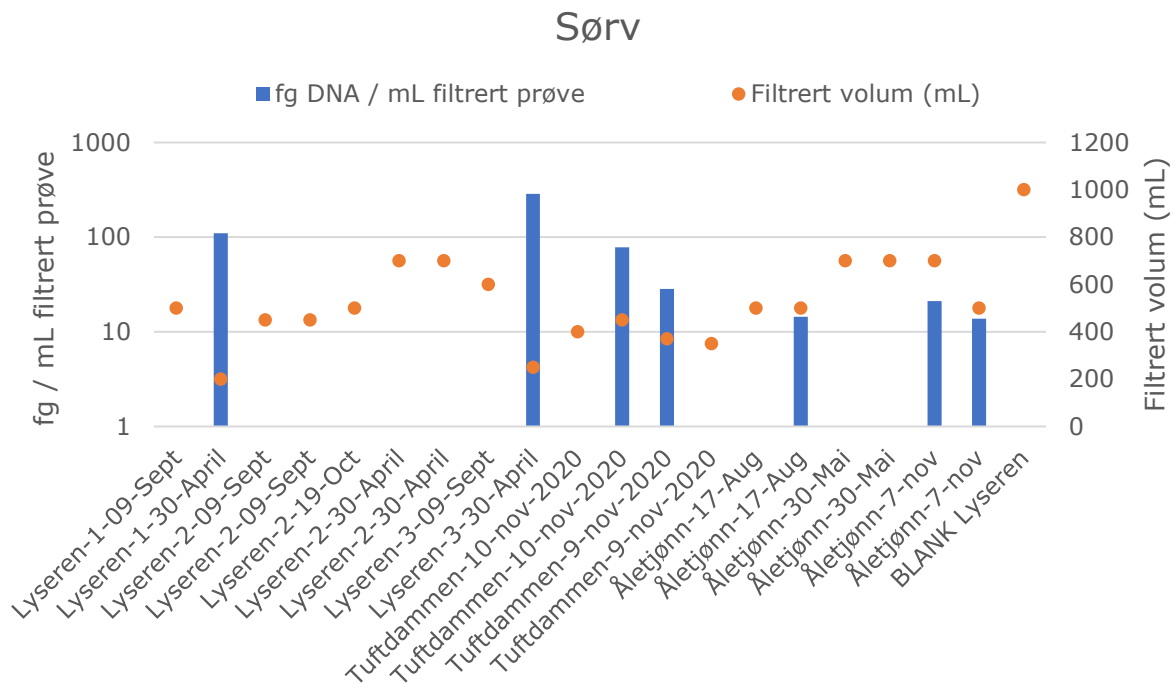
Figur 13. Sørv fra Halle vannet i Vestfold og Telemark. Foto: Akvaplan-niva.

Markørene for sørv ble redesignet, optimalisert og spesifisitetstestet. Det nye deteksjonssystemet ble spesifisitetstestet mot vevsprøver fra en rekke arter (**Tabell 4**). Systemet viste seg spesifikt mot alle artene det ble testet mot, med unntak av mort. Det ble registrert kryssamplifisering mot høye konsentrasjoner av referansemateriale fra mort (amplifisering ved $6.5\text{ng}/\mu\text{L}$ og to av tre replikater amplifiserte ved $0.63\text{ng}/\mu\text{L}$). Videre ble det analysert prøver fra flere lokaliteter hvor det ble forventet å finne arten (Akersvannet, Borrevannet og Halle vannet). Det ble også analysert prøver fra lokaliteter som ble ansett som «sikre negative» (Tuftdammen, Åletjønn og Lyseren) fordi fiskebestanden der er kjent. Det ble registrert lave konsentrasjoner og usikre positive resultater fra alle tre lokasjoner. I Lyseren er det sannsynligvis

mort som forårsaker de falske positive resultatene², men i prøvene fra Åletjønn og Tuftdammen er dette ukjent, uspesifikk amplifisering.

Det ble samlet miljø-DNA prøver for analyser for sørv fra Akersvannet (fire stasjoner), Halle vannet (fire stasjoner) og Borrevannet i 2020, se **Vedlegg A** for kart.

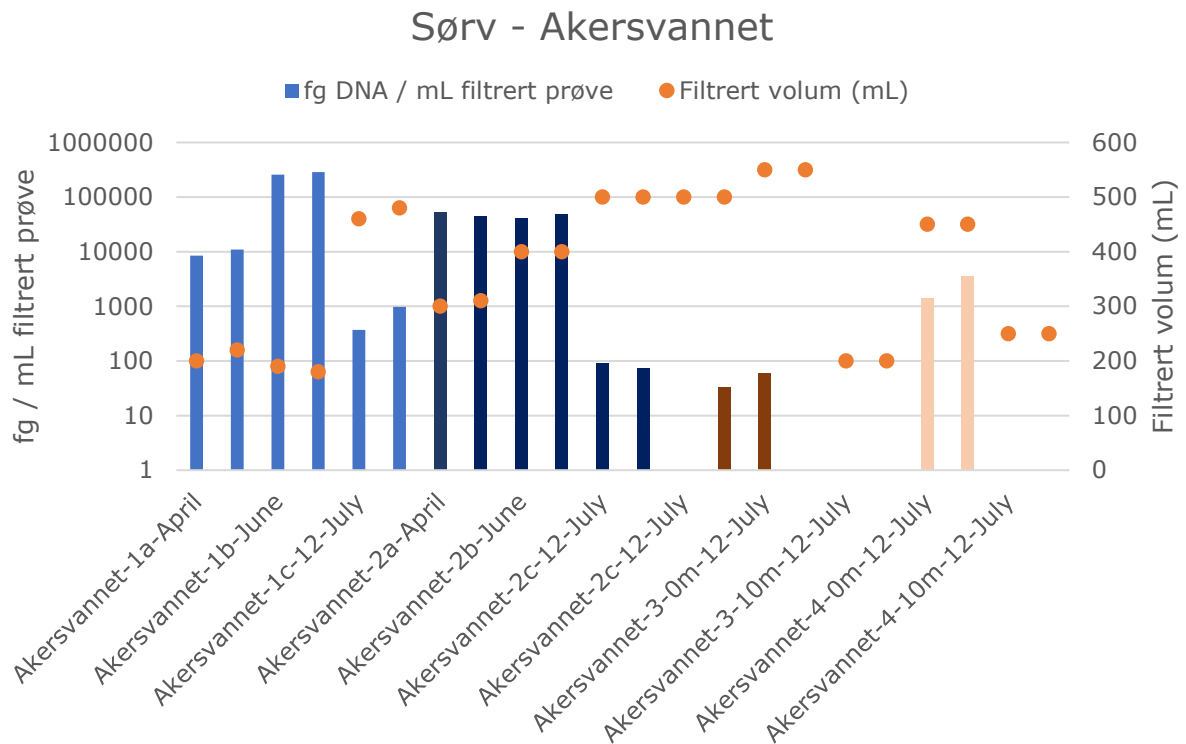
² http://www.lysereninfo.no/fisk_og_fiskekort.htm



Figur 14. Resultater for sørsv fra forventede negative lokaliteter: Lyseren, Tuftdammen og Åletjønn. Søylen viser mengde DNA fra målartern i prøven, korrelert mot en standard kurve generert av vev fra norsk bestand av sørsv. Resultatene vises på logaritmisk skala. Orange sirkler viser filtrert volum.

Akersvannet

Fire stasjoner har blitt prøvetatt i Akersvannet i 2020. Stasjon 1 (Lågerød, sørenden) og stasjon 2 (Buer, nordvest) tre ganger, i april, juni og juli, mens stasjon 3 (midt i innsjøen) og 4 (sørøst) kun ble prøvetatt i juli. Stasjon 3 og 4 ble prøvetatt med båt og det er analysert prøver fra overflaten og 10 meters dyp. Stasjon 1 er samme prøvetakingsstasjon som i 2019. Ved stasjon 1 og 2 ble det registrert jevnt høye nivåer av sørsv, og laveste nivåer ble målt i juli. Ved stasjon 3 og 4, som kun ble prøvetatt i juli, ble det registrert lave nivåer av sørsv i overflaten, mens prøvene fra 10 m var negative (**Figur 15**).



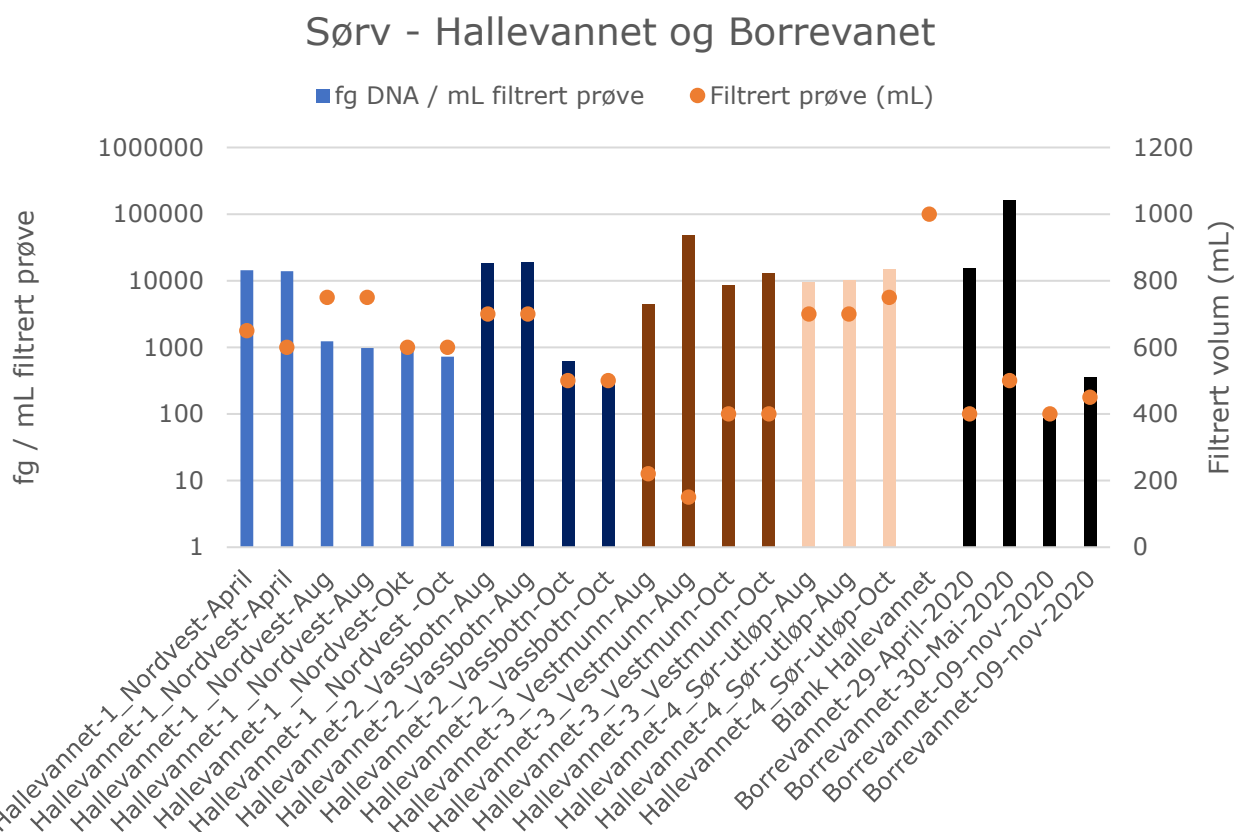
Figur 15. Resultater for sørv fra Akersvannet (stasjon 1 = blå, stasjon 2 = mørkeblå, stasjon 3 = mørk oransje, stasjon 4 = lys oransje). Søylene viser mengde DNA fra sørv i prøven, korrelert mot en standard kurve generert av vev fra norsk bestand av sørv. Merk logaritmisk skala. Orange sirkler viser filtrert volum.

Hallevannet

Fire stasjoner har blitt prøvetatt i Hallevannet i 2020. Stasjon 1 ligger i den nordvestre enden ved Fagernes og denne ble prøvetatt i april, august og oktober. Stasjon 2 er ved Vassbotn, stasjon 3 ved Vestmunnvannet og stasjon 4 ved det sørlige utløpet av innsjøen. Stasjon 2, 3 og 4 ble prøvetatt i august og oktober. Alle prøver var positive og fra tidligere undersøkelser er det klart at det finnes en betydelig bestand av sørv i Hallevannet. Det var ingen tydelige årstidstrender (**Figur 16**).

Borre vannet

Det ble prøvetatt en stasjon i Borrevannet i 2020, i april, mai og november. Alle prøvene var tydelig positive for sørv. Prøvene fra april og mai, spesielt mai, hadde veldig høye nivåer av miljø-DNA (**Figur 16**).



Figur 16. Resultater for sørv fra Hallevannet (stasjon 1 = blå, stasjon 2 = mørkeblå, stasjon 3 = mørk oransje, stasjon 4 = lys oransje) og Borrevannet (svart). Søylene viser mengde DNA fra sørv i prøven, korrelert mot en standard kurve generert av vev fra norsk bestand av sørv. Resultatene vises på logaritmisk skala. Orange sirkler viser filtrert volum.

Det var ikke et tydelig mønster for når i løpet av året det lønner seg å samle prøver for sørv. Arten er en stimfisk som ofte oppholder seg litoralt og våre resultater indikerer at prøver kan samles gjennom hele vekstsesongen. Vi har ikke inkludert prøvetakning på vinteren, dette anbefales heller ikke ettersom arten ikke er aktiv om vinteren.

Deteksjonssystemet ble validert i henholdt til Thalinger et al. (2021) til nivå 3 og det anbefales dermed fortsatt ikke å benytte dette i forvaltningen, med mindre man har god bakgrunnskunnskap om hvilke andre arter som befinner seg i vannmassen eller også benytter annen metodikk til å validere resultatene.

3.5 Suter

Markørene for suter ble redesignet, optimalisert og spesifitetstestet mot en rekke nært beslektede og sameksisterende arter (**Tabell 4**). Det ble ikke registrert kryssamplifisering mellom de utviklede markørene for suter og noen av artene testet for her. Det ble videre analysert prøver fra fire lokaliteter, to der vi forventet å finne arten (Borrevannet og Tuftdammen) og to der arten ikke skal være til stede (Hallevannet og Akersvannet). Alle prøver fra Borrevannet og Tuftdammen var positive, mens alle prøver fra Hallevannet og Akersvannet var negative (**Figur 18**).

Det ble samlet prøver for analyser for suter fra Borrevannet (tre prøvetakninger) og fra Tuftdammen (prøvetakning to påfølgende dager, samt gjennomført prøvefiske).

Borrevannet

Alle prøvene fra Borrevannet var positive for suter (**Figur 18**). Det ble samlet prøver i april, mai og november og det var betydelig høyere nivåer av miljø-DNA om våren (april og mai) enn i november.

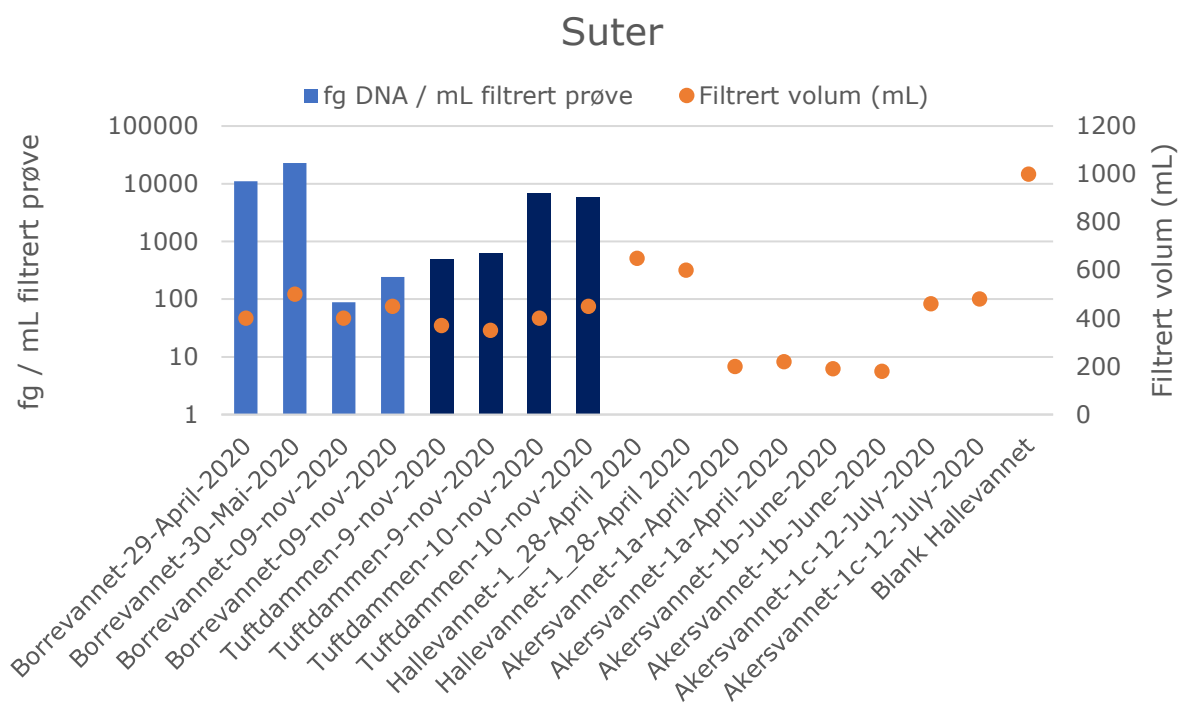
Tuftdammen

I Tuftdammen ble det i 2019 påvist suter både gjennom teinefiske og ved miljø-DNA. Dette er en lokalitet som har en bestand med storsalamander (*Triturus cristatus*), og lokalt engasjerte personer og Statsforvalteren ønsker derfor å gjennomføre tiltak for å fjerne suterene. I 2019 ble det gjennomført et relativt intensivt fiske etter suter med teiner og det ble fanget og tatt ut om lag 300 suter som i all hovedsak var i størrelsen fra 8–12 cm (Freddy Sundby, pers. med.). I 2020 ble det også gjennomført en utfisking med teiner og da var fangsten noe lavere, men det ble fanget flere større eksemplarer på oppimot 25 cm. Det ble også gjennomført et prøvefiske der det ble brukt tre stykk multigarn, der hvert garn består av åtte fem-meters seksjoner med ulike maskevidder (10, 12.5, 15, 18.5, 22, 26, 35 og 45 mm). Det ble fisket en natt (12 timer). Det ble totalt fanget 10 suter som alle var i størrelsen 8–12 cm. Alle prøvene samlet fra Tuftdammen var sterkt positive for suter.



Figur 17. Suter fra prøvefiske i Tuftdammen november 2020.

Deteksjonssystemet ble validert i henholdt til Thalinger et al. (2021) til nivå 4 og vurderes derfor nå som klart for bruk i forvaltningen.



Figur 18. Resultater for suter fra Borrevannet (blå) og Tuftdammen (mørkeblå), samt Halle vannet og Akersvannet (negative prøver). Søylene viser mengde DNA fra suter i prøven, korrelert mot en standard kurve generert av vev fra norsk bestand av suter. Resultatene vises på logaritmisk skala. Orange sirkler viser filtrert volum.

3.6 Vasspest

Det ble tatt prøver tre ganger i 2020 (april, september og oktober) for analyse av vasspest fra tre stasjoner i Lyseren i Viken fylke, og fra fire stasjoner Halle vannet i Vestfold og Telemark, se **Vedlegg A** for kart. Samtlige prøver fra Halle vannet var negative. I Halle vannet ble det funnet drivende toppskudd av vasspest i 1967, men det er ukjent hvor i innsjøen funnet ble gjort, og det finnes ingen opplysninger om funn av arten i innsjøen fra nyere tid (Marit Mjelde, pers. med.).

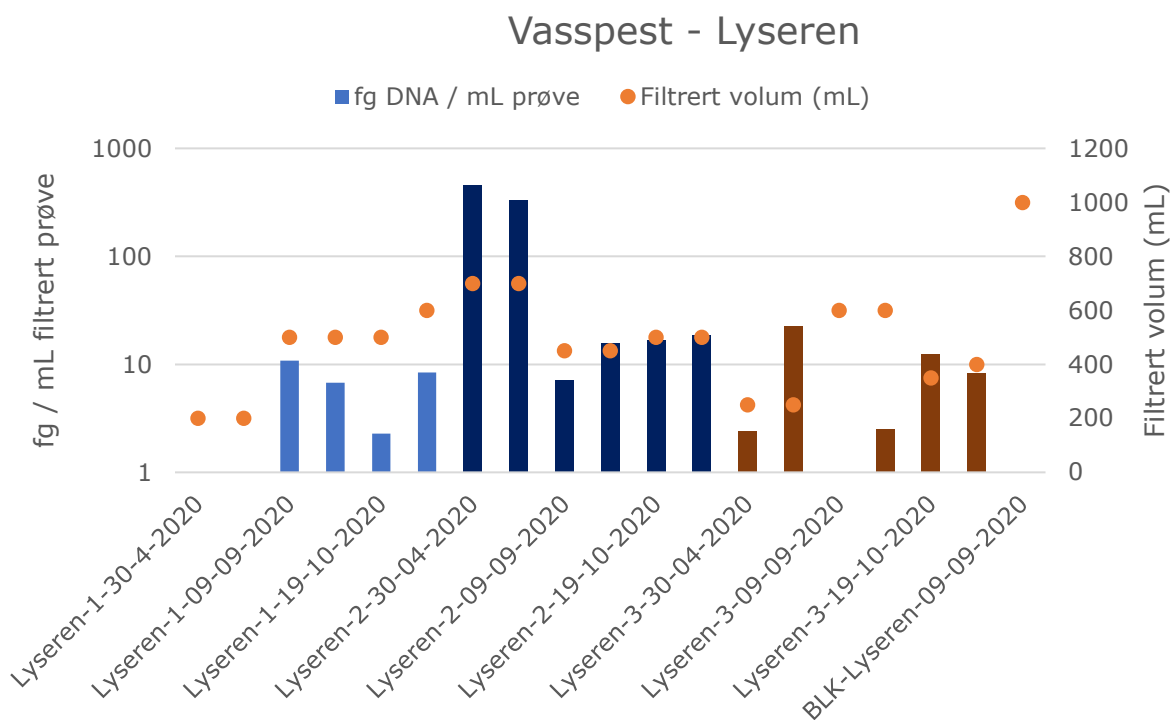
Lyseren

Lyseren viste store forskjeller mellom de analyserte stasjonene (**Figur 19**). Generelt var det relativt lave nivåer av miljø-DNA fra vasspest i Lyseren, men de fleste prøver var enten positive eller usikre positive. Prøvene fra stasjon 1 ved Lyserbråten var negative i april, positive i september og deretter usikkert positive i oktober. Stasjon 2 ved Gransodden hadde prøven med høyest signal i april, mens prøvene fra september og oktober begge hadde en positiv prøve og en usikker positiv prøve. På stasjon 3 ved vestre Breivik var det relativt lave nivåer: En prøve ble kategorisert som sikker positiv i april, ellers var alle prøver usikre positive eller negative.

Vasspest ble første gang registrert i Lyseren i 1990. NIVA gjorde undersøkelser der i 2011 og vasspest var da vanlig i innsjøen. Det ser ut til at arten trives i innsjøen og det er rimelig å anta at den nå er vanlig (Marit Mjelde, pers. med.) Så lenge det ikke foreligger oppdaterte data på forekomst kan vi ikke med sikkerhet si noe om årsakene til forskjellene i våre prøver.

Den høyeste konsentrasjonen av miljø-DNA fra vasspest ble registrert ved Gransodden i april.

I enkelte innsjøer står vasspesten grønn under isen og brytes ned tidlig på våren (Rørslett et al. 1985), noe som fører til en topp i miljø-DNA på våren (Anglès d'Auriac et al. 2019). Muligens har bukta ved Granodden (stasjon 2) en stor bestand av vasspest som først ble brutt ned tidlig på våren, og førte til de høye verdiene (omtrent på samme nivå som oktober-prøver fra Steinsfjorden, se Anglès d'Auriac et al. (2019). Forekomstene på de andre stasjonene kan ha vært mindre.



Figur 19. Resultater for vasspest fra Lyseren (stasjon 1 = blå, stasjon 2 = mørkeblå, stasjon 3 = mørk oransje). Søylen viser mengde DNA fra vasspest i prøven, korrelert mot en standard kurve generert fra blader av planten. Resultatene vises på logaritmisk skala. Orange sirkler viser filtrert volum.

4 Konklusjon

I denne rapporten har vi presentert resultater fra et prosjekt som skulle bidra til å utvikle og teste ut et system for bruk av miljø-DNA som supplerende verktøy i overvåking og kartlegging av fremmed ferskvannsfisk og vannplanten vasspest for forvaltningen. Resultatene bekrefter verdien av miljø-DNA som overvåkningsverktøy, og at dette kan bli et verdifullt overvåkingsverktøy for vårt vannmiljø. Det er likevel grunn til nøkternhet overfor implementering av metodikken. Bruk av miljø-DNA har et betydelig potensial, men metodikken har fortsatt utfordringer og det er viktig å validere resultatene opp mot kjent informasjon om både artene man leter etter og området de lever i. Fagfeltet er i stadig utvikling og stadig nye organismer blir DNA-sekvensert, derfor er det også viktig å gjennomgå allerede implementerte molekylære deteksjonssystemer med jevne mellomrom. I denne rapporten har vi fokusert særlig på problematikk knyttet til spesifisitet av de molekylære markørene.

Artsspesifisitet

For å unngå falske positive resultater er det nødvendig å utvikle robuste deteksjonssystemer og artsspesifikke markører som valideres nøye innen de tas i bruk i forvaltningsøyemed. Inntil nylig har det ikke eksistert et felles rammeverk for validering av deteksjonssystemene, noe som har gjort det komplisert å evaluere publiserte systemer. Alle deteksjonssystemene for fremmede fiskearter involvert i dette prosjektet ble validert i henhold til Thalingers valideringsskala (Thalinger et al. 2021). Deteksjonssystemene for pukkellaks og gjedde viste seg å fungere. Disse ble validert til nivå 4 og er klare for bruk av forvaltningen. Det ble avdekket spesifisitetsproblemer ved markørene for sørv og suter. Disse er derfor re-designet og re-optimalisert. Deteksjonssystemet for suter ble validert til nivå 4 og vurderes som klar for forvaltningen. Deteksjonssystemet for sørv fungerte godt for deteksjon, men det var fortsatt kryssamplifisering mot høye konsentrasjoner av mort og systemet lot seg heller ikke validere mot naturlige prøver fra lokaliteter som skulle vært negative. Denne anbefales derfor ikke til bruk i forvaltningen foreløpig og ble validert til nivå 3. Systemet for ørekyt viste seg å ha betydelig spesifisitetsproblemer mot flere både nært beslektede og sameksisterende arter. Dette ble kun validert til nivå 1 og vi anbefaler ikke videre bruk av disse markørene.

Optimalisering av prøvetaking

Det er viktig å tilpasse prøvetakingen til den arten- eller organismegruppen man er på jakt etter. Her har vi fulgt samme innsamlingsmetodikk som ble utviklet i dette prosjektet i 2019 (Engesmo et al. 2020) til å samle inn prøver ved flere tidspunkt gjennom året og har analysert disse prøvene for utvalgte arter. Resultatene viser at tidspunktet for prøvetakingen er viktig. Pukkellaks har en toårig livssyklus og all fisk dør etter gyting. Dette betyr at fisk som gyter i oddetallsår får avkom som også gyter i oddetallsår. I Norge er oddetallsbestanden den klart mest tallrike, men det finnes også en mindre partallsbestand. Prøvetakingen av pukkellaks viste at det er mulig å detektere arten med miljø-DNA, også i partallsår, da man forventer lavere bestander av arten. For gjedde anbefales det å samle inn prøver i litoral tidlig på året, når fisken gyter. Både sørv og suter kan detekteres året gjennom, men de høyeste nivåene av miljø-DNA blir detektert på våren og det anbefales at prøvetakingen legges til våren for å øke sannsynligheten for å detektere lave bestander.

Miljø-DNA analyser brukes ofte for å lete etter fremmede og invaderende arter, hvor man ønsker å spore artene på et tidlig stadium. Det blir ofte trukket direkte paralleller mellom mengden filtret volum i en prøve og sannsynligheten for å påvise en art (Salter et al., 2019; Thomsen et al., 2016; Takahara et al., 2012). Vi ser ingen slik korrelasjon i våre resultater (se for eksempel **Figur 12** og **Figur 15**), dette stemmer godt overrens med hva som er blitt funnet i andre studier der mengden miljø-DNA er forsøkt sammenlignet med biomasse og korrigeret mot filtrert prøvevolum (Knudsen et al., 2019; Spear et al., 2015; Yates et al., 2019). Når resultatene korrigeres mot filtreringsvolum, er det ofte høye konsentrasjoner av miljø-DNA i prøver fra vann med høy turbiditet. Sannsynligvis vil løst DNA i vannmassene feste seg til partikler, som så fanges i filtret. I slikt grumsete, humusholdig vann er det begrenset hvor mye som kan filtreres før filteret vil tettes. Humusholdig vann inneholder mye naturlige PCR hemmende stoffer som vil forhindre effektiv PCR amplifisering (Zhou et al., 1996; Lakay et al., 2007), derfor er det begrenset hvor store volum det er hensiktsmessig å filtrere. Vår erfaring viser også at kvaliteten på analysene avhenger av PCR-reagenset, i denne og tidligere analyser har vi benyttet PerfeCTa qPCR ToughMix (QuantaBio), noe som har gitt utslag i betydelig mindre PCR inhibering enn vi tidligere har opplevd.

Halle vannet

Det ble analysert prøver fra fire stasjoner i Halle vannet for både gjedde og vasspest, ettersom begge arter er blitt ansett som mulig forekommende der. Gjedde er påvist i flere nærliggende vann og lokale fiskere har spekulert i om det er satt ut gjedde også i Halle vannet. Alle våre prøver var negative for gjedde. Det ble funnet drivende toppskudd av vasspest i 1967, men det er ukjent hvor i

innsjøen funnet ble gjort, og det finnes ingen opplysninger om funn av arten i innsjøen fra nyere tid. Alle våre prøver var også negative for vasspest. Vi konkluderer derfor med at det ikke er bestander av hverken gjedde eller vasspest i Hallevannet.

4.1 Viktige hensyn for å unngå krysskontaminering

Krysskontaminering er en tilbakevendende kilde til usikkerhet ved bruk av miljø-DNA. Erfaringene fra dette prosjektet gjør at noen viktige forholdsregler kan oppsummeres som følger:

Feltarbeid:

- Separate pakkefilter (for eksempel Sterivex-kolonfilter) beskytter prøven mot kontaminering.
- 'Pressure assisted filtration' (PAF) filtreringssystem minimerer kontakten mellom prøve og flerbruksutstyr.
- Prøvene skal ikke aldri tas av personer som samtidig håndterer organismer som er målart i prøven.
- Prøvetakere skal alltid bruke engangshansker.
- Prøvetakingen skal utføres med engangsutstyr, eventuelt må alt utstyr som flyttes mellom lokaliteter klores mellom hver forflytting.
- Prøver skal aldri komme i kontakt med hverandre. Det må som utgangspunkt tas en blank prøve (negativ kontroll) i felt.

Lab-arbeid:

- DNA fra miljø-prøvene bør isoleres på en fysisk adskilt lab fra der hvor qPCR-analysene skal kjøres.
- Det bør alltid inkluderes en blank DNA-ekstraksjon for å kunne påvise eventuell kontaminering ved DNA-isolasjon.
- Alle overflater, håndtak, pipetter og gjenbruksplastikk vaskes før og etter bruk med 1 % klorløsning etterfulgt av EtOH.
- Negative kontroller i qPCR-oppsettet skal inkluderes. Dette gjøres ved å bruke dH₂O som prøve i enkelte brønner. I denne undersøkelsen har vi hatt ni blanke kontroller:
 - Tre brønner som kontrollerer krysskontaminering av reagenser, disse lastes og forsegles først. Tre brønner midt i plata som lastes og forsegles sist. Disse kontrollerer for krysskontaminering ved lasting av reagenser og prøve. Tre brønner til feltblank for å kontrollere felt krysskontaminering.
- Aldri åpne forseglede brønner/rør med qPCR-produkter i samme rom/lab som prøver håndteres eller analyser utføres.

Rapportering

- Amplifisering av negative kontroller skal alltid rapporteres og diskuteres.

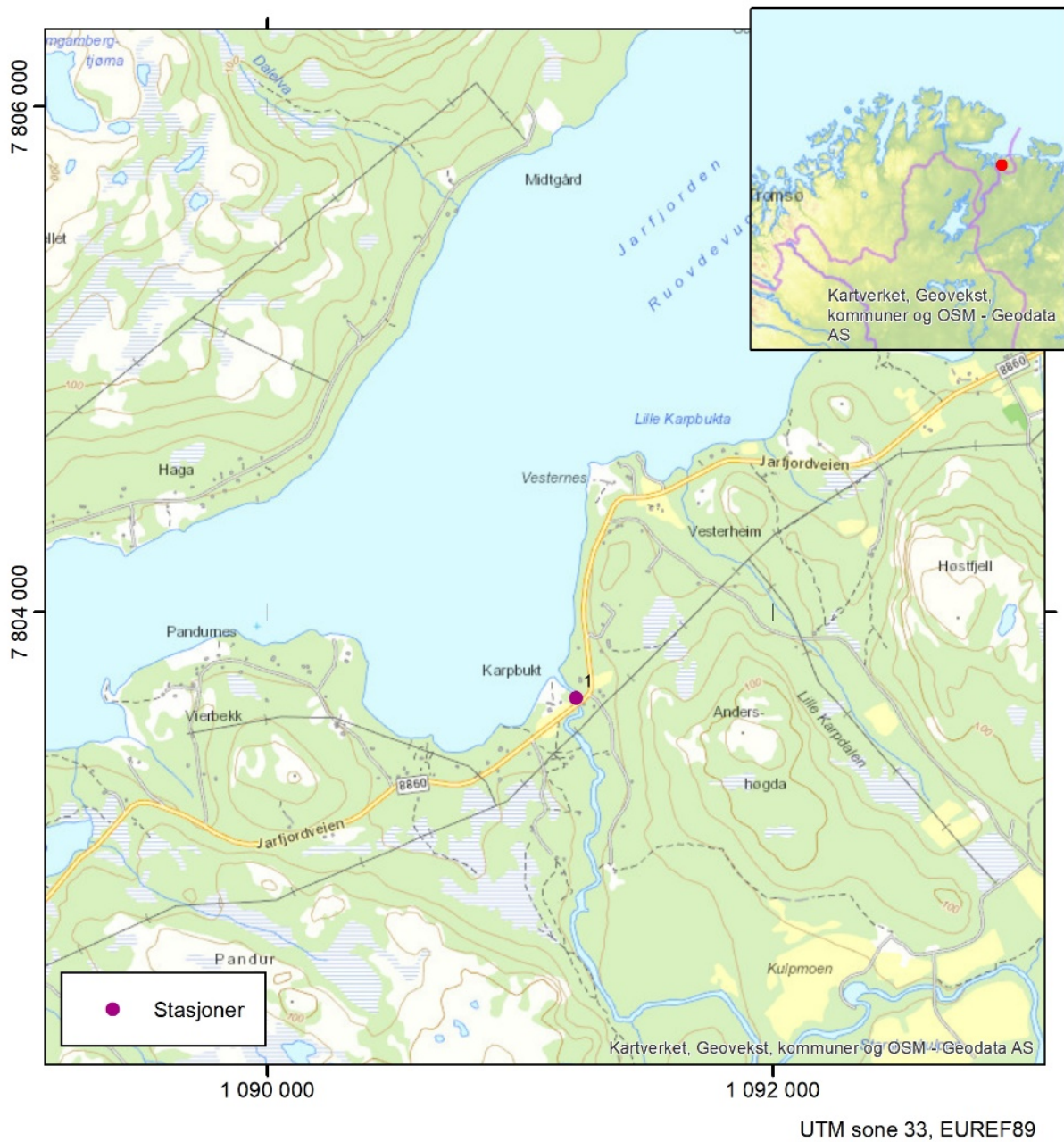
5 Referanser

- Agersnap S, Larsen WB, Knudsen SW, Strand D, Thomsen PF, Hesselsøe M, Mortensen PB, Vrålstad T, Møller PR (2017). Monitoring of noble, signal and narrow-clawed crayfish using environmental DNA from freshwater samples. *PLoS ONE*, 12, e0179261.
- Andersen JH, Kallenbach E, Thaulow J, Hesselsøe M, Bekkevold D, Hansen BK, Jacobsen LMW, Olesen CA, Møller PR, Knudsen SW (2017). Development of species-specific eDNA-based test systems for monitoring of non-indigenous species in Danish marine waters. In, 77. Norwegian Institute for Water Research.
- Andersen JH, Kallenbach E, Hesselsøe M, Knudsen SW, Møller PR, Bekkevold D, Hansen BK, Thaulow J (2016). Steps toward nation-wide monitoring of non-indigenous species in Danish marine waters under the Marine Strategy Framework Directive. *Norsk institutt for vannforskning*.
- Andersen, J. H., Kallenbach, E., Thaulow, J., Hesselsøe, M., Bekkevold, D., Hansen, B. K., Jacobsen, L. M. W., Olesen, C. A., Møller, P. R., Knudsen, S. W. (2018). Development of species-specific eDNA-based test systems for monitoring of non-indigenous species in Danish marine waters. NIVA-rapport 7204-2017.
- Andruszkiewicz EA, Sassoubre LM, Boehm AB (2017). Persistence of marine fish environmental DNA and the influence of sunlight. *PLoS One*, 12: e0185043.
- Angles d'Auriac MB, Strand DA, Mjelde M, Demars BOL, Thaulow J (2019a). Detection of an invasive aquatic plant in natural water bodies using environmental DNA. *PLoS One*, 14: e0219700.
- Angles d'Auriac MB, Le Gall L, Peña V, Hall-Spencer JM, Steneck RS, Fredriksen S, et al. (2019b). Efficient coralline algal psbA mini barcoding and High Resolution Melt (HRM) analysis using a simple custom DNA preparation. *Scientific Reports*, 9(1):578. doi: 10.1038/s41598-018-36998-6.
- Barnes MA, Turner CR, Jerde CL, Renshaw MA, Chadderton WL, Lodge DM (2014). Environmental Conditions Influence eDNA Persistence in Aquatic Systems. *Environmental Science & Technology*, 48: 1819-27.
- Berntsen HH, Sandlund OT, Ugedal O, Thorstad E, Fiske P, Urdal K, Skaala Ø, Fjeldheim PT, Skoglund H, Florø-Larsen B, Muladal R, Uglem I (2018). Pukkellaks i Norge, 2017. NINA Rapport 1571.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellems J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55 (4) , 611-622. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797. Epub 2009 Feb 26. PMID: 19246619.
- Collins RA, Wangensteen OS, O'Gorman EJ, Mariani S, Sims DW, Genner MJ (2018). Persistence of environmental DNA in marine systems. *Communications Biology*, 1: 185.
- Deiner K, Lopez J, Bourne S, Holman L, Seymour M, Grey EK, Lacoursière A, Li Y, Renshaw MA, Pfrender ME, Rius M, Bernatchez L, Lodge DM (2018). Optimising the detection of marine taxonomic richness using environmental DNA metabarcoding: the effects of filter material, pore size and extraction method. *Metabarcoding and Metagenomics*, 2: e28963.
- Engesmo A, Knudsen SW, Christensen G, Hesselsoe M, Anglès d'Auriac MB (2020). Overvåking og kartlegging av fremmed ferskvannsfisk ved bruk av miljø-DNA. Norwegian Environment Agency Report M-1628, 29 pp.

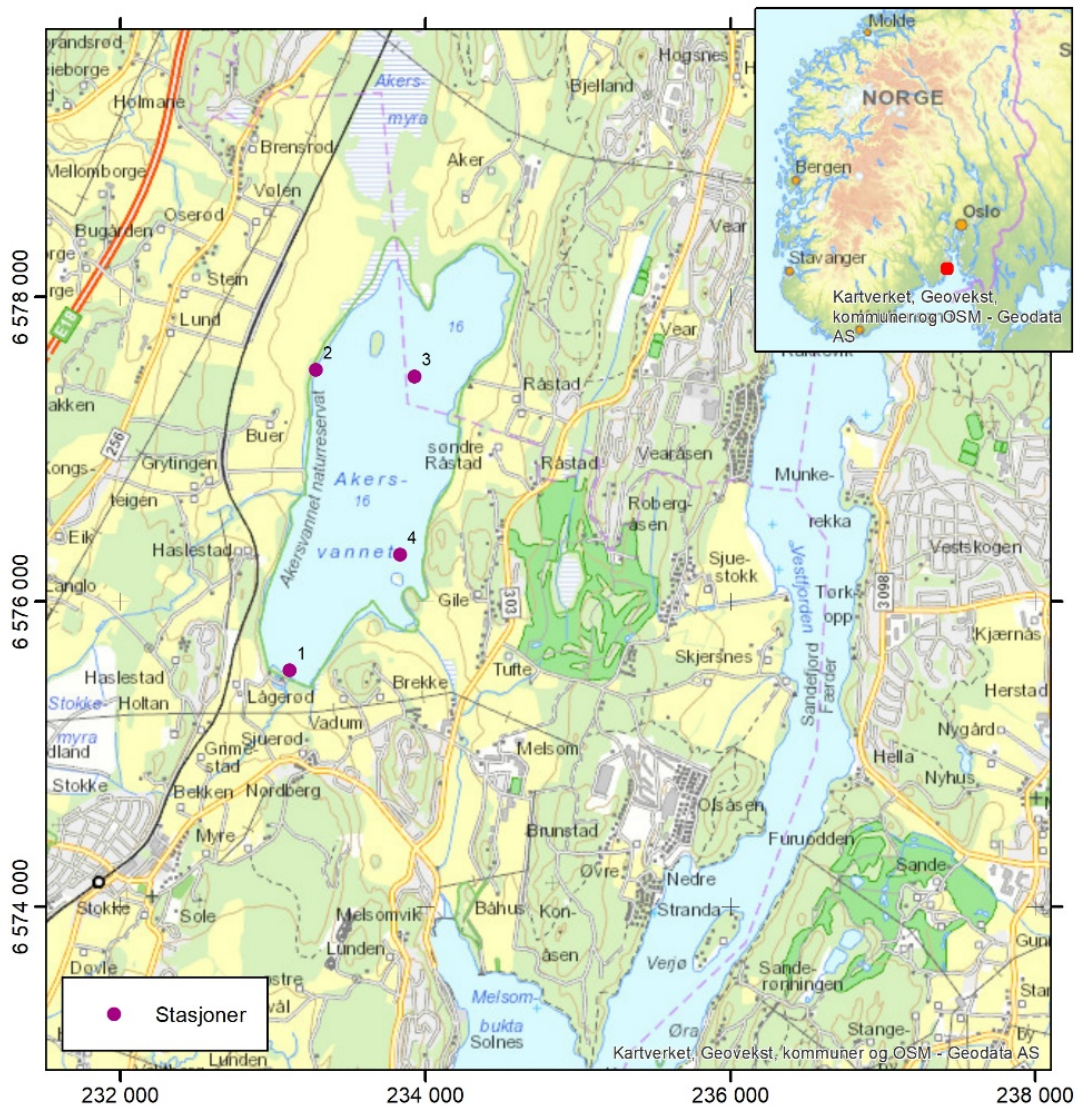
- Fiskekart for Vestfold. 1994. Fylkesmannen i Vestfold, Miljøvern avdelingen.
- Fiskekart for Østfold, 2011. Fylkesmannen i Østfold.
- Fossøy F, Dahle S, Eriksen LB, Hagen M, Spets SK, Hesthagen T (2017). Bruk av miljø-DNA for overvåking av fremmede fiskearter – utvikling av artsspesifikke markører for gjedde, mort og ørekyt. NINA Report 1299.
- Fossøy, F., Thaulow, J., Angles d'Auriac, M., Brandsegg, H., Sivertsgård, R., Mo, T. A., Sundlund, O.T., Hesthagen, T. (2018). Bruk av miljø-DNA som supplerende verktøy for overvåking og kartlegging av fremmed ferskvannsfisk. NINA rapport 1586.
- Goldberg CS, Strickler KM, Pilliod DS (2015). Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. *Biological Conservation*, 183: 1-3.
- Harper LR, Griffiths NP, Handley LL, Sayer CD, Read DS, Harper KJ, Blackman RC, Li J, Hänfling B (2018). Development of environmental DNA surveillance for the threatened crucian carp (*Carassius carassius*). *Freshwater Biology*, 64(1): 93-107.
- Jo T, Murakami H, Yamamoto S, Masuda R, Minamoto T (2019). Effect of water temperature and fish biomass on environmental DNA shedding, degradation, and size distribution. *Ecology and Evolution*, 9: 1135-46.
- Klymus KE, Merkes CM, Allison MJ, Goldberg CS, Helbing CC et al. (2020). Reporting the limits of detection and quantification for environmental DNA assays. *Environmental DNA*, 2: 271– 282. <https://doi.org/10.1002/edn3.29>
- Knudsen SW, Hesselsøe M, Møller PR, Andersen JH (2018). Tekniske anvisninger for eDNA-baseret overvåging af ikke-hjemmehørende marine arter. NIVA report 7203.
- Knudsen SW, Ebert RB, Mortensen PB, Kuntze F, Hesselsøe M, Hassingboe J, Thomsen PF, Sigsgaard EE, Egg E, Møller PR (2019). Species-specific detection of six commercially important marine fishes in the Baltic Sea using environmental DNA. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 510: 31-45. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2018.09.004>
- Lakay FM, Botha A, Prior BA. Comparative analysis of environmental DNA extraction and purification methods from different humic acid-rich soils. *J Appl Microbiol*. 2007 Jan;102(1):265-73. doi: 10.1111/j.1365-2672.2006.03052.x. PMID: 17184343.
- Lacoursière-Roussel A, Côté G, Leclerc V, Bernatchez L, Cadotte M (2016). Quantifying relative fish abundance with eDNA: a promising tool for fisheries management. *Journal of Applied Ecology*, 53: 1148-57.
- Langlois, V. S., Allison, M. J., Bergman, L. C., To, T. A., & Helbing, C. C. (2020). The need for robust qPCR-based eDNA detection assays in environmental monitoring and species inventories. *Environmental DNA*. <https://doi.org/10.1002/edn3.164>
- Mauvisseau Q, Davy-Bowker J, Bulling M, Brys R, Neyrinck S, Troth C, Sweet M (2019). Combining ddPCR and environmental DNA to improve detection capabilities of a critically endangered freshwater invertebrate. *Scientific Reports*, 9: 14064.
- Nunes AL, Tricarico E, Panov VE, Cardoso AC, Katsanevakis S (2015). Pathways and gateways of freshwater invasions in Europe. *Aquatic Invasions* 10, 4: 359–370.
- Pilliod DS, Goldberg CS, Arkle RS, Waits LP (2013). Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 70: 1123-30.
-

- Rørslett B, Berge D, Johansen SW. Mass invasion of *Elodea canadensis* in a mesotrophic, South Norwegian lake—impact on water quality. *SIL Proceedings, 1922–2010*. 1985; 22(5):2920–6. <https://doi.org/10.1080/03680770.1983.11897803>
- Salter I, Joensen M, Kristiansen R, Steingrund P, Vestergaard P. Environmental DNA concentrations are correlated with regional biomass of Atlantic cod in oceanic waters. *Commun Biol*. 2019 Dec 10;2:461. doi: 10.1038/s42003-019-0696-8. PMID: 31840106; PMCID: PMC6904555.
- Sigsgaard EE, Nielsen IB, Carl H, Krag MA, Knudsen SW, Xing Y, Holm-Hansen TH, Møller PR, Thomsen PF (2017). Seawater environmental DNA reflects seasonality of a coastal fish community. *Marine Biology*, 164: 128.
- Spear, S. F., Groves, J. D., Williams, L. A., & Waits, L. P. (2015). Using environmental DNA methods to improve detectability in a hellbender (*Cryptobranchus alleganiensis*) monitoring program. *Biological Conservation*, 183, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.016>
- Spens J, Evans AR, Halfmaerten D, Knudsen SW, Sengupta ME, Mak SST, Sigsgaard EE, Hellström M. (2016). Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution*, 8: 635-645.
- Takahara T, Minamoto T, Yamanaka H, Doi H, Kawabata Z (2012) Estimation of Fish Biomass Using Environmental DNA. *PLoS ONE* 7(4): e35868. doi:10.1371/journal.pone.0035868
- Thalinger, B., Deiner, K., Harper, L. R., Rees, H. C., Blackman, R. C., Sint, D., Traugott, M. Goldberg, C.S. & Bruce, K. (2021). A validation scale to determine the readiness of environmental DNA assays for routine species monitoring. doi: <https://doi.org/10.1101/2020.04.27.063990>
- Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, Moller PR, Rasmussen M, Willerslev E (2012). Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS One*, 7: e41732
- Thomsen PF, Møller PR, Sigsgaard EE, Knudsen SW, Jørgensen OA, Willerslev E (2016) Environmental DNA from Seawater Samples Correlate with Trawl Catches of Subarctic, Deepwater Fishes. *PLoS ONE* 11(11): e0165252. doi:10.1371/journal.pone.0165252
- Wilcox, T. M., K. S. McKelvey, M. K. Young, S. F. Jane, W. H. Lowe, A. R. Whiteley, and M. K. Schwartz. 2013. 'Robust Detection of Rare Species Using Environmental DNA: The Importance of Primer Specificity', *Plos One*, 8.
- Yates, M. C., Fraser, D. J., & Derry, A. M. (2019). Meta-analysis supports further refinement of eDNA for monitoring aquatic species-specific abundance in nature. *Environmental DNA*, 1(1), 5–13. <https://doi.org/10.1002/edn3.7>
- Zhou J., Bruns, MA., Tiedje JM. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (2) 316-322

Vedlegg A. Kart over prøvetakningslokaliteter

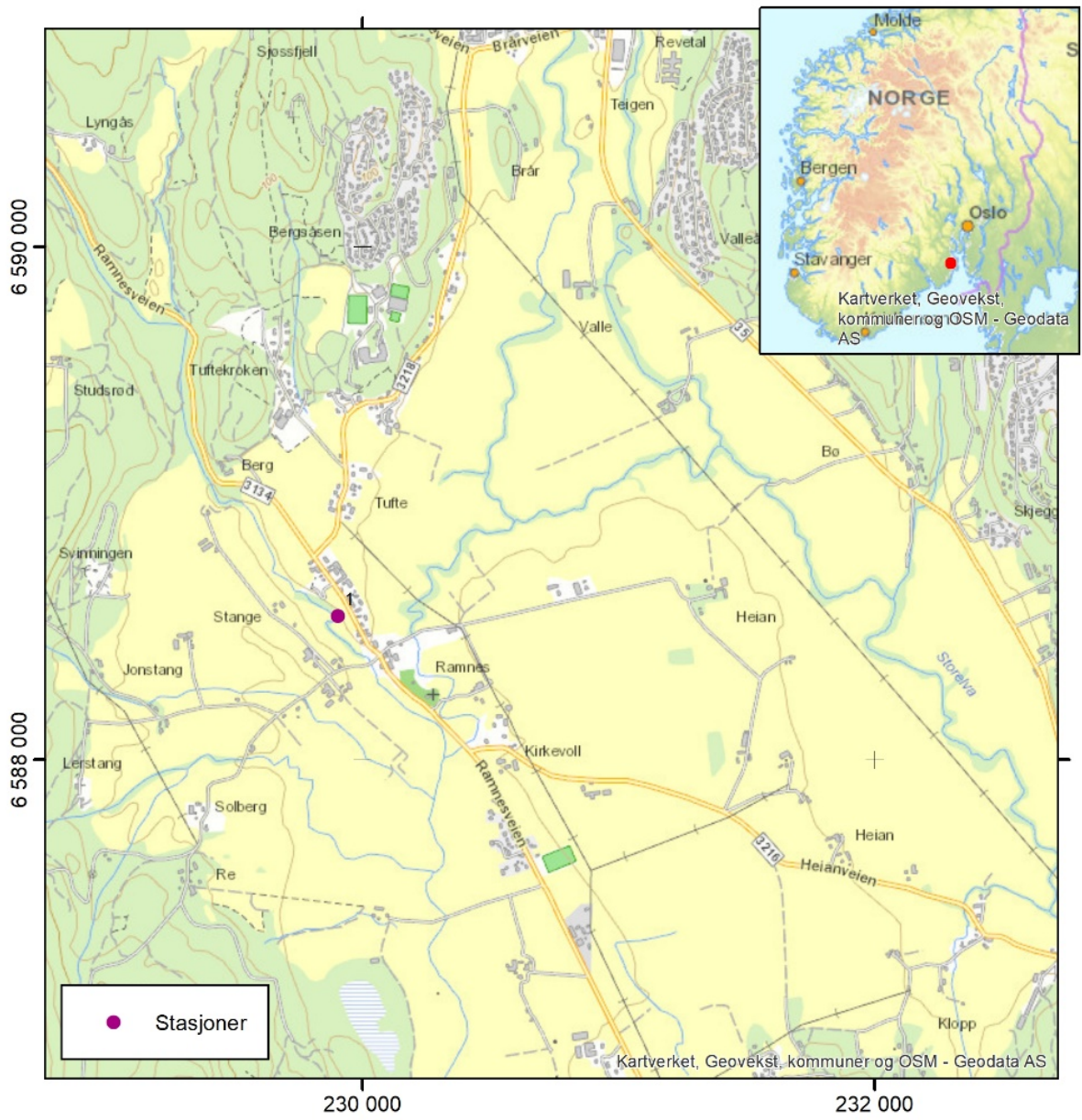


Prøvetakingsstasjon i Karpelva i Sør-Varanger kommune i Troms og Finnmark fylke.



UTM sone 33, EUREF89

Prøvetakingsstasjoner i Akersvannet Tønsberg og Stokke kommune i Vestfold og Telemark fylke.



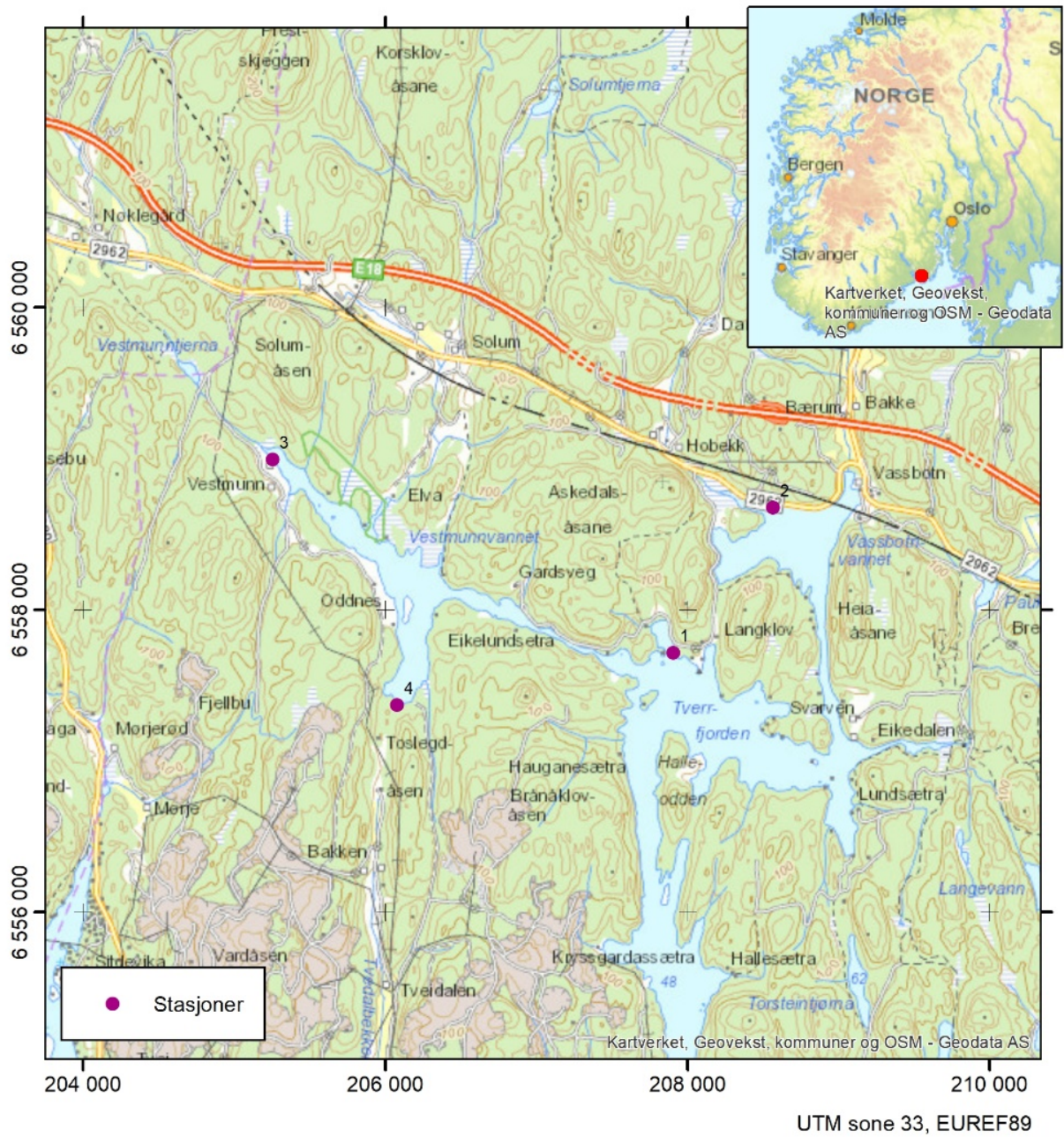
UTM sone 33, EUREF89

Prøvetakingsstasjoner i Ramnesbekken i Aulivassdraget i Tønsberg kommune i Vestfold og Telemark fylke.

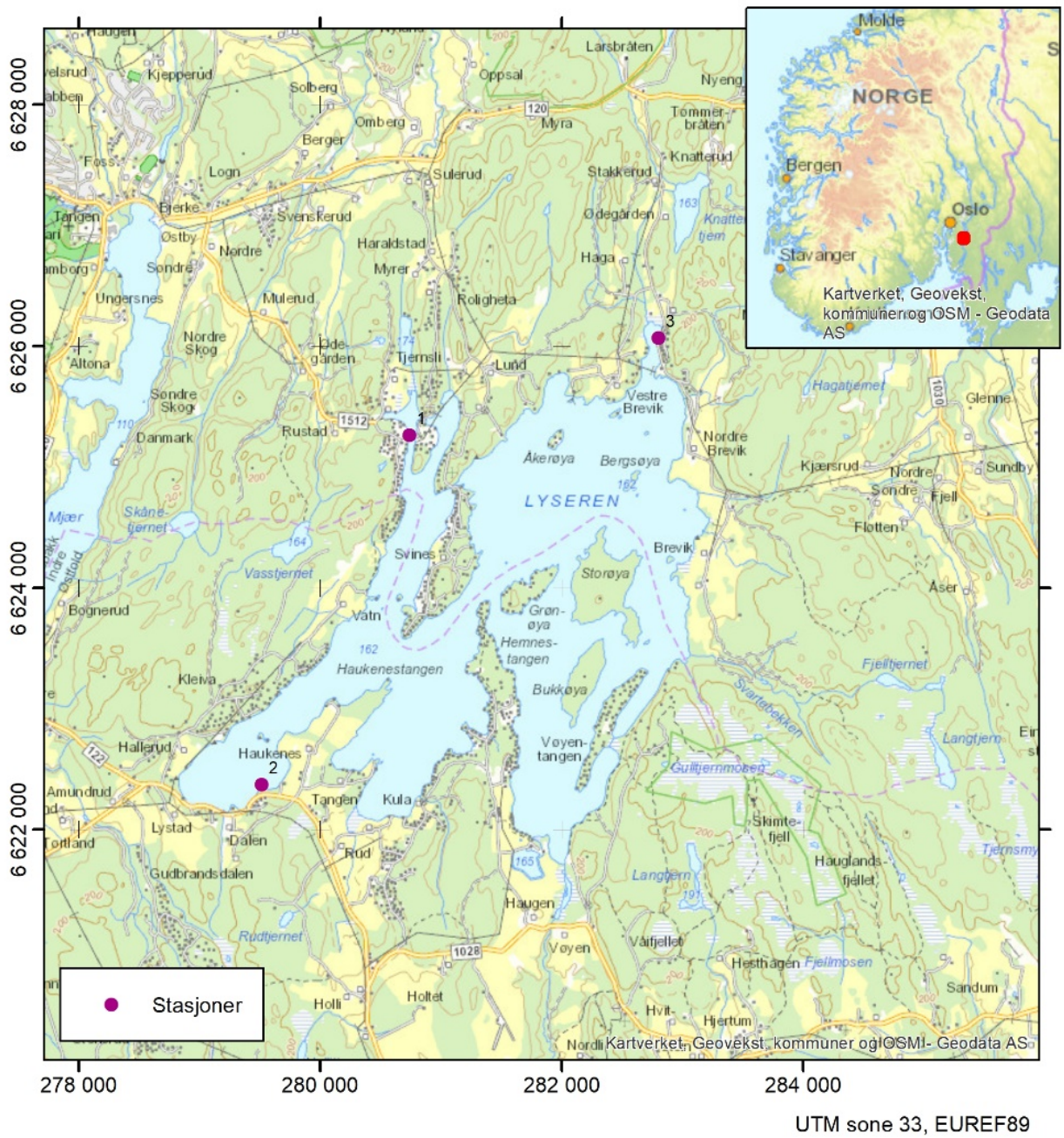


UTM sone 33, EUREF89

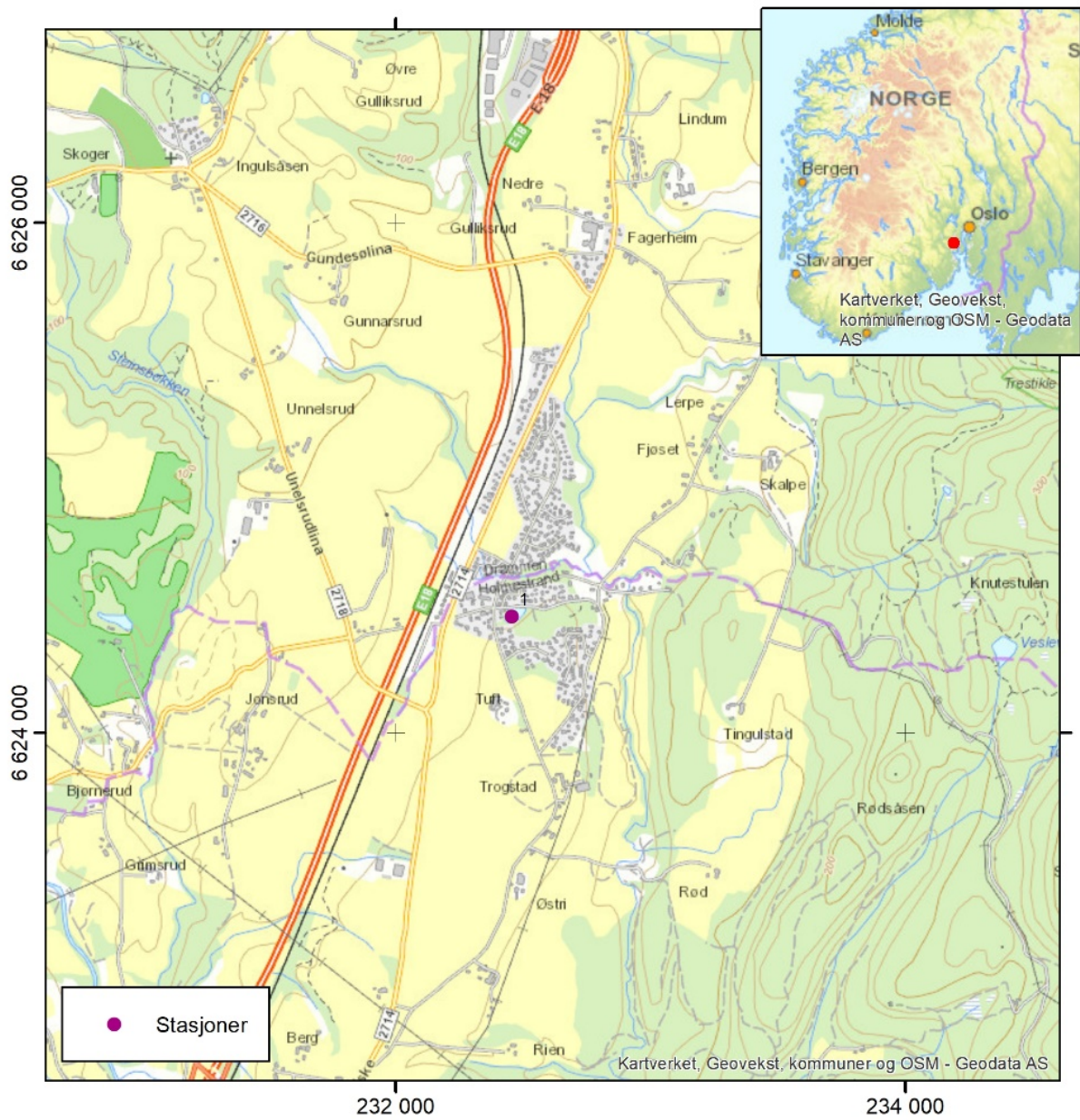
Prøvetakingsstasjon i Borrevannet i Horten kommune i Vestfold og Telemark fylke.



Prøvetakingsstasjoner i Hallevannet i Larvik kommune i Vestfold og Telemark fylke.

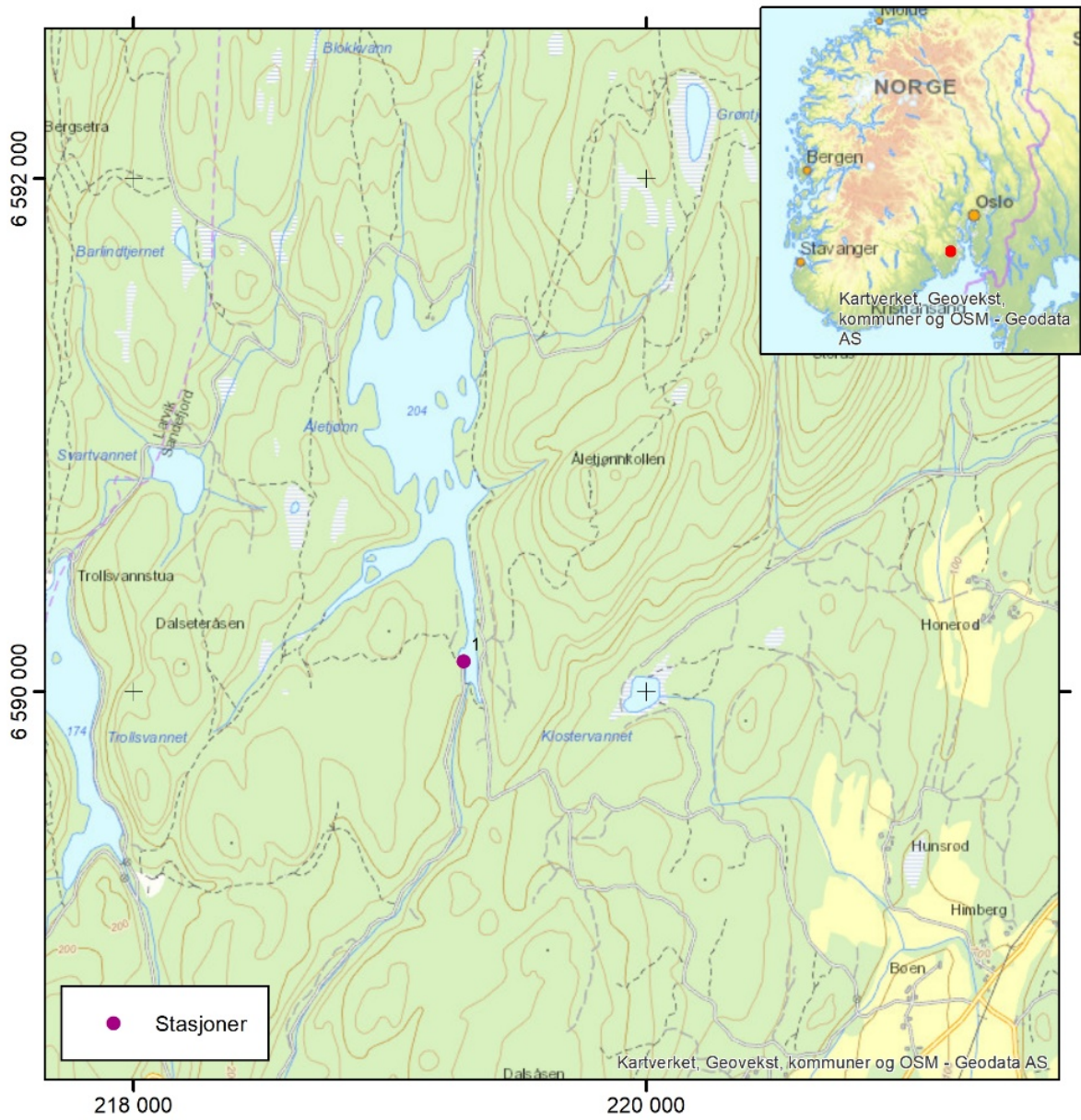


Prøvetakingsstasjoner i Lyseren i Indre Østfold og Enebakk kommuner i Viken fylke.



UTM sone 33, EUREF89

Prøvetakingsstasjoner i Tuftdammen i Holmestrand kommune i Vestfold og Telemark fylke.



UTM sone 33, EUREF89

Prøvetakingsstasjon i Åletjønn i Sandefjord kommune i Vestfold og Telemark fylke.

NIVA: Norges ledende kompetansesenter på vannmiljø

Norsk institutt for vannforskning (NIVA) er Norges viktigste miljøforskningsinstitutt for vannfaglige spørsmål, og vi arbeider innenfor et bredt spekter av miljø, klima- og ressurs spørsmål. Vår forskerkompetanse kjennetegnes av en solid faglig bredde, og spisskompetanse innen mange viktige områder. Vi kombinerer forskning, overvåkning, utredning, problemløsning og rådgivning, og arbeider på tvers av fagområder.



Norsk institutt for vannforskning

Gaustadalléen 21 • 0349 Oslo
Telefon: 02348 • Faks: 22 18 52 00
www.niva.no • post@niva.no