

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

2021



**Hovedkontor**

Økernveien 94  
0579 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](http://www.niva.no)

Tittel Overvåking og kartlegging av fremmed ferskvannsfisk ved bruk av miljø-DNA 2021	Løpenummer 7732-2022	Dato 17.03.2022
Forfatter(e) Anette Engesmo Elianne D. Egge Steen W. Knudsen Guttorm Christensen Martin Hesselsøe Marc Anglès d'Auriac	Fagområde Overvåking	Distribusjon Åpen
	Geografisk område Norge	Sider 41 + vedlegg

Oppdragsgiver(e) Miljødirektoratet	Oppdragsreferanse Sunniva Aagaard
Oppdragsgivers utgivelse: Miljødirektoratet, M-2243 I 2022	Utgitt av NIVA Prosjektnummer 210130

<p>Sammendrag</p> <p>Det ble samlet miljø-DNA prøver fra Akersvannet og Virikbekken som ble analysert for gjedde og ørret. Resultatene viste et forutsigbart mønster i Virikbekken, med størst konsentrasjon av gjedde DNA øverst og størst konsentrasjon av ørret DNA nederst mot fjorden. Grense Jakobselv, samt tre lokasjoner på Svalbard ble prøvetatt for å analysere for pukkellaks og sameksisterende anadrome laksefisk (ørret, atlantisk laks og røye). Analysene ble utført med tre prøvetakningsreplikater og seks tekniske replikater for å gi statistisk relevans for å analysere resultatene kvantitativt. Videre ble det utviklet nye deteksjonssystemer for ørekyt (tentativt validert til nivå 4) og sørv (validert til nivå 3).</p>
--

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

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

*Anette Engesmo*  
Prosjektleder

*Paul Ragnar Berg*  
Kvalitetssikrer

*Ailbhe Macken*  
Forskningsleder

ISBN 978-82-577-7468-4  
NIVA-rapport ISSN 1894-7948

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

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

2021

## Forord

Norsk institutt for vannforskning (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 i løpet av de siste tre årene har NIVA testet om lag 20 deteksjonssystemer for arter av fremmede ferskvannsfisk, på over 40 lokaliteter.

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 Elianne D. Egge har vært ansvarlig for molekylære analyser. Steen Knudsen har vært ansvarlig for utviklingen av nye molekylære deteksjonssystemer. 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 Paul R. Berg (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, 6. Desember 2021

*Anette Engesmo*

---

# Innholdsfortegnelse

<b>Sammendrag</b> .....	<b>5</b>
<b>Summary</b> .....	<b>6</b>
<b>1 Introduksjon</b> .....	<b>7</b>
<b>2 Metode</b> .....	<b>11</b>
2.1 Feltinnsamling og områdebeskrivelser.....	11
2.2 Molekylære metoder.....	15
2.2.1 DNA-isolering .....	15
2.2.2 qPCR .....	15
2.3 Utvikling av nye markører for sørv og ørekyt.....	17
2.3.1 <i>In silico</i> spesifisitetstesting.....	17
2.3.2 <i>In vitro</i> spesifisitetstesting .....	18
2.3.3 Optimalisering av primer- og probe konsentrasjon.....	19
2.3.4 Definisjon av deteksjonsgrenser (LOD og LOQ) .....	21
<b>3 Resultater og diskusjon</b> .....	<b>22</b>
3.1 Nye markører for ørekyt og sørv .....	22
3.2 Mengde miljø-DNA i prøvene.....	24
3.3 Virikbekken - Sjøørret vs. Gjedde .....	25
3.4 Akersvannet – nivåer av gjedde miljø-DNA gjennom sesongen og på ulike dyp.....	27
3.5 Finnmark og Svalbard – pukkellaks og andre anadrome laksefisker (atlantisk laks, ørret og røye).....	29
3.5.1 Pukkellaks.....	30
3.5.2 Atlantisk laks .....	32
3.5.3 Ørret.....	33
3.5.4 Røye.....	34
<b>4 Konklusjon</b> .....	<b>35</b>
4.1 Viktige hensyn for å unngå krysskontaminering .....	36
4.2 Viktige hensyn artsspesifisitet .....	37
<b>5 Referanser</b> .....	<b>39</b>
<b>Vedlegg A. Ekstra informasjon fra utviklingen av nye deteksjonssystemer</b> .....	<b>42</b>

## 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) og 2020 (Engesmo et al. 2021). I år har vi fokusert på de to økologisk viktige artene gjedde (*Esox lucius*) og pukkellaks (*Oncorhynchus gorbuscha*). Prøvetakningstidspunkt ble valgt basert på tidligere års resultater. Det er samlet inn tre prøvetakningsreplikater fra hver stasjon, som er analysert i seks tekniske replikater. Dette gir en statistisk robusthet som gjør at vi kan kommenterer på mengden av miljø-DNA fra de forskjellige artene i tid og rom. I tillegg er det utviklet nye deteksjonssystemer for ørekyt (*Phoxinus phoxinus*) og sørv (*Scardinius erythrophthalmus*).

De nye deteksjonssystemene for ørekyt og sørv ble testet på tidligere innsamlet materiale i dette prosjektet. Deteksjonssystemet for sørv ser spesifikt ut *in silico* og *in vitro* på vevsmateriale, men det er fortsatt uspesifikk amplifisering på miljøprøver vi ikke kan forklare. Systemet valideres derfor til nivå 3 og anbefales ikke tatt i bruk i forvaltningen. Deteksjonssystemet for ørekyt viser positiv amplifisering i ett teknisk replikat, på en lokasjon som skulle vært negativ. Vi vurderer det til at dette sannsynligvis er amplifisering av ørekyt brukt til agn eller lignende, da alle andre forventede negative lokasjoner er negative. Systemet valideres tentativt til nivå 4. Dette kan derfor anbefales for videre bruk i forvaltningsøyemed.

Alle miljø-DNA prøver ble samlet i henhold til protokollen fulgt tidligere i prosjektet. Det ble samlet vannprøver i Akersvannet på tre tidspunkt gjennom året og på fire stasjoner i innsjøen, som ble analysert for gjedde. Våre resultater viser at konsentrasjonen av miljø-DNA fra gjedde var gjennomgående høy gjennom året, men høyest om våren. Prøver fra Virikbekken ble analysert for gjedde og ørret. Konsentrasjonene av miljø-DNA fra de to artene ble sammenlignet og avdekket et sannsynlig mønster, for ørret var det høyest konsentrasjoner nederst i vassdraget mot Sandefjordsfjorden, mens for gjedde var det høyest konsentrasjoner øverst, da denne vandrer nedover. Resultatene fra 2021 tyder på at gjedde har spredd seg til en større del av Virikbekken samt til sidebekkene, enn hva som har vært kjent tidligere.

Det ble samlet prøver fra Grense Jakobselv i Finnmark, samt tre elver på Svalbard som ble analysert for pukkellaks og andre anadrome laksefisk. Resultatene for pukkellaks viste en svært regelmessig fortykning av miljø-DNA fra havet og innover Grense Jakobselv. Det samme mønsteret ble til en viss grad observert for atlantisk laks, mens det var jevnere nivåer av ørret og røye innover i elven. Resultatene fra Finnmark viser at miljø-DNA er en meget egnet metode for deteksjon av pukkellaks. Tidligere i dette prosjektet har vi også vist at man kan påvise yngel på våren, samt oppvandring av mindre bestander (oppvandring i partallsår).

Prøvetakningen på Svalbard viste lave konsentrasjoner av pukkellaks i Torskevannet og Lovènvatnet. Lave konsentrasjoner av laks ble registrert i Torskevannet. Røye ble registrert i alle tre lokasjoner, det var lave konsentrasjoner i Bretjørna og meget høye konsentrasjoner i Torskevannet. Det ble også registrert forholdsvis lave konsentrasjoner av ørret fra Lovènvatnet og Torskevannet. Dette var overraskende ettersom det ikke tidligere er registrert ørret på Svalbard. Resultatene anbefales derfor validert med videre prøvetakning.

## Summary

Title: Monitoring of invasive freshwater fish using environmental DNA (eDNA).

Year: 2022

Author(s): Anette Engesmo, Elianne D. Egge, Steen W. Knudsen, Guttorm Christensen, Martin Hesselsøe and Marc Anglès d'Auriac

Source: Norwegian Institute for Water Research, ISBN 978-82-577-7468-4

On behalf of the Norwegian Environment Agency, NIVA has evaluated the use of environmental DNA (eDNA) for the detection of alien freshwater fish in Norway. The project is a continuation of the same project in 2019 (Engesmo et al. 2020) and 2020 (Engesmo et al. 2021). This year we have focused on two ecologically important species: Pike (*Esox lucius*) and pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). Sampling time was selected based on previous years' results. Three sampling replicas have been collected from each station, which are analysed into six technical replicates. This provides a statistical resilience that allows us to comment on the amount of environmental DNA from the different species in time and space. In addition, new qPCR assays have been developed for minnow (*Phoxinus phoxinus*) and rudd (*Scardinius erythrophthalmus*).

The new assays for minnow and rudd were tested environmental samples previously collected in this project and validated according to Thalinger's validation scale. The rudd assay was validated to level 3 and is not recommended implemented into further monitoring efforts. The assay targeting minnow performed better, and all environmental samples gave the expected result, except for one unexplained amplification in an expected negative sample. The minnow assay is therefore tentatively validated to level 4 and may be used further for monitoring purposes.

All eDNA samples were collected according to the protocol followed earlier in the project. Water samples to be analysed for pike were collected from four stations in Akersvannet, at three times throughout the year. Results show that the concentration of eDNA from pike was generally high throughout the year, but highest in spring. Samples from Virikbekken were analysed for pike and trout. The concentrations of eDNA from the two species were compared and showed, predictably, that trout, which migrates up the stream from the fjord had the highest concentrations at the bottom of the watercourse. While pike, which migrated down the stream, had the highest concentrations at the top. The results from 2021 indicate that pike has spread to a larger part of Virikbekken as well as to the side streams, than has been known in the past.

Samples were collected from Grense Jakobselv in Finnmark, as well as three rivers in Svalbard that were analysed for pink salmon and other anadrome salmon fish. The results for pink salmon showed a very regular dilution of eDNA from the sea and into Grense Jakobselv. The same pattern was to some extent observed for Atlantic salmon, while there were more even levels of trout and char. The results from Finnmark show that environmental DNA is a very suitable method for detecting pink salmon. Earlier in this project, we have also shown that fry can be detected in the spring.

Sampling in Svalbard showed low concentrations of pink salmon in Torskevannet and Lovènvatn. Low concentrations of salmon were recorded in Torskevannet. Char was registered in all three locations, there were low concentrations in Bretjørna and very high concentrations in Torskevannet. Relatively low concentrations of trout were also recorded from Lovènvatn and Torskevannet. This was surprising as trout is not considered a part of the fauna in Svalbard. Further sampling is recommended to validate these findings.

# 1 Introduksjon

De senere år har det skjedd omfattende metodeutvikling innenfor miljøovervåkning og det er et tydelig ønske fra både forvaltning og forskning om inkludering av ny metodikk. Molekylære metoder og deteksjon av miljø-DNA er en av disse metodene som stadig oftere inkluderes. Molekylære metoder representerer på mange måter et paradigmeskifte i miljøovervåkingen, der man går fra å detektere hele organismer til å detektere molekyler. Prinsippet for deteksjon av miljø-DNA er enkelt - alle organismer har en unik genetisk signatur innprentet i hver enkelt celle. Denne signaturen vil «lekke» ut i miljøet via naturlige prosesser som avføring, reproduksjon, smoltifisering, skade eller predasjon. Det er altså mulig å isolere den genetiske signaturen fra en organisme direkte fra en vannprøve. Miljø-DNA vil 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), altså vil en molekylær deteksjon implisere at det har vært et levende individ av den aktuelle arten, i det følgende betegnet som 'mållarten', 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 et fåtall 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 og for å gi forvaltningen anledning til å sette i gang nødvendige tiltak er det viktig å oppdage introduksjonen tidlig. Bruk av miljø-DNA til overvåkning av fremmede ferskvannsfisk vil kunne bidra til at man raskere kan iverksette tiltak for å begrense skadene.

## **Forutsetninger for å lykkes med miljø-DNA**

På tross av de store mulighetene denne metodikken representerer har metodikken fortsatt utfordringer og det er viktig å validere resultatene opp mot kjent informasjon om både artene man leter etter og området de lever i. Kvaliteten på analyser av miljø-DNA vil aldri bli bedre enn de innsamlede prøvene. Korrekt prøvetakningsprotokoll og enhetlig behandling av prøvene er en forutsetning for å lykkes. Sted, vanddybde 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 prøvetaking. Sjiktning 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 ut ifra hvilken organisme man leter etter. I tillegg vil det være sesongvariasjoner i mengden av miljø-DNA, avhengig av den aktuelle artens økologi og livssyklus. Særlig i forbindelse med gyteperiode hos fisk så kan man forvente større mengder av miljø-DNA i vannet (Sigsgaard et al. 2017; Angles d'Auriac et al. 2019). Det er altså nødvendig å kjenne mållartens 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 mållartenes økologi og livssyklus.



Krysskontaminering har vært et tilbakevendende problem ved bruk av miljø-DNA, og kan skje både ved prøvetaking, prøvebehandling og ved analyse. I avsnitt 4.1. har vi oppsummert erfaringene gjort i dette prosjektet for å minimere muligheten for krysskontaminering.

### **Falske positive- og negative resultater**

Ved utføring av molekylære analyser er både falske positive og falske negative resultater 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 skalaen<sup>1</sup>. 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. Skalaen og de viktigste valideringspunktene er oppsummert i avsnitt 4.2.

### **Gjennomføring av prosjektet**

Oppdragsgiver hadde i utgangspunktet definert 12 arter av fremmed ferskvannsfisk de ønsket evaluert med tanke på overvåkning ved bruk av miljø-DNA. Disse var ørret (*Salmo trutta*), gjedde (*Esox lucius*), pukkellaks (*Oncorhynchus gorboscha*), ørekyt (*Phoxinus phoxinus*), regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*), karpe (*Cyprinus carpio*), karuss (*Carassius carassius*), abbor (*Perca fluviatilis*) og mort (*Rutilus rutilus*), (*Salvelinus fontinalis*), sørv (*Scardinius erythrophthalmus*), suter (*Tinca tinca*) og solabbor (*Lepomis gibbosus*). I løpet av prosjektets første år (2019) ble det gjennomført ett litteraturstudium av fagfeltets status internasjonalt. Eksisterende prøvetakningsmetodikk og protokoller ble evaluert og forenklet der dette var mulig. Det ble samlet inn miljø-DNA prøver fra totalt 31 lokaliteter som ble brukt til å positivt verifisere at markørene kunne detektere de aktuelle artene. Det ble utviklet nye markører for solabbor. Det ble samlet inn referansemateriale av alle tolv arter, samt samlet inn og sekvensert 11 individer av suter og 7 individer av sørv for generering av referansesekvenser (Engesmo et al. 2020).

For prosjektets andre år ble fokuset snevret inn og det ble gitt detaljfokus til fem arter som alle var problematiske (gjedde, ørekyt, sørv og suter) eller meget interessante (pukkellaks) i prosjektets første år. Det ble samlet inn prøver fra færre lokaliteter, men prøvene ble tatt på forskjellige tidspunkt gjennom året for å evaluere viktigheten av prøvetakingstidspunkt. Deretter ble spesifisiteten til de fem deteksjonssystemene evaluert, og for ørekyt, sørv og suter ble det avdekket spesifisitetsproblemer. Det ble utviklet nye markører for suter. Deteksjonssystemene for pukkellaks, gjedde, solabbor og suter ble vurdert som tilstrekkelig validert til at de kan tas i bruk i forvaltningen (Engesmo et al. 2021).

---

<sup>1</sup> <https://edna-validation.com/>

I denne rapporten vil vi presentere resultatene fra 2021, samt sammenstille erfaringer vi har gjort oss underveis i dette prosjektet. I 2021 har vi hovedsakelig fokusert på to økologisk interessante arter: gjedde og pukkellaks. Prøvetakningen ble igjen spredt ut over året og det er samlet flere prøvetakningsreplikater per lokalitet, samt at disse er kjørt i flere tekniske replikater på lab for å kunne presentere resultatene kvantitativt. Det ble samlet prøver på forskjellige stasjoner og ved flere dyp i Akersvannet for å se på utbredelsen av gjedde. I tillegg er det samlet prøver fra Virikbekken der konsentrasjonen av gjedde og sjøørret ble sammenlignet. Videre ble det sett på utbredelsen av anadrome laksefisk i Grense Jakobselv i Finnmark og i tre innsjøer på Svalbard. Her ble mengden miljø-DNA for pukkellaks, røye (*Salvelinus alpinus*), ørret og atlantisk laks (*Salmo salar*) analysert og presentert kvantitativt. Til slutt er det også utviklet nye molekylære deteksjonssystemer (assays) for sørv og ørekyt. Deteksjonssystemet for sørv ser spesifikt ut *in silico* og *in vitro* på vevsmateriale, men det er fortsatt uspesifikk amplifisering på miljøprøver vi ikke kan forklare. Systemet valideres derfor til nivå 3 på Thalinger's valideringsskale og anbefales ikke tatt i bruk i forvaltningen (Thalinger et al. 2021). Deteksjonssystemet for ørekyt viser positiv amplifisering i ett teknisk replikat, på en lokasjon som skulle vært negativ. Vi vurderer det til at dette sannsynligvis er amplifisering av ørekyt brukt til agn eller lignende, da alle andre forventede negative lokasjoner er negative. Systemet valideres tentativt til nivå 4 og kan derfor anbefales for videre bruk i forvaltningsøyemed.

## Faktaboks I - Ordliste:

**Amplifisering:** Primere binder seg til en DNA-sekvens godt nok til at polymerase-molekylet kan feste seg og lage en kopi av DNA-sekvensen, og det lages tilstrekkelig mange kopier til at det detekteres av PCR-maskinen.

**Deteksjonssystem (assay):** En kombinasjon av primere, probe og fysiske og kjemiske forhold under amplifiserings-reaksjonen (PCR), som gjør at man kan påvise DNA-sekvenser fra en bestemt art, og unngå signaler fra DNA-sekvenser fra andre arter (dvs. falske positive resultater).

**DNA-polymerase:** Et enzym som kobler sammen nukleotider til en DNA-sekvens. Fester seg ved en primer som sitter på en komplementær DNA-sekvens.

**Inhibering:** Skjer når en prøve inneholder for mange PCR-hemmende stoffer til at prøven ikke amplifiserer, på tross av at målarten er til stede i prøven.

**Miljø-DNA:** DNA som er isolert fra en prøve fra et miljø (for eksempel vann fra en innsjø eller jord), i motsetning til DNA som er isolert fra vev fra en bestemt organisme. DNAet i en miljø-DNA-prøve vil stamme fra celler eller løst DNA fra organismer som finnes i dette miljøet.

**Kryssamplifisering:** Når et deteksjonssystem amplifiserer andre arter enn målarten.

**Krysskontaminering:** Kontaminering med materiale eller DNA fra en prøve til en annen. Dette kan forekomme under prøvetaking, DNA-ekstrahering eller i det DNA-et overføres til PCR-platen.

**Markør:** En relativt kort DNA-sekvens som er unik for en art. Dette kan for eksempel være en del av et gen.

**Målart:** Utvalgt art prøver analyseres for.

**PCR (Polymerase Chain Reaction):** Betegnelse på den reaksjonen som skjer når DNA-polymerase lager kopier av markøren ved hjelp av primere. PCR-reaksjonen går i sykluser, og hver syklus består av denaturering (DNA-dobbelheliksen splittes i to enkelt-tråder), annealing (primer og probe binder seg til en enkelttråd) og elongering (DNA-polymerasen syntetiserer en ny DNA-tråd komplementær med en enkelttråd, den gamle og den nye tråden danner da en ny dobbelheliks.) For hver syklus kopieres hvert DNA-molekyl og det totale antallet DNA-kopier i reaksjonen vil dobles.

**Primer:** En kort (ca. 20 base par) DNA-sekvens som er komplementær med DNA-sekvensen i starten eller slutten av markøren. Når en primer er tilstrekkelig spesifikk, vil den binde seg kun til markøren fra mål-arten, ved en gitt temperatur. Når primeren er bundet, vil DNA-polymerasen feste seg, og starte å lage en kopi av markøren.

**Probe:** En kort DNA-sekvens som er komplementær med en del av markøren innenfor primerne. I likhet med primerne skal proben være spesifikk for mål-arten ved en gitt temperatur. Proben har et fluorescerende molekyl festet i den ene enden, og et såkalt "slukke-molekyl" i den andre. Når DNA-polymerasen kommer kjørende langs enkelttråden, deles proben i to, og det fluorescerende molekylet lyser opp.

## 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 2021 ble det samlet inn prøver fra 28. april til 19. oktober. Følgende elver og innsjøer ble prøvetatt: Akersvannet, Virikbekken, Grense Jakobselv, Torskevannet, Lovénvatnet og Bretjørna.

Akersvannet (**Figur 1**) er en næringsrik innsjø på 2,4 km<sup>2</sup> som ligger i kommunene Sandefjord og Tønsberg. Akersvannet har bestander av gjedde, abbor, gjørs, ål, sørv, vederbuk, flire og brasme. Det ble gjennomført innsamling av prøver i tre omganger i Akersvannet i 2021 (28.04, 28.05 og 19.10). Prøvetakningen i Akersvannet ble gjennomført på fire ulike stasjoner og på to av stasjonene som var pelagialt (åpne vannmasser) ble det tatt prøver på to ulike dyp (overflate og 10 meter). Hensikten med å gjennomføre dette var for å finne ut om det er noen tidspunkt på året som er bedre egnet enn andre og eventuelt hvor i vannet og vannmassene som egnet seg best.

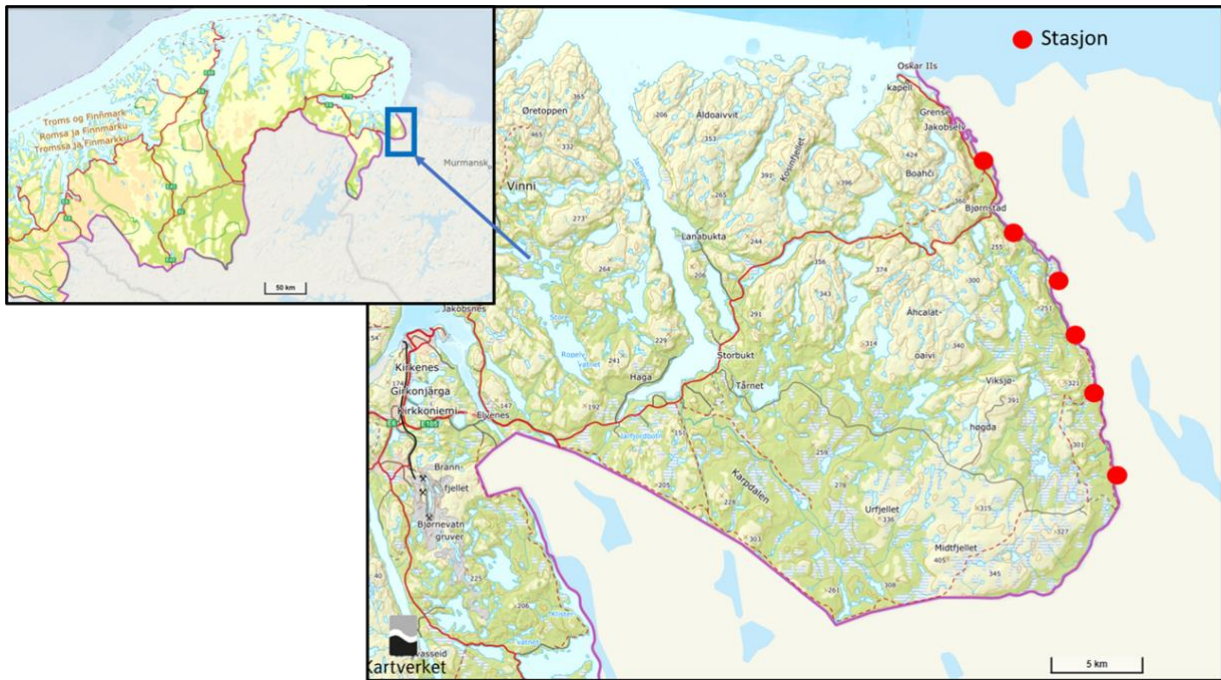
Virikbekken (**Figur 1**) har sin opprinnelse i Bugårdsdammen og renner ut i Istrevassdraget ved Hem bru. Vassdraget har også flere sidebekker som er fiskeførende (Brønnumbekken/Hanastabekken og Marumbekken). Virikbekken renner gjennom et landskap som er sterkt preget av jordbruksdrift. Bekkens økologiske tilstand bærer også preg av det. Ved siden av en dårlig økologisk tilstand, har det også vandret ned gjedde og abbor fra Bugårdsdammen. Gjedda er ulovlig utsatt i dammen. I Virikbekken ble det gjennomført en prøvetakingsrunde (18.06) på 10 stasjoner fra øvre del i Bugårdsdammen og til nedre del der vassdraget møter Istrebekken. To av prøvetakingspunktene ble henholdsvis lagt til sidebekkene Brønnumbekken og Istreelva. Hensikten med prøvetakingen var for å se på fordelingen av gjedde og ørret i vassdraget ved bruk av miljø-DNA.

Grense Jakobselv (Vuorján) drenerer de østlige delene av Finnmark og er en grenseelv mot Russland (**Figur 2**). Elva har en lengde på om lag 49 km med utspring fra innsjøen Vuorjánláđvi rundt en kilometer nord for grensa mot Russland og munner ut i Varangerfjorden på grensa mellom Norge og Russland. Elva er laksefiskeførende (atlantisk laks, sjøørret og sjørøye) og sjøvandrende laksefisk kan uhindret vandre opp til Jakobselvatnet, noe som tilsier at lakseførende strekning er om lag 39 km. Pukkellaks ble registrert i elva for første gang på 1960-tallet og oppgangen av pukkellaks i elva har vært stor de senere oddetallsårene som i 2017, 2019 og 2021. Det har vært uklart hvor langt opp i vassdraget pukkellaksen vandrer. Normalt sett er det klart høyeste tetthet i den nedre delen. Det ble samlet inn prøver fra seks stasjoner fra Grense Jakobselv i august 2021. Hensikten med miljø-DNA prøvetakingen i vassdraget er å kartlegge hvor langt opp i vassdraget pukkellaksen blir registrert.

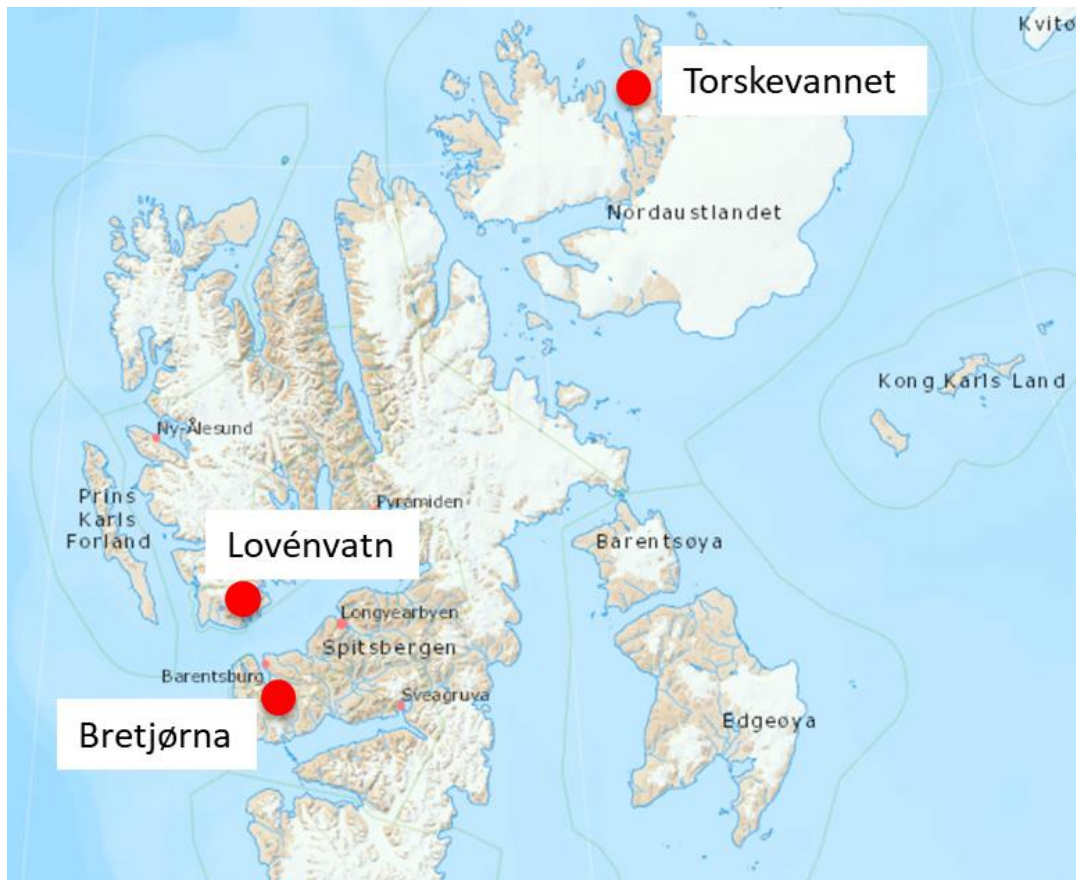
Det ble også samlet inn miljø-DNA prøver fra tre anadrome vassdrag på Svalbard med tanke på å påvise pukkellaks. Prøvene er tatt fra elven, nærme munningen til innsjøen de er navngitt etter. Det har årlig blitt registrert pukkellaks på Svalbard de siste 10 årene, men det er uklart i hvor stor grad pukkellaksen vandrer opp i elver og innsjøer. Det ble samlet inn prøver i september fra Torskevannet (Norduaustlandet) samt fra Lovénvatnet (Isfjorden) og Bretjørna (Grønfjorden) (**Tabell 1, Figur 3**).



Figur 1. Prøvetakingsstasjoner på Østlandet.



Figur 2. Prøvetakingsstasjoner i Grense Jakobselv, Troms og Finnmark.



**Figur 3.** Prøvetakingsstasjoner på Svalbard.

Det ble samlet inn tre filter fra hver lokalitet (stasjon) ved hver prøvetaking. Disse er tatt fra samme sted, direkte etter hverandre. Ved prøvetaking ble 1,5 liter vannprøve fylt i sterile engangsposer ved hjelp av engangs plastikkbeger. Vannposen ble montert i en lukket filtreringsopsats 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 2021.

Innsjø	Fylke	Kommune	Kilde	St.	Posisjon	Posisjon	Prøvetatt	Analysert for
<b>Akersvannet</b>	Vestfold og Telemark	Sandefjord og Tønsberg	F, SV	1	59.25235	10.32083	april, mai og oktober	Gjedde
<b>Akersvannet</b>	Vestfold og Telemark	Sandefjord og Tønsberg	F, SV	2	59.23462	10.32023	april, mai og oktober	Gjedde
<b>Akersvannet</b>	Vestfold og Telemark	Sandefjord og Tønsberg	F, SV	3	59.25239	10.33220	april, mai og oktober	Gjedde
<b>Akersvannet</b>	Vestfold og Telemark	Sandefjord og Tønsberg	F, SV	4	59.24185	10.33197	april, mai og oktober	Gjedde
<b>Virikbekken</b>	Vestfold	Sandefjord	F, SV	1	59.13147	10.19806	Juni	Gjedde og ørret
<b>Virikbekken</b>	Vestfold	Sandefjord	F, SV	2	59.12893	10.20167	Juni	Gjedde og ørret
<b>Virikbekken</b>	Vestfold	Sandefjord	F, SV	3	59.12740	10.20224	Juni	Gjedde og ørret
<b>Virikbekken</b>	Vestfold	Sandefjord	F, SV	4	59.12414	10.20159	Juni	Gjedde og ørret
<b>Virikbekken</b>	Vestfold	Sandefjord	F, SV	5	59.10580	10.20518	Juni	Gjedde og ørret
<b>Virikbekken</b>	Vestfold	Sandefjord	F, SV	6	59.10554	10.20091	Juni	Gjedde og ørret
<b>Virikbekken</b>	Vestfold	Sandefjord	F, SV	7	59.09477	10.20301	Juni	Gjedde og ørret
<b>Virikbekken</b>	Vestfold	Sandefjord	F, SV	8	59.07343	10.18410	Juni	Gjedde og ørret
<b>Virikbekken</b>	Vestfold	Sandefjord	F, SV	9	59.07989	10.20241	Juni	Gjedde og ørret
<b>Virikbekken</b>	Vestfold	Sandefjord	F, SV	10	59.07941	10.20259	Juni	Gjedde og ørret
<b>Grense Jakobselv</b>	Troms og Finnmark	Sør Varanger	SV, M	1	69.64657	30.93770	August	Anadrome laksefisk
<b>Grense Jakobselv</b>	Troms og Finnmark	Sør Varanger	SV, M	2	69.67527	30.93963	August	Anadrome laksefisk
<b>Grense Jakobselv</b>	Troms og Finnmark	Sør Varanger	SV, M	3	69.70322	30.89109	August	Anadrome laksefisk
<b>Grense Jakobselv</b>	Troms og Finnmark	Sør Varanger	SV, M	4	69.72446	30.88735	August	Anadrome laksefisk
<b>Grense Jakobselv</b>	Troms og Finnmark	Sør Varanger	SV, M	5	69.61512	30.95220	August	Anadrome laksefisk
<b>Grense Jakobselv</b>	Troms og Finnmark	Sør Varanger	SV, M	6	69.58291	30.94154	August	Anadrome laksefisk
<b>Torskevannet</b>	Svalbard		SYS	1	80.28408	22.59281	September	Anadrome laksefisk
<b>Lovénvatnet</b>	Svalbard		SYS	1	78.27182	13.77031	September	Anadrome laksefisk
<b>Bretjørna</b>	Svalbard		SYS	1	77.95993	14.26745	September	Anadrome laksefisk

Kilder benyttet for bekreftelse av tilstedeværelse av målart: F=fiskekart, SV=Statsforvalter, SYS=Sysselmester, 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). Etterfølgende ekstraksjon ble DNA konsentrasjon målt med Qubit 1X dsDNA HS Assay Kit på et Qubit Flex Fluorometer (Invitrogen).

### 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 miljøprøver ble kjørt i seks tekniske replikater, med mindre noe annet er angitt. Positive og negative kontroller ble også 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 målarten. I tillegg inkluderes fire typer negative kontroller: I tre brønner tilsettes 5 µl rent vann (ddH<sub>2</sub>O) 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 ddH<sub>2</sub>O 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). I tillegg ble det også utført en negativ ekstraksjonskontroll samtidig med DNA-ekstrahering, for å kontrollere for kontaminasjon på laben og krysskontaminering av prøver under ekstraksjon. 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 % klørlosning og deretter med EtOH.



**Tabell 2.** Markører og qPCR-protokoller inkludert i dette prosjektet. Kons. (nM) angir den optimale sluttkonsentrasjon av primere og probe. Ta = annealing temperatur, Amp. (bp) = amplifiseringslengde.

Art / markør	Sekvens navn	Sekvens (fram, reverse og probe)	Ta °C	Kons. (nM)	Amp. (bp)	Ref.
<b>Gjedde</b> ( <i>Esox lucius</i> ) / Cyt B	EsolucCBL	GGGACGTAACTACGGCTGA	60	1200	84	Spens et al. (2016)
	EsolucCBR	CGGGCGATGTGTATGTA		800		
	EsolucCBP	<b>FAM</b> -CCGAAATATTCACGCTAACGGTGCA- <b>BHQ1</b>		300		
<b>Ørekyt</b> ( <i>Phoxinus phoxinus</i> ) / Cyt B	Phopho_cytb_F07	CGT CAC CCC ACC CCA TAT TC	60	400		Denne studien
	Phopho_cytb_R09	GGG TGT TCT ACG GGT ATG CC		1000		
	Phopho_cytb_P07	<b>FAM</b> -TGC CTA TGC TAT CTT ACG GTC TAT CCC- <b>BHQ1</b>		400		
<b>Sørv</b> ( <i>Scardinius erythrophthalmus</i> ) / Cyt B	Scaery_cytb_F14	TCG CAT TCC ACT TCC TCC TG	60	200		Denne studien
	Scaery_cytb_R07	AAG CTG TAA GGG CAA GCA GT		800		
	Scaery_cytb_P08	<b>FAM</b> -TAC ACG AAA CAG GAT CGA ACA ACC CGG- <b>BHQ1</b>		200		
<b>Pukkellaks</b> ( <i>Oncorhynchus gorbuscha</i> ) / COI	Oncgor_CO1_F09	TCCTTCCTCCTCCTCTTC	60	400	163	Andersen et al. (2017)
	Oncgor_CO1_R06	TGGCCCCTAAAATTGATGAG		400		
	Oncgor_CO1_P06	<b>FAM</b> -CAGGGGCATCCGTCGACTTAACTAT- <b>BHQ1</b>		100		
<b>Ishavsørøye</b> ( <i>Salvelinus alpinus</i> ) / COI	A-char-F25	CCCAGCTATTTCTCAATATCAAACC	63.5	500	124	Mirimin et al. 2020*
	A-char-R21	GATTTCCGGTCCGTGAGTAACA		500		
	A-char-P24	<b>FAM</b> -CCC GTTCTAGCAGCAGGCATTACT- <b>TAMRA</b>		250		
<b>Ørret</b> ( <i>Salmo trutta</i> ) / Cyt B	CarimSt-F	CGCCCGAGGACTCTACTATGGT	60	600	108	Carim et al. (2016)
	CarimSt-R	GGAAGAACGTAGCCCACGAA		300		
	CarimSt-P	<b>FAM</b> -CGGAGTCGTA CTGCTAC- <b>MGB-NFQ</b>		250		
<b>Atlantisk laks</b> ( <i>Salmo salar</i> ) / COI	Ssalar-COI-74-F	CGCCCTAAGTCTCTTGATTCTGA	60	400	74	Atkinson et al. 2018**
	Ssalar-COI-74-R	CGTTATAAATTTGGTCATCTCCCAGA		400		
	Ssalar-COI-74-P	<b>FAM</b> -AGA ACTCAGCCAGCCTG- <b>MGB-NFQ</b>		400		
<b>Solabbor</b> ( <i>Lepomis gibbosus</i> ) / Mitochondrial cytb	Pumpkinseed:CytB-F	GCCGCCACTGTAATTCACC	58	200	75	Engesmo et al. 2020
	Pumpkinseed:CytB-R	TGCGTCCGAGTTTAAAGCCTA		1000		
	Pumpkinseed:CytB-P	<b>FAM</b> -CACGAAACAGGCTCCAACAACCC- <b>BHQ1</b>		250		
<b>Suter</b> ( <i>Tinca tinca</i> ) / Mitochondrial COI	Suter-83bp-372F20	CCTCAGTAGACCTAACAATT	59	500	83	Engesmo et al. 2021
	Suter-83bp-434R21	AGTTGTGGTGATAAAAATTGAT		500		
	Suter-83bp-391L19	<b>FAM</b> -TGCTAGGTGAAGTGAGAAA- <b>MGB</b>		250		

\* Assay reoptimalisert i denne studien: Ta økt til 63,5 °C

\*\* Assay reoptimalisert i denne studien: Primer og probe konsentrasjoner endret

**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 <sub>2</sub> 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 <sub>2</sub> 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. Lastes og forsegles før ordinære prøver.
5 Negativ kontroll	5 µL ekstraksjonsblank brukes som prøve i 3 brønner på alle prøvekjøringer	Ordinære prøvekjøringer	Kontroll for krysskontaminering ved DNA-ekstraksjon. Lastes og forsegles før ordinære prøver.

## 2.3 Utvikling av nye markører for sørv og ørekyt

### 2.3.1 *In silico* spesifisitetstesting

Test av artsspesifikke markører ble gjort på samme måte for begge arter og følger i hovedsak tidligere publiserte protokoller (Agersnap et al., 2017; Knudsen et al., 2019). Vevsprøver fra dansk ferskvannsfisk ble innhentet fra Natural History Museum of Denmark (NHMD). Genomisk DNA ble ekstrahert med DNeasy blood and tissue kit (Qiagen) etterfølgende produsentens protokoll. Ekstrahert genomisk DNA ble fortynnet 1:100 for alle etterfølgende PCR og qPCR tester. Dette resulterte i en lavere konsentrasjon enn de opprinnelige vevsekstraktene, men konsentrasjonene vil fortsatt være betydelig høyere enn konsentrasjonene man kan forvente å finne av miljø-DNA i filtrerte vannprøver.

Mitokondrielle DNA sekvenser (mtDNA) for en rekke relevante fiskearter ble lastet ned fra NCBI Genbank og videre analysert i Geneious vR7 (Kearse et al. 2012). Genet 'cytochrome b' ble alignert mot hverandre med MAFFT v6.822 (Kato & Toh 2010). Følgende NCBI GenBank sekvensene ble brukt: *Abramis brama*: AP009305, *Abramis brama*: KC894466, *Alburnus alburnus*: AB239593, NC\_008659, *Blicca bjoerkna*: AF038468, *Carassius auratus*: JN105355, NC\_002079, *Ctenopharyngodon idella*: NC\_010288, *Cyprinus carpio*: AP009047, *Hypophthalmichthys molitrix*: JQ231114, *Leucaspis delineatus*: AP009307, *Phoxinus phoxinus*: NC\_020358, *Scardinius erythrophthalmus*: NC\_031561, *Tinca tinca*: AB218686.

Forslag til oligonukleotider ble innhentet med Primer3 v0.4.0 (Koressaar & Remm 2007) ved å bruke mtDNA sekvensen for cytochrome b fra henholdsvis sørv og ørekyt som søkesekvens, med definerte

primer parametere: annealingtemperatur 60 °C, 20 bp lengde og 70-450 bp amplikon og probe parametere: annealingtemperatur 68 °C og 27 bp lengde. Deretter ble de foreslåtte primersekvensene testet ved bruk av Primer-BLAST funksjonen til NCBI Genbank (Ye et al. 2012). Alle primere som ved blasting ikke var spesifikke ble utelatt. De resterende primersekvensene ble deretter sammenlignet med det tidligere genererte alignmentet av cytochrome b i Geneious. Alle primere som fortsatt så ut til å være spesifikke mot sin målart ble deretter bestilt (TAG Copenhagen A/S) og testet med vanlig PCR (**Vedlegg A**).

### 2.3.2 *In vitro* spesifisitetstesting

Primerene som ble designet *in silico* ble testet med ordinær PCR på genomisk ekstrahert DNA fra målarten, samt andre beslektede arter (**Tabell 4**). Alle PCR-reaksjoner ble utført med totalt 25 µL reaksjonsvolum inneholdende 1 µL av hver primer (konsentrasjon 10 µM), 2.5 µL buffer (x10), 2.5 µL dNTP (2 mM per dNTP) og 0.1 µL (5U/µL) AmpliTaq Gold Polymerase (Thermo-fisher, Applied Biosystems), 11.6 µL ddH<sub>2</sub>O, 2 µL (25 mM) MgCl<sub>2</sub> og 2 µL templat DNA fra vevsprøver av målarten. Disse innledende testene involverte mange forskjellige kombinasjoner av de designede primerene (**Vedlegg A**), samt DNA fra både målarten og en rekke beslektede- og sameksisterende arter. Resultatene ble visualisert under UV lys på en 2 % agarosegel, farvet med GelRed (Thermo Scientific). Kombinasjoner av primere som ikke viste seg spesifikke mot målarten ble forkastet.

For de primer kombinasjonene som fortsatt så spesifikke ut ble det bestilt opp TaqMan prober modifisert med FAM- og BHQ1. Disse ble nå spesifisitetstestet med qPCR (**Vedlegg A**). Alle qPCR reaksjoner ble utført med Stratagene Mx3005P (Agilent). Alle reaksjoner ble utført med totalt reaksjonsvolum på 25 µL, inneholdende 1 µL av hver primer (med konsentrasjon 10 µM) og 1 µL probe (2.5 µM), 10 µL TaqMan Environmental Mastermix 2.0 (Applied Biosystems), 10 µL ddH<sub>2</sub>O og 3 µL 1:100 DNA fra målarten. Alle reaksjoner kjørt med tekniske duplikater og to negative kontroller. qPCR resultatene ble eksportert som excel filer fra Mx3005P programmet, og analysert med kode i R v4.1 (R Core Team, 2021) med følgende 'packages': "ggplot2" (Wickham 2016), "pdp" (Greenwell, 2017) og "readxl" (Wickham & Bryan 2017).

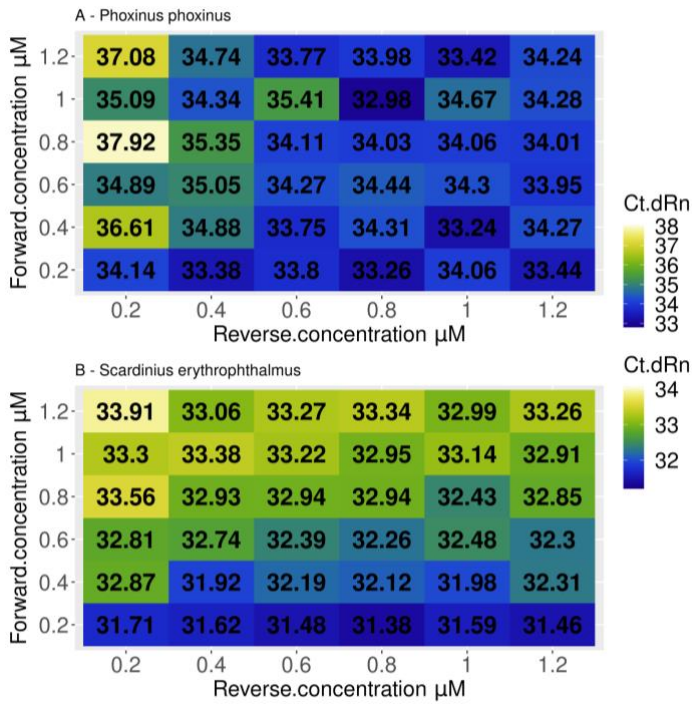
Ut fra spesifisiteten til primer og probe kombinasjonene, samt amplifikasjonseffektiviteten i qPCR reaksjonene ble kombinasjonen primere og probe: Phopho\_cytb\_F07 og Phopho\_cytb\_R09 med proben Phopho\_cytb\_P07 valgt for ørekyt og kombinasjonen Scaery\_cytb\_F14 og Scaery\_cytb\_R07, samt proben Scaery\_cytb\_P08 valgt for sørv.

**Tabell 4.** Beslektede- og sameksisterende arter som ble brukt til *in vitro* spesifisitetstesting. ZMUC = Zoological Museum University of Copenhagen. Museumskatalog nummeret henviser til samlingen av fisk 'Pisces'. Alle vevsprøver brukt for ekstraksjon av genomisk DNA har et matchende museumseksemplar deponert ved ZMUC.

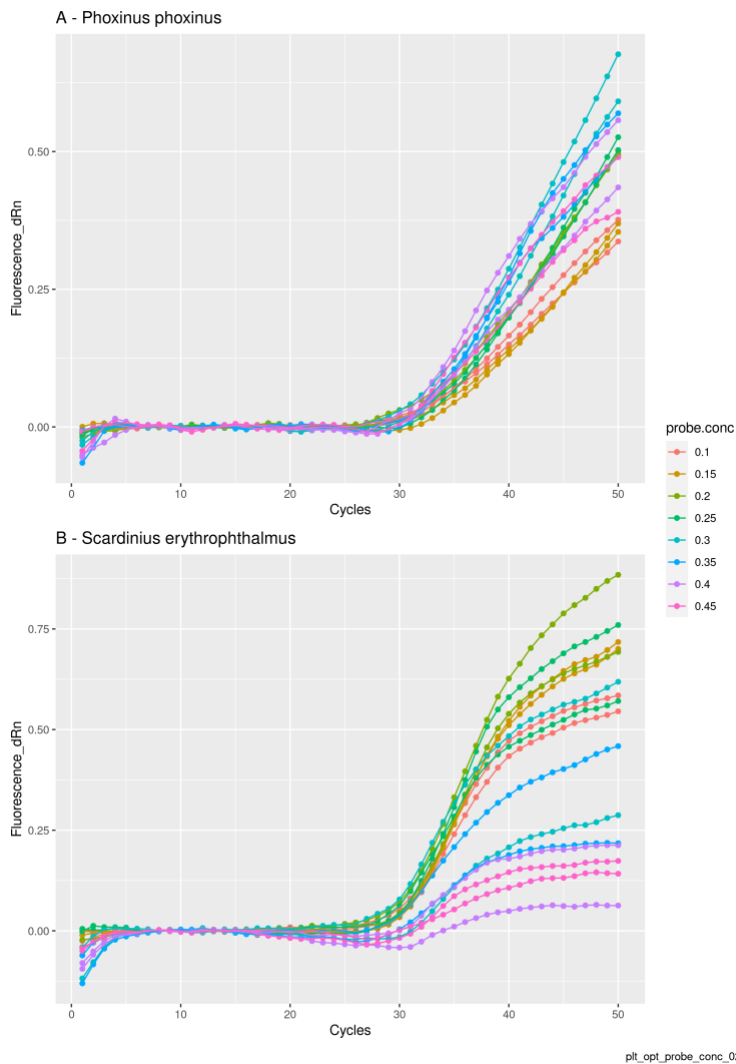
Art	Forkortelse	MuseumAbbr	MuscatNo	GenomicDNA extracNo
<b>Brasme</b> ( <i>Abramis brama</i> )	Abrbra	ZMUC	P265515	P38.10
<b>Laue</b> ( <i>Alburnus alburnus</i> )	Albalb	ZMUC	P265093	E15_08
<b>Flire</b> ( <i>Blicca bjoerkna</i> )	Blibjo	ZMUC	P265619	P94.6
<b>Karuss</b> ( <i>Carassius carassius</i> )	Caraur	ZMUC	P264743	P38.13
<b>Gullfisk</b> ( <i>Carassius auratus</i> )	Carcar	ZMUC	P265763	E15_06
<b>Gresskarpe</b> ( <i>Ctenopharyngodon idella</i> )	Cteide	ZMUC	P264713	E15_04
<b>Karpe</b> ( <i>Cyprinus carpio</i> )	Cypcar	ZMUC	P265736	E15_07
<b>Sølvkarpe</b> ( <i>Hypophthalmichthys molitrix</i> )	Hypmol	ZMUC	P265410	NA
<b>Vederbuk</b> ( <i>Leuciscus idus</i> )	Leuidu	ZMUC	P265618	P94.33
<b>Gullbust</b> ( <i>Leuciscus leuciscus</i> )	Leuleu	ZMUC	P265072	NA
<b>Ørekyt</b> ( <i>Phoxinus phoxinus</i> )	Phopho	ZMUC	P265084	P94.28
<b>Bitterling</b> ( <i>Rhodeus amarus</i> )	Rhoama	ZMUC	P264908	E15_01
<b>Mort</b> ( <i>Rutilus rutilus</i> )	Rutrut	ZMUC	P265459	P38.11
<b>Sørv</b> ( <i>Scardinius erythrophthalmus</i> )	Scaery	ZMUC	P264529	E15_02
<b>Suter</b> ( <i>Tinca tinca</i> )	Tintin	ZMUC	P265005	E14_01

### 2.3.3 Optimalisering av primer- og probe konsentrasjon

Primerkonsentrasjonen ble optimalisert ved å kjøre en matris med forskjellige konsentrasjoner av F(foreward) og R(revers) primer mot hverandre. Alle konsentrasjoner ble kjørt i duplikater og den konsentrasjonskombinasjon med lavest gjennomsnittlig Ct verdi (se avsnitt 2.4) ble valgt (**Figur 4**). Tilsvarende test ble gjort for probekonsentrasjon, der qPCR reaksjoner ble kjørt med optimalisert primerkonsentrasjon og forskjellige probekonsentrasjoner. Den konsentrasjonen som ga lavest gjennomsnittlig Ct verdi ble valgt (**Figur 5**). Se **Tabell 2** for de valgte primer- og probekonsentrasjoner.



**Figur 4.** Optimalisering av primerkonsentrasjon for (A) ørekyt og (B) sørv. Lavere Ct-verdi angir optimal konsentrasjon av primere. Konsentrasjonene er oppgitt som sluttkonsentrasjon i de enkelte reaksjonsbrønner.



**Figur 5.** Optimalisering av probekonsentrasjon for (A) ørekyt og (B) sørv.

### 2.3.4 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 fortykningsserie 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), som 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 fortykningen 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 seks tekniske replikater av en prøve amplifiserer innen rimelig avstand fra hverandre). På bakgrunn av de negative kontrollene, LOD og LOQ, er resultatene i denne rapporten delt inn i tre kategorier:

- 1) **Positive prøver angir entydig** qPCR amplifisering av mållarten i alle replikater.
- 2) **Usikre positive prøver angir** qPCR amplifisering av mållarten, men amplifiseringen kommer senere enn den laveste standarden, eller bare i minst en av replikater.
- 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 to nye deteksjonssystemer for sørv og ørekyt, samt resultatene fra miljø-DNA analyser for gjedde, sjøørret og pukkellaks og andre anadrome laksefisk (atlantisk laks, ørret og røye).

### 3.1 Nye markører for ørekyt og sørv

Utviklingen av nye deteksjonssystem for sørv og ørekyt er beskrevet frem til nivå 3 på Thalinger's valideringsskala i detalj i seksjon 2.3. For å validere systemene opp til nivå 4 ble de videre testet på en rekke miljøprøver som tidligere er samlet inn i dette prosjektet. Ved denne valideringen ble hver prøve kjørt i tre tekniske replikater.

#### Ørekyt

Deteksjonssystemet for ørekyt ble testet på følgende lokaliteter der prøvene var forventet negative, kjent fiskesamfunn på lokasjonen er gitt i parentes:

1. Tuftdammen (Suter, karpe (funnet en død i 2019))
2. Lyseren (Laue, mort, ål, abbor, gjedde, krøkle, lake og ørret)
3. Grense Jakobselv (laks, ørret, røye og pukkellaks)
4. Hallevannet (Sørv, abbor, ørret og røye)

Systemet ble videre testet på følgende lokaliteter som var forventet positive, kjent fiskesamfunn på lokasjonen er gitt i parentes:

1. Åletjønn (Ørekyt, ørret, abbor)
2. Akersvannet (Sørv, gjørs, vederbuk, brasme, ørekyt, gjedde og abbor)
3. Aulielva (laks, ørret, ørekyt og abbor – drenerer fra Revovatn hvor det er registrert gjedde, mort, gulbust, brasme)

Det var ikke amplifisering i de forventet negative prøvene, med unntak av en av de tre replikatene fra en prøve i Tuftdammen. Ettersom alle andre forventede negative prøver (inkludert fire andre prøver fra Tuftdammen) ikke amplifiserte, anser vi det som plausibelt at denne ene amplifiseringen er en reell amplifisering, men ikke av levende fisk. Årsaken til amplifiseringen er ukjent og dette er problematisk, men det kan tenkes at ørekyt har blitt brukt som agnfisk, eller fiskeredskaper brukt i dammen kan tidligere være brukt på lokasjoner med ørekyt (som det er mange av i nærheten). Alle forventede positive prøver, med unntak av prøvene fra Åletjønn ga positiv deteksjon av ørekyt. I henhold til fiskekart for Vestfold fra 2000 skal det være ørekyte i Åletjønn. Imidlertid ble det i dette prosjektet gjennomført prøvefiske med elektrisk fiskeapparat på flere stasjoner både i 2019 og 2020 uten at det ble påvist ørekyt. Dette antyder at en eventuell populasjon av ørekyt er svært liten om ørekyte i det hele tatt er til stede i Åletjønn per i dag. Deteksjonssystemet valideres tentativt til nivå 4 og anses som klart til bruk i forvaltningen.

#### Sørv

Deteksjonssystemet for sørv ble testet på følgende lokaliteter der prøvene var forventet negative, kjent fiskesamfunn på lokasjonen er gitt i parentes:

1. Tuftdammen (Suter, karpe (funnet en død i 2019))
2. Åletjønn (Ørekyt, ørret, abbor)

3. Grense Jakobselv (Pukkellaks, atlantisk laks, røye og ørret)
4. Aulielva (laks, ørret, ørekyt og abbor – drenerer fra Revovatn hvor det er registrert gjedde, mort, gulbust og brasme)
5. Lyseren (Laue, mort, ål, abbor, gjedde, krøkle, lake og ørret)

Systemet ble videre testet på følgende lokaliteter som var forventet positive, kjent fiskesamfunn på lokasjonen er gitt i parentes:

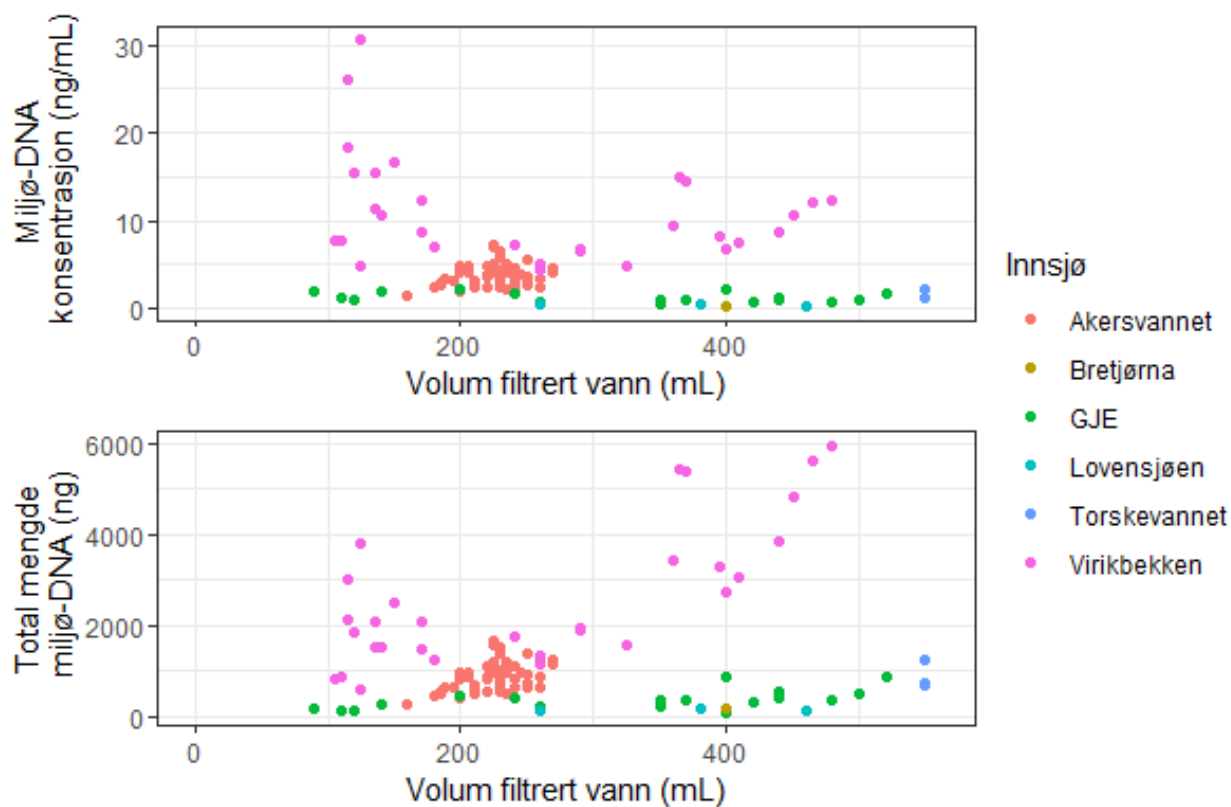
1. Akersvannet (Sørv, gjørs, vederbuk, brasme, ørekyt, gjedde og abbor)
2. Hallevannet (Sørv, abbor, ørret og røye)
3. Borrevannet (Sørv, ørekyt, abbor, gjedde, mort, suter, laue, brasme og gjørs)

Det ble observert amplifisering fra tre av lokasjonene som var forventet negative. Dette var flere enkeltreplikater fra Tuftdammen, én fra Lyseren og én fra Aulielva. Amplifiseringen var lav (tilsvarende meget lave nivåer av miljø-DNA) og med atypiske amplifiseringskurver, men opphavet til den uspesifikke amplifiseringen er ukjent. I alle de forventet positive prøvene ble det påvist sørv, med unntak av prøvene fra Borrevannet. De testede prøvene fra Borrevannet ble samlet inn i midten av november 2020. Dette er i utgangspunktet veldig sent for miljø-DNA prøver og vi har gjennom prosjektet sett en tydelig tendens på at det er lavere nivåer av miljø-DNA fra karpefisker om høsten. Likevel var det amplifisering av meget lave nivåer av miljø-DNA fra sørv i disse prøvene når de ble analysert med et tidligere utviklet deteksjonssystem (Engesmo et al. 2021). Det er mulig at disse nivåene var så lave at DNAet nå er degradert. På grunn av den uspesifikke amplifiseringen i Tuftdammen, Lyseren og Åletjønn anser vi det fortsatt som sannsynlig at dette deteksjonssystemet har spesifisitetsproblemer. Det valideres derfor kun til nivå 3 og anses ikke som klart til bruk i forvaltningen.



### 3.2 Mengde miljø-DNA i prøvene

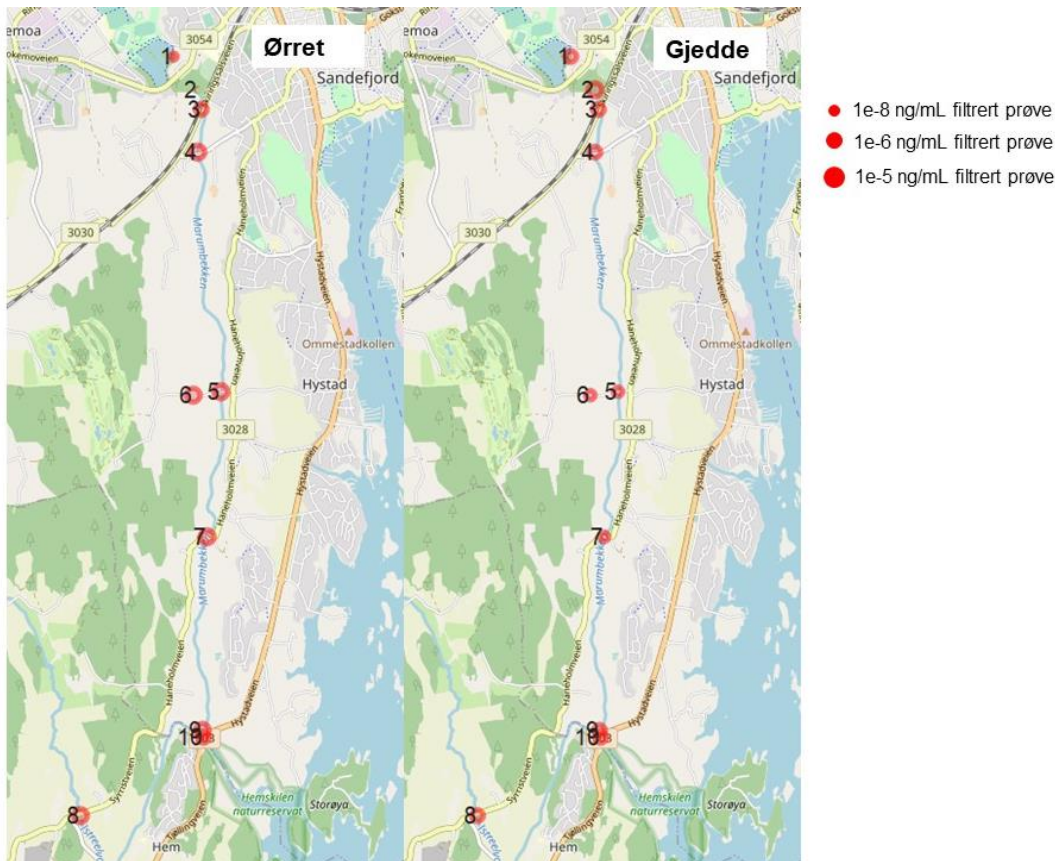
Volum som var mulig å filtrere gjennom systemet varierte mellom ca. 100 mL og 560 mL (**Figur 6**). Det var en tendens til at prøvene med minst volum hadde høyest konsentrasjon av miljø-DNA i Virikbekken. Her var det også en tendens til at total mengde miljø-DNA økte med økende volum. For Akersvannet og Grense Jakobselv var total mengde miljø-DNA uavhengig av volum filtrert vann, innen de volumer som ble filtrert i denne studien.



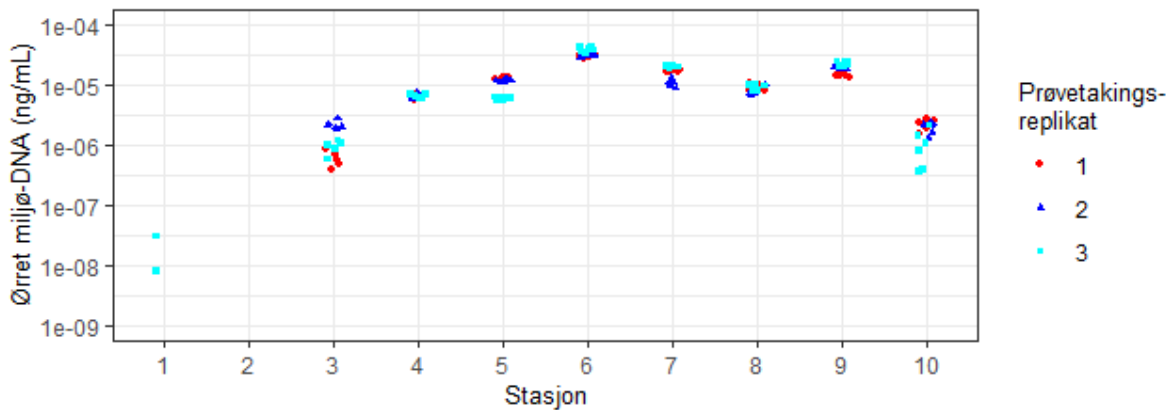
**Figur 6.** Konsentrasjon av miljø-DNA (ng/mL filtrert prøve), og total mengde miljø-DNA (i nanogram) plottet mot volum filtrert prøve. GJE = Grense Jakobselv.

### 3.3 Virikbekken - Sjørøret vs. Gjedde

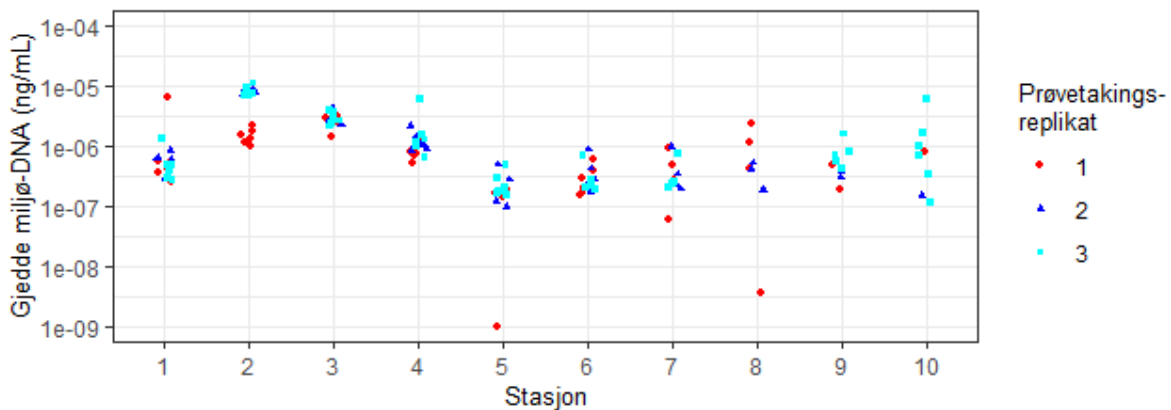
**Virikbekken** i Vestfold starter i Bugårdsdammen og munner ut i Hemskenen i Sandefjordsfjorden. Virikbekken har flere fiskeførende sidebekker blant annet Brønnum-/Hanastabekken, Marumbekken og Istreelva. Virikbekken og Istreelva møtes noen hundre meter fra elvemunningen. Virikbekken renner gjennom jordbrukslandskap, og den økologiske tilstanden bærer preg av avrenning fra områder med stor landbruksaktivitet. Elva har en god bestand av sjørøret samt noe stasjonær ørret. For å bedre gyteforholdene for ørret har det de senere årene blitt gjennomført en rekke tiltak for å bedre gyte- og oppvekstforholdene for sjørøret (kilde: Sandefjord forvaltningsråd for anadrom laksefisk, [www.sffal.no](http://www.sffal.no)). Ørretbestanden vil kunne bli negativ påvirket av gjedde, som har blitt ulovlig satt ut i Bugårdsdammen og som har muligheten til å vandre nedover elva pga. mangelfulle sperresystemer i Bugårdsdammen. Sperresystemet ble oppgradert høsten 2018 (kilde: Sandefjord forvaltningsråd for anadrom laksefisk, [www.sffal.no](http://www.sffal.no)). Vi ønsket derfor å sammenligne nivåene av miljø-DNA fra ørret og gjedde i elva. Prøver ble tatt fra 10 stasjoner (**Figur 7**), lokalisert fra øverst til nederst i elva (stasjon 1-5, 7, 9 og 10), stasjon 6 er lokalisert i en sidebekk like ved stasjon 5, stasjon 8 er lokalisert i Istreelva, hvor det også er registrert ørret.



**Figur 7.** Fordeling av miljø-DNA fra ørret og gjedde langs Virikbekken i Vestfold. Størrelsen på punktene er proporsjonal med median konsentrasjon av miljø-DNA fra målararten (ng/volum filtrert prøve).



**Figur 8.** Konsentrasjon av miljø-DNA fra ørret i prøver fra ti stasjoner i Virikbekken, korrelert mot en standard kurve generert av vev fra norsk ørret. Ved stasjon 3-10 ble ørret amplifisert i alle replikater. Fra stasjon 2 ble ørret ikke amplifisert i noen replikater, og fra stasjon 1 ble ørret kun amplifisert i to av seks tekniske replikater fra det ene prøvetakingsrepliketet. Merk logaritmisk skala på y-aksen.



**Figur 9.** Konsentrasjon av miljø-DNA fra gjedde i prøver fra ti stasjoner langs Virikbekken, korrelert mot en standard kurve generert av vev fra norsk gjedde. Ved stasjon 1-4 og 6 ble gjedde amplifisert i alle replikater. Fra stasjon 5 amplifiserte hhv. 4 av 6, 6 av 6 og 6 av 6 tekniske replikater og fra stasjon 7 amplifiserte 5 av 6 tekniske replikater fra alle prøvetakingsreplikater. Fra stasjon 8 amplifiserte hhv. 0 av 6, 3 av 6 og 4 av 6 tekniske replikater. Fra stasjon 9 amplifiserte alle prøvetakingsreplikater (i hhv. 2 av 6, 2 av 6 og 6 av 6 tekniske replikater) og fra stasjon 10 amplifiserte 1 av 6, 1 av 6 og 6 av 6 tekniske replikater. Merk logaritmisk skala på y-aksen.

Resultatene viser ulik fordeling av miljø-DNA fra gjedde og ørret i Virikbekken (**Figur 7, 8 og 9**). For ørret observerte vi lavest konsentrasjoner øverst i elva, på stasjon 1 (øverst) var det meget lav amplifisering (under LOQ) og fra stasjon 2 var det ingen amplifisering. Deretter observerte vi stigende konsentrasjoner fra stasjon 3-6. Konsentrasjonene ved stasjon 6-9 lå på omtrent samme nivå, mens stasjon 10 hadde noe lavere konsentrasjon. Spesielt kan man merke seg at stasjon 8, som er lokalisert i Istreelva, var på samme nivå som stasjonene i Virikbekken. Årsaken til at nivåene av miljø-DNA fra ørret var under deteksjonsgrensen på de to øverste stasjonene er at denne delen av vassdraget ikke er tilgjengelig for sjøørret. Det er derfor lite trolig at det er ørret til stede på disse stasjonene. En mulig årsak til de lave miljø-DNA konsentrasjonene av ørret på stasjon 10 (nedre del

av Istrevassdraget) er at denne stasjonen ikke har et typisk habitat for ørret. Stasjon 9 som ligger i nederste del av Virikbekken har et betydelig bedre habitat for ørret.

For gjedde observerte vi det motsatte mønsteret: stasjonene øverst i elva hadde de høyeste nivåene av miljø-DNA (stasjon 1-4), mens stasjon 5-10 generelt hadde noe lavere nivåer, og ved stasjon 7-10 hadde noen av prøvetakingsreplikatene manglende eller usikker deteksjon. I en tidligere undersøkelse gjennomført i 2019 der det også ble benyttet miljø-DNA ble det påvist gjedde på to av tre stasjoner i den øvre delen av Virikbekken, men ikke i stasjonene i den nedre delen og i Istreelva (Berntsen et al. 2019). Resultatene fra 2021 tyder på at gjedde har spredd seg til en større del av Virikbekken samt til sidebekkene.

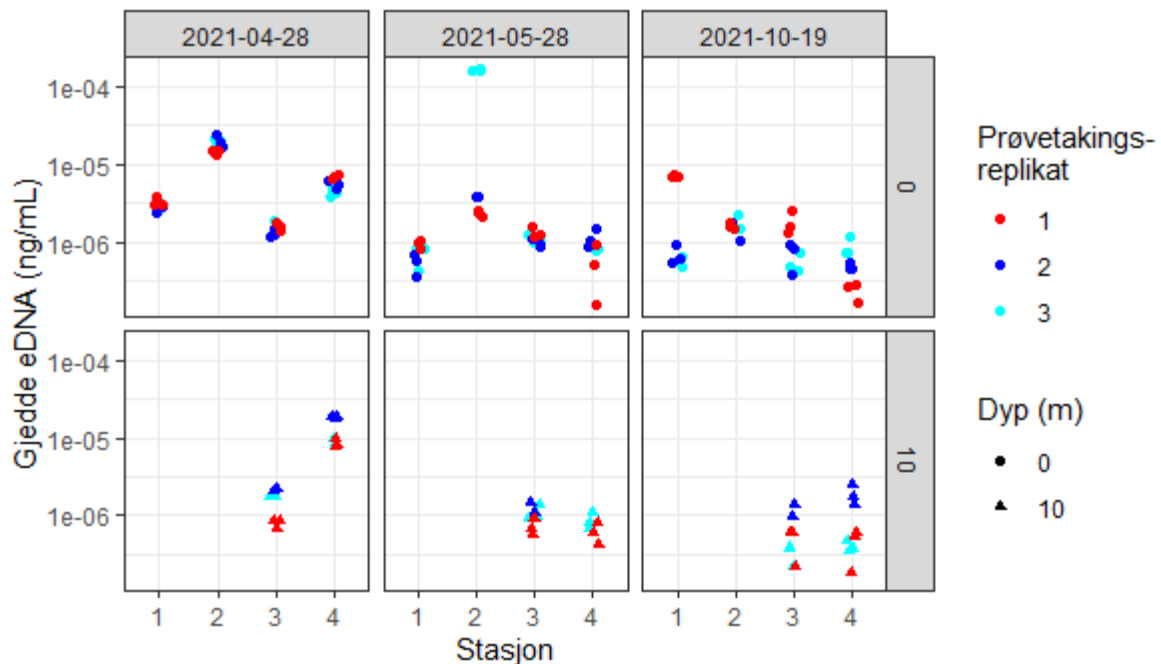
Resultatene gir mening sett i lys av at ørret vandrer oppover elva, og gjedda vandrer nedover fra Bugårdsdammen. Deteksjon av gjedde i hele Virikbekken og på stasjonen i sidebekkene Istreelva og Brønnumbekken viser at det fortsatt trengs tiltak for å begrense denne regionalt fremmede arten i vassdraget. Gjedde vil kunne ha en betydelig negativ effekt på sjøørretbestanden i vassdraget.

### 3.4 Akersvannet – nivåer av gjedde miljø-DNA gjennom sesongen og på ulike dyp

Prøver ble tatt fra Akersvannet på tre ulike tidspunkter, fra vår til høst. Prøvene ble tatt fra fire stasjoner (**Figur 10**), stasjon 1 (Buer) på nordvest-bredden av vannet, stasjon 2 (Lågerød) i sørenden, stasjon 3 midt i innsjøen og stasjon 4 i sør. Prøver ble tatt i overflaten (0 m) fra alle stasjonene, og i tillegg fra 10 m dyp fra stasjon 3 og 4. Prøvene ble tatt fra båt.



**Figur 10.** Fordeling av miljø-DNA fra gjedde i Akersvannet. Ved stasjon 3 og 4 indikerer det øverste punktet konsentrasjonen ved 10 meters dyp. Størrelsen på punktene er proporsjonal med median konsentrasjon av miljø-DNA fra målarten (ng/volum filtrert prøve).



**Figur 11.** Konsentrasjon av miljø-DNA fra gjedde fra Akersvannet i 2021, korrelert mot en standard kurve generert av vev fra norsk gjedde. Merk logaritmisk skala på y-aksen.

Gjedde ble detektert i alle prøver og alle prøvetakings- og tekniske replikater (**Figur 11**). Det var generelt godt samsvar mellom replikatene innen prøvene, med noen unntak. Resultatene viser generelt noe høyere nivåer i april enn i mai og oktober, på begge dyp, bortsett fra i ett prøvetakingsreplikant i mai, som hadde mer enn 10 ganger høyere nivåer. Gjedda gyter i litoralsonen etter isløsningen om våren, og det er da man forventer å finne de høyeste konsentrasjonene av miljø-DNA. Det var ingen klar forskjell i nivåer mellom stasjonene i litoralsonen (1 og 2), og stasjonene i den pelagiske sonen (ute i innsjøen), men i overflaten hadde stasjon 2 de høyeste nivåene. Imidlertid var nivåene på 10 m dyp ved stasjon 4 like høye som i overflaten ved stasjon 2. Når temperaturen stiger om sommeren, vil deler av populasjonen trekke ut på dypere vann der temperaturen er lavere. Det var imidlertid ingen tydelig forskjell i nivåer mellom 0 og 10 m i mai. Etersom det var lave temperaturer i Sør-Norge våren 2021 er det mulig at denne effekten ikke var tydelig i mai. Resultatene viser omtrent like nivåer i mai og oktober, og lite forskjell mellom dyp. Man kan anta at dette nivået var "bakgrunnsnivå"/den generelle konsentrasjonen av gjedde miljø-DNA i Akersvannet i 2021, og at høyere nivåer forekommer under spesielle omstendigheter som for eksempel gyting.

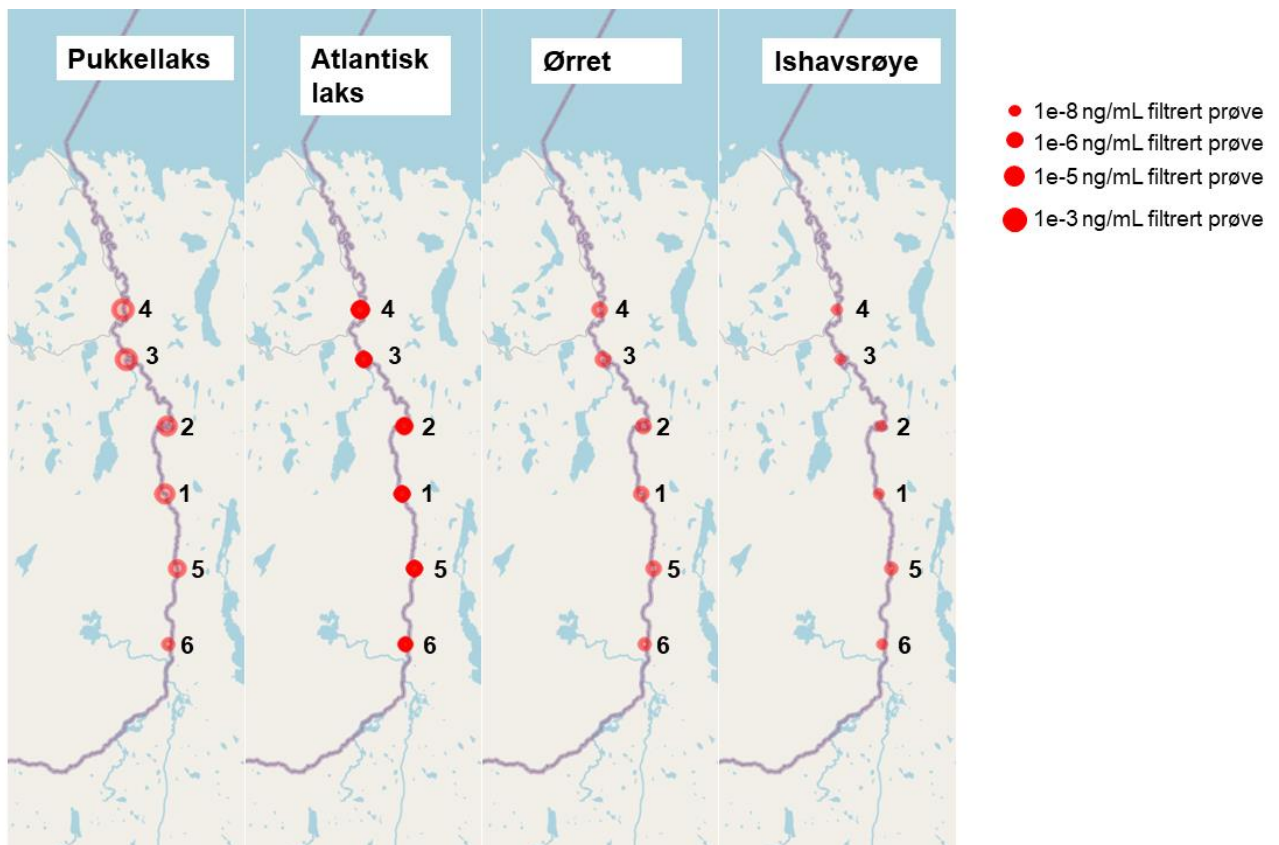
### 3.5 Finnmark og Svalbard – pukkellaks og andre anadrome laksefisker (atlantisk laks, ørret og røye)

Prøver ble samlet i Grense Jakobselv 18. august 2021 (**Figur 12**) fra seks stasjoner plassert mellom 10 og 35 km oppstrøms fra munningen av elva. Fra Svalbard ble det tatt prøver fra Lovønsjøen og Bretjørna på Spitsbergen og fra Torskevannet på Nordaustlandet.

Prøvene fra Grense Jakobselv ble analysert for alle kjente sameksisterende anadrome laksefisk i området og fordelingen av miljø-DNA konsentrasjonene oppover i elven er vist i **Figur 13**.



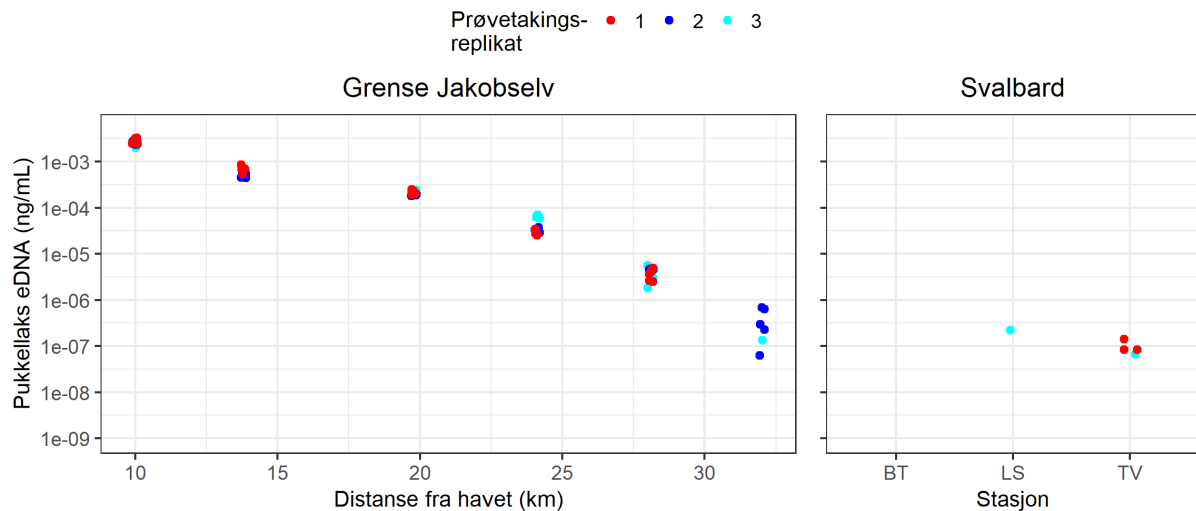
**Figur 12.** Prøvetakning i Grense Jakobselv.



**Figur 13.** Fordeling av miljø-DNA fra anadrome laksefisk i Gense Jakobselv, Finnmark. Størrelsen på punktene er proporsjonal med median konsentrasjon av miljø-DNA fra mållarten (ng/volum filtrert prøve).

### 3.5.1 Pukkellaks

I Gense Jakobselv ble pukkellaks detektert i alle prøvetakings- og tekniske replikater fra alle stasjoner, bortsett fra ved stasjonen lengst inn i landet, hvor den ble detektert i to av tre prøvetakingsreplikater, med 5 av 6 og 1 av 6 tekniske replikater (**Figur 14**). Resultatene viser en svært regelmessig fortyning av miljø-DNA fra pukkellaks langs Gense Jakobselv. Lineær regresjon av ln-transformert miljø-DNA-konsentrasjon, mot distanse fra havet i kilometer, gir en korrelasjonskoeffisient på 0.9. Stigningstallet er  $-0.37$ , som betyr at mengden miljø-DNA i snitt minker med c. 31% for hver kilometer fra havet (utregningen er  $[\exp(-0.37)-1]*100\% = -30.9\%$ ). Resultatene stemmer svært godt overens med observasjoner som ble gjort under innsamling av prøvene. Det er en klart høyere tetthet av pukkellaks i de nedre delene av vassdraget for så å avta jo lenger opp i vassdraget man kommer. Det ble observert pukkellaks i Lasaruskulpen (st. 5), men ikke i Langvannet (st. 6). Det er ingen vandringshinder for pukkellaks fra sjøen og opp til Langvannet.

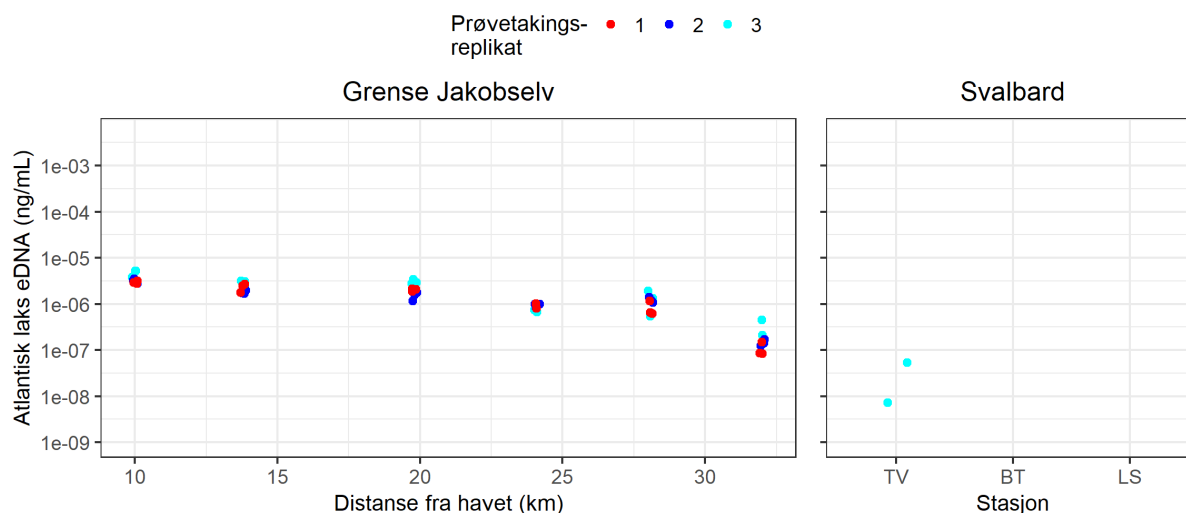


**Figur 14.** Konsentrasjon av miljø-DNA fra pukcellaks per milliliter filtrert vannprøve fra seks stasjoner i Grense Jakobselv og tre innsjøer på Svalbard (TV = Torskevannet, BT = Bretjørna, LS = Lovènsjøen). Stasjonene i Grense Jakobselv er plassert i rekkefølge fra nederst til øverst i elva. Merk logaritmisk skala på y-aksen.

På Svalbard ble kun svært lave konsentrasjoner av pukcellaks detektert (**Figur 14**). Pukcellaks ble ikke detektert i Bretjørna, og i kun ett teknisk replikat i Lovènsjøen. I Torskevannet ble pukcellaks detektert i to prøvetakingsreplikater, men i kun ett og tre tekniske replikater i hver av dem. Det ble ikke observert pukcellaks i noen av disse tre elvene på Svalbard. Utløpselva fra Torskevannet har betydelig vannføring og det vil være fullt mulig for pukcellaks å vandre opp i denne innsjøen. Det er fanget pukcellaks i Torskevannet i tidligere år. Utløpselva fra Bretjørna og Lovènsjøen hadde relativt liten vannføring da prøvene ble tatt noe som kan føre til at det er vanskelig for pukcellaks å vandre opp i disse elvene. Prøvene ble samlet inn i september som er mot slutten av sesongen for oppvandring av pukcellaks. Det ble likevel observert nygått pukcellaks i Linnévatn i slutten av september. Vassdrag som er tilgjengelig for pukcellaks på Svalbard har ofte en innsjø som pukcellaksen vandrer opp til før den eventuelt gyter. Dette kan være en av årsakene til at det ble observert lite miljø-DNA fra pukcellaks i prøvene fra elvene på Svalbard. Det er ikke vist at pukcellaks gyter i elvene på Svalbard. En måte å kontrollere dette på vil være å ta miljø-DNA i nedre del av utløpselvene tidlig på våren når fremdeles eventuelt gytt rogn ligger nede i grusen.



### 3.5.2 Atlantisk laks

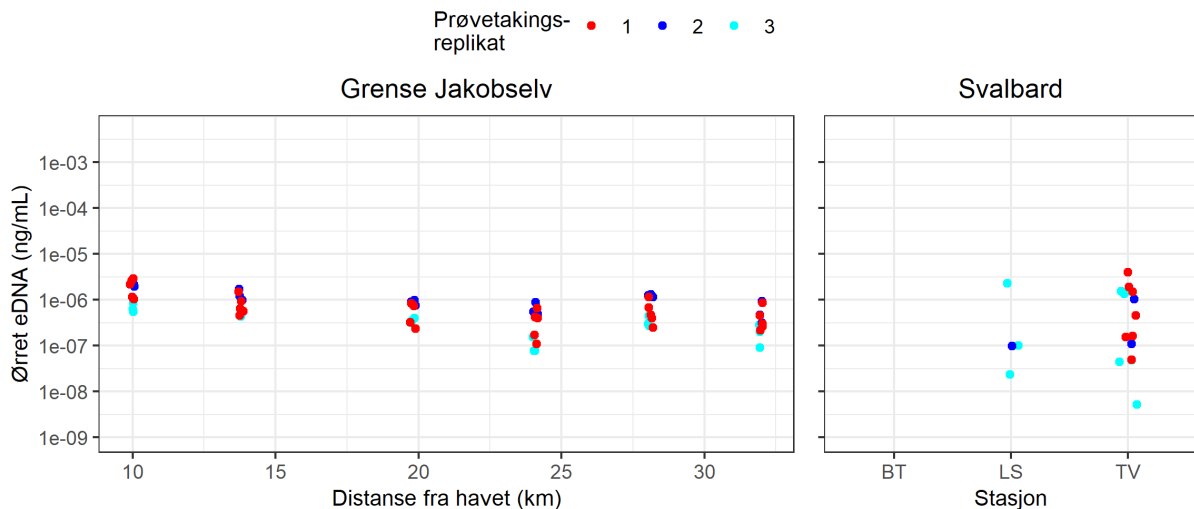


**Figur 15.** Konsentrasjon av miljø-DNA fra atlantisk laks per milliliter filtrert vannprøve fra seks stasjoner i Grense Jakobselv, Finnmark, og tre innsjøer på Svalbard (TV = Torskevannet, BT = Bretjørna, LS = Lovønsjøen). Stasjonene i Grense Jakobselv er plassert i rekkefølge fra nederst til øverst i elva. Merk logaritmisk skala på y-aksen.

I Grense Jakobselv ble atlantisk laks detektert ved alle stasjoner, i alle replikater (**Figur 15**). Konsentrasjon var synkende oppover i elva (stigningstall  $-0.11$ , korrelasjonskoeffisient  $0.7$ ,  $p$ -verdi =  $0.02$ ). Dette samsvarer bra med oppvandring av laks i Grense Jakobselv.

På Svalbard ble atlantisk laks detektert i kun ett prøvetakingsreplikant fra Torskevannet, i to tekniske replikater. Det er de senere årene registrert atlantisk laks i fjordene på Svalbard. Hovedmengden av atlantisk laks er registrert på høsten fra september og utover. Det er ikke registrert at atlantisk laks vandrer opp i elvesystemene på Svalbard.

### 3.5.3 Ørret

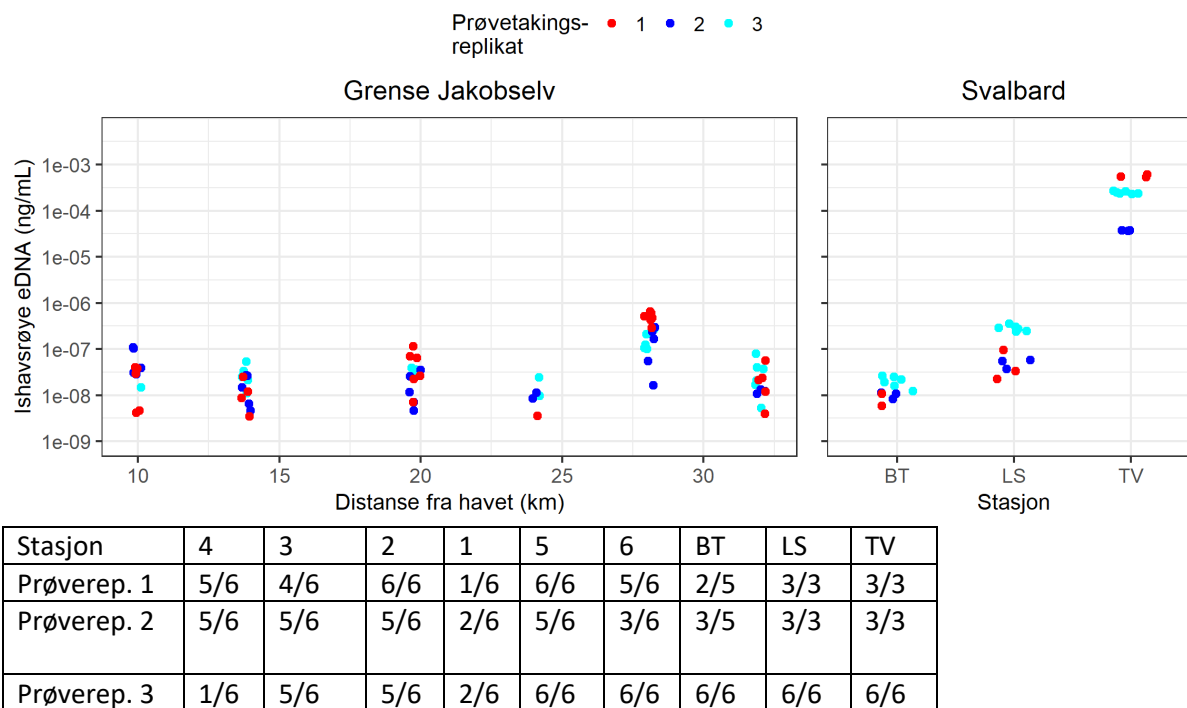


**Figur 16.** Konsentrasjon av miljø-DNA fra ørret per milliliter filtrert vannprøve fra seks stasjoner i Grense Jakobselv, Finnmark, og tre innsjøer på Svalbard (TV = Torskevannet, BT = Bretjørna, LS = Lovènsjøen), prøvetatt 18.08.2021 (Grense Jakobselv) og 10-15.09.21 (Svalbard). Stasjonene i Grense Jakobselv er plassert i rekkefølge fra nederst til øverst i elva. Merk logaritmisk skala på y-aksen.

I Grense Jakobselv ble ørret detektert ved alle stasjoner, i alle replikater (**Figur 16**). Det var en tendens til synkende konsentrasjon oppover i elva (stigningstall  $-0.05$ , korrelasjonskoeffisient  $0.6$ ,  $p$ -verdi =  $0.05$ ). Det er registrert ørret i hele vassdraget. Det er ingen informasjon om tettheten av ørret i de ulike delene av vassdraget.

På Svalbard ble ørret detektert i Torskevannet (alle prøvetakingsreplikater) og i Lovénvatn (to av tre prøvetakingsreplikater), men ikke i noen replikater fra Bretjørna (**Figur 16**). Dette er overraskende resultater da det tidligere kun er én kjent observasjon av sjøørret på Svalbard. Dette var i Linnévatn i 2019. Man kan derfor ikke utelukke at sjøørret kan sporadisk finnes i elver på Svalbard, men dette er svært uvanlig. Vi har videre validert resultatene ved å analysere feltblank fra Svalbard og ekstraksjonsblank og begge var negative for ørret, så det er usannsynlig at dette resultatet skyldes krysskontaminering, men det kan likevel ikke utelukkes. For å utelukke krysskontaminering under qPCR-kjøring, ble assayet for ørret kjørt på nytt med kun Svalbard-prøver på platen, med samme resultat. Videre var konsentrasjonene i Torskevannet på samme nivå som i prøvene fra Grense Jakobselv, noe som taler imot krysskontaminering under feltarbeid eller ekstraksjon, da man ville forvente lavere konsentrasjoner i den kontaminerte prøven. Deteksjonsassayet som brukes er tidligere publisert av Carim et al. (2016) og det er derfor ikke evaluert i henhold til Thalingers skala i dette prosjektet. For å videre verifisere resultatene har vi testet assayet *in vitro* mot pukkellaks og røye, da dette ikke er gjort i den opprinnelige publikasjonen. Vi fant ingen kryssamplifisering mot noen av artene. Vi finner ingen åpenbare grunner til å ikke feste lit ved disse resultatene og anbefaler videre prøvetaking i Torskevannet for å bekrefte eller avkrefte tilstedeværelsen av ørret.

## 3.5.4 Røye



**Figur 17.** Konsentrasjon av miljø-DNA fra røye per milliliter filtrert vannprøve fra seks stasjoner i Grense Jakobselv, Finnmark, og tre elver på Svalbard (TV = Torskevannet, BT = Bretjørna, LS = Lovønsjøen), prøvetatt 18.08.2021 (Grense Jakobselv) og 10-15.09.21 (Svalbard). Hvert prøvetakingsreplikant ble først kjørt i 3 tekniske replikater, og hvis noen av disse var negative ble 2 eller 3 nye tekniske replikater kjørt, avhengig av hvor mye materiale som var tilgjengelig. Merk logaritmisk skala på y-aksen. Tabellen angir i hvor mange tekniske replikater av røye som ble amplifisert fra hver av prøvetakingsreplikantene.

I Grense Jakobselv ble røye detektert i alle prøvetakingsreplikater fra alle stasjoner, men i varierende antall tekniske replikater (**Figur 17**). Mest usikker deteksjon var fra stasjonen midt i elva (ca. 24 km fra munningen), hvor røye kun ble amplifisert i 1-2 av 6 tekniske replikater fra hver av prøvetakingsreplikantene. Det var ingen sammenheng mellom konsentrasjon av miljø-DNA fra røye og distanse til munningen av Grense Jakobselv. Det er både anadrom og stasjonær røye i Grense Jakobselv. Det er ikke gjennomført registreringer av tettheter av anadrom og stasjonær røye i vassdraget så det finnes lite informasjon om tetthet av røye på de ulike elvestrekningene.

På Svalbard var det betydelig høyere nivåer i Torskevannet på Nordaustlandet enn i Lovønsjøen og Bretjørna på Spitsbergen. Røyebestanden i de tre innsjøene på Svalbard består både av stasjonær røye og av anadrom røye. Torskevannet har en god bestand av storvokst sjørøye.

## 4 Konklusjon

I denne rapporten har vi presentert resultater fra et prosjekt som hadde som mål å *utvikle og teste ut et system for bruk av miljø-DNA som supplerende verktøy i overvåkning og kartlegging av fremmed ferskvannsfisk 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.

### 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 prosjektets to siste år ble validert i henhold til Thalingers valideringsskala (Thalinger et al. 2021). Deteksjonssystemene for pukkellaks, gjedde, suter og solabbor ble validert til nivå 4 (Engesmo et al. 2020, 2021) og vurderes alle som egnede for fremtidig bruk i forvaltningsøyemed. I 2021 ble det utviklet nye deteksjonssystemer for sørv (validert til nivå 3) og ørekyt (tentativt validert til nivå 4).

Alle andre molekylære deteksjonssystemer for fremmed ferskvannsfisk som er brukt tidligere i dette prosjektet er ikke vurdert i henhold til Thalinger's valideringsskala og vi har her ikke evaluert spesifisiteten på disse. Dette gjelder oppgitte markører for regnbueørret, abbor, karpe, karuss, bekkerøye, mort, ørret, atlantisk laks og røye. Men det er blitt utført ekstra spesifisitetstesting for deteksjonssystemene mot laksefiskene (ørret, atlantisk laks og røye) uten at dette har avdekket spesifisitetsproblematikk.

### 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 tidligere i dette prosjektet (Engesmo et al. 2020, 2021) 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.

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 6**), dette stemmer godt overens 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-reagensene, 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.

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

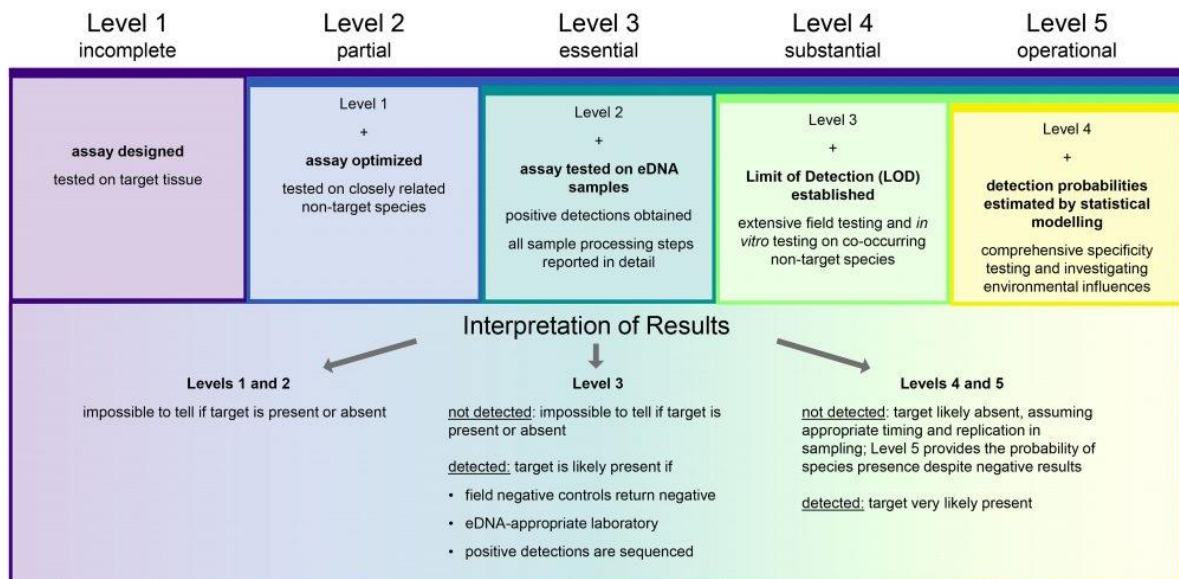
### Lab-arbeid:

- 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 % klørløsning etterfulgt av EtOH.
- Negative kontroller i qPCR-oppsettet skal inkluderes. Dette gjøres ved å bruke dH<sub>2</sub>O 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.

## 4.2 Viktige hensyn artsspesifisitet



**Figur 18.** Valideringsskala for molekylære deteksjonssystemer. Figur hentet fra edna-validation.com og studiet av Thalinger et al. (2021).

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 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 systemets deteksjonsgrense (LOD) og oppgitt hvordan denne grensen 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 spesifitetstesting 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.

## 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.
- 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.
- Atkinson S, Carlsson JEL, Ball B, Egan D, Kelly-Quinn M, Whelan K, Carlsson J. 2018. A quantitative PCR-based environmental DNA assay for detecting Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 28(5): p. 1238-1243.
- 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.
- Carim, K. J., T. M. Wilcox, M. Anderson, D. J. Lawrence, M. K. Young, K. S. McKelvey, and M. K. Schwartz. 2016. 'An environmental DNA marker for detecting nonnative brown trout (*Salmo trutta*)', *Conservation Genetics Resources*, 8: 259-61.
- 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.
- 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.
- Engesmo A, Kistenich S, Knudsen SW, Christensen G, Hesselsoe M, Anglès d'Auriac MB (2021). Overvåking og kartlegging av fremmed ferskvannsfisk og vasspest ved bruk av miljø-DNA. Norwegian Environment Agency Report M-2028, 37 pp.
- Fiskekart for Vestfold. 1994. Fylkesmannen i Vestfold, Miljøvernavdelingen.
- Fiskekart for Østfold, 2011. Fylkesmannen i Østfold.



- Greenwell, B.M. (2017): pdp: An R package for constructing partial dependence plots. *The R Journal*, 9(1):421--436.
- 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.
- Katoh, K. & K. Toh (2010): Parallelization of the MAFFT multiple sequence alignment program. *Bioinformatics* 26, 1899–1900.
- Kearse, M., R. Moir, A. Wilson, S. Stones-Havas, M. Cheung, S. Sturrock, S. Buxton, A. Cooper, S. Markowitz, C. Duran, T. Thierer, B. Ashton, P. Mentjies & A. Drummond (2012): Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647-1649.
- 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 overvågning 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>
- Koressaar, T. & M. Remm (2007): Enhancements and modifications of primer design program Primer3. *Bioinformatics* 23:1289–1291.
- 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.
- Mirimin L, Hickey A, Barrett D, DeFaoite F, Boschetti S, Venkatesh S, Graham CT (2020). Environmental DNA detection of Arctic char (*Salvelinus alpinus*) in Irish lakes: Development and application of a species-specific molecular assay. *Environmental DNA*, 2(2): p. 221-233.
- 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.

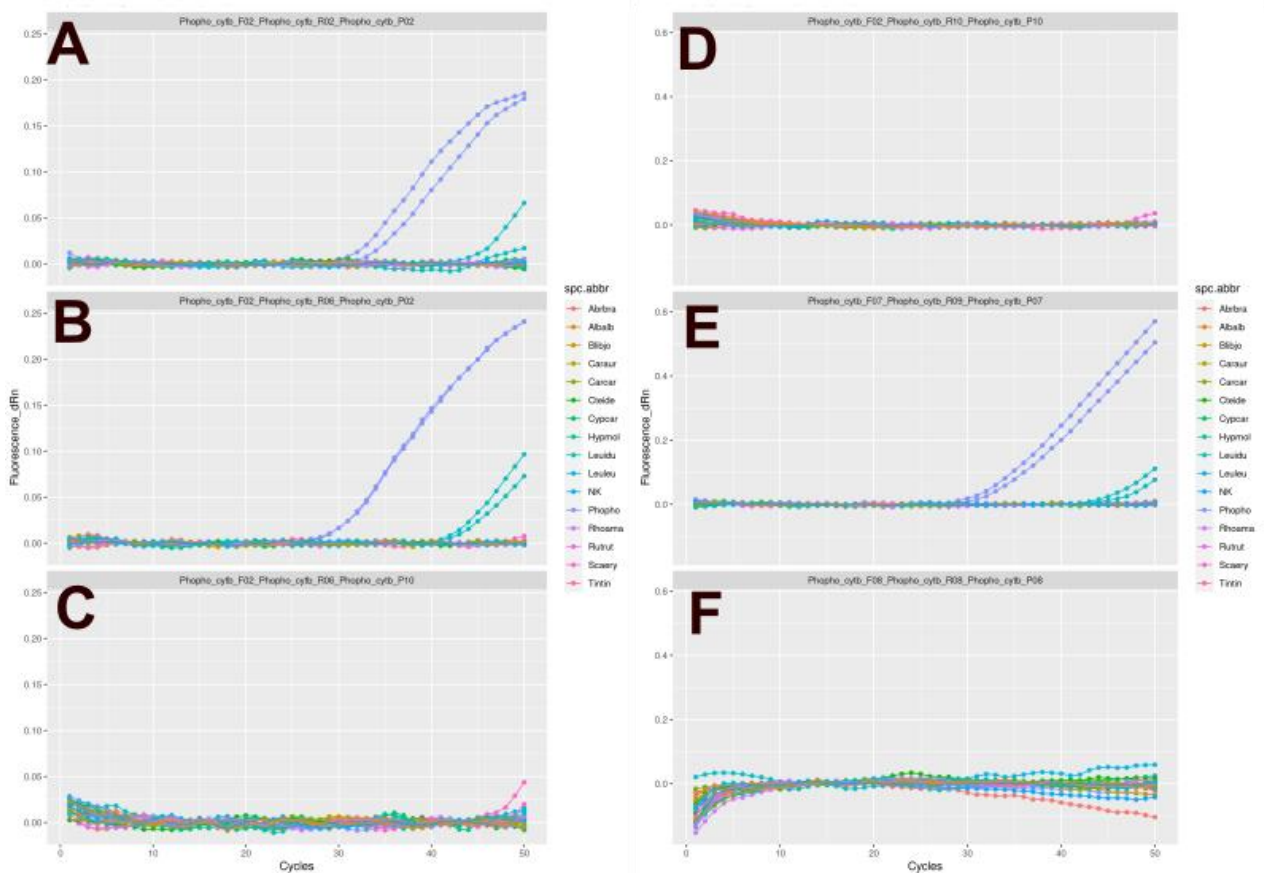
- Pilliod DS, Goldberg CS, Arkle RS, Waits LP (2013). Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 70: 1123-30.
- R Core Team (2020): R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- 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
- Wickham, H. (2016): *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York, 2016.
- Wickham, H. & J. Bryan (2017): *readxl: Read Excel Files*. R package version 1.0.0. <https://CRAN.R-project.org/package=readxl>.
- 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>
- Ye, J., G. Coulouris, I. Zaretskaya, I. Cutcutache, S. Rozen & T.L. Madden (2012): Primer- BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13:134
- Zhou J., Bruns, MA., Tiedje JM. (1996). DNA recovery from soils of diverse composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 (2) 316-322

## Vedlegg A. Ekstra informasjon fra utviklingen av nye deteksjonssystemer

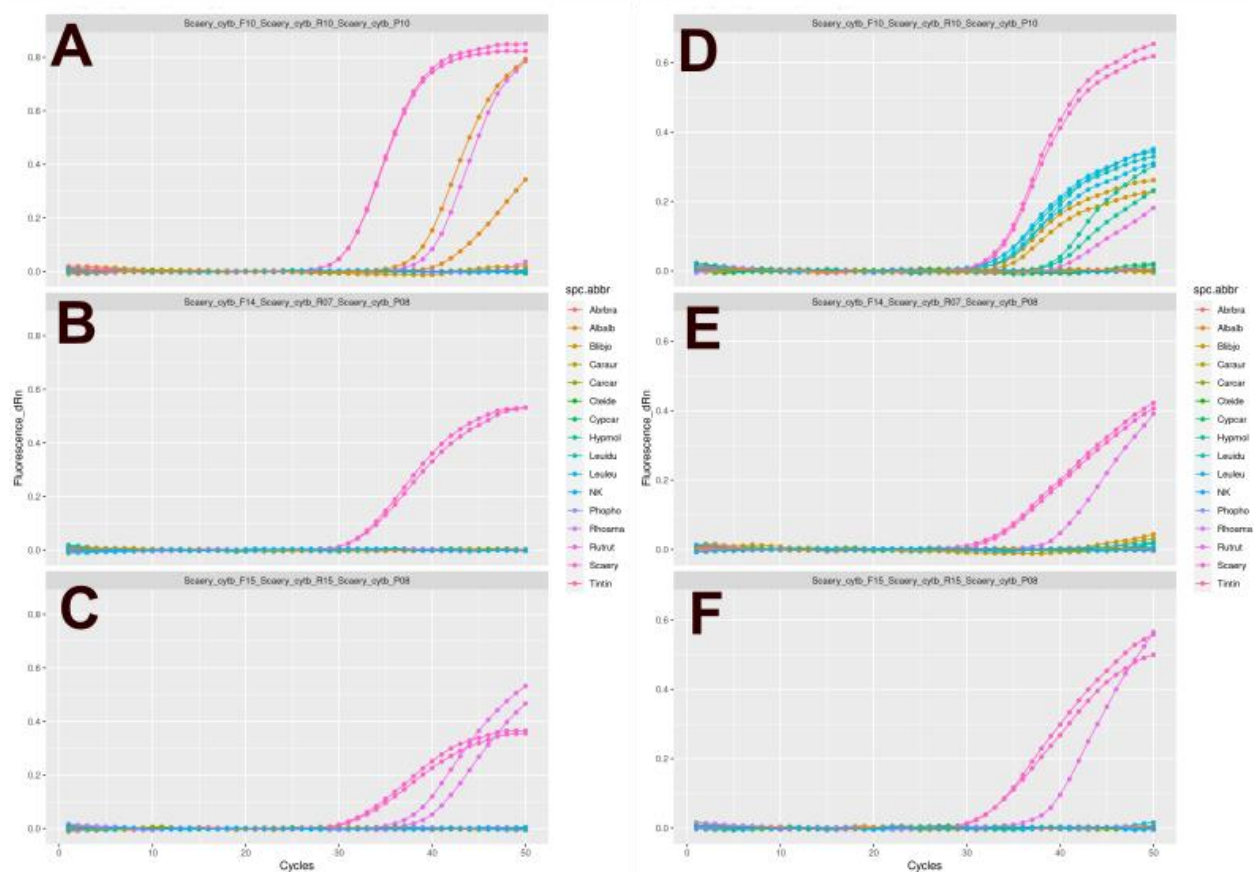
Primer og probe sekvenser designet *in silico* og brukt til PCR test av spesifisitet. Oligonukleotider for ørekyt (*Phoxinus phoxinus*) er navngitt 'Phopho' og oligonukleotider for sørv (*Scardinius erythrophthalmus*) er navngitt 'Scaery'.

Oligo:	Sekvens (5' -> 3'):
Phopho_cytb_F01	5'-CCC GCT GGC TTA AAC TCA GA-3'
Phopho_cytb_F02	5'-GCA CTC GTT GAC CTC CCT AC-3'
Phopho_cytb_F06	5'-TTT GTG GGC TAC GTC CTT CC-3'
Phopho_cytb_F07	5'-CGT CAC CCC ACC CCA TAT TC-3'
Phopho_cytb_F08	5'-GGC ATA CCC GTA GAA CAC CC-3'
Phopho_cytb_F09	5'-CCT TCC GCC CAT TAA CCC AA-3'
Phopho_cytb_F10	5'-CCT TCC CTG AGG CCA AAT GT-3'
Phopho_cytb_P02	5'-FAM-ACA CGC CAA CGG AGC ATC TTT CTT CTT-BHQ1-3'
Phopho_cytb_P07	5'-FAM-TGC CTA TGC TAT CTT ACG GTC TAT CCC-BHQ1-3'
Phopho_cytb_P08	5'-FAM-TGG CCA AGT AGC ATC AAT TTT ATA CTT TGC A-BHQ1-3'
Phopho_cytb_P10	5'-FAM-ACA AAC TTA TTG TCA GCA GTC CCC TAC A-BHQ1-3'
Phopho_cytb_R02	5'-GGA AGG ACG TAG CCC ACA AA-3'
Phopho_cytb_R04	5'-GAA TAT GGG GTG GGG TGA CG-3'
Phopho_cytb_R06	5'-GAG AAG CCG CCT CAG ATT CA-3'
Phopho_cytb_R07	5'-GGA CGC CTC CCA ACT TGT TA-3'
Phopho_cytb_R08	5'-CAG CGG TGT AAG GAC GAG AA-3'
Phopho_cytb_R09	5'-GGG TGT TCT ACG GGT ATG CC-3'
Phopho_cytb_R10	5'-AGC CGC CTC AGA TTC ATT GA-3'
Scaery_cytb_F06	5'-TCC TCT CAG CAG TCC CCT AC-3'
Scaery_cytb_F07	5'-CAC TTC CTC CTG CCA TTC GT-3'
Scaery_cytb_F08	5'-AAC GCG ACC CTA ACA CGA TT-3'
Scaery_cytb_F09	5'-GCA CTA GTC GAC CTC CCA AC-3'
Scaery_cytb_F10	5'-GCC TAT GCC ATC CTC CGA TC-3'
Scaery_cytb_F14	5'-TCG CAT TCC ACT TCC TCC TG-3'
Scaery_cytb_F15	5'-ACT TCC TCC TGC CAT TCG TC-3'
Scaery_cytb_P06	5'-FAM-CTC AGT AGA CAA CGC GAC CCT AAC ACG-BHQ1-3'
Scaery_cytb_P08	5'-FAM-TAC ACG AAA CAG GAT CGA ACA ACC CGG-BHQ1-3'
Scaery_cytb_P09	5'-FAM-ATT CTT CGC ATT CCA CTT CCT CCT GCC-BHQ1-3'
Scaery_cytb_P10	5'-FAM-TCA AAG CAG CGA GGA CTA ACT TTC CGC-BHQ1-3'
Scaery_cytb_R06	5'-ACG AAT GGC AGG AGG AAG TG-3'
Scaery_cytb_R07	5'-AAG CTG TAA GGG CAA GCA GT-3'
Scaery_cytb_R08	5'-GAG TGG GTT TGC TGG GGT AA-3'

<b>Scaery_cytb_R09</b>	5'-CGA GAA GTA CGG GTG GAA GG-3'
<b>Scaery_cytb_R10</b>	5'-AAG ATG GAT GCG ACC TGA CC-3'
<b>Scaery_cytb_R13</b>	5'-TCA GAG GTG TAG TGC ATG GC-3'
<b>Scaery_cytb_R15</b>	5'-CCA AAG CTG TAA GGG CAA GC-3'



Amplifikasjonsplot fra qPCR med test av nye ørekyt primere og prober. Kombinasjonen av primerne: Phopho\_cytb\_F07' og 'Phopho\_cytb\_R09' med proben Phopho\_cytb\_P07 (plot E) gir spesifikk amplifikasjon for ørekyt i 40 amplifikasjonssykluser. Det samme gjelder kombinasjonen av Phopho\_cytb\_F02, Phopho\_cytb\_R02 med proben Phopho\_cytb\_P02 (plot A) og Phopho\_cytb\_F02, Phopho\_cytb\_R06 med proben Phopho\_cytb\_P02 (plot B). Forkortelser for artene er gitt i **Tabell 4**.



Amplifikasjonsplot fra qPCR med test av nye sørv primere og prober. Kombinasjonen av Scaery\_cytb\_F14 og Scaery\_cytb\_R07, samt proben Scaery\_cytb\_P08 (plot B) gir spesifikk amplifikasjon for sørv opp til 50 amplifikasjonssykluser. Forkortelser for artene er gitt i **Tabell 4**.

## 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

Økernveien 94 • 0579 Oslo  
Telefon: 02348 • Faks: 22 18 52 00  
[www.niva.no](http://www.niva.no) • [post@niva.no](mailto:post@niva.no)