

Analysen av miljø-DNA fra Tanavassdraget for påvisning av pukcellaks

På oppdrag fra Fylkesmannen i Troms og Finnmark

Frode Fossøy, Hege Brandsegg, Rolf Sivertsgård

Trondheim 01.03.2020

UPUBLISERT

TILGJENGELIGHET
Åpen

PROSJEKTLEDER
Frode Fossøy

ANSVARLIG FORSKNINGSSJEF
Ingeborg Palm Helland

OPPDRAGSGIVER(E)/BIDRAGSYTER(E)
Fylkesmannen i Troms og Finnmark

OPPDRAGSGIVERS REFERANSE

KONTAKTPERSON(ER) HOS OPPDRAGSGIVER/BIDRAGSYTER
Eirik Frøiland

Innhold

1 Innledning.....	3
1.1 Bakgrunn.....	3
1.2 Formål.....	3
2 Material og metode.....	4
2.1 Prøvetaking.....	4
2.2 Labanalyser	4
3 Resultater og diskusjon.....	5
4 Litteratur	8

1 Innledning

1.1 Bakgrunn

Analysen av miljø-DNA er en ny metode for overvåking av arter og økosystemer der innsamling av prøver ikke er avhengig av langvarig innsats eller taksonomisk ekspertise i felt (Thomsen & Willerslev 2015, Valentini mfl. 2016). Denne metoden har vist seg å være svært effektiv med tanke på overvåking av truede arter samtidig som den muliggjør innsamling av prøver ved hjelp av publikum (Thomsen mfl. 2012b, Biggs mfl. 2015).

Miljø-DNA kan tilby en mer objektiv metode for overvåking av økosystemer der innsamling av prøver ikke er avhengig av langvarig innsats eller taksonomisk ekspertise i felt, og ikke vil være til skade for miljøet eller lokale arter. Metoden drar nytte av at alle organismer frigir DNA til omgivelsene sine. Dette er det dermed mulig å samle inn ved filtrering av vannprøver. Med arts-spesifikke genetiske markører er det mulig å påvise tilstedeværelsen av en enkelt art eller hele taksonomiske grupper. Da DNA brytes ned raskt i naturen, vil en påvisning av en eller flere arter indikere en stor sannsynlighet for at denne eller disse finnes på den undersøkte lokaliteten eller har vært i området innenfor en relativ kort periode. Metoden er svært sensitiv og det trengs i prinsippet kun en enkelt DNA-kopi for arten som ønskes undersøkt, for å kunne påvise tilstedeværelsen av denne. Derfor har metoden frem til nå primært vært brukt til å finne sjeldne arter (Thomsen mfl. 2012b) og/eller uønskete fremmede arter (Balasingham mfl. 2017). Sammenligning med konvensjonelle metoder har vist at miljø-DNA-metoden er mer sensitiv og finner flere arter (Thomsen mfl. 2012a).

NINA har i løpet av de siste årene utviklet både prøvetakingsutstyr og molekylære verktøy for analyser av miljø-DNA og har verifisert protokoller for mange akvatiske organismer (Fossøy mfl. 2017, Taugbøl mfl. 2017, Fossøy mfl. 2018, Taugbøl mfl. 2018, Fossøy mfl. 2019, Wacker mfl. 2019), deriblant pukkellaks (*Oncorhynchus gorbuscha*) (Gargan mfl. 2019).

1.2 Formål

NINA har på bestilling av Fylkesmannen i Troms og Finnmark undersøkt tilstedeværelse av pukkellaks i Tanavassdraget.

2 Material og metode

2.1 Prøvetaking

Miljø-DNA-prøver ble samlet inn fra totalt 19 lokaliteter og sideelver til Tana samt en lokalitet fra elva Komag, som en positiv kontroll, i august 2019 (**Tabell 1**). Prøvene ble samlet inn av Natural Resources Institute Finland (LUKE). To parallellprøver ble innsamlet på hver lokalitet. Fem eller 10 liter vann ble filtrert gjennom et 2.0 µm glassfiberfilter (Merck Millipore) ved hjelp av en batteridrevet peristaltisk pumpe (Bürkle Vampire). Filtrene ble lagret i ATL-buffer (Qiagen) frem til videre analyser i lab.

Tabell 1. Oversikt over lokaliteter prøvetatt for påvisning av pukkellaks i dette studiet.

Lokalitet	Lengde-grad	Bredde-grad	Dato
Utsjoki	501789	7755708	12.08.2019
Veahcajohka	512038	7761579	12.08.2019
Galddasjohka	537247	7764465	12.08.2019
Buolbmatjohka	539723	7758193	12.08.2019
Luovtejohka	545272	7793787	13.08.2019
Golggotjohka	544066	7806403	13.08.2019
Maskejohka			13.08.2019
Laksejohka	521020	7773196	13.08.2019
Kuoppilasjoki	489182	7759592	13.08.2019
Nilijoki	469322	7739471	13.08.2019
Inarijoki, lower part	454006	7697416	13.08.2019
Karasjohka, upper part	427160	7699824	13.08.2019
Lesjohka	425848	7703388	13.08.2019
Karasjohka, lower part	441508	7707458	13.08.2019
Leavvajohka	479177	7759040	14.08.2019
Baisjohka	467980	7739753	14.08.2019
Valjohka	450611	7732154	14.08.2019
Akujoki	459591	7720052	14.08.2019
Inarijoki, mid part	447534	7649191	14.08.2019
Komag			

2.2 Labanalyser

DNA ble isolert fra filterprøvene ved hjelp av en NucleoSpin Plant II (Machery-Nagel) protokoll. En arts-spesifikk markør for pukkellaks (Gargan mfl. 2019) ble analysert ved bruk av qPCR. En qPCR-analyse oppformerer en liten bit av DNA bestemt av den genetiske markøren man bruker ved hjelp av et varmesensitivt enzym og en maskin som justerer temperaturen opp og ned i mange repeterte sykler. En prøve regnes som positiv dersom man ser en klar økning av DNA-konsentrasjonen målt ved hjelp av fluorescens under PCR-analysen. Alle prøver ble kjørt i triplikater, sammen med en positiv kontroll av pukkellaks-DNA og negative kontrollprøver. For å kunne karakterisere en prøve som positiv i en qPCR-analyse forventer vi at minst to av tre replikater skal være positive.

3 Resultater og diskusjon

Pukkellaks ble påvist i Maskejohka, to lokaliteter i Inarijoki, to lokaliteter i Karasjohka samt Leavvajohka i Tanavassdraget i tillegg til Komagelva (**Tabell 2**). I tillegg ble 1 av 3 PCR-replikater positive for Utsjoki, Veahcajohka, Luovtejohka og Valjohka. Vi forventer altså at minst 2 av 3 PCR-replikater skal være positive før vi karakteriserer en prøve som positiv. Falske positive resultater kan forekomme i miljø-DNA-analyser, og vi prøver å unngå disse ved å sette strenge kriterier. Men det er mulig at noen av disse prøvene har svært lave konsentrasjoner av pukkellaks, som ligger under deteksjonsgrensen vår for miljø-DNA. At en art *ikke* blir påvist selv om den finnes i lokaliteten kan skyldes flere årsaker, som for eksempel vannkvalitet i lokaliteten, temperatur, tetthet av arten, prøvevolumet som ble innsamlet samt behandling og analysering av prøven på lab. En negativ miljø-DNA-prøve bør derfor ikke sees på som et endelig bevis for arten ikke finnes i lokaliteten.

Tabell 2. Resultater fra qPCR-analyser av vannprøvene. Alle prøvene ble kjørt i triplikater, og en prøve ble karakterisert som positiv når minst to av triplikatene var positive.

Løpenummer	Lokalitet	Vanntemperatur (C)	Vannvolum (L)	Antall PCR-replikater	Antall positive PCR-replikater	Ct Mean	Ct SD	Resultat
1	Utsjoki	12.1	5	3	0			Negativ
2	Utsjoki	12.1	5	3	1	38.96815		Negativ
3	Veahcajohka	11.0	5	3	0			Negativ
4	Veahcajohka	11.0	5	3	1	38.33741		Negativ
5	Galddasjohka	10.7	5	3	1	40.09626		Negativ
6	Galddasjohka	10.7	5	3	0			Negativ
7	Buolbmatjohka	11.2	4	3	0			Negativ
8	Buolbmatjohka	11.2	5	3	0			Negativ
9	Luovtejohka	9.3	5	3	1	40.02055		Negativ
10	Luovtejohka	9.3	5	3	0			Negativ
11	Golggotjohka	13.8	3.5	3	0			Negativ
12	Golggotjohka	13.8	3.5	3	0			Negativ
13	Maskejohka	10.1	5	3	3	31.15555	0.193005	Positiv
14	Maskejohka	10.1	5	3	3	31.65103	0.156455	Positiv
15	Laksejohka	10.3	5	3	0			Negativ
16	Laksejohka	10.3	5	3	0			Negativ
17	Kuoppilasjoki	10.0	5	3	0			Negativ
18	Kuoppilasjoki	10.0	5	3	0			Negativ
19	Nilijoki	10.7	5	3	0			Negativ
20	Nilijoki	10.7	5	3	0			Negativ
21	Inarijoki, lower part	12.2	5	3	3	36.94717	0.672589	Positiv
22	Inarijoki, lower part	12.2	5	3	3	34.57631	0.576056	Positiv
23	Karasjohka, upper part	12.3	4	3	1	39.02934		Negativ
24	Karasjohka, upper part	12.3	5	3	3	37.37657	0.636692	Positiv

25	lesjohka	12.5	5	3	0			Negativ
26	lesjohka	12.5	40.0206	3	0			Negativ
27	Karasjohka, lower part	12.8	5	3	3	36.94016	0.738545	Positiv
28	Karasjohka, lower part	12.8	5	3	3	38.16487	1.182103	Positiv
29	Leavvajohka	8.6	5	3	2	39.42774	0.735049	Positiv
30	Leavvajohka	8.6	5	3	0			Negativ
31	Baisjohka	10.0	5	3	0			Negativ
32	Baisjohka	10.0	5	3	0			Negativ
33	Valjohka	12.0	5	3	1	39.66672		Negativ
34	Valjohka	12.0	5	3	0			Negativ
35	Akujoki	10.0	5	3	0			Negativ
36	Akujoki	10.0	5	3	0			Negativ
37	Inarijoki, mid part	12.7	5	3	2	39.14099	0.47342	Positiv
38	Inarijoki, mid part	12.7	5	3	0			Negativ
K1	Komag	10.9	5	3	3	28.03685	0.152868	Positiv
K2	Komag	10.9	5	3	3	27.46639	0.151056	Positiv
K3	Komag	10.9	5	3	3	28.3416	0.369065	Positiv
K4	Komag	10.9	5	3	3	28.26538	0.113821	Positiv

4 Takksigelser

Dette prosjektet ble delfinansiert av prosjektet Tana river Interreg (Interreg Nord).

5 Litteratur

- Balasingham, KD, Walter, RP, Mandrak, NE & Heath, Daniel D. 2017. Environmental DNA detection of rare and invasive fish species in two Great Lakes tributaries. *Molecular Ecology* 27(1): 112-127.
- Biggs, J, Ewald, N, Valentini, A, Gaboriaud, C, Dejean, T, Griffiths, RA, Foster, J, Wilkinson, JW, Arnell, A, Brotherton, P, Williams, P & Dunn, F. 2015. Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation* 183(0): 19-28.
- Fossøy, F, Dahle, S, Eriksen, LB, Spets, MH, Karlsson, S & Hesthagen, T. 2017. Bruk av miljø-DNA for overvåking av fremmede fiskearter - utvikling av artsspesifikke markører for gjedde, mort og ørekyt. Norsk institutt for naturforskning. NINA Rapport 1299.
- Fossøy, F, Thaulow, J, Anglès d'Auriac, M, Brandsegg, H, Sivertsgård, R, Mo, TA, Sandlund, OT & T., H. 2018. Bruk av miljø-DNA som supplerende verktøy for overvåking og kartlegging av fremmed ferskvannsfisk. Norsk institutt for naturforskning. NINA Rapport 1586.
- Fossøy, F, Brandsegg, H, Sivertsgård, R, Pettersen, O, Sandercock, BK, Solem, Ø, Hindar, K & Mo, TA. 2019. Monitoring presence and abundance of two gyrodactylid ectoparasites and their salmonid hosts using environmental DNA. *Environmental DNA* in press.
- Gargan, LM, Fossøy, F, Mo, TA, Carlsson, JEL, Ball, B & Carlsson, J. 2019. Environmental (e)DNA detection of the invasive pink salmon *Oncorhynchus gorbuscha* during the 2017 Norwegian invasion. *BioRxiv*: 651554.
- Taugbøl, A, Dervo, BK, Bærum, KM, Brandsegg, H, Sivertsgård, R, Ytrehus, B, Miller, A & Fossøy, F. 2017. Første påvisning av den patogene soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) i Norge - Bruk av miljø-DNA for påvisning av fremmede arter. Norsk institutt for naturforskning NINA Rapport 1399: 25.
- Taugbøl, A, Dervo, BK, Sivertsgård, R, Brandsegg, H & Fossøy, F. 2018. Bruk av miljø-DNA til overvåking av små- og storsalamander. Norsk institutt for naturforskning NINA-Rapport 1476.
- Thomsen, PF, Kielgast, J, Iversen, LL, Møller, PR, Rasmussen, M & Willerslev, E. 2012a. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS ONE* 7(8): e41732.
- Thomsen, PF, Kielgast, JOS, Iversen, LL, Wiuf, C, Rasmussen, M, Gilbert, MTP, Orlando, L & Willerslev, E. 2012b. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology* 21(11): 2565-2573.
- Thomsen, PF & Willerslev, E. 2015. Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation* 183(0): 4-18.
- Valentini, A, Taberlet, P, Miaud, C, Civade, R, Herder, J, Thomsen, PF, Bellemain, E, Besnard, A, Coissac, E, Boyer, F, Gaboriaud, C, Jean, P, Poulet, N, Roset, N, Copp, GH, Geniez, P, Pont, D, Argillier, C, Baudoin, J-M, Peroux, T, Crivelli, AJ, Olivier, A, Acqueberge, M, Le Brun, M, Møller, PR, Willerslev, E & Dejean, T. 2016. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 25(4): 929-942.
- Wacker, S, Fossøy, F, Larsen, BM, Brandsegg, H, Sivertsgård, R & Karlsson, S. 2019. Downstream transport and seasonal variation in freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) eDNA concentration. *Environmental DNA*(10.1002/edn3.10).

Norsk institutt for naturforskning

NINA Hovedkontor

Postadresse: Postboks 5685 Torgarden, 7485 Trondheim

Besøks-/leveringsadresse: Høgskoleringen 9, 7034 Trondheim

Telefon: 73 80 14 00, Telefaks: 73 80 14 01

E-post: firmapost@nina.no

Organisasjonsnummer 9500 37 687

<http://www.nina.no>



Samarbeid og kunnskap for framtidens miljøløsninger