

Bruk av miljø-DNA som supplerende verktøy for overvåkning og kartlegging av fremmed ferskvannsfisk

Frode Fossøy, Jens Thaulow, Marc Anglès d'Auriac, Hege Brandsegg, Rolf Sivertsgård, Tor Atle Mo, Odd Terje Sandlund, Trygve Hesthagen



NINAs publikasjoner

NINA Rapport

Dette er NINAs ordinære rapportering til oppdragsgiver etter gjennomført forsknings-, overvåkings- eller utredningsarbeid. I tillegg vil serien favne mye av instituttets øvrige rapportering, for eksempel fra seminarer og konferanser, resultater av eget forsknings- og utredningsarbeid og litteraturstudier. NINA Rapport kan også utgis på annet språk når det er hensiktsmessig..

NINA Temahefte

Som navnet angir behandler temaheftene spesielle emner. Heftene utarbeides etter behov og serien favner svært vidt; fra systematiske bestemmelsesnøkler til informasjon om viktige problemstillinger i samfunnet. NINA Temahefte gis vanligvis en populærvitenskapelig form med mer vekt på illustrasjoner enn NINA Rapport.

NINA Fakta

Faktaarkene har som mål å gjøre NINAs forskningsresultater raskt og enkelt tilgjengelig for et større publikum. Faktaarkene gir en kort framstilling av noen av våre viktigste forskningstema.

Annen publisering

I tillegg til rapporteringen i NINAs egne serier publiserer instituttets ansatte en stor del av sine vitenskapelige resultater i internasjonale journaler, populærfaglige bøker og tidsskrifter.

Bruk av miljø-DNA som supplerende verktøy for overvåkning og kartlegging av fremmed ferskvannsfisk

Frode Fossøy
Jens Thaulow
Marc Anglès d'Auriac
Hege Brandsegg
Rolf Sivertsgård
Tor Atle Mo
Odd Terje Sandlund
Trygve Hesthagen

Fossøy, F., Thaulow, J., Anglès d'Auriac, M., Brandsegg, H., Sivertsgård, R., Mo, T.A., Sandlund, O.T. & Hesthagen T. 2018. Bruk av miljø-DNA som supplerende verktøy for overvåkning og kartlegging av fremmed ferskvannsfisk. NINA Rapport 1586. Norsk institutt for naturforskning.

Trondheim, november 2018

ISSN: 1504-3312

ISBN: 978-82-426-3325-5

RETTIGHETSHAVER

© Norsk institutt for naturforskning

Publikasjonen kan siteres fritt med kildeangivelse

TILGJENGELIGHET

Åpen

PUBLISERINGSTYPE

Digitalt dokument (pdf)

KVALITETSSIKRET AV

Elisabet Forsgren

ANSVARLIG SIGNATUR

Forskningssjef Ingebrigt Uglem (sign.)

OPPDRAKSGIVER(E)/BIDRAGSYTER(E)

Miljødirektoratet

OPPDRAKSGIVERS REFERANSE

M-1238|2018

KONTAKTPERSON(ER) HOS OPPDRAGSGIVER/BIDRAGSYTER

Sunniva Aagaard og Jarle Steinkjer

FORSIDEBILDE

Bekkerøye fra Hovinbekken © Tor Atle Mo

NØKKEWORD

Ferskvannsfisk

Fremmede arter

Miljø-DNA

Artsspesifikke markører

KONTAKTOPPLYSNINGER

NINA hovedkontor

Postboks 5685 Torgarden
7485 Trondheim
Tlf: 73 80 14 00

NINA Oslo

Gaustadalléen 21
0349 Oslo
Tlf: 73 80 14 00

NINA Tromsø

Postboks 6606 Langnes
9296 Tromsø
Tlf: 77 75 04 00

NINA Lillehammer

Vormstuguvegen 40
2624 Lillehammer
Tlf: 73 80 14 00

NINA Bergen

Thormøhlensgate 55
5006 Bergen
Tlf: 73 80 14 00

www.nina.no

Sammendrag

Fossøy, F., Thaulow, J., Anglès d'Auriac, M., Brandsegg, H., Sivertsgård, R., Mo, T.A., Sandlund, O.T. & Hesthagen T. 2018. Bruk av miljø-DNA som supplerende verktøy for overvåking og kartlegging av fremmed ferskvannsfisk. NINA Rapport 1586. Norsk institutt for naturforskning.

Denne rapporten er en videreføring av miljø-DNA som metode for overvåking av fremmed ferskvannsfisk i norske elver og innsjøer. I dette studiet har vi gjort en utstrakt gjennomgang og test av eksisterende protokoller for å påvise fremmed ferskvannsfisk ved hjelp av miljø-DNA. Vi har så gjort en vurdering om miljø-DNA-prøver kan fungere som et supplerende verktøy for overvåking og kartlegging av fremmed ferskvannsfisk gjennom andre pågående prosjekter.

I vår prioriteringsliste har vi indikert at gjedde, ørekyt, pukkellaks og regnbueørret bør ansees som de viktigste fremmede artene å overvåke i Norge. Vi kan bekrefte at alle disse artene har arts-spesifikke protokoller som fungerer. I tillegg har vi testet protokoller og bekreftet at disse fungerer på vannprøver innsamlet i dette studiet for: abbor, bekkerøye, karpe, karuss, mort og solabor. En test av kryssamplifisering mellom arter viste at protokollene i dette studiet mest sannsynlig er artsspesifikke. Vi testet også protokollene for mulig PCR-inhibering, og fant til dels kraftig inhibering av flere prøver. Mengden inhibitorer vil variere mye mellom lokaliteter og årstider og vi vil anbefale å teste for inhibering ved alle miljø-DNA-analyser.

I dette studiet har vi sammenlignet to etablerte protokoller basert på ulike filtre og analyser. Protokollene inkluderer to svært ulike filtertyper med et 0.22 µm Sterivex-filter og et 2.0 µm glassfiberfilter. Dette gjør seg utslag i hvor store vannvolumer det er mulig å filtrere og i dette studiet har vi filtrert ca. 1 liter vann gjennom Sterivex-filteret og 10 liter vann gjennom glassfiberfilteret. Resultatene våre viser at det finere filteret fanger mer DNA per liter vann, men at det høye vannvolumet som er mulig med det grovere filteret fanger mer DNA totalt sett. Andre studier viser at dette kan være avgjørende for om man påviser en sjelden art eller ikke. Vi vil anbefale bruk av begge disse metodene.

I tillegg til uttesting av protokoller inkluderer denne rapporten også fortsetting av to pågående prosjekter på fremmed ferskvannsfisk. Her undersøker vi grensen for påvisning av fisk i Bymarka i Trondheim og forsetter overvåking av en potensiell spredning av gjedde i Telemarkskanalen. Eksperimentene i Bymarka viser at vi klarer å påvise 20 fisker med en lengde på 20 cm i to naturlige innsjøer, noe vi anser som svært viktig informasjon for overvåking av fremmed ferskvannsfisk. Resultatene fra Telemarkskanalen påviser for første gang gjedde oppstrøms Kjellidal sluse ved bruk av miljø-DNA.

Frode Fossøy (frode.fossoy@nina.no), Hege Brandsegg, Rolf Sivertsgård, Odd Terje Sandlund, Trygve Hesthagen - NINA, Akvatisk avdeling, Pb 5685 Torgarden, 7485 Trondheim.
Jens Thaulow - NIVA, Seksjon for pelagisk ferskvannsökologi, Gaustadalléen 21, 0349 Oslo.
Marc Anglès d'Auriac - NIVA, Seksjon for systemer og teknologi, Gaustadalléen 21, 0349 Oslo.
Tor Atle Mo - NINA Oslo, Gaustadalléen 21, 0349 Oslo.

Innhold

1 Innledning	6
2 Bruk av miljø-DNA til kartlegging og overvåking	8
2.1 Litteraturgjennomgang av gjeldende protokoller for relevante arter på bruk av miljø-DNA for deteksjon av fisk i ferskvann	8
2.1.1 Artsspesifikke markører – qPCR og ddPCR	8
2.1.2 Artsgenerelle markører – Miljø-DNA-metastrekkoding	9
2.1.3 Standardisering av felt- og labprotokoller	10
2.1.3.1 NINA prøvetaking og ddPCR-protokoll	10
2.1.3.2 NIVA prøvetaking og qPCR-protokoll	12
2.1.3.3 NINA DNA-metastrekkoding protokoll	12
2.2 Gjennomgang av relevant, eksisterende overvåking og undersøkelser/aktivitet hvor miljø-DNA vil være aktuell å bruke som supplerende verktøy	13
2.2.1 Eksisterende overvåkingsprogrammer vurdert i dette studiet	13
2.2.2 Enkeltarter og områder under spredning	14
2.3 Resultater fra uttesting av eksisterende protokoller for fremmed ferskvannsfisk	17
2.3.1 Prøveinnsamling i felt og valg av lokaliteter	17
2.3.2 Test av protokoller på innsamla vannprøver	18
2.3.3 Test av kryssamplifisering av artsspesifikke markører	22
2.3.4 Sammenligning av to etablerte protokoller	22
2.3.4.1 Analyser med ddPCR	23
2.3.4.2 Analyser med qPCR	25
2.3.5 Test av PCR-inhibering	27
2.3.5.1 Analyser med ddPCR	27
2.3.5.2 Analyser med qPCR	29
3 Uttesting av miljø-DNA som metode i Bymarka	32
3.1 Test av nedre grense for påvisning av miljø-DNA	32
3.2 Sammenligning av miljø-DNA-konsentrasjon og biomasse av fisk	35
4 Oppfølging av miljø-DNA i Telemarkskanalen 2018	37
5 Konklusjon	40
5.1 Uttesting av protokoller for overvåking av fremmed ferskvannsfisk	40
5.2 Eksperimentene i Bymarka i Trondheim	41
5.3 Spredning av gjedde i Telemarkskanalen	42
6 Referanser	43
7 Vedlegg	47

Forord

Uønsket spredning av fremmed og regionalt fremmed ferskvannsfisk er et økende problem i Norge. Gjedde blir flyttet til stadig nye vannlokaliteter i nærheten av de fleste store byene i Norge til tross for at dette er straffbart. I nærheten av Trondheim ble det påvist utsetting av abbor både i 2017 og 2018. Rundt Oslo finner man også flere lokaliteter der akvariefisk har blitt satt ut og etablert villlevende bestander. En tidlig påvisning av slike utsetninger er ofte nødvendig for å kunne gjøre raske tiltak og fjerne disse artene fra de nye lokalitetene før de gjør varig skade på økosystemet og sprer seg videre.

Miljø-DNA er en ny metode og et nytt virkemiddel for å kunne overvåke vannmiljøer på en rask og enkel måte. Noen få vannprøver er ofte tilstrekkelig for å kunne påvise uønskete arter i en ny lokalitet. I denne rapporten har vi på oppdrag fra Miljødirektoratet testet publiserte protokoller for en rekke fremmede ferskvannsfisk i Norge. Med dette studiet kan vi presentere en utvidet artsliste der vannprøver og miljø-DNA-analyser kan brukes til påvisning, og denne kunnskapen vil være et viktig ledd for overvåking og forvaltning av fremmede fiskearter i norske vannmiljøer.

En stor takk rettes til Miljødirektoratet og spesielt Sunniva Aagaard og Jarle Steinkjer for tilrettelegging og oppfølging av miljø-DNA-prosjekter på fremmede ferskvannsfisk over flere år. I tillegg vil vi takke Hege Sangolt og Steinar Sandøy for konstruktive innspill på prosjektmøtene.

Mange personer har bidratt med vesentlig informasjon til dette prosjektet og vi vil takke Bjørn Walseng (NINA) for informasjon rundt valg av lokaliteter i Tvedestrand og Arendal og Laila Saks-gård (NINA) for hjelp med å fremskaffe referanseprøver av fremmede fiskearter. Steen Wilhelm Knudsen (NIVA Danmark), Lars Magnus Wulf Jacobsen (Danmarks Tekniske Universitet, DTU Aqua) og Clint Muhlfeld (United States Geological Survey) takkes for raske leveranser av vevsprøver av fiskearter til bruk som referanseprøver.

I denne rapporten inkluderer vi også resultater og diskusjon fra to pågående miljø-DNA-prosjekter tilknyttet Bymarka i Trondheim og fiskesperra i Telemarkskanalen. Vi vil takke Terje Nøst (Trondheim kommune) og TOFA for tilrettelegging av utsetting av fisk i Bymarka, og Magdalene Langset (NINA) for stor innsats i felt.

Dette prosjektet har vært utført som et tett samarbeid mellom NINA og NIVA, og prosjektleder vil til slutt rette en stor takk til sine kollegaer i NIVA for et produktivt samarbeid og mange morsomme prosjektmøter undervegs.

2. desember, Trondheim

Frode Fossøy
Prosjektleder

1 Innledning

Spredning av fremmede fiskearter i ferskvann øker stadig i mange land og regnes som et alvorlig miljøproblem (Sala mfl. 2000, Cucherousset & Olden 2011, Clavero & Villero 2014). Potensielt negative konsekvenser på stedeegne arter skjer gjennom konkurranse, predasjon, hybridisering, spredning av parasitter og ødeleggelse eller forringelse av leveområder (Gozlan 2009, Britton mfl. 2010, Gozlan mfl. 2010, Hesthagen mfl. 2015). I Norge har det også vært en omfattende spredning og introduksjon av ferskvannsfisk (Kleiven & Hesthagen 2012, Hesthagen & Sandlund 2016, Hesthagen & Sandlund 2016). Dette gjelder ikke bare fremmede arter, men også spredning av naturlig forekommende arter til nye områder og vassdrag. Disse artene blir betegnet som regionalt fremmede. Spredningen av ferskvannsfisk skjer hovedsakelig ved menneskelig aktivitet. For å sette inn effektive tiltak mot fremmede arter, er forvaltningen avhengig av at de blir oppdaget så raskt som mulig (Leung mfl. 2002). Nye forekomster av fremmede arter kan være spesielt vanskelig å påvise ettersom det ofte er snakk om få individer i en invasjonfase. I akvatiske miljøer kan dette være ekstra utfordrende da visuell deteksjon er vanskelig uten en omfattende fangsttynnsats, som ofte også kan være til skade for lokale arter, først og fremst gjennom bifangst.

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, og som kan innsamles 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. 2012) 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. 2012). NINA har tidligere utviklet, testet og brukt miljø-DNA-markører for påvisning av gjedde, mort og ørekyt med stor suksess (Fossøy mfl. 2017), og NIVA har de siste årene gjennom sin avdeling i København jobbet med implementering av miljø-DNA for overvåking av fremmede arter i ulike havner samt havet rundt Danmark (Andersen mfl. 2016, Andersen mfl. in print).

Denne rapporten omhandler en videreføring av miljø-DNA som metode for overvåking av fremmed ferskvannsfisk i norske elver og innsjøer. Vi gjør i første omgang en utstrakt test av eksisterende protokoller for å utvide antall arter av fremmed ferskvannsfisk vi kan overvåke med arts-spesifikke markører. Vi gjør så en vurdering om miljø-DNA-prøver kan brukes som et supplementende verktøy for overvåking og kartlegging av fremmed ferskvannsfisk gjennom eksisterende prosjekter. Norsk forvaltning har allerede en bred portefølje av overvåkingsprosjekter i ferskvann. Miljø-DNA-prøver er forholdsvis enkle og raske å gjennomføre i felt, og dersom personell som likevel er på oppdrag i ferskvann som del av andre prosjekter også kan samle miljø-DNA-prøver vil man raskt og billig kunne få inn mange prøver med en bred geografisk dekning.

I tillegg inkluderer denne rapporten også fortsetting av to tidligere prosjekter på fremmed ferskvannsfisk. Vi har tidligere brukt Bymarka i Trondheim for uttesting av metoder relatert til miljø-DNA (Fossøy mfl. 2017). I dette studiet undersøker vi grensen for påvisning av få individer i en

naturlig innsjø samt sammenhengen mellom biomasse av fisk og konsentrasjon av miljø-DNA. Vi har også tidligere testet ut miljø-DNA for å undersøke en potensiell spredning av gjedde oppstrøms den elektriske fiskesperra i Telemarkskanalen. Her presenterer vi data fra en utvidet prøvetaking både oppstrøms og nedstrøms sperra i 2018.

2 Bruk av miljø-DNA til kartlegging og overvåking

2.1 Litteraturgjennomgang av gjeldende protokoller for relevante arter på bruk av miljø-DNA for deteksjon av fisk i ferskvann

Tekstboks 2.1. Miljø-DNA begreper (engelsk i parentes)

DNA-strekkoding (DNA-barcoding)

Bruk av et kort DNA-fragment for identifisering av en art ved bruk av Sanger-sekvensering.

DNA-metastrekkoding (DNA-metabarcoding)

Automatisk identifisering av mange arter fra mange korte DNA-fragmenter ved bruk av «next-gen» sekvensering, uavhengig av prøvemateriale.

Miljø-DNA (environmental DNA - eDNA)

DNA isolert fra en miljøprøve som f.eks. jord, vann eller luft.

Miljø-DNA-metastrekkoding (eDNA-metabarcoding)

Bruk av miljøprøver som f.eks. jord, vann eller luft som prøvemateriale for DNA-metastrekkoding.

Når det gjelder bruk av artsspesifikke eller artsgenerelle markører, er dette en vurdering som må gjøres i hvert enkelt tilfelle. I områder med spredning av enkeltarter, slik som for eksempel ørekyt på Hardangervidda, vil en artsspesifikk markør være mest hensiktsmessig, mens for en generell overvåking av nye introduksjoner i bynære strøk der mange arter kan være aktuelle, vil en artsgenerell markør være mest hensiktsmessig. En DNA-metastrekkoding analyse krever en god del lengre analysetid sammenlignet med ddPCR («droplet-digital-PCR», også kalt digital-PCR) eller qPCR («quantitative-PCR», også kalt «real-time-PCR»), og er derfor mindre egnet i hastesaker.

2.1.1 Artsspesifikke markører – qPCR og ddPCR

I denne delen av prosjektet har vi gått systematisk gjennom artene i Fremmedartslista (Forsgren mfl. 2018) samt regionalt fremmede arter listet i **Tabell 1**. For hver art har vi gjennomført et litteratursøk for å finne eventuelle publiserte artsspesifikke genetiske markører i tillegg til upubliserte markører som NINA og NIVA selv har utviklet. For hver markør har vi gått gjennom protokollen for å beskrive: i) hvordan markøren er utviklet; ii) hvor langt det amplifiserte fragmentet er; iii) smeltepunkt for markører og prober; iv) om man har testet for kryssamplifikasjon i andre arter; og v) om man har testet markøren på vannprøver i felt. Denne informasjonen er oppsummert i **Vedlegg tabell 1**.

Noen av markørene i litteraturen inkluderer ikke probe. Dette betyr at den ikke kan kjøres på digital-PCR (ddPCR). Disse markørene kan fortsatt kjøres på kvantitativ-PCR (qPCR) med Sybr-green teknologi, men vi anbefaler likevel at det blir utviklet prober eller nye markører for alle artene, da en probe øker spesifisiteten og muliggjør standardisering av assay på digital-PCR. Av artene vi har gått gjennom kunne vi ikke finne eksisterende markører for krøkle, lagesild, sandkryper og suter. For noen arter eksistere det flere markører, og vi har i dette prosjektet testet samtlige markører med probe for de aktuelle artene. I tillegg har vi testet kryssamplifisering av alle markører ved å inkludere DNA fra vevsprøver fra alle arter av ferskvannsfisk vi hadde tilgjengelig i prosjektperioden. Dette er svært viktig da forutsetningen for å bruke disse markørene er at de er arts-spesifikke.

Tabell 1. Fremmede (F) og regionalt fremmede (R) fiskearter i ferskvann i Norge som blir vurdert i dette prosjektet, i alfabetisk rekkefølge. Abbor og krøkle ble ikke prioritert i Fremmedartslista 2018, men vi velger likevel å inkludere dem i vår undersøkelse.

Art	Art latin	Kategori
Abbor	<i>Perca fluviatilis</i>	R
Bekkerøye	<i>Salvelinus fontinalis</i>	F
Dvergmalles	<i>Ameiurus nebulosus</i>	F
Gjedde	<i>Esox lucius</i>	R
Gullfisk	<i>Carassius auratus</i>	F
Canadarøye	<i>Salvelinus namaycush</i>	F
Karpe	<i>Cyprinus carpio</i>	F
Karuss	<i>Carassius carassius</i>	R
Krøkle	<i>Osmerus eperlanus</i>	R
Lagesild	<i>Coregonus albula</i>	R
Mort	<i>Rutilus rutilus</i>	R
Pukkellaks	<i>Oncorhynchus gorbuscha</i>	F
Regnbueørret	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	F
Regnlaue	<i>Leucaspis delineatus</i>	F
Sandkryper	<i>Gobio gobio</i>	F
Solabbor	<i>Lepomis gibbosus</i>	F
Suter	<i>Tinca tinca</i>	F
Sørv	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	R
Ørekyt	<i>Phoxinus phoxinus</i>	R

2.1.2 Artsgenerelle markører – Miljø-DNA-metastrekkoding

For miljø-DNA-metastrekkoding finnes det mange markører som er designet for fisk (**Tabell 2**). Vi har tidligere analysert en god del vannprøver i samarbeid med firmaet Spygen i Frankrike basert på markøren *teleo* (Valentini mfl. 2016, Fossøy mfl. 2017). Vi har også gjort flere tester av disse markørene på gel, og våre resultater viser at markørene Tele02 og Tele03 (Miya mfl. 2015) ser ut til å fungere best på våre vannprøver.

Tabell 2. Oversikt over DNA-metastrekkodingmarkører for fisk.

Referanse	Markør	Gen	Produkt-lengde	Testresultater
Valentini mfl. (2016)	Teleo	12S	45-96	Kjørt i samarbeid med Spygen, men gir dårlig produkt på gel i våre tester
Taberlet mfl. (2018)	Tele02	12S	129-209	Gir klart produkt på gel
Miya mfl. (2015)	Tele03	12S	133-213	Gir klart produkt på gel
Shokralla mfl. (2015)	Fish_Univ	COI	652	Gir dårlig produkt på gel
Shokralla mfl. (2015)	Fish_mini	COI	226	Gir dårlig produkt på gel
Miya og Nishida (2000)	L14912-CYB H15149-CYB	CytB	285	Gir dårlig produkt på gel
Thomsen mfl. (2012)	FishCBL	CytB	130	Gir dårlig produkt på gel

2.1.3 Standardisering av felt- og labprotokoller

Fra vår tidligere uttesting av ulike filtertyper og labprotokoller har vi erfart at små variasjoner i valg av utstyr og metoder kan medføre store variasjoner i hvor mye DNA man får ut av en miljøprøve (Fossøy mfl. 2017). Vi vil gjerne også presisere viktigheten av både positive og negative kontroller når man analyserer miljø-DNA, spesielt for undersøkelser knytta til spredning av fremmede arter. For prøvetaking i felt, bør en slik undersøkelse helst inkludere en positiv lokalitet der man er sikker på at arten finnes, og en negativ lokalitet der man er sikker på at arten ikke finnes. Alternativt, eller gjerne også i tillegg, kan man ta med springvann ut i felt som man filtrerer gjennom utstyret man har brukt for å sjekke at man ikke har kontaminert noe av prøvetakingsutstyret.

For innsamling av vannprøver i felt er det viktig å tenke over valg av filtertyper og preservering av filter. Videre vil valg av prøvetaking i felt være helt avgjørende og man må vurdere: i) særskilte habitatspreferanser til arten; ii) vannstrømmer, sjikting og omrøring; iii) tidspunkt for innsamling; og iv) inkludering av fysiske måleparametere som temperatur, pH og turbiditet. Når det gjelder labanalyser finnes det mange forskjellige protokoller, og her må man tenke over: i) valg av isoleringsmetode for DNA; ii) kontroll av inhibering; iii) inkludering av negative og positive kontroller; og iv) hvordan tolke resultatene. NINA og NIVA har per i dag to ulike standarder både når det gjelder prøvetaking og labanalyser. I denne rapporten beskriver vi de to ulike tilnærmingene, og gjør en direkte sammenligning av protokollene.

2.1.3.1 NINA prøvetaking og ddPCR-protokoll

NINA har tidligere benyttet seg av et 0.45 µm cellulosefilter (Pall MicroFunnel 300 ST, Fossøy mfl. (2017)), men har i den senere tid gått over til å bruke et 2.0 µm glassfiberfilter (Merck Millipore). Vi har utviklet en egen filterholder og et standard kit som vi sender ut til oppdragsgivere og som muliggjør at de kan ta prøvene selv (Figur 1). Vi har også utviklet en egen hånddrevet peristaltisk pumpe i samarbeid med M-TECH AS i Trondheim (**Figur 1**). Overgangen til et litt grovere glassfiberfilter skyldes i første omgang at prøvetaking og filtrering i felt går mye raskere og at man filtrere større vannvolumer. Vannlokaliteter med mye partikler og humus representerer en stor utfordring for filtrering av vann gjennom finmaskete filter. I tillegg ser vi fra egne studier at sannsynligheten for å oppdage sjeldne arter øker ved filtrering av 10 liter vann gjennom 2.0 µm filteret sammenlignet med 1 liter vann gjennom 0.45 µm filteret (upubliserte data).



Figur 1. NINA prøvetakingsutstyr og hånddrevet peristaltisk pumpe. Foto: Frode Fossøy/NINA.

NINA benytter seg også av en batteridrevet peristaltisk pumpe (Bürkle Vampire sampler, **Figur 2**) eller en 3-armet manifold (Pall) tilkopleet en membranpumpe (Sartorius Microsart e.jet) når flere filterprøver skal tas på samme sted. Dette er en svært effektiv metode for å raskt kunne ta mange prøver på kort tid.



Figur 2. Filtrering av 10 liter vann med Bürkle Vampire peristaltisk pumpe ved Maridalsvannet i Oslo. Foto: Tor Atle Mo/NINA.

Glassfiberfiltrene blir preservert i 5 ml Eppendorfrør med 4050 µl ATL-buffer (Qiagen) direkte etter prøvetakning og oppbevart i romtemperatur frem til isolering. Ved isolering blir 450 µl proteinase-K (Qiagen) tilsatt direkte i 5 ml rørene og inkubert ved 56°C over natt. DNA blir så isolert med NucleoSpin Plant II Midi kit (Macherey-Nagel) etter produsentens protokoll, men med lysering- og vaskebuffer fra Qiagen. DNA blir eluert i 200 µl forvarmet AE-buffer (Qiagen) og deretter reeluert på samme kolonne for å maksimere utbyttet av DNA.

NINA bruker en digital-PCR (ddPCR: droplet-digital-PCR) for påvisning og kvantifisering av DNA ved hjelp av artsspesifikke markører. For hvert PCR-oppsett blir det tatt med en positiv kontroll (DNA fra arten som templat) og en negativ kontroll (dH₂O som templat). Hver ddPCR reaksjon består av 0.9 µM forward og revers primer, 0.25 µM probe, 10 µL ddPCR™ Supermix for Probes (ingen dUTP), dH₂O og DNA-templat. Mengden DNA-templat kan variere mellom 0.1 og 8.0 µl i hver reaksjon avhengig av prøvevolum og DNA-konsentrasjon. I dette studiet ble samtlige prøver analysert med 1 µl DNA-templat i PCR reaksjonen. I tillegg ble en fraksjon av prøvene kjørt både med 0.1 og 5 µl DNA-templat for å evaluere inhibering i PCR-reaksjonen. Dråper blir automatisk generert ved hjelp av en QX200 AutoDG robot (Bio-Rad), og PCR-amplifisering ble utført i en Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) med følgende temperaturer: først et denatureringssteg ved 95°C i 10 min, etterfulgt av 40 sykluser med denaturering ved 95°C i 30 sek, annealing og elongering ved 58°C eller 60°C i 1 min og et siste denatureringssteg ved 98°C i 10 min før avkjøling ved 4°C. Dråpene blir så automatisk avlest for tilstedeværelse eller fravær av fluorescens ved hjelp av en QX200™ Droplet Reader (Bio-Rad). Positive og negative dråper ble separert fra hverandre ved hjelp av QuantaSoft software v.1.7.4 (Bio-Rad) og dette blir videre brukt til å beregne tilstedeværelse og kvantifisere DNA fra de ulike artene. Antall DNA-kopier per liter vann blir så utregnet via formelen:

$$1. \text{ DNA}_{\text{kopier/L}} = (\text{DNA}_{\text{konsentrasjon}} / \text{PCR-volum}_{\text{ddPCR}}) * \text{Templatvolum} / \text{Vannvolum}$$

Hvor DNA_{konsentrasjon} blir beregnet av QuantaSoft, PCR-volumet er 20 µl, Templatvolumet er DNA-mengden som inngår i PCR-reaksjonen og vannvolumet er mengden vann filtrert i felt. Vi setter en minimumsgrense på tre positive dråper for å karakterisere en prøve som positiv for å redusere sannsynligheten for falske positive. Denne grensen er satt på bakgrunn av negative felt- og labkontroller der vi av og til observerer 1 eller 2 positive dråper, selv ved bruk av destillert vann i analysen.

2.1.3.2 NIVA prøvetaking og qPCR-protokoll

I felt ble det samlet inn to 1-liters vannprøver fra hver lokalitet. Etter innsamling ble prøvene plassert i en kjøleboks med is for å holde disse så kalde som mulig under transporten tilbake til NIVA. Dette gjøres for å redusere nedbrytningshastigheten av DNA fra innsamlingstidspunktet og frem til filtrering. Dette er noe som NIVA har god erfaring med fra andre prosjekter.

I laboratoriet ble alle flaskene tørket over med en 5-10 % klor oppløsning for å dekontaminere utsiden. Deretter ble vannet filtrert med 0.22 µm Sterivex filter fra Millipore. Vannmengden som var mulig å få igjennom filtrene ble registrert for å kunne sammenligne signalstyrken mellom prøvene i form av DNA konsentrasjon per 1 mL. Etter frysing av filtrene ved -20°C ble DNAet på filtrene isolert etter en metode basert på Spens mfl. (2016). Påvisning av miljø-DNA ble utført på en Real-Time PCR maskin (qPCR) fra Bio-Rad. Amplifiseringen ble gjennomført i et 25 µL reaksjonsvolum bestående av 12.5 µL TaqMan Environmental Master Mix 2.0 (Thermo Fischer Scientific), volumet for forward og reverse primer samt probe var avhengig av optimalisert konsentrasjon (**Vedlegg tabell 2**), 2.5 µL isolert miljø-DNA og vann, avhengig av primer og probe volum, opp til reaksjonsvolumet på 25 µL. Protokollen som ble brukt for amplifiseringen på qPCR maskinen for assays med probe besto av en første varmebehandling på 10 min ved 95°C etterfulgt av 50 sykluser med 15 sek ved 95°C og 1 min annealing ved spesifikke temperaturer for de enkelte assays (**Vedlegg tabell 2**). For solabbor ble assay kjørt uten probe hos NIVA. Amplifisering ble gjennomført med 2x Ssofast EvaGreen Supermix (Bio-Rad) i et 25 µL reaksjonsvolum, inklusiv 0.5 mg/µl BSA, 2mM MgCl₂, 2.5 µL miljø-DNA, primerkonsentrasjoner som i **Vedlegg tabell 2** og vann opp til reaksjonsvolumet. qPCR protokollen besto av en første oppvarming til 98°C i 2 min, etterfulgt av 45 sykluser av 98°C i 5 sek og 68°C i 10 sek. Alle prøver ble kjørt som triplikater inklusive negative kontroller. Amplifisering av miljø-DNA fra hver lokalitet ble sammenlignet med en standardkurve bestående av rent DNA ekstrahert fra en vevsprøve for den pågjeldende arten som det ble søkt etter. Dette ble gjort for å kunne sammenligne mengden miljø-DNA fra hver lokalitet og derved indikere andel biomasse i eller oppstrøms lokaliteten.

2.1.3.3 NINA DNA-metastrekkoding protokoll

På NINA har vi testet og utviklet en standard protokoll for DNA-metastrekkoding. Kort oppsummert baserer vi vår protokoll på Illumina sin egen 16S 'metagenomics' protokoll der vi bruker en to-steps PCR-protokoll for generering av bibliotek på NINAs egen lab før de ferdige bibliotekene sekvenseres på en Illumina MiSeq ved NTNU Genomics Core Facility (GFC). Resultatene blir analysert med programvaren OBITOOLS (Boyer mfl. 2016) installert på vår egen modulære Linux-server, der vi bruker European Nucleotide Archive (ENA) (www.ebi.ac.uk/ena) som referansedatabase for identifisering av arter. ENA er Europas ekvivalent til NCBI Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) i USA og DNA Databank of Japan (DDBJ) (www.ddbj.nig.ac.jp), og data blir synkronisert daglig mellom disse tre institusjonene.

2.2 Gjennomgang av relevant, eksisterende overvåking og undersøkelser/aktivitet hvor miljø-DNA vil være aktuell å bruke som supplerende verktøy

2.2.1 Eksisterende overvåkingsprogrammer vurdert i dette studiet

Selv om det foregår en utstrakt overvåking av ulike kvalitetselementer i mange ferskvannslokaliteter i Norge (**tabell 3**), er det relativt liten overlapp mellom disse og aktuelle lokaliteter for overvåking av fremmed ferskvannsfisk. Overvåking for tidlig oppdagelse av spredning av fremmede arter må rettes mot områder som er valgt ut på grunnlag av vår nåværende kunnskap om forekomst og spredningsvektorer. Eksisterende overvåking er ikke geografisk tilpasset temaet fremmede fiskearter. Ved miljø-DNA-overvåking er det følgelig nødvendig med egne feltrunder i utvalgte lokaliteter for om mulig oppnå tidlig påvisning av fremmede arter.

I noen tilfeller kan det likevel være annen aktivitet i samme region/vassdrag, slik at feltarbeidet kan kombineres. Det som synes å være mest egnet i så måte er Elveovervåkingsprogrammet og ØKOFERSK med aktiviteter i relativt mange vassdrag/områder. Øvre Drengsrudvann i Asker er f.eks. en lokalitet med minst to fremmede fiskearter (dvergmalles og suter), og den inngår i ØKOFERSK. Man må likevel beregne ekstra kostnader med innsamling av vannprøver til miljø-DNA analyser, da disse prøvene må samles inn etter egne protokoller mht. f.eks. romlig fordeling for å oppnå størst mulig sikkerhet i deteksjon.

Tabell 3. Oversikt over eksisterende overvåkingsprogrammer av ferskvann i Norge.

Overvåking	Hvem
Overvåking av lakseelver	NINA
ØKOSTOR/FIST	NINA/NIVA
ØKOFERSK	NINA/NIVA
Edelkreps/Signalkreps	NINA/VI
Gyrodactylus salaris	NINA/VI

Det kan skilles mellom to typer overvåkingslokaliteter; i) utviklingen i lokaliteter hvor en fremmed art allerede har etablert seg, eventuelt er i ferd eller kan være i ferd med å etablere seg, ii) overvåking av nærliggende lokaliteter for å påvise videre spredning. Eksisterende overvåkingslokaliteter vil derfor bare dekke en del av behovet for å overvåke spredning av fremmede fiskearter. Ved prioritering av overvåkingslokaliteter vil det være nødvendig ikke bare å vurdere den totale forekomsten i et gitt område/fylke. Det må legges betydelig vekt på å overvåke bestander i nærområdene til det vi kan kalle «satellittbestander». Dette er bestander som i dag ligger relativt isolert til, langt fra andre bestander med samme art. Disse representerer en stor fare for videre spredning. Eksempler på slike bestander kan være suter og sørv på Østlandet (Oppland), samt ørekyt og gjedde på en rekke steder, bl.a. på Vestlandet og i Trøndelag.

Dersom en skal legge opp et overvåkingsprogram av mer generell karakter, og med en viss geografisk spredning, er det naturlig at flere lokaliteter i ØKOFERSK inngår. I så fall bør en benytte en generell markør som omfatter både agnfisk (ørekyt, sørv, mort, sandkryper), troféfisk (gjedde, karpe, Canadarøye) og akvariefisk (gullfisk, rødgjellet solabbor).

Innsjøer i ØKOSTOR/FIST er mindre egnet på grunn av størrelsen. For det første er prøvetakingen i så store innsjøer svært arbeidskrevende. For det andre er mulighetene for å sette inn tiltak mindre, dersom en introduksjon først har skjedd.

Ved overvåking av pukkellaks og regnbueørret i elver vil det være aktuelt å benytte lokaliteter hvor det allerede pågår overvåking av laks (ungfisktellinger (elfiske) og gytefisktellinger

(snorkling)). Det er derfor mulig å overvåke relativt mange lokaliteter. I flere elver i Finnmark foregår det egne undersøkelser av pukkellaks, både registreringer og uttak av fisk. Utvikling av miljø-DNA-metodikk for pukkellaks/regnbueørret vil kunne effektivisere dette arbeidet.

Hvert år overvåkes et risikobasert utvalg av norske lakseelver for forekomst og spredning av *Gyrodactylus salaris*. De viktigste utvalgskriteriene er de 2-3 største elvene i hvert fylke samt elver med mye aktivitet som sportsfiske og padling. I tillegg overvåkes elver som er friskmeldte etter en kjemisk utryddelsesbehandling mot parasitten. Laksunger samles inn med elfiskeapparat, konserveres og undersøkes under lupe for forekomst av *G. salaris*. Det er utviklet sensitive metoder for å påvise *G. salaris*-DNA i vannprøver (Collins mfl. 2010) og dagens Gyro-overvåking kan suppleres eller erstattes med en miljø-DNA-overvåking.

Valg av overvåkingslokaliteter byr på store utfordringer og usikkerhet fordi vi i liten grad kjenner til de prioriteringene som blir gjort av personer som sprer fremmede arter. Selv om det viser seg at mange av introduksjonene skjer i bynære områder eller nær tettsteder, er dette på langt nær alltid tilfelle. I tillegg har ofte lokaliteter med fremmede arter lett adgang, dvs. de ligger nær bilvei. Trolig vil også lokalitetens beskaffenhet spille inn med tanke på den arten som blir satt ut, f.eks. karpe og suter. Suksessen til en type utsetting vil sikkert også være avgjørende. Det er nylig satt ut krøkle i Storsjøen i Rindal, noe som synes å ha hatt en positiv effekt på aurebestanden med betydelig økt vekst og større antall «storaure» (Museth mfl. 2017, Eloranta mfl. 2018). Dette er en stor innsjø med en stor pelagisk sone; et viktig leveområde for krøkle. Slike utsettinger som gir «positive» effekter vil øke faren for nye utsettinger. Relativt store innsjøer synes også å bli prioritert ved utsetting av Canadarøye, ofte der det er god forekomst av potensiell førfisk i form av aure eller røye. God tilgang på førfisk er trolig også en faktor som blir vektlagt ved utsetting av gjedde. Det er imidlertid mange eksempler på at det er satt ut gjedde også i mindre innsjøer, der gjedda utrydder byttfisk og utvikler seg til en kannibalbestand (Shafi & Maitland 1971, Hesthagen mfl. 2015).

2.2.2 Enkeltarter og områder under spredning

Vi har gått gjennom lista over fremmede og regionalt fremmede arter i Fremmedartslista (Forsgren mfl. 2018), og rangert 11 av dem i prioritert rekkefølge i forhold til problemene de representerer (**tabell 4**). En oversikt over alle artene med aktuelle områder for spredning er listet i **Vedlegg tabell 3**.

Tabell 4. Rangering av de ulike artene mht. behovet for overvåking med miljø-DNA. I kolonnen «Kategori» står F for fremmede arter og R for regionalt fremmede arter. I kolonnen «Risiko» har vi listet risikokategorien som bestemt i Fremmedartslista. I kolonnen «Testet» er arter der markører og protokoller allerede er testet under norske forhold satt som ja.

Prioritet	Art	Kategori	Risiko	Testet
1	Gjedde	R	Svært høy	Ja
2	Ørekyt	R	Svært høy	Ja
3	Pukkellaks	F	Høy	Ja
3	Regnbueørret	F	Høy	Nei
5	Sørv	R	Svært høy	Nei
6	Mort	R	Høy	Ja
6	Abbor	R	-	Nei
8	Sandkryper	F	Lav	Nei
9	Suter	F	Høy	Nei
10	Karpe	F	Høy	Nei
11	Krøkle	R	-	Nei

Spredningen av gjedde er uten sammenligning den alvorligste trusselen mot stedeegne arter, og har følgelig førsteprioritet. Spredningen skyldes trolig først og fremst at den blir sett på som en

troféfisk. Gjedde har fram til i dag blitt satt ut i en rekke innsjøer og vassdrag i Sør-Norge. Dette gjelder ikke minst i Aust-Agder og Hordaland. Det gjelder imidlertid også flere store innsjøer på Østlandet; Krøderen, Randsfjorden og Sperillen (Hesthagen & Sandlund 2012). Fra Krøderen har den spredt seg oppover Hallingdalselva hvor den kan vandre fritt opp til Nesbyen. Fra Sperillen skjer spredningen via Begna hvor den blir stoppet ved Eid kraftverk. Men det går rykter om fangst av gjedde i øvre deler av elva. Lengre oppe i vassdraget er det flere store og fiskerike innsjøer som Strondafjorden og Slidrefjorden. I Telemarkkanalen er det nå gjedde opp til Kjeldal og Hogga sluse. Dersom den blir satt ut lengre opp i vassdraget, vil den spre seg til flere store innsjøer, i første omgang til Flåvatnet og Kviteseidvatnet. Gjeddene står også på terskelen til å spre seg til øvre deler av Nordmarkavassdraget. Den er nylig satt ut i Mylla (2015) i Nitelvvassdraget. Derfra er det bare ca. 1 km til den øverste innsjøen (Ølja) i Nordmarksvassdraget. I de siste årene har det vært flere hendelser med utsetting av gjedde i Trøndelag og Rogaland.

Den andre arten på vår prioriteringsliste er ørekyt, som også er en regionalt fremmede art. Det har vært en omfattende spredning av ørekyt i flere fylker i løpet av de siste ti-årene med store konsekvenser for stedeegne arter som ørret (Hesthagen & Sandlund 1997). Faren for videre spredning av ørekyt til vestlige deler av Hardangervidda representerer den alvorligste trusselen. Andre introduksjoner av ørekyt i randområder til dagens utbredelse er Røssåga i Nordland, Øvre Otta i Oppland og Suldalsvassdraget (Suldalsvatnet) i Rogaland.

I 2017 ble det registrert en overraskende stor spredning av pukkellaks (Berntsen mfl. 2018). Totalt ble arten påvist i flere enn 260 vassdrag, fra Øst-Finnmark i nord til Østfold i sør. På grunn av mangelen på kunnskap rundt mulige effekter på annen anadrom fisk, setter vi pukkellaks som nummer tre på prioritetslista vår, tett etterfulgt av regnbueørret. Begge er arter av stillehavslaks og gyter i lakseelver, og kan følgelig overvåkes ved hjelp av de samme prøvene. I tillegg representerer regnbueørreten en fare som vektor for spredning av *Gyrodactylus salaris*. Det foregår i dag en betydelig oppdrett av regnbueørret langs kysten, spesielt fra Hordaland, Sogn og Fjordane og Trøndelag. Det har i de siste årene vært en betydelig rømming fra disse anleggene, og noe av denne fisken går opp i lakseførende vassdrag.

På vår prioriteringsliste følger så tre regionalt fremmede arter på plassene 5-7: sørv, mort og abbor har hatt flere alvorlige spredningstilfeller i de siste tiårene. Spesielt har spredningen av abbor vært mer omfattende enn tidligere antatt. Sandkryper (grundling) er en fremmed art som vi har satt på åttendeplass. Denne karpefisken forekommer i dag i kun to vassdrag: Numedalsvassdraget i Buskerud/Vestfold og Nesheimsvassdraget i Vest-Agder. I Numedalsvassdraget forekommer den på en minst 58 km lang strekning, samt i flere tilløpsbekker og innsjøer. Sandkryper representerer en stor trussel fordi den kan etablere seg i anadrome vassdrag, med negative effekter på laks og ørret. En videre spredning vil derfor være svært uheldig.

Av andre fremmede arter følger så to karpefisker; suter og karpe. Det har vært en omfattende spredning av suter gjennom lang tid med nærmere 100 lokaliteter bare i Aust-Agder (Kleiven & Hesthagen 2012). I seinere år har karpe dukket opp i stadig nye steder, spesielt i Nedre Telemark, Grenlandsområdet (Hesthagen & Sandlund 2016). Det er forventet en økende spredning av både suter og karpe i årene framover. Begge disse artene forekommer mange steder i mindre vannforekomster, og de representerer derfor ikke noen stor trussel mot stedeegne arter. Både type habitat (dybde, tilgang på vegetasjon) og klima kan begrense utbredelse og mengde (tett-het). Suter er likevel en relativt tilpasningsdyktig art som enkelte lokaliteter kan danne relativt tette bestander. Om ønskelig er det også mulig å fjerne disse artene fra mindre vannforekomster. Spredningen av andre fremmede arter vurderes som mindre alvorlige, som regnlau, gullfisk og dvergmalles. Denne kategorien omfatter også to laksefisker, Canadarøye og bekkerøye. Spredningen av Canadarøye er også relativt beskjeden med totalt ca. 15 bestander, men den reproducerer ikke i alle lokaliteter (Hesthagen & Sandlund 2017). Spredningen av bekkerøye har vært mer omfattende med ca. 200 kjente reproduserende bestander (Hesthagen & Kleiven 2013, Hesthagen mfl. 2018).

Blant regionalt fremmede arter har krøkle fått lav prioritet. Men det har nylig vært satt ut krøkle i Storsjøen, med betydelig effekter på ørretbestanden (Museth mfl. 2017, Eloranta mfl. 2018). Lagesild og karuss er begge regionalt fremmede arter som er antatt å ikke representere store risikoer og ble satt til lav risiko i Fremmedartslista (Forsgren mfl. 2018).

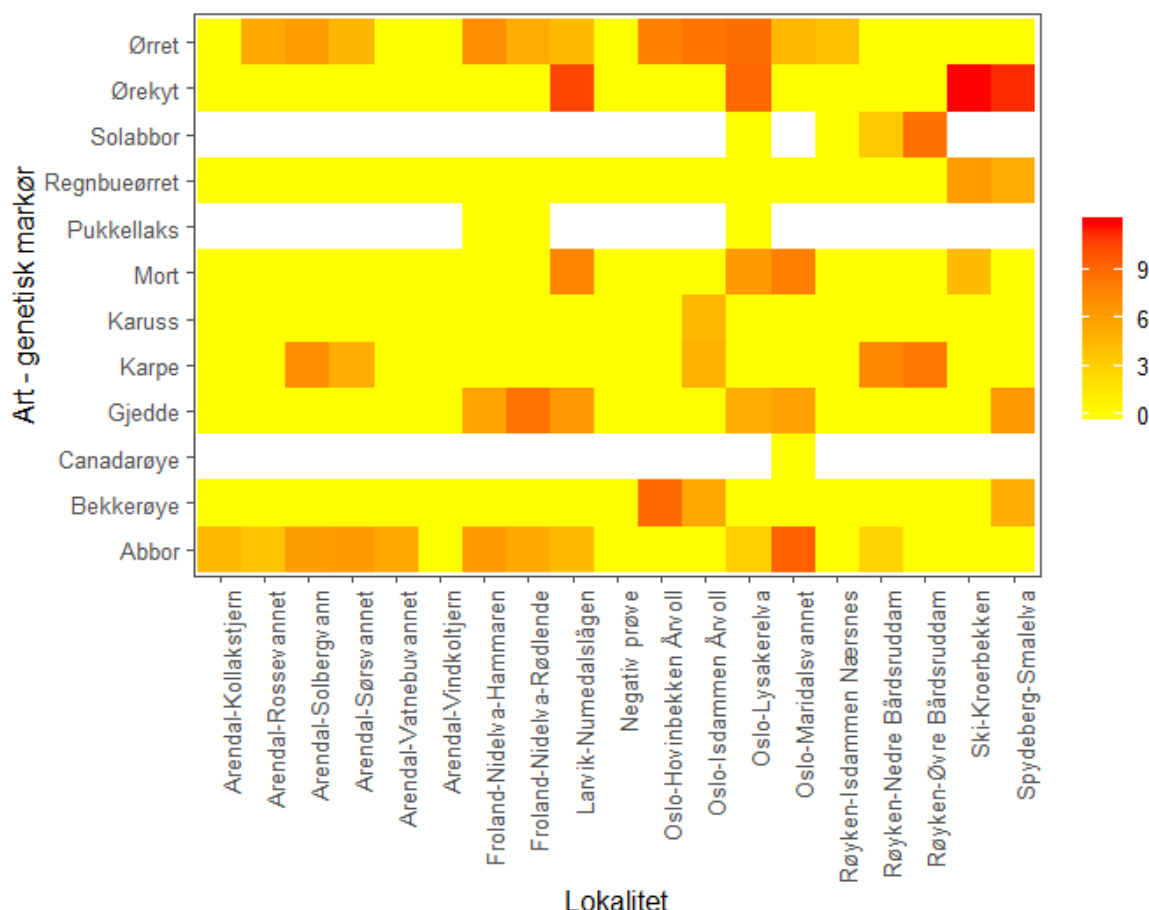
2.3 Resultater fra uttesting av eksisterende protokoller for fremmed ferskvannsfisk

2.3.1 Prøveinnsamling i felt og valg av lokaliteter

Basert på eksisterende kunnskap rundt spredning av fremmed ferskvannsfisk besluttet vi å gjøre to målretta innsamlinger av prøver sentralt på Østlandet og fra Sørlandet (**Tabell 5**). Lokalitetene ble valgt med mål om å kunne påvise samtlige arter i prioriteringslista med tilgjengelige markører (**Tabell 4**).

Tabell 5. Oversikt over lokaliteter hvor det ble tatt miljø-DNA-prøver som del av dette prosjektet.

Kommune	Lokalitet	Dato	Breddegrad	Lengdegrad	Vannvolum (liter)	Vanntemperatur (°C)
Arendal	Kollakstjern	04.10.2018	6490203.77	497095.05	2	11.0
Arendal	Rossevannet	05.10.2018	6481301.33	480542.49	5	11.4
Arendal	Solbergvann	05.10.2018	6480389.65	484627.61	5	10.3
Arendal	Sørsvannet	05.10.2018	64800089.77	483127.70	5	11.3
Arendal	Vatnebu vannet	04.10.2018	6490359.26	496454.61	4	11.6
Arendal	Vindkoltjern	04.10.2018	6490559.96	497786.51	5	11.4
Froland	Nidelva-Hammaren	05.10.2018	6476489.32	482790.57	5	9.9
Froland	Nidelva-Rødlende	05.10.2018	6484143.04	478670.39	5	9.8
Larvik	Numedalslågen	23.08.2018	6589335.26	210890.10	10	
Larvik	Numedalslågen	23.08.2018	6581418.79	211644.11	10	
Oslo	Hovinbekken Årvoll	05.11.2018	6652689.51	266634.42	10	Ca. 8
Oslo	Isdammen Årvoll	05.11.2018	6653863.35	266876.72	10	Ca. 8
Oslo	Lysakerelva	21.09.2018	6650326.98	255855.14	10	Ca. 8
Oslo	Maridalsvannet	03.10.2018	6656570.85	264982.83	10	10
Oslo	Maridalsvannet	03.10.2018	6657235.29	265503.90	10	10
Oslo	Maridalsvannet	03.10.2018	6658412.31	264789.49	10	10
Røyken	Isdammen Nærsnes	21.09.2018	6633157.03	247002.88	10	Ca. 8
Røyken	Nedre Bårdsruddam	21.09.2018	6633088.52	247251.30	10	Ca. 8
Røyken	Øvre Bårdsruddam	21.09.2018	6633084.80	247077.25	10	Ca. 8
Ski	Kroerbekken	05.11.2018	6615298.67	268014.58	9.5	Ca. 8
Spydeberg	Smalelva	05.11.2018	6616895.87	280687.15	7.5	Ca. 8



Figur 3. Oppsummering av miljø-DNA-analyser for de ulike lokalitetene (x-aksen) og de artsspesifikke markørene (y-aksen). Hvite felter er kombinasjoner som ikke er kjørt, mens gule felter representerer negative resultater. Verdien fra oransje mot rødt viser estimert antall DNA-kopier per liter vann på en logaritmisk skala.

2.3.2 Test av protokoller på innsamla vannprøver

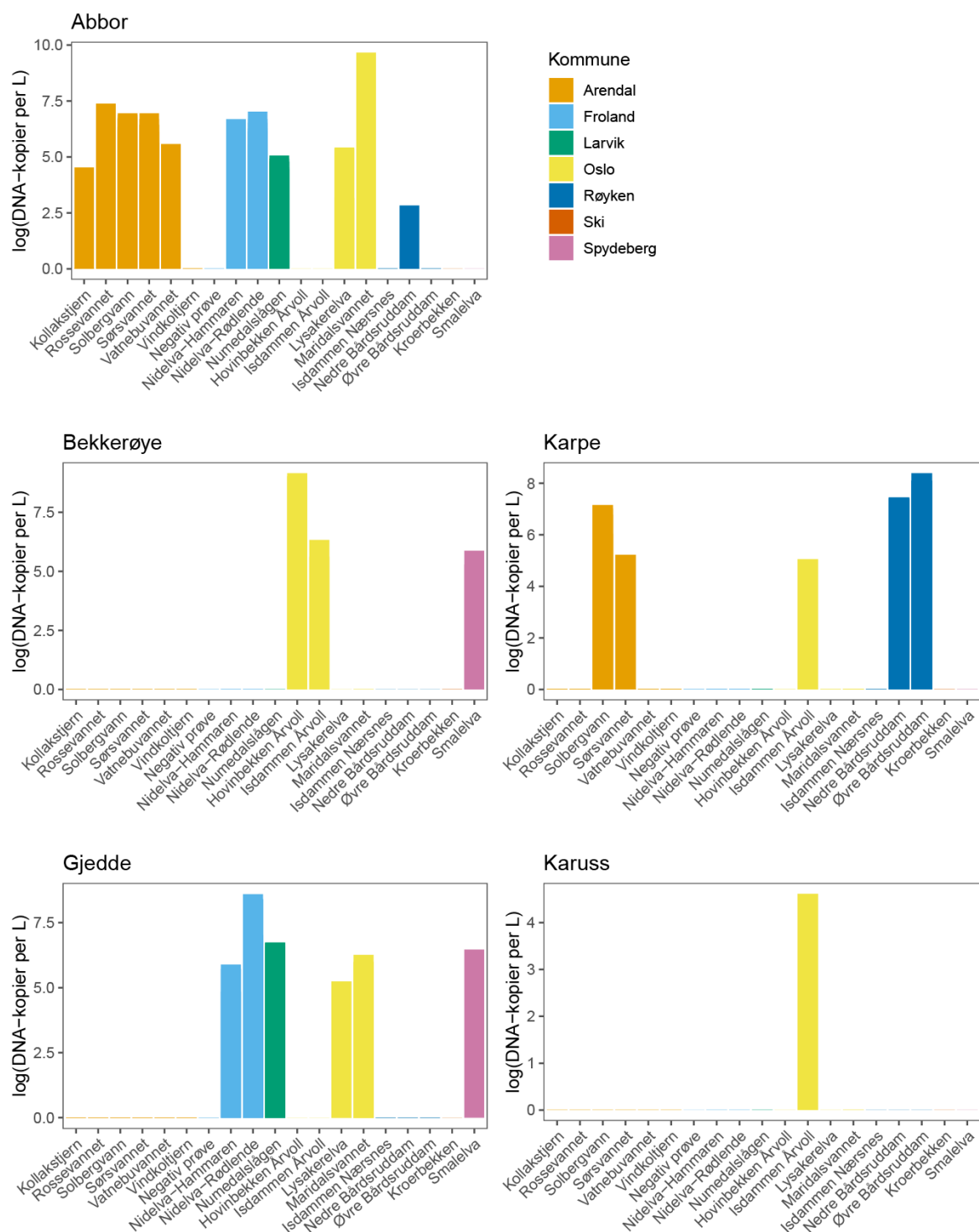
Resultatene fra våre analyser viser at de aller fleste protokollene fungerer som forventet med hensyn til å påvise de fremmede artene i vannprøver (**Figur 3**). En publisert markør for sørv Nathan mfl. (2015) ble testet gjentatte ganger med ulike PCR-betingelser, men vi klarte ikke å få denne til å fungere tilfredsstillende verken på positive kontrollprøver eller vannprøver, og denne ble da droppet fra våre analyser.

Et fåtall arter ble bare testet i et utvalg av innsjøer i dette studiet. Dette inkluderer pukkellaks, som bare ble undersøkt i to elver: Nidelva i Froland og Lysakerelva, og som ikke ble påvist i noen av prøvene. Vi har tidligere påvist pukkellaks med vannprøver og kan derfor si at denne markøren fungerer (upubliserte data). Markøren for Canadarøye ble kun testet i Maridalsvannet og viste ingen positive prøver. Markøren slo ut på den positive kontrollen, men resultatene viste dårlig separasjon mellom positive og negative dråper. Vi er derfor usikre på om denne markøren fungerer tilstrekkelig bra på vannprøver. Til sist har vi rødgjellet solabbor, som kun ble testet i Lysakerelva og Røyken kommune og som påviste arten i både i øvre og nedre Bårdsruddam som forventet.

Abbor ble påvist i alle lokaliteter i Arendal og Froland utenom Vindkolltjern (**Figur 5**). I tillegg påviste vi abbor i Numedalslågen, Lysakerelva, Maridalsvannet og Nedre Bårdsruddam. Sistnevnte var overraskende og så vidt over vår grense på tre positive dråper. Bekkerøye ble påvist i Hovinbekken og Isdammen på Årvoll. Dette var forventet basert på tidligere kunnskap. I tillegg fikk vi positive utslag av bekkerøye i Smalelva. Så vidt vi vet finnes det ikke noen tidligere informasjon om dette (Hesthagen & Kleiven 2013). Vi anbefaler at dette bekreftes eller avkreftes med både nye miljø-DNA-analyser og konvensjonelle undersøkelser. Gjedde ble påvist Nidelva, Numedalslågen Lysakerelva, Maridalsvannet og Smalelva. Gjedde ble ikke påvist i noen av lokalitetene i Arendal, noe som stemmer med eksisterende kunnskap (Kleiven & Hesthagen 2012). Karpe ble påvist i Solbergvann og Sørsvannet i Arendal, Isdammen på Årvoll samt Øvre og Nedre Bårdsruddam. Dette er alle kjente lokaliteter fra før. Karuss ble kun påvist i Isdammen på Årvoll. Mort ble påvist i Numedalslågen, Lysakerelva, Maridalsvannet og Kroerbekken. Regnbueørret ble kun påvist i Kroerbekken og Smalelva. Ørekyt ble påvist i Numedalslågen, Lysakerelva, Maridalsvannet, Kroerbekken og Smalelva. Ørret (brunørret) ble påvist i Rossevannet, Solbergvann og Sørsvannet i Arendal, Nidelva i Froland, Numedalslågen, Hovinbekken, Isdammen på Årvoll, Lysakerelva, Maridalsvannet og Isdammen Nærsnes.

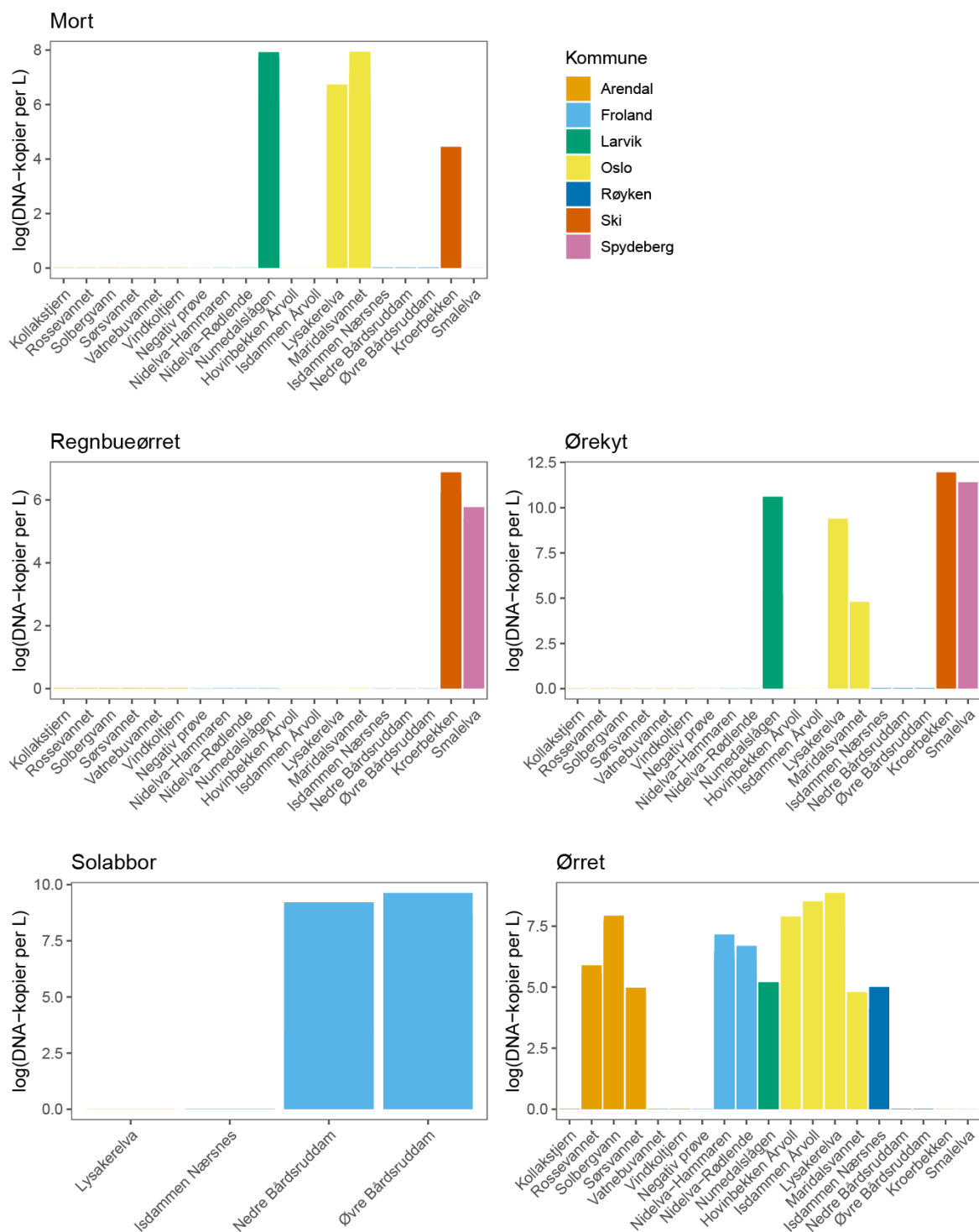


Figur 4. En leiebil fungerer utmerket som en mobil feltstasjon, her parkert ved Solbergvann i Arendal. Foto: Rolf Sivertsgård/NINA.



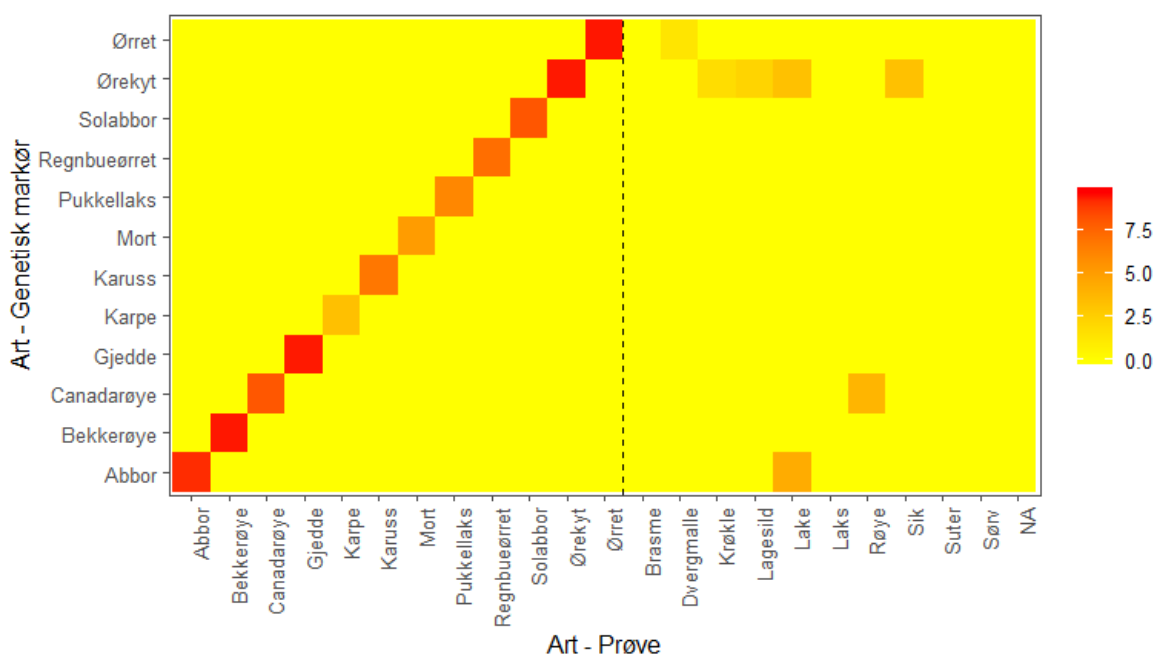
Figur 5. Grafene viser DNA-konsentrasjon av hver art for hver lokalitet målt med ddPCR og artsspesifikke markører.

(Figur 5 fortsettelse)



2.3.3 Test av kryssamplifisering av artsspesifikke markører

Uttesting av kryssamplifisering av artsspesifikke markører er en krevende analyse. Man er helt avhengig av at DNA-prøvene man benytter er basert på rent vev, og ikke på noen måte er kontaminert av andre arter. Når det gjelder fisk er dette ofte problematisk da flere arter ofte er fanget i samme garn, lagret i samme fiskstemp og målt og veid med det samme utstyret. Skjellprøver og finneklipp blir kanskje innsamlet med en og samme kniv eller saks uten sterilisering. Vi har prøvd å samle flere DNA-prøver per art, men er likevel usikre på om prøvene våre er rene. Aller helst bør slike tester inkludere muskelprøver tatt på innsiden av fisken med sterilt utstyr, men slike prøver er svært vanskelig å oppdrive. Dette betyr altså at positive utslag på denne kryss-testen ikke nødvendigvis skyldes at den genetiske markøren ikke er artsspesifikk. I **Figur 6** har vi brukt en logaritmisk skala for å vise antall positive dråper i en ddPCR, og de oransje prøvene vi ser som kryssamplifisering er alle svært lave. Det betyr at dersom dette ikke skyldes kontaminering mellom prøvene, vil sannsynligheten for at vi plukker opp feil art i en vannprøve være svært liten, da DNA-konsentrasjonen i vevsprøvene vi har brukt i denne testen er mye høyere enn den vil være i en vannprøve. Vi kan derfor ikke komme med en klar konklusjon etter denne testen, men vi tror at alle disse markørene vil være artsspesifikke for miljø-DNA-prøver.



Figur 6. Illustrasjon av kryssamplifisering av artsspesifikke markører mot andre fiskearter. X-aksen viser hvilken art prøvematerialet (DNA) kommer fra og y-aksen viser hvilken art den genetiske markøren er laget for. Gule felter representerer negative resultater, mens verdien fra oransje mot rødt viser antall positive dråper i en digital-PCR på en logaritmisk skala. Ideelt sett skal vi bare ha positive verdier når begge akser viser samme art.

2.3.4 Sammenligning av to etablerte protokoller

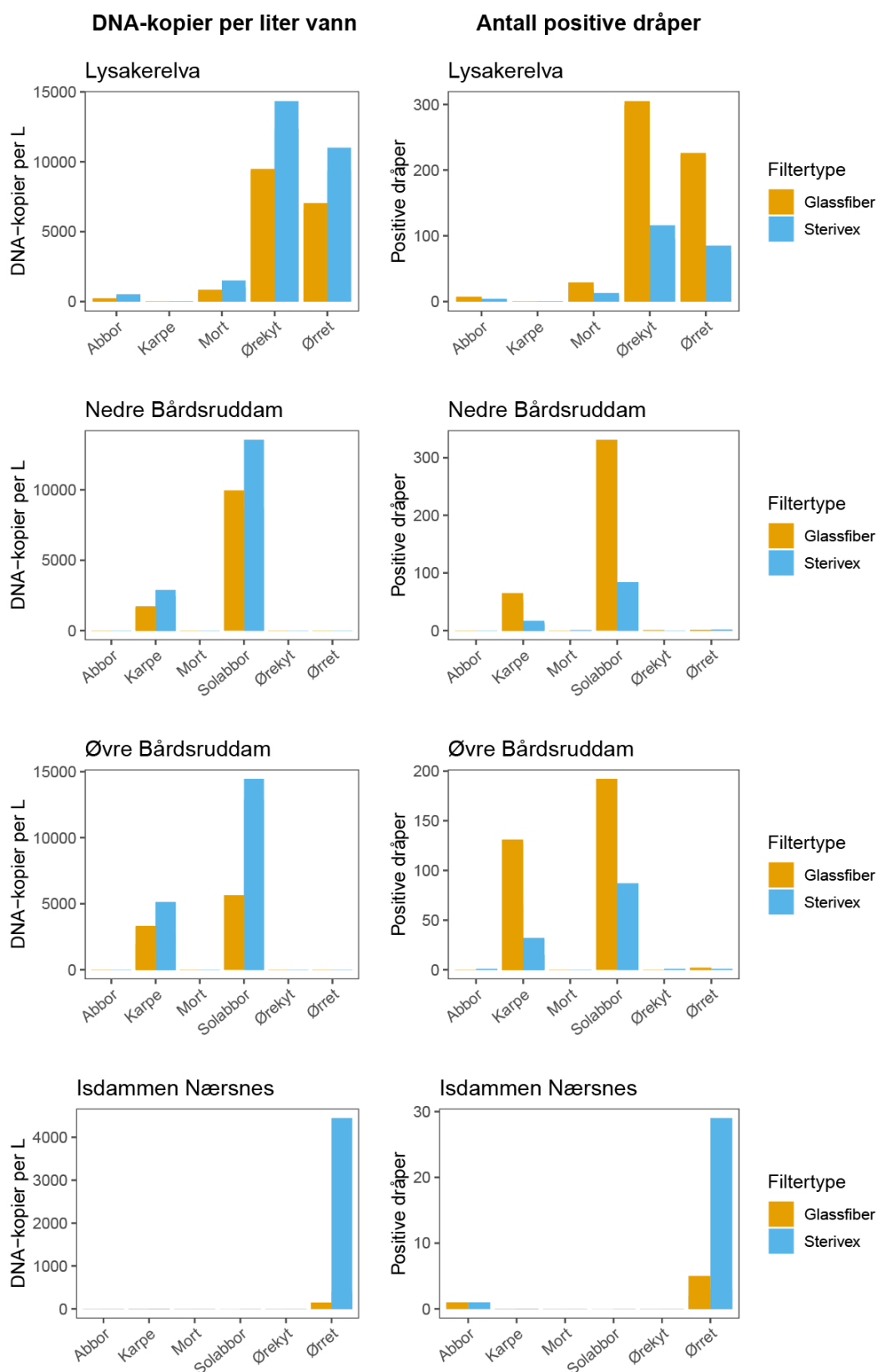
NINA og NIVA gjorde en felles innsamling av miljø-DNA-prøver i Lysakerelva, Øvre og Nedre Bårdsruddam og Isdammen Nærnes 21. september 2018 (**Figur 7**). NINA filtrerte 10 liter vann gjennom et stk. 2.0 µm glassfiberfilter i felt mens NIVA tok med seg vannprøver til sin lab i Oslo og filtrerte ca. 1 liter vann gjennom hvert av to 0.22 µm Sterivex-filtre. DNA ble isolert med respektive metoder hos NIVA og NINA, og deretter ble DNA utvekslet mellom labene og analysert med en ddPCR-maskin hos NINA og en qPCR-maskin hos NIVA.



Figur 7. Tor Atle Mo fra NINA demonstrerer NINAs feltprotokoll for innsamling av vannprøver mens Jens Thaulow fra NIVA observerer. Foto: Marc Anglès d'Auriac/NIVA.

2.3.4.1 Analyser med ddPCR

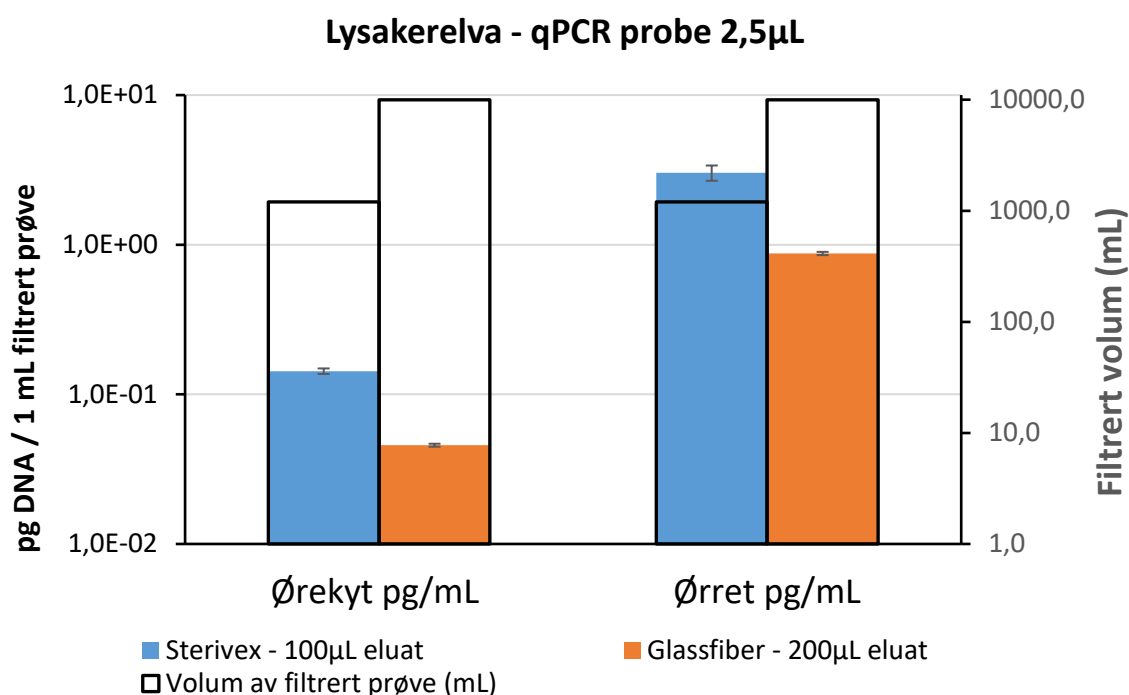
Resultatene fra sammenligningen viser i hovedsak at de fremmede artene blir påvist med begge protokollene. Det finere 0.22 μm filteret fanger som forventet flere DNA-kopier per liter vann enn det grovere 2.0 μm filteret (**Figur 8**, venstre kolonne). Men når man ser på hvor sterkt signal man får i en ddPCR, representert som antall positive dråper, blir mønsteret motsatt (**Figur 8**, høyre kolonne). Det store vannvolumet man kan filtrere på det grovere filteret øker altså totalmengden av DNA selv om man taper litt DNA per liter vann sammenlignet med det finere filteret. Dette kan være en viktig forskjell når man prøver å påvise en sjelden art med miljø-DNA, og kan føre til to ulike svar for de to filtrerte. NINA har tidligere sammenlignet 0.45 μm cellulosefilter med 2.0 μm glassfiberfilter for påvisning av blant annet *Gyrodactylus salaris* og *G. derjavinae* i lakseelva Driva, og finner det samme mønsteret der (upubliserte data). I det studiet finner vi også at sannsynligheten for påvisning øker med 2.0 μm sammenlignet med 0.45 μm filteret.



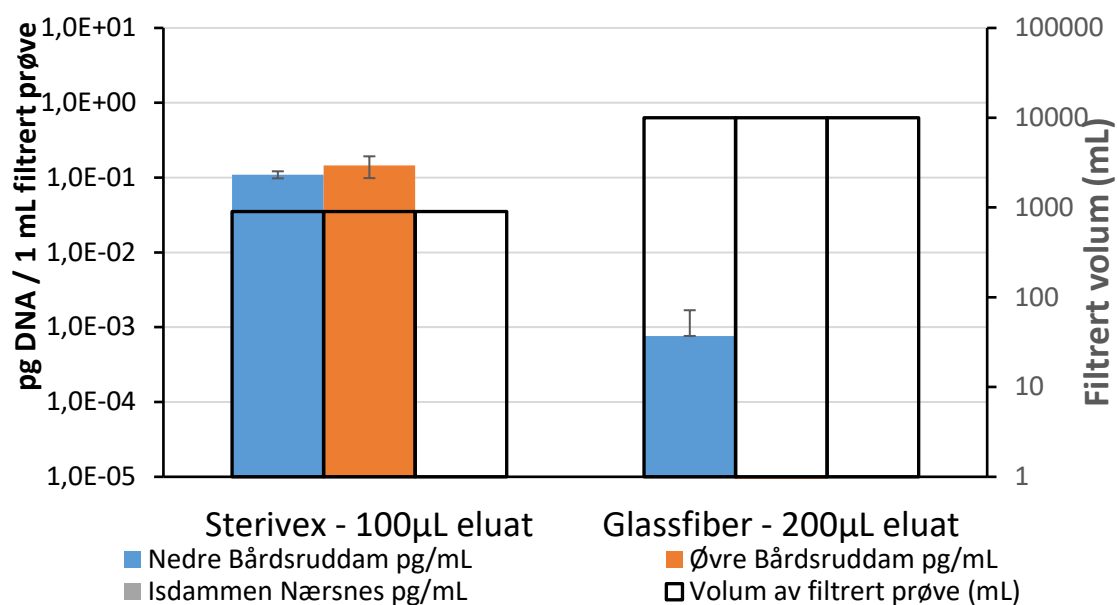
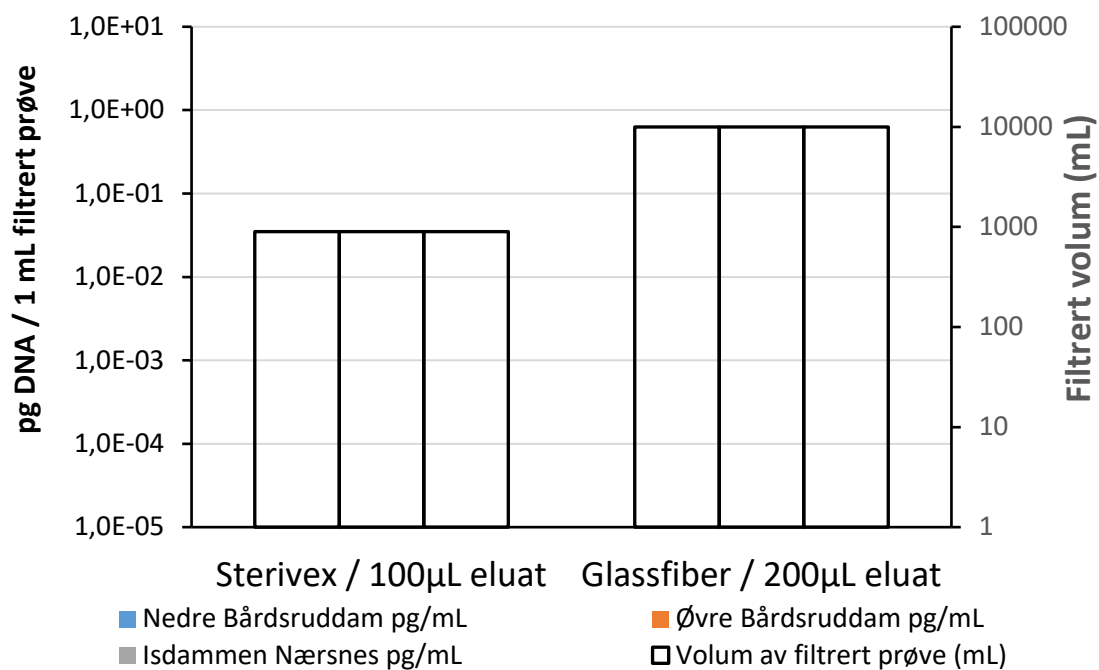
Figur 8. Figuren viser en sammenligning mellom NINAs (glassfiber) og NIVAs (Sterivex) protokoller for seks arter i fire lokaliteter. Grafene til venstre viser antall DNA-kopier per liter vann mens grafene til høyre viser antall positive dråper i digital-PCR-analysen. Kun kjøring med 1 µl templatvolum er inkludert i denne grafen.

2.3.4.2 Analyser med qPCR

Prøvene fra sammenligningstesten ble analysert med qPCR-teknologi i NIVA sitt laboratorium i Oslo. Analysene med qPCR bekrefter resultatene fra ddPCR. Det noe finere Sterivex-filteret fanger opp mer DNA per liter enn det grovere glassfiberfilteret i den relativt klare Lysakerelva (**Figur 9**). Det samme mønsteret finner man i Nedre Bårdsruddam for karpe, mens i Øvre Bårdsruddam er det kun Sterivex-filteret som fanger opp et signal. Ser man så på solabbor, er det ikke signal fra noen av filtrene. I følge ddPCR-analysene var det mer solabbor-DNA enn karpe-DNA, men likevel finner qPCR-analysene kun karpe-DNA i disse analysene. Dette var rart, men har en enkel forklaring. Disse prøvene viser problemer med PCR-inhibering, og vi diskuterer dette i neste avsnitt.



Figur 9. Sammenligning av protokoller basert på qPCR kjørt av NIVA.

(Fortsettelse **Figur 9**)**Karpe - qPCR probe 2.5µL****Solabbor - qPCR EvaGreen 2.5µL**

2.3.5 Test av PCR-inhibering

2.3.5.1 Analyser med ddPCR

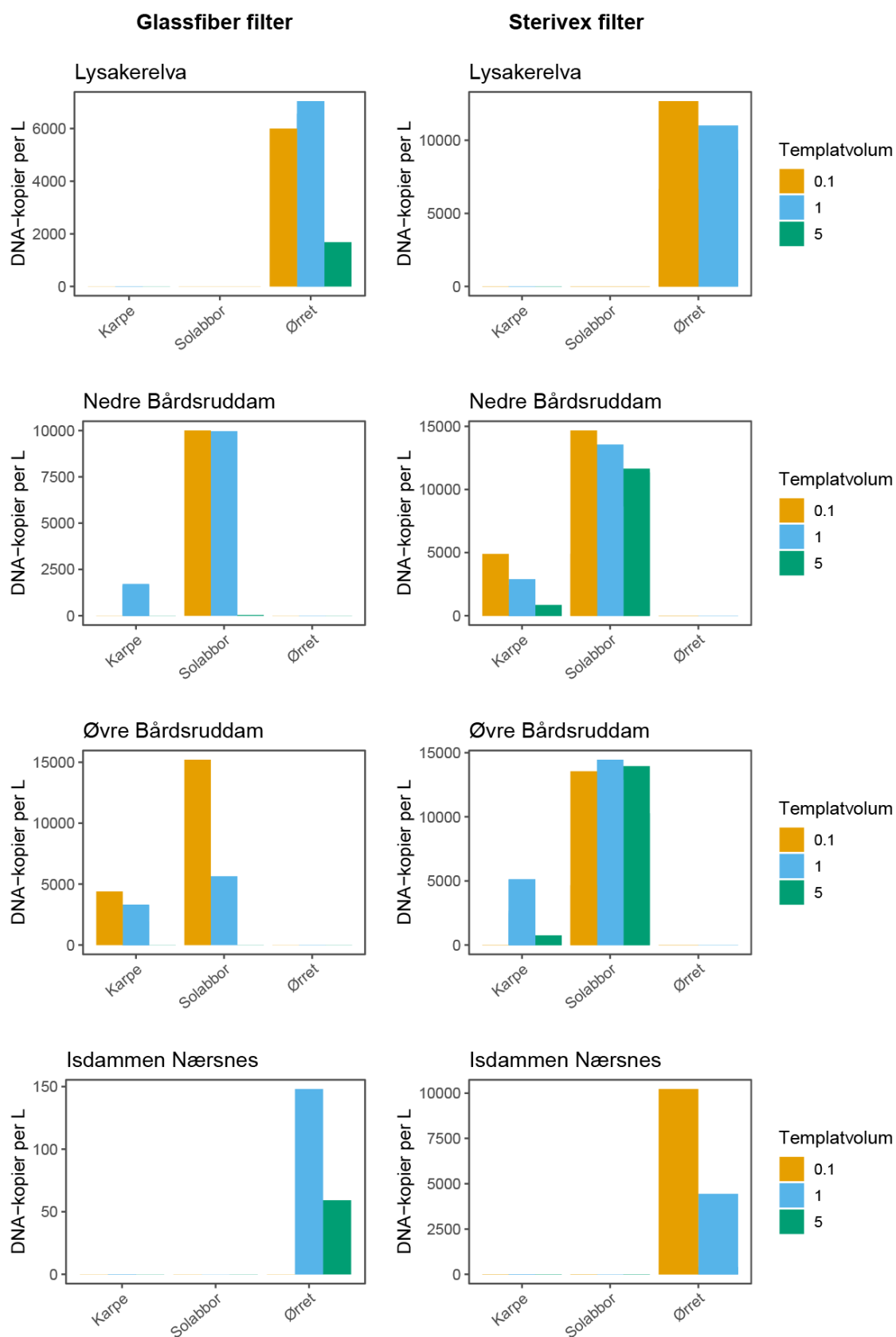
For prøvene som ble innsamlet i felleskap av NINA og NIVA gjorde vi også en uttesting av mulig inhibering i PCR-reaksjonen og hvordan dette påvirker påvisning av fremmede arter. Inhibering av en PCR-reaksjon stammer fra ulike kjemiske forbindelser i vannprøven som også finnes i DNA-prøven etter isolering. De aller fleste kjente inhibitorer er organiske forbindelser slik som salter, huminsyre, galle og urea, men også uorganiske forbindelser slik som kalsium-ioner kan inhibere PCR-reaksjonen (Schrader mfl. 2012). Dette fører til at utbyttet av DNA blir redusert og at man i noen tilfeller ikke kan påvise en art i det hele tatt. Uten inhibering forventer man at utbyttet av DNA skal være en tiendedel når man reduserer templatvolumet med en tiendedel. Dersom utbyttet istedenfor *øker* når man reduserer templatvolumet har man PCR-inhibering. Vi testet 3 ulike templatvolumer for de tre artene karpe, solabbor og ørret for de fire spesifikke lokalitetene.

Resultatene viser en klar forskjell mellom filtre og lokaliteter når det gjelder grad av inhibering (**Figur 10**). Det høye vannvolumet filtrert gjennom glassfiberfiltrene øker også mengden av inhibitorer som kan påvirke PCR-reaksjonen og vi fant en spesiell sterk inhibering i glassfiberfiltrene fra Øvre og Nedre Bårdsruddam. Analysene kjørt med 5 µl templatvolum på ddPCR-maskinen viste en total inhibering, og vi kunne ikke påvise noen av artene. Ved å redusere templatmengden til 1 µl reduserer man også mengden urene stoffer og i disse analysene påviste vi både karpe og solabbor. Ved å redusere templatvolumet til 0.1 µl doblet vi nesten utbyttet av DNA per liter vann i Øvre Bårdsruddam. Dette viser at også 1 µl templatvolum kan være problematisk i dette tilfellet.

Sammenlignet med glassfiberfilteret finner vi mye mindre inhibering med Sterivex-filteret. Selv i Øvre og Nedre Bårdsruddam er det relativt liten forskjell i DNA-utbyttet mellom de ulike templatvolumene, selv om karpe ser ut til å ha mer variasjon enn solabbor (**Figur 10**). Derimot ser vi at det positive signalet forsvinner for karpe i Øvre Bårdsruddam med bare 0.1 µl templatvolum. Da ble det rett og slett for lite karpe-DNA til at PCR-reaksjonen kunne påvise det. Nå hadde begge prøvene i dette tilfellet 2 positive dråper og var derfor rett under grensen vår på 3 dråper.

Det optimale templatvolumet avhenger her altså både av filtertype/vannvolum og lokalitet. Større vannvolumer vil medføre mer inhibering. Nå bør det også nevnes at glassfiberfiltrene fra 10 liter vann ble eluert i 200 µl mens Sterivex-filtrene fra 1 liter vann ble eluert i 100 µl, slik at konsentrasjonen av inhibitorer da ble større i glassfiberfiltrene. Ved å fortynne DNAet vil man også fortynne konsentrasjonen av inhibitorer og dermed omgå dette problemet. Mengden inhibitorer vil variere stort mellom ulike vann typer, og da spesielt i en gradient fra oligotrofe til eutrofe innsjøer. Generelt bør man tilpasse elueringsvolum i en isolering til mengden DNA man isolerer. Slik sett burde man kanskje tilpasse elueringsvolum til både hvor store vannvolumer man filtrerer og hvor eutroft vanntypen er.

Resultatene fra denne testen viser at man alltid bør teste miljø-DNA-prøver for PCR-inhibering, spesielt om man skal gjøre en kvantifisering av DNA-mengden. Vannvolum og mengden inhibitorer vil variere mye mellom lokaliteter og årstider og det vil da være vanskelig å forutsi hvor stort problemet med inhibering er.



Figur 10. Figuren viser hvordan templatvolum (DNA-volum i µl) påvirker inhibering i en ddPCR-reaksjon for protokollen med glassfiberfilter til venstre og for Sterivex-filter til høyre. Det ble ikke analysert 5 µl templatvolum for ørret for Sterivex-filtrene.

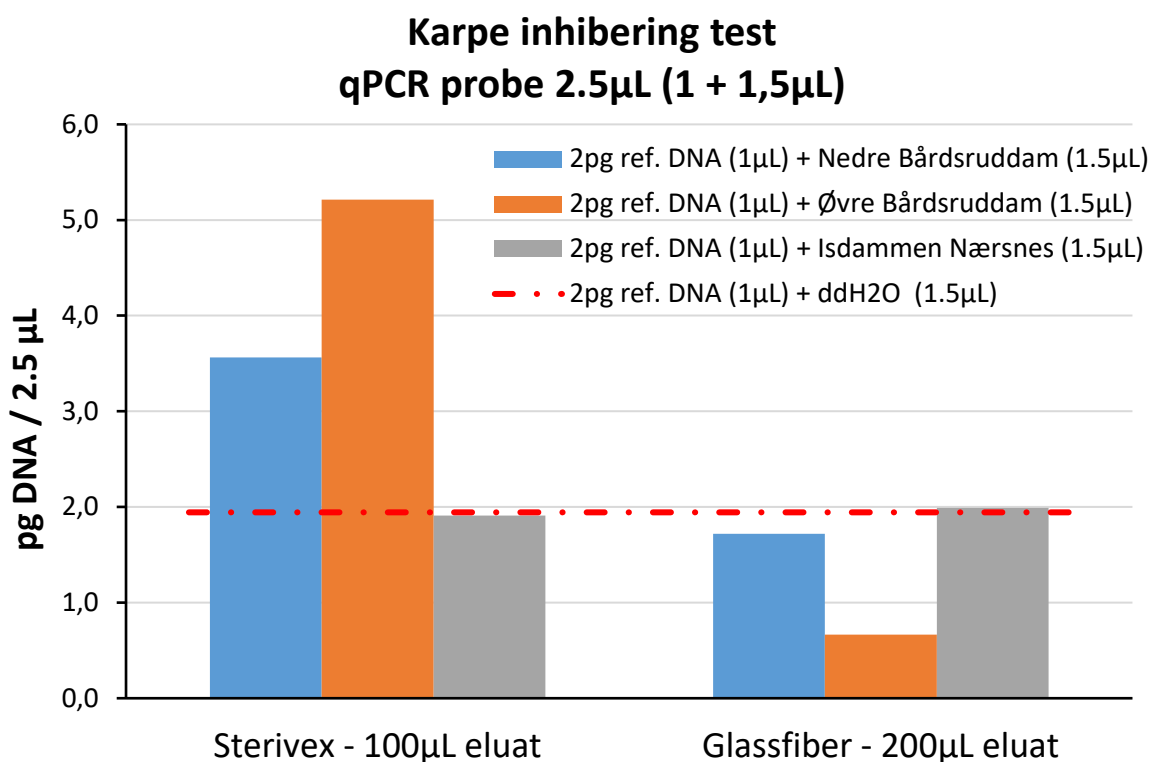
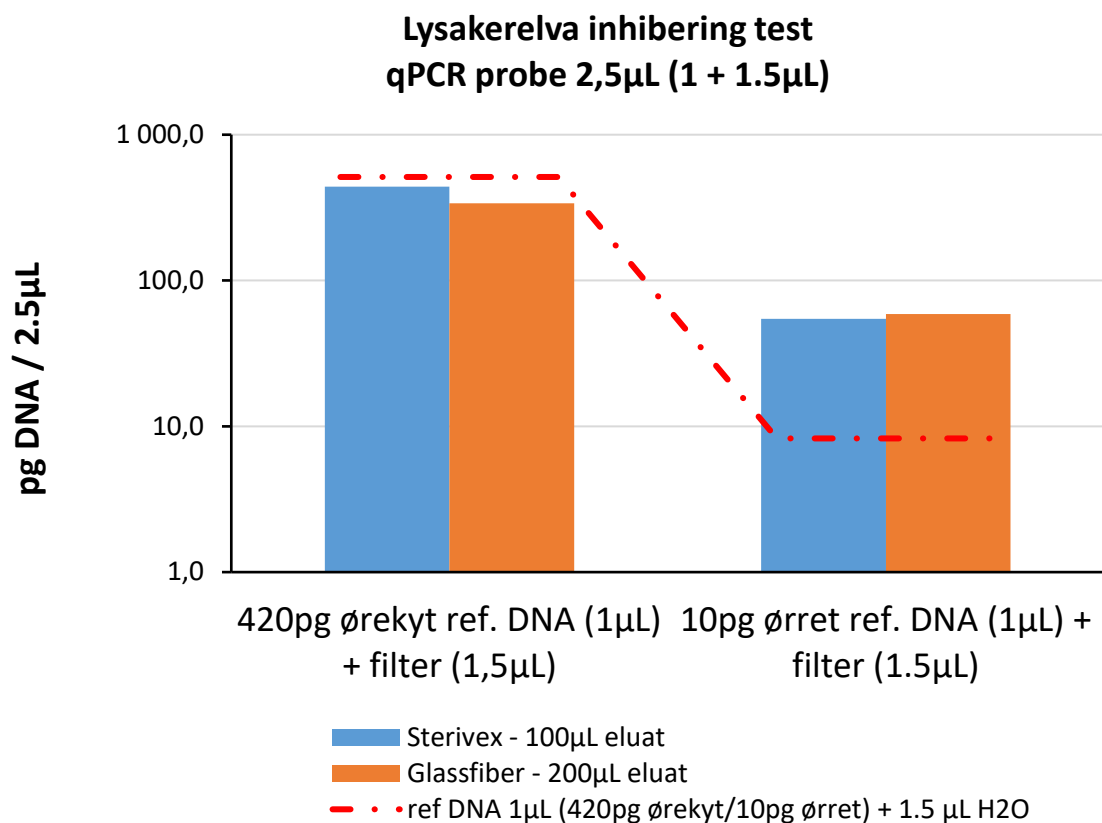
2.3.5.2 Analyser med qPCR

NIVA valgte å gjøre en litt annen test enn NINA for å se på PCR-inhibering. Istedenfor å redusere templatvolumet og se om DNA-utbyttet *øker*, ble en positiv kontrollprøve tilsatt litt av DNA-templatet fra vannfiltrene for å se om DNA-utbyttet *minker* (**Figur 11**). Den positive kontrollprøven er DNA fra rent fiskevev, og viser generelt lite inhibering. Ved å tilsette litt av DNA-templatet fra en ukjent prøve vil man da kunne se om denne prøven har inhibitorer eller ikke ved å avgjøre om DNA-utbyttet blir redusert eller ikke. Fordelen med denne metoden er man også kan teste prøver som er negative for arten man leter etter. Men dersom man finner bevis for PCR-inhibering bør man redusere eller fortynne DNA-templatet for å se om man da får et positivt signal.

For Lysakerelva viser ørekyt en liten grad av inhibering, mens ørret ikke viser inhibering (**Figur 11**). Her ser man at en tilsetning av DNA-templat fra vannfiltrene faktisk *øker* DNA-utbyttet og dermed bidrar med mye ørret-DNA til prøven i tillegg til kontrollprøven. For disse prøvene var det ingen forskjell i graden av inhibering mellom de to filtertypene.

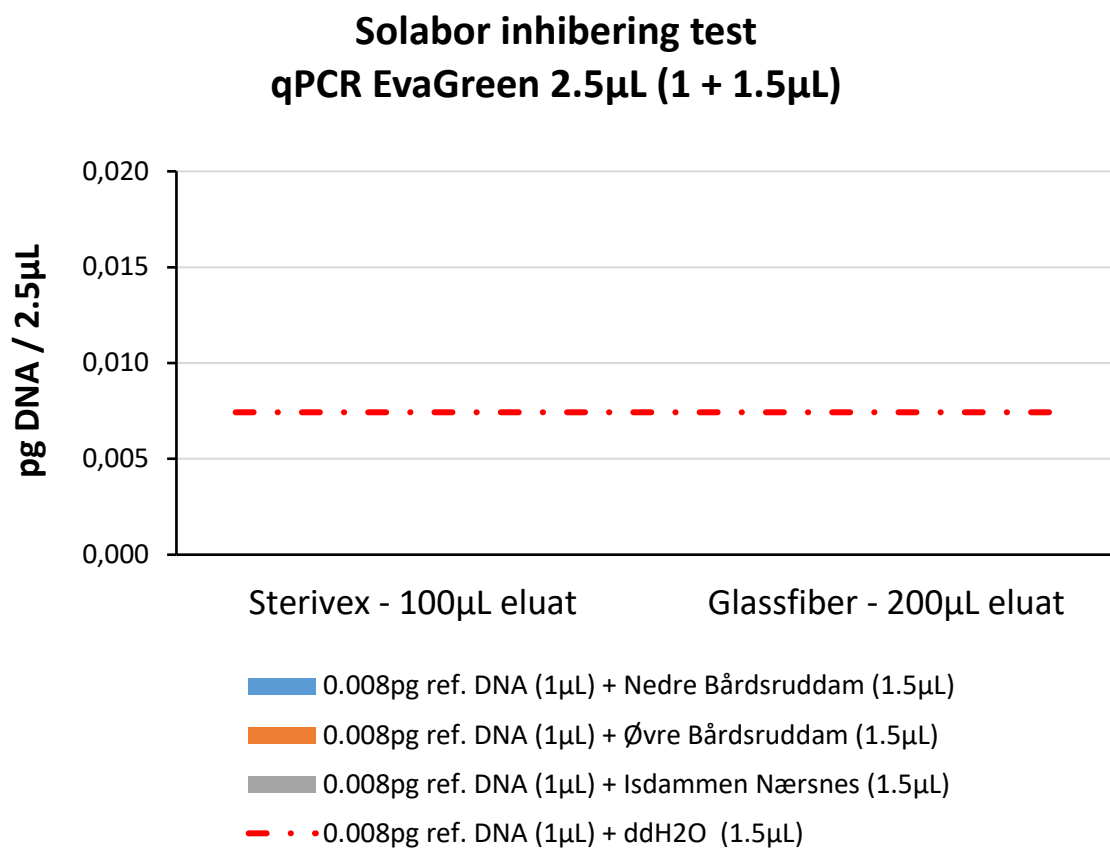
Ser man derimot på Karpe fra dammene i Røyken kommune, finner man en mye sterkere grad av inhibering i glassfiberfiltrene sammenlignet med Sterivex-filtrene for Øvre og Nedre Bårdsruddam, mens det er ingen forskjell for Isdammen Nærsnes (**Figur 11**). Igjen kan dette forklares med det store prøvevolumet på 10 liter vann og dermed en mye høyere konsentrasjon av inhibitorer i prøven. Løsningen er altså å redusere eller fortynne templatvolumet for å få et sterkere signal.

NIVA klarte ikke å påvise Solabbor i Øvre og Nedre Bårdsruddam med qPCR (**Figur 11**), selv om ddCPR resultatene viser at DNA-konsentrasjonen av solabbor var høyere enn for karpe (**Figur 10**). Grunnen til den store forskjellen ligger i hvilken polymerase som er brukt for amplifisering. Protokollen for ddPCR er basert på TaqMan Environmental Mastermix som inkluderer en masse stoffer for å redusere inhibering. Protokollen for qPCR benyttet SsoFast, da dette solabbor-assayet ikke inkluderte probe. Selv om det var tilsatt BSA og ekstra $MgCl_2$, så viste inhiberingstesten at dette ikke var nok for å få en vellykket amplifisering. For påvisning av karpe ble det brukt et TaqMan assay med probe også for qPCR, og dette fungerte utmerket.



Figur 11. Test av inhibering på en qPCR maskin der en positiv kontrollprøve blir tilsatt DNA-templat fra en miljøprøve for å se om DNA-utbyttet blir redusert.

(Fortsettelse **Figur 11**)



3 Uttesting av miljø-DNA som metode i Bymarka

Vi har tidligere brukt Bymarka til uttesting av miljø-DNA som metode (Fossøy mfl. 2017). Høsten 2016 ble sju innsjøer behandlet med rotenon for å fjerne mort fra Bymarka i Trondheim. Morten ble sett på som en trussel mot drikkevannskvaliteten for Trondheim kommune, og ble derfor fjernet. Vi benyttet oss av at den døde fisken ble plukket opp og målt etter behandlingen, noe som gjorde det mulig å se hvordan relative forskjeller i konsentrasjonen av miljø-DNA samsvarte med relative forskjeller i biomasse. Den gangen var det flere faktorer som gjorde det vanskelig å anslå den totale biomassen av hver fiskeart i hver innsjø, men vi fant likevel at konsentrasjonen av miljø-DNA samsvarte med den målte biomassen til en viss grad (Fossøy mfl. 2017)

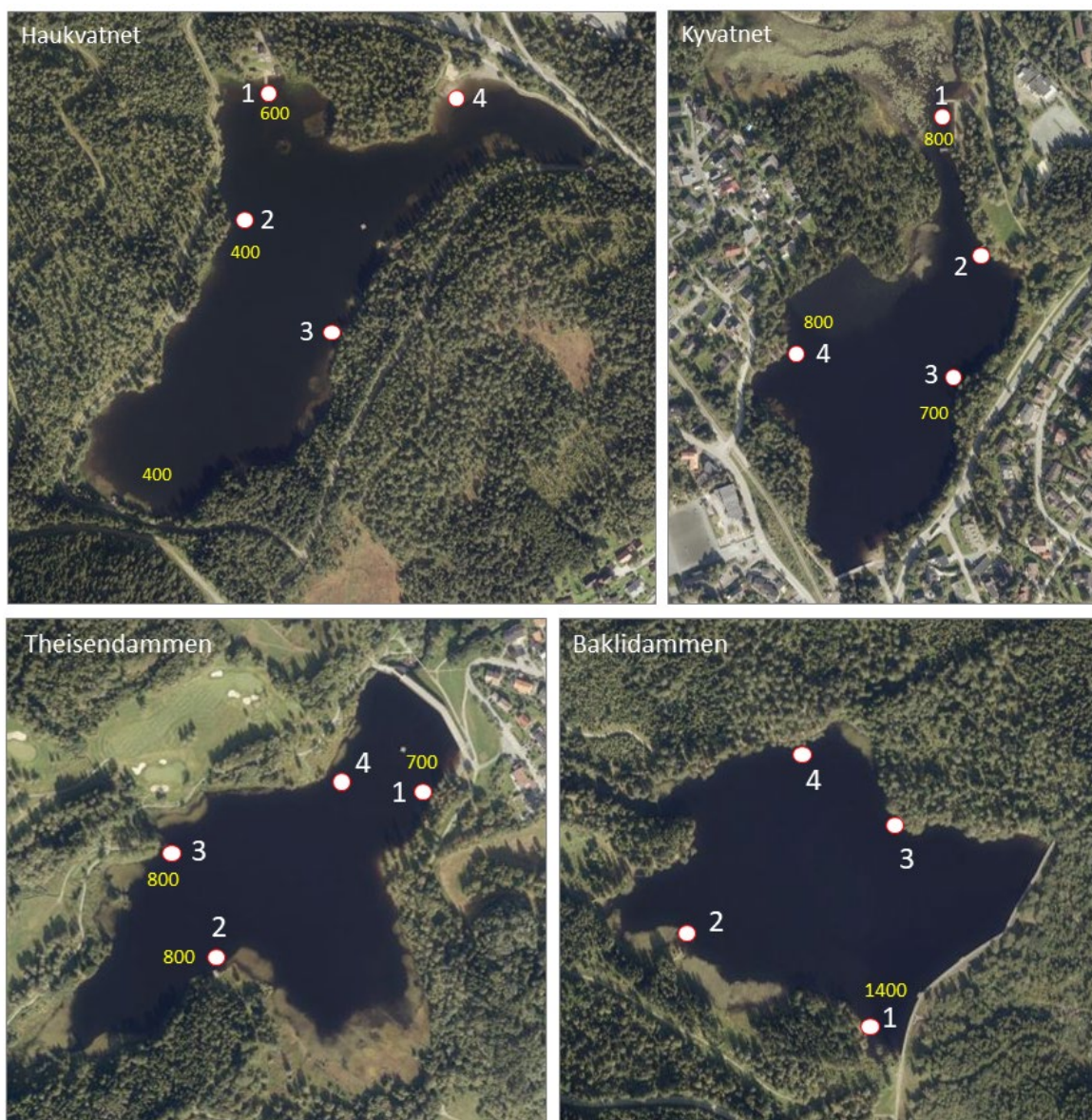
Etter nesten to år uten fisk i disse innsjøene ble det i 2018 gjeninnført ørret i fire av dem: Bakli-dammen, Theisendammen, Haukvatnet og Kyvatnet. Dette gav oss en unik mulighet til å teste to spesifikke problemstillinger rundt miljø-DNA-analyser: i) kan vi påvise noen få individer av en fiskeart i en naturlig innsjø; og ii) gjennomføre en ny test av sammenhengen mellom miljø-DNA-konsentrasjon og biomasse der vi har bedre kontroll på den totale biomassen. Dette er to svært sentrale spørsmål for bruk av miljø-DNA i forvaltningsrelaterte spørsmål, og spesielt finnes det lite kunnskap om hvor sensitiv metoden er til å påvise sjeldne arter i naturlige innsjøer.

3.1 Test av nedre grense for påvisning av miljø-DNA

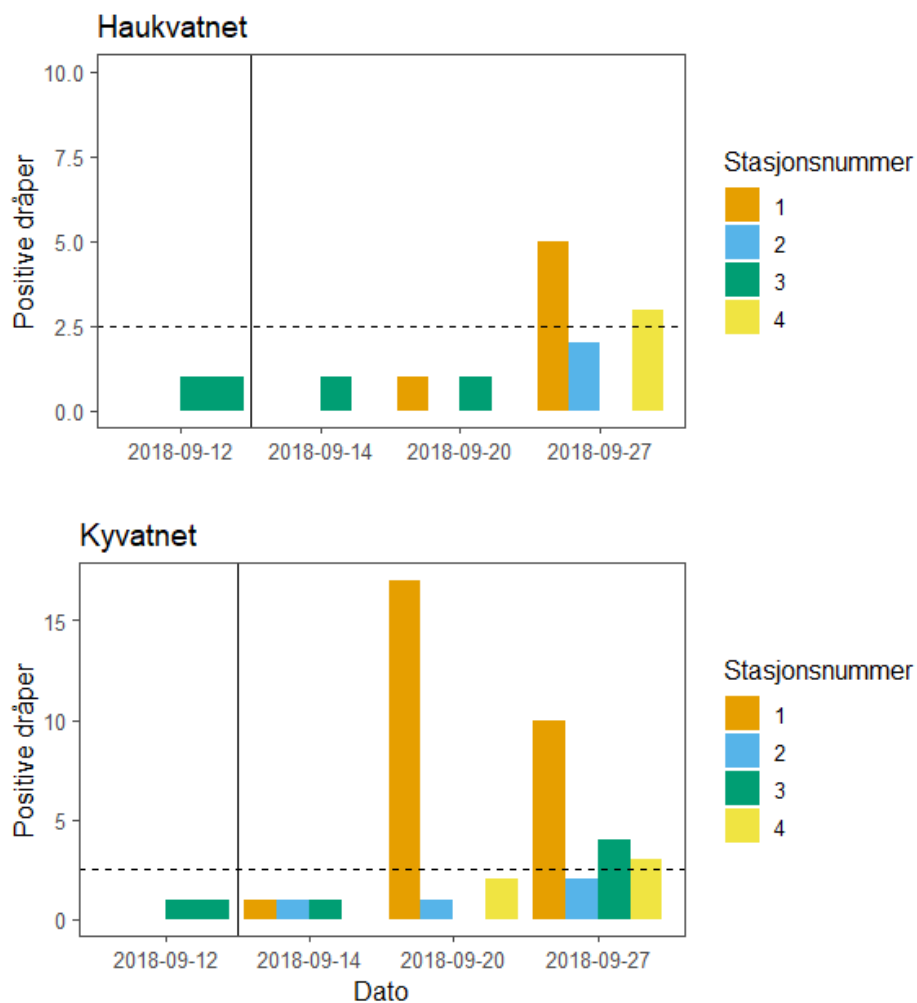
I samarbeid med Trondheim kommune og Trondheim og omland fiskeadministrasjon (TOFA) ble 20 ørret med en lengde på ca. 20 cm (med en kondisjonsfaktor på 1.1, pers med. Terje Nøst) satt ut på et spesifikt punkt (stasjon 1, se **Figur 12**) i hver av innsjøene Haukvatnet og Kyvatnet 13. september 2018. Den totale biomassen av ørret tilsvarer da ca. 400 gram i hver innsjø. Vi tok først vannprøver før utsettingen for å bekrefte at innsjøene var fisketomme. Vi tok så vannprøver direkte ved utsettingsstedet og en til tre andre lokaliteter i disse innsjøene dagen etter utsetting, en uke etter utsetting og to uker etter utsetting av fisk.

Resultatene viser at vi så vidt klarer å påvise ørret-DNA i disse innsjøene. **Figur 13** viser antall positive dråper i en digital-PCR-analyse med en artsspesifikk markør for ørret. Vi påviser her en positiv dråpe i analysen før utsetting i begge innsjøer. Dette er ikke uvanlig og vi har tidligere brukt en nedre grense på 3 positive dråper for å klassifisere en prøve som positiv (Fossøy mfl. 2017). Dersom vi bruker denne grensa ser vi at vi ikke påviser ørret-DNA dagen etter utsetting i noen innsjøene, men påviser ørret-DNA en uke etter utsetting i Kyvatnet, og i begge innsjøene to uker etter utsetting (**Figur 13**). Vi finner mest DNA nærmest utsettingsstedet (Stasjonsnummer 1), men vi påviser også ørret på noen av de andre stasjonene to uker etter utsetting.

Dette eksperimentelle studiet viser altså at det er mulig å påvise 20 fisk på 20 cm i hver av de to innsjøene, men at valget av sted for prøvetaking vil kunne påvirke konklusjonen. Vi anser at en biomasse på ca. 400 gram er høyst relevant for overvåking av fremmed ferskvannsfisk og at dagens metodikk er egnet for å fange opp en introduksjon av en ny art på et tidlig tidspunkt.



Figur 12. Oversikt over stasjoner for prøvetaking av miljø-DNA i hvite tall. I Haukvatnet og Kyvatnet ble det satt 20 fisk på 20 cm 13. september ved stasjon 1. Gule tall angir antall fisk satt ut 4. oktober.



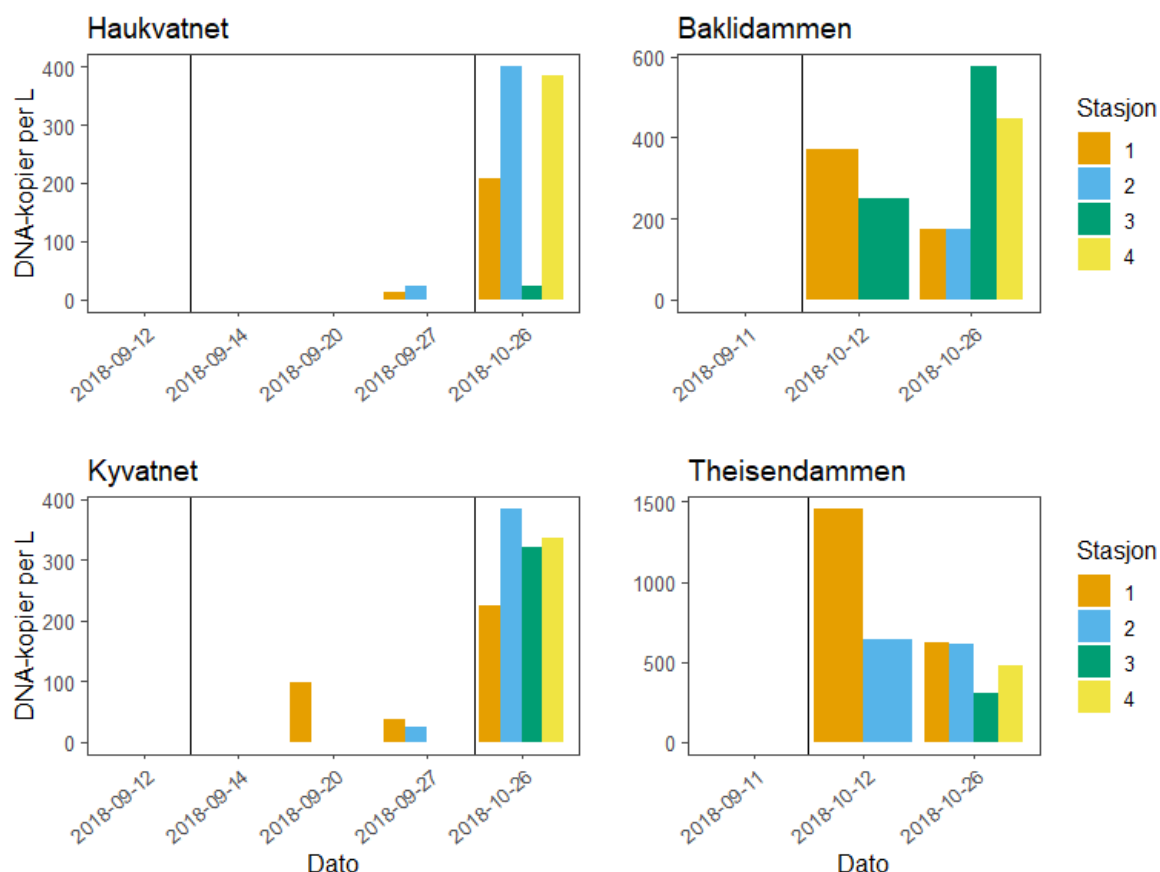
Figur 13. Påvisning av ørret ved bruk av miljø-DNA etter utsetting av 20 ørret på ca. 20 cm i hver av innsjøene Haukvatnet og Kyvatnet. Grafen viser antall positive dråper i en digital-PCR, før utsetting av fisk til venstre for den vertikale linjen og ved flere tidspunkter etter utsetting til høyre. Den horisontale stipla linja viser grensa på tre positive dråper for å klassifisere en prøve som positiv. Se **Figur 12** for plassering av stasjoner.

3.2 Sammenligning av miljø-DNA-konsentrasjon og biomasse av fisk

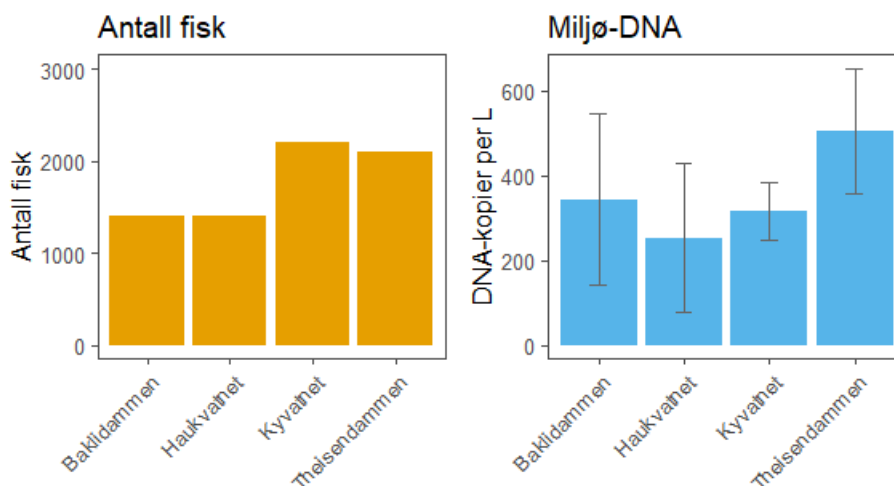
Den 4. oktober 2018 gjennomførte Trondheim kommune og TOFA en større planlagt utsetting av fisk i fire innsjøer i Bymarka. Til sammen ble det satt ut i overkant av 7000 1-somrig ørret med en gjennomsnittlig lengde på 97 mm og en gjennomsnittlig vekt på 10 gram (pers. med. Terje Nøst) fordelt på 1400 fisk i Haukvatnet, 2200 fisk i Kyvatnet, 1400 fisk i Baklidammen og 2100 fisk i Theisendammen (**Figur 12**). Med unntak av Baklidammen ble fiskene fordelt på 3 ulike utslippspunkter i innsjøene, mens all fisk i Baklidammen ble satt ut på et punkt.

Vannprøver fra alle fire innsjøer ble innsamlet før utsetting av fisk. Vi tok så nye vannprøver fra Baklidammen og Theisendammen en uke etter utsetting og i alle fire innsjøene tre uker etter utsetting av fisk. Vi antok da at både fisk og miljø-DNA ville spre seg rundt i innsjøen i løpet av tre uker.

Resultatene viser at vi finner relativt høye konsentrasjoner av ørret-DNA både en uke (12. oktober) og tre uker (26. oktober) etter utsetting (**Figur 14**). Som studiet før rotenonbehandlingen i 2016 også viste finner vi store variasjoner mellom lokaliteter innen hver innsjø (Fossøy mfl. 2017).



Figur 14. DNA-konsentrasjon fra vannprøver i forhold til dato og utsetting av fisk for hver stasjon i fire innsjøer i Bymarka. Noter forskjellig skala for de ulike innsjøene. Vertikale linjer markerer utsetting. Se **Figur 12** for plassering av stasjoner.



Figur 15. Sammenligning mellom antall fisk utsatt i hvert vann og gjennomsnittlig (\pm standardfeil) konsentrasjon av miljø-DNA i de ulike innsjøene fra prøvetaking 26. oktober.

Antall fisk varierte altså fra 1400 til 2200 mellom de fire innsjøene. Miljø-DNA resultatene inneholdt mye variasjon innen innsjøer, og det var ingen sterk sammenheng mellom antall fisk og den gjennomsnittlige konsentrasjonen av miljø-DNA (**Figur 15**). Thølsendammen hadde høyest konsentrasjon og skilte seg noe fra de andre innsjøene, mens Kyvatnet hadde lavere konsentrasjon enn forventet ut fra antallet fisk.

Fiskene som ble satt ut var bare 10 gram i snitt, og det betyr at den totale biomassen fortsatt må regnes som veldig lav i disse innsjøene (fra 14 til 22 kg). Til sammenligning ble det etter rotenonbehandlingen i 2016 plukket ca. 1200 kg mort i Kyvatnet og 550 kg mort i Haukvatnet (Fossøy mfl. 2017). Den lave biomassen kan kanskje forklare hvorfor vi ikke finner en bedre sammenheng mellom antall fisk og miljø-DNA-konsentrasjonen i dette studiet.

Dessverre kan vi ikke sammenligne konsentrasjonen av miljø-DNA i dette studiet med dataene fra 2016 da vi har endret både filtertype og protokoller etter flere optimaliseringer av metoden siden den gang. Men dersom man sammenligner konsentrasjonen av miljø-DNA i lys av den store forskjellen i biomasse ser man at utbyttet av DNA har økt med optimaliseringene av protokollene våre (Fossøy mfl. 2017).

Det finnes noen studier som viser at miljø-DNA kan brukes til å estimere relativ biomasse mellom innsjøer og elver, men ofte er det knyttet mye usikkerhet til disse estimatene (Takahara mfl. 2012, Lacoursière-Roussel mfl. 2016, Lacoursière-Roussel mfl. 2016, Fossøy mfl. 2017, Pont mfl. 2018). Dybde, gjennomstrømningshastighet, sprangsjikte, eutrofiering og temperatur vil påvirke konsentrasjonen av miljø-DNA og dermed estimatet av relativ biomasse. Vi har tidligere vist at det også er store forskjeller i konsentrasjonen av miljø-DNA innen innsjøer, og hvor og hvordan man tar prøven vil ha stor påvirkning på estimatet for biomasse (Fossøy mfl. 2017). I det samme studiet viser vi også at konsentrasjonen av miljø-DNA varierer mye gjennom året. Miljø-DNA krever derfor fortsatt en del forskning og utvikling før det kan brukes som et estimat for biomasse i forvaltnings spørsmål.

4 Oppfølging av miljø-DNA i Telemarkskanalen 2018

Uønsket spredning av gjedde er blitt et stort problem, og vi satte altså gjedda på førsteplass på vår prioriteringsliste (**Tabell 4**). I Telemarkskanalen har Miljødirektoratet fått satt opp en elektrisk fiskesperre ved Kjellidal sluse (**Figur 16**) for å hindre at gjedda sprer seg oppover kanalen og truer en verneverdig bestand av stor ørret.



Figur 16. Bilde av den elektriske fiskesperra ved Kjellidal sluse. Foto: Rolf Sivertsgård/NINA.

Vi har i to tidligere år brukt miljø-DNA til å undersøke om det finnes gjedde oppstrøms den elektriske sperra, men har så langt ikke kunnet påvise gjedde-DNA forbi Kjellidal sluse. I 2018 intensiverte vi prøvetakingen og tok flere prøver fra flere ulike lokaliteter, og vi tok prøver like nedstrøms og oppstrøms selve sperra **Figur 17**. Dette innebærer at vi tok en prøve inne i båtkanalen mellom sperra og slusa, noe som potensielt kunne vise om gjedde passerte sperra.

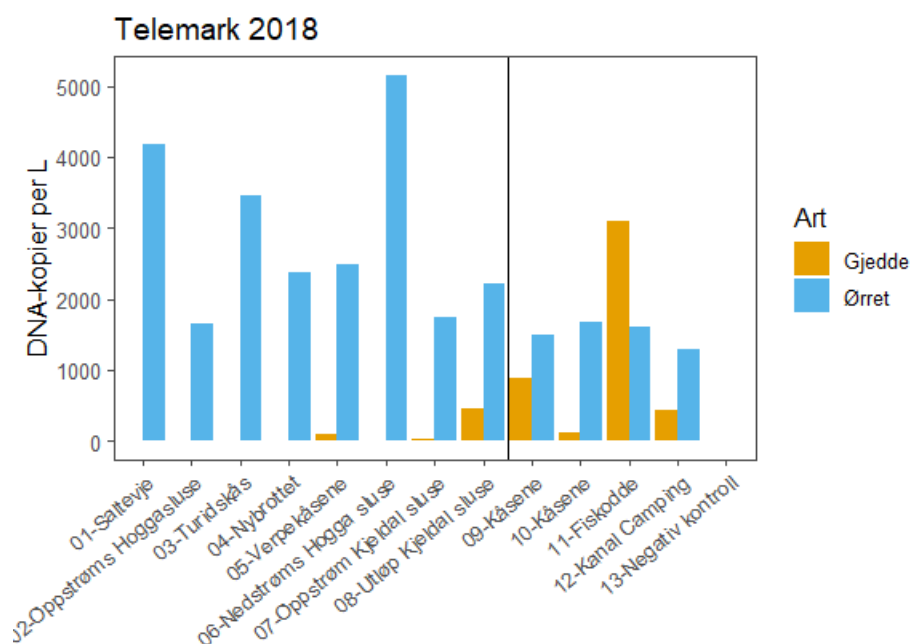


Figur 17. Kart over lokaliteter for miljø-DNA-prøver i Telemarkskanalen 2018. Basert på bakgrunnskart fra www.norgebilder.no.

Resultatene fra 2018 påviser for første gang gjedde oppstrøms Kjellidal sluse ved bruk av miljø-DNA (**Figur 18**). Vi fant positive prøver av gjedde på to stasjoner oppstrøms slusa, i tillegg til positive prøver mellom sperra og slusa (**Figur 19**). Vi påviste ikke gjedde-DNA oppstrøms Hogga sluse.

Påvisning av gjedde-DNA oppstrøms Kjellidal sluse bekrefter dermed at det finnes gjedde ovenfor sperra. Under innsamling av vannprøver ble det også observert en antatt gjeddeyngel i elva oppstrøms Kjellidal sluse. Dette betyr at det kan ha vært gyting ovenfor sperra i 2018. Årsaken til spredningen er fortsatt ukjent. Det har tidligere vært diskutert om sperra ikke virker som opprinnelig tiltenkt, og om det er mulig at gjedda har klart å passere sperra. Men gjedde blir også stadig bevisst spredt av menneskehånd, og det er mulig at fisk har blitt flyttet bevisst oppstrøms Kjellidal sluse. Vannprøven som ble tatt mellom sperra og slusa viser at det står gjedde rett oppstrøms den elektriske sperra. Dette kan skyldes at gjedda har tatt seg forbi sperra, men ikke kommer videre oppover gjennom båtslusa. Men det kan like gjerne skyldes at fisk har blitt flyttet forbi Kjellidal sluse, som så har blitt med strømmen tilbake ned gjennom båtslusa. Det er da mulig at fisken er fanget på oppsiden av fella, og ikke kommer seg forbi den elektriske strømmen og videre nedover båtkanalen. Uansett årsak bør man nå undersøke strekningen mellom Kjellidal og Hogga sluser mer nøyaktig og vurdere om tiltak er nødvendig for å hindre videre spredning.

Selv om vi ikke fant positive prøver av gjedde oppstrøms Hogga sluse vil vi presisere at vi ikke kan garantere at det ikke finnes gjedde der. Fremtidige undersøkelser bør utøke antall prøver i dette området for å undersøke dette nærmere.



Figur 18. DNA-konsentrasjon for ørret og gjedde fra ulike lokaliteter oppstrøms (mot venstre) og nedstrøms (mot høyre) den elektriske fiskesperra ved Kjellidal sluse i Telemarkskanalen (markert med vertikal linje).



Figur 19. Bildet viser båtkanalen nedover mot fiskesperra med utsikt fra Kjellidal sluse. I dette området ble det altså påvist gjedde-DNA. Foto: Rolf Sivertsgård/NINA.

5 Konklusjon

5.1 Uttesting av protokoller for overvåking av fremmed ferskvannsfisk

Denne rapporten omhandler en videreføring av miljø-DNA som metode for overvåking av fremmed ferskvannsfisk i norske elver og innsjøer. I dette arbeidet har vi gjort en utstrakt gjennomgang og uttesting av eksisterende protokoller for å påvise fremmed ferskvannsfisk ved hjelp av miljø-DNA i vannprøver.

I vår prioriteringsliste har vi indikert at gjedde, ørekyt, pukkellaks og regnbueørret bør ansees som de viktigste fremmede artene å overvåke i Norge. Vi kan bekrefte at alle disse artene har arts-spesifikke protokoller som fungerer. I tillegg har vi testet protokoller og bekreftet at disse fungerer på vannprøver innsamlet i dette studiet for: abbor, bekkerøye, karpe, karuss og solabbor. En publisert protokoll for sørv ble testet, men ikke bekreftet i dette studiet, og en publisert protokoll for Canadarøye ble karakterisert som usikker og kunne ikke bekreftes med vannprøver i dette studiet.

Blant de fremmede artene vi har gått gjennom i dette studiet mangler det bekrefta protokoller for sørv, sandkryper, suter og krøkle fra vår prioriteringsliste på 11 arter, samt dvergmalle, gullfisk, lagesild, krøkle og regnlaue. Markøren vi testa for Canadarøye er også usikker utfra resultatene i denne testen. Forvaltningen må her vurdere om det er ønskelig å utvikle protokoller også for disse artene.

En test av kryssamplifisering mellom arter viste at de genetiske markørene i dette studiet mest sannsynlig er artsspesifikke. I slike tester er man helt avhengig av at DNA-prøvene man benytter er basert på rent vev, og ikke på noen måte er kontaminert av andre arter. Når det gjelder fisk er dette ofte problematisk da flere arter ofte er fanget i samme garn, lagret i samme fiskstamp og målt og veid med det samme utstyret. Vi gjorde også en test for å avsløre uønsket PCR-inhibering i analysene våre, og fant kraftig inhibering i flere prøver. Mengden inhibitorer vil variere mye mellom lokaliteter og årstider og vi vil anbefale å alltid teste for inhibering ved analyser av miljø-DNA.

Selv om det foregår en utstrakt overvåking i mange ferskvannslokaliteter i Norge, er det relativt liten overlapp mellom disse og aktuelle lokaliteter for overvåking av fremmed ferskvannsfisk. Overvåking for tidlig oppdagelse av fremmede arter må rettes mot områder som er valgt ut på grunnlag av vår nåværende kunnskap om forekomst og spredningsvektorer. Ved bruk av miljø-DNA til overvåking er det følgelig nødvendig med egne feltrunder i utvalgte lokaliteter for om mulig oppnå tidlig påvisning av fremmede arter. I noen tilfeller kan det likevel være annen aktivitet i samme region/vassdrag, slik at feltarbeidet kan kombineres.

En sammenligning av to ulike protokoller for innsamling og analyser av miljø-DNA-prøver viser at begge fanger opp de fremmede artene i denne testen. De to ulike feltprotokollene inkluderer to svært ulike filtertyper med et 0.22 µm Sterivex-filter og et 2.0 µm glassfiberfilter. Dette gjør seg utslag i hvor store vannvolumer det er mulig å filtrere og i denne testen filtrerte vi ca. 1 liter vann gjennom Sterivex-filteret og 10 liter vann gjennom glassfiberfilteret. Resultatene våre viser at det finere filteret fanger mer DNA per liter vann, men at det høye vannvolumet som er mulig med det grovere filteret fanger mer DNA totalt sett. Andre studier viser av dette kan være avgjørende for om man påviser en sjelden art eller ikke. Vi vil anbefale fortsatt bruk av begge disse

metodene, da de begge har fordeler og bakdeler. Sterivex filtrene er svært praktiske i bruk siden i de kommer i sterile forpakninger til engangsbruk. Glassfiberfiltrene krever egne filterholdere, som gjenbrukes og må klores mellom prøvetakinger. Men vannforekomster med mye partikler eller algeoppblomstringer representerer en stor utfordring for filtrering av vann gjennom finmaskete filtre. Erfaringsmessig vil prøvetaking og filtrering i felt være enklere og raskere med det grovere glassfiberfilteret. Et mye større vannvolum kan også være gunstig om man ønsker å bruke prøvene til andre analyser, som for eksempel DNA-metastrekkoding for å se på diversitet av bunndyr. Vi antar da at et større vannvolum vil fange opp DNA fra flere arter. Miljø-DNA er en metode i rivende utvikling, og vi ser at det hele tiden kommer små justeringer som forbedrer både feltinnsamling og labanalyser. Det er derfor vanskelig per i dag å anbefale én standard som alle bør følge.

Selv om metoder og analyser stadig blir utviklet er det noen standarder man alltid bør følge. Vi anbefaler at det alltid blir tatt minst to parallelle vannprøver fra hver lokalitet for å kunne estimere «sampling-varians» og regne på «occupancy» i statistiske modeller. Resultatene våre viser en sterk effekt av PCR-inhibering og man bør derfor alltid å teste for dette. Man bør også alltid inkludere positive og negative prøver og vi anbefaler at både felt-negative og lab-negative prøver inkluderes. Felt-negative prøver kan være rent vann som man har med ut i felt og filtrerer etter at man har tatt de faktiske prøvene for å teste for mulig kontaminering av utstyret. Lab-negative prøver bør inkluderes som del av isolering av DNA og følge de samme protokollene som miljø-DNA-filtrene.

I løpet av dette studiet har vi også diskutert styrker og svakheter ved bruk av qPCR og ddPCR. Sistnevnte er nok mest nøyaktig når det gjelder å kvantifisere mengde DNA. Men ved svært lave DNA-konsentrasjoner er det mulig at en qPCR-analyse er mer sensitiv enn en ddPCR-analyse. Vi tror at dette kan skyldes selve prinsippet for en ddPCR, som gjør om én stor fysisk prøve til mange små separate analyser inne i opptil 20,000 dråper. Har man bare en eller noen få DNA-kopier av arten man er ute etter å påvise vil disse kunne havne i en enkelt dråpe. Uansett hvor god PCR-reaksjon man har eller hvor mange cykler man kjører eller hvor mange dråper man genererer vil man bare få denne ene positive dråpen. I og med at vi bruker en nedre grense på tre positive dråper for å karakterisere en prøve som positiv, vil ikke en slik prøve bli tolket som en påvisning av arten. En qPCR vil ikke bli påvirket på samme måte og kan derfor muligens påvise lavere konsentrasjoner av DNA i en prøve. Vi vil derfor anbefale at prøver der en ddPCR viser en eller to positive dråper kjøres om på en qPCR for å bekrefte resultatet.

I tillegg til å følge gode standarder ved feltinnsamling og labanalyser må man også vurdere biologien til arten man er ute etter å påvise, samt sesongvariasjoner, temperatur, omrøringer og vær. Langvarig regn vil for eksempel føre til økt fortynning av mengden DNA i vannet og grumsete vann som gjør det vanskeligere å filtrere vannet. Om en art er vårgyter eller høstgyter vil kunne påvirke når det er størst sannsynlighet for å påvise den.

5.2 Eksperimentene i Bymarka i Trondheim

Resultatene fra eksperimentene i Bymarka viste at det er mulig å påvise 20 fisk med 20 cm lengde i to innsjøer, men at valget av sted for prøvetaking vil kunne påvirke konklusjonen. Så vidt vi vet er dette første gang noen har gjort et slikt eksperiment i naturlige innsjøer. Antall fisk og total biomasse er høyst relevant for påvisning av uønsket spredning av fremmed ferskvannsfisk, og dette resultatet er svært viktig i forhold til miljø-DNA som metode for overvåking.

Etter utsetting av fisk i fire innsjøer kunne vi ikke vise til en klar forskjell i DNA-konsentrasjon i forhold til antall fisk. Nå var det en relativt liten biomasse som ble satt ut og forskjellene i antall fisk var ikke veldig stor. Derimot viser resultatene at utviklingen av metodene vi har gjort siden oppstarten av dette prosjektet har ført til en stor økning i utbyttet av DNA og dermed muligheten for å påvise sjeldne arter.

5.3 Spredning av gjedde i Telemarkskanalen

Undersøkelsene i Telemarkskanalen har nå pågått siden 2016, og vi har tidligere ikke kunnet påvise gjedde-DNA oppstrøms den elektriske fiskesperra. Men en utvidet prøvetaking i 2018 viser nå for første gang gjedde-DNA oppstrøms Kjellidal sluse og sperra. Vi påviser gjedde på to forskjellige lokaliteter mellom Kjellidal og Hogga sluser, samt inne i båtkanalen oppstrøms sperra. Den positive prøven som ble tatt mellom sperra og slusa viser med all sannsynlighet at det står gjedde rett oppstrøms den elektriske sperra. Dette kan skyldes at gjedda har tatt seg forbi sperra, men ikke kommer videre oppover gjennom båtslusa. Men det kan like gjerne skyldes at fisk har blitt flyttet forbi Kjellidal sluse, som så har blitt med strømmen tilbake ned gjennom båtslusa.

Vi kunne ikke påvise gjedde oppstrøms Hogga sluse, men våre resultater kan ikke garantere at det ikke finnes gjedde i dette området. Vi anbefaler derfor at dette området bør undersøkes nærmere både med miljø-DNA og konvensjonelle undersøkelser.

6 Referanser

- Andersen, JH, Kallenbach, E, Hesselsøe, M, Knudsen, SW, Møller, PR, Bekkevold, D, Hansen, BK & Thaulow, J. 2016. Steps toward nation-wide monitoring of non-indigenous species in Danish marine waters under the Marine Strategy Framework Directive. Rapport 7022-2016 DK3. NIVA Denmark.
- Andersen, JH, Kallenbach, E, Kjeldgaard, MB, Knudsen, SW, Dale, T, Eikrem, W, Fagerli, C, Green, G, Hobæk, A, Oug, E, Thaulow, J, Hesselsøe, M, Bekkevold, D, Jacobsen, LMW, Kuhn, J, Møller, PR, Olesen, CA, Car, H & Stuer-Lauridsen, F. in print. A baseline study of the occurrence of non-indigenous species in Danish harbours. NIVA Denmark Report.
- 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.
- 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. Norsk institutt for naturforskning.
- Boyer, F, Mercier, C, Bonin, A, Le Bras, Y, Taberlet, P & Coissac, E. 2016. obitools: a unix-inspired software package for DNA metabarcoding 16(1): 176-182.
- Britton, JR, Davies, GD & Harrod, C. 2010. Trophic interactions and consequent impacts of the invasive fish *Pseudorasbora parva* in a native aquatic foodweb: a field investigation in the UK. *Biological Invasions* 12(6): 1533-1542.
- Clavero, M & Villero, D. 2014. Historical ecology and invasion biology: long-term distribution changes of introduced freshwater species. *BioScience* 64(2): 145-153.
- Clusa, L & García-Vázquez, E. 2018. A simple, rapid method for detecting seven common invasive fish species in Europe from environmental DNA. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 28(3): 619-629.
- Collins, CM, Kerr, R, McIntosh, R & Snow, M. 2010. Development of a real-time PCR assay for the identification of *Gyrodactylus* parasites infecting salmonids in northern Europe. *Diseases of Aquatic Organisms* 90(2): 135-142.
- Cucherousset, J & Olden, JD. 2011. Ecological impacts of nonnative freshwater fishes. *Fisheries* 36(5): 215-230.
- Davison, PI, Créach, V, Liang, WJ, Andreou, D, Britton, JR & Copp, GH. 2016. Laboratory and field validation of a simple method for detecting four species of non-native freshwater fish using eDNA. *Journal of Fish Biology*: n/a-n/a.
- Eichmiller, JJ, Bajer, PG & Sorensen, PW. 2014. The relationship between the distribution of common carp and their environmental DNA in a small lake. *Plos One* 9(11).
- Eloranta, AP, Johnsen, SI, Power, M, Bærum, KM, Sandlund, OT, Finstad, AG, Rognerud, S & Museth, J. 2018. Introduced European smelt (*Osmerus eperlanus*) affects food web and fish community in a large Norwegian lake. *Biological Invasions*.
- Forsgren, E, Hesthagen, T, Finstad, AG, Wienerroither, R, Nedreaas, K & Bjelland, O. 2018. Fremmedartslista. Artsgruppe fisker, vurdering av økologisk risiko. Artsdatabanken.
- 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.

- Furlan, EM & Gleeson, D. 2016. Environmental DNA detection of redbfin perch, *Perca fluviatilis*. Conservation Genetics Resources 8(2): 115-118.
- Gozlan, RE. 2009. Response by R Gozlan: Biodiversity crisis and the introduction of non-native fish: solutions, not scapegoats. Fish and Fisheries 10(1): 109-110.
- Gozlan, RE, Britton, JR, Cowx, I & Copp, GH. 2010. Current knowledge on non-native freshwater fish introductions. Journal of Fish Biology 76(4): 751-786.
- Hesthagen, T & Sandlund, OT. 2012. Gjedde, sørv og suter: status, vektorer og tiltak mot uønsket spredning. NINA Rapport 669. Norsk institutt for naturforskning.
- Hesthagen, T & Kleiven, E. 2013. Forekomst av reproduserende bestander av bekkerøye (*Salvelinus fontinalis*) i Norge pr. 2013. NINA Rapport 900. Norsk institutt for naturforskning.
- Hesthagen, T, Sandlund, OT, Finstad, AG & Johnsen, BO. 2015. The impact of introduced pike (*Esox lucius* L.) on allopatric brown trout (*Salmo trutta* L.) in a small stream. Hydrobiologia 744(1): 223-233.
- Hesthagen, T & Sandlund, OT. 2016. Spredning av ferskvanns-fisk i Norge. En fylkesvis oversikt og nye registreringer i 2015. NINA Rapport 1205. Norsk institutt for naturforskning.
- Hesthagen, T & Sandlund, OT. 2016. Tiltaksrettet kartlegging og overvåking av fremmed ferskvannsfisk – en tilstandsvurdering av spredning pr. 2016. NINA Rapport 1302. Norsk institutt for naturforskning.
- Hesthagen, T & Sandlund, OT. 2017. Canadarøye – fremmed fisk med potensial for stor skade. NINA Fakta nr. 1-2017
- Hesthagen, T, Bolstad, GH & Kleiven, E. 2018. Distribution of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) across Norwegian watersheds - is it an invasive species? . Fauna norvegica 38: 1-8.
- Kleiven, E & Hesthagen, T. 2012. Fremmede fiskearter i ferskvann i Aust-Agder - Historikk, status og konsekvenser. NINA Rapport 665. Norsk institutt for naturforskning.
- Lacoursière-Roussel, A, Côté, G, Leclerc, V & Bernatchez, L. 2016. Quantifying relative fish abundance with eDNA: a promising tool for fisheries management. Journal of Applied Ecology 53(4): 1148-1157.
- Lacoursière-Roussel, A, Rosabal, M & Bernatchez, L. 2016. Estimating fish abundance and biomass from eDNA concentrations: variability among capture methods and environmental conditions. Molecular Ecology Resources: n/a-n/a.
- Leung, B, Lodge, DM, Finnoff, D, Shogren, JF, Lewis, MA & Lamberti, G. 2002. An ounce of prevention or a pound of cure: bioeconomic risk analysis of invasive species. Proceedings of the Royal Society B 269(1508): 2407-2413.
- Matejusova, I, Doig, F, Middlemas, SJ, Mackay, S, Douglas, A, Armstrong, JD, Cunningham, CO & Snow, M. 2008. Using quantitative real-time PCR to detect salmonid prey in scats of grey Halichoerus grypus and harbour Phoca vitulina seals in Scotland - an experimental and field study. Journal of Applied Ecology 45(2): 632-640.
- Minamoto, T, Uchii, K, Takahara, T, Kitayoshi, T, Tsuji, S, Yamanaka, H & Doi, H. 2017. Nuclear internal transcribed spacer-1 as a sensitive genetic marker for environmental DNA studies in common carp *Cyprinus carpio*. Molecular Ecology Resources 17(2): 324-333.

- Miya, M & Nishida, M. 2000. Use of mitogenomic information in Teleostean molecular phylogenetics: a tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 17(3): 437-455.
- Miya, M, Sato, Y, Fukunaga, T, Sado, T, Poulsen, JY, Sato, K, Minamoto, T, Yamamoto, S, Yamanaka, H, Araki, H, Kondoh, M & Iwasaki, W. 2015. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science* 2(7): 150088.
- Museth, J, Johnsen, SI, Eloranta, A, Sandlund, OT, Linløkken, A, Bærum, KM & Dokk, JG. 2017. Fiskesamfunnet i Storsjøen i 2016. Effekter av reguleringsinngrep, fiske og introdusert krøkle. NINA Rapport 1347. Norsk institutt for naturforskning.
- Nathan, LR, Jerde, CL, Budny, ML & Mahon, AR. 2015. The use of environmental DNA in invasive species surveillance of the Great Lakes commercial bait trade. *Conservation Biology* 29(2): 430-439.
- Olsen, J, Lewis, C, Massengill, R, Dunker, K & Wenburg, J. 2015. An evaluation of target specificity and sensitivity of three qPCR assays for detecting environmental DNA from Northern Pike (*Esox lucius*). *Conservation Genetics Resources* 7(3): 615-617.
- Pont, D, Rocle, M, Valentini, A, Civade, R, Jean, P, Maire, A, Roset, N, Schabuss, M, Zornig, H & Dejean, T. 2018. Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. *Scientific Reports* 8(1): 10361.
- Roy, M, Belliveau, V, Mandrak, NE & Gagné, N. 2018. Development of environmental DNA (eDNA) methods for detecting high-risk freshwater fishes in live trade in Canada. *Biological Invasions* 20(2): 299-314.
- Sala, OE, Chapin, FS, Armesto, JJ, Berlow, E, Bloomfield, J, Dirzo, R, Huber-Sanwald, E, Huenneke, LF, Jackson, RB, Kinzig, A, Leemans, R, Lodge, DM, Mooney, HA, Oesterheld, M, Poff, NL, Sykes, MT, Walker, BH, Walker, M & Wall, DH. 2000. Biodiversity - Global biodiversity scenarios for the year 2100. *Science* 287(5459): 1770-1774.
- Schrader, C, Schielke, A, Ellerbroek, L & Johne, R. 2012. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology* 113(5): 1014-1026.
- Shafi, M & Maitland, M. 1971. Comparative aspects of the biology of pike *Esox lucius* in two Scottish lochs. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh* 71B.
- Shokralla, S, Hellberg, RS, Handy, SM, King, I & Hajibabaei, M. 2015. A DNA mini-barcoding system for authentication of processed fish products. *Scientific Reports* 5: 15894.
- Taberlet, P, Bonin, A, Zinger, L & Coissac, E. 2018. *Environmental DNA: for biodiversity research and monitoring*. Oxford University Press, Oxford.
- Takahara, T, Minamoto, T, Yamanaka, H, Doi, H & Kawabata, Zi. 2012. Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLoS ONE* 7(4): e35868.
- Thomsen, PF, Kielgast, J, Iversen, LL, Møller, PR, Rasmussen, M & Willerslev, E. 2012. 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. 2012. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology* 21(11): 2565-2573.
- 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.
- Wilcox, TM, McKelvey, KS, Young, MK, Jane, SF, Lowe, WH, Whiteley, AR & Schwartz, MK. 2013. Robust detection of rare species using environmental DNA: the importance of primer specificity. *PLOS ONE* 8(3): e59520.
- Wilcox, TM, Carim, KJ, McKelvey, KS, Young, MK & Schwartz, MK. 2015. The dual challenges of generality and specificity when developing environmental DNA markers for species and subspecies of *Oncorhynchus*. *PLoS ONE* 10(11): e0142008.

7 Vedlegg

Vedlegg tabell 1. Oversikt over publiserte og tilgjengelige markører for fremmede ferskvannsfisk.

Art	Referanse	Software brukt til primerdesign	Gen	Probe	Produktlengde	Annealing temperatur	Testet for kryss-amplifikasjon	Testet på vannprøver	Kommentar
Abbor	Furlan og Gleeson (2016)	NA	12S	Ja	92	60	Ja	Ja	
Bekkerøye	Wilcox mfl. (2013)		CytB	Ja	140	53	Amplifiserer med Bull trout	Ja	
Canadarøye	Lacoursière-Roussel mfl. (2016)	Primer Express	COI	Ja	66	NA	Ja	Ja	
Dvergmalle	ERI Report 44 Hydrolysis assays internal report								Ikke offentlig tilgjengelig
Gjedde	Olsen mfl. (2015)	Primer Express	COI	Ja		60	Ja	Ja	
Gjedde	Olsen mfl. (2015)	Primer Express	CTRL	Ja		60	Ja	Ja	
Gjedde	Olsen mfl. (2015)	Primer Express	CytB	Ja		60	Ja	Ja	
Gjedde	Fossøy mfl. (2017)	Genious og Primer Express	CytB	Ja	64	58	Ja	Ja	
Gullfisk	Andersen mfl. (in print)	Geneious og Primer Express	COI	Ja	97	60	Ja	Ja	
Karpe	Eichmiller mfl. (2014)	Primer Express	CytB	Ja	149	60	Ja	Ja	
Karpe	Minamoto mfl. (2017)	Primer Express	CytB	Ja	NA	58	Ja	Ja	
Karpe	Minamoto mfl. (2017)	Primer Express	ITS	Ja	84	58	Ja	Ja	
Karpe	Takahara mfl. (2012)	NA	CytB	Ja	78	60	Ja	Ja	
Karuss	Roy mfl. (2018)	Primer Express	COI	Ja	110	58	Ja	Ja	
Mort	Fossøy mfl. (2017)	Geneious og Primer Express	16S	Ja	62	58	Ja	Ja	
Pukkellaks	Andersen mfl. (in print)	Geneious og Primer Express	COI	Ja	163	60	Ja	Ja	
Pukkellaks	Upublisert Jens Carlson, UCD						Ja	Ja	Ikke offentlig tilgjengelig
Regnbueørret	Wilcox mfl. (2015)	Decipher and Primer Express	NADH	Ja	102	60	Ja	Ja	
Regnbueørret	Andersen mfl. (in print)	Geneious og Primer Express	CytB	Ja	78	60	Ja		
Regnlaue	Davison mfl. (2016)	Primer-Primer assay	COI	Nei	251	61	Ja	Ja	
Solabbor	Davison mfl. (2016)	Primer-Primer assay	COI	Nei	310	61	Ja	Ja	
Solabbor	Andersen mfl. (in print)	Primer-Primer assay	CytB	Nei	132	61	Nei	Nei	
Sørv	Nathan mfl. (2015)	NCBI BLAST	CTRL	Nei	203	NA	Ja	Ja	
Ørekyt	Fossøy mfl. (2017)	Geneious og Primer Express	CTRL	Ja	69	58	Ja	Ja	

Vedlegg tabell 2. PCR-protokoller for qPCR-analyser kjørt av NIVA i dette studiet.

Art	Primer navn	DNA-sekvens (Forward, reverse og probe)	Annealing temperatur	Sekvens (nM)	Produkt lengde (bp)	Referanse
Ørret	Salmonid FOR	CGGAGCATCTTTCTTCTTATCTG T	60	900	95	Matejusova mfl. (2008)
	<i>S. trutta</i> REV	CTCCGATATTTTCAGGTTTCTTATATAGG		900		
	<i>S. trutta</i> Probe	VIC -CGAGGACTCTACTATGGTTC-MGB		250		
Karpe	CpITS1-F	TTCAAAGACCCCCGTAAC	58	900	84	Minamoto mfl. (2017)
	CpITS1-R	GCCATGCCGCACACA		900		
	CpITS1-P	VIC-TCACGACCCCCCTTATTTTCCAAAACC-TAMRA		120		
Ørekyt	Orekyt_CTRL_19-42_F	GGATGGCTAACCCATATCTCAACT	60	900		Fossøy mfl. (2017)
	Orekyt_CTRL_68-88_R	GTCAAACCCAAAAGCAAGGA		900		
	Orekyt_CTRL_51-64_P	FAM-CGCACGCTCTCGAA		250		
Solabbor	L.gibb_F	GCCTAGCCACCCAAATTCTCACA	58	900	100	Thaulow mfl. (upublisert)
	L.gibb_R	ACACATCTGCCGTGATGT		900		
	L.gibb_P	TGATATCGCAACCGCTTCTCCTCAGT		250		
	LGCB1f	AACATGAAACATCGGAGTCGTCTTG	68	400	132	
	LGCB1r	TAGGGCACTGCTGAAAGGAGATT		400		
	LeGi-16S-F	GGACACGGGGCTAAACCAAAT	68	1000	113	Clusa og García-Vázquez (2018)
	LeGi-16S-R	GGGCTCTTAGTTGTGGAATTGCA		1000		

Vedlegg tabell 3. Fremmede arter (R=regionalt fremmed, F=fremmed) i prioritert rekkefølge med informasjon om problemområder i Norge.

Prioritet	Art	Fremmed kategori	Problemområder i Norge	Prioritetsområder i Norge	Eksisterende overvåking	Egen overvåking nødvendig	Tiltak mulig
1	Gjedde	R	Oppland, Buskerud, Telemark, Hordaland, Rogaland, Trøndelag	1. Sperillen/Begnavassdraget 2. Krøderen/Hallingdalselva 3. Telemarksvassdraget 4. Ølja/Nordmarksvassdraget 5. Rogaland 6. Trøndelag	1. Eget prosjekt på fiske-sperra i Telemarkskanalen i 2018	Ja	
2	Pukkellaks	F	Øst-Finnmark spesielt, sør til og med Hordaland	Finnmark	Norske lakseelver	Nei	
2	Regnbueørret	F	Hordaland, Sogn og Fjordane, Møre og Romsdal, Trøndelag		Norske lakseelver	Nei	
3	Ørekyt	R	Sør-Norge, pluss Trøndelag og Nordland	1.Hardangervidda (Hordaland og Buskerud), 2.Nordland (Røssåga), 3.Rogaland (Suldalsområdet)	FIST 2021 (Røssvatn), eget prosjekt fra Fylkesmannen i Hordaland på Hardangervidda i 2018	Ja	
4	Sørv	R	Telemark, Agder, Rogaland	1. Telemark (Grenlands-området) 2. Agder, 3. Rogaland (Jæren), 4.Oppland (Hunnselva)	Nei	Ja	
5	Mort	R	Telemark, Østlandet	1.Oppland 2. Heddalsvatnet (Skienassdraget, 3. Rørosområdet, 4. Trysil	Nei	Ja	
6	Abbor	R	Hordaland, Trøndelag	Hordaland	Nei	Ja	
7	Sandkryper	F	Buskerud/Vestfold (Numedalslågen), Vest-Agder (Nesheimvassdraget)	1.Nær Numedalslågen og 2.Nesheimvassdraget	Nei	Ja	
8	Suter	F	Rogaland, Aust-Agder, Telemark, Akershus, Oppland	Rogaland (Tysvær, Haugesund), Agder, Telemark (Grenland), Oppland (Gran).	Nei	Ja	
9	Karpe	F	Nedre Telemark, Akershus, Østfold	1. Nedre Telemark	Nei	Ja	
10	Krøkle	R	Hedmark	Rendalsvassdraget (Storsjøen)	Nei	Ja	
11	Bekkerøye	F	Agder, Telemark, Hedmark	Agder	Nei	Ja	
11	Canadarøye	F	Nord-Trøndelag	Nord-Trøndelag, Hedmark (Narsjøen)	Nei	Ja	
11	Dvergmalle	F	Akershus (Asker, Bærum), Oslo	Asker, Bærum, Oslo	Nei	Ja	Ja
11	Gulfisk	F	Agder, Østlandet	Enkeltlokalteter	Nei	Ja	Ja
11	Karuss	R	Sør-Norge	Sør-Norge	Nei	Ja	
11	Lagesild	R	Finnmark (Pasvik)	Finnmark (Pasvik)	Nei	Ja	
11	Regnlaue	F	Agder	Agder	Nei	Ja	Ja
11	Solabbor	F	Akershus, Buskerud, Østfold	Akershus (Asker), Buskerud, (Røyken) Østfold (Moss)	Nei	Ja	Ja

*Norsk institutt for naturforskning, NINA,
er en uavhengig stiftelse som forsker på natur og
samspillet natur–samfunn.*

*NINA ble etablert i 1988. Hovedkontoret er i
Trondheim, med avdelingskontorer i Tromsø,
Lillehammer, Bergen og Oslo. I tillegg driver NINA
Sæterfjellet avlsstasjon for fjellrev på Oppdal,
og forskningsstasjonen for vill laksefisk på lms i
Rogaland.*

*NINAs virksomhet omfatter både fors–kning
og utredning, miljøovervåking, rådgivning og
evaluering. NINA har stor bredde i kompetanse og
erfaring med både naturvitere og sam–funnsvitere
i staben. Vi har kunnskap om artene, naturtypene,
samfunnets bruk av naturen og sammenhenger
med de store drivkreftene i naturen.*

ISSN:1504-3312
ISBN: 978-82-426-3325-5

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