

Analysen av miljø-DNA for påvisning av amfibier

På oppdrag fra Lørenskog kommune

Frode Fossøy, Hege Brandsegg, Rolf Sivertsgård

Trondheim 06.10.2023

UPUBLISERT

TILGJENGELIGHET
Åpen

PROSJEKTLEDER
Frode Fossøy

ANSVARLIG FORSKNINGSSJEF
Ingeborg Palm Helland

OPPDRAGSGIVER(E)/BIDRAGSYTER(E)
Lørenskog kommune

OPPDRAGSGIVERS REFERANSE

KONTAKTPERSON(ER) HOS OPPDRAGSGIVER/BIDRAGSYTER
Marlene Wæge Stubberud

Innhold

1 Innledning.....	3
1.1 Bakgrunn.....	3
1.2 Formål.....	3
2 Material og metode.....	4
2.1 Prøvetaking.....	4
2.2 Labanalyser	5
2.3 Resultater og diskusjon	6
3 Litteratur	8

1 Innledning

1.1 Bakgrunn

Analyser av miljø-DNA er en ny metode for overvåking av arter og økosystemer der innsamling av prøver ikke er avhengig av langvarig innsats eller taksonomisk ekspertise i felt (Thomsen & Willerslev 2015, Valentini mfl. 2016). Denne metoden har vist seg å være svært effektiv med tanke på overvåking av sjeldne arter samtidig som den muliggjør innsamling av prøver ved hjelp av publikum (Thomsen mfl. 2012b, Biggs mfl. 2015, Balasingham mfl. 2017).

Metoden drar nytte av at alle organismer frigir DNA til omgivelsene sine, som man dermed kan samle inn ved for eksempel filtrering av vannprøver. Gjennom analyser med ulike genetiske markører er det mulig å påvise tilstedeværelsen av en enkelt art eller beskrive artssamfunn i lokaliteten man tok prøver fra. Da DNA brytes ned raskt i naturen, vil en påvisning av en eller flere arter indikere at denne eller disse finnes på den undersøkte lokaliteten eller har vært i området innenfor en relativt kort periode. Metoden er svært sensitiv og det trengs i prinsippet kun en enkelt DNA-kopi for å kunne påvise tilstedeværelsen av en spesifikk art. Sammenligning med konvensjonelle metoder har vist at miljø-DNA-metoden ofte er mer sensitiv og finner flere arter (Thomsen mfl. 2012a).

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

1.2 Formål

NINA har på bestilling fra Lørenskog kommune undersøkt tilstedeværelse av storsalamander (*Triturus cristatus*), småsalamander (*Lissotriton vulgaris*) og spissnutefrosk (*Rana arvalis*).

2 Material og metode

2.1 Prøvetaking

Miljø-DNA-prøver ble samlet inn av oppdragsgiver ved hjelp av NINAs miljø-DNA **Tabell 1**. Vann ble filtrert gjennom et vannfilter (NatureMetrics) ved hjelp av en batteridrevet peristaltisk pumpe (Bürkle Vampire). Filtrene ble deretter tilsatt ATL-buffer (Qiagen) for konservering frem til videre analyser på Senter for Biodiversitetsgenetikk (NINAGEN) i Trondheim.

Tabell 1. Oversikt over prøver innsamlet i dette prosjektet.

PrøveID	Dato	Tidspunkt	Nord	Øst	Lokalitet	Lokalitetstype
1	05.5.23	14:00	59.92499	10.98236	Olavskilden	Dam
2	05.5.23	14:30	59.92499	10.98236	Olavskilden	Dam
3	08.5.23	14:00	59.94489	10.95650	Luhr skole	Kunstig erstatningsdam
4	08.5.23	14:30	59.94489	10.95650	Luhr skole	Kunstig erstatningsdam
5	10.5.23	09:15	59.93560	11.01358	Kurland v/TIFF-løkka	Fangdam
6	10.5.23	09:45	59.93560	11.01358	Kurland v/TIFF-løkka	Fangdam
7	10.5.23	12:15	59.92631	10.92589	Lysås	Dam
8	10.5.23	12:45	59.92631	10.92589	Lysås	Dam
11	10.5.23	14:30	59.91602	11.00394	Stensrud	Skogsdam
12	10.5.23	15:00	59.91602	11.00394	Stensrud	Skogsdam
13	22.5.23	10:20	59.89616	10.92437	Igletjern	Skogstjern
14	22.5.23	11:00	59.89616	10.92437	Igletjern	Skogstjern
15	22.5.23	12:10	59.88816	10.94002	Skullerudtjern	Skogstjern
16	22.5.23	12:30	59.88816	10.94002	Skullerudtjern	Skogstjern
17	24.5.23	10:15	59.93456	10.96816	Vesletjernet	Vann
18	24.5.23	10:40	59.93456	10.96816	Vesletjernet	Vann
19	24.5.23	12:30	59.88977	10.98955	Losby	Dam
20	24.5.23	12:50	59.88977	10.98955	Losby	Dam
21	24.5.23	13:10	59.88669	10.99830	Østmork	Dam
22	24.5.23	13:30	59.88669	10.99830	Østmork	Dam
23	24.5.23	14:05	59.89530	10.97773	Vestmork	Dam
24	24.5.23	14:30	59.89530	10.97773	Vestmork	Dam
25	25.5.23	13:20	59.90678	10.93519	Lintjernet	Tjern
26	25.5.23	13:40	59.90678	10.93519	Lintjernet	Tjern

2.2 Labanalyser

DNA ble isolert fra filterprøvene ved hjelp av en NucleoSpin Plant II (Machery-Nagel) protokoll. Arts-spesifikke markører for storsalamander (Thomsen mfl. 2012b) og småsalamander (Smart mfl. 2015) ble analysert ved hjelp av digital PCR (ddPCR) og spissnutefrosk (Thomsen mfl. 2012b) ble analysert ved hjelp av qPCR. En qPCR-analyse oppformerer en liten bit av DNA bestemt av den genetiske markøren man bruker ved hjelp av et varmesensitivt enzym. En prøve regnes som positiv dersom man ser en klar økning av DNA-konsentrasjonen målt ved hjelp av fluorescens under PCR-analysen. C_T -verdien viser hvor mange PCR-sykler det tar før DNA-mengden gir et klart fluorescens signal. En lavere C_T betyr derfor høyere konsentrasjoner av DNA. Alle prøver ble kjørt i triplikater, sammen med en positiv og negativ kontroll. For å kunne karakterisere en prøve som positiv i en qPCR-analyse forventer vi at minst to av tre replikater skal være positive. En ddPCR oppformerer DNA i omtrent tjue tusen dråper samtidig, der vi forventer at minst 3 dråper er positive for å konkludere med at prøven er positiv.

3 Resultater og diskusjon

Resultatene fra analysene påviser både storsalamander og småsalamander i prøvene 3 og 4 fra Luhr skole (**Tabell 2**). I tillegg er prøvene 1 og 2 fra Olavskilden positive for småsalamander. Til sist er den ene prøven (prøve 21) fra Østmork også positiv for småsalamander. Vi antar derfor at det finnes småsalamander i Olavskilden, Luhr Skole og Østmork, mens storsalamander finnes i dammen ved Luhr skole. Det ble ikke påvist noen signaler fra spissnutefrosk i noen av prøvene i qPCR-analysen.

Falske positive resultater kan forekomme i miljø-DNA analyser, men vi prøver å unngå disse ved å sette strenge kriterier. Vi kan likevel ikke helt utelukke at noen av de positive prøvene kan være falske positive. Usikkerheten rundt en negativ prøve er ikke kjent. At en art *ikke* blir påvist kan skyldes flere årsaker, som for eksempel vannkvalitet i lokaliteten, temperatur, tetthet av arten, prøvevolumet som ble innsamlet samt behandling og analysering av prøven på lab. En negativ miljø-DNA-prøve bør derfor ikke sees på som et endelig bevis for at arten ikke finnes i lokaliteten.

Tabell 2. Resultater av ddPCR-analyser av stor- og småsalamander. For hver prøve genereres det omtrent tjue tusen dråper som testes for forekomst av mål arten hver for seg. Vi forventer at minst 3 dråper er positive for å konkludere med at prøven er positiv.

PrøveID	Vannvolum	Vanntemperatur	Storsalamander			Småsalamander		
			DNA-konsentrasjon	Dråper totalt	Positive dråper	DNA-konsentrasjon	Dråper totalt	Positive dråper
1	1.5	9.5	0.00	20400	0	0.17	20400	3
2	1.5	9.5	0.00	19381	0	0.36	19381	6
3	3.5	12.5	1.02	20802	18	7.72	20802	136
4	5	12.5	1.02	20680	18	19.73	20680	344
5	4	8.5	0.00	20802	0	0.00	20802	0
6	4	8.5	0.00	21286	0	0.00	21286	0
7	3	8.2	0.00	19527	0	0.00	19527	0
8	4.5	8.2	0.00	20112	0	0.00	20112	0
11	4.5	8.5	0.00	21851	0	0.00	21851	0
12	5	8.5	0.00	20216	0	0.00	20216	0
13	3	15.7	0.00	19912	0	0.00	19912	0
14	3.5	15.7	0.00	20929	0	0.00	20929	0
15	5	16.8	0.00	19257	0	0.06	19257	1
16	5	16.8	0.00	20156	0	0.00	20156	0
17	5	17	0.00	20171	0	0.06	20171	1
18	5	17	0.00	17612	0	0.00	17612	0
19	3	18.7	0.00	20928	0	0.00	20928	0
20	3	18.7	0.00	20482	0	0.00	20482	0
21	2.5	18.5	0.00	20900	0	1.13	20900	20

22	2.5	18.5	0.00	21029	0	0.00	21029	0
23	5	16.7	0.00	20188	0	0.12	20188	2
24	3	16.7	0.00	21771	0	0.00	21771	0
25	5	16.5	0.00	21509	0	0.00	21509	0
26	5	16.5	0.00	20295	0	0.06	20295	1
Negativ kontroll			0.00	21533	0	0.00	21533	0
Positiv kontroll			14.45	20072	245	3373.04	19907	1877 5

4 Litteratur

- Balasingham, KD, Walter, RP, Mandrak, NE & Heath, Daniel D. 2017. Environmental DNA detection of rare and invasive fish species in two Great Lakes tributaries. *Molecular Ecology* 27(1): 112-127.
- Biggs, J, Ewald, N, Valentini, A, Gaboriaud, C, Dejean, T, Griffiths, RA, Foster, J, Wilkinson, JW, Arnell, A, Brotherton, P, Williams, P & Dunn, F. 2015. Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation* 183(0): 19-28.
- Fossøy, F, Brandsegg, H, Sivertsgård, R, Pettersen, O, Sandercock, BK, Solem, Ø, Hindar, K & Mo, TA. 2019. Monitoring presence and abundance of two gyrodactylid ectoparasites and their salmonid hosts using environmental DNA. *Environmental DNA* in press.
- 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. NINA Rapport 1299. Norsk institutt for naturforskning.
- Fossøy, F, Thaulow, J, Anglès d'Auriac, M, Brandsegg, H, Sivertsgård, R, Mo, TA, Sandlund, OT & T., H. 2018. Bruk av miljø-DNA som supplerende verktøy for overvåkning og kartlegging av fremmed ferskvannsfisk. NINA Rapport 1586. Norsk institutt for naturforskning.
- Smart, AS, Tingley, R, Weeks, AR, van Rooyen, AR & McCarthy, MA. 2015. Environmental DNA sampling is more sensitive than a traditional survey technique for detecting an aquatic invader. *Ecological Applications* 25(7): 1944-1952.
- Taugbøl, A, Dervo, BK, Bærum, KM, Brandsegg, H, Sivertsgård, R, Ytrehus, B, Miller, A & Fossøy, F. 2017. Første påvisning av den patogene soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) i Norge. Bruk av miljø-DNA for påvisning av fremmede arter. NINA Rapport 1399. Norsk institutt for naturforskning: 25.
- Taugbøl, A, Dervo, BK, Sivertsgård, R, Brandsegg, H & Fossøy, F. 2018. Bruk av miljø-DNA til overvåkning av små- og storsalamander. Norsk institutt for naturforskning NINA-Rapport 1476.
- Thomsen, PF, Kielgast, J, Iversen, LL, Møller, PR, Rasmussen, M & Willerslev, E. 2012a. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS ONE* 7(8): e41732.
- Thomsen, PF, Kielgast, JOS, Iversen, LL, Wiuf, C, Rasmussen, M, Gilbert, MTP, Orlando, L & Willerslev, E. 2012b. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology* 21(11): 2565-2573.
- Thomsen, PF & Willerslev, E. 2015. Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation* 183(0): 4-18.
- Valentini, A, Taberlet, P, Miaud, C, Civade, R, Herder, J, Thomsen, PF, Bellemain, E, Besnard, A, Coissac, E, Boyer, F, Gaboriaud, C, Jean, P, Poulet, N, Roset, N, Copp, GH, Geniez, P, Pont, D, Argillier, C, Baudoin, J-M, Peroux, T, Crivelli, AJ, Olivier, A, Acqueberge, M, Le Brun, M, Møller, PR, Willerslev, E & Dejean, T. 2016. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 25(4): 929-942.
- Wacker, S, Fossøy, F, Larsen, BM, Brandsegg, H, Sivertsgård, R & Karlsson, S. 2019. Downstream transport and seasonal variation in freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) eDNA concentration. *Environmental DNA* 10.1002/edn3.10.

Norsk institutt for naturforskning

NINA Hovedkontor

Postadresse: Postboks 5685 Torgarden, 7485 Trondheim

Besøks-/leveringsadresse: Høgskoleringen 9, 7034 Trondheim

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

E-post: firmapost@nina.no

Organisasjonsnummer 9500 37 687

<http://www.nina.no>



Samarbeid og kunnskap for framtidens miljøløsninger