

Bruk av miljø-DNA for overvåking av fremmede fiskearter – utvikling av artsspesifikke markører for gjedde, mort og ørekyt

Frode Fossøy, Sondre Dahle, Line Birkeland Eriksen, Merethe Hagen Spets, Sten Karlsson & Trygve Hesthagen



NINAs publikasjoner

NINA Rapport

Dette er en elektronisk serie fra 2005 som erstatter de tidligere seriene NINA Fagrapport, NINA Oppdragsmelding og NINA Project Report. Normalt er dette NINAs 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 Kortrapport

Dette er en enklere og ofte kortere rapportform til oppdragsgiver, gjerne for prosjekt med mindre arbeidsomfang enn det som ligger til grunn for NINA Rapport. Det er ikke krav om sammendrag på engelsk. Rapportserien kan også benyttes til framdriftsrapporter eller foreløpige meldinger til oppdragsgiver.

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. De sendes til presse, ideelle organisasjoner, naturforvaltningen på ulike nivå, politikere og andre spesielt interesserte. 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 for overvåking av fremmede fiskearter

- Utvikling av artsspesifikke markører for gjedde, mort og ørekyt

Frode Fossøy
Sondre Dahle
Line Birkeland Eriksen
Merethe Hagen Spets
Sten Karlsson
Trygve Hesthagen

Fossøy, F., Dahle, S., Birkeland Eriksen, L., Hagen Spets, M., 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. 33s.

Trondheim, januar 2017

ISSN: 1504-3312

ISBN: 978-82-426-2976-0

RETTIGHETSHAVER

© Norsk institutt for naturforskning

Publikasjonen kan siteres fritt med kildeangivelse

TILGJENGELIGHET

Åpen

PUBLISERINGSTYPE

Digitalt dokument (pdf)

REDAKSJON

Norunn S. Myklebust

KVALITETSSIKRET AV

Odd Terje Sandlund

ANSVARLIG SIGNATUR

Forskningssjef Kjetil Hindar (sign.)

OPPDRAGSGIVER(E)/BIDRAGSYTER(E)

Miljødirektoratet

OPPDRAGSGIVERS REFERANSE

M-695|2017

KONTAKTPERSON(ER) HOS OPPDRAGSGIVER/BIDRAGSYTER

Sunniva Aagaard

FORSIDEBILDE

Filtrering av vann i Kyvatnet. © Frode Fossøy

NØKKELOD

Miljø-DNA

Fremmede arter

Fisk

Gjedde

Mort

Ørekyt

KEY WORDS

Environmental DNA

Invasive species

Fish

Pike

Roach

Minnow

KONTAKTOPPLYSNINGER

NINA hovedkontor

Postboks 5685 Sluppen

7485 Trondheim

Telefon: 73 80 14 00

NINA Oslo

Gaustadalléen 21

0349 Oslo

Telefon: 73 80 14 00

NINA Tromsø

Framsenteret

9296 Tromsø

Telefon: 77 75 04 00

NINA Lillehammer

Fakkelgården

2624 Lillehammer

Telefon: 73 80 14 00

www.nina.no

Sammendrag

Fossøy, F., Dahle, S., Birkeland Eriksen, L., Hagen Spets, M., 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.

I denne rapporten sammenfatter vi resultater fra uttesting av miljø-DNA som metode for å påvise og overvåke fremmede fiskearter. Som del av dette arbeidet har vi utviklet og testet artsspesifikke miljø-DNA-markører for gjedde, mort og ørekyt. I tillegg har vi testet og optimalisert utstyr og protokoller for både lab- og feltarbeid i forhold til slike undersøkelser. Vi har testet ulike filtre, vannvolumer, ekstraksjonsprotokoller og sett på variasjonen mellom enkeltprøver over tid, lokaliteter og innsjøer. De fleste av disse testene har foregått i Bymarka i Trondheim med fokus på mort og gjedde, men vi har også undersøkt vannprøver fra Hardangervidda med fokus på ørekyt og vandringsperrer i ørretvassdrag.

Vi finner en god del variasjon mellom enkeltprøver både i tid og rom, men når vi slår sammen flere prøver fra hver innsjø finner vi relativt konsistente resultater både med hensyn til påvisning og kvantifisering av enkeltarter samt beskrivelse av fiskesamfunn. Resultatene viser en lav konsentrasjon av miljø-DNA i perioden februar til april, og en oppblomstring av miljø-DNA i slutten av mai, som mest sannsynlig sammenfaller med tidspunktet for våromrøring. Prøvetaking for påvisning av fåtallige fremmede arter vil derfor være gunstig i slutten av mai og starten av juni i disse innsjøene. Om man derimot ønsker å kvantifisere miljø-DNA for å kunne si noe om relativ biomasse eller endringer i biomasse for ulike fiskearter over tid vil perioden fra starten av juli og utover være et bedre tidspunkt.

I Bymarka finnes det også data fra prøvefiske med garn. I tillegg ble det samla inn død fisk etter rotenonbehandling i september 2016. Man har derfor en god formening om relative forskjeller i tetthet mellom de ulike artene i de aktuelle innsjøene. Vi finner en god sammenheng mellom konsentrasjonen av miljø-DNA og biomassen av fisk fra de nevnte undersøkelsene.

Fra undersøkelsen av ørekyt på Hardangervidda kan vi bekrefte resultatene fra konvensjonelle undersøkelser med elfiske og utsetting av ruser. Vi fant ørekyt-DNA nedstrøms vandringsperrere som forventet, men ingen tegn til ørekyt-DNA oppstrøms vandringsperrere.

Vi konkluderer med at miljø-DNA er et reelt alternativ for beskrivelse av fiskesamfunn og påvisning av fremmede arter i forhold til konvensjonelle metoder. Vi finner at både påvisning og kvantifisering av artsspesifikt DNA stemmer bra overens med konvensjonelle metoder, og at miljø-DNA er mindre arbeidskrevende i felt og totalt sett er en billigere metode. Vi anbefaler at forvaltningen tar i bruk miljø-DNA i overvåking av fiskesamfunn og fremmede arter og at metoden gis mulighet til å videreutvikles for norske forhold.

Frode Fossøy, Sondre Dahle, Line Birkeland Eriksen, Merethe Hagen Spets, Sten Karlsson, Trygve Hesthagen, NINA, Postboks 5685, Sluppen, 7485 Trondheim.
Epost: frode.fossoy@nina.no

Innhold

Sammendrag	3
Innhold	4
Forord	5
1 Innledning	6
1.1 Miljø-DNA og overvåking av fremmede arter	6
1.2 Miljø-DNA som metode	6
1.2.1 Artsspesifikke markører.....	7
1.2.2 Artsgenerelle markører.....	7
1.3 Spredning av fremmede ferskvannsarter	7
1.3.1 Gjedde.....	8
1.3.2 Mort.....	8
1.3.3 Ørekyt.....	9
2 Utvikling og testing av markører og protokoller	10
2.1 Et standardisert mål for miljø-DNA.....	10
2.2 Miljø-DNA markører	10
2.3 DNA-ekstraksjon	11
2.4 Filtype	12
2.5 Vannvolum	12
2.6 Årstid og dato.....	13
3 Variasjon i tid og rom	14
3.1 Variasjon mellom individuelle prøver.....	15
3.2 Variasjon mellom lokaliteter og datoer	16
3.3 Variasjon mellom innsjøer	18
4 Sammenligning mellom miljø-DNA og konvensjonelle metoder	20
5 Uttesting av artsgenerell markør	22
6 Ørekyt og vandringsperrer på Hardangervidda	23
7 Kostnadsanalyse	25
7.1 Konvensjonelle analyser	25
7.2 Miljø-DNA analyser	25
8 Oppsummering og konklusjon	27
9 Referanser	30
10 Vedlegg 1	33

Forord

Uønsket spredning av fremmede arter utgjør en alvorlig miljøtrussel for norsk natur. En tidlig påvisning av uønskete arter vil gjøre det mulig å iverksette tiltak i en tidlig fase av spredningen og dermed øke sannsynligheten for å kunne gjøre noe med problemet. Bruk av miljø-DNA for påvisning av fremmede arter har vist seg å være mer sensitiv enn eksisterende metoder i flere eksempler og kan dermed utgjøre en viktig brikke i håndteringen av problemet med fremmede arter.

Denne rapporten utgjør den aller første praktiske undersøkelsen av miljø-DNA som metode for å påvise og kvantifisere fremmede fiskearter i Norge. Vi har her spesielt fokusert på utvikling av metodikk både i felt og på lab og undersøkt hvordan konsentrasjonen av miljø-DNA varierer over tid og mellom lokaliteter innen og mellom innsjøer. Resultatene fra denne rapporten utgjør et viktig fundament for bruk av miljø-DNA i forvaltningen.

En stor takk rettes til Miljødirektoratet og spesielt Sunniva Aagaard for tilrettelegging av prosjektet og Jarle Steinkjer for viktige innspill underveis. Deler av prosjektet ble finansiert gjennom NINAs strategiske instituttsatsing (SIS). Terje Nøst (Trondheim kommune) og Helge Bardal (Veterinærinstituttet) takkes for informasjon og viktige innspill i forbindelse med rotenonbehandlingen i Bymarka i Trondheim og verdifulle kommentarer til rapporten. Sten Byrkjeland (Fylkesmannen i Hordaland) og Lars Inge Enerstvedt (Statens naturoppsyn) takkes for tilrettelegging og bidrag til gjennomføring av prøvetaking på Hardangervidda. Magdalene Langset (NINA) takkes for assistanse ved prøvetaking i felt.

Trondheim, januar 2017

Frode Fossøy

Prosjektleder

1 Innledning

1.1 Miljø-DNA og overvåking av fremmede arter

Forvaltning av både terrestriske og akvatiske miljøer er avhengig av gode metoder for å bestemme hvilke arter og hvor mange individer per art det finnes i et bestemt miljø. Slike metoder kan være vanskelige å standardisere og er ofte avhengige av taksonomisk kompetanse hos enkeltpersoner. Det kan være spesielt vanskelig å detektere forekomst av fremmede arter i en invasjonfase med få individer. I akvatiske miljøer kan dette være ekstra utfordrende da visuell deteksjon er vanskelig uten en omfattende fangsttinsats, som også kan inkludere uønsket fangst av de naturlig tilhørende artene. Innsamling og analyse av miljø-DNA kan være en alternativ metode for overvåking av økosystemer der innsamling av prøver ikke er avhengig av langvarig innsats eller taksonomisk ekspertise i felt. DNA i miljøet kommer fra hud- og hårceller, spytt, avføring og alle celler som måtte falle av en levende eller nylig død organisme (Pietramellara mfl. 2009). Ved å lete etter DNA fra spesifikke arter i en vann- eller jordprøve kan man altså avgjøre om denne arten finnes i lokaliteten. Man er derfor ikke avhengig av å fange eller observere arten man er interessert i.

Miljø-DNA er bredt definert som alt DNA isolert fra vann, jord eller luft (Taberlet mfl. 2012). Begrepet Miljø-DNA har vært i bruk siden 1987, men var i begynnelsen stort sett knyttet til sedimentprøver og DNA fra mikrober (Ogram mfl. 1987). Miljø-DNA er altså alt det DNA fra organismer vi kan finne i en spesifikk vannprøve fra for eksempel en innsjø eller elv, uavhengig av hvilken art det måtte komme fra. Det er derfor karakterisert av en kompleks blanding av fragmentert DNA fra ulike organismer (Taberlet mfl. 2012). Miljø-DNA er i utgangspunktet uspesifikt og representerer ideelt sett alle arter i et gitt økosystem, men mengden DNA en finner i en gitt miljøprøve er i praksis avhengig av antall individer, kroppsstørrelse, aktivitetsnivå og habitatvalg for hver art. Enkelte studier har også vist at DNA-mengden i en miljøprøve gir en god indikasjon på den relative biomassen fra hver art, og man kan derfor også bruke miljø-DNA til å lage et såkalt semikvantitativt estimat for antall individer, eller relativ biomasse fra hver art (Andersen mfl. 2012, Takahara mfl. 2012, Thomsen mfl. 2012). Bruk av miljø-DNA er altså ganske ny som metode, men har i det siste vært i en rivende utvikling.

I løpet av de siste tiårene har det vært en omfattende spredning og introduksjon av ferskvannsfisk her i landet (**pkt 1.2**). Dette gjelder ikke bare fremmede arter, men også noen av artene med naturlig innvandring som har blitt innført til nye områder ved menneskelig aktivitet. For å sette inn effektive tiltak mot nyintroduserte eller nyetablerte bestander, er forvaltningen avhengig at de blir oppdaget og rapportert inn så raskt som mulig. Hittil har dette vært basert på at fiskere og andre brukere har rapportert inn sine observasjoner (Hesthagen & Sandlund 2012, Hesthagen & Sandlund 2015, Hesthagen & Sandlund 2016, Sandlund mfl. 2013). Dette skjer i de fleste tilfeller når vedkommende art blir fanget av fiskere. Forvaltningen er derfor avhengig av et effektivt overvåkings- og kartleggingsprogram for spredning av ulike fiskearter i ferskvann, som gjør tidlig varsling mulig. I de fleste tilfeller vil det imidlertid gå en viss tid, i enkelte tilfeller flere år, fra en art blir innført til den blir oppdaget.

I denne rapporten undersøker vi muligheten for å bruke miljø-DNA (fra engelsk: environmental DNA (eDNA)) til å påvise de invasive fiskeartene gjedde, mort og ørekyt. Rapporten omhandler både en utvikling av artsspesifikke markører for de tre fiskeartene og en uttesting av teknologien i felt. Basert på dette vil vi gi konkrete råd og anbefalinger om hvordan miljø-DNA kan brukes i kartleggings- og overvåkningsaktiviteter i forvaltningen.

1.2 Miljø-DNA som metode

Man kan generelt dele inn miljø-DNA i to ulike fremgangsmåter, der pris, tidsbruk og resultat er forskjellig; vi snakker om artsspesifikke eller artsgenerelle genetiske markører. Stort sett er de aller fleste miljø-DNA-markører basert på mitokondrielt DNA. Mitokondrielt DNA nedarves bare gjennom mor og inneholder konserverte DNA sekvensert som gjør disse markørene ideelle for bruk til strekkoding og miljø-DNA. I denne rapporten har vi utviklet og optimalisert artsspesifikke

markører for gjedde, mort og ørekyt. I tillegg presenterer vi også noe data på en arts-generell markør.

1.2.1 Artsspesifikke markører

Genetiske markører som er så spesifikke at de i en «suppe» av DNA fra mange ulike arter bare fester seg til en bestemt art, kaller vi for artsspesifikke markører. Slike markører blir ofte brukt til å påvise forekomst av sjeldne rødlistearter, eller uønskede svartelistearter (Dejean mfl. 2011, Ficetola mfl. 2008, Goldberg mfl. 2011, McKelvey mfl. 2016, Thomsen mfl. 2012). Deteksjon av insekter, krepsdyr, frosk, salamander, fisker og pattedyr har vært gjort med gode resultater ved hjelp av denne metoden (Dejean mfl. 2011, Ficetola mfl. 2008, Goldberg mfl. 2011, Thomsen mfl. 2012).

Noen studier har brukt denne metoden til å kartlegge utbredelsen av fremmede arter, blant annet oksefrosk i Frankrike (Dejean mfl. 2012), der man sammenlignet miljø-DNA med konvensjonelle registreringer og fant oksefrosk i 38 av totalt 49 lokaliteter med miljø-DNA, men bare i 7 av lokalitetene med de konvensjonelle metodene. I en storskala undersøkelse av to fremmede asiatiske karpearter i elvene rundt Chicago, Illinois, USA, ble miljø-DNA brukt til å kartlegge den geografiske spredningen av disse artene (Jerde mfl. 2011). Ved hjelp av vannprøver fant forskerne karpe-DNA ovenfor elektriske sperrer satt opp for å hindre spredning til Lake Michigan, og også forbi den antatte spredningsfronten bestemt med konvensjonelle metoder. Miljø-DNA har altså potensiale til å påvise fremmede arter på et tidlig stadium der lav tetthet kan gjøre konvensjonelle metoder lite hensiktsmessige. Innsamling av prøver kan gjøres svært raskt over et større område, og er ikke avhengig av store mannskaper i felt. Studiene som har vært gjort så langt viser også at miljø-DNA er mer sensitiv enn de konvensjonelle metodene (Dougherty mfl. 2016). Tetthet av arts-spesifikt miljø-DNA korrelerer også bra med både antall og biomasse av fisk fanget gjennom garnfiske på tvers av innsjøer (Lacoursière-Roussel mfl. 2016). For norske forhold kan denne metoden være ideell for å se på spredning og utbredelse av fremmede fiskearter der konvensjonelle metoder er avhengige av stor innsats i felt, som for eksempel ved prøvefiske med garn og elfiskeapparat.

1.2.2 Artsgenerelle markører

Man kan også bruke miljø-DNA fra en vann- eller jordprøve til å kartlegge biodiversitet i habitatet prøven ble tatt fra. Et eksempel på dette er hentet fra det marine miljø, der vannprøver fra en båthavn i København ble brukt til å identifisere hvilke fiskearter som forekom i et bestemt område. Miljø-DNA kunne identifisere 24 ulike fiskearter i vannprøver innsamlet på ett enkelt tidspunkt, mens de fleste konvensjonelle metodene gjennomført over en tre års periode bare kunne dokumentere halvparten av dette (Thomsen mfl. 2012, Valentini mfl. 2016). Mer nylig har et lignende studie også dokumentert at diversitet av fiskearter ved bruk av DNA-analyser av vannprøver hentet opp fra dypet utenfor Grønland korrelerer positivt med fangstdata fra konvensjonell dypvannstråling (Thomsen mfl. 2016). I ferskvann har denne metoden vist seg å fange opp flere arter enn det man finner ved elfiske (Hänfling mfl. 2016, Olds mfl. 2016), og den reflekterer romlig fordeling i større vannsystemer (Civade mfl. 2016). I tillegg har man i akvarieforsøk funnet en god sammenheng mellom relativ kvantifisering av miljø-DNA og antall fisk per art (Evans mfl. 2016).

1.3 Spredning av fremmede ferskvannsarter

Spredning av fremmede fiskearter i ferskvann blir i mange land ansett som et svært alvorlig miljøproblem (Clavero & Villero 2014, Cucherousset & Olden 2011, Sala mfl. 2000). Potensielt negative konsekvenser på stedegne arter skjer gjennom konkurranse, predasjon, hybridisering, og ødeleggelse eller forringelse av leveområder og økosystem-funksjoner (Britton mfl. 2010,

Gozlan 2009, Gozlan mfl. 2010, Hesthagen mfl. 2015). Fram til 2008 ble minst 624 arter ferskvannsfisk identifisert som introduserte til lokaliteter eller vassdrag utenfor sine naturlige leveområder (Gozlan 2008).

Spredning av fremmede fiskearter i ferskvann skjer også i Norge, og 11 reproduserende arter er så langt identifisert (Sandlund mfl. 2013). Totalt har vi 32 fiskearter med naturlig innvandring i ferskvann, noe som betyr at ca. 25% av alle reproduserende arter er innførte. Det var først med Huitfeldt-Kaas sin publikasjon «Ferskvandsfiskenes utbredelse og indvandring i Norge» fra 1918, at vi fikk en inngående forståelse av innvandringsveiene til de enkelte fiskeartene og deres naturlige forekomst (Huitfeldt-Kaas 1918).

Det viser seg at spredningen av flere arter med opprinnelig naturlig innvandring til deler av Norge også representerer en trussel mot det biologiske mangfoldet. Når disse artene blir spredt utenfor sitt naturlige utbredelsesområde, betegnes de som regionalt fremmede (Sandvik mfl. 2015). Dette gjelder spesielt gjedde, ørekyt, mort og sørv (Hesthagen & Sandlund 2012, Hesthagen & Sandlund 2015, Hesthagen & Sandlund 2016, Hesthagen & Østborg 2004, Kleiven & Hesthagen 2012, Museth mfl. 2007, Sandlund mfl. 2013). De regionale forskjellene i våre fiskesamfunn blir stadig mindre når naturlig forekommende arter går tapt og erstattes med fremmede eller regionalt fremmede arter. Vi ser nå konturene av denne utviklingen i deler av Sørlandet og Østlandet. Denne utviklingen kalles homogenisering av faunaen (Clavero & García-Berthou 2006, Rahel 2000, Villéger mfl. 2011). Spredning av enkelte arter som gjedde kan også føre til at arter som ørret blir helt utryddet, i alle fall når spredningen skjer til mindre og relativt grunne innsjøer (Hesthagen mfl. 2015). Men selv i store innsjøer som for eksempel Krøderen har gjedda forårsaket en reduksjon hos den naturlige ørretbestanden med 80-90 % (Brabrand 2007).

1.3.1 Gjedde

Huitfeldt-Kaas gir en rekke opplysninger om når og hvor ulike fiskearter har blitt satt ut. Siden tidlig på 1900-tallet har det vært en til dels omfattende spredning av gjedde her i landet (Hesthagen & Sandlund 2012). De alvorligste tilfellene av slik spredning omfatter blant annet Telemarkskanalen. Her forekommer det nå gjedde fra Børsesjø i Skien til Norsjø og Heddalsvatnet (Hesthagen & Sandlund 2012). Den har også spredt seg til Falkumelva, nedre deler av Bøelva og Heddøla. I vest er det gjedde fra Ulefoss og opp til Hogga sluse, samt i Skoelva og Østerå. I Krøderen ble det innført gjedde på 1990-tallet, og den finnes nå i alle deler av innsjøen (Brabrand 2009). Den har også spredt seg oppover Hallingdalselva, noe som trolig skyldes en sekundærspredning. Det er nå store bestander av gjedde i de større elfvefjordene Brommafjorden og Myrefjorden. Gjeddene er registrert opp til Svenkerud ovenfor Nesbyen, der Halifossen litt lengre opp er et hinder for videre spredning. Om gjedda blir satt ut ovenfor denne fossen, kan den spre seg helt opp til Ål. Dette er litt ovenfor der Votna samløper med Hallingdalselva. Gjeddene har også blitt satt ut i Sperillen i seinere år, med spredning både oppstrøms (Begna) og nedstrøms (Ådalselva). I Trondheimsregionen, spesielt i Sagelvvassdraget i Malvik kommune, har det vært omfattende spredning av gjedde i seinere år. Dette har resultert i utryddelse av flere ørretbestander (Hesthagen mfl. 2015).

1.3.2 Mort

Mort er en vanlig og naturlig forekommende art i sørøstlige deler av landet, spesielt i Glommavassdraget og vassdrag lengre øst (Huitfeldt-Kaas 1918). Beregninger viser at det fins rundt 500-1000 bestander av mort her i landet (Rask 2000, Tammi mfl. 2003). Glommavassdraget har mort opp til Rendalen og Engerdal. Den forekommer også i flere områder i Vestfold og i nedre deler av Buskerud. Det er også mort i noen få vatn i Bamble i Telemark. Det har opp gjennom tiden vært satt ut mort en rekke steder her i landet. Dette gjelder blant annet i Bymarka i Trondheim på slutten av 1800-tallet. I dette området har det vært en økende spredning av mort i seinere år, og den finnes nå i minst åtte innsjøer. Mort er nylig blitt satt ut i Vikarauntjønnna som ligger øst for Trondheim sentrum. Her ble bestanden fjernet med rotenon høsten 2014 (Bardal 2015). Høsten 2016 ble sju innsjøer i Bymarka i Trondheim rotenonbehandlet for å fjerne mort. I seinere år

er det også blitt satt ut mort i Randsfjorden og Tyrifjorden, og i flere andre innsjøer på Østlandet. Arten ble etter få år dominerende i strandsona i Tyrifjorden (Morten Eken, pers. medd.).

I forbindelse med NINAs arbeid med Naturindeks i 2015 kom det opplysninger om at mort har vært benyttet som agn flere steder, bl.a. i forbindelse med isfiske. Om dette har resultert i etablering av nye bestander, er ennå usikkert. Men mange introduksjoner av mort har allerede skjedd i seinere år, og det er stor fare for videre spredning i flere regioner. Morten vil vanligvis danne tette bestander etter en introduksjon, med store negative følger for andre fiskearter og det biologiske mangfoldet (Sandlund mfl. 2016).

1.3.3 Ørekyt

Ørekyt hadde opprinnelig en begrenset naturlig utbredelse her i landet. Den omfattet Østlandet, sørøstlige deler av landet, noen vassdrag i Nord-Trøndelag og Troms, og store deler av Øst-Finnmark (Huitfeldt-Kaas 1918). Men i løpet av de siste 100 årene har det vært en omfattende spredning av ørekyt til andre deler av landet (Hesthagen & Sandlund 1997, Hesthagen & Sandlund 2006, Hesthagen mfl. 2006). Denne karpfiskens forekommer nå i alle landets fylker (Hesthagen & Sandlund 2016). Dette har hatt store negative effekter på arter som ørret med en reduksjon i fangstutbyttet på 30-40 % (Museth mfl. 2007). Spredningen av ørekyt skyldes direkte eller indirekte menneskelig aktivitet, spesielt fordi den har vært brukt som agn under fiske (Borgstrøm 1973).

Det er nå ørekyt i minst seks innsjøer i Eidfjord kommune på Hardangervidda etter bl.a. spredning i området rundt Halnefjorden i Hol kommune i Buskerud (Hesthagen & Sandlund 1997). Fra Halnefjorden har den videre spredningen skjedd via innløpselva (Skurdevikåi). Hætjørn har også fått påvist ørekyt, men det er usikkert om den har vandret hit via Skurdevikåi eller om den er innført av mennesker. Hætjørn ble rotenonbehandlet i 2013. En foss litt vest for der Hætjørn renner ned i Skurdevåkåi stopper videre naturlig spredning vestover. Det har også kommet ørekyt til Skaupsjøen (grensevann mellom Eidfjord og Nore og Uvdal kommuner), trolig fordi den er brukt som levende agn. Litt sør for dette området har ørekyta spredt seg fra Holmetjønnane i Nore og Uvdal vestover til to mindre tjern; ett ved Stigstuv og det andre omtrent 1 km lengre sør. Det er også ørekyt i fire små pytter mellom disse to tjernene. Høsten 1995 ble det bygd en jordvoll vest for tjernet ved Stigstuv for om mulig å hindre spredning av ørekyt videre vestover. Høsten 1999 ble dette området rotenonbehandlet.

2 Utvikling og testing av markører og protokoller

2.1 Et standardisert mål for miljø-DNA

NINA har i løpet av 2016 investert i en «digital droplet PCR (ddPCR)» maskin. Til sammenligning med qPCR (kvantitativ-PCR eller sanntids-PCR), som er den vanligste metodikken for å kvantifisere DNA og gir en relativ måling av DNA konsentrasjon, gir ddPCR en absolutt måling. En direkte sammenligning mellom de to metodene viste at ddPCR gir et bedre resultat enn qPCR når det kommer til påvisning av invasive fiskearter (Doi mfl. 2015). Det nye med ddPCR-teknologien er at en enkel PCR-reaksjon deles opp i inntil 20 000 små reaksjoner som hver foregår inne i en liten oljedråpe. Etter endt PCR-reaksjon blir hver dråpe avlest og gir et «digitalt» resultat der hver dråpe blir angitt som positiv eller negativ, eller 0/1 om man vil. ddPCR er altså en «end-point» analyse mens qPCR måler DNA konsentrasjon «live» i analysen. Fordelen med ddPCR er her at resultatet blir lite påvirket av effektiviteten til PCR-reaksjonen og de genetiske markørene. I tillegg kan man slå sammen flere kjøringers dersom man leter etter en sjelden genvariant slik at man ved for eksempel tre kjøringers fra samme prøve kan regne ut total-konsentrasjonen gitt ved summen av positive dråper i forhold til summen av totalt antall dråper analysert (altså opptil 60 000 dråper i dette tilfellet). Man kan da anta at antall DNA-kopier per dråpe vil danne en Poisson statistisk fordeling gitt ved:

$$1) \text{ DNA-konsentrasjon} = -\log(\text{antall negative dråper} / \text{totalt antall dråper}) / \text{dråpevolum}$$

For å kunne kontrollere for vannvolum og mengde DNA-ekstrakt brukt i hver analyse har vi laget et mål på antall DNA kopier per liter gitt ved:

$$2) \text{ DNA Kopier per liter vann} = \text{DNA-konsentrasjon} / \text{ddPCR-volum} * \text{DNA-ekstrakt volum} / \text{vann volum}$$

Dette målet gir en standardisert verdi for DNA-mengde kontrollert for både vannvolum innsamla i felt og ulike volumer og fortyninger på lab. Vi bruker dette målet gjennomgående i denne rapporten for å gjøre tolkningen av dataene lettere. For å unngå såkalte «false positives», altså falske positive signaler, har vi satt en grense på minst fire positive dråper i analysen. Alle prøver med 1-3 positive dråper er altså antatt negative i våre analyser. Denne grensen har vi satt i forhold til våre «negativ-kontroll-prøver» på laben som viser at disse noen ganger kan ha én eller i sjeldne tilfeller to positive dråper. Vi har kjørt minst tre ddPCR replikater av hver vannprøve og slått sammen disse til en verdi som forklart over.

2.2 Miljø-DNA markører

For gjedde var det allerede publisert tre ulike miljø-DNA-markører (Olsen mfl. 2015) da vi startet dette prosjektet. Vi testet disse markørene på DNA ekstrahert fra gjedde (positiv kontroll) men fikk kun et svakt positivt signal. Vi utviklet derfor flere egne markører og testet disse på våre lokale fiskearter. I ettertid har det kommet ut et «erratum» der det kommer frem at primersekvensene inneholdt en feil i originalpublikasjonen (Olsen mfl. 2016). Dette forklarer trolig de svake signalene vi fikk med disse markørene. Vi har ikke testet de korrekte primersekvensene.

For hver av artene gjedde, mort og ørekyt gikk vi gjennom tilgjengelige DNA-sekvenser i GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank) og BOLD Systems (www.boldsystems.org/). For fisk er det generelt flest DNA-sekvenser for Cytochrome B (CytB) og Cytochrome C Oxidase (COI) regionene i mitokondriet. Et unntak var her for ørekyt, der vi også fant mange sekvenser fra den ikke-kodende kontrollregionen (CTRL), og for mort der vi fant mange sekvenser fra ribosomalt

16S RNA. Vi lastet ned det vi fant av relevante DNA-sekvenser og sammenstilte disse i programmet Genious 8.1.8 (Biomatters Ltd) for å manuelt identifisere variable og konserverte regioner innen hvert gen. Et viktig poeng å nevne her er den store variasjonen man finner for disse DNA-sekvensene på tvers av Europa. Spesielt for mort fant vi en god del DNA-sekvenser for sørøst Europa som var veldig forskjellig fra resten av Europa, og ikke ville ha fungert som et godt utgangspunkt for å lage artsspesifikke markører for våre lokale populasjoner. Vi brukte så programmet Primer Express 3.0.1 (Applied Biosystems) for å lage nye markører. En liste over alle markørene vi har testet finnes i **vedlegg 1**.

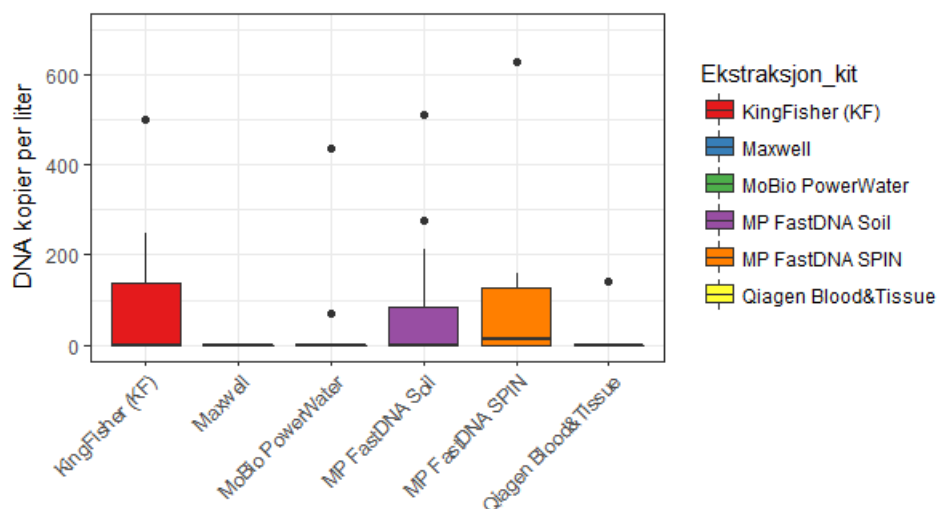
Vi testet så hver markør for arten de var laga for med en gradientanalyse for å finne optimal PCR-annealing-temperatur for hver markør. I tillegg ble hver markør testet på ekstrahert DNA fra gjedde, mort, ørekyt, ørret, laks og røye for å bekrefte arts-spesifisiteten. Ut i fra disse analysene kunne vi til slutt velge ut minst én god markør for hver art som vi har testet videre i feltforsøk.

2.3 DNA-ekstraksjon

Det finnes en rekke ulike kommersielle «kit» for å ekstrahere DNA. Disse varierer i metode og kjemi og ikke minst hvor komplisert prokollen er fra start til slutt. Man ønsker derfor gjerne å finne et kit som både gir høy DNA-kvalitet og som er effektivt i forhold til arbeidsinnsats på lab. En liste over kit vi har testet i løpet av dette prosjektet er gjengitt i **tabell 1**.

Tabell 1. Oversikt over ekstraksjonskit testet i løpet av prosjektperioden.

Produsent	Kit	Manuelt/robot
MP Biomedicals GmbH	FastDNA SPIN Kit	Manuelt
MP Biomedicals GmbH	FastDNA SPIN Kit for Soil	Manuelt
Qiagen	DNeasy Blood and Tissue Kit	Manuelt
MoBio	PowerWater DNA Isolation Kit	Manuelt
Maxwell	Tissue DNA Purification kit	Ekstraksjonsmaskin
ThermoFisher Scientific	King Fisher Cell and Tissue kit	King Fisher Flex ekstraksjonsrobot



Figur 1. DNA-konsentrasjon av gjedde fra vannprøver isolert med ulike kommersielle kit.

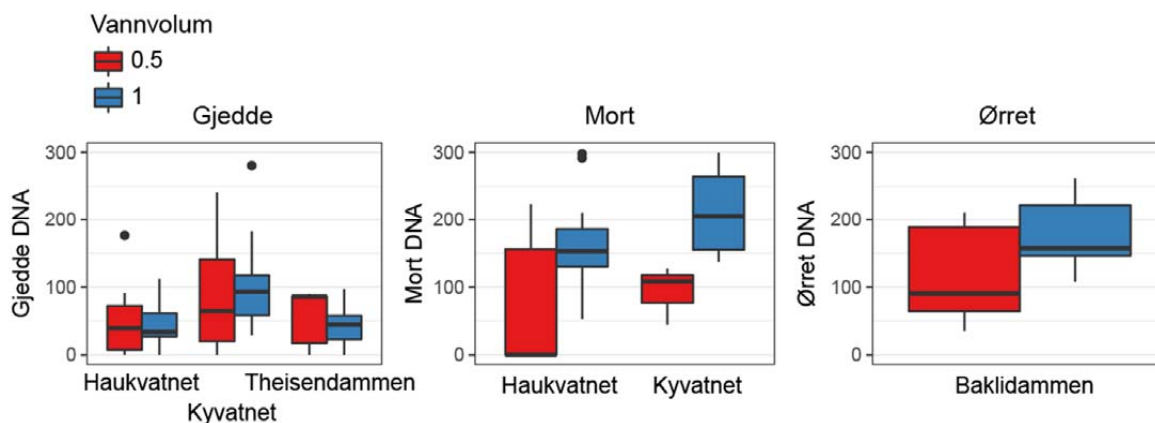
Ut i fra resultatene finner vi tre isolasjonskit som ser ut til å gi tilstrekkelig DNA-kvalitet for å kunne påvise gjedde-DNA fra våre filterprøver (**figur 1**). Vi har valgt å gå videre med MP Fast-DNA SPIN kit, men vi vil også anbefale MP FastDNA Soil og King Fisher Cell and Tissue Kit tilpasset King Fisher ekstraksjonsrobot. De to MP Biomedicals-kitene ble også best i en akvariumstest på karpe (Eichmiller mfl. 2016).

2.4 Filterttype

Vi har testet noen forskjellige filtre med ulik maskestørrelse, med variasjon fra 0,45 mikrometer til 1,2 mikrometer. Uten at vi kan vise til grundige tester på dette kan vi si at vi finner DNA fra fisk i alle disse filtrerene, og dette intervallet i maskestørrelse ser derfor ikke ut til å være en avgjørende faktor. Dette er også i samsvar med andre studier som har testet en mye bredere variasjon i maskestørrelse enn vi har gjort her. I et studie med svært høy turbiditet i tropiske miljøer ble det gjort vellykket påvisning av fisk med filtre helt opp i 20 mikrometer (Robson mfl. 2016). I andre studier har det blitt testet både maskestørrelse og kvalitet, der filtre av glassfiber ser ut til å fange mer miljø-DNA enn polykarbonatfilter (Eichmiller mfl. 2016, Lacoursière-Roussel mfl. 2016). Hva som finnes av praktiske løsninger er også viktig ved valg av filterttype. Engangs sterile filtre fastmontert i filterholdere er svært praktiske til bruk i felt og utgjør også en stor sikkerhet i forhold til krysskontaminering mellom prøver. For noen av filtrerene benyttet vi løse filtre og filterholdere, der vi måtte sterilisere filterholderne med klørløsning mellom hver prøve. Vi vil derfor anbefale sterilt pakket engangsfiltre med filterholder for å unngå kontaminering på tvers av prøver, som for eksempel «Nalgene Analytical Test Filter Funnels» fra ThermoFisher Scientific og «Microfunnel Filter Funnels» fra Pall Corporation. Vi har testet begge disse filtrerene i dette prosjektet med gode resultatet. Vi har gjennomgående preservert filteret ved å lagre dette i en zip-lock pose med silica gel for tørking av prøven.

2.5 Vannvolum

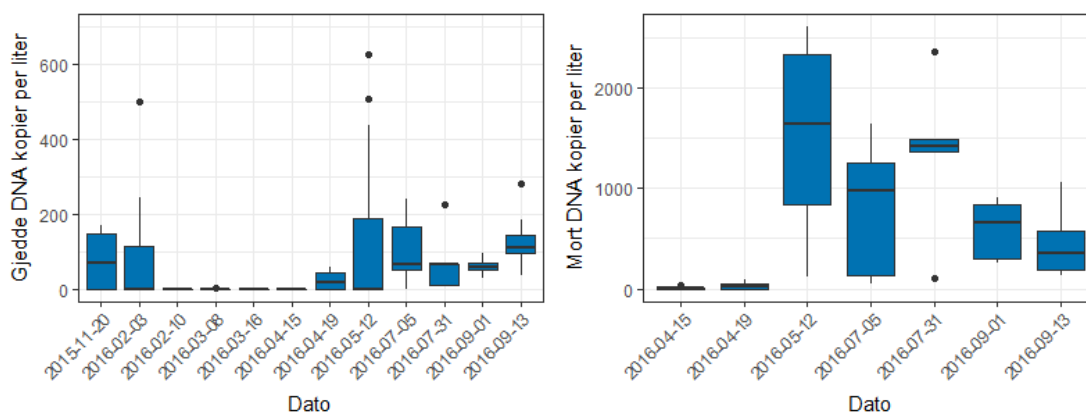
Filtrene man bruker til miljø-DNA er nødvendigvis veldig tette, og dette gjør det vanskelig å filtrere store mengder vann. Stort sett går det bra å få 0,5 liter gjennom filteret i de fleste innsjøer med normalt til mye partikler i vannet. Vi har etterstrebet å pumpe 1 liter, men dette har ikke alltid vært praktisk mulig. På vinterstid med klart vann har vi også pumpet 4-5 liter gjennom de mest åpne filtrerene. I en sammenligning mellom 0,5 liter og 1 liter vann finner vi ingen store forskjeller i slutt-konsentrasjonen av DNA når man regner ut DNA kopier per liter vann, men det ser ut som et litt større volum kan være fordelaktig spesielt for mort (**figur 2**).



Figur 2. Variasjon av miljø-DNA i forhold til prøvetatt vannvolum gitt som DNA kopier per liter vann filtrert.

2.6 Årstid og dato

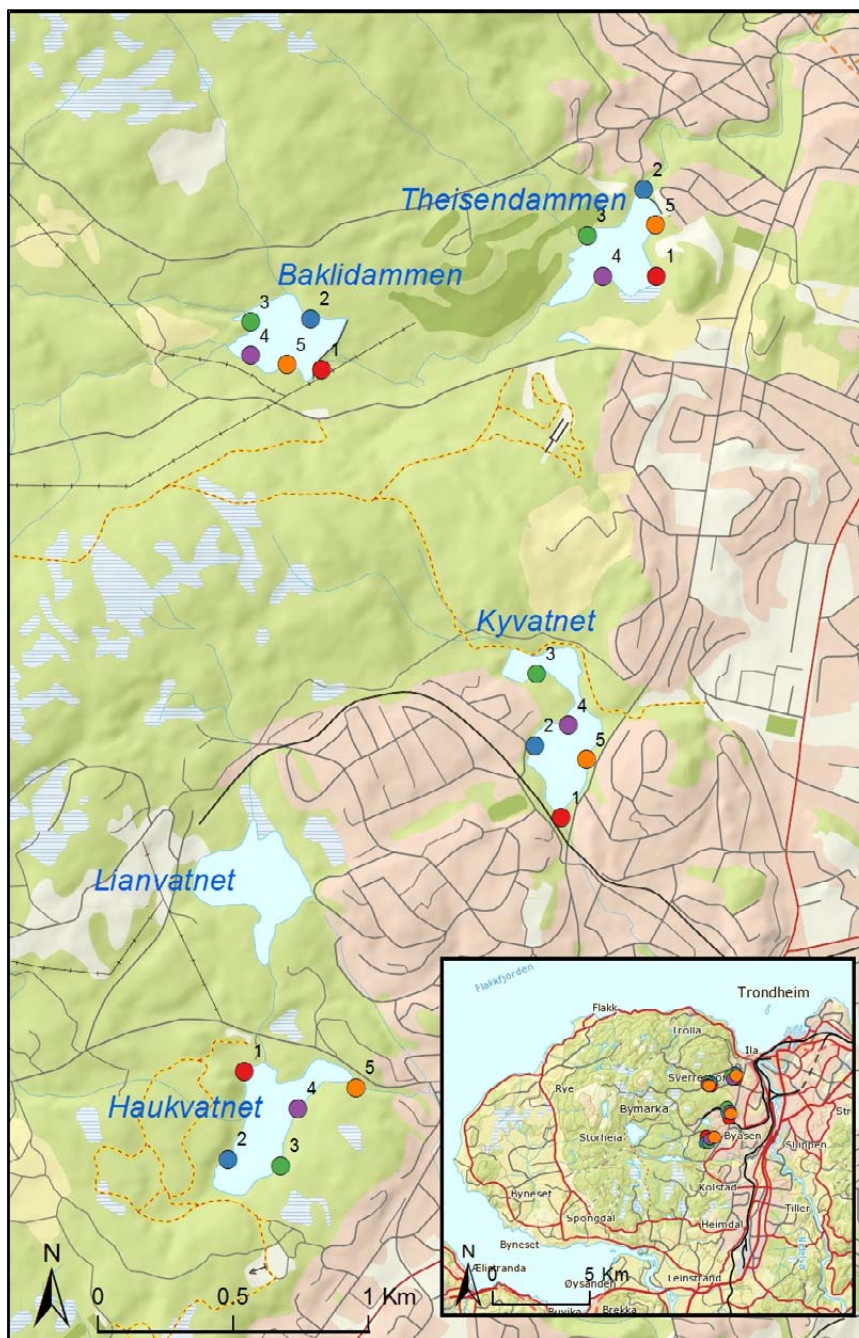
Vi hadde i utgangspunktet forventet at dato ville ha en stor effekt på DNA-konsentrasjonen i en innsjø, og vi har derfor gjennomført gjentatte prøvetakinger i Kyvatnet gjennom nesten et års tid. Her må det nevnes at vi underveis har testet ulike filtre og ulike ekstraksjonskit slik at noe av variasjonen i **figur 3** må tilskrives disse faktorene. Men det kan se ut som om tidlig vår gir veldig lave DNA-konsentrasjoner både for gjedde og mort og at DNA-konsentrasjonen øker markant i april/mai. Dette kan mest sannsynlig tilknyttes en høyere aktivitet på fisken, samt økt vannsirkulasjon ved våromrøring. Sesongbetont aktivitet har også blitt assosiert med DNA-konsentrasjon hos andre arter (Civade mfl. 2016). Også eksperimentelle studier i lukkede akvarier har vist at DNA-konsentrasjon er avhengig av temperatur (Lacoursière-Roussel mfl. 2016). Våre data kan tolkes som at perioden februar til april er et dårlig tidspunkt for prøvetaking, da fisken mest sannsynlig står mer stille, og delvis isdekke og temperaturstratifisering i vannmassen gir lite sirkulasjon i vannet. Skal man velge et enkelt tidspunkt å anbefale prøvetaking ser det ut som om slutten av mai er det beste for å påvise fiskearter i disse innsjøene, men konsentrasjonen av miljø-DNA holder seg også ganske høy utover sommeren. Skal man derimot kvantifisere miljø-DNA er det kanskje mer hensiktsmessig å holde seg unna denne «toppen» rett etter våromrøring, og heller samle inn prøver når vannsirkulasjon og temperaturer har stabilisert seg i juni-august.



Figur 3. Variasjon av miljø-DNA i forhold til dato i Kyvatnet, gjedde til venstre og mort til høyre.

3 Variasjon i tid og rom

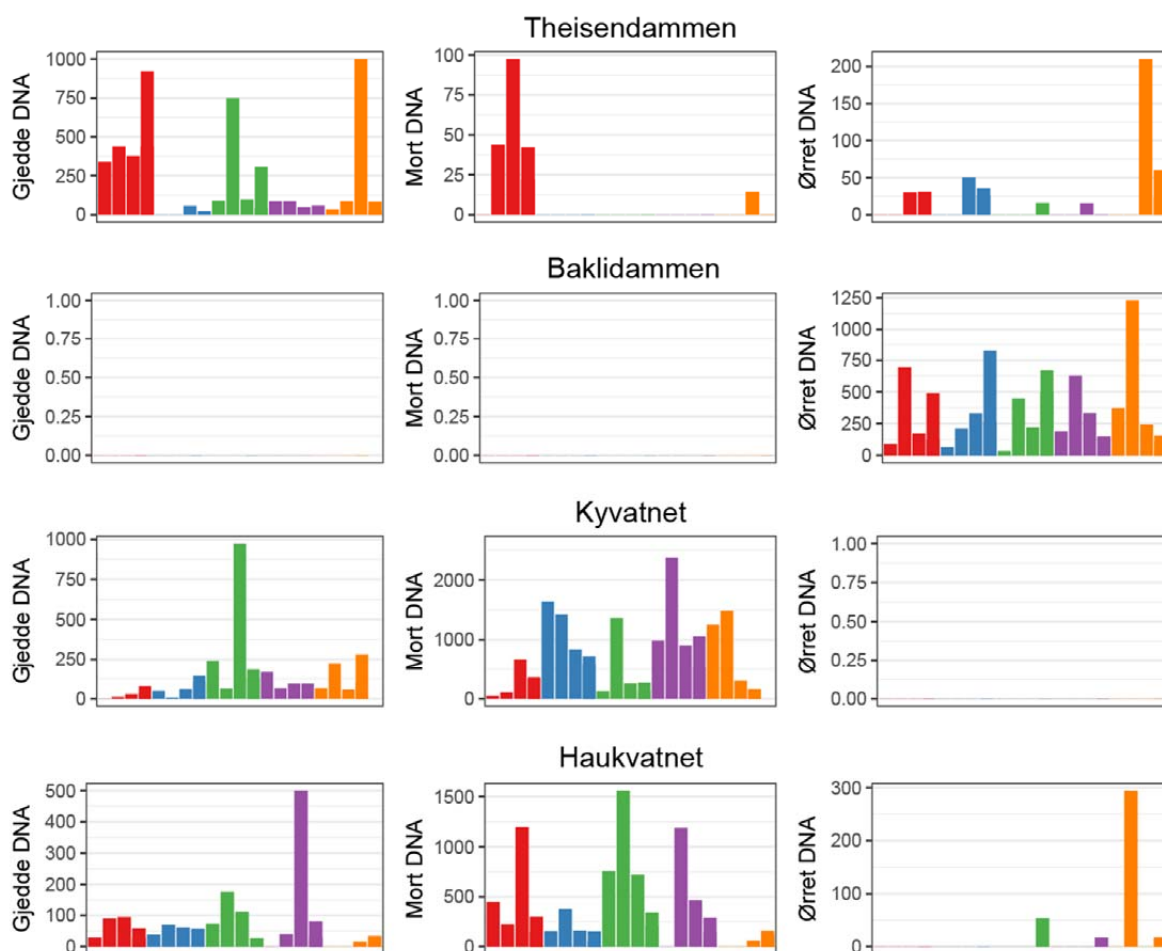
Gjennom sensommeren 2016 gjorde vi en utstrakt testing av fire utvalgte vann i Bymarka for å kunne si hvordan deteksjon og kvantifisering av miljø-DNA påvirkes over tid ved ulike lokaliteter innen en innsjø. Her inkluderte vi Theisendammen, Baklidammen, Kyvatnet og Haukvatnet. Vi valgte så ut fem spesifikke lokaliteter innad i hver av disse innsjøene (**figur 4**) som hver og en ble prøvetatt fire ganger i løpet av tre måneder: 5. juli, 30. juli, 31. august og 12. september. Prøvene ble tatt på 5 til 50 cm dyp, 0 til 2 meter fra land avhengig av forholdene. I tillegg til våre egne markører for gjedde og mort inkluderte vi en publisert markør på ørret (Gustavson mfl. 2015).



Figur 4. Kart over lokaliteter for gjentatte prøvetakinger innen hvert av de fire innsjøene Theisendammen, Baklidammen, Kyvatnet og Haukvatnet. Fargene for hver lokalitet gjenspeiles i **figur 5** og **6**.

3.1 Variasjon mellom individuelle prøver

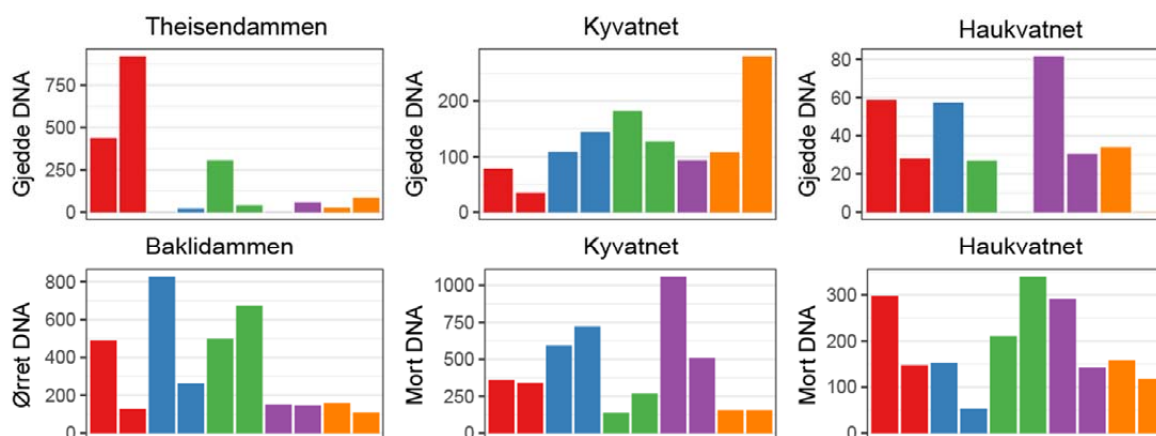
Resultatene av disse gjentatte prøvetakingene viser at det er en god del variasjon både mellom lokaliteter innen den samme innsjøen og innen lokaliteter prøvetatt på ulike tidspunkt (**figur 5**). Fravær av en art i en innsjø er veldig konsistent blant våre prøver og vi har altså ingen falske positive prøver av denne typen. Dette viser at de genetiske markørene vi bruker er helt artsspesifikke og ikke amplifiserer de andre artene i disse innsjøene. Man ser også at ikke alle prøvetakinger påviser alle arter, og at noen enkeltprøver viser en mye høyere DNA-konsentrasjon enn de andre prøvene på samme lokalitet (innen hver farge). Vi tror at disse høye verdiene kan skyldes at vi har filtrert «klumper» med for eksempel vevsrester eller fiskeskjell. Vi brukte en åpen slange på disse prøvene, og det er mulig at et forfilter som ekskluderer større vevsrester kan føre til en mer jevn kvantifisering av miljø-DNA. Negative prøver ser mest ut til å forekomme der det generelt er lave konsentrasjoner av miljø-DNA. I tillegg er det også store forskjeller i hvor konsistente verdiene er mellom lokaliteter for de ulike innsjøene. Vi fant spesielt store variasjoner i Theisendammen, der mort bare viste en noenlunde stabil verdi på én av de fem lokalitetene, og selv om ørret ble detektert på alle lokaliteter var det mange negative resultat blant de fire ulike tidspunktene.



Figur 5. Variasjon i konsentrasjon av miljø-DNA gitt som DNA kopier per liter vann i tid og rom for gjedde, mort og ørret innen og mellom de fire innsjøene Theisendammen, Baklidammen, Kyvatnet og Haukvatnet. Hver farge angir en spesifikk lokalitet innen hvert vann (se **figur 4** for plassering av lokalitetene i forhold til farge). Rekkefølgen innen hver farge angir ulike datoer hver lokalitet er prøvetatt i stigende rekkefølge fra venstre (5. juli, 30. juli, 31. august, 12. september).

I en test med parallelle prøver, tatt på samme tid og samme sted, finner vi også noe variasjon (**figur 6**). Det er tydelig at miljø-DNA har en klumpvis fordeling, og selv to mer eller mindre identiske prøver fra samme sted kan gi forskjellige konsentrasjoner. Her kan også vannvolum forklare noe av variasjonen, og 1 liter vann kan muligens være litt lite for å gi stabile og konsistente resultater. Man kan tenke seg at større volumer vil gi mindre utslag av en tilfeldig klumpvis fordeling mellom prøvene.

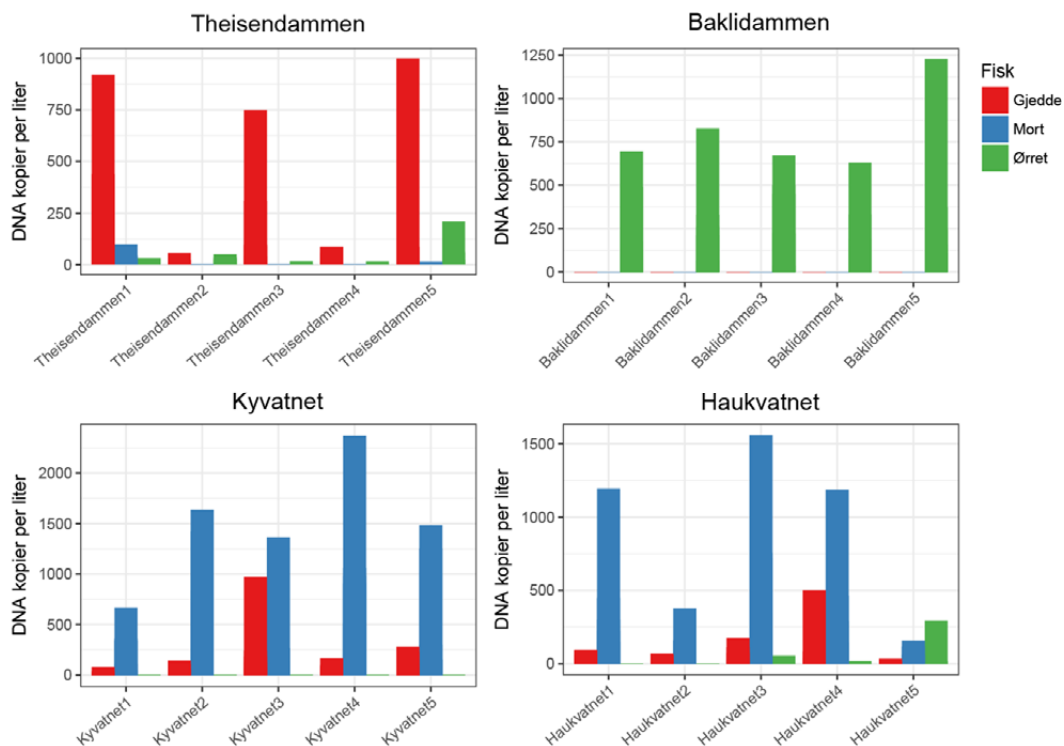
Rent statistisk fant vi en repeterbarhet på $R = 0.34$ ($P = 0.043$) for parallelle prøver fra samme sted på samme tid, og $R = 0.35$ ($P < 0.001$) for prøver fra samme sted på ulike tidspunkter (Nakagawa & Schielzeth 2010).



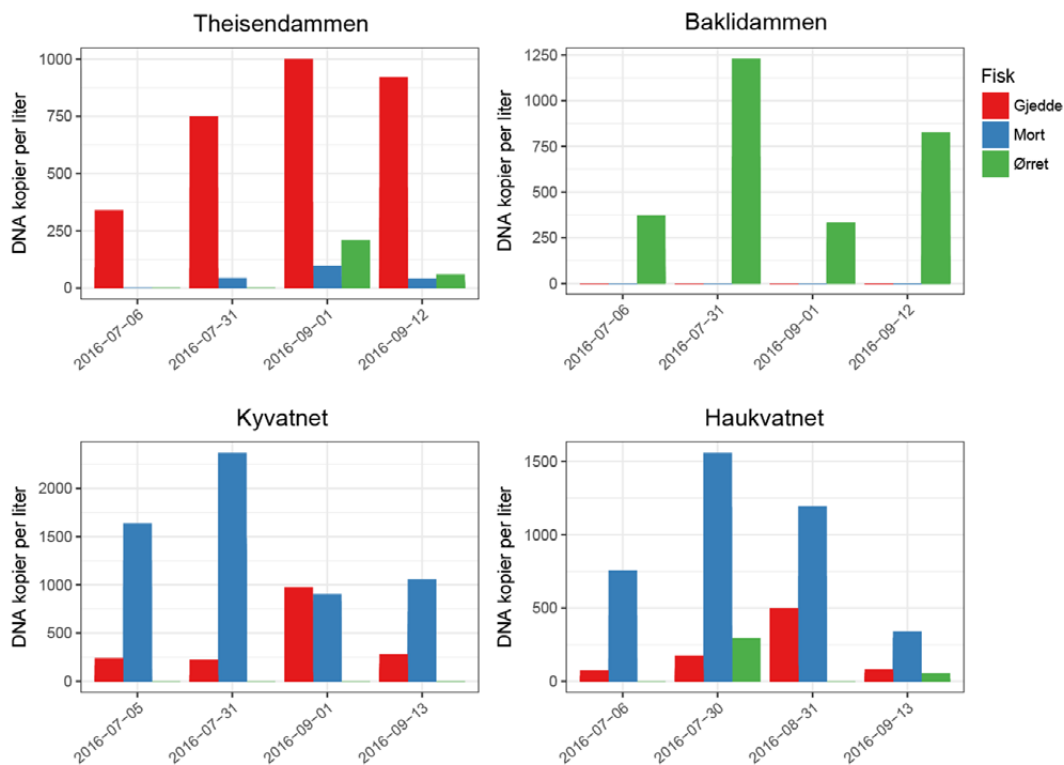
Figur 6. Repeterbarhet mellom to individuelle prøver tatt rett etter hverandre på samme sted, se **figur 4** for plassering av lokalitetene i forhold til farge. Her forventer vi altså at stolper med samme farge skal være like høye om repeterbarheten mellom individuelle prøver er høy. Alle prøvetakinger ble gjort 12. og 13. september, og er basert på 1 liter vann.

3.2 Variasjon mellom lokaliteter og datoer

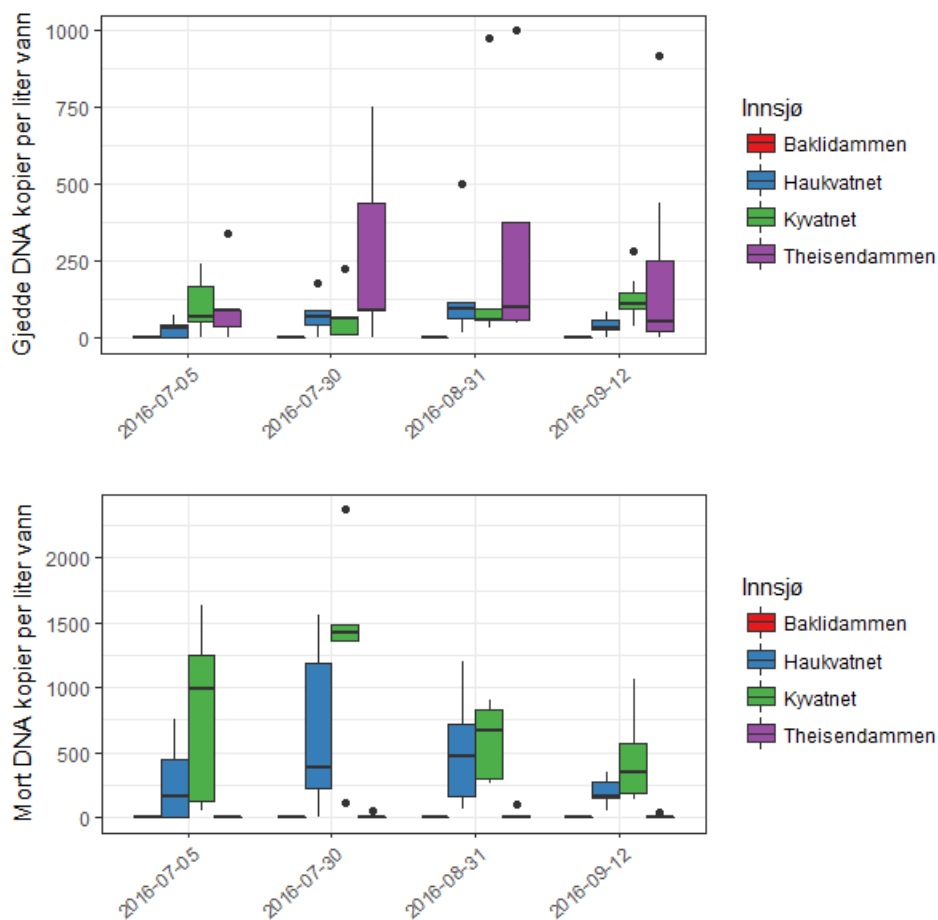
Slår man sammen alle prøver tatt på samme sted over tid (**figur 7**), eller alle prøver tatt innen samme innsjø (**figur 8**), får man straks en mye bedre representasjon av fiskesamfunnet i hver innsjø. Man ser raskt at Theisendammen er dominert av gjedde, med funn av både mort og ørret, Baklidammen har kun ørret, mens både Kyvatnet og Haukvatnet er dominert av mort med innslag av gjedde. Det er også en relativt god konsistens i forholdet mellom de ulike artene innen hver innsjø. Et unntak er igjen Theisendammen, der en finner mye gjedde-DNA i lokalitetene 1, 3 og 5, men ikke i 2 og 4. Her vil nok både biologien hos arten og forholdene i innsjøen påvirke resultatet. Ulike fiskearter er ikke tilfeldig fordelt i en innsjø, og mens gjedda vil foretrekke noen habitater vil mort foretrekke andre habitater. Det er derfor viktig å tenke gjennom prøvetaking i forhold til arten man er ute etter å påvise. Spesielt gjelder dette for invasive arter der man ønsker å påvise den på et tidlig stadium for å kunne gjøre tiltak mot videre spredning.



Figur 7. Variasjon mellom lokaliteter, der data fra ulike datoer er slått sammen for hver lokalitet innen hver innsjø.



Figur 8. Variasjon mellom ulike tidspunkt for prøvetaking, der data fra alle lokaliteter innen en innsjø er slått sammen til en verdi for hver av de ulike tidspunktene.

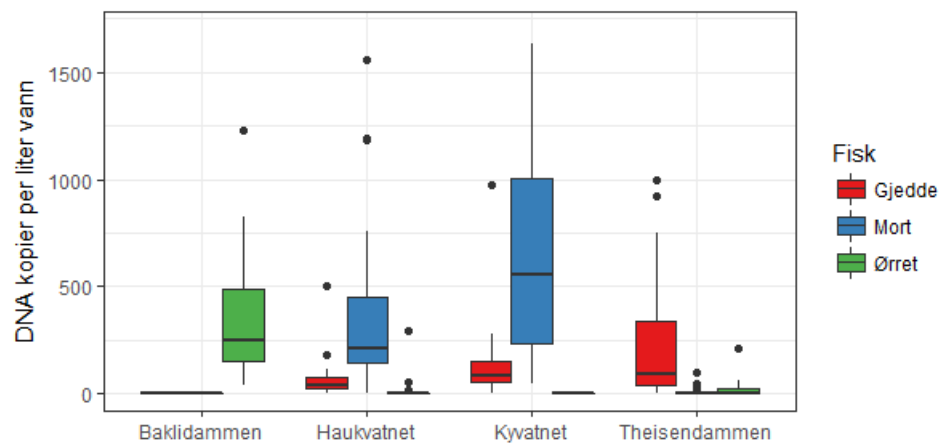


Figur 9. Variasjon i tetthet av miljø-DNA mellom innsjøer over tid for gjedde og mort.

3.3 Variasjon mellom innsjøer

Slår man sammen alle prøvene tatt innen hver innsjø for hvert tidspunkt kan man også sammenligne tetthet av miljø-DNA mellom innsjøer og om dette er konsistent over tid. Vi finner en relativt god konsistens på de ulike tidspunktene for både mort og gjedde i vår studie (**figur 9**). Theisendammen har en høyere tetthet av gjedde-DNA enn de andre innsjøene utenom prøvetakingen i starten av juli. Kyvatnet og Haukvatnet har høy tetthet av mort i motsetning til de to andre innsjøene, og Kyvatnet har jevnt over noe høyere tetthet enn Haukvatnet.

Om man til slutt slår sammen alle prøvene på tvers av både lokaliteter og datoer får man et bra helhetlig inntrykk av fiskesamfunnene både innen og mellom innsjøer (**figur 10**). Man ser raskt hvilke arter som dominerer artssamfunnet og hvordan det relative forholdet mellom artene er innenfor og mellom de ulike innsjøene. Man kan også se at det er en del variasjon innen hver art og innsjø, noe som gjenspeiler variasjonen mellom enkeltprøver fra ulike lokaliteter innen innsjøer og mellom ulike tidspunkt som beskrevet over.



Figur 10. Fiskesamfunnene i de ulike innsjøene med alle miljø-DNA prøver fra ulike lokaliteter og ulike tidspunkt slått sammen til en verdi per innsjø og art.

4 Sammenligning mellom miljø-DNA og konvensjonelle metoder

I Bymarka har det jevnlig vært gjennomført prøvafiske (Nøst 2015) og man har derfor en god formening om relative forskjeller i tetthet mellom de ulike artene (**tabell 2**). Man kan derfor evaluere hvordan miljø-DNA presterer i forhold til konvensjonelt prøvafiske. I tillegg ble det i forbindelse med rotenonbehandlingen i Bymarka i september i 2016 samlet inn død fisk fra de fire aktuelle innsjøene (**tabell 3**). Denne innsamlingen av død fisk gir også en viss formening om relativ fordeling av arter i de ulike innsjøene (Helge Bardal, pers. medd.).

Om man først ser på absoluttverdier i biomasse fra prøvafiske og innsamling av fisk etter rotenonbehandlingen, får man et veldig likt inntrykk av de tre metodene for mort (**figur 11b**). For gjedde (**figur 11a**) er miljø-DNA-resultatet litt forskjellig fra de to andre estimatene, da vi fant en svært høy konsentrasjon av gjedde-DNA i Theisendammen i våre analyser (**figur 10**). Her må det nevnes at en god del gjedder ble plukket opp flere dager etter rotenonbehandlingen i Kyvatnet og Haukvatnet, men at dette ikke ble gjort i Theisendammen (Helge Bardal og Terje Nøst, pers. medd.). Theisendammen inneholdt en god del store gjedder og disse ble verken fanget opp under prøvafiske eller ved innsamling av død fisk etter rotenonbehandlingen.

Om man sammenligner det relative forholdet mellom mort og gjedde for de tre ulike estimatene, får man en bedre overensstemmelse (**figur 11**). For prøvafiske og plukking av død fisk etter rotenonbehandlingen har vi tatt forholdstallet mellom antall kilogram mort delt på antall kilogram gjedde, mens for miljø-DNA har vi tatt forholdstallet mellom gjennomsnittet av antall DNA-kopier per liter for hver art i hver innsjø. For Haukvatnet er dette forholdstallet veldig likt for alle de tre metodene, mens det i Kyvatnet ble fanget mye mort i forhold til gjedde sammenlignet med de to andre metodene.

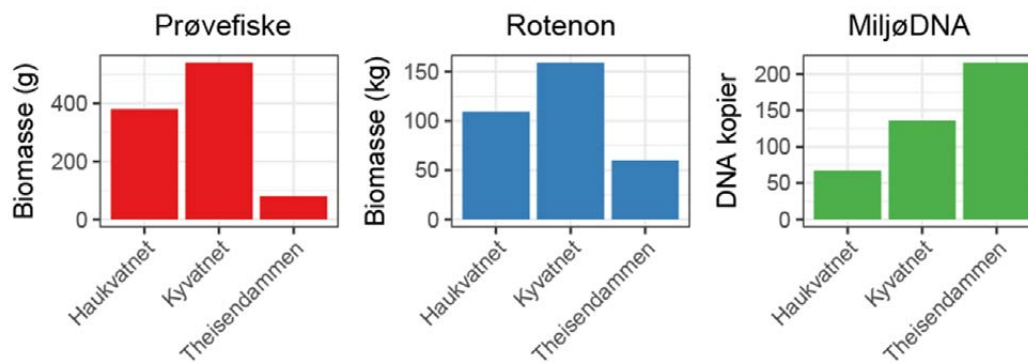
Tabell 2. Oversikt over antall fisk og snittvekt per fisk i gram i ifølge prøvafiske i 2015 (Nøst 2015). Total biomasse er regnet ut som antall fisk ganger snittvekt.

		Haukvatnet	Kyvatnet	Theisendammen	Baklidammen
Gjedde	Antall	2	2	1	
	Snittvekt	190	270	80	
	Biomasse	380	540	80	
Mort	Antall	273	385	4	
	Snittvekt	9	22	8	
	Biomasse	2457	8470	32	
Ørret	Antall			4	42
	Snittvekt			1230	65
	Biomasse			4920	2730

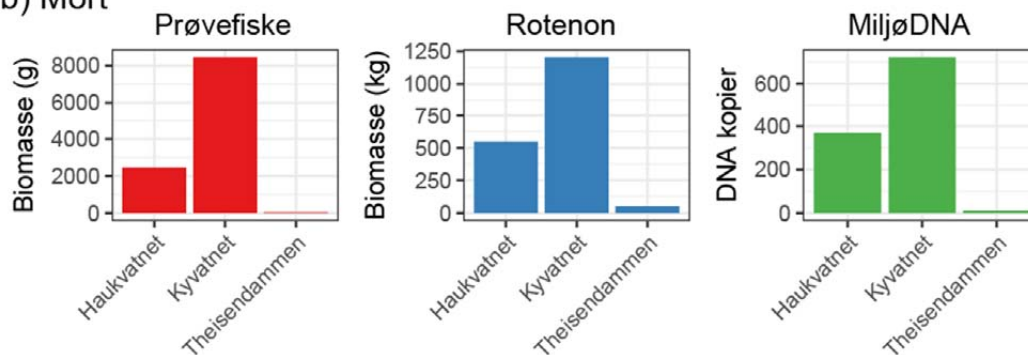
Tabell 3. Oversikt over antall kilogram fisk plukket opp fra hver innsjø etter rotenonbehandling i september 2016. Kilde: Terje Nøst, Trondheim Kommune.

	Haukvatnet	Kyvatnet	Theisendammen	Baklidammen
Gjedde	109	159	60	
Mort	548	1206	50	
Ørret				26

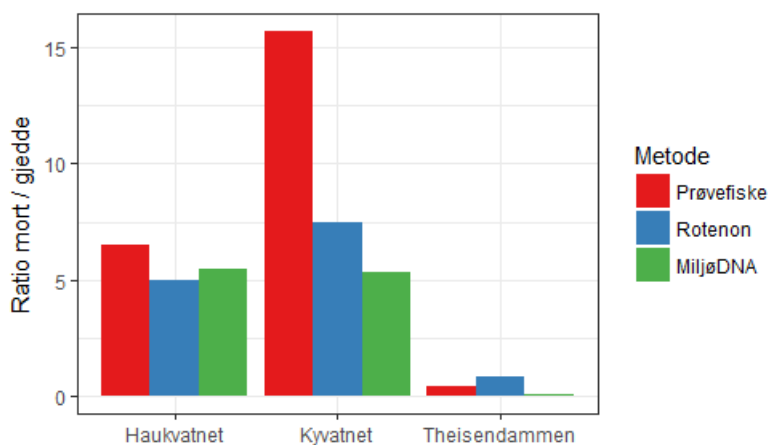
a) Gjedde



b) Mort



Figur 11. Biomasse og miljø-DNA fra henholdsvis prøvefiske, innsamling av fisk etter rotenonbehandling og vannprøvetaking for a) gjedde og b) mort.



Figur 12. Sammenstilling av forholdstallet mellom mort og gjedde i forhold til metode, der prøvefiske og rotenon er gitt som forholdet mellom antall kilogram fisk og miljø-DNA er gitt som forholdet mellom antall DNA-kopier per liter vann.

5 Uttesting av artsgenerell markør

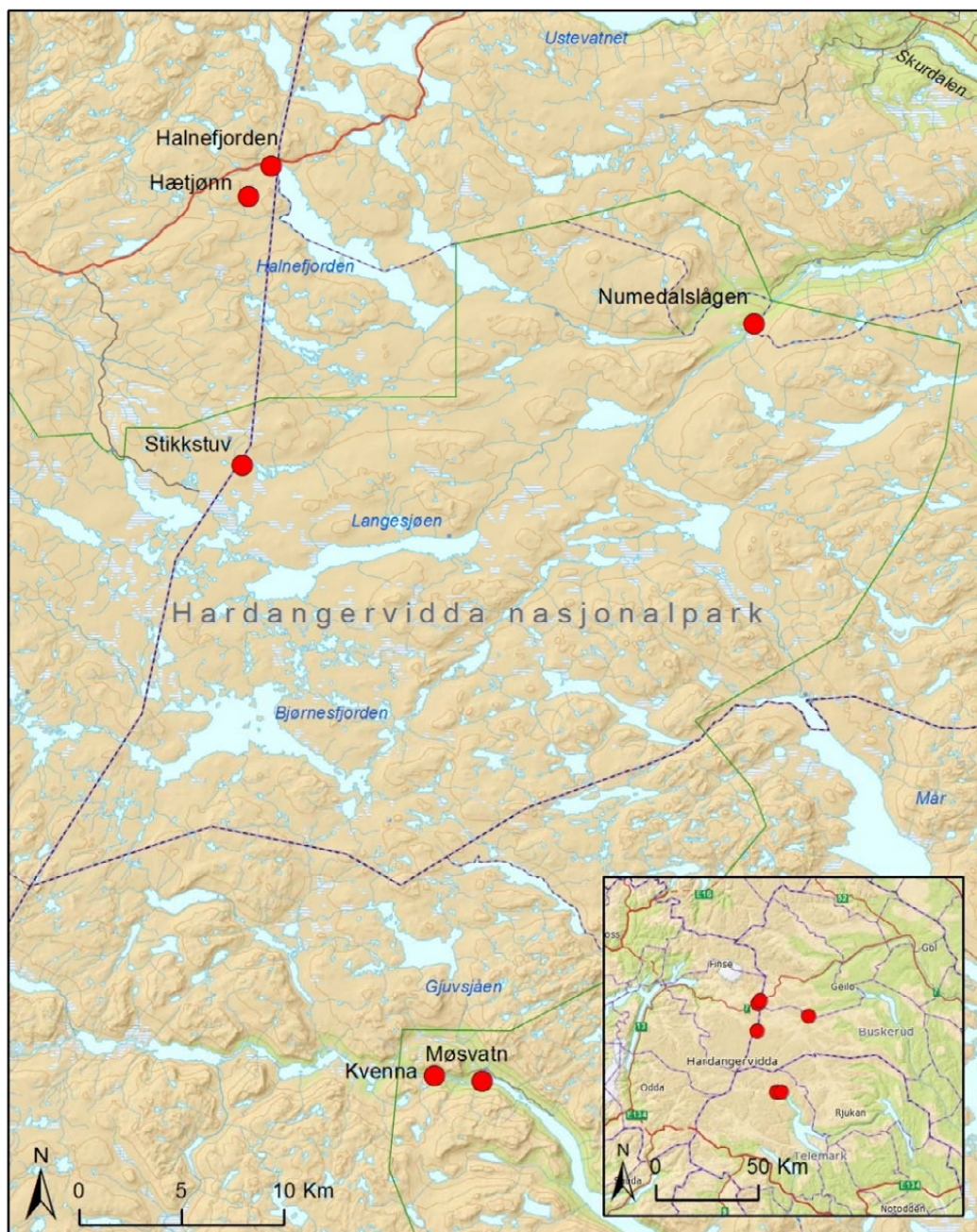
I forbindelse med et samarbeid med Spygen i Frankrike har vi også testet en artsgenerell markør for fisk. Prøvene ble tatt i november 2015. Denne metoden gir en relativ kvantifisering mellom arter, og den kan fange opp alle fiskearter i en lokalitet i en og samme analyse. Men metoden krever en «next-gen-sekvensering» av prøvene og dette har som regel en ventetid på 3 måneder for ferdigstilling av data. Fra Bymarka har vi bare Baklidammen representert blant disse prøvene og vi tar derfor også med to innsjøer fra Malvikmarka for å illustrere hvordan denne metoden kan vise forskjeller i fiskesamfunn mellom innsjøer (**figur 13**). Her finner vi klare forskjeller i relativ tetthet mellom de ulike innsjøene der Baklidammen stort sett bare inneholder ørret mens Hyllvatnet er dominert av gjedde og Mørkdalstjønna har en nesten identisk representasjon av gjedde og ørret. I denne analysen ble det påvist en liten andel mort i Baklidammen, selv om dette ikke ble påvist med den artsgenerelle markøren. Det ble heller ikke funnet død mort etter rotononbehandlingen i 2016. Det er mulig at mort-DNA fra Kobberdammen har blitt transportert ned til Baklidammen og at det er dette vi påviser her.



Figur 13. Sammenligning av fiskesamfunn i Bymarka og Malvikmarka ved bruk av en artsgenerell markør.

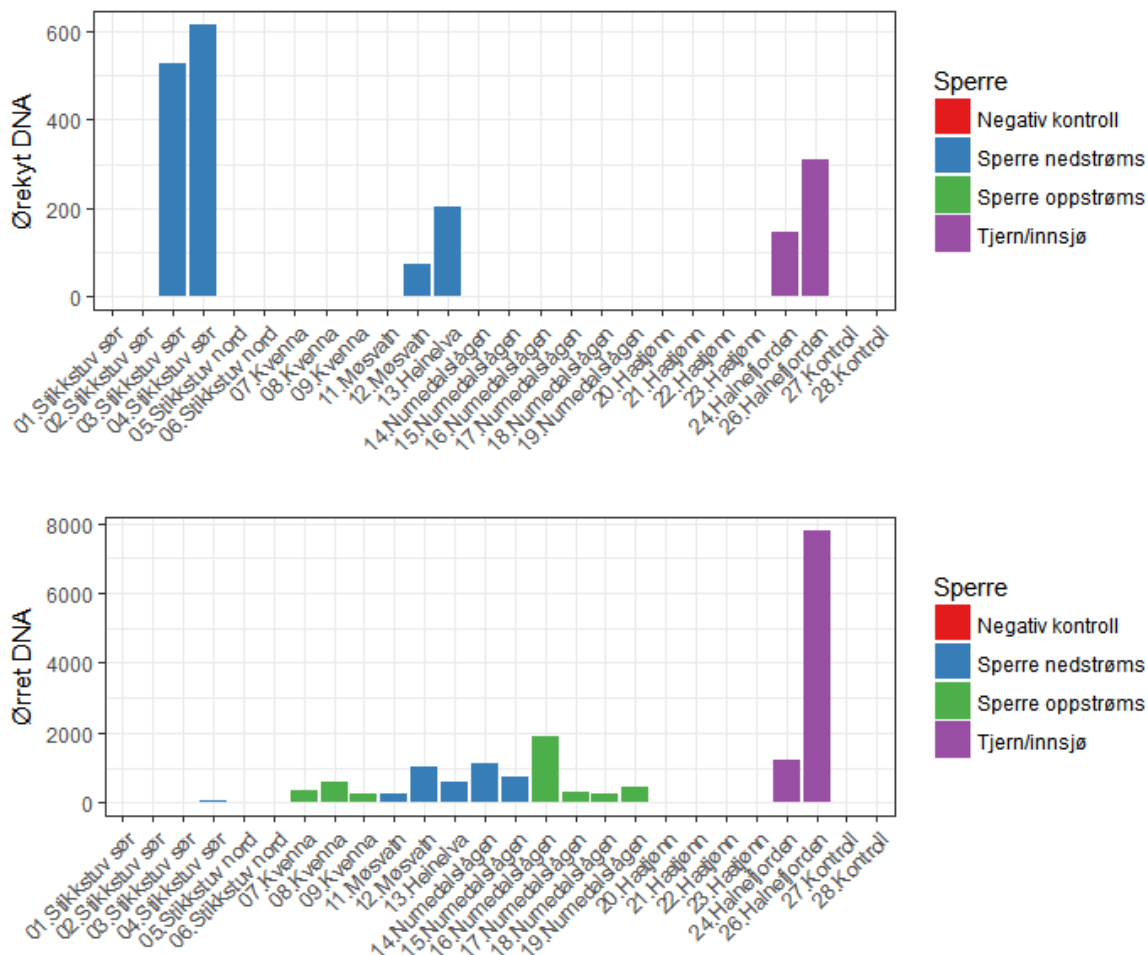
6 Ørekyt og vandringssperrer på Hardangervidda

Sammen med Fylkesmannen i Hordaland og SNO samlet vi inn vannprøver fra flere lokaliteter på Hardangervidda 12. august 2016 for å evaluere miljø-DNA som metode for å påvise spredning av ørekyt (**figur 14**). Artsspesifikke markører for både ørekyt og ørret ble kjørt for alle prøvene. Totalt ble 26 vannprøver samlet inn, inkludert to felt-negative prøver av brønnvann fra Halne Fjellstova. Alle prøver ble satt opp med minst tre replikater på ddPCR for å evaluere tilstedeværelse av ørekyt- og ørret-DNA. Som for prøvene fra Bymarka beskrevet over satte vi også her en grense på minst tre positive dråper for å unngå falske positive prøver.



Figur 14. Kart over lokaliteter på Hardangervidda prøvetatt for påvising av ørekyt ved hjelp av miljø-DNA-analyser i august 2016.

I **figur 15** har vi inkludert alle enkeltprøver fargelagt med plassering av prøvested i forhold til nedstrøms eller oppstrøms av vandringssperre, tjern/innsjø, og negative kontroller. Begge de felt-negative prøvene var negative for begge arter, og det er derfor lite sannsynlig at våre positive prøver er forårsaket av kontaminering. I tillegg ble en vanlig lab-negativ prøve inkludert i hver enkelt kjøring og alle disse var også negative.



Figur 15. Antall DNA kopier per liter vann for ørekyt og ørret for de ulike enkeltprøvene fra hver lokalitet på Hardangervidda.

Vi finner altså ingen ørekyt-DNA oppstrøms noen av sperrene og kan derfor bekrefte det som konsvensjonelle resultater viser (Lehmann & Skår 2016). Vi kan konkludere med positive prøver av ørekyt fra lokalitetene 3 og 4 (Stigstuv Sør), 12 (Møsvatn), 13 (Heinelva), og 24 og 26 (Halnefjorden). Resten av prøvene regnes som negative for ørekyt. Når det gjelder tetthet av DNA, som en proxy for tetthet av ørekyt, finner vi de høyeste konsentrasjonene i Stigstuv Sør etterfulgt av Halnefjorden, Heinelva og Møsvatn (**figur 15**). Prøve 11 ble tatt nederst i Kvenna, rett ovenfor innløp til Møsvatn og var forventet å være positiv. I tillegg ble prøvene 14 og 15 (Numedalslågen) tatt like ovenfor samløp med Heinelva, og var også forventet å være positive. I alle disse tre lokalitetene var det stri strøm i stor elv, og dette kan gjøre det ekstra vanskelig å påvise sjeldne arter.

For ørret har vi mange flere positive prøver, også oppstrøms ørekytsperrer (**figur 14**). Vi finner at prøve 1 til 6 (Stigstuv) er negative, med unntak av prøve 4 (Stigstuv Sør) som muligens har en lav konsentrasjon av ørret-DNA. For ørret får vi også positive utslag for prøvene 11, 14 og 15, der vi ikke påviste ørekyt i stor og stri elv.

7 Kostnadsanalyse

7.1 Konvensjonelle analyser

Ved beregning av utgifter i forbindelse med feltarbeid for å påvise fremmede fiskearter, skilles det mellom lokaliteter i nærområdet (< 2 timers kjøring) og de som ligger i en annen region (**tabell 4**). Undersøkelser i lokaliteter i en annen region forutsetter overnatting. Det blir også skilt mellom «stor lokalitet» og «liten lokalitet», både med hensyn til innsjø (garnfiske) og bekk/elv (elfiske). En stor innsjø forventes å ha et areal > 2 km² og med en pelagisk sone som krever fiske med flytegarn. Garninnsatsen settes til 6-12 stykk i små innsjøer, og 20-35 stykk i store innsjøer. Ved garnfiske benyttes det nordiske oversiktsgarn som settes i ulike dybdeintervall, ifølge norsk og europeisk standard. Feltarbeidet gjennomføres av to personer, og med en timesats på 1000 kroner. Utgifter til reise og ymse tillegg er holdt utenom. Det forutsettes videre at det blir tatt prøver av et utvalg fisk, enten i felt eller senere på lab. Kostnadene er anslått til mellom 10 000 og 48 000 kroner, avhengig av geografisk lokalisering, type feltarbeid, lokalitetstype og størrelse. Størst kostnad medfører prøvefiske med garn i større innsjøer når arbeidet krever lang reise/overnatting. Det er lagt opp til en relativt stor garninnsats, noe som er nødvendig når målet er å påvise artsinventaret i en lokalitet. Også elfiske i elver er ressurskrevende da det er nødvendig å dekke en relativt lang strekning (opp til 10 km), mange stasjoner (opptil 20) og ulike habitattyper.

Tabell 4. Koststadsoverslag ved innsamling av fisk i innsjøer og bekk/elv for å påvise artsinventaret.

Geografisk	Redskap	Lokalitetstype og størrelse	Kostnad (kr)
Lokalt	Garn	Innsjø - Liten	20 000
Lokalt	Garn	Innsjø - Stor	40 000
Lokalt	Elfiske	Bekk	10 000
Lokalt	Elfiske	Elv	20 000
Regionalt	Garn	Innsjø - Liten	35 000
Regionalt	Garn	Innsjø - Stor	48 000
Regional	Elfiske	Bekk	20 000
Regionalt	Elfiske	Elv	48 000

7.2 Miljø-DNA analyser

For miljø-DNA gjør vi den samme distinksjonen mellom lokaliteter i nærområde og de som krever flyreise og overnatting. Miljø-DNA-prøver kan derimot samles inn i løpet av én dag også med flyreise dersom lokaliteten ikke ligger for langt fra flyplass og bilveg. Vi har heller ikke her regnet inn reise- og overnattingskostnader i prisen. Som for konvensjonelle analyser er også hovedkostnaden for miljø-DNA lønnsmidler, men da både for felt- og lab-personell. Dette gjør at antall prøver totalt for en bestilling vil ha stor effekt på prisen per prøve. Tidsbruken på lab og altså antall timeverk blir for eksempel ganske lik om det er fem eller 25 prøver.

I priseksempelet for artsspesifikke markører under tar vi utgangspunkt i 10 prøver fra fem lokaliteter i en innsjø eller elv. For større innsjøer kan det være hensiktsmessig å øke antall prøver, avhengig av formen på innsjøen og biologien til arten man er ute etter å påvise. For lokale innsjøer regner vi her en full arbeidsdag for en ansatt, for regionale innsjøer uten overnatting regner vi 10 timer for en ansatt, og for regionale innsjøer med overnatting regner vi to dager med til sammen 17,5 timer. Vi har kun regnet pris for en genetisk markør for en enkelt art, men ofte er det gunstig å inkludere en vanlig fiskeart som for eksempel ørret i tillegg som en positiv kontroll.

Men i priseksempelen vårt vil dette bare fordyre total kostnaden med 1000 kroner. Vi har regnet med lab-triplikater for alle feltprøver i dette eksempelet.

For artsgenerelle markører blir kostnaden for lab-analyser en god del dyrere. Men en slik analyse inkluderer da påvisning av alle fiskearter i en lokalitet samtidig. Hver prøve vil da koste omtrent 3 500 kroner, og vi vil da begrense antall prøver per innsjø til fire stykk.

Tabell 5. Kostnadsoverslag for artspåvisning og artsinventering med miljø-DNA.

Geografisk	Analyse	Kostnad (kr)
Lokalt	Artsspesifikk analyse	12 000
Lokalt	Artsgenerell analyse	15 000
Regionalt u/overnatting	Artsspesifikk analyse	22 000
Regionalt u/overnatting	Artsgenerell analyse	22 000
Regionalt m/overnatting	Artsspesifikk analyse	25 000
Regionalt m/overnatting	Artsgenerell analyse	32 000

8 Oppsummering og konklusjon

I dette prosjektet har vi utviklet, optimalisert og testet artsspesifikke miljø-DNA-markører for gjedde, mort og ørekyt. I tillegg har vi testet og optimalisert utstyr og protokoller for både lab og felt med hensyn til å kunne påvise fremmede fiskearter gjennom en slik prøve. Videre har vi beskrevet variasjon knytta til sted og tidspunkt for en miljø-DNA-prøve i forhold til påvisning og konsentrasjon av miljø-DNA for en gitt art og innsjø.

Vi har utelukkende fokusert på prøvetaking ved å pumpe vann gjennom et finmaska filter. Vi har testet noen forskjellige filtre med ulik maskevidde, men finner generelt liten forskjell mellom dem i det intervallet vi har testet (0,45-1,2 mikrometer). Vi vil derfor anbefale sterilt pakket engangs filtre med filterholdere for å unngå kontaminering på tvers av prøver. Vi har også testet hvordan vannvolum påvirker konsentrasjonen av miljø-DNA i våre analyser og finner at 1 liter vann gir noe høyere utbytte per volumenhet enn 0,5 liter vann. På lab har vi testet 6 ulike ekstraksjonskit der vi kan anbefale tre av disse for ekstraksjon av DNA fra filter.

Gjennom det siste året har vi gjort gjentatte prøvetakinger i Kyvatnet i Bymarka for å se hvordan årstid påvirker konsentrasjonen av miljø-DNA. Ut i fra disse resultatene kan det se ut som om perioden februar-mars har en lav konsentrasjon av miljø-DNA og dermed egner seg dårlig til påvisning av sjeldne fiskearter. Dette resultatet er bare basert på én innsjø og bør derfor bekrefte med undersøkelser i andre innsjøer. Vi finner også en mulig «peak» i DNA-konsentrasjonen rundt tidspunktet for våromrøring i midten av mai, og dette kan være et gunstig tidspunkt for å påvise sjeldne arter. Men om man er ute etter en kvantifisering av miljø-DNA for å kunne si noe om total biomasse av en art vil dette tidspunktet være mindre ideelt.

Gjennom sommeren 2016 gjennomførte vi et stort eksperiment med gjentatte prøvetakinger i fire ulike innsjøer i Bymarka: Baklidammen, Theisendammen, Kyvatnet og Haukvatnet. I tillegg til våre egne markører for mort og gjedde benyttet vi også en publisert markør for ørret. For hver innsjø valgte vi ut fem lokaliteter som ble prøvetatt på fire ulike tidspunkt i perioden juli til september. Resultatet for enkeltprøver viser at det finnes en god del variasjon både mellom lokaliteter innen en innsjø og mellom ulike tidspunkt for en og samme lokalitet. Men generelt sett finner vi veldig konsistente resultater i påvisning av de ulike artene både innen og mellom innsjøer. For gjedde og mort i Kyvatnet og Haukvatnet, samt ørret i Baklidammen, både påviser og kvantifiserer vi miljø-DNA for stort sett alle lokaliteter og tidspunkter. Derimot finner vi bare ørret i noen enkeltprøver fra Haukvatnet og Theisendammen, og mort stort sett bare i én lokalitet i Theisendammen. Ørret ble satt ut på 1990-talet i Haukvatnet, men er ikke påvist gjennom fiskefangster eller prøvefiske i de senere år, og ble heller ikke funnet etter rotenonbehandling (Terje Nøst, pers. medd.). Det positive signalet vi fanger opp her er derfor muligens kontaminering, enten fra oss selv, eller gjennom transport av ørret-DNA fra folk eller dyr. Vi fant positive signaler av ørret på tre ulike lokaliteter på to ulike datoer. Derimot er testene for gjedde og mort i Baklidammen og ørret i Kyvatnet negative for samtlige enkeltprøver, noe som tyder på at kontaminering fra oss selv i Haukvatnet er lite sannsynlig.

Om man slår sammen alle prøvene fra ulike lokaliteter innen innsjøer eller prøver tatt på samme lokalitet på ulike tidspunkt, finner vi relativt konsistente resultater både for påvisning og kvantifisering av de ulike artene. Ved hjelp av de tre artsspesifikke markørene får vi derfor en meget bra oversikt over fiskesamfunnene i de ulike innsjøene. Vi vil derfor anbefale én prøvetaking med flere lokaliteter innen hver innsjø da dette stort sett er tilstrekkelig for å påvise enkeltarter.

Innsjøene vi benyttet til vårt eksperiment på miljø-DNA ble også prøvefiske med konvensjonell metode, dvs. garnfiske i 2015. I tillegg ble det samla inn død fisk etter rotenonbehandlingen høsten 2016. Vi kan derfor sammenligne hvordan miljø-DNA beskriver fiskesamfunnene i disse innsjøene i forhold til konvensjonelle metoder. Vi finner en svært god sammenheng i tettheten av miljø-DNA mot både prøvefiske og antall kilo fisk plukket opp etter rotenonbehandlingen. Et unntak er Theisendammen, der vi påviser den høyeste konsentrasjonen av gjedde-DNA, mens de to andre metodene finner at denne innsjøen har den laveste biomassen av gjedde blant de undersøkte innsjøene. Om vi derimot ser på forholdstallet mellom mort og gjedde i de samme innsjøene får vi et svært likt bilde av miljø-DNA og biomasse av fisk målt etter rotenonbehandlingen, mens prøvefiske viser et veldig høyt tall for Kyvatnet. Her må det nevnes at gjedde er en

svært vanskelig art å kvantifisere ved hjelp av garnfiske og datagrunnlaget for gjedde er begrenset til to gjedder i Haukvatnet, to gjedder i Kyvatnet og bare ei gjedde i Theisendammen.

Samtidig fant vi svært lite mort-DNA i Theisendammen, og kunne bare påvise mort gjentatte ganger i én av fem lokaliteter. Etter rotenonbehandling ble det bare plukket opp 50 kg mort fra Theisendammen sammenligna med 548 kg i Haukvatnet og 1206 kg i Kyvatnet. Følgelig var tettheten av mort klart lavest i Theisendammen. Når det gjelder forholdet mellom mort og gjedde ble det plukket opp 60 kg gjedde i Theisendammen, altså nesten lik biomasse av mort og gjedde, mens vi påviste en mye høyere konsentrasjon av gjedde-DNA enn mort-DNA. Dette viser at både biologi og innsjø er viktige faktorer i påvisningen av enkeltarter. Theisendammen virker å være en vanskelig innsjø i forhold til bruk av miljø-DNA sammenlignet med de andre innsjøene, og mort-DNA var spesielt vanskelig å påvise i denne innsjøen. Det er mulig at vår prøvetaking langs strandkanten er bedre til å påvise gjedde enn mort, og at en annen prøvetaking lengre ut fra land og dypere ned i vannet ville vært mer egnet til å påvise mort. Samtidig fant vi veldig mye mort-DNA med den samme metoden i Kyvatnet og Haukvatnet.

Dette resultatet er også svært viktig i forhold til påvisning av fremmede fiskearter i en tidlig spredningsfase, altså med få individer og liten biomasse. Om man igjen antar at det meste av fisk ble plukket opp fra Theisendammen etter rotenonbehandling, har vi altså et minimumsestimert på 50 kg mort og 60 kg gjedde. Dette er nok fortsatt en mye høyere biomasse enn det en nylig spredning av mort eller gjedde til en ny innsjø vil gi, men her finner vi altså gjedde-DNA stort sett på alle lokaliteter og alle tidspunkter, mens vi bare finner mort-DNA gjentatte ganger på en lokalitet. Her kan vi derfor si at med den prøvetakingen vi benytta i dette studiet bør gjedde kunne påvises med miljø-DNA i en relativt tidlig spredningsfase. Derimot kan trolig påvisning av mort ved små tettheter forbedres med en alternativ innsamlingsmetodikk.

I tillegg til arbeidet med artsspesifikke markører har vi også testet bruk av en artsgenerell markør for fisk. Her benyttet vi oss av selskapet Spygen i Frankrike for sekvensering og bioinformatikk. Denne metodikken gir altså en samtidig påvisning av alle fiskearter i en gitt lokalitet med en relativ biomasse av hvert art. Disse prøvene gir oss omtrent en halv million DNA-sekvenser hver som kan sammenlignes med en referansedatabase for fisk for å identifisere hvilke arter de kommer fra. Fordelen med denne metoden er at vi slipper å utvikle egne DNA-markører for hver art, mens ulempen er at vi bare får en relativ kvantifisering av forholdet mellom hver art og ikke en absolutt mengde DNA per liter vann. I tillegg krever disse prøvene en «next-gen» sekvensering som ofte har flere måneders ventetid for levering av resultater på kommersielle laboratorier. Men med testen vi gjorde her kunne vi påvise alle arter og gi en god presentasjon av fiskesamfunna i hver innsjø. I denne rapporten gir vi bare et kort innblikk i hvordan slike resultat kan se ut og vil i en senere rapport komme mer tilbake til denne metoden.

I løpet av denne prosjektperioden gjorde vi også en direkte forvaltningsretta undersøkelse av miljø-DNA i forhold til vandringsperrer og spredning av ørekyt på Hardangervidda. Ved hjelp av helikoptertransport fikk vi samlet inn miljø-DNA-prøver fra et veldig stort område i løpet av en halv dag, og dette må sies å være en veldig effektiv og billig undersøkelse. Vi kunne med disse prøvene bekrefte resultater fra konvensjonelle undersøkelser med elfiske og utsetting av ruser, og vi fant ørekyt-DNA nedstrøms vandringsperrere som forventet og ingen tegn til ørekyt-DNA oppstrøms vandringsperrere. Vi inkluderte også her en ørret-DNA-markør som en positiv kontroll og kunne påvise ørret-DNA der dette var forventet.

Vi kan altså konkludere med at miljø-DNA er et reelt alternativ for påvisning av fiskesamfunn og fremmede arter i forhold til konvensjonelle metoder. Vi finner at både påvisning og kvantifisering av artsspesifikt DNA stemmer bra overens med konvensjonelle metoder, men at miljø-DNA er mindre arbeidskrevende i felt og totalt sett er en billigere metode. Miljø-DNA er en veldig sensitiv metode, og kontaminering kan derfor utgjøre et potensielt problem. Det er mulig at fiske-DNA transportert med folk eller dyr kan påvises i en innsjø der arten ikke finnes. Vi fant for eksempel ørret-DNA i Haukvatnet i noen få prøver i dette studiet og så vidt vi vet finnes det ikke ørret i denne innsjøen. Metoden krever derfor at man er svært nøyaktig i forhold til renslighet og transport av prøvetakingsutstyr mellom ulike innsjøer. Når det gjelder grenser for påvisning av fremmede arter med lav tetthet kan vi foreløpig ikke gi noen absolutt verdi for dette. Både innsjø og art vil påvirke denne grensa og prøvetakingsmetoden i dette studiet synes å være bedre egna til

å påvise gjedde enn mort ved lave tettheter. Vi vil anbefale at forvaltningen nå tar i bruk miljø-DNA i overvåkning av fiskesamfunn og fremmede arter og at metoden gis mulighet til å videreutvikles for norske forhold.

9 Referanser

- Andersen, K., Bird, K. L., Rasmussen, M., Haile, J., Breuning-Madsen, H., Kjær, K. H., Orlando, L., Gilbert, M. T. P. & Willerslev, E. 2012. Meta-barcoding of 'dirt' DNA from soil reflects vertebrate biodiversity. - *Molecular Ecology* 21 (8): 1966-1979.
- Bardal, H. 2015. Rapport fra gjennomført rotenonbehandling av Vikerauntjønna 25. sept. 2014. Veterinærinstituttet, Seksjon for miljø og smittetiltak. Notat. 7 s. Veterinærinstituttet, Seksjon for miljø og smittetiltak.
- Borgstrøm, R. 1973. Spredning av ørekyt. Jakt – Fiske – Friluftsliv 102: 28-29.
- Brabrand, Å. 2007. Fiskebiologiske undersøkelser i Krøderen. Rapp. Lab. Ferskvøkol. Innlandsfiske, Universitetet i Oslo 250. 46 s.
- Brabrand, Å. 2009. Tetthet av ørretunger i tilløpselver til Krøderen og i Hallingdalselva. Rapp. Lab. Ferskv. Økol. Innlandsfiske, Universitetet i Oslo 267. 15 s.
- Britton, J. R., Davies, G. D. & 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.
- Civade, R., Dejean, T., Valentini, A., Roset, N., Raymond, J.-C., Bonin, A., Taberlet, P. & Pont, D. 2016. Spatial Representativeness of Environmental DNA Metabarcoding Signal for Fish Biodiversity Assessment in a Natural Freshwater System. - *PLoS ONE* 11 (6): e0157366.
- Clavero, M. & García-Berthou, E. 2006. Homogenization dynamics and introduction routes of invasive freshwater fish in the Iberian peninsula. - *Ecological Applications* 16 (6): 2313-2324.
- Clavero, M. & Villero, D. 2014. Historical Ecology and Invasion Biology: Long-Term Distribution Changes of Introduced Freshwater Species. - *BioScience* 64 (2): 145-153.
- Cucherousset, J. & Olden, J. D. 2011. Ecological Impacts of Nonnative Freshwater Fishes. - *Fisheries* 36 (5): 215-230.
- Dejean, T., Valentini, A., Miquel, C., Taberlet, P., Bellemain, E. & Miaud, C. 2012. Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. - *Journal of Applied Ecology* 49 (4): 953-959.
- Dejean, T., Valentini, A., Duparc, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P. & Miaud, C. 2011. Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. - *PLoS ONE* 6 (8): e23398.
- Doi, H., Takahara, T., Minamoto, T., Matsushashi, S., Uchii, K. & Yamanaka, H. 2015. Droplet Digital Polymerase Chain Reaction (PCR) Outperforms Real-Time PCR in the Detection of Environmental DNA from an Invasive Fish Species. - *Environmental Science & Technology* 49 (9): 5601-5608.
- Dougherty, M. M., Larson, E. R., Renshaw, M. A., Gantz, C. A., Egan, S. P., Erickson, D. M. & Lodge, D. M. 2016. Environmental DNA (eDNA) detects the invasive rusty crayfish *Orconectes rusticus* at low abundances. - *Journal of Applied Ecology* 53 (3): 722-732.
- Eichmiller, J. J., Miller, L. M. & Sorensen, P. W. 2016. Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish. - *Molecular Ecology Resources* 16 (1): 56-68.
- Evans, N. T., Olds, B. P., Renshaw, M. A., Turner, C. R., Li, Y., Jerde, C. L., Mahon, A. R., Pfrender, M. E., Lamberti, G. A. & Lodge, D. M. 2016. Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding. - *Molecular Ecology Resources* 16 (1): 29-41.
- Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F. & Taberlet, P. 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. - *Biology Letters* 4 (4): 423-425.
- Goldberg, C. S., Pilliod, D. S., Arkle, R. S. & Waits, L. P. 2011. Molecular detection of vertebrates in stream water: a demonstration using Rocky Mountain tailed frogs and Idaho giant salamanders. - *PLoS ONE* 6 (7): e22746.
- Gozlan, R. E. 2008. Introduction of non-native freshwater fish: is it all bad? - *Fish and Fisheries* 9 (1): 106-115.
- Gozlan, R. E. 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, R. E., Britton, J. R., Cowx, I. & Copp, G. H. 2010. Current knowledge on non-native freshwater fish introductions. - *Journal of Fish Biology* 76 (4): 751-786.
- Gustavson, M. S., Collins, P. C., Finarelli, J. A., Egan, D., Conchúir, R. Ó., Wightman, G. D., King, J. J., Gauthier, D. T., Whelan, K., Carlsson, J. E. L. & Carlsson, J. 2015. An eDNA assay

- for Irish *Petromyzon marinus* and *Salmo trutta* and field validation in running water. - *Journal of Fish Biology* 87 (5): 1254-1262.
- Hesthagen, T. & Sandlund, O. T. 1997. Endringer i utbredelsen av ørekyte i Norge: årsaker og effekter. - NINA Fagrapport 13. 16 s.
- Hesthagen, T. & Østborg, G. 2004. Utbredelse av ferskvannsfisk, naturlige fiskesamfunn og fisketomme vatn i Troms og Finnmark. - NINA Oppdragsmelding 805. 30 s.
- Hesthagen, T. & Sandlund, O. T. 2006. *Phoxinus phoxinus* 2006. Nobanis Invasive Alien Species Fact Sheet. www.nobanis.org. Nedlastet.
- Hesthagen, T. & Sandlund, O. T. 2012. Gjedde, sørv og suter: status, vektorer og tiltak mot uønsket spredning. - NINA Rapport 669. 45 s.
- Hesthagen, T. & Sandlund, O. T. 2015. Utvikling av metodikk for å påvise spredning av fiskearter i ferskvannsfisk. - NINA Rapport 1092. 30 s.
- Hesthagen, T. & Sandlund, O. T. 2016. Spredning av ferskvannsfisk i Norge. En fylkesvis oversikt og nye registreringer i 2015. - NINA Rapport 1205. 54 s.
- Hesthagen, T., Sandlund, O. T. & Museth, J. 2006. Ørekyt *Phoxinus phoxinus*. www.artsdatabanken.no Faktaark Fremmedart nr. 28. 3 s. Nedlastet.
- Hesthagen, T., Sandlund, O. T., Finstad, A. G. & Johnsen, B. O. 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.
- Huitfeldt-Kaas, H. 1918. Ferskvandsfiskenes utbredelse og indvandring i Norge med et tillæg om krebsen. Centraltrykkeriet. Kristiania. 106 s + kart.
- Hänfling, B., Lawson Handley, L., Read, D. S., Hahn, C., Li, J., Nichols, P., Blackman, R. C., Oliver, A. & Winfield, I. J. 2016. Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. - *Molecular Ecology* 25 (13): 3101-3119.
- Jerde, C. L., Mahon, A. R., Chadderton, W. L. & Lodge, D. M. 2011. "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. - *Conservation Letters* 4 (2): 150-157.
- Kleiven, E. & Hesthagen, T. 2012. Fremmede fiskearter i ferskvann i Aust-Agder - Historikk, status og konsekvenser. - NINA Rapport 665. 108 s.
- 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.
- 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.
- Lehmann, G. B. & Skår, B. 2016. Undersøkelse av ørekyt ved Songmagasinet, Argehovd og Lågliberget i 2016. Uni Research Miljø, Laboratorium for ferskvannssøkolog og innlandsfiske (LFI). Rapport nr. 276. .
- McKelvey, K. S., Young, M. K., Knotek, W. L., Carim, K. J., Wilcox, T. M., Padgett-Stewart, T. M. & Schwartz, M. K. 2016. Sampling large geographic areas for rare species using environmental DNA: a study of bull trout *Salvelinus confluentus* occupancy in western Montana. - *Journal of Fish Biology* 88 (3): 1215-1222.
- Museth, J., Hesthagen, T., Sandlund, O. T., Thorstad, E. & Ugedal, O. 2007. The history of the European minnow in Norway: from harmless species to pest (Supple-met D). - *Journal of Fish Biology* 71: 184-195.
- Nakagawa, S. & Schielzeth, H. 2010. Repeatability for Gaussian and non-Gaussian data: a practical guide for biologists. - *Biological Reviews* 85 (4): 935-956.
- Nøst, T. 2015. Fiskebiologiske undersøkelser i 7 vann i Bymarka med tilliggende bekker i 2015. Fagnotat 15. oktober 2015. Miljøenheten. Trondheim kommune.
- Ogram, A., Sayler, G. S. & Barkay, T. 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. - *Journal of Microbiological Methods* 7 (2-3): 57-66.
- Olds, B. P., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Li, Y., Evans, N. T., Turner, C. R., Deiner, K., Mahon, A. R., Brueseke, M. A., Shirey, P. D., Pfrender, M. E., Lodge, D. M. & Lamberti, G. A. 2016. Estimating species richness using environmental DNA. - *Ecology and Evolution* 6 (12): 4214-4226.
- 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.

- Olsen, J. B., Lewis, C. J., Massengill, R. L., Dunker, K. J. & Wenburg, J. K. 2016. Erratum to: An evaluation of target specificity and sensitivity of three qPCR assay for detecting environmental DNA from Northern Pike (*Esox lucius*). - *Conservation Genetics Resources* 8 (1): 89-89.
- Pietramellara, G., Ascher, J., Borgogni, F., Ceccherini, M. T., Guerri, G. & Nannipieri, P. 2009. Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. - *Biology and Fertility of Soils* 45 (3): 219-235.
- Rahel, F. J. 2000. Homogenization of fish faunas across the United States. - *Science* 288: 854-856.
- Rask, M., Appelberg, M., Hesthagen, T., Tammi, J., Beier, U. & Lappalainen, A. . 2000. Fish status survey of Nordic lakes- species composition, distribution, effects of environmental changes. , Rep. 2000:508. - TemaNord 508.
- Robson, H. L. A., Noble, T. H., Saunders, R. J., Robson, S. K. A., Burrows, D. W. & Jerry, D. R. 2016. Fine-tuning for the tropics: application of eDNA technology for invasive fish detection in tropical freshwater ecosystems. - *Molecular Ecology Resources* 16 (4): 922-932.
- Sala, O. E., Chapin, F. S., Armesto, J. J., Berlow, E., Bloomfield, J., Dirzo, R., Huber-Sanwald, E., Huenneke, L. F., Jackson, R. B., Kinzig, A., Leemans, R., Lodge, D. M., Mooney, H. A., Oesterheld, M., Poff, N. L., Sykes, M. T., Walker, B. H., Walker, M. & Wall, D. H. 2000. Biodiversity - Global biodiversity scenarios for the year 2100. - *Science* 287 (5459): 1770-1774.
- Sandlund, O. T., Hesthagen, T. & Saksgård, L. 2013. Tiltaksrettet overvåking av spredning og introduksjon av ferskvannsfisk. - NINA Rapport 908. 35 s.
- Sandvik, H., Gederaas, L., Moen, T. L. & Skjelseth, S. 2015. Veileder fremmede arter 2017: risikovurdering av økologisk påvirkning, versjon 0.9. Trondheim: Artsdatabanken. 72 s. .
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M. & Rieseberg, L. H. 2012. Environmental DNA. - *Molecular Ecology* 21 (8): 1789-1793.
- Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H. & Kawabata, Z. i. 2012. Estimation of fish biomass using environmental DNA. - *PLoS ONE* 7 (4): e35868.
- Tammi, J., Appelberg, M., Beier, U., Hesthagen, T., Lappalainen, A. & Rask, M. 2003. Fish Status Survey of Nordic Lakes: Effects of Acidification, Eutrophication and Stocking Activity on Present Fish Species Composition. - *AMBIO: A Journal of the Human Environment* 32 (2): 98-105.
- Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Møller, P. R., Rasmussen, M. & Willerslev, E. 2012. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. - *PLoS ONE* 7 (8): e41732.
- Thomsen, P. F., Møller, P. R., Sigsgaard, E. E., Knudsen, S. W., Jørgensen, O. A. & Willerslev, E. 2016. Environmental DNA from Seawater Samples Correlate with Trawl Catches of Subarctic, Deepwater Fishes. - *PLOS ONE* 11 (11): e0165252.
- Thomsen, P. F., Kielgast, J. O. S., Iversen, L. L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M. T. P., 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, P. F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., Gaboriaud, C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, G. H., Geniez, P., Pont, D., Argillier, C., Baudoin, J.-M., Peroux, T., Crivelli, A. J., Olivier, A., Acqueberge, M., Le Brun, M., Møller, P. R., Willerslev, E. & Dejean, T. 2016. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. - *Molecular Ecology* 25 (4): 929-942.
- Villéger, S., Blanchet, S., Beauchard, O., Oberdorff, T. & Brosse, S. 2011. Homogenization patterns of the world's freshwater fish faunas. - *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108 (44): 18003-18008.

10 Vedlegg

Vedlegg 1. Oversikt over genetiske markører utviklet og testet i dette prosjektet. Markørene merket med grønn farge ble valgt ut og brukt gjennomgående i dette studiet.

Art	Gen	Forward primer	Forward primer sekvens	Reverse primer	Reverse primer sekvens	Probe primer	Probe primer sekvens
Gjedde	CytB	EL_CytB_177-199_F	CTCCACAGCCTTCTCATCAGTCT	EL_CytB_218-241_R	TTCGGATAAGTCAGCCGTAGTTAA	EL_CytB_201-216_P	CCACATCTGCCGGGAC
Gjedde	CytB	EL_CytB_378-397_F	CGCCTTCGTTGGCTATGTTT	EL_CytB_417-440_R	GTAAATTACTGTTGCCCTCAAAAA	EL_CytB_401-415_P	CCTGAGGACAAATAT
Gjedde	CytB	EL_CytB_497-515_F	GCGGCTTCTCCGTCGATA	EL_CytB_538-561_R	GAAAGGAAAAAAGAAGTGGAAATGC	EL_CytB_518-534_P	CAACCCTTACACGATTC
Gjedde	CytB	EL_CytB_497-514_F	GCGGCTTCTCCGTCGATA	EL_CytB_538-561_R	GAAAGGAAAAAAGAAGTGGAAATGC	EL_CytB_519-535_P	AACCCTTACACGATTC
Gjedde	CytB	EL_CytB_497-514_F	GCGGCTTCTCCGTCGATA	EL_CytB_538-561_R	GAAAGGAAAAAAGAAGTGGAAATGC	EL_CytB_516-532_P	CGCAACCTTACACCGAT
Gjedde	COI	EL_COI_66-85_F	TGGTGCTTGAGCCGGAATAG	EL_COI_102-119_R	TCGGCCCGGATTAATAAAGG	EL_COI_87-100_P	CGGCACAGCCTTAA
Gjedde	COI	EL_COI_66-84_F	TGGTGCTTGAGCCGGAATA	EL_COI_102-119_R	TCGGCCCGGATTAATAAAGG	EL_COI_86-100_P	TCGGCACAGCCTTAA
Gjedde	COI	EL_COI_66-83_F	TGGTGCTTGAGCCGGAAT	EL_COI_102-119_R	TCGGCCCGGATTAATAAAGG	EL_COI_86-100_P	TCGGCACAGCCTTAA
Mort	16S	Mort_16S_312-331_F	TCCGAGTGGACTGGGCTAAA	Mort_16S_351-374_R	CAGATGTTCTGCGGCTTATAGATG	Mort_16S_334-348_P	CCCAAAGCCAAAGAGA
Mort	CytB	Mort_CytB_380-402_F	CCTTCGTTGGCTACGTA CTACCA	Mort_CytB_440-423_R	GTGATTACGGTGGCGCCT	Mort_CytB_406-421_P	GGGCAAAATATCCTTCT
Mort	COI	Mort_COI_73-90_F	AGCCAACCCGGGTCACTT	Mort_COI_112-131_R	TGGGCGGTAAACGATGACATT	Mort_COI_96-109_P	CGATGACCAAATTT
Mort	COI	Mort_COI_75-92_F	GCCAACCCGGGTCACTT	Mort_COI_112-131_R	TGGGCGGTAAACGATGACATT	Mort_COI_94-109_P	AGGGGATGACCAAATTT
Ørekyt	CTRL	Ørekyt_CTRL_19-42_F	GGATGGCTAACCCATATCTCAACT	Ørekyt_CTRL_68-88_R	GTCAAAACCCCAAAAAGCAAAGGA	Ørekyt_CTRL_51-64_P	CGCACGCTCTCGAA
Ørekyt	COI	Ørekyt_COI_455-471_F	TGAAAGCCCCCGCCATT	Ørekyt_COI_491-508_R	GCACGGCCCATACGAAGA	Ørekyt_COI_473-487_P	CCCAAATATCAAACCC
Ørekyt	COI	Ørekyt_COI_255-271_F	CCTGCCCCCTCAATTCC	Ørekyt_COI_296-310_P	CGGCCCCCAAGCCTCAA	Ørekyt_COI_273-294_P	TCTTCTACTAGTTCCTCTGGT



Norsk institutt for naturforskning (NINA) er et nasjonalt og internasjonalt kompetansesenter innen naturforskning. Vår kompetanse utøves gjennom forskning, utredningsarbeid, overvåking og konsekvensutredninger.

NINAs primære aktivitet er å drive anvendt forskning. Stikkord for forskningen er kvalitet og relevans, samarbeid med andre institusjoner, tverrfaglighet og økosystemtilnærming. Offentlig forvaltning, næringsliv og industri samt Norges forskningsråd og EU er blant NINAs oppdragsgivere og finansieringskilder.

Virksomheten er hovedsakelig rettet mot forskning på natur og samfunn, og NINA leverer et bredt spekter av tjenester gjennom forskningsprosjekter, miljøovervåking, utredninger og rådgiving.

ISSN:1504-3312
ISBN: 978-82-426-2976-0

Norsk institutt for naturforskning

NINA Hovedkontor

Postadresse: Postboks 5685 Sluppen, 7485 Trondheim

Besøks/leveringsadresse: Hogskoleringen 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