

Utvikling av miljø-DNA markører for påvisning av flytegro *Luronium natans*

På oppdrag fra Norsk Naturarv og Anders Gunnar Helle

Markus Majaneva, Hege Brandsegg, Frode Fossøy

Trondheim, 21.12.2020

UPUBLISERT

TILGJENGELIGHET
Åpen

PROSJEKTLEDER
Markus Majaneva

ANSVARLIG FORSKNINGSSJEF
Ingeborg Palm Helland

OPPDRAGSGIVER(E)/BIDRAGSYTER(E)
Norsk Naturarv og Anders Gunnar Helle

OPPDRAGSGIVERS REFERANSE

KONTAKTPERSON(ER) HOS OPPDRAGSGIVER/BIDRAGSYTER
Anders Gunnar Helle

Innhold

1 Introduksjon	Error! Bookmark not defined.
1.1 Bakgrunn.....	Error! Bookmark not defined.
1.2 Formål.....	Error! Bookmark not defined.
2 Metoder	4
2.1 Prøver.....	4
2.2 Miljø-DNA markører.....	4
2.3 Labanalyser.....	5
3 Resultater	6
3.1 Bladtesten.....	6
3.1.1 qPCR.....	6
3.1.2 ddPCR.....	6
3.2 Miljø-DNA med ddPCR.....	7
4 Konklusjon	9
4 Litteratur	10

1 Innledning

1.1 Bakgrunn

Flytegro (*Luronium natans*) er en sterkt truet (EN) vannplante i vassgrofamilien Alismataceae (Henriksen og Hilmo 2015). Den vokser i fem små middels næringsrike sjøer i Oslo: Alnsjøen, Breisjøen, Dausjøen, Maridalsvatnet og Svartkulp. Andre forekomstplasser er enten innplantet (Fredrikstad), ikke bekreftet (Oppegård) eller bygd på feilbestemt materiale (Larvik). Arten er lett å identifisere i felt, særlig med bladene som flyter i overflaten av vannet med sin lille, hvite og tretallige blomst, men den er også svært variabel under vann.

Dykking er ofte brukt for å kartlegge forekomster av flytegro og andre vannplanter, men i det siste har bruk av miljø-DNA vokst som et mulig alternativ til tidskrevende og ofte kompliserte vegetasjonskartlegginger i vann (Anglès d'Auriac mfl. 2019). Analyser av miljø-DNA er en 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). Metoden drar nytte av at alle organismer frigir DNA til omgivelsene sine. Dette er det dermed mulig å samle inn ved filtrering av vannprøver. Med artsspesifikke genetiske markører er det mulig å påvise tilstedeværelsen av en enkelt art eller hele taksonomiske grupper. Da DNA brytes ned raskt i naturen, vil en påvisning av en eller flere arter indikere en stor sannsynlighet for at denne eller disse finnes på den undersøkte lokaliteten eller har vært i området innenfor en relativ kort periode. Metoden er svært sensitiv og det trengs i prinsippet kun en enkelt DNA-kopi for arten som ønskes undersøkt, for å kunne påvise tilstedeværelsen av denne. Derfor har metoden frem til nå primært vært brukt til å finne sjeldne arter (Thomsen mfl. 2012b) og/eller uønskete fremmede arter (Balasingham mfl. 2017). Sammenligning med konvensjonelle metoder har vist at miljø-DNA-metoden er mer sensitiv og finner flere arter (Thomsen mfl. 2012a). NINA har i løpet av de siste årene utviklet både prøvetakingsutstyr og molekylære verktøy for analyser av miljø-DNA og har verifisert protokoller for mange akvatiske organismer (Fossøy mfl. 2017, Taugbøl mfl. 2017, Fossøy mfl. 2018, Taugbøl mfl. 2018, Wacker mfl. 2019, Fossøy mfl. 2020, Magerøy mfl. 2020).

1.2 Formål

Flytegro ble detaljkartlagt i Breisjøen i forbindelse av tapping av vannet på grunn av vedlikehold på demningen, og det viste seg at arten var tilstede i deler som tidligere var kartlagt som fraværende (A.G. Helle, personlig kommunikasjon). Derfor ble planlagt kartlegging av omkringliggende vann og sakterennende bekker, for å vite om flytegro kan være tilstede ved flere lokaliteter der den er tidligere oversett. Dykking var ikke mulig på grunn av mangel på sertifisert personell (under Covid-19 pandemien i 2020).

Derfor foreslo oppdragsgiveren å utforske muligheten til å bruke miljø-DNA til kartlegging av flytegro. I utgangspunktet var vi forberedt på at vi ikke ville kunne bruke denne metoden til kartlegging av flytegro unidelt, men vi ønsket å utvikle ulike miljø-DNA markører. Først testet vi utviklede markører på DNA ekstrahert fra flytegro og nært beslektede arter, og videre, testet vi deteksjonsevnen til de beste markørene på miljø-DNA prøver samlet fra lokaliteter med og uten påvist forekomst av flytegro. Til slutt prøvde vi å estimere i hvilken grad miljø-DNA kan brukes i kartlegging av flytegro.

2 Metoder

2.1 Prøver

Vi fikk ett blad av flytegro fra oppdragsgiveren, og for å få referanser fra nært beslektede arter, hentet vi et blad av vassgro (*Alisma plantago-aquatica*) fra Madsjøen og tjernaks (*Potamogeton natans*) fra Kyvatnet i Trondheim. Bladene ble lagret i silica gel før DNA ble ekstrahert med Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Tyskland) Nucleospin Plant kit ifølge protokollen fra produsenten.

Oppdragsgiveren hadde tatt miljø-DNA prøver 8.-10.9.2020 fra Maridalsvatnet, Dausjøen og Breisjøen i Oslo og fra en dam ved Fjeld Gård i Sarpsborg. Fra Maridalsvatnet ble prøver tatt ved siden av flytegro samt 50m og 100m fra flytegro og fra utløpet. I Dausjøen ble prøver tatt fra vannkanten, utløpet og 100m fra stranden. Fjeld Gård og Breisjøen ble prøvetatt fra stranden. Med hjelp av 1-liter beger og en batteridrevet peristaltisk pumpe (Bürkle Vampire sampler), ble enten 1.5 liter (Fjeld Gård), 3 liter (Breisjøen) eller 5 liter av vann filtrert gjennom et NatureMetrics (Surrey, UK) filterholder som har et 5.0 µm glassfiberfilter og et 0.8 µm polyethersulfone filter. Filtrene ble preservert med 4050 µl ATL-buffer (Qiagen) og 450 µl proteinase-K (Qiagen) direkte etter prøvetakning og oppbevart i romtemperatur frem til isolering. Ved isolering ble rørene inkubert ved 56°C over natten. DNA ble så isolert med NucleoSpin Plant II Midi kit (Macherey-Nagel) etter produsentens protokoll, men med lysering- og vaskebuffer fra Qiagen. DNA ble eludert i 200 µl forvarmet AE-buffer (Qiagen) og deretter eludert igjen på samme kolonne for å maksimere utbyttet av DNA. DNA kvalitet etter ekstraksjoner ble målt med NanoDrop.

2.2 Miljø-DNA markører

For å utvikle mulige artsspesifikke primere og prober til flytegro, ble alle Alismatales sekvenser for gener *atp1*, *cob*, *ccmB*, *mttB*, *nad5*, *rbcL* og *matK* fra Petersen mfl. (2016) hentet fra NCBI GenBank (28.8.2020). I tillegg søkte vi i NCBI GenBank (8.10.2020) for å finne andre mulige gener for å bruke (*trnL*, *trnK*, *nad1*, *nad2*, *nad7*, *cox1*, *cox2* og *ITS1*). Hver genregion ble linjert ved hjelp av MAFFT online server (Kato mfl. 2019) og ble inspisert manuelt for artsspesifikke forskjeller innen Alismataceae. De fleste genregioner var ikke aktuelle for videre undersøkelser fordi de enten hadde for få forskjeller (*atp1*, *ccmB*, *cob*, *cox1*, *cox2*, *mttB*, *nad1*, *nad5*) eller de hadde for stor variasjon og kunne ikke linjeres pålitelig (*nad2*, *nad7*, *trnL*). Fire genregioner hadde tilstrekkelig store forskjeller og linjeringer var pålitelige (*ITS1*, *matK*, *rbcL* og *trnK*), og flytegrospesifikke primere og 5'-FAM TaqMan® MGB prober for disse genregioner (Tabell 1) ble utviklet i programmet Primer Express 3.0.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Standardparametere ble brukt, bortsett fra at maks ampliconlengde var satt til 150 baser.

Tabell 1. Primere og prober utviklet (5'-end til 3'end).

Gen	Navn	Forward sekvens	Navn	Reverse sekvens	Navn	Probe sekvens
matK	L.nat_NI NA_F1	TTGCAGTAGTTT GTTGTAATGGTT TTC	L.nat_NI NA_R1	CTTGAAGCGAG AATTGATTTTCC	L.nat_NI NA_P1	CCTGCAGTT GTTCAAA
matK	L.nat_NI NA_F2	GGAAAATCAATT CTCGCTTCAAG	L.nat_NI NA_R2	GTTGAGACCAA AAAGAAAAGTG ACATT	L.nat_NI NA_P2	TCTCTGATG AAGAAATGG
matK	L.nat_NI NA_F3	CCTGCAGTTGT TCAAAGATCCTT	L.nat_NI NA_R3	AACATTTCCATT TCTTCATCAGA GAA	L.nat_NI NA_P3	AATCAATTCT CGCTTCAAG
ITS1	L.nat_IT S_15F	TCATTGAATGCT TACGCTTTTCG	L.nat_IT S_15R	GCACACGGCAA AGGAGTGAT	L.nat_IT S_15P	TGTGTTTTGG CAATATT
ITS1	L.nat_IT S_1F	CCCGAAAGCTT CATTGTGTTGA	L.nat_IT S_1R	GCAGGTGGAGA GGCAGGTT	L.nat_IT S_1P	CCCGTTAAT GTGAAGTGT
rbcL	L.nat_rb cL_1F	TGTCTATGCCG GGTGTCTCG	L.nat_rb cL_1R	CGGTCAAGGCA GGCATATG	L.nat_rb cL_1P	TGTAGCTTC AGGTGGTAT T
trnK	L.nat_tr nK_1F	CTCGCTCCCAT CTTTAATTGAAG	L.nat_tr nK_1R	GGTCCTCCAAA AAAGGAAATATT G	L.nat_trn K_1P	TCTCAGAATT TACGATCTAT TC

2.3 Labanalyser

Spesifisiteten av primere og prober ble testet med blad-DNA fra flytegro, vassgro og tjernaks. Vi brukte to metoder, kvantitativ real-time PCR (qPCR) og droplet-digital PCR (ddPCR) for materialet. Begge analyser oppformerer en liten bit av DNA bestemt av den genetiske markøren man bruker ved hjelp av et varmesensitivt enzym og en maskin som justerer temperaturen opp og ned i mange repeterte sykler.

I qPCR-analysen regnes en prøve som positiv dersom man ser en klar økning av DNA-konsentrasjonen målt ved hjelp av fluorescens under PCR-analysen, og 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.

Vi kjørte qPCR reaksjoner på en CFX96 Touch Real-Time PCR system (Biorad) og CFX manager (Biorads qPCR software) ble bruk til å kontrollere standardkurve og estimere antall DNA kopier per reaksjon for de brukte arter. qPCR er den vanligste metodikken for å kvantifisere DNA og gir en relativ måling av DNA konsentrasjon.

En ddPCR-analyse gir i stedet en absolutt måling. I ddPCR-analysen 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. ddPCR er altså en «endpoint» 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. Man antar at antall DNA-kopier per dråpe vil danne en Poisson statistisk fordeling. 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).

I vår studie ble ddPCR-dråper automatisk generert ved hjelp av en QX200 AutoDG robot (Bio-Rad), og PCR-amplifisering ble utført i en Veriti™ 96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems). Dråpene ble så automatisk avlest for tilstedeværelse eller fravær av fluorescens ved hjelp av en QX200™ Droplet Reader (Bio-Rad). Positive og negative dråper ble separert fra hverandre ved hjelp av QuantaSoft software v.1.7.4 (Bio-Rad) og dette ble videre brukt til å beregne tilstedeværelse og kvantifisere DNA fra de ulike artene. Antall DNA-kopier per liter vann ble så utregnet via formelen: $\text{DNAkopier/L} = (\text{DNAkonsentrasjon / PCR-volumddPCR}) * \text{Templatvolum} / \text{Vannvolum}$. Hvor DNAkonsentrasjon blir beregnet av QuantaSoft, PCR-volumet er 20 μl , Templatvolumet er DNAmengden som inngår i PCR-reaksjonen (3 μl) og vannvolumet er mengden vann filtrert i felt (1.5-5 L).

3 Resultater

3.1 Bladtesten

3.1.1 qPCR

Vi kjørte alle syv utviklede markører med qPCR. Tabell 2 viser gjennomsnittlig C_T -verdi for alle markørene og for alle tre artene. En artsspesifikk markør skal ikke gi resultater for andre arter, men vi ser at alle utviklede markører gir også utslag på en eller to av de andre artene. Denne kryssamplifiseringen er sterkere med de markørene som hadde minste forskjell på festepunkter av primere og prober – for eksempel matK markører L.nat_NINA 1 og 2 hadde nesten den samme C_T -verdien for flytegro og vassgro, og derfor kan disse markører ikke brukes for å overvåke flytegro (markørene kan ikke skille mellom disse to artene). ITS1, rbcL og trnK markørene er mye mer lovende fordi de hadde større forskjell i C_T -verdier – C_T -verdier var ca. 20 sykler mindre for flytegro enn for vassgro og tjernaks i tilfelle av ITS1 og rbcL markører. Uansett, det var overraskende at ITS1-markørene gav utslag på vassgro og tjernaks til tross for minst ni forskjeller i basepar på festepunkter av primere og prober.

Vi har sett at denne typen av kryssamplifisering skjer når man kjører markører med vevsprøver men at det skjer i lavere omfatning i faktiske miljø-DNA prøver og med ddPCR enn med qPCR. Derfor valgte vi å kjøre bladtesten og alle miljø-DNA prøvene i ddPCR med de beste markørene, altså de som hadde den største forskjellen i den gjennomsnittlige C_T -verdien mellom flytegro og andre arter: L.nat_ITS_15 og L.nat_rbcL.

Tabell 2. Resultater fra qPCR-analyser av bladtesten. Den siste kolonnen viser antall forskjeller på festepunkter av primere og prober (F = forward primere, R = reverse primere, P = probe).

Markør	Art	PCR replikanter	C_T Mean	Forskjell i basepar til flytegro
L.nat_NINA_1	Flytegro	9	18.12	F = 0, R = 0, P = 0
L.nat_NINA_1	Vassgro	9	19.02	F = 1, R = 1, P = 0
L.nat_NINA_1	Tjernaks	9	36.65	F = 5, R = 4, P = 4
L.nat_NINA_2	Flytegro	9	18.08	F = 0, R = 0, P = 0
L.nat_NINA_2	Vassgro	9	19.39	F = 1, R = 0, P = 2
L.nat_NINA_2	Tjernaks	9	36.93	F = 4, R = 3, P = 4
L.nat_NINA_3	Flytegro	9	17.77	F = 0, R = 0, P = 0
L.nat_NINA_3	Vassgro	9	30.68	F = 0, R = 2, P = 1
L.nat_NINA_3	Tjernaks	9	36.99	F = 4, R = 5, P = 3
L.nat_ITS_15	Flytegro	6	14.65	F = 0, R = 0, P = 0
L.nat_ITS_15	Vassgro	6	36.51	F = 8, R = 5, P = 5
L.nat_ITS_15	Tjernaks	6	34.53	F = 18, R = 16, P = 9
L.nat_ITS_1	Flytegro	6	14.78	F = 0, R = 0, P = 0
L.nat_ITS_1	Vassgro	6	36.40	F = 2, R = 3, P = 4
L.nat_ITS_1	Tjernaks	6	34.01	F = 15, R = 9, P = 6
L.nat_rbcL_1	Flytegro	6	17.79	F = 0, R = 0, P = 0
L.nat_rbcL_1	Vassgro	6	NA	F = 1, R = 0, P = 2
L.nat_rbcL_1	Tjernaks	6	36.79	F = 4, R = 2, P = 4
L.nat_trnK_1	Flytegro	6	17.57	F = 0, R = 0, P = 0
L.nat_trnK_1	Vassgro	6	29.51	F = 2, R = 1, P = 0
L.nat_trnK_1	Tjernaks	6	37.57	Ikke tilgjengelig

3.1.2 ddPCR

Forskjellen mellom flytegro og de to andre artene var betydelig i ddPCR bladtesten. For begge markørene var alle ddPCR-dråpene positive med flytegroblad-DNA (16289 dråper for ITS1 og 17006 dråper for rbcL). DNA-ekstrakter fra vassgro- og tjernaksblad ga også positive dråper,

men signifikant mindre. L.nat_ITS_15 gav 13 positive dråper for vassgro og 60 positive dråper for tjernaks. Vassgroblad gav ikke utslag med L.nat_rbcL og tjernaksblad gav 23 positive dråper. Det at alle flytegrodråpene var positive og at mengden positive dråper var marginal for de to andre artene, gir oss grunn til å bruke disse to markørene for å teste vårt primære spørsmål: kan vi bruke miljø-DNA til kartleggingen av flytegro. Hvis markørene viser sterke utslag på vannprøvene er det høyt sannsynlig at vi har detektert flytegro-DNA i prøvene.

3.2 Miljø-DNA med ddPCR

De to utvalgte markørene gir veldig like resultater (Tabell 3, Pearson korrelasjon for positive dråper 0.92, $p < 0.001$). Gitt den lave kryssamplifiseringen, tok vi to forholdsregler: (1) alle miljø-DNA prøvene som hadde færre dråper enn tjernaksblad (60 dråper for L.nat_ITS_15 og 23 dråper for L.nat_rbcL) fikk null flytegro DNA kopier/L (se tabell 3), og (2) vi kjørte også åtte miljø-DNA prøver fra Haukvannet, Kyvatnet og Baklidammen i Trondheim som en kontroll. Flytegro vokser ikke i disse innsjøene, i stedet vokser det tjernaks i alle og vassgro i Haukvannet og Baklidammen.

Tabell 3. Miljø-DNA resultatene for ddPCR med L.nat_ITS_15 og L.nat_rbcL. DNA kopier/L er satt til null i de prøvene som hadde mindre enn 60 dråper (L.nat_ITS_15) eller 23 dråper (L.nat_rbcL). Det var flytegro fysisk tilstede (basert på visuell observasjon) på lokalitetene som er farget grønt.

Prøve	Positive droplets ITS	Positive droplets rbcL	ITS DNA kopier/L	rbcL DNA kopier/L
Maridal 100m	63	7	0.141	0
Maridal 100m	41	22	0	0
Maridal 50m	2	1	0	0
Maridal 50m	4	1	0	0
Maridal 0m	140	39	0.312	0.078
Maridal 0m	40	22	0	0
Maridal utløp	57	14	0	0
Maridal utløp	54	5	0	0
Fjeld Gård dam	10173	1124	139.2	8.26
Fjeld Gård dam	7466	465	72.2	3.51
Dausjøen utløp	1	0	0	0
Dausjøen utløp	3	0	0	0
Dausjøen vannkant	4394	623	10.68	1.236
Dausjøen vannkant	2917	587	6.99	1.206
Dausjøen 100m	57	7	0	0
Dausjøen 100m	53	8	0	0
Breisjøen demning	898	193	3.565	0.705
Breisjøen demning	945	321	3.33	1.01
Haukvannet	0	0	0	0
Haukvannet	0	0	0	0
Kyvatnet	0	0	0	0
Kyvatnet	0	0	0	0
Kyvatnet	0	1	0	0
Kyvatnet	0	0	0	0
Baklidammen	0	0	0	0
Baklidammen	0	1	0	0

Fra ddPCR resultatene ser vi at flytegro-DNA finns definitivt i prøvene fra Fjeld Gård dam, Dausjøen vannkant og Breisjøen demning. I tillegg er det sannsynlig at flytegro-DNA finns i en av

prøvene fra Maridal 0m og Maridal 100m. Det var flytegro fysisk tilstede med visuell observasjon på Fjeld Gård dam, Dausjøen vannkant, Breisjøen demning og Maridal 0m. Altså på de samme punkter som vår analyse påviser tilstedeværelse av flytegro.

Fossøy mfl (2017) har satt en grense på minst fire positive dråper i analysen for å unngå såkalte «false positives», altså falske positive signaler. Derfor og i lyset av resultatene fra våre kontroll-dammer Haukvannet, Kyvatnet og Baklidammen der vi fikk bare to ganger 1 positiv dråpe, er det også nokså sannsynlig at flytegro-DNA finns i de andre prøvene der antall positive dråper er høyere enn fire. Det betyr at bare prøvene fra Maridal 50m og Dausjøen utløp mangler bevis på nærvær av flytegro miljø-DNA. Men 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.

4 Konklusjon

Vi konkluderer med at det er mulig å bruke miljø-DNA for å overvåke flytegro til tross for at vi ikke klarte å utvikle nøyaktig artsspesifikke markører for flytegro. Ved bruk av ddPCR var kryss-amplifisering lav nok at vi kunne se høye konsentrasjoner av flytegro-DNA i en del av miljø-DNA prøver. Men lave konsentrasjoner er ikke målbare med gjeldende markører, og derfor foreslår vi videre utvikling av markører.

Blant de tilgjengelige sekvensene viser ITS1 den største sannsynligheten for en artsspesifikk markør fordi linjering er pålitelig og fordi variabiliteten blant nært beslektede arter i vassgrofamilien er stort nok. Men fordi vi ikke klarte å utvikle artsspesifikk ITS1-markør for flytegro, må man også søke andre genområder. I flere plantestudier (se Anglès d'Auriac mfl. 2019) har man brukt en DNA-sekvens mellom genene trnL og trnF (såkalt trnL-trnF intergenic spacer). Dessverre mangler GenBank sekvenser av trnL-trnF intergenic spacer fra flere nært beslektede arter av flytegro som trenges for å utvikle en flytegro-spesifikk markør. Derfor må man først få tak i alle arter av vassgrofamilien som lever i Norge og sekvensere trnL-trnF intergenic spacer av dem. Deretter bør man utvikle markører for det genområdet og kjøre de samme testene vi har kjørt her.

5 Litteratur

- Anglès d'Auriac, MB, Strand, DA, Mjelde, M, Demars, BOL, Thaulow, J. 2019. Detection of an invasive aquatic plant in natural water bodies using environmental DNA. *PLoS ONE* 14: e0219700.
- Balasingham, KD, Walter, RP, Mandrak, NE & Heath, DD. 2017. Environmental DNA detection of rare and invasive fish species in two Great Lakes tributaries. *Molecular Ecology* 27: 112-127.
- 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: 5601-5608.
- Fossøy, F, Dahle, S, Eriksen, LB, Spets, MH, Karlsson, S & Hesthagen, T. 2017. Bruk av miljø-DNA for overvåking av fremmede fiskearter - utvikling av artsspesifikke markører for gjedde, mort og ørekyt. Norsk institutt for naturforskning. NINA Rapport 1299.
- Fossøy, F, Thaulow, J, Anglès d'Auriac, M, Brandsegg, H, Sivertsgård, R, Mo, TA, Sandlund, OT & T., H. 2018. Bruk av miljø-DNA som supplerende verktøy for overvåkning og kartlegging av fremmed ferskvannsfisk. Norsk institutt for naturforskning. NINA Rapport 1586.
- Fossøy, F, Brandsegg, H, Sivertsgård, R, Pettersen, O, Sandercock, BK, Solem, Ø, Hindar, K & Mo, TA. 2020. Monitoring presence and abundance of two gyrodactylid ectoparasites and their salmonid hosts using environmental DNA. *Environmental DNA* 2: 53–62.
- Henriksen, S, Hilmo, O. (red.) 2015. Norsk rødliste for arter 2015. Artsdatabanken, Norge.
- Katoh, K, Rozewicki, J, Yamada, KD. 2019. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics* 20:1160-1166.
- Magerøy, J, Bækkelie, K, Mo, T, Brandsegg, H, Sivertsgård, R & Fossøy, F. 2020. Elvemusling i Aurskog-Høland og Nes kommuner. Lokalitetsfastsetting med miljø-DNA og oppfølgende vadesøk i Mangbekken, Haretonelva og Rabillfløyta. Norsk institutt for naturforskning. NINA Rapport 1707.
- Petersen, G, Seberg, O, Cuenca, A, Stevenson, DW, Thadeo, M, Davis, JI, Graham, S, Ross, TG. 2016. Phylogeny of the Alismatales (Monocotyledons) and the relationship of *Acorus* (Acorales?). *Cladistics* 32: 141–159.
- Taugbøl, A, Dervo, BK, Bærum, KM, Brandsegg, H, Sivertsgård, R, Ytrehus, B, Miller, A & Fossøy, F. 2017. Første påvisning av den patogene soppen *Batrachochytrium dendrobatidis* (Bd) i Norge - Bruk av miljø-DNA for påvisning av fremmede arter. Norsk institutt for naturforskning NINA Rapport 1399: 25.
- Taugbøl, A, Dervo, BK, Sivertsgård, R, Brandsegg, H & Fossøy, F. 2018. Bruk av miljø-DNA til 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: 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: 2565-2573.
- Thomsen, PF & Willerslev, E. 2015. Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation* 183: 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: 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* 1: 64–73.

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