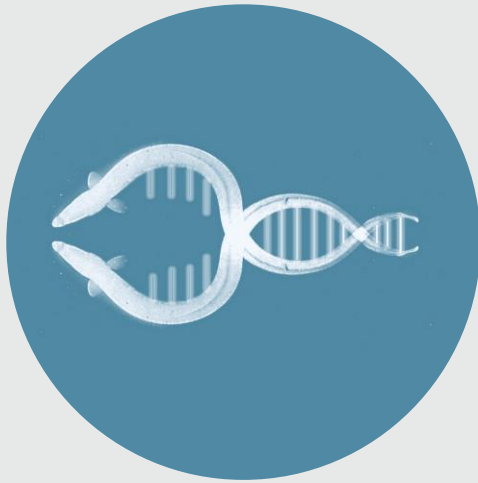


Kartlegging av vandringshindre og kvantifisering av europeisk ål (*Anguilla anguilla*) ved bruk av miljø-DNA



SILJE HALVORSEN

VEILEDER

Audun Slettan

Universitetet i Agder, 2019

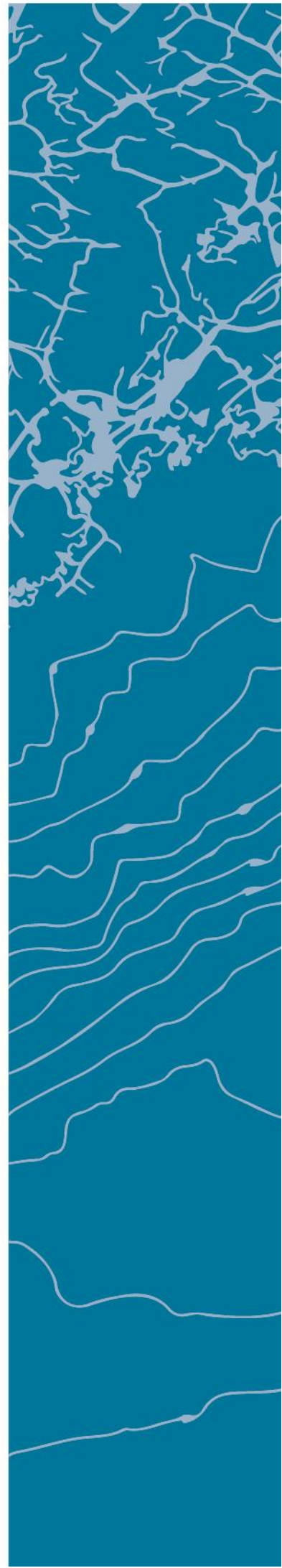
Fakultet for teknologi og realfag

Institutt for naturvitenskapelige fag

Universitetet i Sørøst-Norge, 2019

Fakultet for teknologi, naturvitenskap
og maritime fag

Institutt for natur, helse og miljø



© Silje Halvorsen 2019

Masteroppgave i akvatisk økologi, retning marin økologi, 2019.

Innlevert som oppgave i emnet BIO500 Masteroppgave.

Akvatisk økologi er et felles masterprogram mellom Universitetet i Agder (UiA) og Universitetet i Sørøst-Norge (USN), med spesialisering innenfor marin økologi (ved UiA).

Alle rettigheter reservert. Ingen deler av denne oppgaven kan kopieres uten tillatelse fra forfatteren. Masteroppgaven er gjennomført og godkjent som et ledd i utdanningen ved UiA og USN, og er godkjent som en del av utdanningen. Denne godkjenningen innebærer ikke at universitet inntår for de metoder som er anvendt og de konklusjoner som er trukket.

Universitetet i Agder
Fakultet for teknologi og realfag
Institutt for naturvitenskaplige fag
Gimlemoen
4604 Kristiansand

<http://www.uia.no>

© 2019 Silje Halvorsen

Denne avhandlingen representerer 60 studiepoeng

Sammendrag

Europeisk ål (*Anguilla anguilla*) er en truet art nasjonalt og internasjonalt, og EU-kommisjonen har bestemt at tiltak må gjøres. En av utfordringene arten står overfor i Norge er vandringshindre, spesielt kulverter, som fører bekker og elver under veier. I tillegg er kunnskap om biomasse essensielt i bevaringsarbeid. I dette studiet ble det undersøkt om det var mulig å bruke miljø-DNA (eDNA) som verktøy for kartlegging av vandringshindre for ål. Det ble også undersøkt om individuelle forskjeller i eDNA kunne brukes for å skille mellom individer, og dermed brukes til å estimere biomasse. eDNA er DNA organismer har avgitt til miljøet i form av for eksempel celler og vev.

I første del av studiet ble 26 potensielle vandringshindre i Aust- og Vest-Agder undersøkt ved å ta en vannprøve oppstrøms og nedstrøms for hver konstruksjon, før eDNA fra vannprøvene ble isolert og analysert via Real-Time PCR (qPCR) med spesifikke primere og prober for *A.anguilla*. Resultatet viste at ål kunne påvises oppstrøms og nedstrøms ved 22 av lokalitetene. Dette tyder på at majoriteten av konstruksjonene ikke utgjør vandringshindre, men man kan likevel ikke avslå muligheten for at ål har kommet seg oppstrøms for hindrene via alternative ruter. Vet ett av de potensielle hindrene kunne ål påvises nedstrøms og ikke oppstrøms, men ettersom kulverten ikke virket som noen hindring, var det trolig lite ål i denne delen av bekken. Ved de tre siste potensielle hindrene kunne ikke ål påvises oppstrøms eller nedstrøms, noe som trolig skyldes andre faktorer enn det undersøkte vandringshinderet.

I den andre delen av studiet ble det undersøkt om det var mulig å skille individer av europeisk ål via eDNA fra en vannprøve. Studiet ble utført med to kontroll eksperimenter, det ene med en blanding av genomisk DNA, det andre med eDNA hentet fra et lukket system, begge med kjent antall ål og haplotyper. Ti ål ble fisket, og vevsprøve ble tatt av hvert individ. Individene ble deretter plassert i et kar med vann i en time, før vannprøve ble tatt av karet. Til slutt ble vannprøve tatt av bekken, hvor ålen kom fra. DNA ble isolert, og et område i D-loop regionen i mitokondrie-DNA ble amplifisert og sekvensert fra hver av de ti individene, fra en samleprøve med genomisk DNA fra hvert individ, fra vannprøven fra karet med vann, og fra vannprøven fra bekken. Resultatet viste at hver av de ti individene hadde forskjellig haplotype, som alle ble funnet igjen i samleprøven og i karprøven. I prøven fra bekken, som var hovedmålet, ble det med stor grad av sikkerhet funnet tre ulike haplotyper av ål ($n > 1000$). Dersom man tar utgangspunkt i tidligere publikasjoner om haplotypediversitet for europeisk ål, som er funnet til å være $h = 0,99$, kan man si at det ble funnet tre individer av ål i vannprøven fra bekken.

Abstract

European eel (*Anguilla anguilla*) is an endangered species nationally and internationally, and the EU-Commission has decided that conservation effort is needed. One of the challenges in Norway is obstacles in migration routes, especially where rivers are put in pipes underneath roads. In addition, knowledge regarding biomass is essential in conservation work. In this study, environmental DNA (eDNA) has been investigated as a tool for mapping migration obstacles for eel. The possibility of using individual differences in eDNA to separate individuals, as an estimation of biomass, was also investigated. eDNA is DNA that organisms shed to the environment in e.g. cells or tissue.

In the first part of the study, 26 potential migration route obstacles in Aust- and Vest-Agder were investigated by taking a water sample upstream and downstream from each construction, before eDNA from the sample was isolated and analysed by Real-Time PCR (qPCR) with specific primers and probes matching *A. Anguilla*. The results revealed that eels were detectable upstream and downstream in 22 of the locations. These results suggest that the majority of constructions were not obstacles for the migration, but it is also possible that the eels used alternative routes to pass the obstacles. In one of the locations, eels were detected downstream, but not upstream. The pipeline did not seem like an obstacle, so there was probably low abundance of eels in the area. In the last three potential obstacles, it was not possible to detect eels upstream or downstream, which is probably due to other factors.

In the second part of the study, the possibility of separating individuals of European eel with eDNA from water samples was investigated. The study was conducted with two control experiments, one with a mix of genomic DNA, the second with eDNA collected from a closed system, both with known numbers and haplotypes of eels. Ten eels were fished, and tissue samples were taken from each individual. The individuals were then placed in a tank filled with water for one hour. Water sample was then taken from the tank and the river. DNA was isolated, and a target sequence in the D-loop region in mitochondria-DNA was amplified and sequenced from each of the ten individuals, for a mixed sample of the ten individuals, and from a water sample from the tank and the river. The results suggested that each of the ten individuals had different haplotypes, which all was found in the mixed sample, and in the sample from the water tank. In the sample from the river, the main goal, there was with high degree of certainty found three different haplotypes of European eel ($n > 1000$). Considering earlier publications about haplotype diversity from European eel, which is found to be $h = 0,99$, it is possible to suggest that there were three individuals of eel in found in the water sample from the river.

INNHOLDSFORTEGNELSE

1 Introduksjon.....	9
1.1 Bakgrunn.....	9
1.2 Europeisk ål	9
Ålens livssyklus	10
Haplotypediversitet hos europeisk ål.....	11
Nedgang i ålebestanden.....	12
Forekomst og nedgang av ål i Norge	16
Tiltak for å få opp ålebestanden.....	17
Dagens status	18
1.3 Miljø-DNA.....	19
Artspåvisning ved bruk av eDNA.....	20
Kvantifisering av populasjoner ved bruk av eDNA	21
1. 4 PCR.....	23
Tradisjonell PCR.....	23
Quantitative real-time PCR.....	23
Primerdesign.....	25
1.5 Sekvensering av PCR-produkt.....	25
Sangersekvensering	25
Nanoporesekvensering.....	26
1. 5 Mål og problemstilling.....	27
2. Metode	28
2. 1 Kartlegging av potensielle vandringshindre for ål	28
Vannprøvetaking – potensielle vandringshindre.....	30
2. 2 Bestemmelse av antall individer via miljø-DNA.....	31
Innhenting av genomisk DNA fra individer av ål og eDNA fra vannprøver	31
2.3 Isolering av DNA	32
Isolering av eDNA fra vannprøver.....	32
Isolering av genomisk DNA fra individer av ål.....	32
2. 4 Analyse av DNA via spektrofotometer.....	33
2. 5 Artsspesifikk PCR for undersøkelse av potensielle vandringshindre.....	33
2. 6 Amplifisering av miljø-DNA for studie av individforskjeller	35
Oversikt over DNA-prøvene.....	35
Primerdesign.....	36
PCR-kjøring og gelelektroforese	38
Rensing av PCR-produkt.....	39
2.7 Sekvensering av PCR-produkt for studie av individforskjeller	39

Nanoporesekvensering av PCR-produkt	39
2. 8 Behandling av sekvensdata	42
Individsekvenser A-J fra Sangersekvenseringen.....	42
Sortering av sekvenser fra samleprøven, karprøven og bekkeprøven	42
3 Resultater	43
3. 1 Analyse av prøver oppstrøms og nedstrøms for potensielle vandringshindre	43
qPCR og spektrofotometer	43
3.2 Data for undersøkelse av individforskjeller	46
Analyse fra spektrofotometer	46
Gelelektroforese.....	47
Haplotyper for individ A-J.....	48
Treff med haplotypene A-J i samleprøven og karprøven.....	49
Treff med haplotyper i bekkeprøven	50
Primertreff mot andre fiskearter	51
4 Diskusjon	52
4.1 Potensielle vandringshindre	52
Positivt utslag oppstrøms og nedstrøms for antatte hindre.....	52
Positivt utslag nedstrøms, men ikke oppstrøms. Vandringshinder?	53
Verken positivt utslag oppstrøms eller nedstrøms.....	53
Prøvenes renhet og konsentrasjon	54
Anbefalinger for fremtidige studier av vandringshindre	55
4.2 Skille mellom individer via miljø-DNA	56
Referansesekvensene – ti haplotyper	56
Kontrollforsøk; påvisning av referansesekvensene i kar- og samleprøve.....	56
Haplotyper i bekkeprøven	56
Betydningen av PCR- og sekvenseringsfeil.....	58
Prøvenes renhet, konsentrasjon og utslag på agarosegel.....	59
Ingen optimale primertreff på andre fiskearter	60
Studiets betydning, og videre anbefalinger	60
5 Konklusjon	62
Kilder	63
Vedlegg.....	70
Beskrivelse av lokalitetene.....	70
Resultat av Sangersekvensering for individ A-J.....	97

Forord

Mitt mastergradsstudium i akvatisk økologi, marin retning, avsluttes med denne oppgaven; et prosjekt som har vært engasjerende og spennende fra start til slutt. Jeg har fått muligheten til å utforske mange områder i Agder gjennom en strålende sommermåned, og jeg har fått prøve meg på den nyeste molekylærbiologiske teknologien. Ikke minst har jeg fått trent på skriveferdighetene. Det jeg sitter igjen med er en stor glede til å fortsette med biologi i fremtiden.

En stor takk rettes først og fremst til Audun Slettan for svært god veiledning gjennom hele prosjektet. Jeg har fått mye større forståelse av metoder innenfor molekylærbiologi takket være din kunnskap og formidling. Det har vært utrolig spennende å få prøve seg på teknikker som er helt fremme i tiden - en mulighet jeg er veldig takknemlig for. I tillegg har det vært verdifullt for meg at alle spørsmål har vært velkomne, og at du alltid har vært tilgjengelig. Jeg har også satt stor pris på alle råd og forslag jeg har fått de gangene jeg har stått fast under laboratoriearbeidet. Utover det, og ut over hva en kan forvente av sin veileder, har det vært mange hyggelige samtaler, du har sørget for engasjement til prosjektet utenfra, og ikke minst hatt troen på meg. Alt dette har bidratt til at denne masteroppgaven virkelig har vært gøy å gjennomføre.

Tusen takk også til Morten Mattingsdal for behandling av sekvenseringsdata. Dette arbeidet har vært avgjørende for resultatene i studiet, og har vært til stor hjelp for meg.

Takk også til Kurt Johansen, som har brukt av sin fritid for å hjelpe meg med fiske og behandling av ål. Dette hadde jeg ikke fått til på egenhånd!

Leif Kristian Sortedal og Øystein Jørgensen fortjener også en takk for å ha blitt med på feltarbeid.

Kristiansand 14.05.19

Silje Halvorsen

1 INTRODUKSJON

1.1 BAKGRUNN

Vann er ansett som den mest essensielle naturlige ressursen på jorden, og er i tillegg viktig både økonomisk, kulturelt, estetisk og forskningsmessig. Likevel trues ferskvannssystemer av menneskelige aktiviteter, noe som i mange tilfeller skaper alvorlige konsekvenser for det biologiske mangfoldet. Ferskvann utgjør habitatet til omlag 6% av alle verdens beskrevne arter, som i dag opplever nedgang i biodiversitet i langt større grad enn i noe annet terrestrisk område (Dudgeon et al., 2006). Av alle ferskvannsfisk oppført av Verdens naturvernorganisasjon, International Union for Conservation of Nature (IUCN), er 31% klassifisert som kritisk truet, sterkt truet eller sårbare (Arthington, Dulvy, Gladstone, & Winfield, 2016). Få fiskebestander har vært påvirket av menneskelige aktiviteter i så stor grad som europeisk ål (*Anguilla anguilla*), som i dag vurderes med høy risiko for utryddelse (Dekker & Beaulaton, 2016; D. Jacoby & Gollock, 2014).

1.2 EUROPEISK ÅL

Åleslekten *Anguilla* oppstod for mer enn 50 millioner år siden under perioden Eocen (Tsukamoto & Aoyama, 1998). Europeisk ål ble en egen art for rundt 3 millioner år siden, sammen med 15 andre arter i *Anguilla*-slekten. Åleslekten har dermed overlevd enorme endringer på jorden, som istiden for rundt 22.000 år siden og kontinentaldrift, som trolig har økt avstanden mellom dens oppveksthabitat og gyteområde (Knights, 2003).

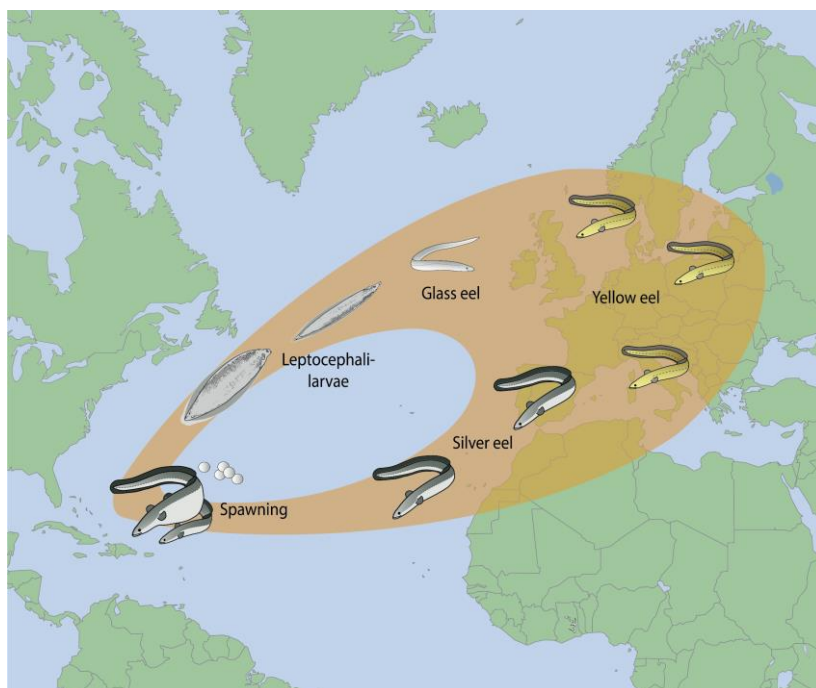


Figur 1: Land med forekomst av europeisk ål (*A. anguilla*) markert med rosa. Figurkilde: Kart basert på "Die Süßwasserfische Europas" (Gerstmeier, Römig) av Anonym (2008) for Wikipedia (CC-BY-SA)

Europeisk ål er en fakultativ katadrom fisk, noe som betyr at den i hovedsak gyter i sjøen og har næringsvandring til ferskvann, med unntak av noen individer som forblir i sjøen hele livet (Thorstad et al., 2010). Fiskearten finnes i Europa og Nord-Afrika, fra Norge til Marokko gjennom Middelhavet og Østersjøen (figur 1) (Bornarel et al., 2018). I ferskvann finnes ål der det er næringsgrunnlag og hvor hindringer ikke stanser vandringsen (Thorstad et al., 2010).

Ålens livssyklus

Ålens yngelsted er i Sargassohavet, 5000 km fra kysten i Europa og Nord-Afrika (Righton et al., 2016). De fleste gyteklare ål starter utvandringen mellom august og desember, og migrerer mellom 3 og 7 km per dag (figur 2) (Righton et al., 2016). Gytingen starter trolig i desember, og når et toppunkt i februar (Righton et al., 2016). Sargassohavet er et produktivt område, hvor mange arter foretar vertikale næringsvandring ned til 20-30 meters dyp om natten. Europeiske ålelarver har enda større vertikale migrasjoner – dybden varierer fra 160 meter på dagen til 100 meter om natten, noe som korresponderer med små hydrozoa, som trolig er deres bytte (Munk et al., 2018). Undersøkelser av mageinnholdet til ålelarver (leptocephaluslarver) bekrefter at dietten domineres av småmaneter, i tillegg til krepsdyr og dødt organisk materiale (Ayala et al., 2018; Riemann et al., 2010). Foreldrene dør etter gyting, mens larvene migrerer til Europa og



Figur 2: Ålens livssyklus og vandringsmønster. Grafisk design: Kari Sivertsen © NINA. Figur gjengitt med tillatelse fra Norsk Institutt for Naturforskning (NINA).

Nord-Afrika, en vandring som tar mellom 1-3 år (Miljødirektoratet, 2011). Ålelarvene har form som et flatt, avlangt pileblad, og er gjennomsiktige med utviklet skjelett (Thorstad et al., 2010). Kjønn bestemmes ikke av gamet-sammensetning, men det virker som at temperatur og tetthet i tidlig vekstfase kan spille en rolle (Vøllestad, 1992). Larvene bruker trolig jordens magnetiske felt til å

orientere seg, og migrerer ved hjelp av havsirkulasjoner (Naisbett-Jones, Putman, Stephenson, Ladak, & Young, 2017), før de går igjennom en metamorfose til glassål og vandrer opp i ferskvann på ulike tider av året i forskjellige europeiske vann. Glassålen ligner den voksne fiskeformen, men er fortsatt gjennomsiktig (Thorstad et al., 2010). I Norge starter oppvandringen fra juni, men noen ål forblir også i saltvann (Miljødirektoratet, 2011). Når ål ankommer vassdragene pigmenterer den etter en stund til gulål (figur 3), en prosess som kan ta fra 3 år i Sør-Europa til over 20 år i Nord-Europa (Vøllestad, 1992). Ål kan bruke flere år på å vandre opp til de øvre delene av vassdragene (Thorstad et al., 2010). Fullvoksen ål i ferskvann vil ofte gjemme seg, eller grave seg ned i bunnsubstratet på dagtid (Baras, Jeandrain, Serouge, & Philippart, 1998). Nattaktiviteten er omtrent dobbelt så høy som dagaktiviteten, noe som kan være fordelaktig for å unngå predatorer samt finne byttedyr (Verhelst et al., 2018). Aktiviteten er også større på sensommeren og tidlig høst. Mye tyder på at små ål foretrekker grunne og sakteflytende elvestrekninger med mye vegetasjon, mens større ål trives på dypere elvestrekninger med høyere vannføring og mindre skjul (Domingos, Costa, & Costa, 2006; Laffaille et al., 2003). Dietten til fullvoksne ål består av blant annet muslinger, insekter, krepsdyr og fisk (Verhelst et al., 2018). Gulålen går igjennom en siste metamorfose til blankål når de migrerer tilbake til Sargassohavet om høsten. Ålen slutter å spise, og gonadene utvikles mot kjønnsmodent stadiet (Thorstad et al., 2010). Ingen kjønnsmoden ål har noen sinne blitt fanget (Miljødirektoratet, 2011).



Figur 3: Europeisk ål, gulålstadiet.
Foto: Silje Halvorsen

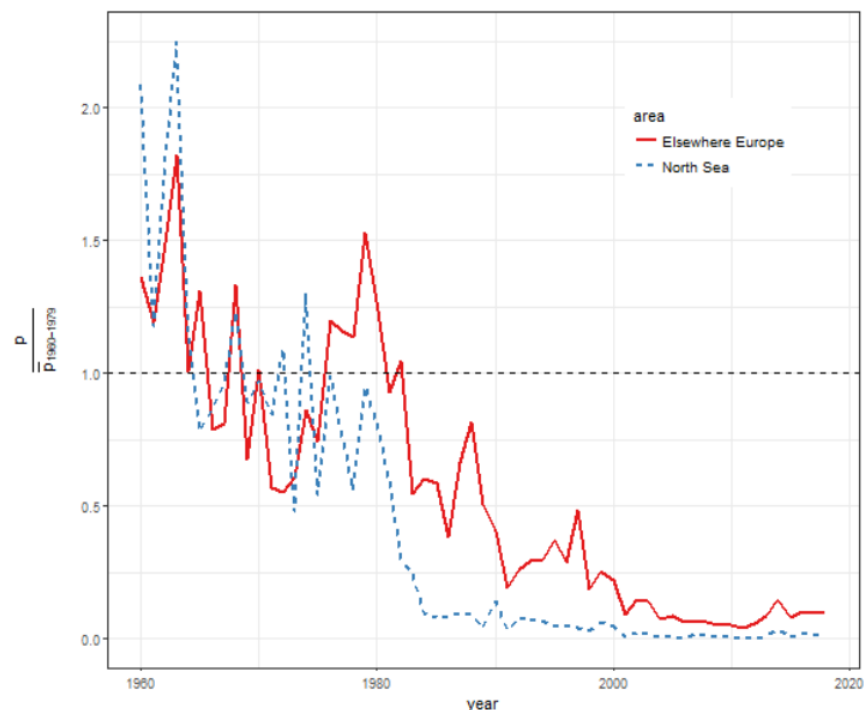
Haplotypediversitet hos europeisk ål

All europeisk ål tilhører en felles populasjon, og det har vært diskusjon om arten virkelig er panmiktisk (har tilfeldig parring). Flere studier støtter hypotesen om en panmiktisk populasjon, men det ser også ut til at det er begrensninger i foreldrenes bidrag til hvert parringsevent (Kettle, Vollestad, & Wibig, 2011). De fleste hannål kommer trolig fra Sørvest-Europa. Hannålen har mindre størrelse og fettlager, og tåler ikke like lange distanser som de større hunnålene, som

kan migrere over lengre avstander. Undersøkelser av D-loop regionen i mitokondriet hos arten viser relativt stor genetisk diversitet, med et stort antall haplotyper (Ragauskas et al., 2014). I en undersøkelse av 229 dobbeltrådede sekvenser fra *A. anguilla* (hentet fra 148 individer fisket for studiet, samt 81 sekvenser hentet i NCBI's genbank) ble det påvist 107 ulike haplotyper (Ragauskas et al., 2014). Haplotypediversiteten i denne studien var høy; $h = 0.99716$. Haplotypediversitet beskriver sannsynligheten for å observere to ulike haplotyper dersom man tilfeldig trekker to individer fra en populasjon (Gollner et al., 2016). Parameteren varierer fra 0 (en haplotype er fullstendig dominant) til 1 (hvert individ har ulik haplotype).

Nedgang i ålebestanden

Europeisk ål har som nevnt overlevd store endringer som istid og kontinentaldrift, noe som illustrerer hvor robust den er i et evolusjonært perspektiv (Knights, 2003). På tross av dette observeres en alvorlig nedgang på få tiår (figur 4). I løpet av de siste 30 årene har det vært en nedgang i rekruttering av glassål på om lag 90%, noe



Figur 4: Geometrisk gjennomsnitt av glassålrekruttering for Nordsjøen og for resten av Europa fra 1960 til 2018. Grafen tar utgangspunkt i 46 tidsserier med rapportert glassål eller gulål. Figur: (ICES, 2018)

som har plassert arten i kategorien "kritisk truet" på IUCNs rødliste, og gjorde at arten ble vurdert med ekstrem høy risiko for utrydning (D. Jacoby & Gollock, 2014). ICES mener den negative utviklingen vedvarer, og at reproduksjonen er svekket og gytebestand redusert. Arten anses derfor fortsatt som kritisk truet på verdensbasis. I 2015 ble europeisk ål oppgradert til kategorien "sårbar" i norsk rødliste, etter å ha vært ansett som "kritisk truet" siden 2006. Dette skyldes en liten økning av individer i to tidsserier i Norge, samt forbedring av ferskvannsmiljø (se avsnitt "Nedgang for ål i Norge").

Rekruttering av glassål er en troverdig måte å estimere trender i ålepopulasjonen, da glassål ikke påvirkes spesielt av lokale faktorer (Drouineau et al., 2018). Nedgangen skyldes trolig en kombinasjon av ulike årsaker som overfiske og akvakultur (Dekker, 2003b), endringer i havstrømmer (Castonguay, Hodson, Moriarty, Drinkwater, & Jessop, 1994), parasitter (Feunteun, 2002), forgiftning (Belpaire et al., 2009), samt habitatødeleggelse og utbygging av dammer og barrierer (Kettle et al., 2011). I tillegg kan global oppvarming påvirke flere av de nevnte faktorene, og skape et samlet trykk som kan utgjøre en større trussel (Drouineau et al., 2018).

Fiske, akvakultur og ulovlig handel

Ål har blitt ansett som matfisk helt siden år 1086, og er hentet ut i omtrent alle land i Europa og de afrikanske og asiatiske områdene ved Middelhavet (Dekker & Beaulaton, 2016). Tilgjengelig informasjon tyder på at handel foregikk lokalt frem til slutten av 1800-tallet, mens markedet hadde en oppgang på 1920-tallet med internasjonale dimensjoner (Dekker, 2019). Den lengste og best dokumenterte handelsruta var eksport fra Nederland til London, med årlige totalvolum på mellom 40 og 100 tonn i perioden 1666-1938 (Dekker, 2019). Etter oppgangen på 1920-tallet økte volumene til flere tusen tonn i den internasjonale handelen (Dekker, 2019). Arten har blitt brukt i akvakultur siden 1960-årene, men ikke uten bruk av glassål (Dekker, 2016; Thorstad et al., 2010). Unge stadier samles inn, dyrkes, selges og konsumeres, hvor Japan er antatt å konsumere 70% av produksjonen (Shiraishi & Crook, 2015). På 1970-tallet oppstod mangel på japansk glassål, noe som førte til import av europeisk og amerikansk glassål (Haro et al., 2000). Den etter hvert økende mangelen skapte prisstigning, noe som gjorde ål til den fiskearten med størst verdi i Frankrike rundt år 2000 (Castelnaud, 2001).

Da arten ble rødlistet, ble all eksport fra Europa ulovlig i 2009, og fangsten har hatt nedgang i hele verden (Dekker, 2003a). Likevel skjer ulovlig fiske og handel av europeisk glassål i Europa for å supplere akvakulturen i Asia, med Kina og Japan som verdens største åleimportør og eksportør (Shiraishi & Crook, 2015). Den ulovlige handelen, kjent som "eel trafficking", er omtalt som Europas største kriminelle handling mot ville dyr (Stein, 2018). Europol har estimert at omlag 100 tonn glassål, eller 350 millioner individer, smugles årlig fra Europa til Asia, med en verdi på 2,27 billioner euro (Europol, 2018; Stein, 2018).

Endringer i havet

Havatmosfæriske endringer i Sargassohavet kan påvirke gyteområdet, og dermed overlevelse av larvene i perioden de transporteres mot Golfstrømmen (Friedland, Miller, & Knights, 2007). Den nordatlantiske oscillasjonen (NAO), et klimafenomen som skyldes forskjellene i lufttrykk mellom Asorene og Island, er et eksempel på en prosess som påvirker ålens overlevelse. NAO-indeksen beskriver tilstanden, hvor høy NAO gir lavtrykk over Island i forhold til Asorene samt mildvær i Skandinavia, mens lav NAO gir høytrykk over Island i forhold til Asorene og kulde i Skandinavia. År med høy NAO-indeks har korrelert med lav ålerekruttering til Skagerrakkysten, noe som forklares med at larvene blir sendt med havstrømmene mot Nord Atlanteren og den subpolare havvirvelen, før de er klare for metamorfosen (C. M. F. Durif, Gjosaeter, & Vollestad, 2011).

Global oppvarming bidrar til disse fysiske endringene, og påvirker også temperatur og planktonsamfunn (Drouineau et al., 2018). Overflatetemperaturen i Sargassohavet har vist seg å korrelere med fangstene i dataserien fra den norske Skagerakkysten (C. M. F. Durif et al., 2011). Forklaringen er at temperaturøkningen fører til lavere tetthet av diatomer og høyere tetthet av cyanobakterier, noe som resulterer i lavere produksjon av karbohydrater. Mindre karbohydrater betyr mindre dødt organisk materiale (marin snø), som er hovednæringskilden for ålelarver (Riemann et al., 2010).

Parasitter

En annen trussel for europeisk ål er ferskvannsparasitten svømmeblæremark (*Anguillicoloides crassus*), som ble innført i Europa rundt 1980, og påvist i Norge i 1993 (Thorstad et al., 2010). Parasitten skaper inflammasjon i svømmeblæren, noe som fører til bakterieinfeksjoner, stress og minsket appetitt (Kirk, 2003). Infeksjonen øker gasskomposisjonen i svømmeblæren slik at ålen ikke klarer å regulere trykket, noe som kan føre til sykdom og død (Kirk, 2003).

Forgiftning

Ål er sårbare for forgiftning på grunn av deres høye trofiske nivå og lipidlager (Belpaire et al., 2009). Stoffer som PBC (polyklorerte bifenyl), tungmetaller og pestisider (Bilau et al., 2007; Byer et al., 2013; Maes et al., 2005) er funnet i ål – ofte i høyere konsentrasjon enn hva som anses som menneskelige inntaksstandarder. Det har eksistert tilfeller hvor ål har dødd direkte

av forgiftning, men oftere oppstår vevsskader, stress, påvirkning på osmoregulering, endret adferd, hormonforstyrrelser og skade på den genetiske informasjonen (Couillard, Hodson, & Castonguay, 1997; Geeraerts & Belpaire, 2010).

Vandringshindre

Europeisk ål foretar to store vandringer i løpet av livet; den første fra gyteområdet til oppveksthabitatet, den andre fra oppveksthabitatet til gyteområdet. En stor trussel på veien er modifisering av naturlige systemer, det vil si utbygging og inngrep i dammer og andre vannsystemer (D. M. P. Jacoby et al., 2015). Utbyggingen av dammer eskalerte i 1950-1960 årene, rundt 20 år før nedgangen av *A. anguilla*. Dette har ført til 50-90% tap av habitat for ål i Europa (Feunteun, 2002). Selv om ålen kommer seg opp de fleste fuktige overflater, kan store dammer ødelegge for migrering av glassål (Hitt, Eyster, & Wofford, 2012). Det kan også være en utfordring for migrasjon av blankål ut i havet.

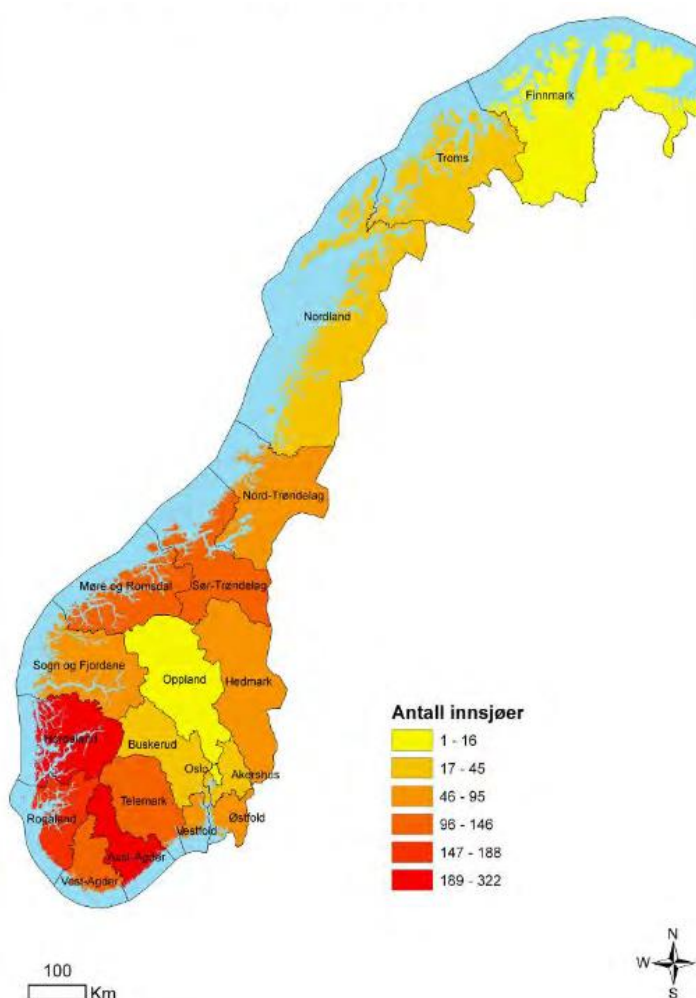
Konstruksjonene som trolig skaper størst dødelighet hos ål er vannturbiner i forbindelse med kraftverk. Det er gjort lite forskning på ål sammenliknet med laksefisk når det gjelder dødelighet for nedvandrende fisk forbi kraftverk, men nedvandrende ål har vist seg å endre oppførsel, samt snu i møte med turbiner (H. M. Jansen, Winter, Bruijs, & Polman, 2007). Mange individer vil likevel ikke unnsnippe turbinene, hvor de kan sette seg fast, kuttet, klemmes, oppleve for raske trykkendringer eller luftovermetning, eller bli utsatt for predasjon (Thorstad et al., 2010). Samlet resultat av flere undersøkelser viser at 52 % av ål som passerer kraftverk blir skadet eller dør (Thorstad et al., 2010).

Ål kan passere hindringer som andre anadrome fiskearter ikke klarer å passere, og motsatt kan migreringen bli hindret steder andre fiskearter passerer. Mange elver og dammer med menneskeskapte konstruksjoner er tilrettelagt for vandrende fisk med fisketrapper. Disse er i midlertid laget med tanke på arter som kan hoppe, som laks (*Salmo salar*) og ørret (*Salmo trutta*). Dette kan bli problematisk for ål, da hindringer som er høyere enn 50-60% av ålens kroppslengde kan stanse oppvandring (Thorstad et al., 2010). Terskler og fisketrapper kan også skape høy vannhastighet, som er spesielt utfordrende for de minste individene. De kan til en viss grad migrere (både horisontalt og vertikalt) på fuktig substrat, men helst nær land eller ved bunnen, for å unngå sterk vannhastighet (Vøllestad, 1992). Dersom vannhastigheten blir for høy, vil mange ikke klare oppvandringen.

Kanaliserings av elver, uttørking av våtmarker, vannuthenting og flombeskyttende vegger vil også skape utfordringer knyttet til vandring (Drouineau et al., 2018). Hindre i forbindelse med veibygging, som kulverter (nedgravd tunnel/rør for gjennomføring av vann), kan også utgjøre barrierer for ålens vandring, men det finnes lite oversikt over påvirkningen. Kulverter kan bli et problem hvis det er fall fra utløpet slik at ål ikke kommer seg opp, dersom vannhastighet er for høy eller lav, hvis kulverten er for lang, eller dersom organisk materiale samler seg foran grinden til kulverten og blokkerer gjennomgang (Statens Vegvesen, 2013).

Forekomst og nedgang av ål i Norge

I Norge er ål påvist i 361 ulike nedbørsfelt; 1788 innsjøer og 104 elver/bekker (Thorstad et al., 2010). Den forekommer i alle fylker, men i størst grad fra Telemark til Hordaland, i tillegg til Møre og Romsdal samt Sør-Trøndelag (Thorstad et al., 2010). Aust-Agder er det fylket med størst registrert forekomst av ål, mens Vest-Agder ligger på en fjerdeplass (figur 5). Forekomsten av ål i ferskvann er størst i områdene nærmest sjøen, opptil ca. 50 moh., og avtar med høyde over havet. Informasjon om artens forekomst er i stor grad basert på spørreundersøkelser fra de siste 30-40 årene, og det ble blant annet gjort en systematisk fiskeregistrering i Sør-Norge på midten av 1970-tallet



Figur 5: Fylkesvis fordeling av innsjøer med registrert forekomst av europeisk ål.

Kilde: Thorstad (2010). Figur gjengitt med tillatelse fra Norsk Institutt for Naturforskning (NINA).

i forbindelse med forsuring (Thorstad et al., 2010). Fellestrekket med undersøkelsene som er utført er at det ikke finnes spesielt mange opplysninger om ål.

Fiske har tidligere foregått i Sør-Norge opp til Sogn og Fjordane, men det meste har blitt eksportert ut av landet. Tettheten av ål er trolig lavere i Norge enn land lengre sør i Europa, men Norge har tilsynelatende flere hunnål. Høy tetthet synes å føre til hannål, mens lav tetthet synes å føre til hunnål, og ettersom tettheten minsker jo lengre opp i elvesystemene en kommer, er det trolig flere hunnål i øvre elvesystemer (Davey & Jellyman, 2005).

Det finnes to tidsserier med overvåkning av ål i Norge, hvor begge har vist sterk nedgang av ål. Havforskningsinstituttet ved Flødevigen i Aust-Agder har utført strandnottrekk ved 80 stasjoner siden 1904. Strandnottrekket har vist nedgang av ål siden 1997, og ingen ål ble fanget i 2007 (C. M. F. Durif & Elie, 2008). Norsk Institutt for Naturforskning (NINA) har registrert opp- og nedvandrende ål siden 1975 i elva Imsa i Rogaland. Antall oppvandrende ål var på topp i 1978 med 121.818 individer, men i 2007 ble det kun registrert 100 individer. Tallene var imidlertid noe bedre i påfølgende år i begge tidsserier, med blant annet 1000 individer i 2008 i Imsa. Etter 2008 har det vært en liten økning i antall ål fra begge tidsseriene, noe som kan ha sammenheng med tiltak som ble utført.

Tiltak for å få opp ålebestanden

Majoriteten av historisk bevaringsarbeid for europeisk ål har blitt utført lokalt eller nasjonalt, med lite koordinasjon. I 2007 vedtok Europeisk Union (EU) en forskrift om gjenoppbygging av ålebestanden (Council regulation No 1100/2007). Alle EUs medlemsland ble pålagt å sikre forvaltningsplaner og tiltak for å redusere menneskeliggskapt dødelighet, med mål om å få opp bestanden på 40% av historisk biomasse av blankål (Anonym, 2007). Forslag til tiltak innebar å redusere kommersielt fiske og fritidsfiske, forbedre habitat og gjøre elver fri til passasje, sette ut yngel, sørge for transport av blankål til havet, redusere predasjon, redusere dødelighet i forbindelse med turbiner, samt utvikle akvakultur (Anonym, 2007; D. Jacoby & Gollock, 2014). I 2007 ble arten også oppført i Appendix II i Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES) (Asis, Lacsamana, & Santos, 2016). Den internasjonale avtalen kontrollerer handel av dyr og planter, hvor formålet er å føre en bærekraftig handel. Alle medlemmene av konvensjonen ble nødt til å stille seg kritiske til handel av europeisk ål. I 2010 ble all EU-eksport og import av *A. anguilla* forbudt (Council Regulation (EC) No 339/97) (Stein et al., 2016).

I Norge ble det dannet en arbeidsgruppe under Fiskeridirektøren i 2008, som anbefalte tiltak og gjenoppbygging av bestanden, samt samarbeid med forskning og forvaltning i Europa. I 2009

ble det forbud mot ålefiske for fritidsfiskere, og i 2010 for kommersielle fiskere i tillegg. Likevel ble det åpnet for et "vitenskapelig fiske" i 2016, hvor utvalgte fiskere fikk tillatelse til fiske og salg av ål mot rapportering til Havforskningsinstituttet (C. Durif & Skiftesvik, 2016). I tillegg ble klassifiseringssystemet for miljøtilstand i vann godkjent i 2009, som er relevant i kartlegging av miljøforhold for ål i vassdrag (Miljødirektoratet, 2011).

Dagens status

Den første evalueringen av tiltakene ble rapportert av Working Group on Eels (WGEEL) i 2012. Rekrutteringen av glassål lå da på under 1% av historisk nivå fra 1960-1979 i Nordsjøen, og 5% andre steder i Europa basert på tilgjengelige tidsserier (ICES, 2012). I 2013 lå rekrutteringen på 1,5% i Nordsjøen og 10% andre steder (ICES, 2013), og i 2015 på 1,2% i Nordsjøen og 8,4% andre steder (ICES, 2015). I siste rapport fra 2018 var rekrutteringen av glassål 2,1% sammenlignet med 1960-1979 i Nordsjøen og 10,1% andre steder i Europa (ICES, 2018). Det kan se ut som det er en tendens i økning av glassålrekruttering, men det er trolig for tidlig å trekke konklusjoner.

Målet om å få opp bestanden på 40% av historisk nivå av blankål ble nådd av 24% av forvaltningsenhetene for ål (seks EU-land), mens de resterende var under målet (ICES, 2018). Ettersom ål bruker rundt 20 år på å nå blankålstadiet, vil effekten av tiltakene trolig vise seg tydeligere med tiden. Bevaringsarbeidet begrenses i dag av mangel på kunnskap om blant annet ålens biologi, utbredelse og habitatbruk, samt hvordan arten påvirkes av ulike faktorer. Direktoratet for Naturforvaltning har blant annet ønsket større kompetanse på fiskepassasjer. Et viktig steg i bevaringsarbeidet i Norge er utbedring av potensielle hindringer for dens vandring. I tillegg vil informasjon om utbredelse og biomasse av ål i ulike områder være svært verdifull informasjon. Et kosteffektivt og presist verktøy som kan brukes i dette arbeidet er miljø-DNA (eDNA).

1.3 MILJØ-DNA

eDNA er DNA som organismene etterlater seg i miljøet, fra for eksempel celler, vev, ekskreter, urin eller gameter. Analyse av vann for artsspesifikt eDNA er en ny og voksende metode som er nyttig i studie av akvatiske organismer (Rees, Maddison, Middleditch, Patmore, & Gough, 2014). Etersom DNA etterlates i vannet, kan organismen påvises via analyse av en vannprøve hentet fra vannområdet den lever i. Dersom målet er å påvise en art, brukes polymerase chain reaction (PCR) med spesifikke primere og prober (Thomsen & Willerslev, 2015). Ønsker man å få treff på flere ulike arter, brukes PCR med universale primere etterfulgt av DNA-sekvensering (Thomsen & Willerslev, 2015).

I akvatiske miljøer er tradisjonelle metoder for artsidentifikasjon ofte basert på morfologi, gjennom for eksempel fiske, feller eller observasjoner av organismene. Dette kan være utfordrende når det gjelder arter med ulike livsstadier (som egg og larver) i tillegg til sjeldne arter. Med synkende kunnskapsnivå i taksonomi og mulige feil i databaser, kan korrekt artsidentifikasjon bli problematisk (Thomsen & Willerslev, 2015). Andre metoder brukt til artsbestemmelse, som karakterisering av spesifikke proteiner eller immunoassay systemer som ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) har også begrensninger (Teletchea, 2009). I disse teknikkene er prøvene tatt direkte fra organismen, noe som betyr at organismen må være til stede ved prøvetidspunktet, og at prøvetakningen kan ha fysiske påvirkninger.

eDNA løser mange av utfordringene assosiert med de andre metodene. Metoden er kosteffektiv i forhold til innhenting av informasjon om distribusjon og tilstedeværelse, og vil utfylle manglende taksonomisk ekspertise. Resultatet er dessuten mer presist og objektivt enn mange tradisjonelle metoder (Strickler, Fremier, & Goldberg, 2015; Thomsen & Willerslev, 2015). I tillegg vil metoden ivareta dyrenes velferd, ved å ikke forstyrre eller skade dem. eDNA-analyser har også vist seg å korrelere med tradisjonelle metoder, i tillegg til å gi positive utslag i større grad enn de tradisjonelle metodene, noe som viser at metoden er spesielt sensitiv (Dejean et al., 2012; Takahara, Minamoto, & Doi, 2013). Dette gjør at det er mulig å påvise fremmede arter mens de enda er sjeldne. I tillegg er DNA mer resistent og tåler høyere temperaturer før denaturering enn andre molekyler, som proteiner, og gir dessuten mer informasjon (Teletchea, 2009). Selv om eDNA kan ha hurtig degradering i vann sammenliknet med i sedimenter, kan det være positivt når man studerer sjeldne arter, fordi man kan anta at organismen har vært tilstede i nær fortid dersom en analyse av eDNA gir positivt utslag på den aktuelle arten (Thomsen & Willerslev, 2015).

På en annen side har de tradisjonelle observeringsmetodene fordel av å kunne skille mellom levende og døde dyr, samt ulike livsstadier. Observasjoner vil dessuten gi informasjon om organismene som er vanskeligere å få ved hjelp av eDNA, som for eksempel størrelse og tilstand. eDNA-metoden har også utfordringer når det kommer til deteksjonsmulighet i vann, i sammenheng med produksjon, transport og degradering av eDNA (Strickler et al., 2015). I tillegg er bruk av eDNA til kvantifisering av populasjoner enda debattert (se avsnitt ‘‘Kvantifisering av populasjoner ved bruk av eDNA’’).

Artspåvisning ved bruk av eDNA

Konseptet med å undersøke DNA fra miljøet utviklet seg fra mikrobiologi i en studie av mikroorganismer i sedimenter (Ogram, Saylor, & Barkay, 1987). eDNA fra planter, sopp, alger og protister ble senere påvist i is på Grønland (Willerslev, Hansen, Christensen, Steffensen, & Arctander, 1999), etterfulgt av pattedyr, fugler og insekter i sedimenter (Thomsen & Willerslev, 2015). Den første påvisningen av makroorganisme-DNA i ferskvann stammet fra menneske, ku, gris og sau (Martellini, Payment, & Villemur, 2005). Siden den første påvisningen av eDNA i vannprøver, har det vært en voksende interesse i akvatiske systemer. Etter en suksessfull påvisning av Amerikansk oksefrosk (*Lithobates catesbeianus*) i 2008, er fisk, reptiler, snegler og krepsdyr påvist (Thomsen & Willerslev, 2015). Amplifisering av store fragmenter som hele mitokondriet (>16 kb) har også vært vellykket, noe som motbeviser en vanlig antagelse om at eDNA fra miljøer med levende fisk i vann er veldig degradert (Deiner et al., 2017).

Metoden har også vist seg å fungere i saltvann, som inneholder mengder med DNA tross det store vannvolumet (Thomsen et al., 2012). Det marine miljøet er ikke undersøkt i like stor grad som det limniske miljøet, men det er økende interesse. I 1968 begynte forskere å måle DNA i saltvannsprøver (Holm-Hansen, Sutcliffe, & Sharp, 1968). Senere ble eDNA fra vannprøver fra Sargassohavet sekvensert for å undersøke mikrobisk diversitet og tilstedeværelse (Venter et al., 2004). Første bruken av eDNA for artspåvisning i sjøen var i 2012. 15 ulike fiskearter ble påvist innenfor tre nærliggende lokaliteter i sjøvann i Danmark, og dekket fisketettheten bedre eller tilsvarende alle andre metoder utført i undersøkelsen (Thomsen et al., 2012). I ettertid har mange arter blitt påvist ved bruk av eDNA. Stat m.fl (2017) analyserte over 23 millioner sekvenser fra 9 L sjøvann samlet i Coral Bay, Australia, og påviste 287 familier av eukaryoter (Stat et al., 2017).

Kvantifisering av populasjoner ved bruk av eDNA

Kvantifisering av populasjoner via eDNA-analyser er ofte basert på sammenlikning av eDNA-konsentrasjon med biomassedata hentet fra fiske- og fangstmetoder. Korrelasjon mellom disse er funnet i studier av ulike arter, for eksempel for japansk ål (*Anguilla japonica*), hvor det ble observert en svak, men signifikant korrelasjon mellom eDNA-konsentrasjon og biomasse av ål estimert via elektrofiske (Itakura et al., 2019). Likevel er denne type kvantifisering debattert (Lacoursiere-Roussel, Dubois, Normandeau, & Bernatchez, 2016). Flere studier finner ingen signifikant korrelasjon mellom konsentrasjon og biomasse, for eksempel i en undersøkelse av ørret i bekken Wehebach, Tyskland (Deutschmann, Muller, Hollert, & Brinkmann, 2019). Deutschmann et al. (2019) mener dette skyldes at produksjonen av eDNA fra ørret varierer med livsstadiet og/eller alder. En slik korrelasjonen, som i studiene nevnt ovenfor, er vanskelig å måle fordi det er mange faktorer som påvirker eDNA-konsentrasjon i vann. I hovedsak påvirkes eDNA av ulike degraderingsprosesser, i tillegg til at eDNA-produksjonen til miljøet varierer både mellom arter og individer. En kan derfor tenke seg at en fiskepopulasjon ikke nødvendigvis vil ha samme eDNA-konsentrasjon i sitt akvatiske miljø, som en tilsvarende fiskepopulasjon i et annet akvatisk miljø. Det er i hovedsak tre prosesser som påvirker eDNA i akvatiske miljøer; eDNA produksjon, eDNA transport og eDNA degradering (Strickler et al., 2015).

eDNA produksjon; Produksjon av eDNA avhenger av art, årstid, populasjonstetthet og diett (Strickler et al., 2015). Arter oppfører seg ulikt i ulike årstider, har forskjellige livssykluser samt varierende næringstilgang, og det er derfor variasjoner i metabolsk rate og habitatbruk (Lacoursiere-Roussel et al., 2016; Strickler et al., 2015). Dette kan skape variasjoner i mengden eDNA man fanger opp i en vannprøve. Det er for eksempel høyere deteksjonsrate for amfibier enn reptiler, på grunn av deres høye sekretutskillelse i forbindelse med egg og larver i vannet (Lacoursiere-Roussel et al., 2016). Produksjon varierer også med populasjonstetthet og størrelse på hvert individ. I en undersøkelse av eDNA-produksjon fra ansjos, sardin og makrell ble det funnet at produksjonsraten varierte fra 165 pg til 3368 pg per time per gram biomasse (Sassoubre, Yamahara, Gardner, Block, & Boehm, 2016). Det må nevnes at det er utfordrende å måle produksjonsrate grunnet stress blant individer under eksperimenter (Nevers et al., 2018). Alt i alt kan man si at det er variasjoner i eDNA-produksjon mellom arter, og mellom individer innenfor samme art.

eDNA transport; Avhengig av miljøet, kan eDNA bli transportert med vannstrømmen, diffundere eller binde seg til sedimenter (Strickler et al., 2015). DNA-molekylene transporteres ikke nødvendigvis homogent nedover en elv, men responderer til ulike vannbevegelser og bentiske substrater (Shogren et al., 2017). Fine substrater kan holde på mer eDNA enn større grus og stein, derfor vil oppholdstiden være større i miljøer med finere substrat (Shogren et al., 2017). Det vil uansett ofte være sammenheng mellom distanse og minkende eDNA-konsentrasjon (Balasingham, Walter, & Heath, 2017). I havet er vannets masse enorm sammenliknet med ferskvannssystemer, dermed vil eDNA trolig være av lokal opprinnelse, og deteksjonsrate vil minke med distanse fra organismen (Port et al., 2016). Uansett er vannbevegelse viktig for innsamling av eDNA fra celler, ellers vil de synke (Lacoursiere-Roussel et al., 2016).

eDNA degradering; Degradering er trolig den faktoren som i størst grad kan redusere eDNA-konsentrasjonen, og inkluderer temperatur, mikrobiell aktivitet, næringsstoffer og UV-stråling (Salter, 2018; Strickler et al., 2015). Temperatur ser ut til å ha den største effekten på eDNA-degradering, mest som en indirekte faktor. Høye temperaturer fører ofte til økt tilstedeværelse og metabolisme hos mikroorganismer. eDNA kan gå igjennom kjemisk hydrolyse når det utsettes for syre eller enzymer fra mikrobiell hydrolyse. Dessuten kan mikroorganismer bruke ATP fra DNA i mangel på fosfat (Salter, 2018). Stråling, spesielt UV-B, kan skade eDNA fotokjemisk, noe som kan lede til feil under PCR-amplifikasjon (Strickler et al., 2015).

Ettersom mange faktorer påvirker eDNA-molekylene i vann, vil konsentrasjonen variere med tid, sted, arter og individer. Det vil derfor være utfordringer knyttet til å bruke eDNA-konsentrasjon som indikator på biomasse.

PCR-inhibitorer

Ved innsamling av eDNA i vann, er det også mulig å samle PCR-inhibitorer som hummussyrer, noe som har høy inhiberingseffekt på eDNA. Dette kan føre til at man får dårligere eller negativt resultat etter PCR, selv om resultatet egentlig skulle vært positivt (falske negativer). Alger og silisiumdioksidpartikler kan også være årsak til lav deteksjon i prøver (Stoeckle et al., 2017).

1. 4 PCR

Tradisjonell PCR

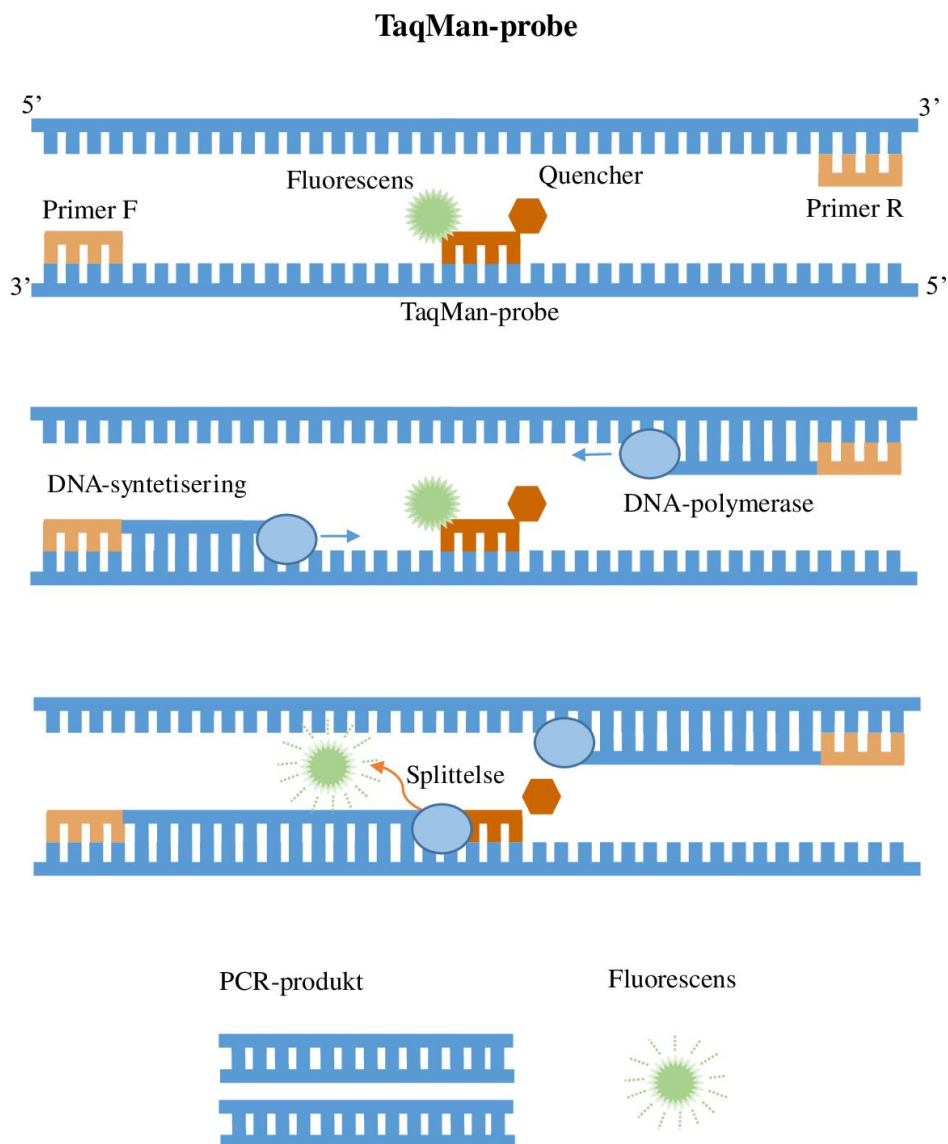
Analyse av eDNA for påvisning av en art inkluderer amplifisering via PCR. PCR er en metode for å oppformere DNA, hvor man kan kopiere en spesifikk sekvens som i utgangspunktet er tilstede i få antall (Klug, Cummings, Spencer, & Palladino, 2017). For å oppformere DNA plasseres dobbeltrådet DNA i et rør, og tilsettes DNA-polymerase, fire deoksynukleotider, samt en buffer for at polymerasen skal virke optimalt. I tillegg tilsettes to primere; to korte, enkelttrådede DNA-sekvenser, den ene komplementær til 5'enden av den ene måltråden, og den andre komplementær til den motsatte måltråden ved 3' enden (Klug et al., 2017). Prøven settes så i PCR-maskinen, hvor det skjer tre ulike trinn. *Denaturering*: Temperaturen heves til 92-95 °C i omtrent ett minutt slik at den doble DNA-tråden splittes til to enkelttråder. *Hybridisering*: Temperaturen senkes til rundt 45-65°C, slik at primerne hybridiserer til DNA-tråden. Primerne fungerer som startsted for polymerasen. *Forlenging*: I tredje trinn justeres temperaturen til 65-75 °C. DNA-polymerase syntetiserer ny DNA-tråd fra der primerne festet seg i 5' til 3' retning.

Hver syklus tar mellom 2 og 5 minutter og repeteres umiddelbart i rundt 30-40 sykluser. Mengde PCR-produkt øker eksponentielt per runde, noe som resulterer i omlag en million ganger større DNA-mengde, enn ved start (Klug et al., 2017). Etter en tradisjonell PCR-kjøring overføres produktet gjerne til en gel for gelelektroforese. Positive utslag vil dermed kunne ses som bånd på gelen.

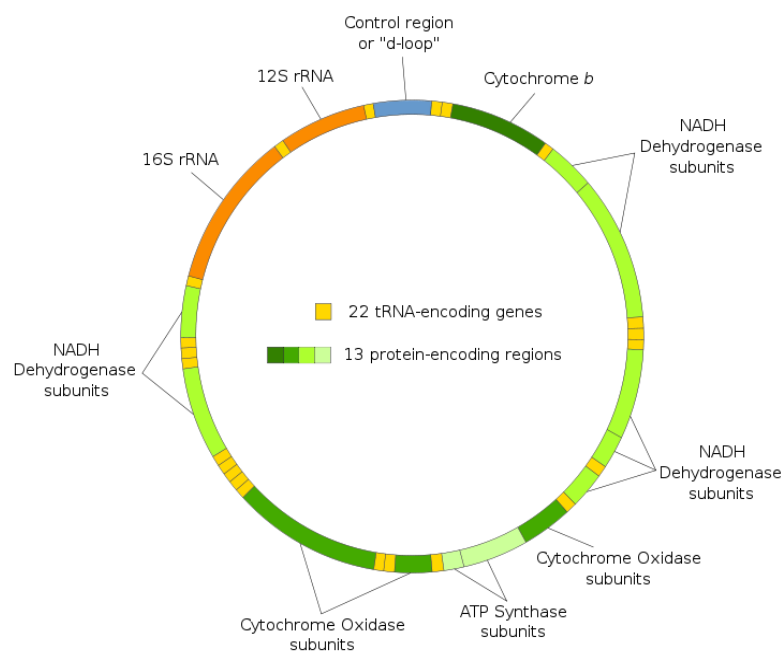
Quantitative real-time PCR

Quantitative real-time PCR (qPCR) ved bruk av TaqMan-probe (TaqMan MGB; Applied Biosystems - Life Technologies Corporation) gjør det mulig å få resultater på få timer uten gelelektroforsese, og er mer sensitivt enn vanlig PCR (Wilcox et al., 2013). qPCR gjør det dessuten mulig å se resultatene for hver syklus, noe som betyr at man ikke nødvendigvis må vente til kjøringen er ferdig for å se om produkt er oppformert. I prosessen amplifiserer de to primerne til en liten del av målsekvensen, og proben fester seg til bindingssetet i mellom disse (figur 6). Proben har et fluorescensmolekyl bundet til seg i den ene enden, og en quencher (utslukker) i den andre enden. Når komponenten er intakt absorberer quencheren signalet fra fluorescensmolekylet. Proben løsner av 5'-3' nukleaseaktiviteten til DNA-polymerase under

syntetiseringen, noe som gjør at et fluorescenssignal kan detekteres av maskinen. Mengden fluorescens er proporsjonal med mengden templat, noe som etter hvert skaper en amplifiseringskurve. Høyere konsentrasjon av DNA i analyserøret når qPCR starter vil gi tidligere kurve. Syklusnummer der fluorescenssignalene er sterkere enn bakgrunnsstøy kalles Ct-verdi (Wilcox et al., 2013). Lavere Ct-verdi tilsier derfor større mengde DNA tilsatt i PCR-løsningen.



Figur 6: Real Time PCR med TacMan-probe. Illustrasjon: Silje Halvorsen



Figur 7: Struktur av mitokondrie i dyreceller. Illustrasjon: Wikipedia (CC BY-SA)

kjerne-DNA per celle, og er dermed fordelaktig i miljøer med lav DNA-konsentrasjon (Rees et al., 2014). Et fragment av cytochrome *b*-genet er ofte brukt i artspåvisning fordi området har variasjon mellom arter, og det er et kort fragment som har mindre sjanse for å brette opp enn lange fragmenter (Rees et al., 2014). Cytochrome-*b* genet innehar både sakte- og hurtigutviklende kodon-områder, og er derfor ansett som et av de viktigste genene i fylogenetisk arbeid (Farias, Orti, Sampaio, Schneider, & Meyer, 2001). Skal man derimot skille individer av samme art må man undersøke et område med variasjoner mellom individer. Et slikt område hos mange dyr er et kontrollområde på mitokondriet som kalles D-loop regionen, som ikke koder for proteiner, men hvor det hyppig forekommer mutasjoner.

1.5 SEKVENSERING AV PCR-PRODUKT

Sangersekvensering

For å studere ulike DNA-sekvenser, må sekvensene leses av, altså sekvenseres. Sammenligning av sekvenser gjør det mulig å skille mellom arter og/eller individer. Under en Sangersekvensering splittes den doble DNA-tråden til to enkelttråder, hvor den ene brukes som templat for syntetiseringen. Deretter tilsettes primer komplementær til målsekvensen, sammen med DNA-polymerase og de fire deoxyribonukleotide trifosfatene (dATP, dCTP, dGTP og

Primerdesign

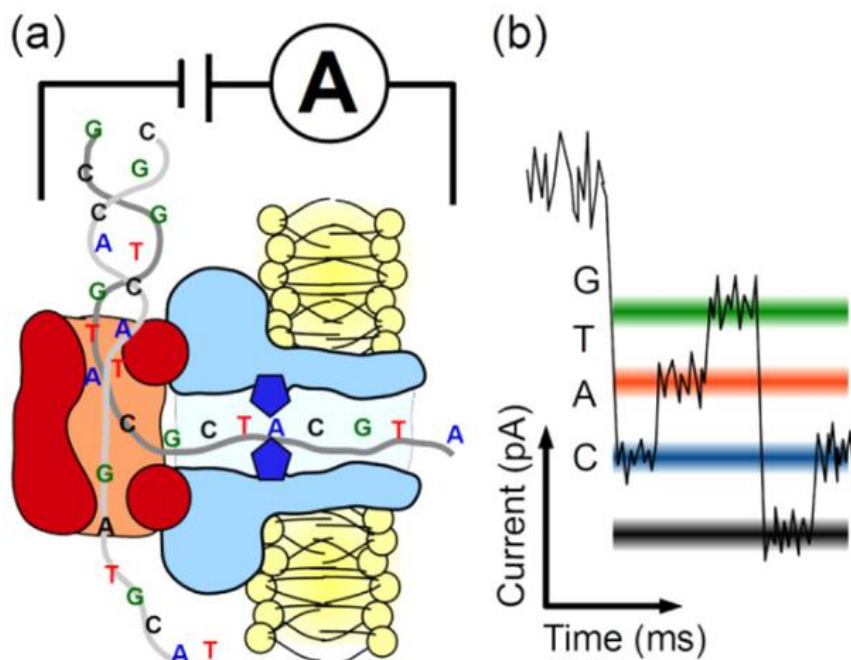
For påvisning av en art velges primer- og probesekvenser med tanke på å være mest mulig spesifikk for arten, og minst mulig for andre arter, ofte ved hjelp av søk mot andre sekvenser i en genbank. Mitokondrie DNA (mtDNA) er ofte brukt som målsekvens for presis artsbestemmelse (figur 7) (Hebert & Gregory, 2005). Mitokondrie-DNA finnes i et større antall enn

dTTP). I tillegg tilsettes en liten mengde modifisert deoxyribonukleotid, kalt dideoxyribonukleotide (ddNTP), en unik for hvert nukleotid (Klug et al., 2017). Dideoxyribonukleotidene har 3' hydrogen istedenfor en 3' hydroksylgruppe i ribosemolekylet, og mangler altså 3' oksygen som trengs for å danne et fosfodiesterbånd med en annen nukleotide. Under DNA-syntesen vil polymerasen noen ganger sette inn en ddNTP istedenfor en dNTP. DNA-syntesen vil dermed stoppe, fordi det ikke kan dannes bånd med en ny nukleotide. Gjennom reaksjonen vil det med tid være en ddNTP ved hver lokasjon på den nye syntetiserte tråden, slik at hver nye tråd varierer i lengde med en nukleotide. Det blir dermed mulig å skille trådene via gelelektroforese, og bestemme sekvensen (Klug et al., 2017). Tidligere ble sekvenseringen kjørt i fire separate rør, med hver unike ddNTP. Nå kan reaksjonen foregå i ett rør, fordi hver ddNTP merkes med fluorescens i egen farge. Disse reaksjonene skjer i PCR-lignende stil med syklus-reaksjoner, hvor produktene overføres til en tynn kapillærgele. Når DNA-fragmentene beveger seg over gelen, skannes de med laser, som leser ulike bølgelengder av lys fra hver ddNTP. Informasjonen behandles av en datamaskin som konverterer bølgelengdene til en DNA-sekvens (Klug et al., 2017).

Nanoporesekvensering

I 2001 ble menneskets genom ferdig sekvensert, et prosjekt som tok om lag 15 år, og foregikk gjennom mange teknologiske fremskritt av DNA-sekvensering (Hasler, 2019). Kontroversiell sekvensering er "kortlest", det vil si at flere tusen fragmenter må festes sammen. Oxford Nanopore Technologies (ONT) MinION er en nyutviklet tredje generasjons sekvensering med revolusjonerende lange sekvenser; i underkant av 2 millioner basepar er rapportert lest (Goldstein, Beka, Graf, & Klassen, 2019). MinIONen kan også sekvensere enkeltmolekyler, og er en liten enhet som kan plugges til en laptop via USB3-inngang. Komponenten består av opp til 512 proteinnanoporer, som utgjør små hull fordelt over en membran (H. J. Jansen et al., 2017). For å nå positiv ladning må DNA-tråden passere gjennom den trange poren i membranen. Poren har en diameter på rundt 1.5 nm på det smaleste, slik at kun enkelttråder kan passere. Under passasjen forandrer elektrisiteten seg etter hvilken base som blokkerer åpningen (Steinbock & Radenovic, 2015) (figur 8).

Hver base har ulike kjennetegn basert på sin fysiske struktur, slik at hver base lar seg gjenkjenne. MinION-enheten kan lese opp til 450 nukleotider i sekundet, og har en sekvenskorrekthet på 94% for enkeltrådet lesing (1D) (H. J. Jansen et al., 2017; Tyler et al., 2018). Sekvenskorrektheten er forholdsvis lav, men dersom det sekvenseres med stor nok dybde, vil



Figur 8: Prinsipp: (a) Dobbeltrådet DNA separeres til to enkeltråder vha en type polymerase (som phi29), hvor så den ene passerer gjennom nanoporen. En innsnevring (mørkeblå) leser av ssDNA-sekvensen. (b) Den ioniske strømmen forandres av nukleotidene. Ved å detektere det skiftende strømnivået, som representerer hver nukleotide, kan sekvensen bestemmes. Figur gjengitt med tillatelse av forfattere Steinbock og Radenovic (2015).

sammenlikning av de samme sekvensene kunne luke bort feil. Signalene kan bli analysert i nåtid, og bestemmer DNA-sekvensen. Leselengden er direkte koblet med lengden på DNA-tråden. Metoden er ekstremt rask, så hvis menneskets genom hadde vært et enkelt DNA-fragment, kunne det blitt sekvensert på 20 timer (Hasler, 2019).

1. 5 MÅL OG PROBLEMSTILLING

Kulverter, broer og fisketrapper kan utgjøre vandringshindre for europeisk ål. Kan vandringshindre påvises ved å analysere eDNA innhentet oppstrøms og nedstrøms for potensielle hindre?

eDNA har vist seg som et vellykket verktøy for artsbestemmelse, men kvantifisering er fortsatt debattert. Kan eDNA brukes til å bestemme antall individer av europeisk ål i en vannprøve ved å se på individforskjeller i mtDNA?

2. METODE

2.1 KARTLEGGING AV POTENSIELLE VANDRINGSHINDRE FOR ÅL

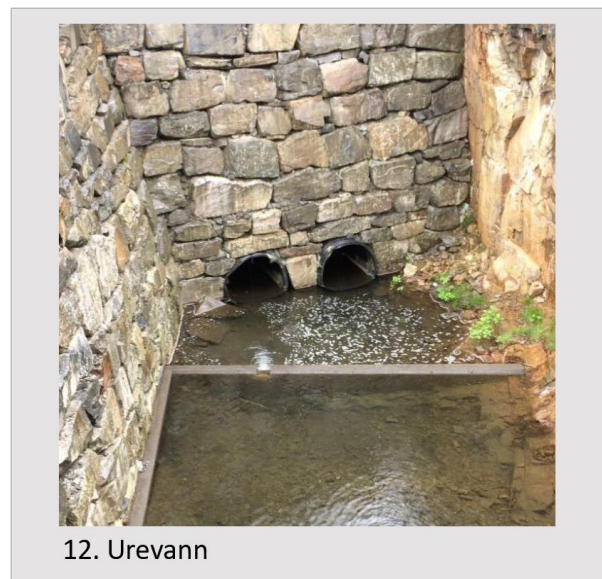
Tabell 1: Oversikt over vurderinger av farbarhet for potensielle fiskevandringshindre vurdert til "lite god", "god" eller "meget god" av Statens vegvesen 2013 (en i 2016). Fire lokaliteter (23-26) er vurdert av NIVA i 2017 ("god" eller "lite god"), men lengre strekninger av bekken er vurdert, ikke enkelthindringer.

Nr	Lokalitet	Vurdering, Statens vegvesen
1	Nidelva	Meget god
2	Birketveit	Lite god
3	Sævelibekken	God (2016)
4	Frivoll	Lite god
5	Reddalskanalen	Meget god
6	Pendalen	God
7	Kaldvell	Meget god
8	Moelva	God
9	Tingsaker	Ikke vurdert
10	Fjelldalselva	Meget god
11	Steindalsbekken	Meget god
12	Urevann	Lite god/ god (to hindre)
13	Studedalen	Lite god
14	Blegehåla	Lite god
15	Østerbekk	God
16	Prestebekken	Lite god
17	Bøen	Lite god
18	Vesbekken	Meget god
19	Augland	Meget god
20	Øvre Strai	Mangler konklusjon
21	Rosslandsbekken	Ikke vurdert
22	Kleplandsbekken	Ikke vurdert
23	Mjålandsbekken	God
24	Smelandsbekken	Lite god
25	Fodnebekken	God, men bør utføre tiltak
26	Vådnebekken	God

For å kartlegge vandringshindre for ål, måtte lokaliteter med konstruksjoner som kunne hindre migrering velges ut. Lokalitetene for vannprøvetakingen ble i hovedsak valgt med utgangspunkt i rapporten "Kartlegging av fiskevandringshindre. Aust-Agder og Vest-Agder" (StatensVegvesen, 2013), der Statens vegvesen, via observasjonsmetoder, hadde kartlagt potensielle vandringshindre tilknyttet vegnettet. Det ble også valgt en lokalitet (lokalitet 3) fra en mindre rapport av Statens vegvesen ved navn "Vandringshindre – kulverter under veg, kartlegging og tiltak" fra 2016 (Lindaas, 2016), og fire lokaliteter (23-26) med utgangspunkt rapporten "Kartlegging av utvalgte sjøaurebekker som renner inn i Mandalselva høsten 2016" (Gabrielsen, Skår, Haraldstad, & Hindar, 2017) fra Norsk Institutt for Vannforskning (NIVA). NIVA-rapporten benyttet seg av elektrofiske i tillegg til observasjon under kartleggingen.

Statens vegvesen kategoriserte farbarheten til hver potensielle hindring til "lite god", "god" eller "meget god" (tabell 1). Med farbarhet menes sannsynligheten for fisk (som i hovedsak var antatt å være ørret, men muligens laks og ål) å komme seg forbi hindringen, da tatt i betraktning innløpsforhold, vannhastighet,

vanddyp og øvrige hindringer. NIVA-rapporten benyttet seg ikke av samme kategorier, men bedømte hver lokalitet til "god" eller "lite god". De potensielle hindrene var i hovedsak kulverter under veg, men også noen tunneler, fisketrapper og broer. Det ble både valgt ut konstruksjoner som var antatt å være problematisk og uproblematisk for migrasjon av fisk.



Figur 9: Kartet viser Aust- og Vest-Agder i Norge, med oversikt over de ulike lokalitetene hvor potensielle vandringshindre ble undersøkt. Lokalitetene er nummerert 1-26, noe som samsvarer med stedsnavn i tabell 1 og informasjon i vedlegg. Bildene viser eksempler på to potensielle vandringshindre, her kulverter; 2, Birketveit og 12, Urevann. Foto: Silje Halvorsen. Kart: Vegkart, Statens vegvesen

Vannprøvene ble tatt ved 26 ulike lokaliteter i bekker eller elver ved navn Nidelva, Birketveit, Sævelibekken, Frivoll, Reddalskanalen, Pendalen, Kaldvell, Moelva, Tingsaker, Fjelldalselva, Steindalsbekken, Urevann, Studedalen, Blegehåla, Østerbekk, Prestebekken, Bøen, Vesbekken,

Augland, Øvre Strai, Rosslandsbekken, Kleplandsbekken, Smelandsbekken, Fodnebekken og Vådnebekken i Aust-Agder og Vest-Agder (figur 9) (se vedlegg s. 71 for detaljert informasjon om hver lokalitet).

Vannprøvetaking – potensielle vandringshindre

Vannprøvetakingen ble utført i juni 2018. Totalt 1 L vann ble hentet ved å samle 20 prøver via et 50 ml rør, på en strekning fra ca. 0-100 meter fra hver konstruksjon langs bekken eller elva. Det ble tatt en prøve oppstrøms og en prøve nedstrøms for hvert potensielle hinder (figur 10).



Figur 10: Eksempel på potensielt vandringshinder. Bekk (Østrebekk) ligger i kulvert under veg. Røde piler oppstrøms og nedstrøms for hinderet viser retning havet. Vannprøvene ble tatt ved området pilene viser, 0-100 m langs elva fra kulverten. Detaljer finnes i vedlegg. Kart: Vegkart, Statens vegvesen

Nedstrømsprøven ble alltid tatt før oppstrømsprøven, for å være sikker på at ikke vann nedstrøms ble tatt med oppstrøms for et hinder. Nye, ubrukte 50 ml begre og hansker ble skiftet ut mellom hver vannprøve for å forhindre kontaminering. Prøvene ble oppbevart i flasker med skrukork i en kjølebag fylt med is på vei fra felt til laboratoriet. 1-litersflasker og øvrig utstyr ble vasket nøye i 10% klor, og lufttørket, dersom det skulle brukes på nytt i felt. 150-900 ml vann (så mye som mulig) fra de innsamlede prøvene ble filtrert på laboratoriet gjennom et cellulosenitratfilter med 0,45 µm porestørrelse (Thermo Scientific Nalgene) ved hjelp av en ILMVAC vakumpumpe (GmbH). Filtrene ble brettet tre ganger med en pinsett og lagt i et 1,5 ml eppendorfrør, før de ble lagret på - 20°C.

2. 2 Bestemmelse av antall individer via miljø-DNA

Innhenting av genomisk DNA fra individer av ål og eDNA fra vannprøver

Målet for denne delen av studiet var å sekvensere eDNA fra en vannprøve hentet i en bekk, for så å undersøke individuelle forskjeller i en spesifikk DNA-sekvens. Det ble ikke funnet tidligere publikasjoner på dette, og det var dermed uvisst om DNA-molekylene var intakte nok til at målsekvensen ville la seg oppformere og sekvensere som ønsket. I den sammenheng ble det planlagt å utføre et kontrollleksperiment, hvor det var lettere å oppformere samt sekvensere DNA-sekvensen, i tillegg til å ta vannprøve fra en bekk. Kontrollleksperimentet ble bestemt til å være et isolert miljø, der antall individer av ål, og haplotypene til hvert individ, var kjent. Etter søknad ble det gitt tillatelse av Fylkesmannen i Agder for fanging, håndtering, og gjenutslipp av ål, slik som beskrevet nedenfor.



Figur 11: Ål i isolert miljø (kar) før vannprøvetaking med hensikt å undersøke individforskjeller. Bekk (Lilleelv) i bakgrunnen, hvor ålen ble fanget, og prøve også hentet.

10 ål ble fisket via et elektrofiskeapparat i en bekk hvor det var god tilgang på ål; Lilleelv, i Arendal, Aust-Agder. Vevsprøver ble tatt for å kunne bestemme haplotypene til de 10 individene. En liten bit av halefinnen fra hvert individ ble klippet av, før de ble lagret på 96% sprit. Deretter ble individene plassert i et 80 L kar med om lag 60 L vann fra bekken (figur 11). Det ble valgt å bruke bekkevann fordi det ble utfordrende å frakte rensert vann til området, samt at vevsprøve fra hvert individ kunne brukes som referanse-sekvenser. Ålen fikk tilførsel av oksygen, og stod i karet i en time. Deretter ble en vannprøve tatt av vannet i karet. Før ålen ble sluppet ut i bekken igjen, ble det tatt en vannprøve av

bekken. Nærmere forklaring av de ulike prøvene finnes i avsnitt 2.6.

2.3 ISOLERING AV DNA

Isolering av eDNA fra vannprøver

DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen) ble brukt til isolering av eDNA. 0,3 g 0,5 mm Zirconia/Silica (Biospec Product) ble lagt i et 1,5 mm skrukorkrør. Filtrene ble hakket til ca. 1 mm biter og lagt i røret med silica-kulene, før 720 µl ATL-buffer ble tilsatt. Rørene ble ristet i 45 sek på 2800 opm (oscillasjoner per minutt) via en bead beating-maskin (MagNa Lyser, Roche). Etter ristingen ble prøvene inkubert ved 56°C i 30 min. Prøvene ble igjen ristet på samme måte, deretter tilsatt 80 µl proteinase K og inkubert ved 56°C i 2 t.

Etter inkuberingen ble prøvene vortexet og sentrifugert i 1 min ved 8000 rpm, før 500 µl supernatant ble overført til et nytt rør. Tilsvarende mengde 96 % etanol og AL-buffer ble tilsatt. 1/3 av blandingen ble deretter overført til en spinnkolonne i et 2 ml samlerør, og sentrifugert i 1 min på 8000 rpm. Innholdet i samlerøret ble kastet, og spinnkolonnen satt tilbake i samlerøret. Dette ble gjentatt i ytterligere to omganger med den resterende blandingen. Deretter ble 500 µl AW1 vaskebuffer tilsatt, og spinnkolonnen sentrifugert i 1 min på 8000 rpm. Innholdet i samlerøret ble kastet, og spinnkolonnen satt tilbake. 500 µl vaskebuffer AW2 ble tilsatt, og prøven ble sentrifugert i 3 min på 13400 rpm. Samlerørene ble kastet, og spinnkolonnen plassert i et 1,5 ml eppendorfrør med avrevet lokk. 100 µl AE-buffer ble tilsatt i to omganger, med 1 min sentrifugering på 8000 rpm mellom tilsetningene. Innholdet ble til slutt overført til et nytt eppendorfrør, som ble merket og lagret på frys ved -20°C.

Isolering av genomisk DNA fra individer av ål

Det ble også isolert DNA fra vevsprøvene fra de 10 individene av ål. En bit på ca. 25 mg ble hakket i mindre biter med en skalpellkniv og lagt i et 1,5 ml eppendorfrør. 180 µl ATL-buffer og 20 µl proteinase K ble tilsatt, før blandingen ble vortexet og sentrifugert. Prøven ble satt til isolering i varmekolbe ved 56 °C til vevet var fullstendig lysert.

Etter lyseringen ble 200 µl AL-buffer og 200 µl 96% etanol tilsatt, før blandingen ble vortexet og overført til en spinnkolonne i et 2 ml samlerør. Prøven ble sentrifugert i 1 min på 8000 rpm, før spinnkolonnen ble overført til nytt samlerør. 500 µl AW1 vaskebuffer ble tilsatt, og prøven ble igjen sentrifugert i 1 min på 8000 rpm. Deretter ble 500 µl AW2 vaskebuffer tilsatt, før prøven ble sentrifugert i 3 min på 13400 rpm. Spinnkolonnen ble så overført til et nytt samlerør. 200 µl AE-buffer ble tilsatt i to omganger og sentrifugert i 1 min på 8000 rpm hver gang.

Løsningen ble så overført til et eppendorfrør, som ble merket og lagt på frys ved -20°C.

2. 4 ANALYSE AV DNA VIA SPEKTROFOTOMETER

Alle prøvene ble analysert i et spektrofotometer (NanoDrop™ One, Thermofisher) for måling av DNA-konsentrasjon og prøvenes renhet. AE-buffer ble benyttet som blankprøve, før 1 µl av hver prøve ble målt. DNA-konsentrasjon i ng/µl indikerer hvor mye DNA det er i prøven. Forholdet mellom absorbansen på bølgelengdene 260 nm over 280 nm (A260/280) viser renhet av nukleinsyrer, hvor 1,8 er optimalt. Lave verdier indikerer kontaminering ved absorbanse 280 eller mindre. For forholdet mellom absorbansen på bølgelengde 260 nm over 230 nm (A260/230) er 2,0-2,2 optimalt. Lave verdier indikerer kontaminering ved absorbanse 230 nm eller mindre. Kontaminering kan skyldes proteiner og fenoler ved rundt 280 nm, og hummussyrer og karbohydrater ved rundt 230 nm.

2. 5 ARTSSPESIFIKK PCR FOR UNDERSØKELSE AV POTENSIELLE VANDRINGSHINDRE

Prøvene tilhørende vandringshindrene ble analysert via qPCR med artsspesifikk TaqMan®-probe, med en reporter 6-FAM fluorescens i 5'-enden og en quencher i 3'-enden. Primerne (forward og reverse) ble designet ved hjelp av Primer-BLAST fra National Center for Biotechnology Information (NCBI) og programmet Primer Express 3.0.1 (tabell 2). Sekvensene er hentet fra cytochrome b-genet i mitokondriene, et område som viser liten variasjon mellom individer, men stor variasjon mellom arter. Det ble også designet primere for ørret på samme måte, da det var ønskelig å utføre en kontrolltest for hver lokalitet. Kontrollen kunne avdekke eventuelle feil i innhenting eller isolering av eDNA.

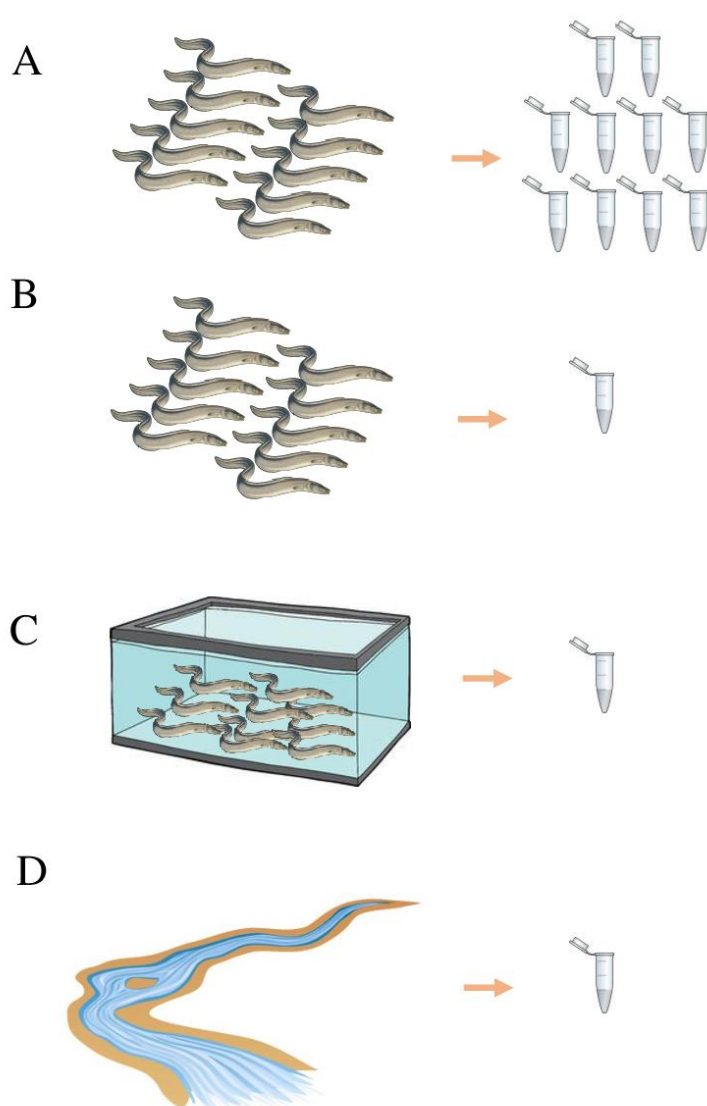
Tabell 2: Primere og prober for *A.anguilla* og *S.trutta*

Cytochrome b, <i>A. anguilla</i> :	Alcyt-F: 5'-CACCCATACTTCTCCTACAAAGACCTA-3' Alcyt-R: 5'-TCTGGGTCTCCAAGCAGGTT-3'
Probe, <i>A. anguilla</i>	5'- FAM-TTCATTATGATGCTCACC-MGBEQ-3'
Cytochrome b, <i>S. trutta</i> :	Stcytb-F: 5'-CCACCCCTACTTCTCATA-3' Stcytb-R: 5'-GGAGGTTGGGTGCGAATAGA-3'
Probe, <i>S.trutta</i>	5'- FAM-CTTGGATTCGTAGCTAT-MGBEQ -3'

Det ble laget 10 µM arbeidsløsning av primerne og proben. PCR-mix for påvisning av europeisk ål ble laget av arbeidsløsningene med en sluttkonsentrasjon på 1 x TaqMan Environmental Master Mix (Applied Biosystems), 0,9 µM Alcyt-F, 0,9 µM Alcyt-R og 0,55 µM probe.

PCR-mix for påvisning av ørret, ble laget av arbeidsløsningene med en sluttkonsentrasjon på 1 x TaqMan Environmental Master Mix, 0,9 µM Stcytb-F, 0,9 µM Stcytb-R og 0,55 µM probe. 15 µl PCR-mix ble tilsatt i en 0,1 ml Micro Fast Tube Strips (Thermo Fisher) etterfulgt av 5 µl eDNA, noe som gav et totalvolum på 20 µl per rør. qPCR ble utført med et StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystem). Prøvene ble kjørt med en temperaturprofil på 50 °C i 2 min, 95°C i 10 min, 96 °C i 15 sek, 57°C i 30 sek og 72°C i 30 sek, totalt 60 runder, med fluorescensdeteksjon etter hver runde. Alle prøvene ble testet i tripletter (tre av samme prøve). For hver kjøring ble det også kjørt en positiv kontroll fra vevsprøve (1 µl DNA + 4 µ H₂O) og negativ kontroll (4 µL H₂O) i tillegg til PCR-mix.

2. 6 AMPLIFISERING AV MILJØ-DNA FOR STUDIE AV INDIVIDFORSKJELLER



Oversikt over DNA-prøvene

For å undersøke om det var mulig å sekvensere DNA fra ulike individer hentet fra en vannprøve, ble forsøket utført på tre ulike typer prøver med varierende opphav. Den ene prøven var fra bekken med ukjent antall ål og haplotyper, mens de to andre fungerte som kontrollleksperimenter, med kjent antall ål og haplotyper. DNA fra vevsprøvene tilhørende de ti åleindividene ble isolert og sekvensert separat. Disse prøvene fungerte som referanser til de to kontrollprøvene i forsøket, og blir videre kalt referansesekvensene A-J (figur 12, A). Den første kontrollprøven bestod av en blanding av DNA isolert fra

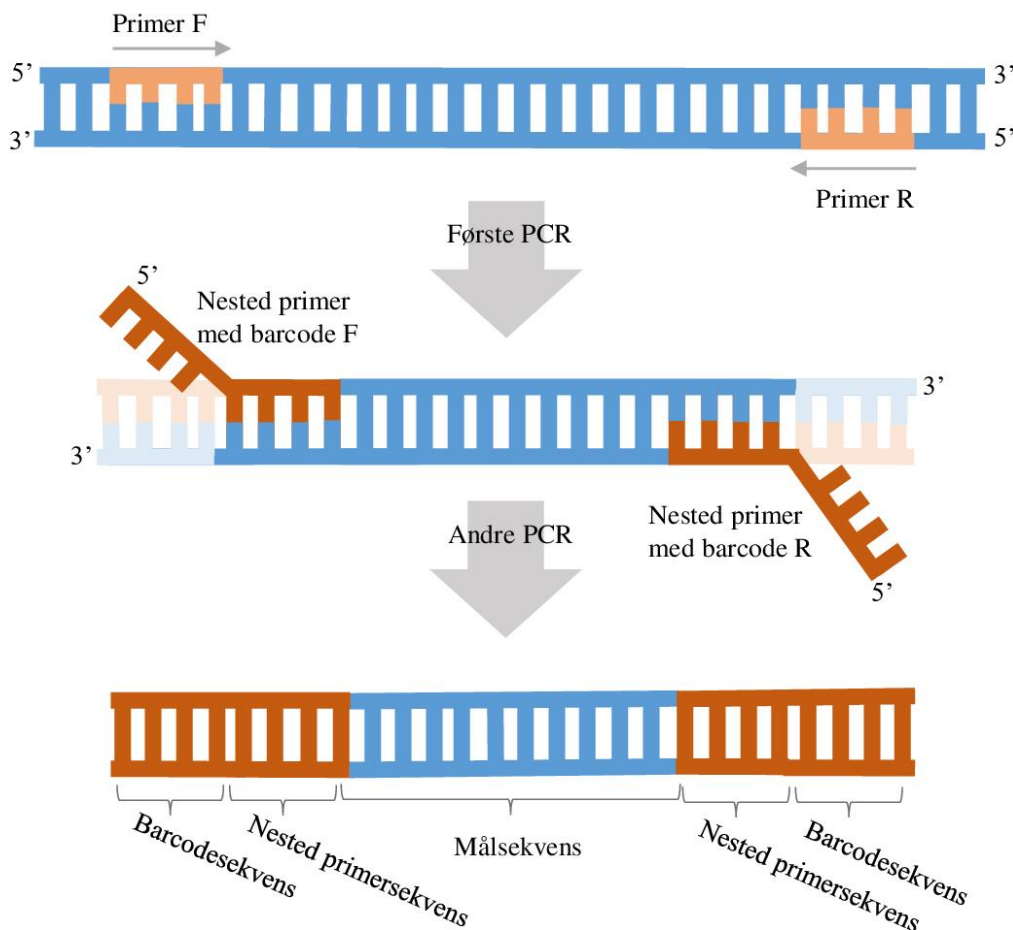
Figur 12: Prøver amplifisert og sekvensert. A) DNA fra 10 individer amplifisert og sekvensert separat. B) DNA fra 10 individer amplifisert og sekvensert i en samleprøve. C) eDNA fra kar med 10 individer, og D) eDNA fra bekk amplifisert og sekvensert. Figur: Silje Halvorsen

individentene. De 10 DNA-prøvene ble fortynnet til samme konsentrasjon, før 5 µl av hver prøve ble blandet til en prøve, videre kalt samleprøven (figur 12, B). Den andre kontrollprøven bestod av eDNA isolert fra vannprøven fra karet med 10 individer, videre omtalt som karprøven (figur 12, C). I samleprøven og karprøven kunne man altså vite at det burde være DNA fra referanseindividene A-J. Den tredje prøven, som var hovedmålet, bestod av eDNA isolert fra vannprøven hentet i bekken hvor ålen kom fra, videre kalt bekkeprøven (figur 12, D). I denne prøven var det eDNA fra et ukjent antall individer.

Primerdesign

For å kunne skille individer av europeisk ål var det avgjørende å designe primere som passet til en sekvens med variasjon mellom individer. Denne sekvensen ble et område i D-loop regionen i mitokondriet. Omlag 20 sekvenser fra *A. anguilla* ble sammenliknet via programmet Clustal Omega (European Bioinformatics Insitutte) for å finne primere som passet ulike individer i D-loop regionen, men som også inneholdt mutasjonene i regionen. Primerne (forward og reverse) ble designet ved hjelp av Primer-BLAST fra NCBI og programmet Primer Express 3.0.1. Primerne som passer til PCR-produktet etter en amplifisering, kalles nested primere.

Nestede primere med barcode



Figur 13: Etter første PCR-kjøring ble det kjørt ny PCR på PCR-produktet med barcodede nested primere. Disse primerne fester seg innenfor de originale primerne. Andre PCR-kjøring resulterer i PCR-produkt med barcodes, eller "merkelapper" på hver ende av målsekvensen, som er mulig å lese av etter sekvensering. Illustrasjon: Silje Halvorsen

Nested primere øker spesifisiteten, og gjør det mulig å amplifisere nok produkt av målsekvensen. Disse primerne kan også forhindre problemer med primer-dimerer. Primer-dimerer kan oppstå når sekvensen til primerne gjør at de kan hybridiserer til hverandre, og dermed danner korte fragmenter. Amplifikasjon av slike korte fragmenter favoriseres ofte i PCR istedenfor målsekvensen. I forsøket ble det brukt nested primere, men disse primerne hadde i tillegg en barcode (strekkode) heftet på i hver ende (figur 13). Barcode-primere er primere med ekstra baser, som fungerer som en merkelapp på PCR-produktet. Slike barcode-primere ble brukt for å merke samleprøven og karprøven (tabell 3). På den måten var det mulig å bestemme om DNA-sekvensene hadde opphav fra samleprøven, karprøven eller bekkeprøven, selv om alle prøvene ble blandet etter PCR-kjøringen, altså før nanoporesekvenseringen. DNA-sekvensene tilhørende bekken fikk ikke barcode-primere, da det ble vanskeligheter med amplifiseringen. Disse kunne imidlertid kjennes igjen en som en av de tre typene DNA-sekvenser uten barcode.

Tabell 3: Primere for sekvens i D-loop regionen for *A.anguilla*. Primerne vises i 5' til 3' retning.

Primere	AaD-F: CCTAGCGCTAAAAATCAGAGAGG AaD-R: TGGCAAAC TTTT TAGAAGGTGTCT
Nested primere	Aa-F: CGCTAAAAATCAGAGAGGAAAGATTT Aa-R: ACTTTT TAGAAGGTGTCTCACATGTAA
To ulike par nested primere med barcode. Barcode-sekvensen er streket under	AaBC01n-F: <u>AGAAGAAAGTTGTCGGTGTCTTTGTGACGCT</u> AAAAATCAGAGAGGAAAGATTT AaBC01n-R: <u>AGAAGAAAGTTGTCGGTGTCTTTGTGAACTTT</u> TTAGAAGGTGTCTCACATGTAA AaBC02n-F: <u>CATCGATTCCGTTTGTAGTCGTCTGTGCGCTA</u> AAAAATCAGAGAGGAAAGATTT AaBC02n-R: <u>CATCGATTCCGTTTGTAGTCGTCTGTGACTTTT</u> GAAGGTGTCTCACATGTAA

For å undersøke om primerne kunne passe til andre fiskearter, ble Aa-F og Aa-R også sammenliknet med mtDNA fra ulike arter (fra NCBI, Genbank) via Clustal Omega.

PCR-kjøring og gelelektroforese

I PCR-kjøringen var det viktig å bruke et enzym med lav feilrate, ettersom sekvensen til PCR-produktene skulle sammenliknes for å skille individer. Målsekvensen, altså et område i D-loop regionen, innehar mange mutasjoner og variasjoner, så det var derfor viktig å unngå mest mulig feil under PCR-kjøringen. En feil under PCR er for eksempel innsetting, utbytting eller fjerning av en nukleotide, som gjør at PCR-produktet ikke blir helt likt det originale DNA-templatet. Den totale feilraten for Phusion High-Fidelity enzym (ThermoFisher) er estimert til å være 0,11% (Vandenbroucke et al., 2011), og har dermed den laveste feilraten av enzymene undersøkt.

Det ble laget 10 μM arbeidsløsning av primerne. PCR-mix ble laget av 1 x Phusion Green Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix, 0,9 μM primer AaD-F, 0,9 μM primer AaD-R og 0,55 μM probe.

47,5 μl PCR-mix ble tilsatt i en 0,1 ml Micro Fast Tube Strips (Thermo Fisher) etterfulgt av 2,5 μl eDNA, noe som gav et totalvolum på 50 μl per rør. PCR ble utført med et Veriti 96 Well Thermal Cycler PCR System (Applied Biosystem). PCR-maskinen hadde en syklus på 98°C i 3 min, 98 °C i 10 s, 57°C i 30 s, 72°C i 30 s og 72°C i 5 min. Det ble kjørt 30 runder (hvor de tre inkuberingene på 10 s, 30 s og 30 s var med i syklusene) for genomisk DNA og 35 runder for eDNA.

Etter amplifisering ble referanseprøvene A-J sendt til Eurofins Scientific (Luxembourg, Tyskland) for Sangersekvensering. For samleprøven, karprøven og bekkeprøven ble det kjørt ny PCR på 1 μl av PCR-produktet med samme PCR-mix og temperaturprofil, men med nested primere. Samleprøven ble kjørt med nested-barcode primere AaBC01n-F og AaBC01n-R, og karprøven ble kjørt med AaBC02n-F og AaBC02n-R. Bekkeprøven ble kjørt med nested primere Aa-F og Aa-R, uten barcode, da barcoded primere viste seg å ikke fungere for denne prøven.

Etter amplifikasjon ble en liten del av PCR-produktet overført til 1% agarosegel med etidiumbromid. Gelelektroforese ble kjørt i ca. 30 min ved 90 V for å se at det ble dannet ønskede bånd.

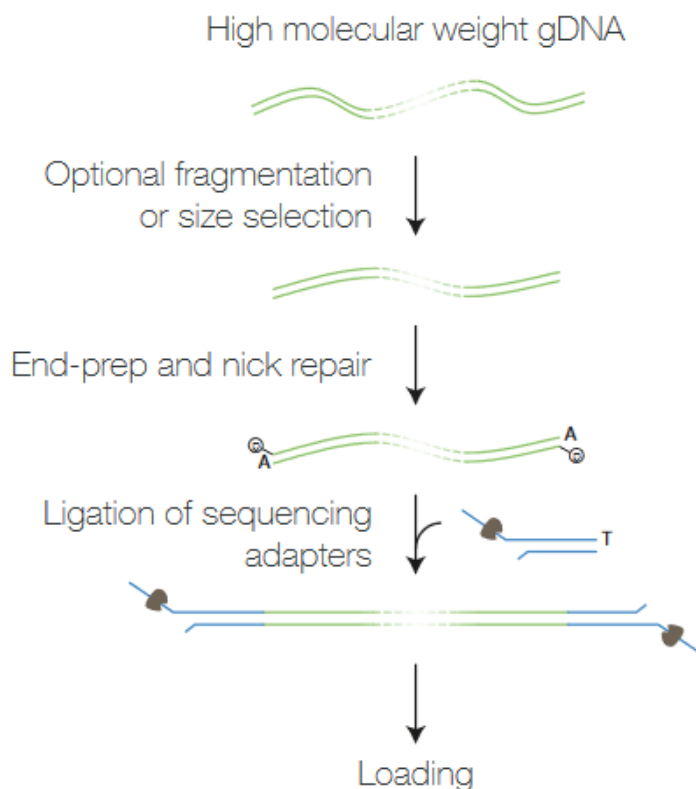
Rensing av PCR-produkt

PCR-produkt fra samleprøven, karprøven og bekkeprøven ble rensert før sekvensering med PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen). 4 volum Binding Buffer ble tilsatt til 1 volum av hvert PCR-produkt. Blandingene ble mikset, og overført til spinnkolonner. Prøvene ble sentrifugert ved 10.000 rpm i 1 min, før innholdet i samlerørene ble kastet. 650 µl vaskebuffer ble deretter tilsatt, før prøvene ble sentrifugert ved 10.000 rpm i 1 min igjen. Innholdet i samlerørene ble igjen kastet, og prøvene ble sentrifugert ved 13.000 rpm i 3 min. Kolonnene ble plassert i nye samlerør, før 50 µl elution buffer ble tilsatt. Prøvene ble inkubert i romtemperatur i 1 min, før sentrifugering ved 13.000 rpm i 1 min. DNA i samlerørene ble til slutt overført til nye eppendorfrør og oppbevart på – 20 °C.

2.7 SEKVENSERING AV PCR-PRODUKT FOR STUDIE AV INDIVIDFORSKJELLER

Nanoporesekvensering av PCR-produkt

Rensert PCR-produkt fra samleprøven, karprøven og bekkeprøven skulle videre bli sekvensert i en samlet prøve via Oxford Nanopore Technologies (ONT) MinION. Konsentrasjon av DNA til hver av de tre prøvene ble først målt via Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen). Deretter ble DNA fra hver prøve blandet til en felles prøve på 50 fmol, der hver prøve hadde lik DNA-konsentrasjon. Ligation Sequencing Kit 1D (Oxford Nanopore Technologies) ble brukt i forberedelse av prøvene før sekvensering.



Figur 14: Oversikt over forberedelsen av DNA-prøvene før sekvensering. Figur: Nanoporetech

DNA-reparasjon og endepreparering; Første trinn i forberedelsen var DNA-reparasjon som sørget for reparasjon av nick (hakk) i DNA-tråden (figur 14). I samme trinn ble endene preparert for at hvert molekyl skulle være uten overheng, og inneholde 5' fosfat- og 3' hydroxyl-grupper. 3'-enden fikk også en dA-hale, som skulle forhindre dannelse av lange DNA-molekyler med mange kopier av samme DNA-sekvens lenket sammen, og klargjorde for liggering av adaptere.

47 µl av DNA-prøven ble blandet med 1 µl DNA CS, 3,5 µl NEBNest FFPE DNA Repairbuffer, 2 µl NEBNext FFPE DNA Repair Mix, 3,5 µl Ultra II End-prep reaction buffer og 3 µl Ultra II End-prep enzyme mix (alle fra New England Biolabs (NEB)) til totalt 60 µl i en PCR-rørstrips. Prøven ble inkubert ved 20 °C i 5 min, og deretter 65°C i 5 min, i en PCR-maskin. DNA-prøven ble overført til et nytt eppendorfrør, før 60 µl AMPure XP beads (Beckman Coulter) (magnetiske kuler) ble tilsatt. Prøven ble så inkubert i 5 min ved romtemperatur, men holdt i bevegelse (hula-bevegelse). Deretter ble prøven sentrifugert og plassert i en beholder med en magnet som trakk partiklene til den ene siden av røret, slik at det ble dannet en pellet. Supernatanten ble pipettert opp og kastet. 200 µl 70% etanol i nukleasefritt vann ble deretter tilsatt røret for vasking, uten å ødelegge pelleten. Etanolen ble så fjernet, før vasketrinnet ble gjentatt enda en gang. Pelleten ble sentrifugert ned, og satt tilbake på magneten for å tørke i 30 s uten lokk. Deretter ble den resuspendert i 61 µl nukleasefritt vann og inkubert i 2 min ved romtemperatur. Røret ble stående ved magneten til supernatanten ble klar, før supernatanten ble overført til et nytt eppendorfrør.

Adapter-liggering og rensing;

I andre trinn ble adaptere ligert, og prøven renses for å fjerne overflødige nukleotider og enzymer. Adaptere liggeres på hver ende av det dobbeltrådede DNA; en Y-adapter (Y-lignende struktur) i 5'-enden, og en såkalt HP-motor-adapter i 3'-enden. Når DNA-molekylene går gjennom nanoporene under sekvensering, er Y-adapteren første del av molekylet som går igjennom.

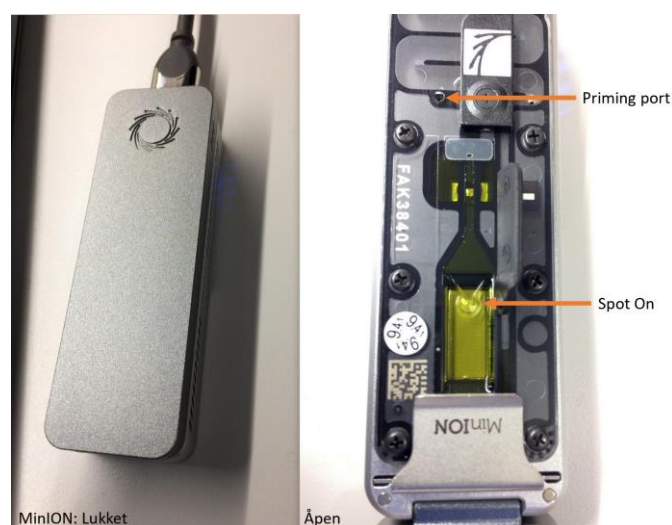
60 µl DNA fra forrige steg ble blandet med 25 µl Ligeringsbuffer, 10 µl NEB-Next Quick T4 DNA Ligase og 5 µl Adapter Mix (AMX) (fra NEB) til totalt 100 µl. Prøven ble inkubert i 10 min ved romtemperatur. 40 µl AMPure XP beads ble tilsatt, før prøven ble inkubert i 5 min ved romtemperatur ved å holde prøven i bevegelse. Prøven ble sentrifugert, deretter plassert ved en magnet til det ble dannet en pellet, før supernatanten ble pipettert opp og kastet. 250 µl Short

Fragment Buffer (SFB, fra NEB) ble tilsatt, og prøven ble plassert på magneten til pellet igjen ble dannet. Supernatanten ble fjernet, før dette trinnet fra LFB-buffer ble gjentatt en gang til. Prøven ble så sentrifugert og plassert ved magneten for tørking i 30 s. Pelleten ble deretter resuspendert i 15 μ l Elution Buffer (fra NEB), og inkubert i 10 min på romtemperatur. Prøven ble til slutt plassert ved magneten til væsken ble klar. Deretter ble 15 μ l av supernatanten overført til et nytt eppendorfrør.

Klargjøring av flow-celle;

SpotON flow-cellen ble klargjort ved at luftbobler ble fjernet og buffer tilsatt, før DNA ble overført. Lokket på nanoporesekvenseringskomponenten ble åpnet, samt lokket som dekket åpningen for buffer. Komponentene ble sjekket for luftbobler. En P1000 pipette ble innstilt på 200 μ l og plassert over åpningen ‘priming port’ (figur 15). Deretter ble hjulet stilt til 220 μ l, slik at noe buffer ble trukket opp av komponenten.

30 μ l Flush Tether (FLT, fra NEB) ble tilsatt i en beholder med Flush Buffer (FLB, fra NEB) og mikset via pipettering. 800 μ l av denne blandingen ble tilsatt flow-cellen i ‘priming port’ via sakte pipettering. Luken ble lukket. 37,5 μ l Sequencing Buffer (SQB, fra NEB), 25,5 μ l Loading Beads (LB) og 12 μ l av DNA-biblioteket ble blandet via pipettering, til totalt 75 μ l. Luken ‘SpotON’ ble åpnet før hele blandingen ble overført til flow-cellen ved å dryppe dråpe for dråpe over åpningen. Luken ble lukket. MinION-flow-cellen var koblet til en Laptop i USB3-inngangen. Sekvenseringen ble deretter startet i programmet MinKNOW ved å følge instruksjonene.



Figur 15: MinION komponent brukt i Nanoporesekvensering. Til venstre er komponenten lukket, til høyre er den åpnet. Lukene ‘Priming port’ for buffer og ‘SpotOn’ for DNA er vist med piler. Illustrasjon: Silje Halvorsen

2. 8 BEHANDLING AV SEKVENSDATA

Individsekvenser A-J fra Sangersekvenseringen

Hver enkelt forward og reverse-sekvens tilhørende individ A-J fra Sangersekvenseringen ble satt sammen til dobbelttrådede sekvenser via programmet Bio Edit Sequence Alignment Editor. Deretter ble de ti sekvensene sammenlignet med hverandre via Bio Edit og Clustal Omega. I tillegg ble sekvensene A-J sammenliknet med 186 ulike *A. anguilla* mitokondriesekvenser fra NCBI's database av Morten Mattingdal (Universitetet i Agder) via programmet Porechop.

Sortering av sekvenser fra samleprøven, karprøven og bekkeprøven

Behandling av data fra Nanoporesekvenseringen ble i helhet utført av Mattingdal, som forklarte prosedyren i ettertid. Programmene Porechop, BLAST og Minimap ble brukt. Data fra sekvenseringen ble først sortert i tre kategorier via Porechop; samleprøven (barcode 1), karprøven (barcode 2) og bekkeprøven (ingen barcode). Først ble sekvensene for samle- og karprøven sortert ut. Disse sekvensene måtte inneholde både forward- og reverse-barcoden (to barcoder), tilhørende enten barcode 1 eller 2, samt ha minimum 85 % sekvenslikhet med barcodene. Etter å ha sortert ut sekvensene for kar- og samleprøven, var det en del sekvenser igjen. I neste sortering ble sekvenslikheten til barcodene senket til maksimum 60% sekvenslikhet. Da ville sekvensene inneha nested primere, men ingen barcode, og disse kunne plasseres i kategorien for bekk.

Minimap ble brukt for å undersøke om referansesekvensene A-J kunne påvises i samle- og karprøven. Sekvenstreffet ble satt til å ha 99,9% sikkerhet (Mapping quality score > 30). Mapping quality score kvantifiserer muligheten for at en avlesning er feilplassert.

BLAST ble brukt for å undersøke om haplotyper i NCBI's genbank, samt referansesekvensene, kunne påvises i bekkeprøven. Sekvenstreffet ble satt til å ha en e-verdi på > 1e-99 (1×10^{-99}). E-verdi uttrykker et estimat av hvor mange ganger en kan forvente et resultat, minst like ekstremt som det observerte, oppstår ved tilfeldighet. Jo lavere e-verdi, jo høyere signifikant treff. For at en sekvens skulle plasseres under en haplotype, måtte sekvenslikheten være > 95% til haplotypen.

3 RESULTATER

3. 1 ANALYSE AV PRØVER OPPSTRØMS OG NEDSTRØMS FOR POTENSIELLE VANDRINGSHINDRE

qPCR og spektrofotometer

Tabell 4: Artsspesifikk qPCR-analyse for eDNA isolert fra vannprøver hentet oppstrøms og nedstrøms for potensielle vandringshindre, som utgjør 26 ulike lokaliteter. Med nedstrøms menes nedenfor hinderet (nærmest havet), og oppstrøms ovenfor hinderet. *A.anguilla* og *S.trutta* er undersøkt. Hver prøve er analysert tre ganger (triplett), hvor "+" indikerer positivt utslag, mens "-" indikerer at utslaget ikke ble positivt. Ct-gjennomsnitt gjelder for tripletten av eDNA-prøvene tilhørende *A.anguilla*. eDNA-konsentrasjon (ng/µl) og absorbanse 260/280 og 260/230 nm er også målt vha spektrofotometer (NanoDrop One).

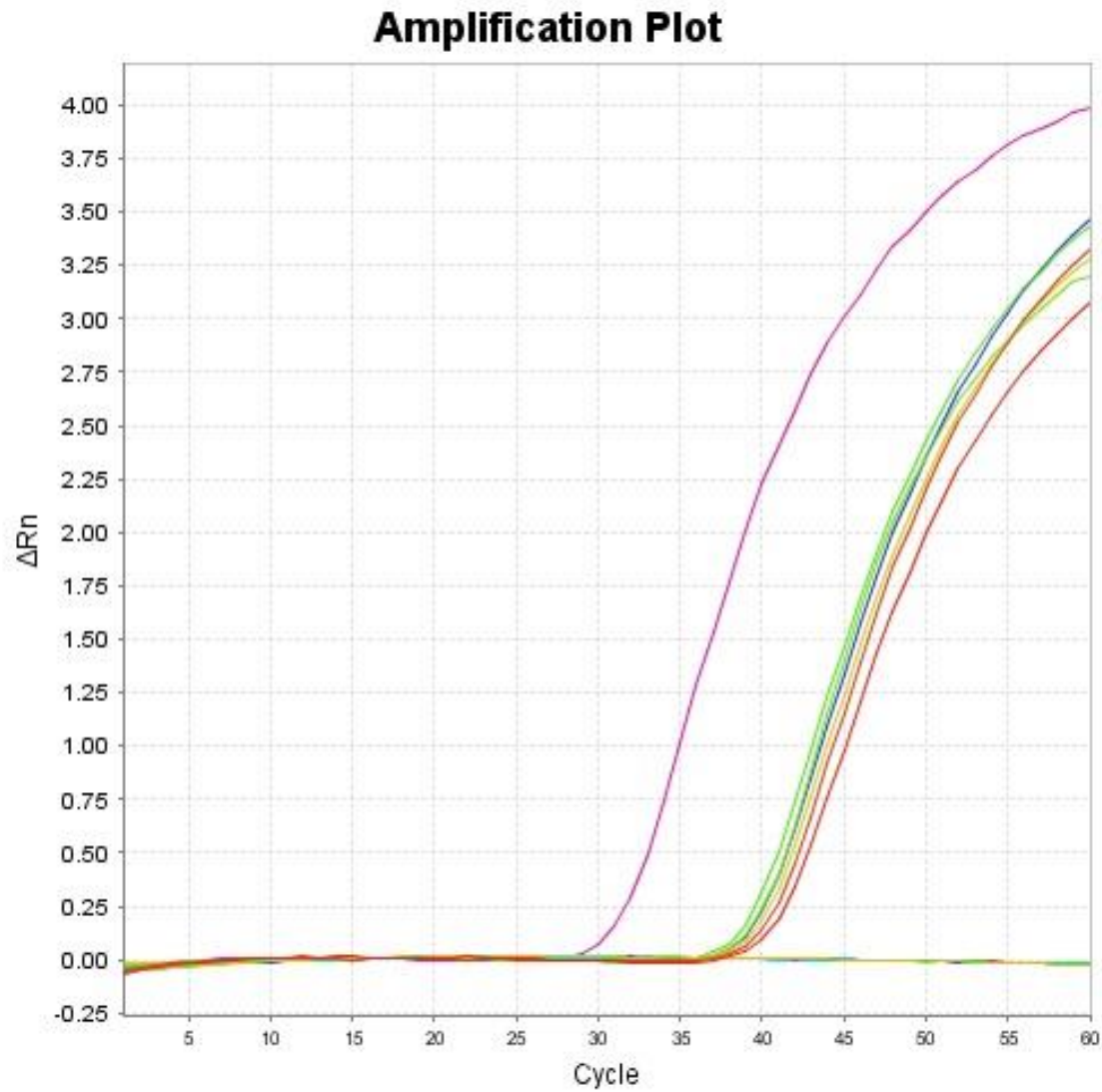
Lokalitet	PCR tripplett <i>A.anguilla</i>	C _t – gj.snitt <i>A.anguilla</i>	Ng/ul	A260/A280	A260/A230	PCR, tripplett <i>S. trutta</i>
1 nedstrøms	+++	36	122,8	1,47	0,67	+++
1 oppstrøms	+++	37	134,5	1,48	0,70	+++
2 nedstrøms	---	0	43,7	1,66	0,90	---
2 oppstrøms	---	0	43,4	1,66	0,86	---
3 nedstrøms	+++	36	45,3	1,39	0,60	+++
3 oppstrøms	+++	34	47,4	1,42	0,61	+++
4 nedstrøms	+++	38	25,8	1,55	0,76	+++
4 oppstrøms	+++	38	63,6	1,44	0,75	+++
5 nedstrøms	+++	36	92,4	1,93	1,45	+++
5 oppstrøms	+++	37	73,5	1,90	1,49	+++
6 nedstrøms	+++	34	19,6	1,70	1,42	+++
6 oppstrøms	+++	33	29,1	1,69	1,01	+++
7 nedstrøms	+++	37	13,8	1,75	0,70	+++
7 oppstrøms	+++	38	24,2	1,79	0,86	+++
8 nedstrøms	++-	40	47,3	1,52	0,57	+++
8 oppstrøms	++-	46	60,9	1,43	0,62	+++
9 nedstrøms	+++	38	38,2	1,54	0,56	+++
9 oppstrøms	+++	37	88,0	1,46	0,66	+++
10 nedstrøms	++-	39	42,0	1,44	0,58	+++
10 oppstrøms	++-	41	49,2	1,39	0,59	+++
11 nedstrøms	+++	40	8,1	1,85	0,95	+++
11 oppstrøms	+++	41	36,1	1,81	1,07	+++
12 nedstrøms	++-	41	27,9	1,50	0,61	+++
12 oppstrøms	+++	39	15,7	1,67	0,64	+++
13 nedstrøms	---	0	49,7	1,47	0,59	+++
13 oppstrøms	---	0	29,5	1,57	0,46	+++
14 nedstrøms	+++	40	3,1	1,89	0,33	++-
14 oppstrøms	+++	39	4,8	1,64	0,21	+++
15 nedstrøms	+-	40	27,0	1,97	1,26	+++
15 oppstrøms	---	0	36,2	1,91	1,42	+++
16 nedstrøms	+++	39	11,0	1,70	0,57	+++
16 oppstrøms	+++	38	86,9	1,49	0,56	+++

17 nedstrøms	- - -	0	14,6	1,90	0,94	+ + +
17 oppstrøms	- - -	0	31,7	1,69	0,66	+ + +
18 nedstrøms	+ + +	37	9,3	1,96	0,88	+ + +
18 oppstrøms	+ + +	38	24,5	1,68	0,80	+ + +
19 nedstrøms	+ + +	38	11,3	1,85	1,13	+ + +
19 oppstrøms	+ + +	36	16,5	1,69	0,50	+ + +
20 nedstrøms	+ + +	37	5,7	1,59	0,58	+ + +
20 oppstrøms	+ + -	41	13,2	1,60	0,54	+ + +
21 nedstrøms	+ + +	39	12,8	1,77	0,93	+ + +
21 oppstrøms	+ + +	38	46,4	1,83	1,10	+ + +
22 nedstrøms	+ + +	38	76,7	1,66	0,93	+ + +
22 oppstrøms	+ + +	37	147,2	1,50	0,75	+ + +
23 nedstrøms	+ + +	41	18,8	1,71	0,91	+ + +
23 oppstrøms	+ + +	37	37,7	1,57	0,67	+ + +
24 nedstrøms	+ + +	40	95,7	1,43	0,62	+ + +
24 oppstrøms	+ + +	42	12,1	1,67	0,69	+ + +
25 nedstrøms	+ - -	43	44,4	1,46	0,63	+ + +
25 oppstrøms	+ + -	41	12,4	1,64	0,81	+ + +
26 nedstrøms	+ + +	40	33,6	1,45	0,65	+ + +
26 oppstrøms	+ + +	37	13,6	1,84	0,46	+ + +

Europeisk ål kunne påvises oppstrøms og nedstrøms ved 22 av 26 lokaliteter (tabell 4). Ved lokalitet 2, 13 og 17 kunne ikke ål påvises. Lokalitet 15 tester positivt for ål nedstrøms, men ikke oppstrøms. Det er kun en av prøvene i tripletten som tester positivt, og utslaget kommer sent i PCR-kjøringen, med et Ct-gjennomsnitt på 40. Ørret kunne påvises på alle lokalitetene unntatt lokalitet 2, hvor heller ikke ål kunne påvises.

Gjennomsnittlig Ct-verdi for prøvene med positivt utslag lå på mellom 33 og 46, mens konsentrasjonen varierte fra 3,1-147,2 ng/µl for alle prøvene.

Absorbanse 260/280 nm lå på mellom 1,39-1,96, mens absorbanse 260/230 nm lå på mellom 0,21-1,49.



Figur 16: Eksempel på resultat av qPCR-kjøring. Rosa kurve viser positiv kontroll (genomisk DNA fra *A.anguilla*). Kurvene i regnbuen viser triplett av lokalitet 12, 14, og 15 nedstrøms med positivt utslag, med en Ct-verdi på rundt 37. Flat linje viser triplett av lokalitet 13 uten positivt utslag, samt en negativ kontroll (dobbel destillert vann).

Positive utslag vises som en kurve på qPCR-maskinen (figur 16).

3.2 DATA FOR UNDERSØKELSE AV INDIVIDFORSKJELLER

Analyse fra spektrofotometer

Tabell 5: Konsentrasjon (ng/μl) og absorbanse 260/280 nm og 260/230 nm av DNA fra individ A-J og samleprøven, samt eDNA fra karprøven og bekkeprøven målt vha spektrofotometer (NanodropOne).

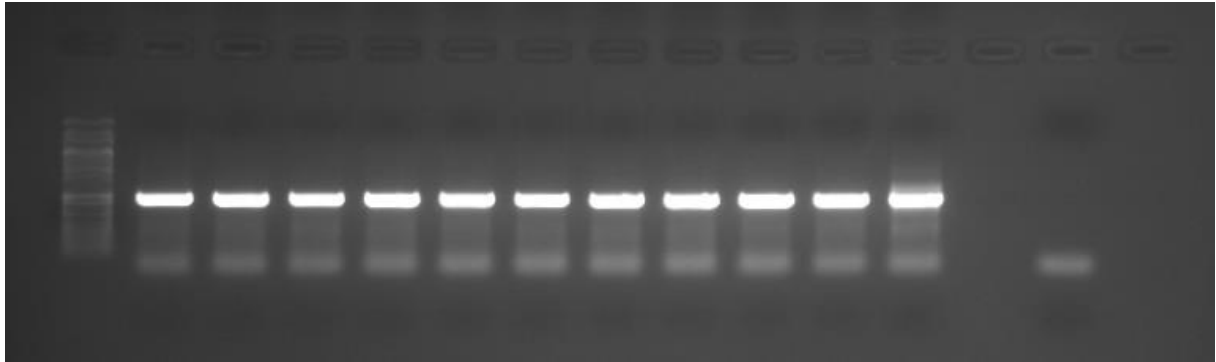
Prøve	Ng/μl	Ng/μl etter fortynning	260/280	260/230
Individ A	153,1	65,0	1,98	2,32
Individ B	266,9	65,0	2,03	2,29
Individ C	94,9	65,0	2,03	2,26
Individ D	172,9	65,0	2,01	2,35
Individ E	105,7	65,0	2,03	2,24
Individ F	68,2	65,0	2,08	2,73
Individ G	72,9	65,0	2,02	2,51
Individ H	133,3	65,0	2,05	2,21
Individ I	178,0	65,0	2,04	2,15
Individ J	171,8	65,0	2,02	2,08
Samleprøven	65,0		2,03	2,31
Karprøven	65,1		1,73	0,92
Bekkeprøven	45,5		1,56	0,73

Genomisk DNA fra åleindivid A-J hadde en konsentrasjon på mellom 68,2 og 266,9 ng/μl før fortynning til 65,0 ng/μl (tabell 5). Absorbanse 260/280 nm for disse prøvene lå på mellom 1,98 og 2,08. Absorbanse 260/230 nm lå på mellom 2,08 og 2,73.

eDNA fra karprøven og bekkeprøven hadde en konsentrasjon på henholdsvis 65,1 og 45,5 ng/μl. 260/280-verdiene lå på 1,73 og 1,56, mens 260/230-verdiene lå på 0,92 og 0,73.

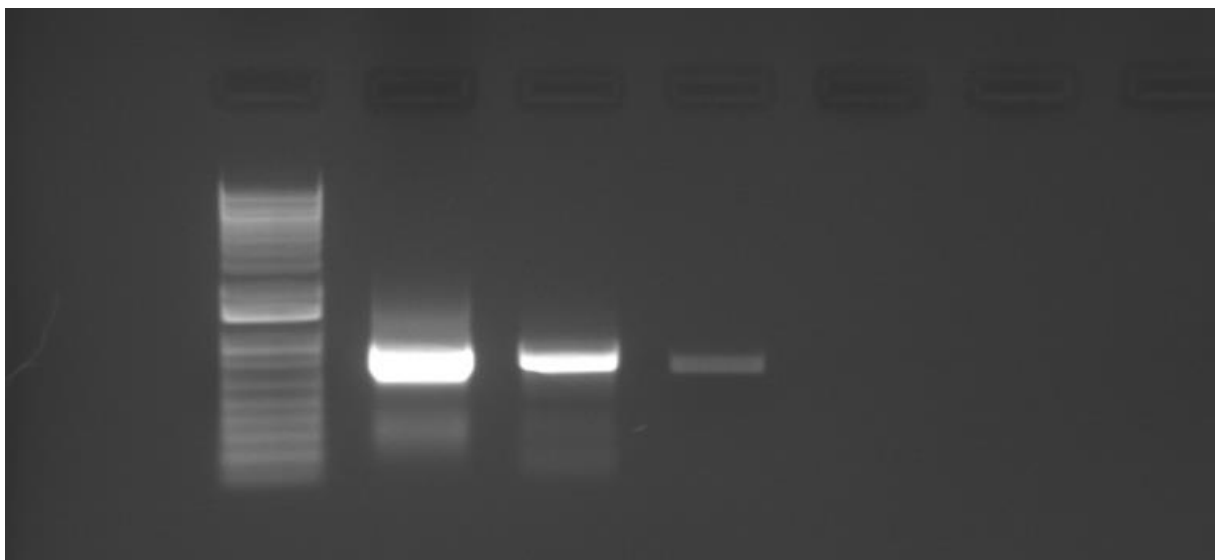
Gelelektroforese

Resultatet av gelelektroforesen for PCR-produktene for enkeltindividene A-J, viser at det ble dannet bånd som samsvarer med lengde på målsekvensen (ca.700 bp) i D-loop regionen (figur 17). Det ble også dannet noen svake bånd som kan tyde på primer-dimerer. Negativ kontroll ble negativ.



Figur 17: Agarosegel med bånd fra PCR-produkt av målsekvens i D-loop region 10 individer av *A.anguilla*. Første brønn er størrelsesstandard, etterfulgt av individene A-J, deretter et mellomrom før negativ kontroll.

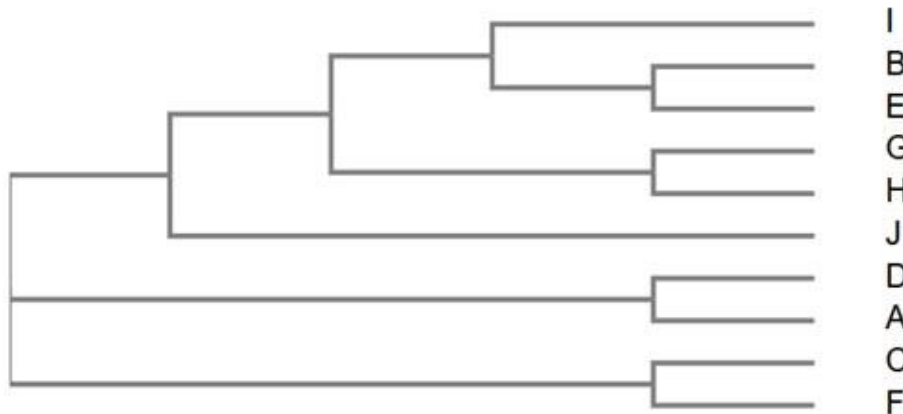
Gelelektroforesen av nested PCR-produkt tilhørende samleprøven, karprøven og bekkeprøven viser også bånd som samsvarer med målsekvensen (figur 18). Båndene er av ulik styrke, hvor samleprøven er sterkest, etterfulgt av karprøven og bekkeprøve. Negativ kontroll ble negativ.



Figur 18: Agarosegel med bånd fra PCR-produkt av målsekvens i D-loop region for samleprøven og karprøven, som er genomisk DNA, og bekkeprøven som er eDNA. Første brønn er størrelsesstandard, etterfulgt samleprøven, karprøven, bekkeprøven og negativ kontroll.

Haplotyper for individ A-J

Resultatet av Sangersekvenseringen for individ A-J er ti ulike haplotyper av europeisk ål (figur 19). Sammenligning av sekvensene fra de ti individene finnes i vedlegg (s. 97).



Figur 19: Sammenligning av individ A-J illustrert som fylogenetisk tre vha Clustal Omega. Treet viser 10 haplotyper.

Tabell 6: Sammenlikning av sekvenser fra individ A-J mot haplotyper (fra 186 mtDNA-sekvenser fra *A. anguilla*) hentet fra NCBI GenBank. Haplotypene i genbank har referansenavn, for eksempel "KJ564262.1".

Individ	Haplotype (NCBI)	Treff, prosent
A	KJ564262.1	99,713
B	KJ564238.1	98,990
C	KJ564226.2	98,854
D	KJ564219.1	99,001
E	KJ564238.1	99,297
F	KJ564255.2	99,571
G	KJ564257.1	96,681
H	KJ564257.1	97,399
I	KJ564246.1	99,273
J	KJ564224.1	99,855

Sekvens A, B, C, D, E, F, I og J viser over 98,8 % treff med sekvenser publisert i NCBI's genbank for *A. anguilla* (tabell 6). Sekvens G og H har begge treff på haplotype KJ564257.1 med henholdsvis 96,681 % og 97,399 % treff.

Treff med haplotypene A-J i samleprøven og karprøven

Tabell 7: Antall treff for samleprøven og karprøven med hver av referansesekvensene A-J via programmet Minimap. Kriterier: to intakte barcodes og minimum 85% sekvenslikhet med disse. Mapping quality > 30 (99,9% sikkerhet).

Referansesekvensene	Haplotype (NCBI)	Minimap quality > 30	
		Samleprøve Barcode 1	Karprøve Barcode 2
A	KJ564262.1	1083	937
B	KJ564238.1	145	416
C	KJ564226.1	101	270
D	KJ564219.1	764	241
E	KJ564238.1	219	293
F	KJ564255.1	202	2339
G	KJ564257.1	71	379
H	KJ564257.1	1281	2624
I	KJ564246.1	883	707
J	KJ564224.1	257	3214
	Totalt	5006/15852	11420/17446

Alle referansesekvensene, eller haplotypene A-J, finnes i samleprøven og i karprøven i varierende grad (tabell 7). Programmet Minimap finner referansesekvensene i 5006 av 15852 sekvenser i samleprøven, og i 11420 av 17446 sekvenser i karprøven. Sekvensene som blir til overs, og ikke får treff blant haplotypene A-J har under 99,9% sikkerhet.

Treff med haplotyper i bekkeprøven

Sekvensene uten barcoder ble kjørt i programmet BLAST mot haplotypene A-J, samt alle kjente mitokondrielle genom.

Tabell 8: Treff i BLAST på haplotyper tilhørende *A. anguilla* fra NCBI's GenBank med eDNA-sekvensene fra vannprøve tatt i bekk. Kriterier: maksimum 60% likhet med barcoded primere, og minimum 95% likhet med haplotyper i GenBank. E-verdi: > e-99

	Haplotype (NCBI)	BLAST Alle mtDNA-genom	BLAST Referansesekvenser
	KJ564256.1	170649	
	AJ225979.1	9405	
	AJ225970.1	2280	
	KJ564237.1	561	
	AJ225994.1	455	
	AJ225954.1	289	
	AJ225955.1	274	
A	KJ564262.1		187
B	KJ564238.1		1525
C	KJ564226.1		72
D	KJ564219.1		108
E	KJ564238.1		7309
F	KJ564255.1		572
G	KJ564257.1		52
H	KJ564257.1		1366
I	KJ564246.1		2954
J	KJ564224.1		293
	Totalt	186325/1769485	14438/1769485

I bekkeprøven ble det funnet treff på til sammen syv ulike haplotyper (tabell 8). Tre av disse haplotypene har over tusen treff ($n > 1000$). Det er også funnet treff på fire andre haplotyper ($n < 1000$), men som ikke anses som helt sikre treff. Til sammen har 186325 av 1769485 sekvenser treff med disse haplotypene i varierende grad.

En haplotype dominerer fullstendig; KJ564256.1. Av alle leste sekvenser uten barcode har ca. 10 % over 95 % identitet til denne haplotypen.

I tillegg har 14438/1769485 sekvenser treff med referansesekvensene A-J i kategorien for bekk.

Primertreff mot andre fiskearter

Tabell 9: Nested primer Aa-F og Aa-R sammenlignet med mtDNA fra arter en kan forvente å finne i bekken hvor ålen ble fanget. Sammenligningen ble utført vha Clustal Omega, hvor artssekvenser ble hentet i NCBI's GenBank. Grå felt markerer nukleotider som samsvarer mellom primersekvens og artssekvens.

Ørret <i>Salmo trutta</i> GenBank: LC137015.1	Aa-F <i>S. trutta</i>	CGCTAAAAATCAGAGAGGAAAGATTT TTCGGTTAAAGTCCGAG
	Aa-R <i>S. trutta</i>	ACTTTTTAGAAAGGTGTCTCACATGTAA CTAGGGTCTCTCGTATAACC
Røye <i>Salvelinus alpinus</i> Genbank: MF621743.1	Aa-F <i>S. alpinus</i>	CGCTAAAAATCAGAGAGGAAAGATTT CTCCCTAGTGCTCAGAGAGAGGAGATTTTA
	Aa-R <i>S. alpinus</i>	ACTTTTTAGAAAGGTGTCTCACATGTAA ACACTTTGTAGACGTCGTATGA
Elveniøye <i>Lampreta fluviatilis</i> Genbank: FP929026.1	Aa-F <i>L. fluv.</i>	CGCTAAAAATCAGAGAGGAAAGATTT AGAGGGGTAAGATTTG
	Aa-R <i>L. fluv.</i>	ACTTTTTAGAAAGGTGTCTCACATGTAA AAGTTTTTTTCGATAAAGTCACGCAGGTAATA
Ørekyte <i>Phoxinus phoxinus</i> Genbank: AB671170.1	Aa-F <i>P. phoxinus</i>	CGCTAAAAATCAGAGAGGAAAGATTT AGCGTTAAAGCTCGGACAGAAAGAAATTTA
	Aa-R <i>P. phoxinus</i>	ACTTTTTAGAAAGGTGTCTCACATGTAA AATAATAGAAGACGTCTCACTAGAAAGC
Sik <i>Coregonus lavaretus</i> Genbank: AB034824.1	Aa-F <i>C. lavaretus</i>	CGCTAAAAATCAGAGAGGAAAGATTT CTCCCTAGTGCTCAGAGAGAGGAGATTTTA
	Aa-R <i>C. lavaretus</i>	ACTTTTTAGAAAGGTGTCTCACATGTAA AAGACGCGGCCTCACCTGTAATA
Krøkle <i>Osmerus eperlanus</i> Genbank: MH238073.1	Aa-F <i>O. eperlanus</i>	CGCTAAAAATCAGAGAGGAAAGATTT AGCGTTAAAGCTCAGACAGCACAGACCTCT
	Aa-R <i>O. eperlanus</i>	ACTTTTTAGAAAGGTGTCTCACATGTAA ACTTTGTAGACGTCGTCTGACTTT
Abbor <i>Perca fluviatilis</i> Genbank: KM410088.1	Aa-F <i>P. fluv.</i>	CGCTAAAAATCAGAGAGGAAAGATTT CAGTGAAGCCTAAAAAAGCAGAGATTTTA
	Aa-R <i>P. fluv.</i>	ACTTTTTAGAAAGGTGTCTCACATGTAA ACACTTTGTAGACGTAGTCTGACTA

Nested primere Aa-F og Aa-R viser ingen optimale treff med mtDNA fra fiskeartene ørret, røye, elveniøye, ørekyte, sik, krøkle eller abbor (tabell 9).

4 DISKUSJON

4.1 POTENSIELLE VANDRINGSHINDRE

Positivt utslag oppstrøms og nedstrøms for antatte hindre

Ved de fleste lokalitetene (22 av 26) kunne *A. anguilla* påvises nedstrøms og oppstrøms for de potensielle vandringshindrene. Dette betyr trolig at majoriteten av konstruksjonene ikke utgjør vandringshindre.

Likevel kan det være flere forklaringer på hvorfor så mange av lokalitetene testet positivt oppstrøms og nedstrøms. For det første er det mulig at ål har passert hindringen via alternative ruter, som via nærliggende bekker, gress eller fuktig substrat. Ved for eksempel lokalitet 12, Urevann, er den antatte hindringen en fiske-trapp beregnet på hoppende fisk, etterfulgt av flere høye terskler, noe som vil være vanskelig for ål å passere. Lokalitet 14, Blegehåla, og 16, Prestebekken byr også på utfordringer, da bekken renner gjennom en kulvert med overheng nedstrøms, etterfulgt av en bratt steinrøys. Ved disse lokalitetene kan en ikke se bort ifra at ål har passert via alternative ruter, som er mindre utfordrende enn høye terskler og kulverter med overheng. Perioder med flom kan skape små sidebækker, som også muliggjør vandring rundt hinderet. Det kan derfor være mulig å få positivt utslag oppstrøms og nedstrøms for en hindring, uten at ål har passert gjennom hindringen.

En annen forklaring kan være at konstruksjonen er dannet etter oppvandring. Etter at ål har vandret opp i bekken og stasjonært seg i en innsjø, kan den leve i opptil rundt 20 år, og hindringer kan ha blitt etablert i ettertid. Ål kan dermed avgir eDNA som føres nedover bekken, og gi positivt utslag. Det er få konstruksjoner hvor informasjon om etableringsår er tilgjengelig, men et eksempel er lokalitet 3, Sævelibekken, hvor kulverten er bygd i 2011. Det er derfor mulig at ål har vandret opp før dannelsen av kulverten, og avgir DNA til miljøet nedenfor.

Lignende resultater kan også vise seg dersom noen individer har vandret gjennom kulverten under høy vannstand. Konstruksjoner kan potensielt være vandringshindre under perioder med normal eller lav vannstand, mens de er mulig å passere i perioder med mye vann. Dermed kan de få individene som passerte under flommen gi inntrykk av at konstruksjonen ikke hindrer vandringshindre.

En siste teori kan være at rovdyr har flyttet ål over hindringer, men det er nok lite sannsynlig da både prøvene oppstrøms og nedstrøms er klart positive. På tross av at det finnes alternative forklaringer for de positive prøvene, kan man anta at de fleste åleindividene har passert hindringen i bekken.

Positivt utslag nedstrøms, men ikke oppstrøms. Vandringshinder?

Det finnes ett eksempel hvor ål ble påvist nedstrøms, men ikke oppstrøms, for en konstruksjon; lokalitet 15, Østerbekk. Denne kulverten kan utgjøre et vandringshinder, men det er flere detaljer som peker mot andre forklaringer. Farbarheten er kategorisert som "god" av Statens vegvesen ved denne kulverten, og egen observasjon vil også bedømme kulverten til mulig å passere (se bilde i vedlegg, s. 85). Det er mest sannsynlig lite ål i dette området, noe som indikeres med få positive utslagene i tripletten (kun en av tre positive prøver nedstrøms), og den noe høye Ct-verdien i PCR-kjøringen. Høy Ct-verdi betyr at utslaget kom sent i kjøringen, og at det dermed var lite DNA i prøven. Vannstanden var svært lav ved prøvetakings-tidspunktet, noe som kan ha påvirket mengden eller størrelsen på ål som var i stand til å bevege seg i dette området. Færre eller mindre individer vil avgi mindre eDNA, slik nedstrømsprøven indikerer.

Verken positivt utslag oppstrøms eller nedstrøms

Ved lokalitet 2, 13 og 17 kan ikke ål påvises oppstrøms eller nedstrøms. Alle tre lokalitetene er bestemt til farbarhet "lite god" av Statens vegvesen i 2013, men så lenge det ikke er positivt utslag nedstrøms, kan ikke resultatene si noe om hvorvidt det er mulig for ål å passere. Det er derfor andre grunner til at det ikke kan påvises ål i disse områdene.

Ved Birketveit, lokalitet 2, kan det være flere vandringshindre nedstrøms for den undersøkte kulverten. Bekken kan gå igjennom opptil seks kulverter eller broer nedenfor konstruksjonen, slik det ser ut i Vegkart (NVDB, 2018). Dette kan ha hindret ål i å nå prøvetakingsstedet. Det virker heller ikke som om bekken fører til noe innsjø oppstrøms, som man antar er "målet" for vandringsveien. Ettersom ål er i ferskvann i rundt 20 år, kan det tenkes at ål vandrer i flere bekker før den finner det endelige leveområdet. Bekker som ikke fører til noen innsjø, kan dermed tenkes å ha lav tetthet av ål. De samme beskrivelsene gjelder lokalitet 13, Studedal, hvor det

trolig er to kulverter eller broer som kan utgjøre vandringshindre på vei opp fra fjorden, som bekken ender ut i. Bekken fører nødvendigvis heller ikke opp til nærliggende innsjøer. Lokalitet 17, Bøen, har mulig en nedenforliggende kulvert som kan utgjøre et vandringshinder, men kan være tilknyttet innsjøen Farvannet oppstrøms. Likevel ble det observert ved prøvetakings-tidspunkt at vannet var "råttent" og stillestående nedstrøms for kulverten. I tillegg var det plassert et rør koblet til en maskin foran kulverten, som pumpet opp vann opp av bekken for vanning av nærliggende åkere. Dette kan ha vært forstyrrende og skremmende for oppvandrende fisk.

En annen faktor som kan forklare hvorfor disse tre bekkene ikke testet positivt er vannkvaliteten. Det ble ikke gjort noen vannanalyse for å undersøke miljøtilstand, men det kan selvsagt tenkes at enkelte bekker ikke har optimalt miljø for ål. For Birketveit finnes ingen direkte informasjon om vannkvalitet, likevel er nærmeste/øvre bekk, utløpsbekk fra Temse (vannforekomst 019-31-R), vurdert med svært dårlig økologisk tilstand, ifølge Vann-Nett Portal (NVE, 2019). Økologisk tilstand for Studedalen (nedbørsfelt 020.4A) og Bøen (vannforekomst 020-188-R) er moderat, hvor Bøen blant annet har høye verdier av aluminium (NVE, 2019).

En siste forklaring kan være at det har vært ål tilstede ved lokalitetene som ikke blir oppdaget i testingen. Det vil alltid være en viss sannsynlighet for å ikke fange opp eDNA i vannprøvene, eller at det kan ha skjedd feil under laboratoriearbeidet som gjør at arten ikke blir påvist. Likevel virker ikke dette sannsynlig, ettersom det er konsekvent negativt oppstrøms og nedstrøms for alle tre lokalitetene. En annen faktor som styrker troverdigheten på prøvene, er at det er mulig å påvise en annen art fra de samme prøvene. Ørret tester positivt på lokalitet 13 og 17, noe som betyr at eDNA er fanget opp i vannprøvene, og isolasjonen av DNA har vært vellykket. Ørret er en vanligere art enn ål, og er dyktigere til å hoppe opp terskler, og er derfor naturlig å påvise flere steder. Ørret kan derimot ikke påvises ved lokalitet 2, noe som *kan* forklares med feil under vannprøvetaking, isolering av eDNA, eller qPCR. Likevel er det mer sannsynlig at forklaringen er knyttet til de seks nedenforliggende kulvertene, det at bekken ikke fører til noen innsjø, eller at vannkvaliteten ikke er optimal.

Prøvenes renhet og konsentrasjon

Absorbansen gir en indikasjon på renhet for DNA-prøver. Absorbansen 260/280 nm lå på mellom 1,39 og 1,96 for eDNA-prøvene hentet ved de 26 lokalitetene. Den optimale verdien er 1,8, og

gjennomsnittlig har prøvene en verdi på 1,65. Dette er altså litt under hva som er optimalt. Absorbansen 260/230 lå på mellom 0,21 og 1,49, med et gjennomsnitt på 0,77. De optimale verdiene er på mellom 2,0 og 2,2. Prøvene ligger dermed under hva som anses som optimalt. Det er ikke uventet å få litt lave absorbanseverdier i målinger av eDNA. Optimale verdier vil forventes i større grad for prøver hentet direkte fra kilden (som vev og blod), mens eDNA er hentet fra et miljø som kan inneholde mange kontaminerende partikler. Hummussyrer fra nedbrutt organisk materiale er trolig årsaken til de lave absorbanseverdiene. Slike partikler kan være såkalte PCR-hemmere, som gjør at PCR ikke virker optimalt.

PCR-hemmere kunne vært årsaken til at lokalitet 2 ikke gav positivt utslag på ål eller ørret. Likevel skiller ikke absorbanseverdiene for denne lokaliteten seg ut fra de andre prøvene, men ligger rett over gjennomsnittet. Lokalitet 13 og 17 opp- og nedstrøms, samt lokalitet 15 nedstrøms, tester ikke positivt på ål, men skiller seg heller ikke spesielt ut i fra de andre prøvene som har positivt utslag. TaqMan-mixen inneholder dessuten stoffer som skal unngå problemer med PCR-hemmere. Absorbansen er altså trolig ikke årsak til at noen prøver ikke tester positivt.

eDNA-konsentrasjon indikerer hvor mye DNA som har blitt isolert, og varierte fra mellom 3,10 og 147,2 ng/ μ l. Konsentrasjonen måler eDNA avgitt fra alle arter som var tilstede under vannprøvetakingen, ikke bare ål og ørret. Ct-verdiene varierte fra 33-46, noe som er litt høyt, men forventet da vannprøver har lavere DNA-konsentrasjon enn prøver med genomisk DNA hentet direkte fra en organisme. Det er uansett ingenting som tyder på at disse verdiene har vært problematiske i forhold til DNA-isolasjon og amplifisering i qPCR.

Anbefalinger for fremtidige studier av vandringshindre

eDNA kan være et svært hjelpelig verktøy i påvisning av vandringshindre. Det vil likevel være nyttig å kombinere metoden med observasjoner og kartverktøy for mest presis vurdering av konstruksjonene. Visuelle observasjoner er viktig, ettersom det er rimelig å anta at ål kan komme seg oppstrøms for et hinder via alternative ruter. Det anbefales derfor at informasjon om nærliggende bekker og substrat vurderes ved siden av innhenting av eDNA i felt. Vannprøver for analyse av miljøtilstand kan også være nyttig ved mistanke om dårlig vanntilstand. Kartverktøy og annen informasjon om konstruksjoner, som kulverter, bør også brukes i vurderingen av potensielle hindre, da arten kan ha vandret forbi før etableringsår, eller ha blitt hindret av nedenforliggende hindre.

4.2 SKILLE MELLOM INDIVIDER VIA MILJØ-DNA

Referansesekvensene – ti haplotyper

DNA fra individene A-J ble sekvensert via Sangersekvensering, som resulterte i ti ulike haplotyper. Disse haplotypene ble sammenlignet mot andre haplotyper fra europeisk ål funnet i NCBI's genbank, hvor åtte av dem viste treff med over 99% likhet med sekvenser i databasen. To individer hadde lavere treff på sekvenser i genbanken; G og H med henholdsvis 96,681% og 97,399% treff med haplotyper i databasen. Dette kan bety at det er funnet en, kanskje to, nye haplotyper av europeisk ål som ikke er publisert tidligere.

Kontrollforsøk; påvisning av referansesekvensene i kar- og samleprøve

Det var mulig å amplifisere og sekvensere et område i D-loop regionen fra en blanding av genomisk DNA og eDNA hentet i en vannprøve fra et lukket akvatisk miljø. I samleprøven og karprøven kunne en finne igjen de ti referansesekvensene fra individ A-J.

Det viste seg at karprøven fikk flere treff på referansesekvensene A-J, enn samleprøven. I karprøven hadde 11420/17446 (65%) sekvenser treff på haplotypene, mens i samleprøven hadde 5006/15852 (32%) sekvenser treff på haplotypene. Selv om databehandlingsprogrammene fant igjen et stort antall sekvenser tilhørende både samle- og karprøven, hadde altså færre sekvenser fra samleprøven gode nok treff med referansesekvensene. Det var likevel ikke høyere treff for karprøven på alle haplotypene; samleprøven hadde større treff på haplotype A, D og I. Årsaken kan kanskje knyttes til databehandlingen, dersom søk i sekvensene tilhørende samleprøven var vanskeligere enn søk i sekvensene tilhørende karprøven. Noe kan også skyldes tilfeldigheter, men forklaringen på dette vites ikke.

Haplotyper i bekkeprøven

Den største utfordringen var å sekvensere eDNA hentet fra bekken for å skille mellom haplotyper. Dette viste seg å fungere, og det var med stor grad av sikkerhet mulig å påvise tre ulike haplotyper i bekkeprøven (med $n > 1000$). Det ble til sammen funnet syv haplotyper, men ettersom fire av disse hadde under tusen treff, defineres disse som usikre i denne oppgaven. Begrunnelsen diskuteres i avsnittet nedenfor "Betydningen av PCR- og sekvenseringsfeil".

I en studie utført av Ragauskas (2014) var haplotypediversiteten for europeisk ål $h = 0,99$. Dersom man antar at haplotypediversiteten er den samme i bekken hvor vannprøven ble hentet, kan man anslå at det er funnet eDNA fra tre individer i bekken. Ettersom hensikten med undersøkelsen var å finne ut av om det var mulig å skille mellom individer via eDNA, gir ikke studiet svar på hvor stort område dette individantallet gjelder for. Men det er mulig å si at dette antallet kunne påvises i en liter vann hentet på ett sted i bekken.

Utfordringer knyttet til manglende barcodesekvens for bekkeprøven

Sekvensene som hadde treff på haplotyper i NCBI's genbank utgjorde 186325 av totalt 1769485 (10,5%) sekvenser uten barcoder. Som det kommer frem av tallene, er det mange sekvenser som ikke gir treff på haplotyper i kategorien for bekk. Begrunnelsen kan bygge på at sekvenser tilhørende bekkeprøven var vanskelige å sortere, da de ikke hadde egne barcoder på primerne. Kravene for å havne i kategorien "samleprøve" eller "karprøve" var at sekvensene måtte ha to intakte barcoder, og minst 85% sekvenslikhet med disse. Kravet for å havne i kategorien "bekkeprøve" var sekvenslikhet på maksimum 60% for barcode-primerne, altså kun sekvenser uten barcoder. Dermed kunne mange sekvenser med lave "score" fra samle- og karprøven havne i denne kategorien, som rest.

Dette kan også forklare hvorfor flere sekvenser i kategorien for bekk hadde treff med referansesekvensene A-J. Dette kan altså være sekvenser som egentlig tilhørte kar- og samleprøven, men som i mangel på intakte barcoder, havnet i kategorien for bekk. Bekkeprøven ble hentet en time etter at individene A-J ble fisket opp, så det kan selvfølgelig også tenkes at deres eDNA kunne finnes i bekken. Det er ikke lett å slå fast om haplotypene A-J i kategorien for bekk, kom fra bekken, eller kar- og samleprøven. Selv om opphavet til referansesekvensene A-J i denne kategorien er usikkert, påvirker det ikke troverdigheten av de andre haplotypene som er funnet i bekkeprøven. Det er ikke tvil om at det er eDNA fra bekken.

Potensielt flere haplotyper som ikke er registrert i genbank

En annen forklaring på hvorfor det er mange sekvenser til overs, er at det kanskje er funnet haplotyper som mangler referanse i genbanken. Ettersom haplotypediversiteten er såpass høy hos ål, er det ikke usannsynlig å finne haplotyper som ikke er påvist før. Kravet for å havne innenfor en haplotype ble satt til minimum 95% sekvenslikhet med haplotypene i genbanken,

noe som utelukker sekvenser med mindre sekvensidentitet, og potensielt nye haplotyper. En kan dermed tenke seg at det finnes haplotyper som ikke er dokumentert før, blant sekvensene med lavere treff.

På en annen side, minimumskravet om 95% treff kan også skape spørsmål om hvorvidt alle sekvensene som er plassert ved en haplotype, nettopp har denne haplotypen. Dersom to ulike haplotyper har mindre enn 5% variasjon, kan de i teorien ha blitt plassert under samme haplotype. Det er ikke utført beregninger på hvor stor forskjell det er mellom haplotyper i dette studiet. Det er likevel satt et høyt sikkerhetsnivå ($n > 1000$) for å unngå den potensielle problematikken. Dersom over tusen sekvenser viser over 95% identitet til en haplotype, er det høyst sannsynlig at denne haplotypen er påvist, selv om noen sekvenser fra en annen haplotype skulle blitt med i kategorien.

Kartlegging av potensielt nye haplotyper blant sekvenseringsdata hadde krevd mer omfattende analyser, noe som hadde overskredet arbeidsmengden i dette studiet.

Én haplotype påvist i større antall

Av alle haplotypene funnet i bekken, var en av dem i langt større antall enn de andre; KJ564256.1. Årsaken til dette kan være flere. Det kan for eksempel hende at et individ var i nærheten av prøvetakingsstedet da vannprøven ble tatt, slik at mye eDNA havnet i vannprøven. I tillegg vil større individer, høyere metabolsk rate og mer bevegelse føre til mer eDNA i vannet. Det er dessuten mulig å fange opp celler eller vev fra et individ, som kan gi spesielt stor eDNA-konsentrasjon. En siste mulighet er at denne haplotypen er mer vanlig, og deles av flere enn ett individ. Det er generelt forventet at det vil være variasjon i antall treff per haplotype, fordi det vil være ulik avstand fra individene til prøvetakingsstedet, i tillegg til de nevnte individuelle trekkene. Dette vil uansett ikke påvirke estimatet av antall individer, fordi man tar utgangspunkt i artens haplotypediversitet og antall haplotyper påvist, ikke mengde.

Betydningen av PCR- og sekvenseringsfeil

Når hensikten er å sammenlikne DNA-sekvenser for å undersøke forskjeller, kan feil i oppformering eller avlesning være kritisk. I et område som D-loop regionen kan det være stor variasjon mellom sekvenser. Det er derfor viktig at resultatene av PCR-kjøringen og

sekvenseringen er korrekt, slik at man ikke anser en maskinfeil som naturlige ulikheter. Hvordan kan vi vite om haplotypene er ekte haplotyper, og ikke PCR- eller sekvenseringsfeil? Det viktigste er at PCR-produktene er korrekte, da disse har blitt oppformert i stort antall, hvilket også gjelder eventuelle basefeil gjort av maskinen. Ifølge tidligere studier har PCR, ved bruk av et Phusion High Fidelity enzym, en total feilrate på 0,11%. Enzymet har den laveste feilraten av kjente enzymer, og er valgt i dette studiet. Dersom man skulle øke sikkerheten ytterligere kunne en utført flere PCR-kjøringer, etterfulgt av sekvenseringer, og sammenlignet resultatet. Men dette vil selvsagt kreve mer tid og større finansiering.

Nanoporesekvenseringen har en feilrate på om lag 6 %, noe som er høyere enn andre typer sekvenseringsmetoder. Dette kan virke ødeleggende, men ettersom det er tusenvis av like DNA-molekyler som leses av, har man mulighet til å sortere ut sekvenser med basefeil som ikke deles av flere molekyler. Dette er en annen grunn til at det er valgt et høyt sikkerhetsnivå for påvisning av haplotyper i bekken. I resultatene for bekken har tre av de syv haplotypene over tusen treff ($n > 1000$), noe som gjør at vi med stor grad av sikkerhet kan si at de stammer fra naturen, og ikke er PCR- eller sekvenseringsfeil.

Prøvenes renhet, konsentrasjon og utslag på agarosegel

Genomisk DNA fra individene A-J hadde en absorbanse 260/280 nm på mellom 1,98 og 2,08, noe som er litt høyere enn optimalt. Absorbansen 260/230 nm lå på mellom 2,08 og 2,73, noe som er ganske nærme det optimale, eventuelt litt høyt. DNA-konsentrasjonene lå på mellom 68,2 og 266,9 ng/ μ l. Disse verdiene skapte ingen problemer for amplifisering og sekvensering av prøvene.

Samleprøven hadde en 260/280-absorbanse på 2,03, og 260/230-absorbanse på 2,91, som er litt høyere enn optimalt. eDNA-konsentrasjonen lå på 65 ng/ μ l. Karprøven hadde en 260/280-absorbanse på 1,73, som er ganske optimalt, og en 260/230-absorbanse på 0,92, som er litt lavt. eDNA-konsentrasjonen var 65,1 ng/ μ l. Bekkeprøven hadde en 260/280-absorbanse på 1,56 og en 260/230-absorbanse på 0,73, som er lavt, med konsentrasjon på 45,1 ng/ μ l. Absorbanseverdiene er litt lavere, spesielt 260/230-verdiene, noe som trolig kommer av hummussyrer i vannet. Det virket likevel ikke som om dette hadde noe negativ effekt på amplifiseringen.

Det var forventet å finne at eDNA-prøvene hadde lavere konsentrasjon enn vevsprøvene, ettersom det er mye mindre DNA og biologisk materiale i vann, enn fra en kilde dirkete. Da det

ble kjørt PCR på PCR-produktet av samle-, kar-, og bekkeprøven, ble det sikret nok produkt til sekvensering. Konsentrasjonen av DNA for prøvene gjenspeiler seg i båndene på agarosegelen. Genomisk DNA fra individ A-J, som alle ble fortynnet til 65 ng/ μ l, viser sterke bånd. Samleprøven, altså blanding av DNA fra individ A-J, viser også sterkt bånd. eDNA fra karprøven viser noe svakere bånd, mens eDNA fra bekkeprøven viser det aller svakeste båndet. Selv om det var tydelig forskjell her, var det ikke noe problem å sekvensere PCR-produktene.

Det ble også dannet noen små, svake bånd nederst på gelen tilhørende individ A-J, som skyldes primer-dimerer. Sekvensen til primerne har gjort at de hybridiserer til hverandre og danner korte fragmenter som amplifiseres. Dette kan en imidlertid ikke se på gelen tilhørende samle-, kar- og bekkeprøven, fordi det ble kjørt ny PCR med nested primere, som forhindrer fenomenet. Primer-dimerene skapte ikke problemer, og PCR-produktet ble dessuten rensset før sekvensering.

Det er i tillegg verdt å nevne at ved alle bånd, unntatt båndet tilhørende bekkeprøven, kan man se et grått ‘slør’ i bakgrunnen. Dette skyldes bakgrunnsfluorescens fra etidiumbromid, som farger agarosegelen. Dette kunne vært unngått dersom man farget gelen etter elektroforesen, men har ingenting å si for resultatet.

Ingen optimale primertreff på andre fiskearter

Primerne Aa-F og Aa-R passet ikke optimalt på noen steder i mtDNA for artene ørret, røye, elveniøye, ørekyte, sik, krøkle eller abbor. Det er derfor ingen mistanke om at sekvensene som er amplifisert, sekvensert og viser treff på ulike haplotyper, stammer fra andre arter enn europeisk ål.

Studiets betydning, og videre anbefalinger

Flere studier har undersøkt muligheten for å bruke eDNA-konsentrasjon i vann som indikator på biomasse, blant annet Deutschmann et al. (2019) i et studie av ørret, men mangler signifikante funn. Dette kan skyldes at eDNA-konsentrasjonen påvirkes av mange faktorer i vann, både i forbindelse med produksjon, transport og degraderingsprosesser. Disse faktorene kan gjøre at eDNA-konsentrasjonen ikke korrelerer nøyaktig med biomasse. Ved å undersøke

individuelle forskjeller i DNA-sekvensene, vil en unngå en del av denne problematikken. For eksempel, som diskutert tidligere, kan sekvenser tilhørende *en* haplotype forekomme i langt høyere antall enn andre, i en vannprøve. Dette kan skyldes høyere konsentrasjon av eDNA eller celler i vannet tilhørende ett individ, noe som er helt naturlig med tanke på avstand, nedbrytning og individuelle forskjeller. Denne konsentrasjonsforskjellen vil likevel ikke påvirke det eventuelle estimatet man ville gitt på antall individer. Hadde man derimot undersøkt korrelasjon mellom konsentrasjon og biomasse, kunne man endt opp med et skjevt estimat av biomasse. Denne detaljen kan gjøre at undersøkelser av individforskjeller kan bli en mer presis metode for estimering av biomasse, enn konsentrasjonsmålinger av eDNA. Forutsetningen for metoden er at det er nok eDNA, at vannprøvene dekker det aktuelle området, og at det finnes informasjon om haplotypediversitet. Ål har som sagt høy haplotypediversitet, og individene kommer fra Sargassohavet til mer eller mindre tilfeldige oppvekstområder i landet. Undersøkes andre arter, som ørret, må man ta hensyn til at et område sannsynligvis har mange individer som er i nært slektskap, samt lavere haplotypediversitet. Så lenge man er klar over haplotypediversiteten, vil det uansett være mulig å gi et estimat på antall individer, uavhengig om den er høy eller lav.

I studiet blir det bekreftet at det er mulig å skille mellom individer av europeisk ål via eDNA hentet fra en vannprøve, som er det første steget i utviklingen av en potensielt ny metode for å estimere biomasse i vann. Likevel er flere ting som må utforskes før man kan fastslå om dette er en metode som kan fungere. Det vil først og fremst være naturlig å sekvensere PCR-produkt fra eDNA hentet fra *en* bekk, alene i en sekvensering, for å unngå problematikk med barcode-primere. Det neste steget vil være å undersøke rekkevidden av ulike typer vannprøver, både i bekker, elver og innsjøer, slik at en vet hvor mange prøver som må tas for å dekke et område. Det er også viktig med kunnskap om haplotypediversitet dersom metoden skal kunne brukes. Kartlegging av nye haplotyper er dermed essensielt i videre arbeid. Det kan også være nyttig å utforske andre DNA-områder for å finne de mest gunstige individspesifikke sekvensene, både for ål og andre arter. Målet er at man i fremtiden kan ha en standard prosedyre for å estimere biomasse i et akvatisk miljø via eDNA. Dette ville vært et veldig godt verktøy i bevaringsarbeid, men også på alle andre områder som nyttiggjør seg av artskartlegging.

5 KONKLUSJON

eDNA innhentet via vannprøver gjør det mulig å påvise, men også skille individer, av europeisk ål, noe som er et svært nyttig og kosteffektivt verktøy i bevaringsarbeid.

Via eDNA hentet oppstrøms og nedstrøms for 26 potensielle vandringshindre i Agder, kunne europeisk ål påvises både oppstrøms og nedstrøms for 22 potensielle hindre. Det er derfor rimelig å anta at ål kommer seg forbi majoriteten av de potensielle hindrene, men det er likevel verdt å huske på at ål kanskje kan passere via alternative ruter eller under høy vannstand. Ål ble påvist nedstrøms, men ikke oppstrøms, for ett potensielt hinder, men her er det trolig større sannsynlighet for lav individtetthet, enn at ål ble hindret. Ved de tre siste lokalitetene kunne ikke ål påvises oppstrøms eller nedstrøms for de potensielle hindrene. Det er sannsynligvis ikke ål ved disse stedene grunnet andre faktorer. eDNA kan altså være et nyttig verktøy i påvisning av en art på ved en lokalitet, og kan dermed brukes i kartlegging av vandringshindre. Likevel er kunnskap om artens adferd, visuelle observasjoner av terrenget, og bruk av kartverktøy avgjørende for korrekte vurderinger av vandringshindre.

Det var mulig å skille individer av europeisk ål via eDNA innhentet fra en vannprøve. I to kontrolleksperimenter, det ene hvor genomisk DNA fra ti individer ble blandet til en samleprøve, og det andre med eDNA fra et isolert miljø med ti individer, var det mulig å finne igjen alle de ti haplotypene. Den største måloppnåelsen var imidlertid at det var mulig å skille mellom individer via eDNA hentet i en bekk. Det ble med stor grad av sikkerhet påvist tre haplotyper ($n > 1000$) av ål. Ifølge tidligere studier er haplotypediversiteten for europeisk ål høy, $h = 0.99$, og man kan derfor anta at det var tre individer i nærheten av vannprøvetakingsstedet. Denne informasjonen kan brukes til å utvikle en potensielt ny metode for estimering av biomasse i akvatiske miljøer.

KILDER

- Anonym. (2007). *Council Regulation (EC) No 1100/2007 of 18 September 2007 establishing measures for the recovery of the stock of European eel*. Retrieved from Official Journal of the European Union L: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/>
- Arthington, A. H., Dulvy, N. K., Gladstone, W., & Winfield, I. J. (2016). Fish conservation in freshwater and marine realms: status, threats and management. *Aquatic Conservation-Marine and Freshwater Ecosystems*, 26(5), 838-857. doi:10.1002/aqc.2712
- Asis, A., Lacsamana, J. K. M., & Santos, M. D. (2016). Illegal trade of regulated and protected aquatic species in the Philippines detected by DNA barcoding. *Mitochondrial DNA Part A*, 27(1), 659-666. doi:10.3109/19401736.2014.913138
- Ayala, D. J., Munk, P., Lundgreen, R. B. C., Traving, S. J., Jaspers, C., Jorgensen, T. S., . . . Riemann, L. (2018). Gelatinous plankton is important in the diet of European eel (*Anguilla anguilla*) larvae in the Sargasso Sea. *Scientific Reports*, 8. doi:10.1038/s41598-018-24388-x
- Balasingham, K. D., Walter, R. P., & Heath, D. D. (2017). Residual eDNA detection sensitivity assessed by quantitative real-time PCR in a river ecosystem. *Molecular Ecology Resources*, 17(3), 523-532. doi:10.1111/1755-0998.12598
- Baras, E., Jeandrain, D., Serouge, B., & Philippart, J. C. (1998). Seasonal variations in time and space utilization by radio-tagged yellow eels *Anguilla anguilla* (L.) in a small stream. *Hydrobiologia*, 372, 187-198. doi:10.1023/a:1017072213791
- Belpaire, C. G. J., Goemans, G., Geeraerts, C., Quataert, P., Parmentier, K., Hagel, P., & De Boer, J. (2009). Decreasing eel stocks: survival of the fattest? *Ecology of Freshwater Fish*, 18(2), 197-214. doi:10.1111/j.1600-0633.2008.00337.x
- Bilau, M., Sioen, I., Matthys, C., De Vocht, A., Goemans, G., Belpaire, C., . . . De Henauw, S. (2007). Probabilistic approach to polychlorinated biphenyl (PCB) exposure through eel consumption in recreational fishermen vs. the general population. *Food Additives and Contaminants*, 24(12), 1386-1393. doi:10.1080/02652030701459848
- Bornarel, V., Lambert, P., Briand, C., Antunes, C., Belpaire, C., Ciccotti, E., . . . Drouineau, H. (2018). Modelling the recruitment of European eel (*Anguilla anguilla*) throughout its European range. *Ices Journal of Marine Science*, 75(2), 541-552. doi:10.1093/icesjms/fsx180
- Byer, J. D., Lebeuf, M., Alae, M., Stephen, B. R., Trottier, S., Backus, S., . . . Hodson, P. V. (2013). Spatial trends of organochlorinated pesticides, polychlorinated biphenyls, and polybrominated diphenyl ethers in Atlantic Anguillid eels. *Chemosphere*, 90(5), 1719-1728. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.10.018
- Castelnaud, G. (2001). LOCALISATION DE LA PÊCHE, EFFECTIFS DE PÊCHEURS ET PRODUCTION DES ESPÈCES AMPHIHALINES DANS LES FLEUVES FRANÇAIS. *Bulletin Français de la Pêche et de la Pisciculture*(357-360), 439-460.
- Castonguay, M., Hodson, P. V., Moriarty, C., Drinkwater, K. F., & Jessop, B. M. (1994). Is there a role of ocean environment in American and European eel decline? *Fisheries Oceanography*, 3(3), 197-203.
- Couillard, C. M., Hodson, P. V., & Castonguay, M. (1997). Correlations between pathological changes and chemical contamination in American eels, *Anguilla rostrata*, from the St. Lawrence River. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 54(8), 1916-1927. doi:10.1139/cjfas-54-8-1916

- Davey, A. J. H., & Jellyman, D. J. (2005). Sex determination in freshwater eels and management options for manipulation of sex. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 15(1-2), 37-52. doi:10.1007/s11160-005-7431-x
- Deiner, K., Renshaw, M. A., Li, Y. Y., Olds, B. P., Lodge, D. M., & Pfrender, M. E. (2017). Long-range PCR allows sequencing of mitochondrial genomes from environmental DNA. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(12), 1888-1898. doi:10.1111/2041-210x.12836
- 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. doi:10.1111/j.1365-2664.2012.02171.x
- Dekker, W. (2003a). Did lack of spawners cause the collapse of the European eel, *Anguilla anguilla*? *Fisheries Management and Ecology*, 10(6), 365-376. doi:10.1111/j.1365-2400.2003.00352.x
- Dekker, W. (2003b). *Status of the European eel stock and fisheries*.
- Dekker, W. (2016). Management of the eel is slipping through our hands! Distribute control and orchestrate national protection. *Ices Journal of Marine Science*, 73(10), 2442-2452. doi:10.1093/icesjms/fsw094
- Dekker, W. (2019). The history of commercial fisheries for European eel commenced only a century ago. *Fisheries Management and Ecology*, 26(1), 6-19. doi:10.1111/fme.12302
- Dekker, W., & Beaulaton, L. (2016). Climbing back up what slippery slope? Dynamics of the European eel stock and its management in historical perspective. *Ices Journal of Marine Science*, 73(1), 5-13. doi:10.1093/icesjms/fsv132
- Deutschmann, B., Muller, A. K., Hollert, H., & Brinkmann, M. (2019). Assessing the fate of brown trout (*Salmo trutta*) environmental DNA in a natural stream using a sensitive and specific dual-labelled probe. *Science of the Total Environment*, 655, 321-327. doi:10.1016/j.scitotenv.2018.11.247
- Domingos, I., Costa, J. L., & Costa, M. J. (2006). Factors determining length distribution and abundance of the European eel, *Anguilla anguilla*, in the River Mondego (Portugal). *Freshwater Biology*, 51(12), 2265-2281. doi:10.1111/j.1365-2427.2006.01656.x
- Drouineau, H., Durif, C., Castonguay, M., Mateo, M., Rochard, E., Verreault, G., . . . Lambert, P. (2018). Freshwater eels: A symbol of the effects of global change. *Fish and Fisheries*, 19(5), 903-930. doi:10.1111/faf.12300
- Dudgeon, D., Arthington, A. H., Gessner, M. O., Kawabata, Z. I., Knowler, D. J., Leveque, C., . . . Sullivan, C. A. (2006). Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews*, 81(2), 163-182. doi:10.1017/s1464793105006950
- Durif, C., & Skiftesvik, A., B. . (2016). *Forskningsfangst av ål - Sluttrapport*. Retrieved from
- Durif, C. M. F., & Elie, P. (2008). Predicting downstream migration of silver eels in a large river catchment based on commercial fishery data. *Fisheries Management and Ecology*, 15(2), 127-137. doi:10.1111/j.1365-2400.2008.00593.x
- Durif, C. M. F., Gjosaeter, J., & Vollestad, L. A. (2011). Influence of oceanic factors on *Anguilla anguilla* (L.) over the twentieth century in coastal habitats of the Skagerrak, southern Norway. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 278(1704), 464-473. doi:10.1098/rspb.2010.1547
- Europol. (2018). Glass eel traffickers earned more than EUR 37 million from illegal exports to Asia. Retrieved from

- <https://www.europol.europa.eu/newsroom/news/glass-eel-traffickers-earned-more-eur-37-million-illegal-exports-to-asia>
- Farias, I. P., Orti, G., Sampaio, I., Schneider, H., & Meyer, A. (2001). The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: The limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes. *Journal of Molecular Evolution*, 53(2), 89-103. doi:10.1007/s002390010197
- Feunteun, E. (2002). Management and restoration of European eel population (*Anguilla anguilla*): An impossible bargain. *Ecological Engineering*, 18(5), 575-591. doi:10.1016/s0925-8574(02)00021-6
- Friedland, K. D., Miller, M. J., & Knights, B. (2007). Oceanic changes in the Sargasso Sea and declines in recruitment of the European eel. *Ices Journal of Marine Science*, 64(3), 519-530. doi:10.1093/icesjms/fsm022
- Gabrielsen, E. S., Skår, B., Haraldstad, T., & Hindar, K. (2017). Kartlegging av utvalgte sjøaurebekker som renner inn i Mandalselva høsten 2016 (289). Retrieved from [http://www.vannportalen.no/globalassets/vannregioner/agder/agder---dokumenter/rapporter/arkiv-602982-v1-sjoaurebekker_i_mandalselva .pdf](http://www.vannportalen.no/globalassets/vannregioner/agder/agder---dokumenter/rapporter/arkiv-602982-v1-sjoaurebekker_i_mandalselva.pdf)
- Geeraerts, C., & Belpaire, C. (2010). The effects of contaminants in European eel: a review. *Ecotoxicology*, 19(2), 239-266. doi:10.1007/s10646-009-0424-0
- Goldstein, S., Beka, L., Graf, J., & Klassen, J. L. (2019). Evaluation of strategies for the assembly of diverse bacterial genomes using MinION long-read sequencing. *Bmc Genomics*, 20. doi:10.1186/s12864-018-5381-7
- Gollner, S., Stuckas, H., Kihara, T. C., Laurent, S., Kodami, S., & Arbizu, P. M. (2016). Mitochondrial DNA Analyses Indicate High Diversity, Expansive Population Growth and High Genetic Connectivity of Vent Copepods (Dirivultidae) across Different Oceans. *Plos One*, 11(10). doi:10.1371/journal.pone.0163776
- Haro, A., Richkus, W., Whalen, K., Hoar, A., Busch, W. D., Lary, S., . . . Dixon, D. (2000). Population decline of the American eel: Implications for research and management. *Fisheries*, 25(9), 7-16. doi:10.1577/1548-8446(2000)025<0007:pdotae>2.0.co;2
- Hasler, N. (2019). Pore Over This: Advances In DNA Sequencing. Retrieved from <http://oxsci.org/2019/02/10/pore-over-this-advances-in-dna-sequencing/>
- Hebert, P. D. N., & Gregory, T. R. (2005). The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology*, 54(5), 852-859. doi:10.1080/10635150500354886
- Hitt, N. P., Eyler, S., & Wofford, J. E. B. (2012). Dam Removal Increases American Eel Abundance in Distant Headwater Streams. *Transactions of the American Fisheries Society*, 141(5), 1171-1179. doi:10.1080/00028487.2012.675918
- Holm-Hansen, O., Sutcliffe, W. J., & Sharp, J. (1968). Measurement of deoxyribonucleic acid in the ocean and its ecological significance. *Limnol Oceanogr*(13), 507-514.
- ICES. (2012). *ICES WGEEL REPORT 2012. Report of the Joint EIFAAC/ICES/GFCM. Working Group on Eel (WGEEL)* Retrieved from Copenhagen Denmark:
- ICES. (2013). *EIFAAC/ICES WGEEL REPORT 2013. Report of the Joint EIFAAC/ICES Working Group on Eels (WGEEL)*. Retrieved from 18-22 March in Sukarietta, Spain. 4-10 September in Copenhagen Denmark:
- ICES. (2015). *ICES WGEEL REPORT 2015. Report of the Joint EIFAAC/ICES/GFCM. Working Group on Eel (WGEEL)*. Retrieved from Antalya, Turkey:
- ICES. (2018). *ICES WGEEL REPORT 2018*. Retrieved from Gdansk, Poland:
- Itakura, H., Wakiya, R., Yamamoto, S., Kaifu, K., Sato, T., & Minamoto, T. (2019). Environmental DNA analysis reveals the spatial distribution, abundance, and

- biomass of Japanese eels at the river - basin scale. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 1-13.
- Jacoby, D., & Gollock, M. (2014). *Anguilla anguilla*. The IUCN Red List of Threatened Species. Retrieved from <http://www.iucnredlist.org/details/60344/0>
- Jacoby, D. M. P., Casselman, J. M., Crook, V., DeLucia, M. B., Ahn, H., Kaifu, K., . . . Gollock, M. J. (2015). Synergistic patterns of threat and the challenges facing global anguillid eel conservation. *Global Ecology and Conservation*, 4, 321-333. doi:10.1016/j.gecco.2015.07.009
- Jansen, H. J., Liem, M., Jong-Raadsen, S. A., Dufour, S., Weltzien, F. A., Swinkels, W., . . . Henkel, C. V. (2017). Rapid de novo assembly of the European eel genome from nanopore sequencing reads. *Scientific Reports*, 7. doi:10.1038/s41598-017-07650-6
- Jansen, H. M., Winter, H. V., Bruijs, M. C. M., & Polman, H. J. G. (2007). Just go with the flow? Route selection and mortality during downstream migration of silver eels in relation to river discharge. *Ices Journal of Marine Science*, 64(7), 1437-1443. doi:10.1093/icesjms/fsm132
- Kettle, A. J., Vollestad, L. A., & Wibig, J. (2011). Where once the eel and the elephant were together: decline of the European eel because of changing hydrology in southwest Europe and northwest Africa? *Fish and Fisheries*, 12(4), 380-411. doi:10.1111/j.1467-2979.2010.00400.x
- Kirk, R. S. (2003). The impact of *Anguillicola crassus* on European eels. *Fisheries Management and Ecology*, 10(6), 385-394. doi:10.1111/j.1365-2400.2003.00355.x
- Klug, W. S., Cummings, M. R., Spencer, C. A., & Palladino, M. A. (2017). *Essentials of Genetics* (9th ed.). Edinburgh Gate, Harlow, Essex CM20 2JE, England: Pearson Education Limited.
- Knights, B. (2003). A review of the possible impacts of long-term oceanic and climate changes and fishing mortality on recruitment of anguillid eels of the Northern Hemisphere. *Science of the Total Environment*, 310(1-3), 237-244. doi:10.1016/s0048-9697(02)00644-7
- Lacoursiere-Roussel, A., Dubois, Y., Normandeau, E., & Bernatchez, L. (2016). Improving herpetological surveys in eastern North America using the environmental DNA method. *Genome*, 59(11), 991-1007. doi:10.1139/gen-2015-0218
- Laffaille, P., Feunteun, E., Baisez, A., Robinet, T., Acou, A., Legault, A., & Lek, S. (2003). Spatial organisation of European eel (*Anguilla anguilla* L.) in a small catchment. *Ecology of Freshwater Fish*, 12(4), 254-264. doi:10.1046/j.1600-0633.2003.00021.x
- Lindaas, M. I. S. V. (2016). *Vandringshindre - kulverter under veg, kartlegging og tiltak*. Retrieved from <https://www.fylkesmannen.no/contentassets/baa13c8606024e8aab02d60c3d934bf6/07---vandringshindre--kulverter-under-veg-kartlegging-og-tiltak.-ingvild-mogster-lindaas-senioringenior-statens-vegvesen.pdf>
- Maes, G. E., Raeymaekers, J. A. M., Pampoulie, C., Seynaeve, A., Goemans, G., Belpaire, C., & Volckaert, F. A. M. (2005). The catadromous European eel *Anguilla anguilla* (L.) as a model for freshwater evolutionary ecotoxicology: Relationship between heavy metal bioaccumulation, condition and genetic variability. *Aquatic Toxicology*, 73(1), 99-114. doi:10.1016/j.aquatox.2005.01.010
- Martellini, A., Payment, P., & Villemur, R. (2005). Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water. *Water Research*, 39(4), 541-548. doi:10.1016/j.watres.2004.11.012

- Miljødirektoratet. (2011). *Forvaltningstiltak for ål i Norge. Iverksatte og foreslåtte tiltak. Notat 5-2011* (0802-1546). Retrieved from Direktoratet for naturforvaltning:
- Munk, P., Nielsen, T. G., Jaspers, C., Ayala, D. J., Tang, K. W., Lombard, F., & Riemann, L. (2018). Vertical structure of plankton communities in areas of European eel larvae distribution in the Sargasso Sea. *Journal of Plankton Research*, *40*(4), 362-375. doi:10.1093/plankt/fby025
- Naisbett-Jones, L. C., Putman, N. F., Stephenson, J. F., Ladak, S., & Young, K. A. (2017). A Magnetic Map Leads Juvenile European Eels to the Gulf Stream. *Current Biology*, *27*(8), 1236-1240. doi:10.1016/j.cub.2017.03.015
- Nevers, M. B., Byappanahalli, M. N., Morris, C. C., Shively, D., Przybyla-Kelly, K., Spoljaric, A. M., . . . Roseman, E. F. (2018). Environmental DNA (eDNA): A tool for quantifying the abundant but elusive round goby (*Neogobius melanostomus*). *Plos One*, *13*(1). doi:10.1371/journal.pone.0191720
- NVDB (Cartographer). (2018). Vegkart. Retrieved from <https://www.vegvesen.no/vegkart/vegkart/#kartlag:geodata/@600000,722500,0,3>
- NVE (Cartographer). (2019). Vann-Nett Portal. Retrieved from <https://vann-nett.no/portal/#/mainmap>
- 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. doi:10.1016/0167-7012(87)90025-x
- Port, J. A., O'Donnell, J. L., Romero-Maraccini, O. C., Leary, P. R., Litvin, S. Y., Nickols, K. J., . . . Kelly, R. P. (2016). Assessing vertebrate biodiversity in a kelp forest ecosystem using environmental DNA. *Molecular Ecology*, *25*(2), 527-541. doi:10.1111/mec.13481
- Ragauskas, A., Butkauskas, D., Sruoga, A., Kesminas, V., Rashal, I., & Tzeng, W. N. (2014). Analysis of the genetic structure of the European eel *Anguilla anguilla* using the mtDNA D-loop region molecular marker. *Fisheries Science*, *80*(3), 463-474. doi:10.1007/s12562-014-0714-1
- Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R. M., & Gough, K. C. (2014). REVIEW The detection of aquatic animal species using environmental DNA - a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*, *51*(5), 1450-1459. doi:10.1111/1365-2664.12306
- Riemann, L., Alfredsson, H., Hansen, M. M., Als, T. D., Nielsen, T. G., Munk, P., . . . Castonguay, M. (2010). Qualitative assessment of the diet of European eel larvae in the Sargasso Sea resolved by DNA barcoding. *Biology Letters*, *6*(6), 819-822. doi:10.1098/rsbl.2010.0411
- Righton, D., Westerberg, H., Feunteun, E., Okland, F., Gargan, P., Amilhat, E., . . . Aarestrup, K. (2016). Empirical observations of the spawning migration of European eels: The long and dangerous road to the Sargasso Sea. *Science Advances*, *2*(10). doi:10.1126/sciadv.1501694
- Salter, I. (2018). Seasonal variability in the persistence of dissolved environmental DNA (eDNA) in a marine system: The role of microbial nutrient limitation. *Plos One*, *13*(2). doi:10.1371/journal.pone.0192409
- Sassoubre, L. M., Yamahara, K. M., Gardner, L. D., Block, B. A., & Boehm, A. B. (2016). Quantification of Environmental DNA (eDNA) Shedding and Decay Rates for Three Marine Fish. *Environmental Science & Technology*, *50*(19), 10456-10464. doi:10.1021/acs.est.6b03114

- Shiraishi, H., & Crook, V. (2015). Eel market dynamics: An analysis of *Anguilla* production. *TRAFFIC. Tokyo, Japan*.
- Shogren, A. J., Tank, J. L., Andruszkiewicz, E., Olds, B., Mahon, A. R., Jerde, C. L., & Bolster, D. (2017). Controls on eDNA movement in streams: Transport, Retention, and Resuspension. *Scientific Reports*, 7. doi:10.1038/s41598-017-05223-1
- Stat, M., Huggett, M. J., Bernasconi, R., DiBattista, J. D., Berry, T. E., Newman, S. J., . . . Bunce, M. (2017). Ecosystem biomonitoring with eDNA: metabarcoding across the tree of life in a tropical marine environment. *Scientific Reports*, 7. doi:10.1038/s41598-017-12501-5
- StatensVegvesen. (2013). *Kartlegging av fiskevandringshindre. Aust-Agder og Vest-Agder*. Retrieved from <https://www.vegvesen.no/attachment/537642/binary/864989?fast=title=Kartlegging+av+fiskevandringshindre+i+Agder.pdf>
- Stein, F. M. (2018). Europe's largest wildlife crime: illegale trade of the european eel. Retrieved from <http://www.illegalwildlifetrade.net/2018/07/27/europes-largest-wildlife-crime-illegal-trade-of-the-european-eel/>
- Stein, F. M., Wong, J. C. Y., Sheng, V., Law, C. S. W., Schroder, B., & Baker, D. M. (2016). First genetic evidence of illegal trade in endangered European eel (*Anguilla anguilla*) from Europe to Asia. *Conservation Genetics Resources*, 8(4), 533-537. doi:10.1007/s12686-016-0576-1
- Steinbock, L. J., & Radenovic, A. (2015). The emergence of nanopores in next-generation sequencing. *Nanotechnology*, 26(7). doi:10.1088/0957-4484/26/7/074003
- Stoeckle, B. C., Beggel, S., Cerwenka, A. F., Motivans, E., Kuehn, R., & Geist, J. (2017). A systematic approach to evaluate the influence of environmental conditions on eDNA detection success in aquatic ecosystems. *Plos One*, 12(12). doi:10.1371/journal.pone.0189119
- Strickler, K. M., Fremier, A. K., & Goldberg, C. S. (2015). Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation*, 183, 85-92. doi:10.1016/j.biocon.2014.11.038
- Takahara, T., Minamoto, T., & Doi, H. (2013). Using Environmental DNA to Estimate the Distribution of an Invasive Fish Species in Ponds. *Plos One*, 8(2). doi:10.1371/journal.pone.0056584
- Teletchea, F. (2009). Molecular identification methods of fish species: reassessment and possible applications. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 19(3), 265-293. doi:10.1007/s11160-009-9107-4
- Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Moller, P. R., Rasmussen, M., & Willerslev, E. (2012). Detection of a Diverse Marine Fish Fauna Using Environmental DNA from Seawater Samples. *Plos One*, 7(8). doi:10.1371/journal.pone.0041732
- Thomsen, P. F., & Willerslev, E. (2015). Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 183, 4-18. doi:10.1016/j.biocon.2014.11.019
- Thorstad, B. E., Larsen, M., Hesthagen, T., Næsje, F. T., Poole, R., Aarestrup, K., . . . Sandlund, T. O. (2010). *Ål og konsekvenser av vannkraftutbygging*. Retrieved from
- Tsukamoto, K., & Aoyama, J. (1998). Evolution of freshwater eels of the genus *Anguilla*: a probable scenario. *Environmental Biology of Fishes*, 52(1-3), 139-148. doi:10.1023/a:1007427724175
- Tyler, A. D., Mataseje, L., Urfano, C. J., Schmidt, L., Antonation, K. S., Mulvey, M. R., & Corbett, C. R. (2018). Evaluation of Oxford Nanopore's MinION Sequencing Device for

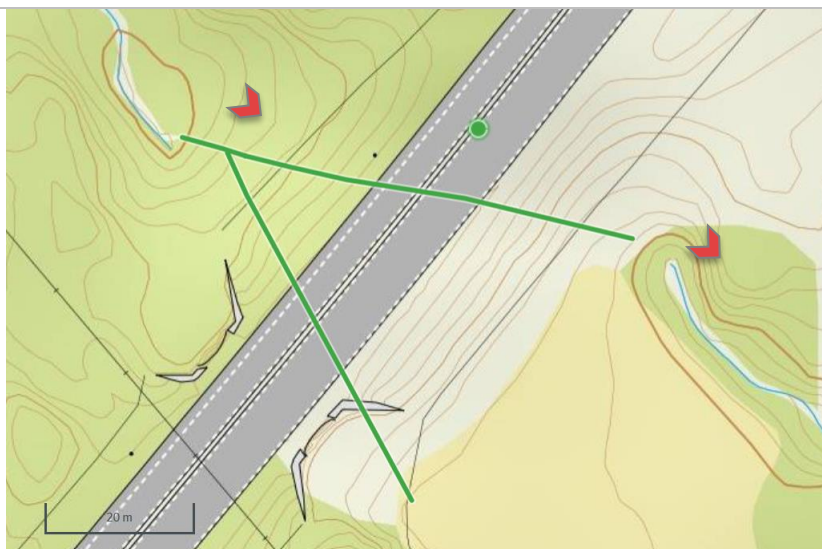
- Microbial Whole Genome Sequencing Applications. *Scientific Reports*, 8. doi:10.1038/s41598-018-29334-5
- Vandenbroucke, I., Van Marck, H., Verhasselt, P., Thys, K., Mostmans, W., Dumont, S., . . . Aerssens, J. (2011). Minor variant detection in amplicons using 454 massive parallel pyrosequencing: experiences and considerations for successful applications. *Biotechniques*, 51(3), 167-177. doi:10.2144/000113733
- Venter, J. C., Remington, K., Heidelberg, J. F., Halpern, A. L., Rusch, D., Eisen, J. A., . . . Smith, H. O. (2004). Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. *Science*, 304(5667), 66-74. doi:10.1126/science.1093857
- Verhelst, P., Reubens, J., Pauwels, I., Buysse, D., Aelterman, B., Van Hoey, S., . . . Mouton, A. (2018). Movement behaviour of large female yellow European eel (*Anguilla anguilla* L.) in a freshwater polder area. *Ecology of Freshwater Fish*, 27(1), 471-480. doi:10.1111/eff.12362
- Vøllestad, L. A. (1992). *Ålefisker*. I Jonsson, B. & Semb-Johansen, A. (red) Norges dyr. : J.W. Cappelens forlag.
- Wilcox, T. M., McKelvey, K. S., Young, M. K., Jane, S. F., Lowe, W. H., Whiteley, A. R., & Schwartz, M. K. (2013). Robust Detection of Rare Species Using Environmental DNA: The Importance of Primer Specificity. *Plos One*, 8(3). doi:10.1371/journal.pone.0059520
- Willerslev, E., Hansen, A. J., Christensen, B., Steffensen, J. P., & Arctander, P. (1999). Diversity of Holocene life forms in fossil glacier ice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(14), 8017-8021. doi:10.1073/pnas.96.14.8017

VEDLEGG

Beskrivelse av lokalitetene

Informasjon om de 26 lokalitetene knyttet til potensielle vandringshindre er presentert i tabell på neste side. Ved hver lokalitet finnes et kart med piler oppstrøms og nedstrøms for det potensielle hinderet. Pilene peker i vannretningen, altså mot havet. Der hvor pilene er plassert markerer også hvor vannprøvene er hentet, men med et tillegg på 0-100 meter i retning fra konstruksjonen. Hver lokalitet har også informasjon om konstruksjon, etableringsår, vegreferanse og Regine-nummer (dersom informasjon er tilgjengelig) som er hentet via kartdata fra Vegkart og NVE. Egne målinger av temperatur, samt observasjoner om vær, vannføring, hinder, substrat og fisk er også nevnt kort. Til slutt er det informasjon om vannprøvens mengde og avstand fra konstruksjonene, samt bilder av de potensielle hindringene.

<p>1. Nidelva</p> <p>Kartdata (NVDB, 2018)</p>		
<p>Konstruksjon og etableringsår</p>	<p>Kulvert, ukjent år</p>	
<p>Vegreferanse</p>	<p>0900 FV407 HP2 m4834 (V)</p>	
<p>Regine-nummer</p>	<p>019.2122</p>	
<p>GPS-koordinater</p>	<p>59.4099°N 8.6566°Ø</p>	
<p>Farbarhet bestemt av Statens Vegvesen 2013</p>	<p>Meget god</p>	
<p>Dato prøvetaking</p>	<p>12.06.18</p>	
<p>Temperatur luft</p>	<p>Nedstrøms: 21.2°C. Oppstrøms: 19.5°C</p>	
<p>Temperatur vann</p>	<p>Nedstrøms: 15.1°C. Oppstrøms: 15.1°C</p>	
<p>Vær</p>	<p>Sol</p>	
<p>Vannføring</p>	<p>Middels vannstand, lav hastighet. Noe større hastighet nedstrøms</p>	
<p>Beskrivelse av hinder</p>	<p>Rør bestående av betong og metall under veg.</p>	
<p>Substrat</p>	<p>Stein og leire. Mer begrodd oppstrøms av gress/strå.</p>	
<p>Observert fisk</p>	<p>Nedstrøms</p>	
<p>Mengde vannprøve</p>	<p>1L</p>	
<p>Avstand fra hinder</p>	<p>Nedstrøms: 0-30m. Oppstrøms: 0-20m</p>	
<p>Mengde vann filtrert</p>	<p>Nedstrøms: 300ml. Oppstrøms: 250ml.</p>	
		
<p>Nidelva oppstrøms</p>	<p>Nidelva nedstrøms</p>	<p>Nidelva nedstrøms</p>

2. Birketveit

Kartdata (NVDB, 2018)

Konstruksjon og etableringsår	Kulvert, 2001
Vegreferanse	0900 EV18 HP11 m3268 (M)
Regine-nummer	019.2122
GPS-koordinater	58.3933°N 8.6673°Ø
Farbarhet bestemt av Statens Vegvesen 2013	Lite god
Dato prøvetaking	12.06.18
Temperatur luft	Nedstrøms: 18.0°C. Oppstrøms: 22.4°C
Temperatur vann	Nedstrøms: 13.4°C. Oppstrøms: 11.6°C
Vær	Sol
Vannføring	Lav vannstand, middels/lav hastighet
Beskrivelse av hinder	Betongrør under veg. 600 mm diameter.
Substrat	Nedstrøms: Fjell og sand, ved kant av jorde. Noe begrodd. Oppstrøms: Jord, stein
Observert fisk	Nei
Mengde vannprøve	1L
Avstand fra hinder	Nedstrøms: 0-50m. Oppstrøms: 0-50m
Mengde vann filtrert	Nedstrøms: 550ml. Oppstrøms: 550ml.



Birketveit oppstrøms



Birketveit nedstrøms

3. Sævelibekken



Kartdata (NVDB, 2018)

Konstruksjon og etableringsår	Kulvert, 2011. Fisketrapp, 2013.
GPS-koordinater	58.3689°N 8.6047°Ø
Vegreferanse	0900 EV18 HP14 m1269 (M)
Regine-nummer	Ukjent
Farbarhet bestemt av Statens Vegvesen 2013	God (egen rapport 2016)
Dato prøvetaking	11.06.18
Temperatur luft	Nedstrøms: 17.5°C. Oppstrøms: 18.8°C
Temperatur vann	Nedstrøms: 13.1°C. Oppstrøms: 15.2°C
Vær	Overskyet
Vannføring	Lav/middels vannstand og hastighet
Beskrivelse av hinder	Betongrør som ender i fisketrapp nedstrøms. 3235 mm i diameter
Substrat	Nedstrøms: Stein, jord, omringet av skog. Oppstrøms: Jord, stein, leire. Ser ut til at husdyr (kyr/sau?) går på hver side.
Observert fisk	Nedstrøms og oppstrøms – små/middels størrelse
Mengde vannprøve	1L
Avstand fra hinder	Nedstrøms: 0-200m. Oppstrøms: 0-100m
Mengde vann filtrert	Nedstrøms: 400ml. Oppstrøms: 700ml



Sævelibekken oppstrøms



Sævelibekken nedstrøms

4. Frivoll

Kartdata (NVDB, 2018)



Konstruksjon og etableringsår	Kulvert, ukjent år
Vegreferanse	0900 EV18 HP16 m983 (M)
Regine-nummer	019.216Z
GPS-koordinater	58.3488°N 8.5855°Ø
Farbarhet bestemt av Statens Vegvesen 2013	Lite god
Dato prøvetaking	11.06.18
Temperatur luft	Nedstrøms: 19.7°C. Oppstrøms: 19.7°C
Temperatur vann	Nedstrøms: 13.7°C. Oppstrøms: 14.4°C
Vær	Overskyet
Vannføring	Middels/lav vannstand og hastighet
Beskrivelse av hinder	Rør av betong og metall. Diameter: 2000mm
Substrat	Leire, jord. Noe begrodd av gress og busker. Vannet ser veldig forurenset og forsøplet ut. Omringet av jorde, hagesenter og stall
Observert fisk	Nei
Mengde vannprøve	1L
Avstand fra hinder	Nedstrøms: 0-20m. Oppstrøms: 0-100m
Mengde vann filtrert	Nedstrøms: 250ml. Oppstrøms: 250ml





Frivoll oppstrøms

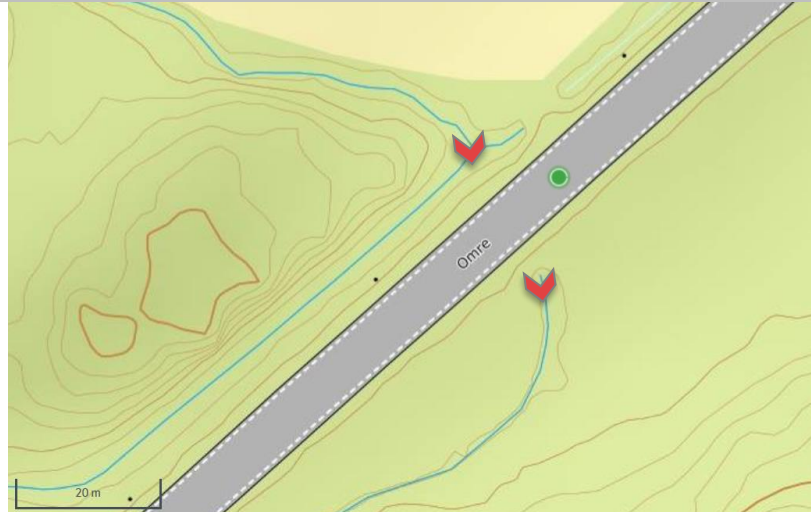


Frivoll nedstrøms



Frivoll nedstrøms

5. Reddalskanalen	
	
Kartdata (NVDB, 2018)	
Konstruksjon og etableringsår	Bro, ukjent år
Vegreferanse	0900 EV18 HP18 m320 – 448 (E18) 0900 FV420 HP10 m1040 – 1067 (420)
Regine-nummer	019.2Z
GPS-koordinater	58.3192°N 8.5388°Ø
Farbarhet bestemt av Statens Vegvesen 2013	Meget god
Dato prøvetaking	11.06.18
Temperatur luft	Nedstrøms: 21.7°C. Oppstrøms: 21.7°C
Temperatur vann	Nedstrøms: 19.9°C. Oppstrøms: 19.9°C
Vær	Sol/sky
Vannføring	Høy vannstand, middels hastighet. Mye strøm i vannet
Beskrivelse av hinder	Bro over kanal (E18 og 420)
Substrat	Fjell. Dyp kanal, kan ikke se bunn
Observert fisk	Nei
Mengde vannprøve	1L
Avstand fra hinder	Nedstrøms og oppstrøms: 15m fra bro. Vannprøvene tatt alt i ett
Mengde vann filtrert	Nedstrøms: 700ml. Oppstrøms: 700ml
	
<p>Reddalskanalen på avstand Reddalskanalen nedstrøms Reddalskanalen oppstrøms</p>	

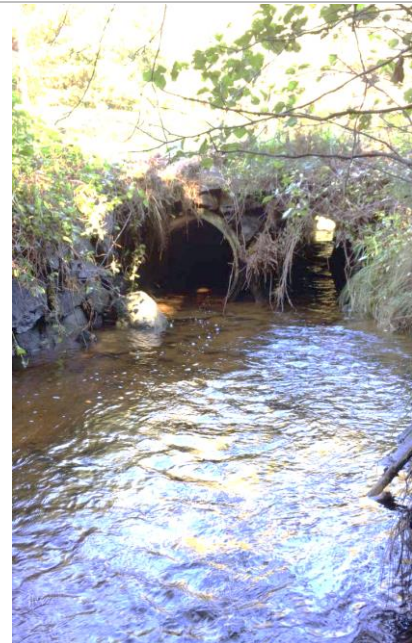
6. Pendalen

Kartdata (NVDB, 2018)



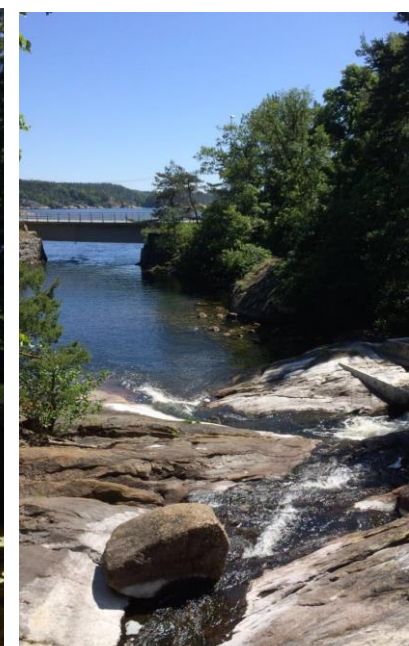

Konstruksjon og etableringsår	Kulvert, ukjent år
Vegreferanse	0900 FV420 HP10 m7095 (H)
Regine-nummer	020.11Z
GPS-koordinater	58.2822°N 8,4784°Ø
Farbarhet bestemt av Statens Vegvesen 2013	God
Dato prøvetaking	08.06.18
Temperatur luft	Nedstrøms: 20.3°C. Oppstrøms: 21.1°C
Temperatur vann	Nedstrøms: 14.7°C. Oppstrøms: 14.2°C
Vær	Sol
Vannføring	Nedstrøms: Middels vannstand og vannhastighet Oppstrøms: Middels vannstand, og lav/middels vannhastighet
Beskrivelse av hinder	Betongrør under veg. 1000 mm i diameter
Substrat	Jord og sand. Litt oppsamling av biologisk materiale nær utløp av kulvert
Observert fisk	Nei
Mengde vannprøve	1L
Avstand fra hinder	Nedstrøms: 0-50 meter. Oppstrøms: ca. 20 meter fra hinder.
Mengde vann filtrert	Nedstrøms: 150 ml. Oppstrøms 250 ml.

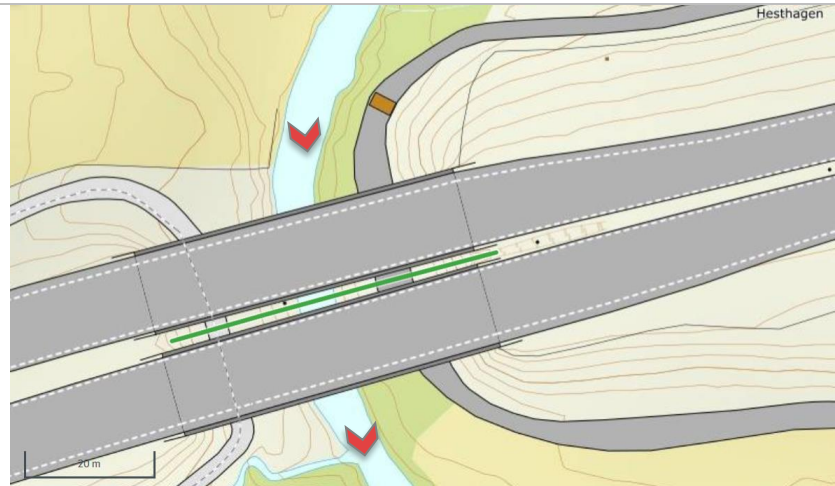


Pendalen oppstrøms



Pendalen nedstrøms

<p>7. Kaldvell</p> <p>Kartdata (NVDB, 2018)</p>		
Konstruksjon og etableringsår	Fisketrapp, ukjent år	
Vegreferanse	0926 Pg99343 hp1 m68	
Regine-nummer	020.1Z	
GPS-koordinater	58.2796°N 8.4200°Ø	
Farbarhet bestemt av Statens Vegvesen 2013	<p>Meget god</p> <p>NB: Prøver ble tatt noe lengre nede i bekken enn hva som ble vurdert av Statens vegvesen, da deres vurdering var basert på E18-bro flere titalls meter over bekken.</p>	
Dato prøvetaking	08.06.18	
Temperatur luft	Nedstrøms: 27.0°C. Oppstrøms: 20.1°C	
Temperatur vann	Nedstrøms: 21.7°C. Oppstrøms: 20.5°C	
Vær	Sol	
Vannføring	Middels hastighet, dypt vann. Bred bekk/elv.	
Beskrivelse av hinder	Demning med fisketrapp	
Substrat	Sand, jord og fjell.	
Observert fisk	Nei. Informasjonsskilt om fiske ved elv, antas å være fisk	
Mengde vannprøve	1L	
Avstand fra hinder	<p>Nedstrøms: ca. 10 m fra bunn av fisketrapp (sjø).</p> <p>Oppstrøms: 0-100 m.</p>	
Mengde vann filtrert	Nedstrøms: 500ml. Oppstrøms: 500ml.	
		
Kaldvell oppstrøms	Kaldvell nedstrøms	Kaldvell fisketrapp (hinder)

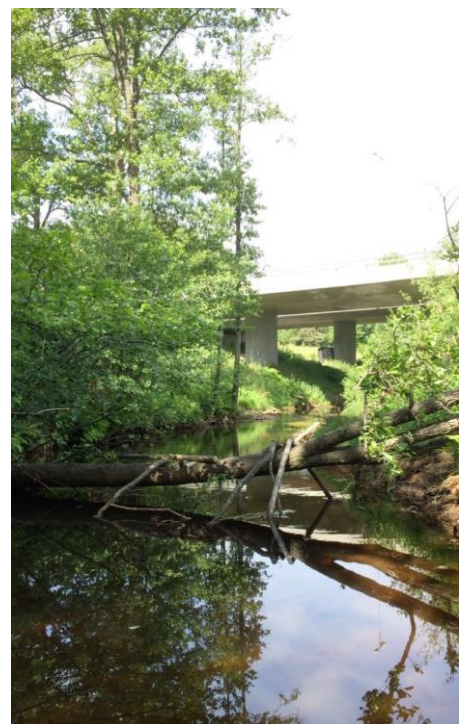
8. Moelva

Kartdata (NVDB, 2018)

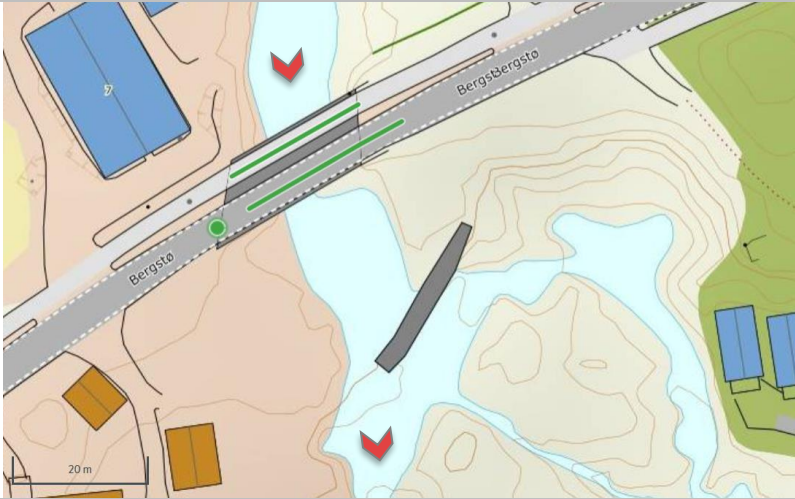

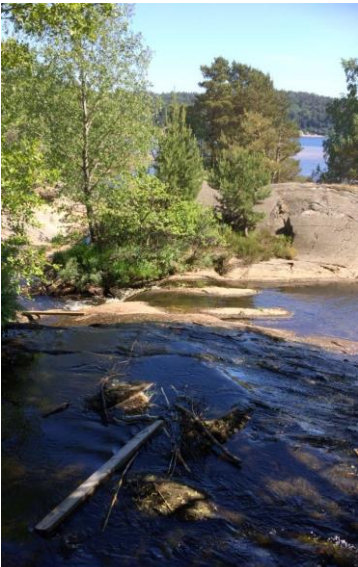

Konstruksjon og etableringsår	Bro, ukjent år
Vegreferanse	0900 EV18 HP19 m2928 – 2980
Regine-nummer	020.2Z
GPS-koordinater	58.263°N 8.344°Ø
Farbarhet bestemt av Statens Vegvesen 2013	God
Dato prøvetaking	07.06.18
Temperatur luft	Nedstrøms: 32.0°C. Oppstrøms: 32.0°C
Temperatur vann	Nedstrøms: 15.4°C. Oppstrøms: 15.4°C
Vær	Sol, sky
Vannføring	Middels vannstand, middels hastighet
Beskrivelse av hinder	Bro over elv, ingen hindring
Substrat	Sand, stein, kantvegetasjon. Overhengende planter og trær.
Observert fisk	Nei
Mengde vannprøve	1L
Avstand fra hinder	Nedstrøms: 0-50m. Oppstrøms: 0-50m.
Mengde vann filtrert	Nedstrøms: 300ml. Oppstrøms: 300ml

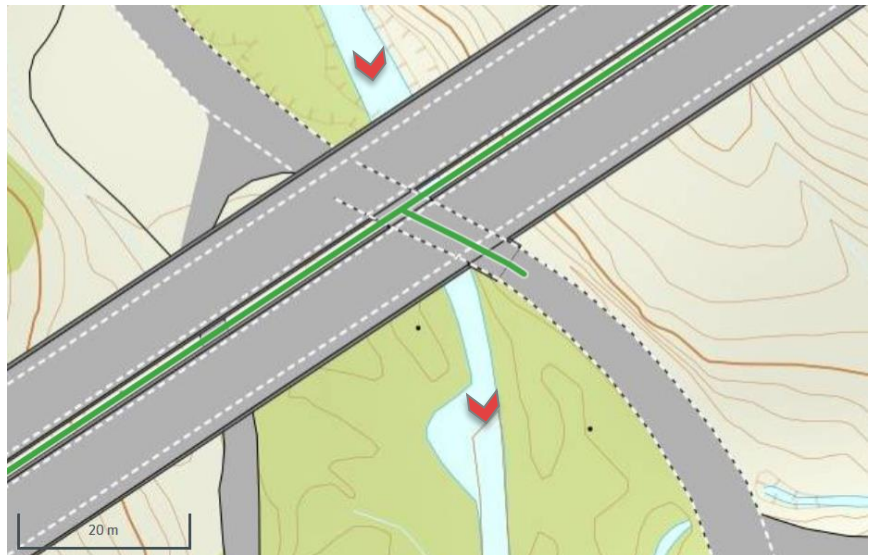


Moelva oppstrøms



Moelva nedstrøms

9. Tingsaker	
Kartdata (NVDB, 2018)	
Konstruksjon og etableringsår	Bru, ukjent år
Vegreferanse	926 36 HP201 m990-1012 0900 FV236 HP1 m1006-1020
Regine-nummer	0.20.2Z
GPS-koordinater	58.2552°N 8.3881°Ø
Farbarhet bestemt av Statens Vegvesen 2013	Ukjent. NB: Prøver ble tatt lengre nede i bekken, enn hva som ble vurdert av Statens vegvesen grunnet feiltolkning av kart.
Dato prøvetaking	07.06.18
Temperatur luft	Nedstrøms: 24.9°C. Oppstrøms: 24.9°C
Temperatur vann	Nedstrøms: 17.2°C. Oppstrøms: 16.6°C
Vær	Sol
Vannføring	Middels vannstand og hastighet. Raskere vannføring ned fra demning.
Beskrivelse av hinder	Demning. Vannet renner ned fjell og stein på den ene siden.
Substrat	Nedstrøms: Sjø, sand og siv. Oppstrøms: Sand, fjell, kantvegetasjon
Observert fisk	Nei
Mengde vannprøve	1L
Avstand fra hinder	Oppstrøms: 5-10m. Nedstrøms: 20m fra hinder.
Mengde vann filtret	Nedstrøms: 400ml. Oppstrøms: 400ml.
	
	
<p>Tingsaker oppstrøms</p>	
	
<p>Tingsaker mellomparti</p>	
	
<p>Tingsaker nedstrøms (sjø)</p>	

10. Fjelddalselva

Kartdata (NVDB, 2018)

Konstruksjon og etableringsår	Bro, ukjent år
Vegreferanse	0900 EV18 HP21 m40 - 425 0900 FV230 HP1 m2293 – 2302 0900 FV230 HP1 m2287 - 2293
Regine-nummer	020.223Z
GPS-koordinater	58.2348°N 8.2936°Ø
Farbarhet bestemt av Statens Vegvesen 2013	Meget god
Dato prøvetaking	07.06.18
Temperatur luft	Nedstrøms: 25.5°C. Oppstrøms: 23.3°C
Temperatur vann	Nedstrøms: 17.1°C. Oppstrøms: 17.1°C
Vær	Sol
Vannføring	Lav/middels hastighet og vannstand
Beskrivelse av hinder	Bro over bekk. Ved lav vannstand kan sementkant på tvers under bro lage et lite hinder.
Substrat	Stein i alle størrelser
Observert fisk	Nedstrøms
Mengde vannprøve	1L
Avstand fra hinder	Nedstrøms: 0-50m. Oppstrøms: 0-50m
Mengde vann filtrert	Nedstrøms: 330ml. Oppstrøms: 330ml.

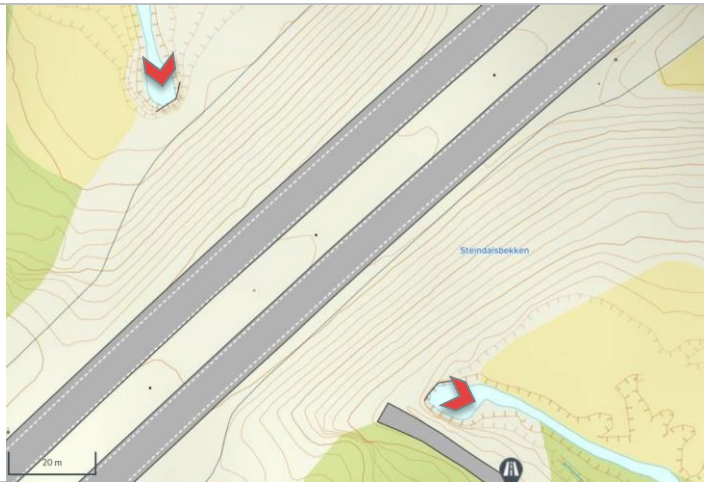


Fjelddalselva nedstrøms



Bro under E18-bro, Fjelddalselva

11. Steindalsbekken



Kartdata (NVDB, 2018)

Konstruksjon og etableringsår	Tunnel, ukjent år
Vegreferanse	0900 Ev18 hp21 m3255
Regine-nummer	020.211Z
GPS-koordinater	58.2227°N 8.2503°Ø
Farbarhet bestemt av Statens Vegvesen 2013	Meget god
Dato prøvetaking	Nedstrøms: 07.06.18. Oppstrøms: 17.06.18 (prøve oppstrøms måtte tas på nytt grunnet feiltolkning av kart)
Temperatur luft	Nedstrøms: 31.8°C. Oppstrøms: 30.4°C
Temperatur vann	Nedstrøms: 17.1°C. Oppstrøms: 13.6°C
Vær	Sol 07.06.18. Regn 17.06.18
Vannføring	Nedstrøms: Middels vannstand og hastighet. Oppstrøms: Middels vannstand, lav hastighet
Beskrivelse av hinder	Tunnel under E18
Substrat	Nedstrøms: Sand, dype kulper. Oppstrøms: Mer jord, smalere bekk. Jorder ender ved bekk opp- og nedstrøms
Observert fisk	Mange fisk nedstrøms og oppstrøms
Mengde vannprøve	1L
Avstand fra hinder	Nedstrøms: 0-150m. Oppstrøms: 0-100m
Mengde vann filtrert	Nedstrøms: 500ml. Oppstrøms: 600ml.



Steindalsbekken oppstrøms



Steindalsbekken nedstrøms

12. Urevann

Kartdata (NVDB, 2018)



Konstruksjon og etableringsår	Kulvert og fisketrapp, ukjent år
Vegreferanse	0926 Kv36 hp1 m816
Regine-nummer	020.3Z
GPS-koordinater	58.2032°N 8.2150°Ø
Farbarhet bestemt av Statens Vegvesen 2013	Lite god/ god (to hindre)
Dato prøvetaking	17.06.18
Temperatur luft	Nedstrøms: 13.8°C. Oppstrøms: 14.5°C
Temperatur vann	Nedstrøms: 17.0°C. Oppstrøms: 17.9°C
Vær	Regn
Vannføring	Middels vannstand og hastighet. Høy hastighet ned fisketrapp.
Beskrivelse av hinder	Rør under veg, ender i 10 m åpen bekk, som igjen går inn i rør og ender i fisketrapp nedstrøms.
Substrat	Stein og fjell. Kantvegetasjon av skog
Observert fisk	Nei
Mengde vannprøve	1L
Avstand fra hinder	Nedstrøms: 0-70m. Oppstrøms: 10m
Mengde vann filtrert	Nedstrøms: 600ml. Oppstrøms: 600ml






Urevann oppstrøms



Urevann mellomparti



Urevann nedstrøms (fisketrapp)

<p>13. Studedalen</p> <p>Kartdata (NVDB, 2018)</p>	
<p>Konstruksjon og etableringsår</p>	<p>Kulvert, ukjent år</p>
<p>Vegreferanse</p>	<p>1001 Sv1008 hp1 m101</p>
<p>Regine-nummer</p>	<p>020.3Z</p>
<p>GPS-koordinater</p>	<p>59.1988°N 8.1758°Ø</p>
<p>Farbarhet bestemt av Statens Vegvesen 2013</p>	<p>Lite god</p>
<p>Dato prøvetaking</p>	<p>17.06.18</p>
<p>Temperatur luft</p>	<p>Nedstrøms: 13.6°C. Oppstrøms: 14.3°C</p>
<p>Temperatur vann</p>	<p>Nedstrøms: 12.1°C. Oppstrøms: 12.7°C</p>
<p>Vær</p>	<p>Regn</p>
<p>Vannføring</p>	<p>Middels/lav vannstand, og lav hastighet</p>
<p>Beskrivelse av hinder</p>	<p>Langt plastrør (170 m ifølge Statens Vegvesen). Bygd mur av stein rundt. Liten diameter.</p>
<p>Substrat</p>	<p>Stein og jord. Kantvegetasjon av skog</p>
<p>Observert fisk</p>	<p>Nei</p>
<p>Mengde vannprøve</p>	<p>1L</p>
<p>Avstand fra hinder</p>	<p>Nedstrøms: 0-60m. Oppstrøms: 0-60m</p>
<p>Mengde vann filtrert</p>	<p>Nedstrøms: 500ml. Oppstrøms: 400ml</p>
	
<p>Studedalen oppstrøms</p>	<p>Studedalen nedstrøms</p>

14. Blegehåla

Kartdata (NVDB, 2018)



Konstruksjon og etableringsår	Kulvert, ukjent år
Vegreferanse	1000 RV41 HP2 m2223 (M)
Regine-nummer	020.AZZ
GPS-koordinater	58,236°N 8,128°Ø
Farbarhet bestemt av Statens Vegvesen 2013	Lite god
Dato prøvetaking	04.06.18
Temperatur luft	Nedstrøms: 20.6°C. Oppstrøms: 22.8°C
Temperatur vann	Nedstrøms: 15.1°C. Oppstrøms: 16.6°C
Vær	Sol
Vannføring	Svært lite vann gjennom rør. Bekken renner raskere lengre ned.
Beskrivelse av hinder	Kulvert ender omtrent ut i luften. Bekken renner ned i bratt steinrøys ned en dal, ender i en smal bekk. Diameter: 1500 mm
Substrat	Store stein
Observert fisk	Nei
Mengde vannprøve	1L
Avstand fra hinder	Nedstrøms: Hele prøven hentet i kulp ca 20 meter fra rør. Oppstrøms: 0-50 meter spredning
Mengde vann filtrert	Nedstrøms: 600ml. Oppstrøms: 600ml



Blegehåla oppstrøms



Blegehåla nedstrøms

15. Østerbekk	
	
Kartdata (NVDB, 2018)	
Konstruksjon og etableringsår	Kulvert, ukjent år
Vegreferanse	1000 RV41 HP2 m1878 (M)
Regine-nummer	020.A22
GPS-koordinater	58,2367°N 8,1288°Ø
Farbarhet bestemt av Statens Vegvesen 2013	God
Dato prøvetaking	04.06.18
Temperatur luft	Nedstrøms: 22.3°C. Oppstrøms: 24.1°C
Temperatur vann	Nedstrøms: 14.0°C. Oppstrøms: 14.0°C
Vær	Sol
Vannføring	Lite vann, middels/lav hastighet
Beskrivelse av hinder	Tunnel av steinblokker som ender i betongrør nedstrøms. 800 mm i diameter
Substrat	Store stein, slam/mudder
Observert fisk	Småfisk oppstrøms og nedstrøms
Mengde vannprøve	1L
Avstand fra hinder	Nedstrøms: 0-50 m spredning. Oppstrøms: 0-50 m spredning
Mengde vann filtrert	Nedstrøms: 800ml. Oppstrøms: 900ml.
	
<p style="text-align: center;">Østerbekk oppstrøms Østerbekk nedstrøms</p>	

16. Prestebekken

Kartdata (NVDB, 2018)


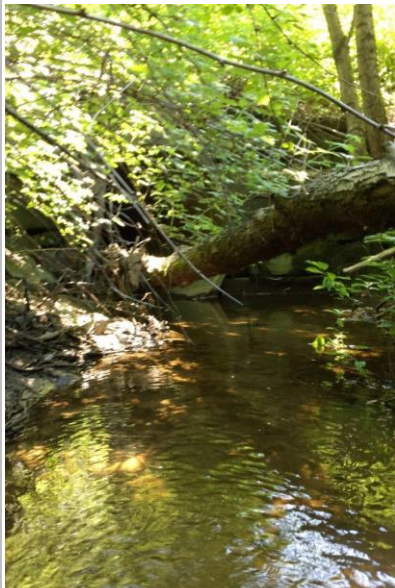


Konstruksjon og etableringsår	Kulvert, ukjent år
Vegreferanse	1000 Rv41 hp2 m712
Regine-nummer	020.A2Z
GPS-koordinater	58,2290°N 8,1165°Ø
Farbarhet bestemt av Statens Vegvesen 2013	Lite god
Dato prøvetaking	04.06.18
Temperatur luft	Nedstrøms: 23.7°C. Oppstrøms: 27.5°C
Temperatur vann	Nedstrøms: 21.2°C. Oppstrøms: 22.2°C
Vannføring	Oppstrøms: Vann/tjern omtrent stillestående. Nedstrøms: Lite vann gjennom rør, øker nedover.
Beskrivelse av hinder	To betongrør med medium/stor diameter. Nedstrøms skaper en bratt steinrøys hinder med den lave vannføringen.
Substrat	Nedstrøms: Fjell og stein, slimete. Veltet skog, busker og kratt over bekk. Oppstrøms: Vann med mudderbunn, samt siv/gress. Godt begrodd.
Observert fisk	Middels/store fisk oppstrøms
Mengde vannprøve	1L
Avstand fra hinder	Nedstrøms: 0-40m spredning. Oppstrøms: 0-20 m spredning
Mengde vann filtrert	Nedstrøms: 250ml. Oppstrøms: 250ml.



Prestebekken oppstrøms



Prestebekken nedstrøms

<p>17. Bøen</p> <p>Kartdata (NVDB, 2018)</p>		
Konstruksjon og etableringsår	Kulvert, ukjent år	
Vegreferanse	1000 Rg451 hp1 m8	
Regine-nummer	020.A21	
GPS-koordinater	58,2°N 8.09°Ø	
Farbarhet bestemt av Statens Vegvesen 2013	Lite god	
Dato prøvetaking	04.06.18	
Temperatur luft	Nedstrøms: 23.5°C. Oppstrøms: 22.0°C	
Temperatur vann	Nedstrøms: 14.2°C. Oppstrøms: 14.5°C	
Vær	Sol	
Vannføring	Middels vannstand og lav hastighet nedstrøms. Noe bedre oppstrøms.	
Beskrivelse av hinder	Betongrør under veg, medium diameter.	
Substrat	Nedstrøms: Mudder og jord. "Råttent" vann i enden av et jorde. Vann hentes opp for vanningsanlegg via rør. Oppstrøms: Mer stein, klarere vann. Skog ligger over bekken.	
Observert fisk	Små fisk oppstrøms	
Mengde vannprøve	1L	
Avstand fra hinder	Nedstrøms: 0-20m. Oppstrøms: 0-50m	
Mengde vann filtrert	Nedstrøms: 480ml. Oppstrøms: 500ml.	
		
Bøen oppstrøms	Bøen nedstrøms	Bøen nedstrøms

18. Vesbekken

Kartdata (NVDB, 2018)

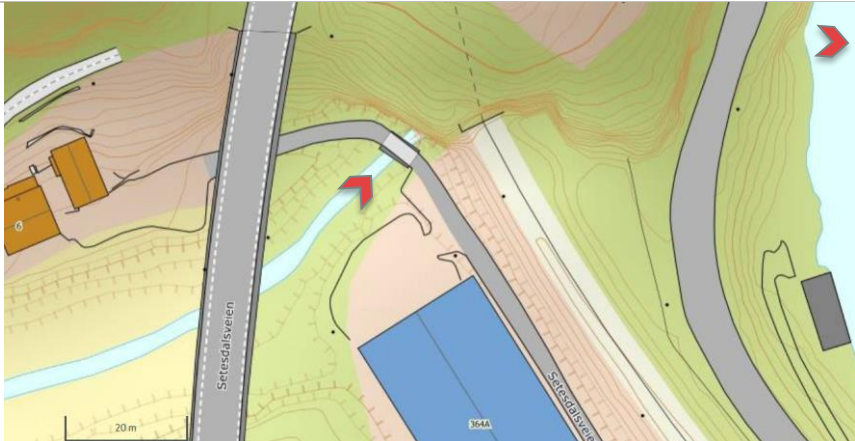


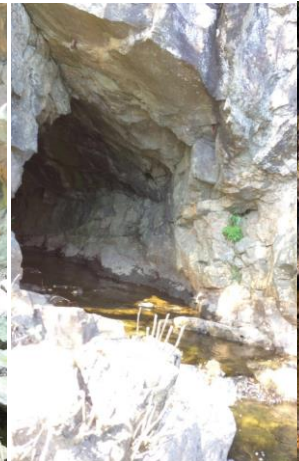

Konstruksjon og etableringsår	Tunnel, ukjent år
Vegreferanse	1000 Rv41 hp1 m4195
Regine-nummer	020.A1Z
GPS-koordinater	58.2031°N 8.0986°Ø
Farbarhet bestemt av Statens Vegvesen 2013	Meget god
Dato prøvetaking	04.06.18
Temperatur luft	Nedstrøms: 22.6°C. Oppstrøms: 21.7°C
Temperatur vann	Nedstrøms: 18.9°C. Oppstrøms: 18.9°C
Vær	Sol
Vannføring	Middels hastighet, middels/lav vannstand
Beskrivelse av hinder	Åpen, stor tunnel som ikke hindrer. Det er bygd demning av sandsekker ca. 15 meter oppstrøms for tunnel. Kan skape hinder ved lav vannstand.
Substrat	Mudder, sand og stein.
Observert fisk	Nei
Mengde vannprøve	1L
Avstand fra hinder	Nedstrøms: 10 m fra tunnel. Oppstrøms: 0-50 m.
Mengde vann filtrert	Nedstrøms: 400ml. Oppstrøms: 500ml.



Vesbekken oppstrøms



Vesbekken

<p>19. Augland</p> <p>Kartdata (NVDB, 2018)</p>			
<p>Konstruksjon og etableringsår</p>	<p>Tunnel, ukjent år</p>		
<p>Vegreferanse</p>	<p>1001 Pv17190 hp47 m110</p>		
<p>Regine-nummer</p>	<p>021.A21</p>		
<p>GPS-koordinater</p>	<p>58.20087°N 7.9254°Ø</p>		
<p>Farbarhet bestemt av Statens Vegvesen 2013</p>	<p>Meget god</p>		
<p>Dato prøvetaking</p>	<p>05.06.18</p>		
<p>Temperatur luft</p>	<p>Nedstrøms: 18.4°C. Oppstrøms: 14.3°C</p>		
<p>Temperatur vann</p>	<p>Nedstrøms: 17.6°C. Oppstrøms: 14.2°C</p>		
<p>Vær</p>	<p>Sol</p>		
<p>Vannføring</p>	<p>Middels hastighet, middels/lav vannstand</p>		
<p>Beskrivelse av hinder</p>	<p>Åpen stor tunnel</p>		
<p>Substrat</p>	<p>Stein og grus i bekk oppstrøms, renner ned i stor elv, Otra</p>		
<p>Observerte fisk</p>	<p>Stor og liten fisk nedstrøms i Otra</p>		
<p>Mengde vannprøve</p>	<p>1L</p>		
<p>Avstand fra hinder</p>	<p>Nedstrøms: 10m. Oppstrøms: 5m.</p>		
<p>Mengde vann filtrert</p>	<p>Nedstrøms: 800ml. Oppstrøms: 800ml</p>		
<div style="display: flex; justify-content: space-around;">     </div>			
<p>Augland oppstrøms elv</p>	<p>Augland oppstrøms tunnel</p>	<p>Augland nedstrøms tunnel</p>	<p>Augland utløp i Otra</p>

20. Øvre Strai



Kartdata (NVDB, 2018)

Konstruksjon og etableringsår	Kulvert, ukjent år
Vegreferanse	1000 RV9 HP3 m4050 (M)
Regine-nummer	021.A21
GPS-koordinater	58.2055°N 7.9251°Ø
Farbarhet bestemt av Statens Vegvesen 2013	Ukjent
Dato prøvetaking	06.06.18
Temperatur luft	Nedstrøms: 21.6°C. Oppstrøms: 21.1°C
Temperatur vann	Nedstrøms: 12.1°C. Oppstrøms: 12.4°C
Vær	Sol
Vannføring	Nedstrøms: Lite hurtigrennende vann, øker nedover. Oppstrøms: Middels vannstand og hastighet
Beskrivelse av hinder	Betongrør under veg, 1500 mm i diameter. Ender i bratt steinrøys, som skaper lite vann spredt nedover. Virker som stort hinder ved så lav vannstand. Nylig utbygging av område nedstrøms: stein/singel former bekken. Nytt hinder ca. 200 m ned: bekken ender i nytt rør under jernbanen.
Substrat	Nedstrøms: Stein, singel. Oppstrøms: Jord, sand
Observert fisk	Småfisk oppstrøms.
Mengde vannprøve	1L
Avstand fra hinder	Nedstrøms: 0-150m. Oppstrøms: 0-100m
Mengde vann filtrert	Nedstrøms: 380ml. Oppstrøms: 320ml



Øvre Strai oppstrøms

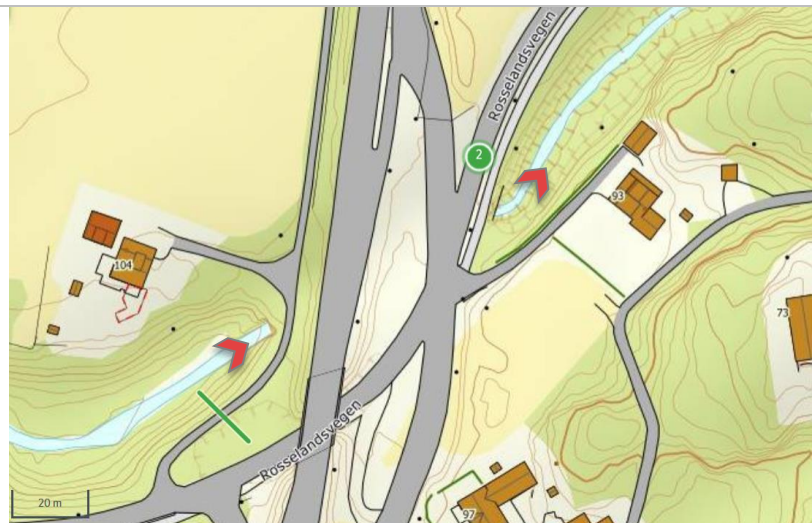


Øvre Strai nedstrøms (steinrøys)



Øvre Strai nedstrøms, bekk

21. Rosslandsbekken



Kartdata (NVDB, 2018)

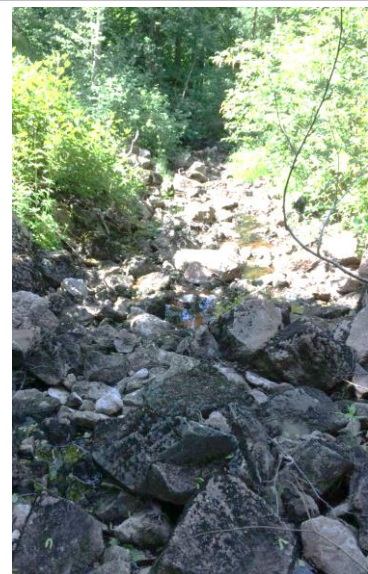
Konstruksjon og etableringsår	Kulvert, ukjent år
Vegreferanse	1000 Fg114 hp201 m1016
Regine-nummer	Ukjent
GPS-koordinater	58.1290°N 7.8554°Ø
Farbarhet bestemt av Statens Vegvesen 2013	Ikke vurdert
Dato prøvetaking	06.06.18
Temperatur luft	Nedstrøms: 18.8°C. Oppstrøms: 16.4°C
Temperatur vann	Nedstrøms: 13.2°C. Oppstrøms: 13.3°C
Vær	Sol/sky
Vannføring	Lav vannstand og vannføring
Beskrivelse av hinder	Betongrør, stor diameter. Mye stein nedstrøms kan være hinder ved svært lav vannstand
Substrat	Stein, mudder, sand, jord. Mye trær henger over bekk. Slimete/alger gjennom rør.
Observert fisk	Oppstrøms og nedstrøms
Mengde vannprøve	1L
Avstand fra hinder	Nedstrøms: 0-70m. Oppstrøms: 0-70m
Mengde vann filtrert	Nedstrøms: 300ml. Oppstrøms: 250ml.



Rosslandsbekken oppstrøms



Rosslandsbekken nedstrøms



Rosslandsbekken nedstrøms

22. Kleplandsbekken

Kartdata (NVDB, 2018)







Konstruksjon og etableringsår	Kulvert, ukjent år
Vegreferanse	1000 Fv166 hp1 m907 1018 Pv1710 hp3 m308
Regine-nummer	Ukjent
GPS-koordinater	58.1045°N. 7.8232°Ø
Farbarhet bestemt av Statens Vegvesen 2013	Ikke vurdert Omtalt i sener rapport av Statens vegvesen som "Betydelig bedret"
Dato prøvetaking	06.06.18
Temperatur luft	Nedstrøms: 17.2°C. Oppstrøms: 29.9°C
Temperatur vann	Nedstrøms: 13.4°C. Oppstrøms: 16.0°C
Vær	Sol
Vannføring	Omtrent stillestående oppstrøms, renner noe nedstrøms. Lav/middels vannstand
Beskrivelse av hinder	Rør med gitter. Kvist blokkerer rør oppstrøms
Substrat	Nedstrøms: Jord, stein, sand. Skittent/uklart vann, noe bedre enn oppstrøms. Skog rundt Oppstrøms: Mudder, jord, strå. Råttent vann. Bobler opp gass/luft når man trækker langs kanten av bekken. Noe begrodd. Jorde rundt
Observert fisk	Nedstrøms
Mengde vannprøve	1L
Avstand fra hinder	Nedstrøms: 0-100m. Oppstrøms: 0-10m
Mengde vann filtrert	Nedstrøms: 250ml. Oppstrøms: 200ml



Kleplandsbekken oppstrøms



Kleplandsbekken nedstrøms

<p>23. Mjålandsbekken</p> <p>Kartdata (NVDB, 2018)</p>		
Konstruksjon og etableringsår	Tunnel under fjell, ukjent år	
Vegreferanse	1000 Fv455 hp3 m9010	
Regine-nummer	Ukjent	
GPS-koordinater	58.2420°N 7.5117°Ø	
Farbarhet bestemt av Statens Vegvesen 2013	Ikke vurdert NIVA: Ikke vandringshinder. NIVA har vurdert lengre strekk av bekken. Prøver ble tatt ved første hinder før utløp i Mandalselva.	
Dato prøvetaking	16.06.18	
Temperatur luft	Nedstrøms: 19.1°C. Oppstrøms: 18.5°C	
Temperatur vann	Nedstrøms: 12.9°C. Oppstrøms: 12.5°C	
Vær	Sol, sky	
Vannføring	Nedstrøms: Høy vannstand og vannføring (Mandalselva). Oppstrøms: Høy vannstand, lav/stillestående hastighet/vann	
Beskrivelse av hinder	Grotte gjennom/under fjellet, som går under veg. Gitter oppstrøms	
Substrat	Nedstrøms: Stein, fjell. Oppstrøms: Dam omringet av fjell og skog, mer gress og planter. Går over til elv lengre oppstrøms.	
Observert fisk	Nedstrøms. Plask observert oppstrøms.	
Mengde vannprøve	1L	
Avstand fra hinder	Nedstrøms: 5m. Oppstrøms: 5m	
Mengde vann filtrert	Nedstrøms: 800ml. Oppstrøms: 350ml.	
		
Mjålandsbekken oppstrøms	Mjålandsbekken oppstrøms	M. nedstrøms, bekkeutløp

24. Smelandsbekken

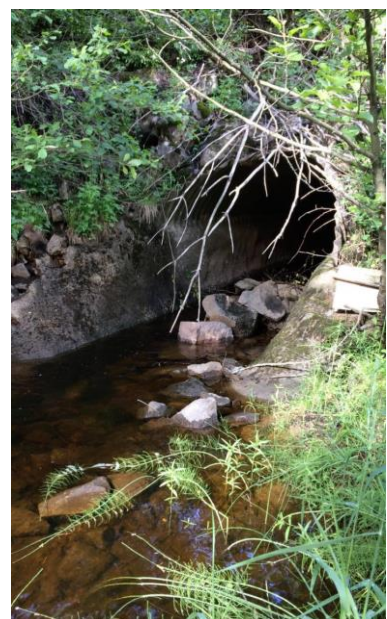
Kartdata (NVDB, 2018)



Konstruksjon og etableringsår	Kulvert, ukjent år
Vegreferanse	1000 Fv201 hp2 m13209
Regine-nummer	Ukjent
GPS-koordinater	58.1296°N. 7.5300°Ø
Farbarhet bestemt av Statens Vegvesen 2013	Ikke vurdert. NIVA: God ved prøvested, men gytegrus burde planeres ut
Dato prøvetaking	15.06.18
Temperatur luft	Nedstrøms: 15.6°C. Oppstrøms: 12.6°C
Temperatur vann	Nedstrøms: 15.6°C. Oppstrøms: 15.6°C
Vær	Sol, sky
Vannføring	Middels/lav vannstand og hastighet
Beskrivelse av hinder	Rør/tunnel av sement og metall
Substrat	Stein, mye kantvegetasjon. Omringet av jorder nedstrøms og skog opps.str.
Observert fisk	Nei
Mengde vannprøve	1L
Avstand fra hinder	Nedstrøms: 0-30m. Oppstrøms: 0-30m
Mengde vann filtrert	Nedstrøms: 250ml. Oppstrøms: 250ml.



Smelandsbekken oppstrøms



Smelandsbekken nedstrøms

25. Fodnebekken

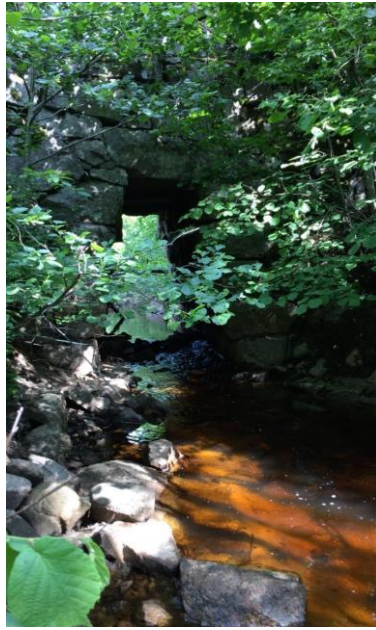


Kartdata (NVDB, 2018)

Konstruksjon og etableringsår	To broer, ukjent år
Vegreferanse	1000 Fv201 hp2 m12030
Regine-nummer	Ukjent
GPS-koordinater	58.1197°N. 7.5255°Ø
Farbarhet bestemt av Statens Vegvesen 2013	Ikke vurdert NIVA: God, men kan gjøres tiltak
Dato prøvetaking	15.06.18
Temperatur luft	Nedstrøms: 18.7°C. Oppstrøms: 14.6°C
Temperatur vann	Nedstrøms: 12.0°C. Oppstrøms: 11.6°C
Vær	Sol, sky
Vannføring	Lav/middels vannstand og hastighet
Beskrivelse av hinder	Tunnel av stein, samt bro av stein med ca. 15 meters mellomrom. Under broen ligger noen store stein som kan hindre farbarhet
Substrat	Sand og stein. Kantvegetasjon oppstrøms
Observert fisk	Liten fisk oppstrøms
Mengde vannprøve	1L
Avstand fra hinder	Nedstrøms: 5m. Oppstrøms: 0-50m
Mengde vann filtrert	Nedstrøms: 200ml. Oppstrøms: 200ml



Fodnebekken oppstrøms



Fodnebekken middelparti



Fodnebekken nedstrøms

26. Vådnebekken

Kartdata (NVDB, 2018)

Konstruksjon og etableringsår	Kulvert, ukjent år
Vegreferanse	1002 Pv99369 hp1 m28
Regine-nummer	Ukjent
GPS-koordinater	58.1022°N. 7.5307°Ø
Farbarhet bestemt av Statens Vegvesen 2013	Ikke vurdert NIVA: God
Dato prøvetaking	15.06.18
Temperatur luft	Nedstrøms: 16.4°C. Oppstrøms: 17.0°C
Temperatur vann	Nedstrøms: 13.6°C. Oppstrøms: 13.6°C
Vær	Sol, sky
Vannføring	Middels vannstand og hastighet. Ender i dam opp- og nedstrøms
Beskrivelse av hinder	Betongrør, medium diameter
Substrat	Stein i alle størrelser. Kantvegetasjon. Jorde oppstrøms, dam som er begrodd av ulike plantearter
Observert fisk	Nei
Mengde vannprøve	1L
Avstand fra hinder	Nedstrøms: 0-40m. Oppstrøms: 0-40m
Mengde vann filtrert	Nedstrøms: 200ml. Oppstrøms: 200ml



Vådnebekken oppstrøms, dam



Vådnebekken oppstrøms



Vådnebekken nedstrøms

Resultat av Sangersekvensering for individ A-J

Resultat av Sangersekvensering utført av Eurofins for referansesequenser A-J. Variasjoner i baser mellom individene er markert med gult.

```

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                10          20          30          40          50
Ål:A  ACTCCCAAAG CTGAGATCAT AAACCTAGACC ACCCTCTGAA ACATACATTA
Ål:B  ACTCCCAAAG CTGAGATCAT AAACCTAGACC ACCCTCTGAA ACATACATTA
Ål:C  ACTCCCAAAG CTGAGATCAT AAACCTAGACC ACCCTCTGAA ACATACATTA
Ål:D  ACTCCCAAAG CTGAGATCAT AAACCTAGACC ACCCTCTGAA ACATACATTA
Ål:E  ACTCCCAAAG CTGAGATCAT AAACCTAGACC ACCCTCTGAA ACATACATTA
Ål:F  ACTCCCAAAG CTGAGATCAT AAACCTAGACC ACCCTCTGAA ACATACATTA
Ål:G  ACTCCCAAAG CTGAGATCAT AAACCTAGACC ACCCTCTGAA ACATACATTA
Ål:H  ACTCCCAAAG CTGAGATCAT AAACCTAGACC ACCCTCTGAA ACATACATTA
Ål:I  ACTCCCAAAG CTGAGATCAT AAACCTAGACC ACCCTCTGAA ACATACATTA
Ål:J  ACTCCCAAAG CTGAGATCAT AAACCTAGACC ACCCTCTGAA ACATACATTA

```

```

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                60          70          80          90          100
Ål:A  TGGTCTACTA CTATGCCTGT ATGTATTATA TTACATATTA TGTATTATAT
Ål:B  TGGCCTACTA CTATGCCTGT ATGTATTATA TTACATATTA TGTATTATAT
Ål:C  TGGTCTACTA CTATGCCTGT ATGTATTATA TTACATATTA TGTATTATAT
Ål:D  TGGTCTACTA CTATGCCTGT ATGTATTATA TTACATATTA TGTATTATAT
Ål:E  TGGCCTACTA CTATGCCTGT ATGTATTATA TTACATATTA TGTATTATAT
Ål:F  TGGTCTACTA CTATGCCTGT ATGTATTATA TTACATATTA TGTATTATAT
Ål:G  TGGTCTACTA CTATGCCTGT ATGTATTATA TTACATATTA TGTATTATAT
Ål:H  TGGTCTACTA CTATGCCTGT ATGTATTATA TTACATATTA TGTATTATAT
Ål:I  TGGCCTACTA CTATGCCTGT ATGTATTATA TTACATATTA TGTATTATAT
Ål:J  TGGTCTACTA CTATGCCTGT ATGTATTATA TTACATATTA TGTATTATAT

```

```

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                110         120         130         140         150
Ål:A  TACATACATA TATTTACTAG TACATTACAT GAAAACCTGAC ATAATTTAAT
Ål:B  TACATACATA TATTTACTAG TACATTACAT GAAAACCTAAC ATAATTTAAT
Ål:C  TACATACATA TATTTACTAG TACATTACAT GAAAACCTGAC ATAATTTAAT
Ål:D  TACATACATA TATTTACTAG TACATTACAT GAAAACCTAAC ATAATTTAAT
Ål:E  TACATACATA TATTTACTAG TACATTACAT GAAAACCTAAC ATAATTTAAT
Ål:F  TACATACATA TATTTACTAG TACATTACAT GAAAACCTAAC ATAATTTAAT
Ål:G  TACATACATA TATTTACTAG TACATTACAT GAAAACCTAAC ATAATTTAAT
Ål:H  TACATACATA TATTTACTAG TACATTACAT GAAAACCTAAC ATAATTTAAT
Ål:I  TACATACATA TATTTACTAG TACATTACAT GAAAACCTAAC ATAATTTAAT
Ål:J  TACATACATA TATTTACTAG TACATTACAT GAAAACCTAAC ATAATTTAAT

```

```

      ....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
                160         170         180         190         200
Ål:A  GTACATGCTA AATACAATGT AATATAACCA ATAAAATATG TAAAAATCAA
Ål:B  GTACATCCTA AATATAAATGT AATATAACCA ATAAAATATG TAAAAATCAA
Ål:C  GTACATGCTG AATATAAATGT AATATAACCA ATAAAATATG TAAAAATCAA
Ål:D  GTACATGCTG AATATAAATGT AATATAACCA ATAAAATATG TAAAAATCAA
Ål:E  GTACATCCTG AATATAAATGT AATATAACCA ATAAAATATG TAAAAATCAA
Ål:F  GTACGTGCTG AATACAATGT AATATAACCA ATAAAATATG TAAAAATCAA
Ål:G  GTAAATGCTG AATACAATGT AATATAACCA ATAAAATATG TAAAAATCAA

```

Ål:H GTACATGCTG AATACAATGT AATATAACCA ATAAAATATG TAAAAATCAA
 Ål:I GTACATCCTG AATATAATGT AATATAACCA ATAAAATATG TAAAACTCAA
 Ål:J GTACATGCTG AATACAGTGT AATATAACCA ATAAAATATG TAAAAATCAA

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 210 220 230 240 250

Ål:A TAATATGTAA AATATTATCC AATTTACAAA CATTATATAA TAAACACAAT
 Ål:B TAATATGTAA AATATTATCC AACCTTACAAA CATTATATAA TAAAGCATAAC
 Ål:C TAATATGTAA AATATTATCC AACCTTACAAA AATTTATATAA TAAACATAAC
 Ål:D TAATATGTAA AATATTATCC AATTTACAAA CATTATATAA TAAACATAAT
 Ål:E TAATATGTAA AATATTATCC AACCTTACAAA CATTATATAA TAAACATAAC
 Ål:F TAATATGTAA AATATTATCC AACCTTACAAA AATTTATATAA TAAACATAAC
 Ål:G TAATATGTAA AATATTATCC AACCTTACAAA CATTATATAA TAAACATAAC
 Ål:H TAATATGTAA AATATTATCC AACCTTACAAA CATTATATAA TAAACATAAC
 Ål:I TAATATGTAA AATATTATCC AACCTTACAAA CATTATATAA TAAACATAAC
 Ål:J TAATATGTAA AATATTACCT AACCTTACAAA TATTTATATAA TAAACACAAC

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 260 270 280 290 300

Ål:A AAGGTTAAAA AACATTTATG TTTAATACAT AAACCAAGAC ATACATAATA
 Ål:B AAAGTTAAAA AACATTTATG TTTAATACAT AAACCAAGAC ATACATAATA
 Ål:C AAAGTTAAAA AACATTTATG TTTAATACAT AAACCAAGAC ATACATAATA
 Ål:D AAAGCTAAAA AACATTTATG TTTAATACAT AAACCAAGAC ATACATAATA
 Ål:E AAAGTTAAAA AACATTTATG TTTAATACAT AAACCAAGAC ATACATAATA
 Ål:F AAAGTTAAAA AACATTTATG TTTAATACAT AAACCAAGAC ATACATAATA
 Ål:G AAGGTTAAAA AACATTTATG CTTAATACAT GAACCAAGAC ATACATAATA
 Ål:H AAGATTAAAA AACATTTATG CTTAATACAT GAACCAAGAC ATACATAATA
 Ål:I AAAGTTGAAA AACATTTATG TTTAATACAT AAACCAAGAC ATACATAATA
 Ål:J AAAGTTAAAA AACATTTATG TTTAATACAT AAACCAAGAC ATACATAATA

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 310 320 330 340 350

Ål:A CATTACACTA GAAACCAACA TGAACCTCCTA AACACGGAAA GAAAAATCCTT
 Ål:B CATTACTACTA GAAACCAACA TGAACCTCCTA AACACGGAAA GAAAAATCCTT
 Ål:C CATTACGCTA GAAACCAACA TGAACCTCCTA AACACGGAAA GAAAAATCCTT
 Ål:D CATTACACTA GAAACCAACA TGAACCTCCTA AACACGGAAA GAAAAATCCTT
 Ål:E CATTACTACTA GAAACCAACA TGAACCTCCTA AACACGGAAA GAAAAATCCTT
 Ål:F CATTACGCTA GAAACCAACA TGAACCTCCTA AACACGGAAA GAAAAATCCTT
 Ål:G CATTACAATA GAAACCAACA TGAACCTCCTA AACACGGAAA GAAAAATCCTT
 Ål:H CATTACAATA GAAACCAACA TGAACCTCCTA AACACGGAAA GAAAAATCCTT
 Ål:I CATTACTACTA GAAACCAACA TGAACCTCCTA AACACGGAAA GAAAAATCCTT
 Ål:J CATTACGCTA GAAACCAACA TGAACCTCCTA AACACGGAAA GAAAAATCCTT

.....|.....||.....||.....||.....||.....|
 360 370 380 390 400

Ål:A GATCTAGCTG TAAACTATCA CCCCATATT CCTATGTTCA AATCAACATT
 Ål:B GATCCAGCTG TAAACTATCA TCCCCTATT CCTATGTTCA AACCAACATT
 Ål:C GATCCAGCTG TAAACTATCA TCCCCTATT CCTATGTTCA AATCAACATT
 Ål:D GATCCAGCTG TAAACTATCA CCCCATATT CCTATGCTCG AATCAACATT
 Ål:E GATCCAGCTG TAAACTATCA TCCCCTATT CCTATGTTCA AACCAACATT
 Ål:F GATCCAGCTG TAAACTATCA TCCCCTATT CCTATGTTCA AATCAACATT
 Ål:G GATCCAGCTG TAAACTATCA CCCCATATT CCTATGTTCA AACCAACATT
 Ål:H GATCCAGCTG TAAACTATCA CCCCATATT CCTATGTTCA AACCAACATT
 Ål:I GATCCAGCTG TAAACTATCA TCCCCTATT CCTATGTTCA AACCAACATT

Ål: J	GATCTAGCTG	TAAACTATCA	TCCCCATATT	CCTATGTTCA	AATCAACATT

	410	420	430	440	450
Ål: A	AAAATCAGTA	AAACAGCTAA	ATGTAATAAG	AGATCACCAA	CCAAATAAAT
Ål: B	AAAATCAGTA	AAACAGCTAA	ATGTAATAAG	AGATCACCAA	CCAAATAAAT
Ål: C	AAAATCAGTA	AAACAGCTAA	ATGTAATAAG	AATCACCAA	CCAAATAAAT
Ål: D	AAAATCAGTA	GAACAGTTGA	ATGTAATAAG	AGATCACCAA	CCAAAATAAA
Ål: E	AAAATCAGTA	AAACAGCTAA	ATGTAATAAG	AGATCACCAA	CCAAATAAAT
Ål: F	AAAATCAGTA	AAACAGCTAA	ATGTAATAAG	AATCACCAA	CCAAATAAAT
Ål: G	AAAATCAGTA	AAACAGTTAA	ACGCAATAAG	AGATCACCAA	CCAAATAAAT
Ål: H	AAAATCAGTA	AAACAGTTAA	ATGTAATAAG	AGATCACCAA	CCAAATAAAT
Ål: I	AAAATCAGTA	AAACAGCTAA	ATGTAATAAG	AGATCACCAA	CCAAATAAAT
Ål: J	AAAATCAGTA	AAACAGCTAA	ATGTAATAAG	AGATCACCAA	CCAAATAAAT

	460	470	480	490	500
Ål: A	CAAGTGAAT~	ACGTTTATTG	ATAATCAAGG	ACAGTAATTG	TAGAATCGCA
Ål: B	CAAGTGAAT~	ACGTTTATTG	ATAATCAAGG	ACAGTAATTG	TAAAGTTGCA
Ål: C	CAAGTGAAC~	ACGTTTATTG	ATAATCAAGG	ACAGTAATTG	TAGAATTTGCA
Ål: D	TCAAGTGAAT	ACGTTTATTG	ATAATCAGGG	ACAGTAATTG	TAGAATTTGCA
Ål: E	CAAGTGAAT~	ACGTTTATTG	ATAATCAAGG	ACAGTAATTG	TAAAGTTGCA
Ål: F	CAAGTGAAC~	ACGTTTATTG	ATAATCAAGG	ACAGTAATTG	TAGAATTTGCA
Ål: G	CAAGTGAAT~	ACGTTTATTG	ATAATCAGGG	ACAGTGATTG	TAGAATTTGCA
Ål: H	CAAGCGAAT~	ACGTTTATTG	ATAATCAGGG	ACAGTGATTG	TAGAATTTGCA
Ål: I	CAAGTGAAT~	ACGTTTATTG	ATAATCAAGG	ACAGTAATTG	TAAAGTTGCA
Ål: J	CAAGTGAAT~	ACGTTTATTG	ATAGTCAAGG	ACAATAATTG	TAGATTCGCA

	510	520	530	540	550
Ål: A	TAAAATGAAC	TATTACTGGC	ATTTGGCTCC	TATTCAGGT	CCCCACATCT
Ål: B	TAAAATGAAC	TATTACTGGC	ATTTGGCTCC	TATTCAAAGT	CCCCACATTT
Ål: C	TAAAATGAAC	TATTACTGGC	ATTTGGCTCC	TATTCAGGG	CCCCACATCT
Ål: D	TAAAATGAAC	TATTACTGGC	ATTTGGCTCC	TATTCAGGT	CCCCACATCT
Ål: E	TAAAATGAAC	TATTACTGGC	ATTTGGCTCC	TATTCAAAGT	CCCCACATTT
Ål: F	TAAAATGAAC	TATTACTGGC	ATTTGGCTCC	TATTCAGGG	CCCCACATCT
Ål: G	TAAAATGAAC	TATTACTGGC	ATTTGGCTCC	TATTCAGGT	CCCCACATTT
Ål: H	TAAAATGAAC	TATTACTGGC	ATTTGGCTCC	TATTCAGGT	CCCCACATCT
Ål: I	TAAAATGAAC	TATTACTGGC	ATCTGGCTCC	TATTCAAAGT	CCCCACATCT
Ål: J	TAAAATGAAC	TATTACTGGC	ATTTGGCTCC	TATTCAGGT	CCCCACATCT

	560	570	580	590	600
Ål: A	ATGAATTCCC	CATAACTTGA	ATTATATCTG	GCATCTGGTT	AATGGTATTA
Ål: B	ATAAATTCCC	CATAATTTGA	ATTATATCTG	GCATCTGGTT	AATGGTATAG
Ål: C	ACGAATTCCC	CATAATTTGA	ATTATATCTG	GCATCTGGTT	AATGGTATAG
Ål: D	ATGAATTCCC	CATAATTTGA	ATTATATCTG	GCATCTGGTT	AATGGTATAG
Ål: E	ATAAATTCCC	CATAATTTGA	ATTATATCTG	GCATCTGATT	AATGGTATAG
Ål: F	ATGAATTCCC	CATAATTTGA	ATTATATCTG	GCATCTGGTT	AATGGTATAG
Ål: G	ATGAATTCCC	CATAACTTGA	ATTATATCTG	GCATCTGGTT	AATGGTATAG
Ål: H	ATGAATTCCC	CATAACTTGA	ATTATATCTG	GCATCTGGTT	AATGGTATAG
Ål: I	ATAAAT~CCC	CATAATTTGA	ATTATATCTG	GCATCTGGTT	AATGGTATAG
Ål: J	ATGGATTCCC	CATAACTTGA	ATTATATCTG	GCATCTGGTT	AATGGTATAA

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          610          620          630          640          650
Ål:A  TACATTAGAC TCGTTACTCA CCAAGCCGAG CATTAATTTA TAGGCATTTA
Ål:B  TACATTAGAC TCGTTACTCA CCAAGCCGGG CGTTAATTTA TAGGCATTTG
Ål:C  TACATTAGAC TCGTTACTCA CCAAGCCAAG CATTAATTTA TAGGCATTTA
Ål:D  TACATTAAAC TCGTTACCA CCAAGCCGAG CATTAATTTA TAGGCATTTA
Ål:E  TACATTAGAC TCGTTACTCA CCAAGCCGGG CGTTAATTTA TAGGCATTTG
Ål:F  TACATTAGAC TCGTTACTCA CCAAGCCGAG CATTAATTTA TAGGCATTTA
Ål:G  TACATTAAAC TCGTTACTCA CCAAGCCGAG CATTAATTTA TAGGCATTTG
Ål:H  TACATTAGAC TCGTTACTCA CCAAGCCGAG CATTAATTTA TAGGCATTTA
Ål:I  TACATTAGAC TCGTTACTCA CCAAGCCGGG CATTAATTTA TAGGCATTTG
Ål:J  TACATTAGAC TCGTTACTCA CCAAGCCGAG CATTAATTTA TAGGCATTTG

```

```

.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....|
          660          670          680          690          700
Ål:A  GTATTTTTTTT TT~GGTTTCC TTTTCATTTTA CATGTGAGAC ACCTTCAAAA.
Ål:B  GTATTTTTTTT TT~GGTTTCC TTTTCATTTTA CATGTGAGAC ACCTCAA...
Ål:C  GTATTTTTTTT TT~GGTTTCC TTTTCATTTTA CATGTGAGAC ACCTTCAAAA.
Ål:D  GTATTTTTTTT TT~GGTTTCC TTTTCATTTTA CATGTGAGAC ACCTTCAAAA
Ål:E  GTATTTTTTTT TTTGGTTTCC TTTTCATTTTA CATGTGAGAC ACCTTCTAAA
Ål:F  GTATTTTTTTT TTTGGTTTCC TTTTCATTTTA CATGTGAGAC ACCTTCTAAA
Ål:G  GTATTTTTTTT TTTGGTTTCC TTTTCATTTTA CATGTGAGAC CCTCAAAA..
Ål:H  GTATTTTTTTT TT~GGTTTCC TTTTCATTTTA CATGTGAGAC ACCTCAA...
Ål:I  GTATTTTTTTT TTTGGTTTCC TTTTCATTTTA CATGTGAGAA CTAAAAAT..
Ål:J  GTATTTTTTTT TTTGGTTTCC TTTTCATTTTA CATGTGAGCA CTAAAGAAAT.

```