

Kartlegging av biodiversitet av fisk i Raet nasjonalpark ved hjelp av eDNAanalyse

MIKAL NILSEN

VEILEDER

Førsteamanuensis Audun Slettan

Universitetet i Agder, 2020

Fakultet for teknologi og realfag

Institutt for naturvitenskapelige fag

Master

© Mikal Nilsen 2020

UiA Masteroppgave i Kystsoneøkologi

Innlevert som oppgave i emnet: BIO501 Masteroppgave, våren 2020, under veiledning av Førsteamanuensis Audun Slettan

Alle rettigheter reservert. Ingen deler av denne oppgaven kan kopieres uten tillatelse fra forfatteren. Masteroppgaven er gjennomført som et ledd i utdanningen ved Universitetet i Agder og er godkjent som en del av utdanningen. Denne godkjenningen innebærer ikke at universitetet inestår 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>

© 2020 Mikal Nilsen

Denne avhandlingen representerer 60 studiepoeng

Forord

Jeg ønsker å takke min veileder, førsteamanuensis Audun Slettan for verdifull veiledning på laboratoriet og gjennom hele skriveprosessen. En stor takk går også til nasjonalparkforvalter i Raet nasjonalpark Jenny Marie Guldbrandsen og fylkesmannen i Agder for forslaget om å lage en oppgave om eDNAanalyse i Raet nasjonalpark, og for søknad og tildeling av midler til prosjektet. Takk til Morten Mattingsdal for hjelp og veiledning med behandling av sekvenseringsdata. Jeg vil rette en takk til Universitetet i Agder for lån av laboratoriefasiliteter og utstyr. En takk går også til Ida Kristin Mellerud og Halvor Knudsen ved Havforskningsinstituttet på Flødevigen for hjelp med lån av båt til utføring av feltarbeid, samt lån av laboratoriefasiliteter. Jeg vil takke Terje Jåvoll, som tok meg med på tokt med G.M. Dannevig. En generell takk går også til Havforskningsinstituttet for tilgang på data fra strandnottoktet høsten 2019. Til slutt vil jeg gjerne takke mine medstudenter og venner Kurt Johansen, Silje Halvorsen og Daniel Molnes Hole som var med meg ut i felt for å ta vannprøver.

Sammendrag

Raet nasjonalpark strekker seg over mesteparten av kystlinjen utenfor Grimstad, Arendal og Tvedestrand kommuner og har et totalareal på 607 km². 98,5 % av dette arealet er sjø og omfatter mange ulike undersjøiske naturtyper. Noen av disse naturtypene kan fungere som gyte- og leveområder for et rikt mangfold av fisk, men lite er gjort for å overvåke biodiversiteten hos fisk i nasjonalparken. Fisk er vanskelig å observere i sitt naturlige habitat, og tradisjonelle overvåkingsmetoder er ofte invasive, selektive og kostbare. eDNAanalyse er et verktøy med stort potensiale i overvåkning av arter og biodiversitet i miljøer hvor tradisjonelle overvåkningsmetoder er krevende å utføre. I denne oppgaven ble det utforsket muligheten for å beskrive biodiversiteten av fisk i Raet nasjonalpark ved eDNAanalyse. 12 vannprøver fra 8 ulike lokaliteter i og ved Raet nasjonalpark ble analysert ved hjelp av PCR med universelle primere og nestegenerasjonssekvensering. 8 av disse prøvene ble tatt mellom 0-1 meter under overflaten fra hver lokalitet, mens de resterende 4 prøvene ble tatt ved 10, 50, 100 og 140 meters dyp ved en av lokalitetene. Totalt fra disse vannprøvene ble 23 fiskearter detektert. Det var stor variasjon mellom hvor mange arter som ble detektert fra de ulike lokalitetene og fra de ulike dypene. Dette viser potensialet eDNAanalyse har til å beskrive biodiversiteten hos fisk, selv på en relativt lokal skala. Mange av artene som ble detektert var arter som tidligere hadde blitt påvist i Raet nasjonalpark, men noen av artene hadde derimot ikke før blitt påvist i nasjonalparken. Mange av disse artene har sitt egentlige opphav i Stillehavet, men har nære slektninger i norske farvann. Dette kan tyde på at feil arter har blitt identifisert, men en grundigere gjennomgang av sekvenseringsdataene må til for å undersøke dette. Resultatene fra eDNAanalysen av en av vannprøvene ble sammenliknet med data fra en mer tradisjonell metode utført ved den samme lokaliteten. Flere arter ble funnet med eDNAanalyse, men kun 2 av artene overlappet med den mer tradisjonelle metoden. Dette betyr at det fortsatt er arter som ikke ble detektert ved hjelp av eDNAanalyse, og at metoden burde videreutvikles. Selv om videre studier burde gjøres for å validere og videreutvikle metoden, viser resultatene i denne oppgaven at eDNAanalyse har et stort potensiale når det kommer til å beskrive biodiversiteten hos fisk i havet.

Abstract

Raet national park stretches over most of the coastline outside of Grimstad, Arendal and Tvedestrand municipalities, and has a total area of 607 km². 98,5 % of this area is ocean and contains many different underwater nature types. Some of these nature types work as breeding and living areas for a rich diversity of fishes, although little effort is done to monitor the biodiversity of fish in the national park. Fishes are difficult to observe in their natural habitat, and traditional monitoring methods are often invasive, selective and expensive. eDNA analysis is a tool with great potential in monitoring species and biodiversity in environments where traditional methods are difficult to use. In this thesis I explore the possibility to describe the biodiversity of fishes in Raet national park using eDNA analysis. 12 water samples from 8 different locations in and around Raet national park was analysed using PCR with universal primers and next-generation sequencing. 8 of these samples was taken from 0-1 meter below the surface, while the remaining 4 was taken at 10, 50, 100, 140 meters depths at one of the locations. A total of 23 fish species was detected from these water samples. Large variations between the number of species detected at the different locations and the different depths was revealed. This shows the potential for eDNA analysis to describe the biodiversity of fish species, even at a local scale. Many of the species detected had previously been spotted in Raet national park. However, a number of the species detected has not previously been discovered in the national park. Many of these species originate in the Pacific Ocean but have close relatives in Norwegian waters. This may suggest that some of the species have been detected incorrectly, however a closer inspection of the sequence data is necessary to examine this further. The results of the eDNA analysis of one of the samples was compared to data from a more traditional sampling method used in the same location. A higher number of species was detected using eDNA analysis, however only 2 species overlap with the more traditional method. This suggest that there are still species that was not detected by eDNA analysis, and that the method should be developed further. Even if the method should be studied and developed further, the results of this thesis show that eDNA analysis have great potential in describing the biodiversity of fishes in the ocean.

Innhold

Introduksjon	8
Raet nasjonalpark	8
Bevaringssoner i Tvedestrand kommune	9
Overvåking av fiskebestander	9
eDNA.....	10
Analyse av eDNA fra vannprøver	12
Utfordringer ved bruk av eDNAanalyse	14
Problemstilling.....	16
Materiale og metoder	17
Lokalitetsbeskrivelse	17
Lokalitet A – Hengsholmen (58.612°N, 009.082°Ø)	17
Lokalitet B – Furuøya (58.603°N, 008.933°Ø)	18
Lokalitet C – Alvekilen (58.466°N, 008.874°Ø).....	18
Lokalitet D – Hovekilen (58.435°N, 008.823°Ø)	18
Lokalitet E – Flødeviga (58.426°N, 008.752°Ø)	18
Lokalitet F – Gjervoldsøy/Klauva (58.414°N, 008.740°Ø).....	18
Lokalitet G – Sømskilen (58.397°N, 008.713°Ø)	19
Lokalitet H – Dypvannsprøver (58.395°N, 008.761°Ø).....	19
Vannprøveinnsamling	19
Overflateprøver	19
Dypvannsprøver	19
Filtrering og isolasjon.....	20
Filtrering av vannprøver	20
Isolering av DNA	20
PCR og Agarose Gel.....	21
Måling av DNAkonsentrasjon i PCRprodukt.....	22
Rensing av PCRprodukt	23
Forberedelse av PCRprodukter og Nanoporesekvensering	23
Barcoding	23

DNAreparering og endepreparering	25
Adapterligering og «clean-up»	25
DNAsekvensering med Nanopore	26
Analyse av sekvenseringsdata	27
Strandnotdata	27
Resultater	28
 DNAamplifisering ved PCR og agarosegel.....	28
 Sekvenseringsdata	28
 Sammenlikning av strandnotdata og sekvenseringsresultater	37
Diskusjon.....	40
Konklusjon.....	50
Referanser	51

Introduksjon

Raet nasjonalpark

Raet nasjonalpark, som ble opprettet av Kongen i statsråd 16. desember 2016, ligger i ytre skjærgård i Grimstad, Arendal og Tvedestrand kommuner (Forskrift om vern av Raet nasjonalpark, 2016; Prosjektgruppa for Raet nasjonalpark, 2016). Nasjonalparken strekker seg fra Lyngør i Tvedestrand kommune i nordøst til Valøyene utenfor Fevik i Grimstad kommune i sørvest, og yttergrensen i sjøen strekker seg 12 nautiske mil utenfor grunnlinjen på det bredeste. Dette gir et totalareal på ca. 607 km², hvorav omtrent 589,7 km² er sjøareal. Nasjonalparken består av landarealer, øyer, holmer og skjær, og i sjøen er både overflaten, vannsøylen og bunnen omfattet av nasjonalparken.

Sjøområdene står for omtrent 98,5 % av arealet i nasjonalparken (Prosjektgruppa for Raet nasjonalpark, 2016). Det meste av dette omfatter relativt åpen og bølgeeksponert kyst, men større beskyttede områder er også representert i verneområdet. Det er mange ulike undersjøiske naturtyper representert i nasjonalparken. Den mest karakteristiske av disse er selve raet, et av de mest kjente israndmorenene i Norge. Dette er rygger av sand, grus og stein som har blitt hauget opp av isbreer, og lagt igjen når breen har trukket seg tilbake (Direktoratet for Naturforvaltning, 2007). Moreneryggen skaper en heterogen bunntype med hulrom, vegger og flater. Dette gir grobunn for et rikt arts mangfold, og tareskog er dominerende i store deler av det undersjøiske raet.

I le av randmorenene er det forekomster av grunne skjellsandflater, mudderbunner og undersjøiske enger, vanligvis dominert av ålegras (Prosjektgruppa for Raet nasjonalpark, 2016). Skjellsanden, som dannes av avsetninger fra skjell og andre kalkdannende organismer, avsettes hovedsakelig ute i skjærgården på lesiden av skjær og holmer (Direktoratet for Naturforvaltning, 2007).

Bløtbunnen i strandsonen består av mudder, med partikler av leire, silt og sand (Direktoratet for Naturforvaltning, 2007; Prosjektgruppa for Raet nasjonalpark, 2016). Her er det ofte høy biologisk produksjon og et stort biologisk mangfold. På mer beskyttede bløtbunnsområder med sand eller mudder vil det ofte vokse store mengder ålegras. Disse ålegrasengene skaper gode oppvekstmuligheter for kystnær fisk som torsk, ål og sjøørret. Ålegrasenger fungerer også som oppvekstområde og spiskammer for småfisk og andre marine organismer, og er viktig å bevare.

Bevaringssoner i Tvedestrand kommune

I tillegg til Raet nasjonalpark, ligger det også fem bevaringssoner i Tvedestrand kommune. Disse er delt i fire bevaringssoner og en forbudssone: Indre Oksefjord bevaringszone, Furuøya forbudssone, Sagesund bevaringszone, Kvadstadkilen bevaringszone og Ytre skjergård bevaringszone. Bevaringssonene ble fastsatt i 2012, og forlenget i 2017 (Forskrift om bevaringssoner i Tvedestrand, 2012). I bevaringssonene er det forbudt å fiske med andre redskaper enn håndsnøre, fiskestang, juksa eller dorg. I forbudssonen er all fiske og all høsting av marine levende ressurser forbudt, men det er tillatt å fiske strandkrabbe.

Overvåking av fiskebestander

For å overvåke fiskebestander og biodiversitet i havet blir det brukt mange ulike metoder. Fisk er vanskelig å observere i sitt naturlige habitat, og derfor krever mange av disse metodene at man fanger og direkte behandler fisken (Côté & Perrow, 2006; Katsanevakis et al., 2012). Kommersielt brukes tråling og notfiske. Dette er metoder som bruker dyrt utstyr, trenger mye arbeidskraft og tar mye tid, og er derfor ikke alltid mulig å benytte i forskningssammenheng. Data fra kommersielt fiske kan være verdifullt for å overvåke fiskebestander både på målarter, altså arten/artene som var målet for fisket, og på bifangst, men man får ofte bare data på kommersielt attraktive arter og ikke nødvendigvis et godt bilde på artsmangfoldet i et økosystem.

Fiske med mindre og ofte rimeligere utstyr som garn, strandnot, ruser og tegner eller stang og linefiske er mer tilgjengelig, og kan lettere bli brukt i forskningssammenheng til å overvåke mer spesifikke områder og en større diversitet i arter (Côté & Perrow, 2006). Det alle disse fangstmetodene har til felles er at de er selektive på hvilke arter, hvilken alder, eller hvilken størrelse på fisken de fanger, og at de krever invasive inngrep (Baird & Hajibabaei, 2012; Côté & Perrow, 2006; Hansen, Bekkevold, Clausen, & Nielsen, 2018; Katsanevakis et al., 2012; Kelly et al., 2014; Thomsen & Willerslev, 2015). Dette betyr at det må brukes flere fangstmetoder sammen for å få et godt bilde av diversiteten av fisk i et område (Katsanevakis et al., 2012). Det betyr også at man ikke nødvendigvis vil få et fullverdig bilde. Noen arter vil selekteres bort ved bruk av slike metoder, og noen av disse kan være arter som er avgjørende i et økosystem. Metoder der fisk blir fanget og behandlet krever også mye tid og mange arbeidstimer for å få utført. Det stiller også krav til en viss taksonomisk ekspertise, og dette er et felt som er i nedgang (Hopkins & Freckleton, 2002; Wheeler, 2004).

Arter som er mer sjeldne, som lever i områder som er vanskelige å nå med tradisjonelt utstyr, eller invasive arter blir også vanskelig å finne, eller få et godt bilde av utbredelsen til. Spesielt utstyr kan brukes for å konsentrere fangsten mot slike arter, men det vil igjen kreve noe kunnskap om hvor artene finnes, og at de er til stede i det hele tatt. En måte å observere sjeldne og invasive arter på er å engasjere lokale friluftfiskere til å rapportere fangsten av ukjente og sjeldne arter. Et eksempel på dette er AlienFish prosjektet fra Middelhavet (Tiralongo et al., 2019), som har vært ekstremt nyttig for å samle observasjoner av sjeldne og invasive arter i og rundt bl.a. Italia. Problemene med slike prosjekter er at det er vanskelig å validere observasjonene gjort av ikke-profesjonelle, og det kan også være en utfordring å engasjere folk i mindre befolkede områder slik som i Norge.

I Raet nasjonalpark er det ingen stor innsats når det kommer til overvåking av artsmangfoldet av fisk og fiskebestander. Det meste av informasjon om biodiversitet og bestandstall på fisk i nasjonalparken kommer fra kommersielt fiske eller fra innmeldinger fra den lokale fritidsfiskeforeningen. Havforskningsinstituttet har derimot en forskingsstasjon i Flødeviga, og her drives det med forskingsfiske. Det kanskje mest kjente og langvarige forskningsprosjektet langs Skagerrakkysten er Havforskningsinstituttets strandnottokt. Dette toktet går langs hele Skagerrakkysten fra Hvaler i øst til Kristiansand i vest, og har pågått siden 1919 (Barceló, Ciannelli, Olsen, Johannessen, & Knutsen, 2016). Noen få av toktets prøvetakingsstasjoner ligger innenfor Raet nasjonalparks grenser, og forskningsprosjektet er noe av det mest verdifulle og fullverdige verktøyet som finnes for å overvåke fiskebestander i nasjonalparken.

eDNA

Nylig har det blitt en større trend å bruke molekylære verktøy for å overvåke akvatiske økosystemer (Baird & Hajibabaei, 2012; Hansen et al., 2018; Kelly et al., 2014). Et slikt molekylært verktøy er analysering av miljøDNA (eDNA). eDNA er genetisk materiale tatt fra miljøet i vannprøver, substratprøver eller liknende (Hansen et al., 2018; Thomsen & Willerslev, 2015). Dette genetiske materialet blir frigjort via bl.a. avføring, hud, skjell eller gameter når organismer interagerer med omgivelsene, og opptrer enten bundet i celler, eller som fritt DNA (Bohmann et al., 2014; Turner et al., 2014). Hos fisk vil eDNA kunne opptre i vannmassene i skjell, gameter, avføring eller til og med som egg. Hvor mye DNA en fisk frigir til miljøet vil variere med fiskens størrelse (Klymus, Richter, Chapman, & Paukert, 2015), livsstadium (Maruyama, Nakamura, Yamanaka, Kondoh, & Minamoto, 2014) og

aktivitetsnivå. Klymus et al. (2015) kom også fram til i sin studie at fisk som har blitt foret frigir en signifikant større mengde eDNA enn fisk som ikke har fått fôr. Det er også rimelig å tenke at forskjellige arter frigir forskjellige mengder DNA til miljøet.

Når slikt DNA først har blitt frigjort til vannmassene vil det starte og brytes ned (Hansen et al., 2018). Hvor lenge DNA vil forbli i vannet og være tilgjengelig for analyse vil variere med temperatur, pH, UV-stråling og mikrobiell aktivitet (Strickler, Fremier, & Goldberg, 2015). Okabe og Shimazu (2007) fant ut at høyere temperaturer førte til økt nedbrytning av DNA i filtrerte ferskvanns og sjøvannsprøver. I den samme studien kom de frem til at lavere salinitet også førte til en høyere nedbrytningsgrad av DNA. Høyere temperaturer kan påvirke nedbrytningsgraden til DNA direkte ved å øke denatureringen av DNAmolekyler (Barnes et al., 2014), men det har også blitt diskutert at økningen av nedbrytning av DNA på grunn av høyere vanntemperaturer og lavere salinitet kan ha noe med de to faktorenes effekt på enzymatisk aktivitet i vannmassene (Okabe & Shimazu, 2007). Vann med høy temperatur og lav salinitet kan også være gode levekår for DNAPredatorer. Tiden det tar før DNA er brutt ned så mye at det ikke kan bli detektert kan derfor variere mellom et par timer til noen uker (Barnes et al., 2014; Dejean et al., 2011; Murakami et al., 2019; Sigsgaard et al., 2017; Thomsen et al., 2012).

Dersom eDNA kan overleve lengre enn et par dager i vannmassene, så vil det mest sannsynlig også ha mulighet til å forflytte seg med havstrømmer og annen bevegelse i vannet. Lite forskning har blitt gjort på hvordan eDNA kan bevege seg i vannmassene fra det blir frigjort til miljøet til det blir nedbrutt, men Thomsen et al. (2012) estimerte at eDNA kan transporteres så langt som 40-600 km før det blir nedbrutt nok til å ikke bli detektert. Murakami et al. (2019) klarte ikke å detektere DNA fra fisk i et bur i sjøen bare 2 timer etter at buret med fisken ble fjernet, men fant eDNA opptil 1000 meter fra buret innen en time etter at fisken ble introdusert til miljøet.

Partiklene som bærer eDNA i vannmassene er som regel større enn 1µm i diameter (Turner et al., 2014) og vil derfor være for store til å forbli suspendert i vannmassene. Disse partiklene vil synke til bunnen og vanligvis blandes med bunnssubstratet, og det vil ikke lengre være mulig å fange det opp ved hjelp av vannprøver. Det er også foreslått at i områder nære kysten vil partikler som bærer eDNA være mindre påvirket av havstrømmer bl.a. på grunn av at tare og sjøgress kan fange opp og lagre slike partikler, eller fordi kystmorfologien hindrer eller reduserer adveksjon og diffusjon av vannmassene (Hansen et al., 2018). Hvis dette

stemmer, så betyr det at det meste av friggitt eDNA ikke har mulighet til å bli transportert veldig langt fra sitt opphav.

Det er imidlertid ikke bare havstrømmer som kan transportere eDNA fra fisk i sjøen. Mobile predatorer som sjøfugl, havpattedyr og andre fisk kan potensielt distribuere DNA fra byttedyr langt vekk fra hvor man vanligvis ville detektert fisken (Thomsen et al., 2012). Dette betyr at det alltid er en sjanse for å detektere DNA fra en art eller et individ som man ikke vanligvis ville funnet i prøvetakingsområdet.

Analyse av eDNA fra vannprøver

eDNA fra vann blir vanligvis analysert ved å først filtrere og isolere DNA fra vannprøver, for så å amplifisere det isolerte DNAet fra prøven med PCR (polymerase chain reaction).

PCR er en metode som oppformerer DNA eksponentielt, og kan amplifisere store mengder DNA fra ganske få molekyler. Metoden er derfor svært sensitiv. Ved å bruke arts- eller taksonspesifikke primere kan DNA fra kun en art, eller en gruppe arter påvises spesifikt selv om mye annet DNA er til stede i prøven (Thomsen & Willerslev, 2015). Med slike metoder kan man både fokusere på en enkelt art ved å bruke artsspesifikke primere (Clusa & García-Vázquez, 2018; Knudsen et al., 2019), eller man kan bruke universelle primere for å potensielt kunne påvise flere arter innen en viss gruppe (Thomsen et al., 2012; Yamamoto et al., 2017).

Ved bruk av artsspesifikke primere i PCR kan man raskt vite om man har påvist målarten eller ikke ved å bekrefte om DNA har blitt amplifisert. Dette kan gjøres f.eks. ved hjelp av gelelektroforese, eller ved å bruke fluoriserende prober under PCR.

Ved bruk av universelle primere kan også metoder som gelelektroforese brukes for å bekrefte at DNA har blitt amplifisert, men man vet fortsatt ikke hvilken eller hvilke arter det amplifiserte DNAet kommer fra. For å finne ut av dette kan man sekvensere PCRproduktet. Det finnes mange ulike måter å sekvensere DNA på, men på grunn av den store mengden DNA som oppstår etter PCR, må metoder som ofte defineres om «next-generation sequencing» anvendes. Dette er en samlebetegnelse på sekvenseringsmetoder som kan sekvensere store mengder DNA på en relativt kort tid (Shokralla, Spall, Gibson, & Hajibabaei, 2012). Etter at det amplifiserte DNAet har blitt sekvensert kan sekvensene sammenliknes med en DNAdatabase og matches med allerede kjente genomer. På denne måten kan flere arter påvises samtidig fra en og samme prøve.

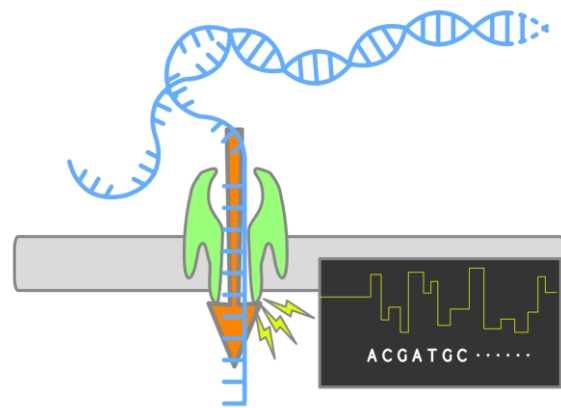
En form for «next-generation sequencing» er nanoporesekvensering. Denne metoden baserer seg på at en enkelttrådet DNAsekvens blir ført gjennom en liten pore, en «nanopore», og nukleotidene i DNAsekvensen blir lest av (Figur1). Dette gjøres ved at spenningen i poren forandres ettersom hvilken nukleotide som blir detektert.

Oxford Nanopores MinION (Oxford Nanopore Technologies) er en relativt nyutviklet nanoporesekvenseringsmaskin.

Maskinen er en liten enhet på 90 g som er lett å transportere, og som potensielt kan brukes ute i felt (Jain, Olsen, Paten, & Akeson, 2016). Den kan operere opptil 512 porer samtidig, og kan lese opptil 450 nukleotider fra enkelttrådet DNA per sekund (Jansen et al., 2017). I teorien har ikke denne metoden noen begrensning på hvor lange DNAsekvenser den kan lese, og sekvenser på over 2 million basepar har blitt sekvensert (Goldstein, Beka, Graf, & Klassen, 2019; Payne, Holmes, Rakyan, & Loose, 2018). Sekvenseringsnøyaktigheten til MinION ligger på gjennomsnittlig 92 %, noe som for visse applikasjoner er altfor lavt. Dette kan potensielt føre til for eksempel at feil arter blir detektert i en eDNAprøve.

Selv om slike sekvenseringsmetoder kan sekvensere store mengder DNA på kort tid, vil det fortsatt ta lang tid og mye arbeid hvis en skal analysere flere eDNA prøver. For å effektivisere dette er det mulig å sekvensere flere prøver samtidig, uten å miste oversikt over hvilke prøver det sekvenserte DNAet kommer fra.

Dette kan gjøres ved å syntetisere en liten barcode, en kjent DNAsekvens, til enden av DNAet som har blitt amplifisert ved PCR. For hver prøve som skal sekvenseres må en spesifikk barcode festes på slik at man ved sekvensering kan skille DNA som kommer fra ulike prøver. Dette gjør at man kan blande sammen amplifisert DNA fra mange prøver til en samlet prøve, og kun trenger å kjøre sekvensering en gang. Barcoder kan festes på amplifisert DNA via en adapter som er ligert på de amplifiserte DNAsekvensene. Denne adapteren kan liggeres på etter DNAamplifikasjon, eller den kan være ligert som en «hale» på PCRprimerne



Figur 1: Forenklet bilde av prinsippet bak nanoporesekvensering. Bildet er laget av DataBase Center for Life Science (DBCLS) hentet fra

<https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=86372818>

som brukes under PCR (Miya et al., 2015). Etter at adapterne er ligert på, kan en ny PCR kjøres for å feste på barcoder. For å kunne skille mellom prøver må en spesifikk barcode brukes på hver enkelt prøve. Disse barcodene kan senere skilles fra hverandre etter DNasekvensering, og man kan identifisere hvilken prøve hver enkelt DNasekvens stammer fra.

Utfordringer ved bruk av eDNAanalyse

En av de største fallgruvene når det kommer til metoder som bruker eDNAanalyse for å påvise arter fra vannprøver er kontaminering av DNA mellom, og i eDNAprøver (Bohmann et al., 2014; Liu, Clarke, Baker, Jordan, & Burrige, 2020; Thomsen & Willerslev, 2015). Kontaminering mellom prøver kan i verste fall gi falske positive resultater, og kan i teorien skje ved alle steg av prosedyren. Under innsamling av prøver kan DNA smitte mellom prøver hvis det samme prøvetakingsutstyret brukes på flere prøver. For å sikre at dette ikke skjer burde prøvetakingsutstyr dekontamineres etter bruk, og mellom hver prøve, eller nytt utstyr burde brukes til hver prøve hvis dette er mulig (Jerde, Mahon, Chadderton, & Lodge, 2011). Blanke prøver som tas med på feltarbeid og analyseres på samme måte som eDNAprøvene kan brukes som kvalitetskontroller på at kontaminering ikke har skjedd under feltarbeid eller transport av prøver. Kontaminering kan også skje under labarbeid, og det er derfor viktig å holde arbeidsflater og utstyr dekontaminert. Også her kan blanke prøver brukes som kvalitetskontroller for å forsikre at kontaminering ikke har skjedd. Spesielt viktig kan dette være under PCR, siden det her blir produsert ekstremt store mengder DNA. Det er også vanlig praksis å holde før PCR- og etter PCRprøver fysisk adskilt (Champlot et al., 2010).

Når eDNA blir hentet via vannprøver får man også med mye annet som flyter i vannmassene. Av og til kan jordpartikler følge med i vannprøven under prøvetaking, og med disse jordpartiklene kan det ofte følge humussyrer. Humussyrer er sterke inhibitorer til enzymer som *Taq* polymerase brukt i PCR for å amplifisere DNA (Matheson, Gurney, Esau, & Lehto, 2010). Partikler som inneholder humussyrer vil mest sannsynlig være vanligst i elver eller mindre vann, men kan potensielt også finnes i sjøen i områder nær land, eller i utløpet av elver og bekker. For å motvirke inhibitorer under PCR blandes ulike buffere inn i reaksjonen. PCRmixer som TaqMan® Environmental Master Mix 2.0 (Thermofisher) inneholder slike buffere, og er designet til å blant annet være effektiv selv når høye nivåer av inhibitorer er til stede (Applied Biosystems, 2011).

Selve amplifiseringen av DNA under PCR kan også være en kilde til feil. Punktmutasjoner eller formering av kimære molekyler kan oppstå, og kan potensielt lede til falske positive deteksjoner (Acinas, Sarma-Rupavtarm, Klepac-Ceraj, & Polz, 2005; Thomsen & Willerslev, 2015). Slike feil vil øke ved amplifisering av lengre sekvenser, og ved å kjøre mange amplifikasjonssykluser under PCR. Feil kan også skje under sekvensering ved avlesning av feil baser. Nestegenerasjonssekvenseringsteknologi, som kan sekvensere ekstreme mengder DNA på kort tid må derfor ha en veldig lav feilrate for ikke å påvirke hvilke arter som blir detektert.

For å kunne identifisere hvilke arter som tilhører sekvensene funnet ved PCR og sekvensering av eDNA krever det at man har pålitelige referansedatabaser. Gendatabaser som NCBI's GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank), eller BOLD (www.boldsystems.org) inneholder utrolige mengder DNasekvenser fra alle slags typer organismer, og er fortsatt voksende, men kan fortsatt mangle visse arter (Kvist, 2013). Dersom DNAet til en art er til stede i en eDNAprøve, men ikke sekvensert i referansedatabasen, så vil ikke arten ha mulighet til å bli detektert etter eDNAanalyse. I verste fall vil dette DNAet bli identifisert som feil art. Derfor er det viktig at slike referansedatabaser er så fullstendige som mulig.

Problemstilling

eDNAanalyse er et verktøy med stort potensiale i overvåkning av arter og biodiversitet i miljøer hvor tradisjonelle overvåkningsmetoder er krevende å utføre. I denne oppgaven ønsker jeg å utforske muligheten til å beskrive biodiversiteten av fisk i Raet nasjonalpark ved å analysere eDNA gjennom PCR med universelle primere, etterfulgt av nestegenerasjons DNasekvensering. Er eDNAanalyse en metode som kan brukes til å effektivt påvise fiskearter ved ulike lokaliteter i Raet nasjonalpark?

Materiale og metoder

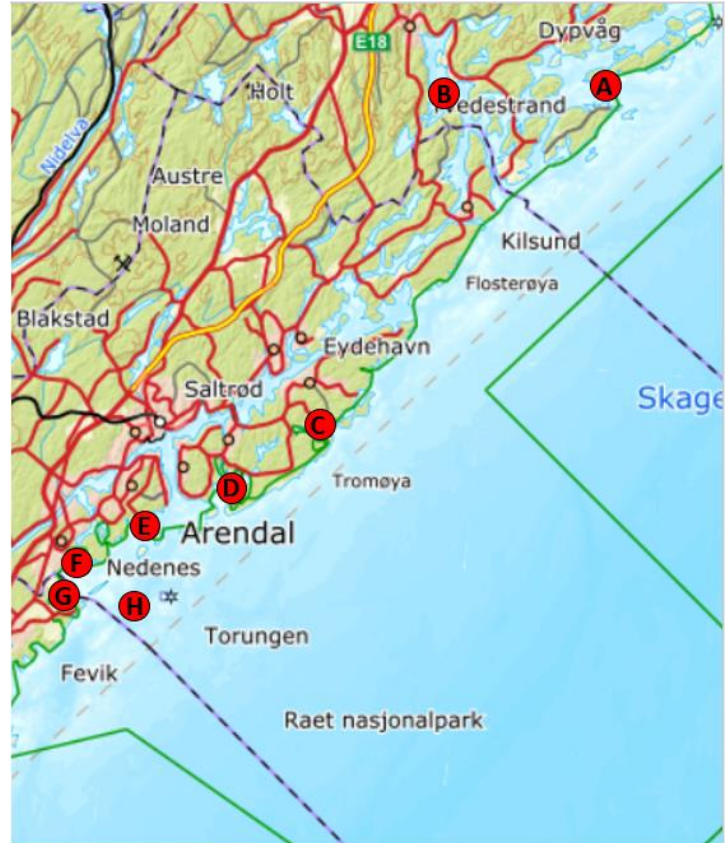
Lokalitetsbeskrivelse

I samarbeid med Jenny Marie Gulbrandsen, Nasjonalparkforvalter i Raet Nasjonalpark, ble det valgt ut 7 lokaliteter i og ved Raet nasjonalpark (Figur 2). Disse lokalitetene, videre kalt Lokalitet A-G, fra nord til sør er A - Hengsholmen, B - Furuøya, C - Alvekilen, D - Hovekilen, E - Flødeviga, F - Gjervoldsøy/Klaua og G - Sømskilen. Disse lokalitetene er spredt fra helt nordøst til helt sørvest i nasjonalparken, og skal representere en spredning av ulike habitater inni og nærliggende nasjonalparken. For å nå disse lokalitetene ble det brukt en Buster XL jolle.

Det ble også tatt prøver fra en 8. lokalitet, herved kalt lokalitet H. Denne lokaliteten ligger lengre ute fra land enn de andre lokalitetene, og prøvene herfra ble tatt i midten av september. For å ta disse prøvene var jeg med Havforskningsinstituttets G.M. Dannevig på tokt fra Flødeviga ut i Skagerrak.

Lokalitet A – Hengsholmen (58.612°N, 009.082°Ø)

Lokalitet A ligger helt nordøst i Raet nasjonalpark. Prøvetakingsområdet ligger på utsiden av Akerøya, mellom Sandøya og Lyngør i Tvedestrand kommune. Lokaliteten er forholdsvis eksponert mot Skagerrak, og vil være mye påvirket av vær og vind. Havbunnen ved denne lokaliteten er hovedsakelig bestående av bløtbunnsområder, med innslag av ålegrassenger (Miljødirektoratet, 2018). Lokaliteten er omringet av skjellsandbunn, og det er også innslag av større tareskogforekomster i nærheten av prøvetakingsområdet.



Figur 2: Lokaliteter A-H. Den grønne linja er grensen til Raet nasjonalpark. De blå linjene er kommunegrensene mellom Grimstad-, Arendal- og Tvedestrand kommune

Lokalitet B – Furuøya (58.603°N, 008.933°Ø)

Lokalitet B er den eneste av lokalitetene som ligger utenfor Raet nasjonalpark, men tilgjengelig ligger den i Tvedestrandsfjorden bevaringszone og ligger innenfor Furuøya forbudssone. Prøvetakingen er gjort langs den nordlige delen av Furuøya, en øy som ligger sentralt i Tvedestrandsfjorden/Oksefjorden i Tvedestrand kommune. Mesteparten av denne fjorden er klassifisert som fjord med naturlig lavt oksygeninnhold, og i området rundt prøvetakingsstedet finnes det innslag av ålegrassenger og bløtbunnsområder i strandsonen (Miljødirektoratet, 2018).

Lokalitet C – Alvekilen (58.466°N, 008.874°Ø)

Alvekilen ligger innerst i Bottsfjorden, langs den sørlige kysten av Trømøy i Arendal kommune. Lokaliteten er stort sett skjermet fra vær og vind, siden den er plassert innerst i en fjord, men kan muligens bli påvirket av havstrømmer og vær fra Skagerrak, siden Bottsfjorden åpner seg rett ut i åpent hav. Alvekilen er dominert av ålegrassamfunn og helt innerst i kilen finnes det også en strandeng og strandsump, selv om dette ligger utenfor prøvetakingsområdet (Miljødirektoratet, 2018).

Lokalitet D – Hovekilen (58.435°N, 008.823°Ø)

Lokalitet D er plassert helt ytterst i Hovekilen på innsiden av Hoveodden helt sør på Tromøy i Arendal kommune. Prøvetakingsområdet er delvis skjermet fra Skagerrak, men kan med riktig vindretning være utsatt for mye vær og vind. Store deler av prøvetakingsområdet er dominert av ålegrassenger, og ellers stort sett dominert av sandbunn/bløtbunn (Miljødirektoratet, 2018).

Lokalitet E – Flødeviga (58.426°N, 008.752°Ø)

Flødeviga ligger helt sør på Hisøy i Arendal kommune. Lokaliteten ligger innenfor Raet nasjonalpark, men den ligger også innenfor et frednings- og bevaringsområde for hummer. I Flødeviga ligger også Havforskningsinstituttets Forskningsstasjon Flødevigen, og området blir brukt til ulike typer forskningsfiske. Innerst i Flødeviga ligger det et ålegrassamfunn (Miljødirektoratet, 2018).

Lokalitet F – Gjervoldsøy/Klauva (58.414°N, 008.740°Ø)

Lokalitet F er plassert i utløpet av Nidelva på den østlige siden av Gjervoldsøy i Arendal kommune. Denne lokaliteten er delvis eksponert ut mot Skagerrak, men er også påvirket av at den ligger i utløpet til en stor elv. Innenfor prøvetakingsområdet ligger det et lite ålegrassamfunn (Miljødirektoratet, 2018).

Lokalitet G – Sømskilen (58.397°N, 008.713°Ø)

Lokalitet G er den vestligste av alle prøvetakingslokalitetene, og den eneste som ligger innenfor Grimstad kommune. I Sømskilen ligger det en større marina, og flere mindre brygger til fritidsbåter. Lokaliteten har flere innslag av ålegrassamfunn (Miljødirektoratet, 2018).

Lokalitet H – Dypvannsprøver (58.395°N, 008.761°Ø)

Lokalitet H ligger ute i havgapet omtrent midt mellom Tjuvholmen og Flatskjær, på utsiden av Nedenes i Arendal kommune. Denne lokaliteten er den eneste som ligger mer enn 100 meter fra land, og er den mest eksponerte av prøvetakingslokalitetene. I området rundt prøvetakingsområdet er det klassifisert større tareskogforekomster, og mot land er det store områder med skjellsand (Miljødirektoratet, 2018).

Vannprøveinnsamling

Overflateprøver

Fra hver av lokalitetene A-G ble det tatt en vannprøve i slutten av juni 2019. Hver prøve besto av ca. 1L vann tatt fra hver lokalitet i en 1L prøveflaske med skrukork. Disse flaskene ble rengjort med 10 % Klorin og skylt godt i ferskvann før de ble skylt i sjøvann på lokaliteten prøven skulle hentes fra. Hver prøve ble tatt ved hjelp av et 1,5 m kosteskaff med en klype som holdt et 50 mL rør. Det ble brukt et nytt rør til hver av lokalitetene, og prøvetakingsutstyret ble vasket med 10 % Klorin og skylt godt med sjøvann fra prøvetakingslokaliteten før hver prøvetaking. Med dette røret ble det tatt 20 delprøver fordelt utover hver lokalitet slik at hver prøve på 1L er representativ til hele lokaliteten. Prøvene ble tatt ca. 0,5 m dypt fra vannoverflaten. Prøvene ble lagret og transportert i kjøleboks med kjøleelementer fra prøven ble tatt til de senere skulle filtreres. I hver kjøleboks ble det også transportert en 1 L prøveflaske fylt med destillert vann. Denne flasken vil fungere som en negativ kontroll for vannprøvene.

Dypvannsprøver

Fra den 8. lokaliteten (H) ble det tatt 5 vannprøver, hvor hver prøve inneholdt ca. 1L vann. Fire av prøvene ble tatt på forskjellige dyp med Niskin flasker i en Niskin Rosette, og overført til rene 1L prøveflasker med skrukork. Disse prøvene ble tatt ved henholdsvis 10 m (H10), 50 m (H50), 100 m (H100) og 140 m (H140) dyp fra overflaten. Den siste av de 5 prøvene ble tatt med en bøtte fra overflaten (H0) og overført i en ren 1L prøveflaske med skrukork. Disse prøvene ble oppbevart i kjøleskap ved ca. 4°C frem til filtrering.

Filtrering og isolasjon

Filtrering av vannprøver

Alle vannprøver ble filtrert med 0,45 µm cellulosenitratfilter (PALL Life Sciences membranfilter GN-6) ved hjelp av en vakuumpumpe (ILMVAC GmbH MPC 101 Z). Dette ble gjort så fort som mulig etter prøvetaking, og prøvene ble aldri liggende lengre enn 8 timer i kjølebag med kjøleelementer. Det ble filtrert mellom 0,7 – 1 L vann fra hver prøve. Filtrene ble brettet med en ren pinsett og lagt i 2 mL rør med skrukork. Disse ble så merket og lagret på -20°C til DNA skulle isoleres fra filtrene. Hver prøve ble filtrert med nytt sterilt filtreringsutstyr, og pinsetter og annet arbeidsverktøy ble vasket i 10 % Klorin mellom hver filtrering.

Isolering av DNA

All isolasjon av DNA ble gjort med e Qiagen DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Ing.). DNA på filtrene ble isolert ved at filtrene ble brettet og kuttet med en steril skalpell i tynne skiver. De kuttete filtrene ble overført i nye 2 mL rør med skrukork sammen med 750 µL ATL-buffer og ca. 0,3 g 0,5 mm Silica beads. Rørene ble så ristet i en bead beatingmaskin (MagNA Lyser, Roche) i 45 sekunder ved 2800 opm (oscillasjoner per minutt), før de ble inkubert ved 56°C i varmeblokk i 30 minutter. De ble så ristet igjen i 45 sekunder ved 2800 opm. 80 µL Proteinase K ble så tilsatt, før rørene ble inkubert på 56°C i varmeblokk i 2 timer. Omtrent hvert 30. minutt ble rørene bladet ved vortexing.

Etter 2 timer ble rørene vortexet i 15 sekunder og sentrifugert i et minutt ved 8000 rpm (runder per minutt). 500 µL supernatant ble så overført til nye rør, før 500 µL AL-buffer og 500 µL 96% etanol ble tilsatt. Rørene ble igjen vortexet i 15 sekunder. 500 µL fra hvert rør ble overført i hver sin DNeasy spinnkolonne, som var plassert i et 2 mL oppsamlingsrør. Spinnkolonnene ble sentrifugert (1 minutt, 8000 rpm), før oppsamlingsrørene ble tømt og spinnkolonnene ble satt tilbake i det samme oppsamlingsrøret. 500 µL fra rørene ble sentrifugert gjennom den samme spinnkolonnen to ganger til, slik at alt innholdet i de opprinnelige rørene ble sentrifugert gjennom kolonnen.

Deretter ble 500 µL AW1 vaskebuffer tilsatt, og kolonnene sentrifugert (1 minutt, 8000 rpm). Spinnkolonnene ble så satt i nye 2 µL oppsamlingsrør, og de brukte rørene ble kastet. 500 µL AW2 vaskebuffer ble så tilsatt, og kolonnene ble sentrifugert (3 minutter, 13 400 rpm). Samlerørene ble igjen kastet, og kolonnene ble plassert i hvert sitt 1,5 mL eppendorfrør hvor lokket var klippet av. 50 µL AE-buffer ble så tilsatt direkte på DNeasy

membranen i kolonnene, før det ble inkubert i ett minutt i romtemperatur og sentrifugert (1 minutt, 8000 rpm). Uten å fjerne kolonnene fra eppendorfrørene ble nye 50 µL AE-buffer tilsatt direkte på DNeasy membranen i kolonnene. Kolonnene ble inkubert i romtemperatur i 1 minutt før de igjen ble sentrifugert (1 minutt, 8000 rpm). Spinnkolonnene ble så fjernet fra eppendorfrørene, og innholdet i eppendorfrørene ble overført til nye 1,5 mL eppendorfrør med lokk. Disse rørene ble merket og lagret ved -20°C. Disse prøvene omtales herved som eDNAprøver. Prøvene isolert fra overflateprøvene fra lokalitet A-G ble merket som henholdsvis prøve A-G, og prøvene isolert fra dypvannsprøvene fra lokalitet H ble merket som henholdsvis H0, H10, H50, H100 og H140, hvor tallet symboliserer dybden under havoverflaten prøven ble tatt på.

PCR og Agarose Gel

eDNAprøvene, samt en av de filtrerte og isolerte feltkontrollene, og en negativ kontroll med destillert H₂O, ble amplifisert ved hjelp av PCR. På disse prøvene ble det brukt et universelt primerset for fisk, MiFish-U (Miya et al., 2015). Primeren passer til en 163-185 bp lang, hypervariabel del av 12S rRNA genet i mitokondrielt DNA hos fisk, som inneholder nok informasjon til å identifisere fisk ned til familie, slekt eller artsnivå. Primerne som ble brukt var en modifisert versjon av MiFish-U med en adapterhale (Tabell 1). Denne halen vil fungere som adapter for barcoding i et senere steg. Primersettet består av en «forward primer» (MiFish-U-F) og en «reverse primer» (MiFish-U-R).

Tabell 1: Primersekvenser og adaptersekvenser til MiFish-U «forward»- og «reverse» primere med adapterhale

Primer	Adaptersekvens (5'-3')	Primersekvens (5'-3')
MiFish-U-F	TTTCTGTTGGTGCTGATATTG	GTCGGTAAACTCGTGCCAGC
MiFish-U-R	ACTTGCCTGTCGCTCTATCTTC	CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG

En 10 µM arbeidsløsning ble laget ved å fortynne primerne med nukleasefritt H₂O. Det ble tilsatt 1,5 µL MiFish-U-F, 1,5 µL MiFish-U-R, 15 µL TaqMan® Environmental Master Mix 2.0 (Thermofisher) i 15 rør i Micro Fast Tube Strips (Thermofisher). I et av rørene ble det tilsatt 1 µL isolert genomisk DNA fra ål og 11 µL nukleasefritt H₂O. Fordi primerne tidligere har blitt brukt til å påvise ål (Halvorsen, 2019), vil denne prøven vil

fungere som positiv kontroll. I ett av rørene ble det tilsatt 12 μL nukleasefritt H_2O . Denne prøven vil fungere som negativ labkontroll. I hvert sitt rør ble 5 μL fra hver eDNAprøve tilsatt sammen med 7 μL nukleasefritt H_2O . I et rør ble det tilsatt 5 μL fra en isolert negativ feltkontroll og 7 μL nukleasefritt H_2O . Totalt ble 15 rør fylt med et totalvolum i hvert rør på 30 μL . Det ble satt lokk på Micro Fast Tube Stripsene, og disse ble så spunnet i en sentrifuge i noen få sekunder før det ble kjørt PCR. PCR ble utført med en ProFlex™ 96-Well PCR System (Thermo Fisher). Temperaturprofilen som ble brukt under PCR startet med et steg med 95°C i 10 min, deretter et steg med 95°C i 15 sek, 58°C i 30 sek og 72°C i 30 sek. Dette steget ble gjentatt i 40 sykluser, før et siste steg med 72°C i 5 min ble utført.

For å være sikker på at DNA ble amplifisert, og at det ikke har skjedd noen kontaminering før eller under PCR, ble det kjørt gelelektroforese på alle PCRprøvene. Det ble laget 1% agarosegel ved å blande 100 mL TAE buffer og 1,0 g agar. Blandingen ble varmet i mikrobølgeovn til all agar var smeltet og løst ut. Blandingen ble så kjølt ned til ca. 60°C før 10 μL SYBR® Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher) ble tilsatt og blandet inn ved røring. Blandingen ble så helt ut i en form og kjølt ned i romtemperatur til den ble solid. Gelen ble deretter lagt i et elektroforesebad med TAE buffer. En størrelsesstandard, Invitrogen 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific), ble tilsatt i den første brønnen. Deretter ble 9 μL fra hver av de 15 PCR prøvene blandet med 2 μL loading dye (50 % glycerol med Bromofenolblått tilsatt), og tilsatt hver sin brønn. Gelelektroforesen ble så startet, og den ble kjørt i ca. 30 min ved 100 V. Gelen ble så fotografert og undersøkt for bånd med et NuGenius Gel Documentation system (Syngene).

Måling av DNAkonsentrasjon i PCRprodukt

DNAkonsentrasjonen av PCRproduktene til eDNAprøvene ble målt med Qubit® 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher). Det ble først laget en Q-arbeidsløsning (QWS) ved å blande 199x Qubit buffer og 1x Qubit solution. Dette ble blandet til 12 prøver samt 2 standarder. Q-arbeidsløsningen fikk et totalvolum på 2800 μL . To standarder ble laget ved at henholdsvis 10 μL Qubit dsDNA BR Standard Assay #1 og 10 μL Qubit dsDNA BR Standard Assay #2 ble blandet med 190 μL QWS i 500 μL Qubit Assay rør. 1 μL PCRprodukt fra hver av de 12 eDNA prøvene ble tilsatt hver sitt 500 μL Qubit Assay rør, og blandet med 199 μL QWS. Qubit 2.0 Fluorometeret ble så kalibrert med de to standardene før DNAkonsentrasjonen til PCRproduktet fra de 12 eDNAprøvene ble målt.

Rensing av PCRprodukt

For å rense PCRproduktene til de 12 eDNA prøvene ble PureLink® PCR Purification Kit (Thermo Fisher) brukt. Binding Buffer B2 og Wash Buffer (W1) ble tilsatt henholdsvis 10 mL isopropanol og 64 mL etanol umiddelbart etter åpning av kittet. 20 µL PCRprodukt fra hver av de 12 eDNAprøvene ble tilsatt hvert sitt 1,5 mL eppendorfrør. Det ble så tilsatt 80 µL Binding Buffer B2 med isopropanol til hvert av disse rørene, før rørene ble vortexet i ca. 10 sekunder. Blandingene fra hvert rør ble overført i hver sin PureLink® spinnkolonne med samlerør. Hver spinnkolonne ble sentrifugert ved 10 000 rpm i 1 minutt før samlerørene ble tømt og satt tilbake på spinnkolonnene. 650 µL Wash Buffer (W1) med etanol ble tilsatt hver av spinnkolonnene, og spinnkolonnene ble sentrifugert ved 10 000 rpm i 1 minutt. Samlerørene ble igjen tømt og satt tilbake på spinnkolonnene før kolonnene ble sentrifugert ved 13 400 rpm i 3 minutter. Samlerørene ble så kastet, og spinnkolonnene ble satt i rene 1,7 mL elueringsrør. 50 µL Elution Buffer ble tilsatt i midten av kolonnen før spinnkolonnen ble inkubert i romtemperatur i 1 minutt. Spinnkolonnen ble deretter sentrifugert ved 13 000 rpm i 2 minutter. Innholdet i elueringsrørene ble så overført til rene 1,5 mL eppendorfrør. DNA konsentrasjonen til de rensede PCRproduktene ble så bestemt med Qubit® 2.0 Fluorometer på samme måte som tidligere.

Forberedelse av PCRprodukter og Nanoporesekvensering

Barcoding

Før barcoding ble PCRproduktet til hver prøve fortynnet 100 ganger. Dette ble gjort ved å tilsette 188 µL nukleasefritt H₂O til 2 µL renset PCRprodukt. De endelige konsentrasjonene til de fortynnede PCRproduktene ble da omtrent 0.75 nM. Barcoding ble gjort ved hjelp av PCR og protokoll fra PRC Barcoding Kit (Oxford Nanopore Technologies) ble fulgt. For hver prøve ble 1 µL PCR Barcode (en av BC01-BC12, ved 10 µM fra PCR Barcoding Kit fra Oxford Nanopore Technologies) (Tabell 2), 24 µL fortynnet PCRprodukt og 25 µL LongAmp Taq 2x Master Mix (New England BioLabs) blandet i Micro Fast Tube Strips (ThermoFisher). Rørene ble spunnet noen få sekunder i en sentrifuge før det ble kjørt PCR i en ProFlex™ 96-Well PCR System (Thermo Fisher). Temperaturprofilen som ble brukt til barcoding PCR besto av et steg med 95°C i 3 minutter, etterfulgt av et steg med 95°C i 15 sekunder, 62°C i 15 sekunder og 65°C i 15 sekunder. Dette steget ble gjentatt i 12 sykluser, før et siste steg med 65°C i 2 minutter ble utført.

Tabell 2: Oversikt over barcodesekvenser tilknyttet prøvenummer og lokalitet

Prøve - Lokalitet	Barcodenummer	Barcode sekvens (5'-3')
A – Hengsholmen	B1	AAGAAAGTTGTCGGTGTCTTTGTG
B – Furuøya	B2	TCGATTCCGTTTGTAGTCGTCTGT
C – Alvekilen	B3	GAGTCTTGTGTCCCAGTTACCAGG
D – Hovekilen	B4	TTCGGATTCTATCGTGTTTCCCTA
E – Flødeviga	B5	CTTGTCCAGGGTTTGTGTAACCTT
F – Gjervoldsøy/Klaua	B6	TTCTCGCAAAGGCAGAAAGTAGTC
G – Sømskilen	B7	GTGTTACCGTGGGAATGAATCCTT
H0 – Dypvannsprøve 0 m	B8	TTCAGGGAACAAACCAAGTTACGT
H10 – Dypvannsprøve 10 m	B9	AACTAGGCACAGCGAGTCTTGTTT
H50 – Dypvannsprøve 50 m	B10	AAGCGTTGAAACCTTTGTCCTCTC
H100 – Dypvannsprøve 100 m	B11	GTTTCATCTATCGGAGGGAATGGA
H140 – Dypvannsprøve 140 m	B12	CAGGTAGAAAGAAGCAGAATCGGA

Etter PCR ble hver prøve overført i hvert sitt 1,5 mL Eppendorfrør før 60 µL resuspenderte AMPure XP kuler (Beckman Coulter Life Sciences) ble tilsatt hver prøve. Prøvene ble så blandet ved å knipse på rørene, og ble inkubert i en Hula mixer i 5 minutter ved romtemperatur. Deretter ble prøvene raskt sentrifugert før de ble plassert på en magnet, og supernatanten ble pipettert av. Med prøvene fortsatt plassert på magneten ble kulene vasket med 200 µL nylig blandet 70% etanol uten å løse opp pelleten. Etanolen ble så fjernet ved pipettering og kastet, før kulene igjen ble vasket med 200 µL 70% etanol. Etanolen ble igjen fjernet ved pipettering og kastet, før prøvene ble sentrifugert og satt tilbake på magneten. All resterende etanol ble pipettert ut av prøvene før prøvene ble stående for å tørke i omtrent 30 sekunder. Prøvene ble fjernet fra magneten og hver pellet ble resuspendert med 10 µL nukleasefritt H₂O, før de ble inkubert i romtemperatur i 2 minutter. Etter inkuberingen ble prøvene igjen satt på magneter slik at kulene ble klumpet sammen til pellets helt til væsken i prøvene ble klare og fargeløse. 10 µL av væsken fra hver prøve ble pipettert over i nye 1,5 mL eppendorfrør og rørene med kulene ble kastet.

DNAkonsentrasjonen fra hver prøve ble så målt i Qubit[®] 2.0 Fluorometer (Thermo Fisher). For å få like mengder PCRprodukt fra hver prøve, ble 5 µl fra hver av prøve A-F og prøve H0, H10, H50 og H100 og 1 µL fra prøve G og H140 ble blandet sammen i en «Pooled» prøve.

DNAreparering og endepreparering

Etter at prøvene ble barcodet og samlet sammen i en prøve måtte det gjøres DNAreparering og endepreparering. Alle reagenser brukt i dette steget ble klargjort og behandlet som anbefalt i prosedyren «PCR barcoding genomic DNA (SQK-LSK109) fra Oxford Nanopore Technologies før bruk. 2 µL av den samlede prøven ble vannet ut med 45 µL nukleasefritt H₂O i et nytt 1,5 mL eppendorfrør slik at DNAmengden i prøven ble omtrent 100-200 fmol. Denne løsningen ble så blandet sammen med 1 µL DNA CS, 3,5 µL NEBNext FFPE DNA Repair Buffer, 2 µL NEBNext FFPE DNA Repair Mix (New England BioLabs), 3,5 µL Ultra II End-prep reaction buffer (New England BioLabs) og 3 µL End-prep enzyme mix (New England BioLabs) i et 0,2 mL PCR rør. Røret ble sentrifugert raskt og inkubert ved 20°C i 5 minutter, og ved 65°C i 5 minutter i en ProFlex™ 96-Well PCR System (Thermo Fisher). Den inkuberte prøven ble så overført til et nytt 1,5 mL eppendorfrør før det ble tilsatt 60 µL resuspendert AMPure XP beads (Beckman Coulter Life Sciences) til prøven. Prøven ble inkubert i en Hula mixer i 5 minutter ved romtemperatur. Prøven ble så sentrifugert og satt på en magnet slik at det ble dannet en pellet. Supernatanten ble pipettert av før kulene ble vasket med 200 µL nyblandet 70% etanol. Etanolen ble fjernet ved pipettering og kastet, før kulene ble vasket med nye 200 µL nyblandet 70% etanol. Igjen ble etanolen fjernet ved pipettering og kastet. Røret ble deretter sentrifugert, satt tilbake på magneten og all resterende etanol ble pipettert av. Pelleten fikk tørke i omtrent 30 sekunder før røret ble flyttet fra magneten, og pelleten ble resuspendert i 61 µL nukleasefritt H₂O. Prøven ble inkubert 2 minutter ved romtemperatur. Prøven ble igjen satt på en magnet slik at kulene dannet en pellet, og den fikk stå til eluatet var klart og fargeløst. Eluatet på 61 µL ble så overført til et nytt 1,5 mL eppendorfrør.

Adapterligering og «clean-up»

Alle reagenser brukt i dette steget ble klargjort og behandlet som anbefalt av produsenten før bruk. Flere av reagensene ble hentet fra Ligation Sequencing Kit (Oxford Nanopore Technologies). 60 µL av prøven fra det forrige steget ble blandet med 25 µL Ligation Buffer (LNB), 20 µL NEBNext Quick T4 DNA Ligase og 5 µL Adapter Mix (AMX)

i et 1,5 mL eppendorfrør. Prøven ble forsiktig blandet og sentrifugert, før den ble inkubert i 10 minutter ved romtemperatur. 40 μ L resuspenderte AMPure XP kuler (Beckman Coulter Life Sciences) ble satt til prøven, og prøven ble inkubert i en Hula mixer i 5 minutter ved romtemperatur. Prøven ble sentrifugert, og satt på en magnet slik at kulene dannet en pellet. Supernatanten ble fjernet ved pipettering, og kulene ble vasket med 250 μ L Short Fragment Buffer (SFB). Kulene ble resuspendert ved å knipse på røret før prøven ble satt tilbake på magneten og kulene dannet igjen en pellet. Supernatanten ble så fjernet ved pipettering, før vaskesteget ble repetert. Prøven ble igjen sentrifugert og satt tilbake på magneten, og all resterende supernatant ble pipettert av. Pelleten fikk tørke i omtrent 30 sekunder før røret ble fjernet fra magneten og pelleten resuspendert i 15 μ L Elution Buffer (EB). Prøven ble så inkubert i 10 minutter ved romtemperatur. Deretter ble prøven satt tilbake på magneten til kulene dannet en pellet, og eluatet var klart og fargeløst. Til slutt ble 15 μ L av eluatet overført til et nytt 1,5 mL eppendorfrør og lagret på is til sekvensering. Dette eluatet var DNAprøven som var klart til sekvensering.

DNasekvensering med Nanopore

Reagensene brukt til klargjøring og loading av SpotON flow cellen ble hentet fra Ligation Sequencing Kit (Oxford Nanopore Technologies) og Flow Cell Priming Kit (Oxford Nanopore Technologies), og ble klargjort og behandlet som anbefalt av produsenten. Det ble brukt en MinION Flow Cell (R9.4.1) (Oxford Nanopore Technologies) i en MinION Sequencing Device (Oxford Nanopore Technologies) ved sekvensering. En ny Flow Cell ble montert i sekvenseringsmaskinen før den ble klargjort til bruk. Primingporten ble åpnet og noen få μ L luft og væske ble pipettert fra cellen for å fjerne alle bobler. En flow cell priming mix ble laget ved å overføre 30 μ L Flush Tether (FLT) direkte i røret med Flush Buffer (FB). Denne mixen ble blandet med pipettering. 800 μ L av priming mixen ble sakte fylt i flow cellen gjennom primingporten. Flow cellen fikk så hvile i 5 minutter. I et nytt 1,5 mL eppendorfrør ble DNAbiblioteket klargjort ved at 37,5 μ L Sequencing Buffer (SQB), 25,5 μ L nylig mikset Loading Beads (LB) og 12 μ L fra den tidligere klargjorte DNAprøven ble blandet. SpotON sample porten ble forsiktig åpnet, og 200 μ L flow cell priming mix ble tilsatt priming porten. DNAbiblioteket ble mikset forsiktig ved pipettering før 75 μ L av prøven ble tilsatt dråpevis via flow cellen via SpotON sample porten. SpotOn sample porten og priming porten ble begge lukket, og sekvenseringen ble startet. Sekvenseringen ble gjort med en

MinION Sequencing Device (Oxford Nanopore Technologies) og programvaren MinKnow (Oxford Nanopore Technologies). Sekvenseringen ble kjørt i omtrent 19 timer.

Analyse av sekvenseringsdata

Sekvenseringsprogramvaren produserte FAST5-filer som ble basecalleet og kategorisert etter barcoder 1-12 med *Guppy*, en integrert programvare i *MinKnow*. Disse filene var nå i FASTQ-format. De basecallede FASTQ-filene ble deretter «renset» ved å fjerne adaptore og barcoder med *Porechop*. *FastQC* i Linux ble deretter brukt for å sjekke kvaliteten og lengden på sekvensene. Sekvenser lengre enn 230 bp og kortere enn 200 bp ble filtrert bort, og filene ble konvertert til FASTA-format. FASTA filene ble så sammenliknet med referansedatabase ved hjelp av programvaren *BLAST+*. Referansedatabasen ble hentet fra NCBI sin «Nucleotide»-database og inneholdt all sekvensert mitokondrielt DNA fra databasen. *BLAST+* ble kjørt slik at sekvensene fra mitt bibliotek måtte matche minimum 90 % med sekvenser fra referansedatabasen. Kun den sekvensen som matchet best, altså nærmest 100 %, ble med som resultat fra *BLAST+*. Produktet fra *BLAST+* ble så filtrert i *R-studio* slik at kun sekvenser som matchet minimum 97 % med referansedatabasen ble med videre. Deretter ble resultatet filtrert slik at identifiserte arter med under 100 sekvenser totalt fordelt på alle barcodene ble filtrert bort.

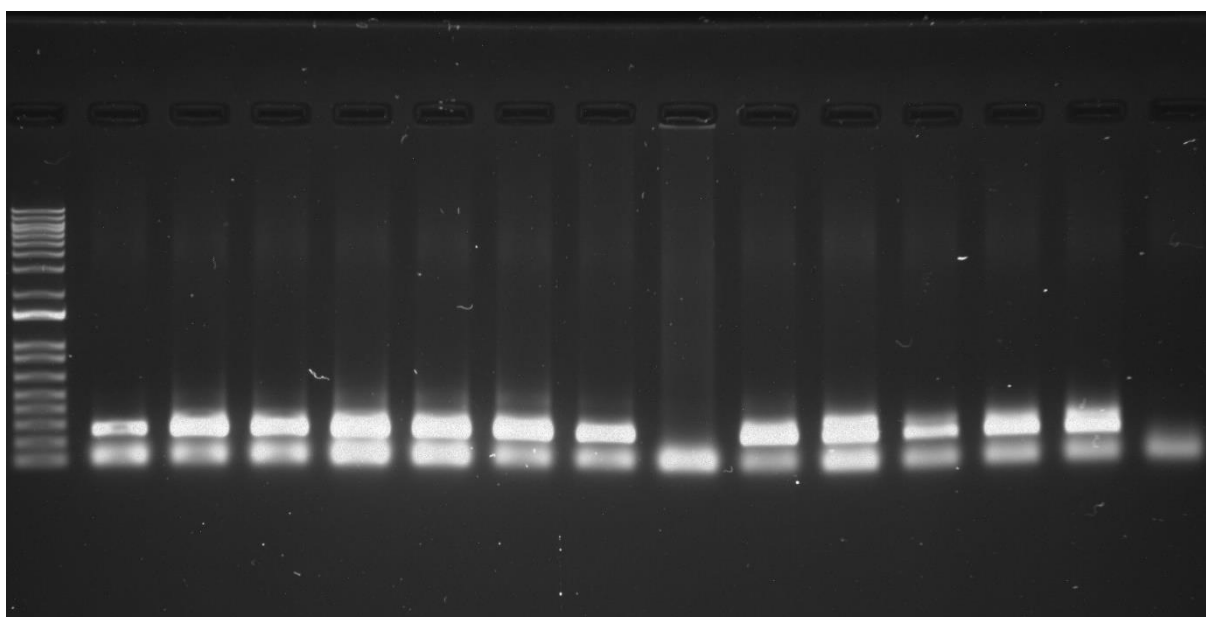
Strandnotdata

For å kunne ha et sammenlikningsgrunnlag mellom arter identifisert ved hjelp av eDNA analyse og en mer tradisjonell metode, ble upubliserte data fra Havforskningsinstituttets strandnottokt høsten 2019 brukt. Disse ble levert fra Havforskningsinstituttet med tillatelse til bruk til dette prosjektet. Dataen brukt er fra stasjon 65 og 66 som begge er lokalisert i Flødeviga. Dataen fra de to prøvestasjonene ble satt sammen til et datasett, og sammenliknet med resultatet av sekvenseringsdataanalysen. Spesielt ble dette datasettet sammenliknet med resultatene fra vannprøve E, som er hentet fra samme lokalitet noen måneder tidligere.

Resultater

DNAamplifisering ved PCR og agarosegel

Samtlige vannprøver, med unntak av vannprøve G, produserte bånd i agarosegel ved gelelektroforese etter DNAamplifisering ved PCR (Figur 3). Vannprøve G produserte bånd etter en senere amplifisering og elektroforese. Prøven med genomisk DNA fra Ål produserte også bånd på samme sekvenslengde som vannprøvene. Den negative labkontrollen, og de negative feltkontrollene produserte ikke bånd.



Figur 3: Bånd fra gelelektroforese. Fra venstre: Størrelsesstandard, genomisk DNA fra Ål, prøve A, B, C, D, E, F og G, dypvannsprøve H0, H10, H50, H100, H150 og negativ labkontroll.

Sekvenseringsdata

19 timer med sekvensering med MinION nanoporesekvensering resulterte i over 3 millioner sekvenser. Etter basecalling, *Blast+* og filtrering etter 97% sekvenslikhet og minimum 100 sekvenser per art ble den totale summen av sekvenser fra 12 prøver lik 16 082 sekvenser. Det ble identifisert totalt 24 arter av sekvensene fra de 12 prøvene etter *Blast+* og filtrering. Fra dette var det totalt 23 fiskearter og *Homo sapiens* (menneske) som ble indentifisert. De 23 fiskeartene er oppført i tabell 3 med norske, vitenskapelige og engelske navn.

eDNA analyse for fisk i Raet nasjonalpark

Tabell 3: Fiskearter identifisert ved hjelp av BLAST+ av sekvenseringsdata. Artene er plassert alfabetisk etter sitt norske navn. Artene er satt opp med Vitenskapelige, norske og engelske navn, og det er beskrevet hvilke prøver arten ble identifisert i etter sekvensering. N/A betyr at de ikke har noe navn på dette språket.

Vitenskapelig navn	Norsk navn	Engelsk navn	Prøver identifisert i
<i>Perca fluviatilis</i>	Abbor	European perch	E, F, G, H0
<i>Gadus chalcogrammus</i>	Alaskatheragra	Walleye pollock	A, E, F, H0, H50, H100, H140
<i>Lophius piscatorius</i>	Breiflabb	Angler	H100, H140
<i>Anguilla anguilla</i>	Europeisk ål	European eel	C, E, F, G, H0
<i>Anarhichas lupus</i>	Gråsteinbit	Atlantic wolffish	H100
<i>Merlangius merlangus</i>	Hvitting	Whiting	A, H0, H140
<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	Hyse	Haddock	A, B, C, E, F, H0, H100
<i>Salmo salar</i>	Laks	Atlantic salmon	E, G, H0, H100
<i>Pollachius pollachius</i>	Lyr	Pollock	D, E, F, H0, H10, H50,
<i>Scomber scombus</i>	Makrell	Atlantic mackerel	A, B, C, D, E, F, G, H0, H10, H100, H140
<i>Sardina pilchardus</i>	Sardin	Sardine	H10, H140
<i>Pollachius virens</i>	Sei	Saithe	B, D, E, F, H0, H10, H50
<i>Cluoea harengus</i>	Sild	Atlantic herring	A, B, D, E, F, G, H10, H50, H100, H140
<i>Clupea pallasii</i>	Stillehavssild	Pacific herring	A, B, D, E, F, G, H10, H50, H100, H140
<i>Gadus morhua</i>	Torsk	Atlantic cod	A, E, F, H0, H10, H50, H100, H140
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Trepigget stingsild	Three-spined stickleback	A, B, C, D, E, F, G, H0, H50
<i>Myoxocephalus scorpius</i>	Vanlig ulke	Shorthorn sculpin	A, B, D, E

<i>Salmo trutta</i>	Ørret	Sea trout	B, C, D, E, F, G, H0
<i>Ammodytes personatus</i>	N/A	Pacific sandeel	D, E, F, H0,
<i>Cleisthenes herzensteini</i>	N/A	Sohachi	D, F, G, H140
<i>Kareius bicoloratus</i>	N/A	Stone flounder	C, D, E, F, G, H0, H140
<i>Platichthys stellatus</i>	N/A	Starry flounder	C, D, E, F, G, H0, H140
<i>Pholis crassispina</i>	N/A	N/A	B, C, D, E, F

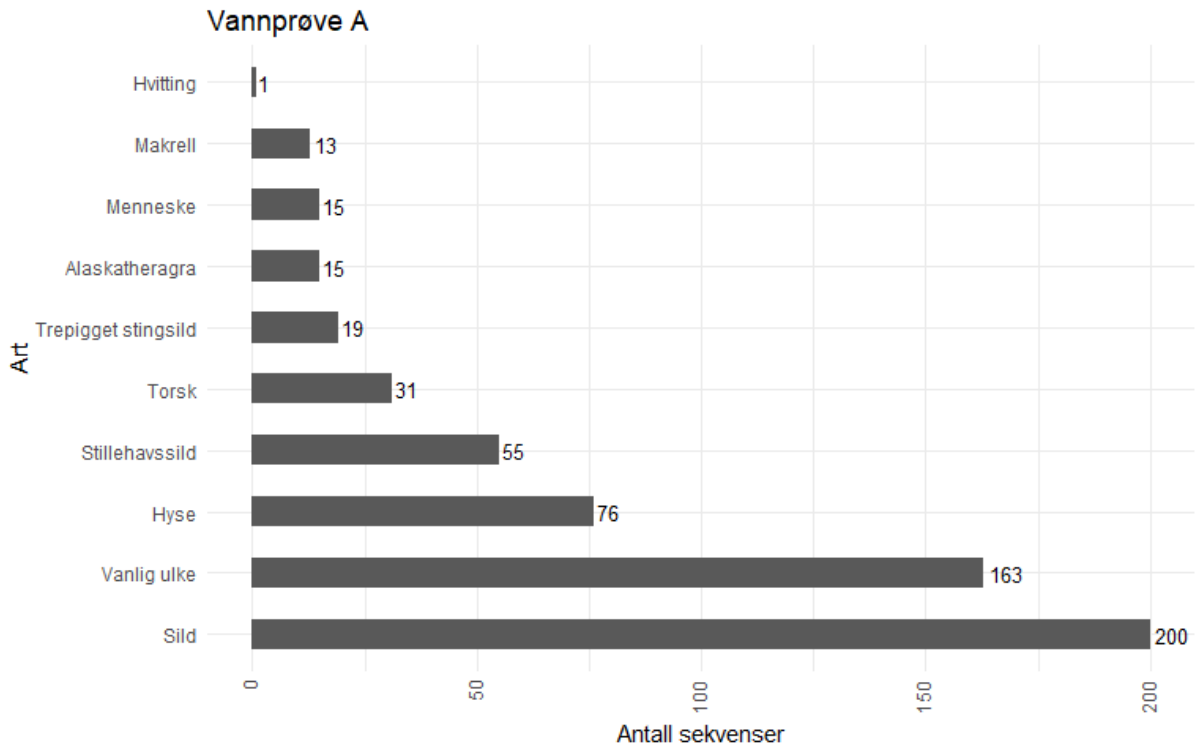
Makrell (*Scomber scombus*) er arten som ble funnet i flest prøver. Denne arten ble funnet i alle overflateprøvene (A-F) og i alle dypvannsprøvene (H0-H140) med unntak av på 100 meters dyp (H100). Gråsteinbit (*Anarhichas lupus*) var den eneste arten som kun ble funnet i én prøve. Denne arten ble ikke funnet i noen av overflateprøvene (A-F) og fra dypvannsprøvene (H0-H140) ble arten kun funnet på 100 meters dyp (H100).

Av lokalitetene til overflateprøvene (A-F) var det lokalitet E (Flødeviga) hvor det ble identifisert flest fiskearter etter sekvensering. Her ble 18 fiskearter identifisert. Lokaliteten med færrest antall identifiserte fiskearter av overflateprøvene var lokalitet C (Alvekiln). Her ble det identifisert 8 fiskearter. Av dypvannsprøvene (H0-H140) ble det identifisert flest fiskearter i prøven fra overflaten (H0) med 15 fiskearter. Av disse prøvene var det prøvene fra 10 meter og 50 meters dyp hvor det ble identifisert færrest fiskearter. Fra hver av disse vannprøvene ble det identifisert 7 fiskearter.

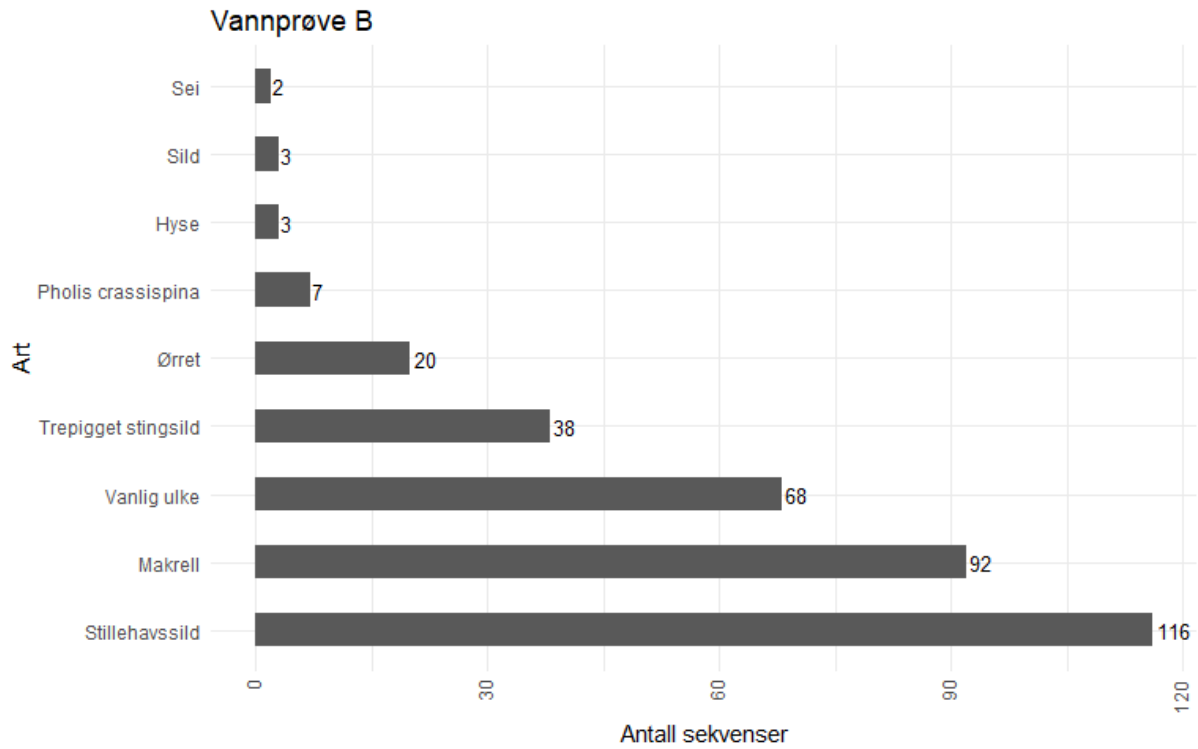
Figur 4-15 viser hvilke arter som ble identifisert i prøvene fra de ulike lokalitetene og dybdene. Figurene viser også hvor mange sekvenser som ble identifisert som hver enkelt art fra hver prøve. Vannprøven med flest antall sekvenser totalt er vannprøve H0 med 3956 sekvenser, mens vannprøve B har færrest sekvenser totalt med 349 sekvenser. Fiskearten som ble identifisert med flest sekvenser totalt er sild (*Cluoea harengus*), med totalt 1966 sekvenser fordelt på 10 vannprøver. Arten som ble identifisert med færrest sekvenser totalt er *Pholis crassispina* med 102 sekvenser totalt fordelt på 5 vannprøver. *Pholis crassispina* er en art i familien Pholidae, og er en stillehavsart. Dens eneste slektning kjent fra norske farvann er tangsprell (*Pholis gunnellus*).

Sei (*Pollachius virens*) var den arten som ble identifisert med flest sekvenser på en enkelt prøve. Den ble identifisert med 1102 sekvenser i vannprøve H0. Flere fiskearter ble identifisert med kun 1 sekvens ved noen prøver. Eksempler på dette er Torsk (*Gadus morhua*)

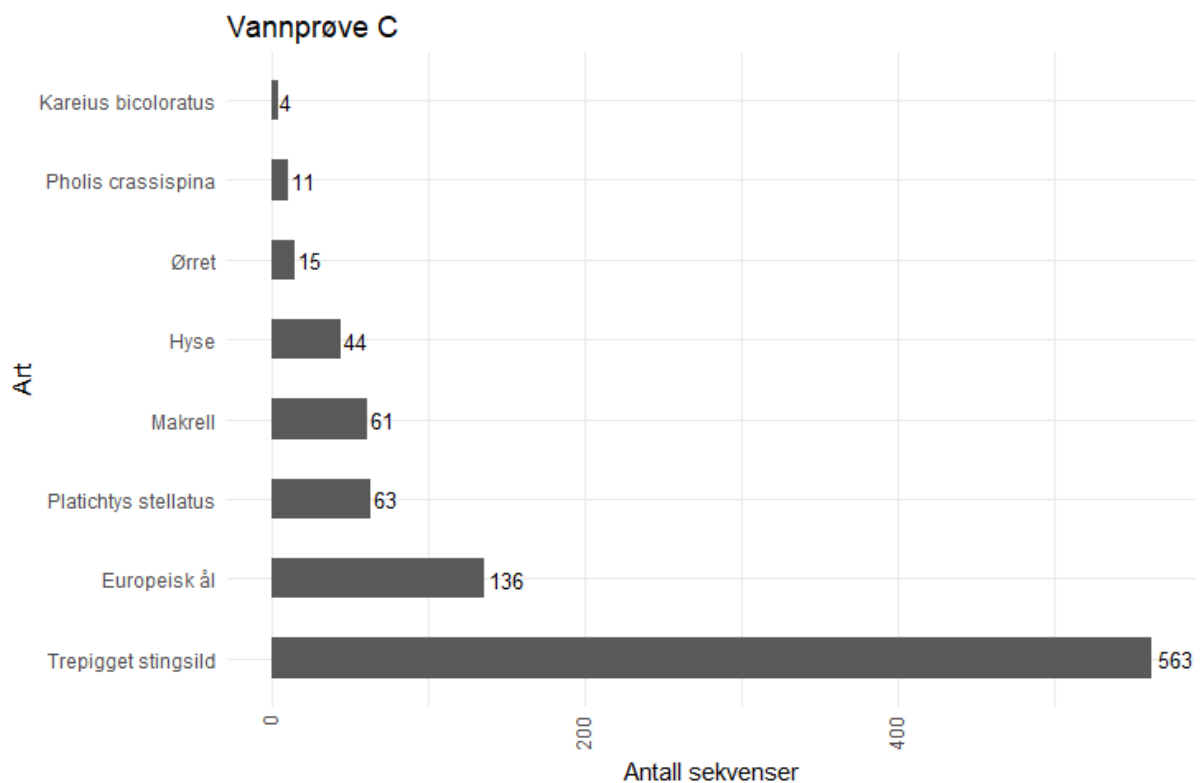
som ble identifisert med bare 1 sekvens i vannprøve H10 (10 meters dyp), og laks (*Salmo salar*) som ble identifisert med bare 1 sekvens både i vannprøve E (Flødeviga) og vannprøve G (Sømskilen). Alle disse artene ble identifisert med flere sekvenser i andre prøver, og ble derfor ikke filtrert ut.



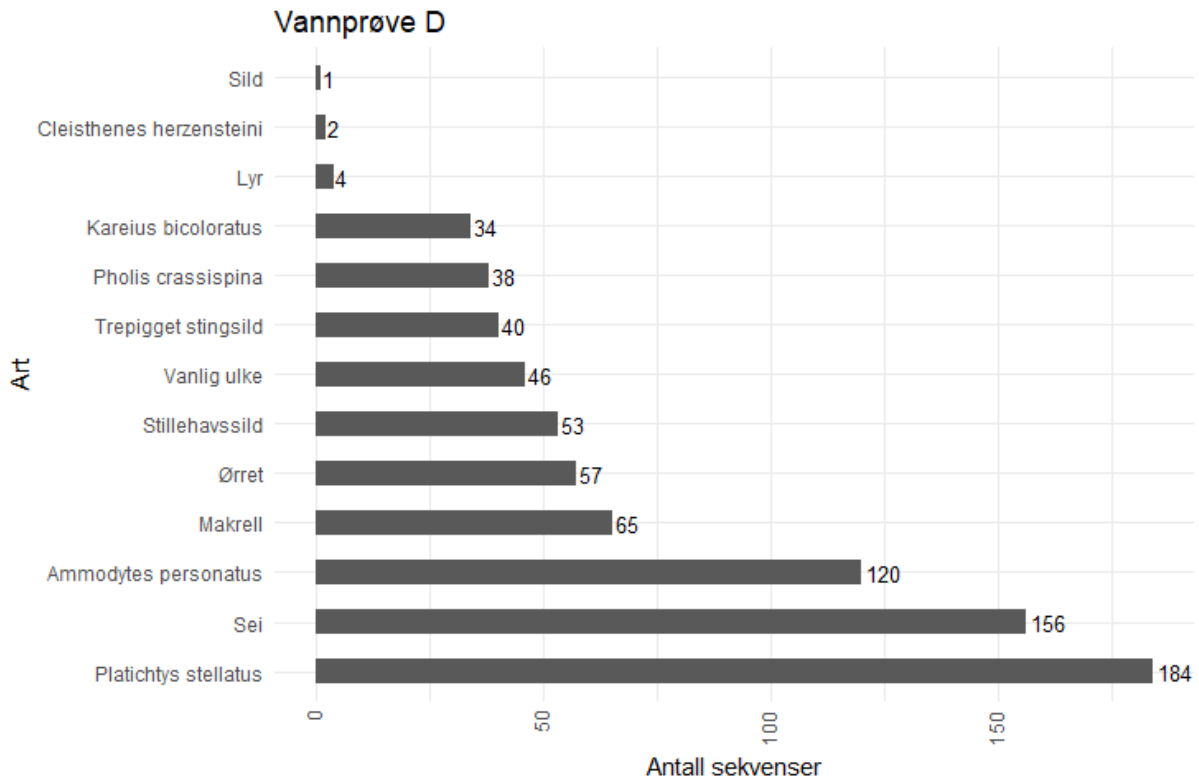
Figur 4: Arter identifisert i vannprøve fra lokalitet A – Hengsholmen. Artene med norske artsnavn på y-aksen og antall sekvenser hver art ble identifisert med i prøven på x-aksen.



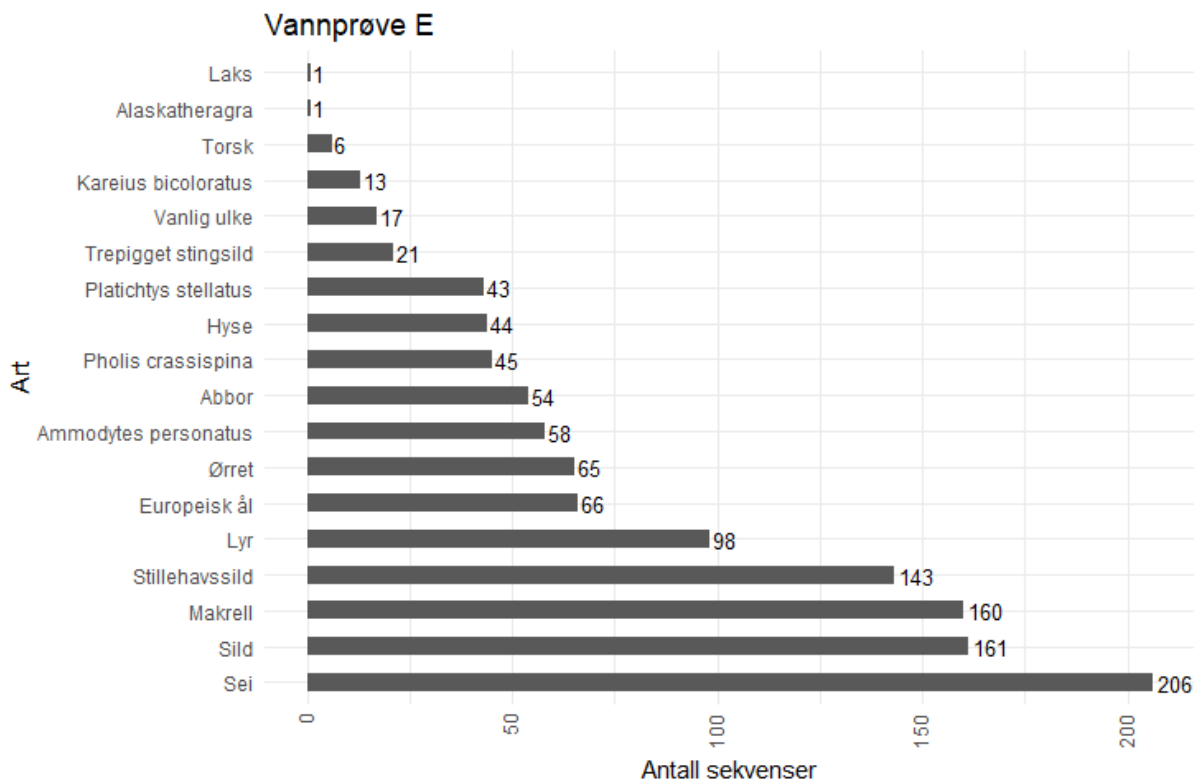
Figur 5: Arter identifisert i vannprøve fra lokalitet B – Furuøya. Artene med norske artsnavn på y-aksen og antall sekvenser hver art ble identifisert med i prøven på x-aksen.



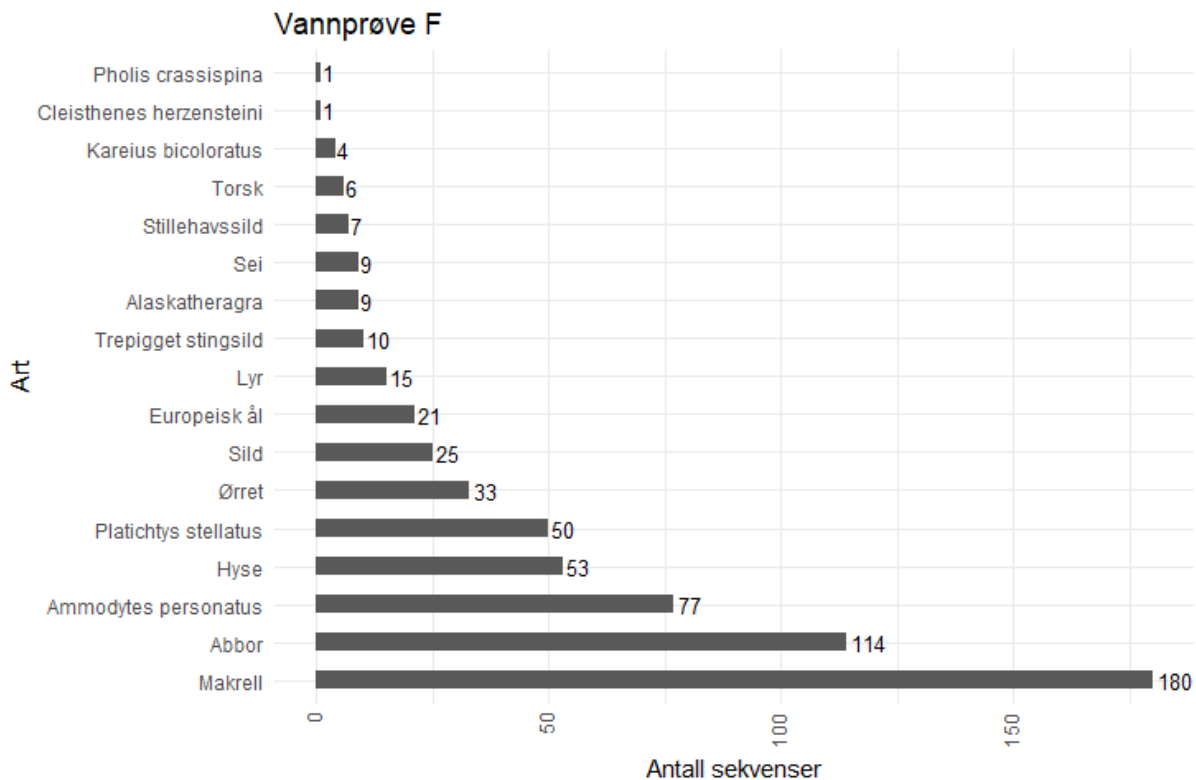
Figur 6: Arter identifisert i vannprøve fra lokalitet C – Alvekilen. Artene med norske artsnavn på y-aksen og antall sekvenser hver art ble identifisert med i prøven på x-aksen.



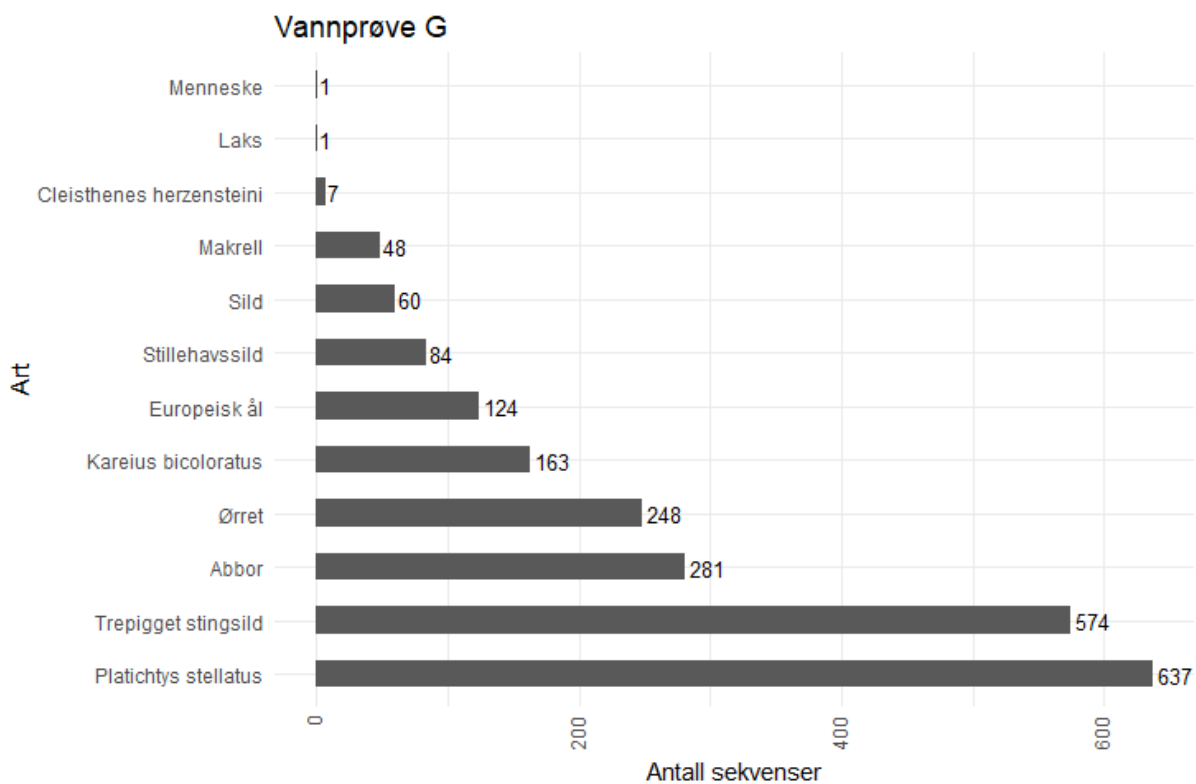
Figur 7: Arter identifisert i vannprøve fra lokalitet D – Hovekilen. Artene med norske artsnavn på y-aksen og antall sekvenser hver art ble identifisert med i prøven på x-aksen.



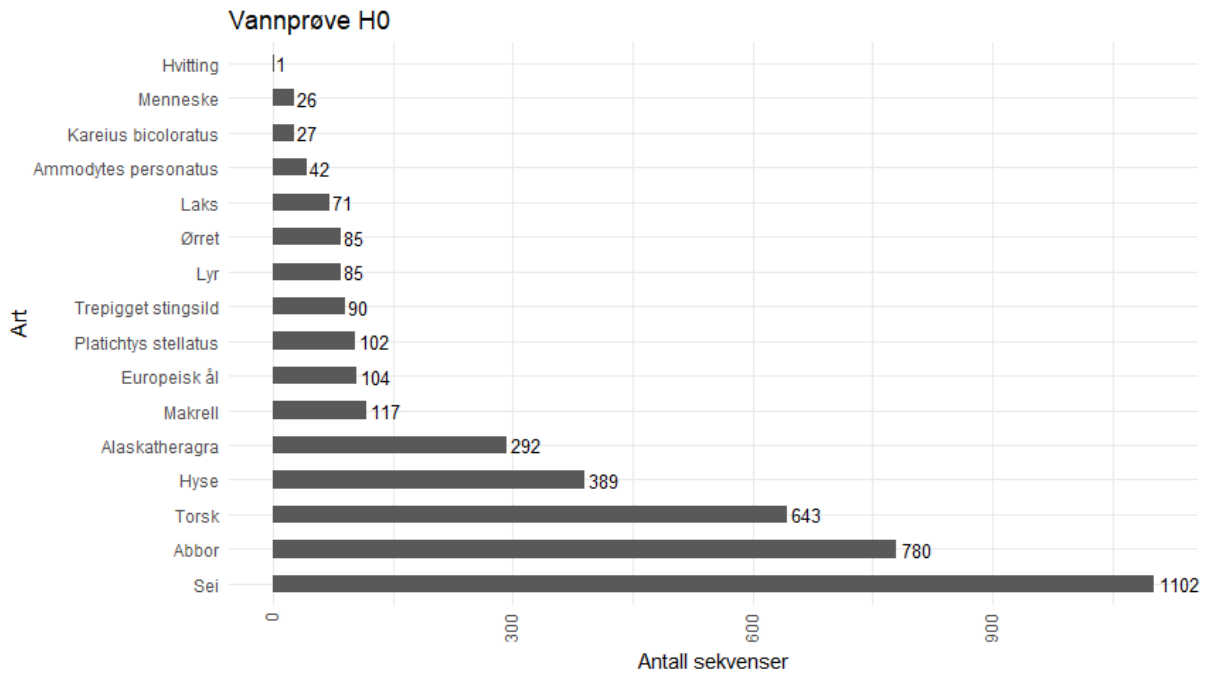
Figur 8: Arter identifisert i vannprøve fra lokalitet E – Flødeviga. Artene med norske artsnavn på y-aksen og antall sekvenser hver art ble identifisert med i prøven på x-aksen.



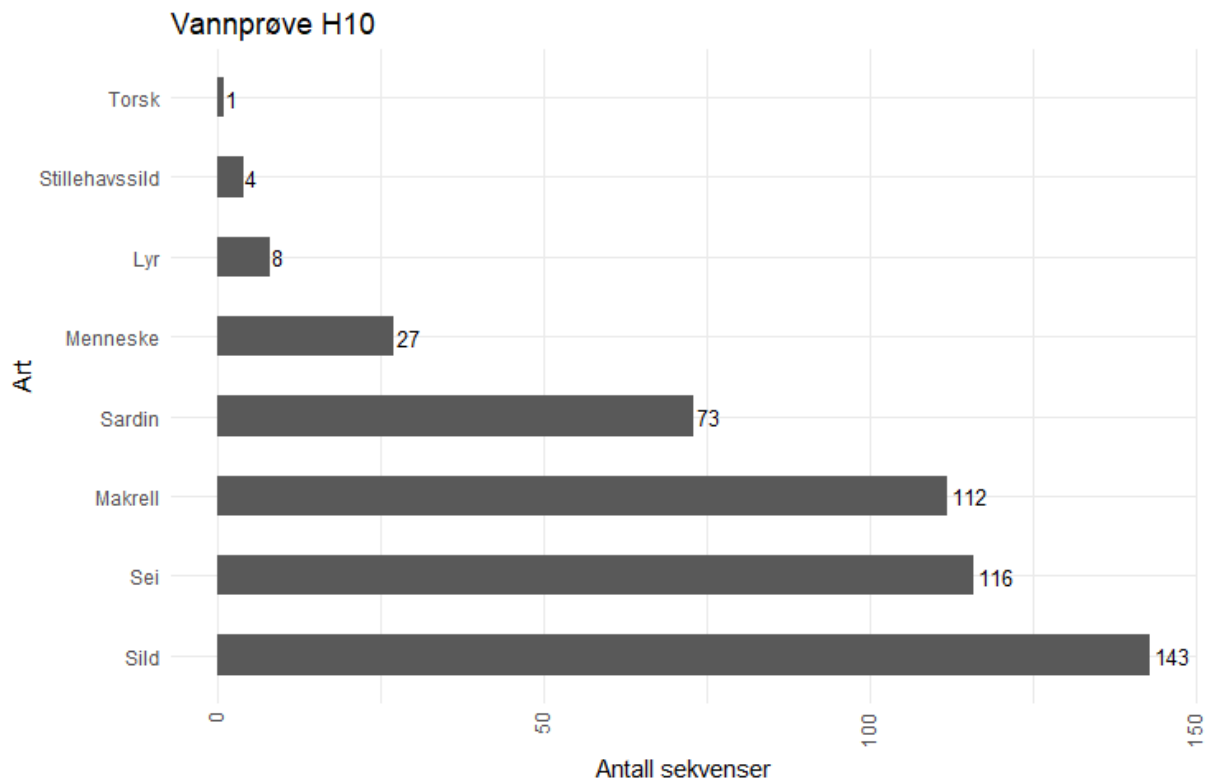
Figur 9: Arter identifisert i vannprøve fra lokalitet F – Gjervoldsøy/Klaua. Artene med norske artsnavn på y-aksen og antall sekvenser hver art ble identifisert med i prøven på x-aksen.



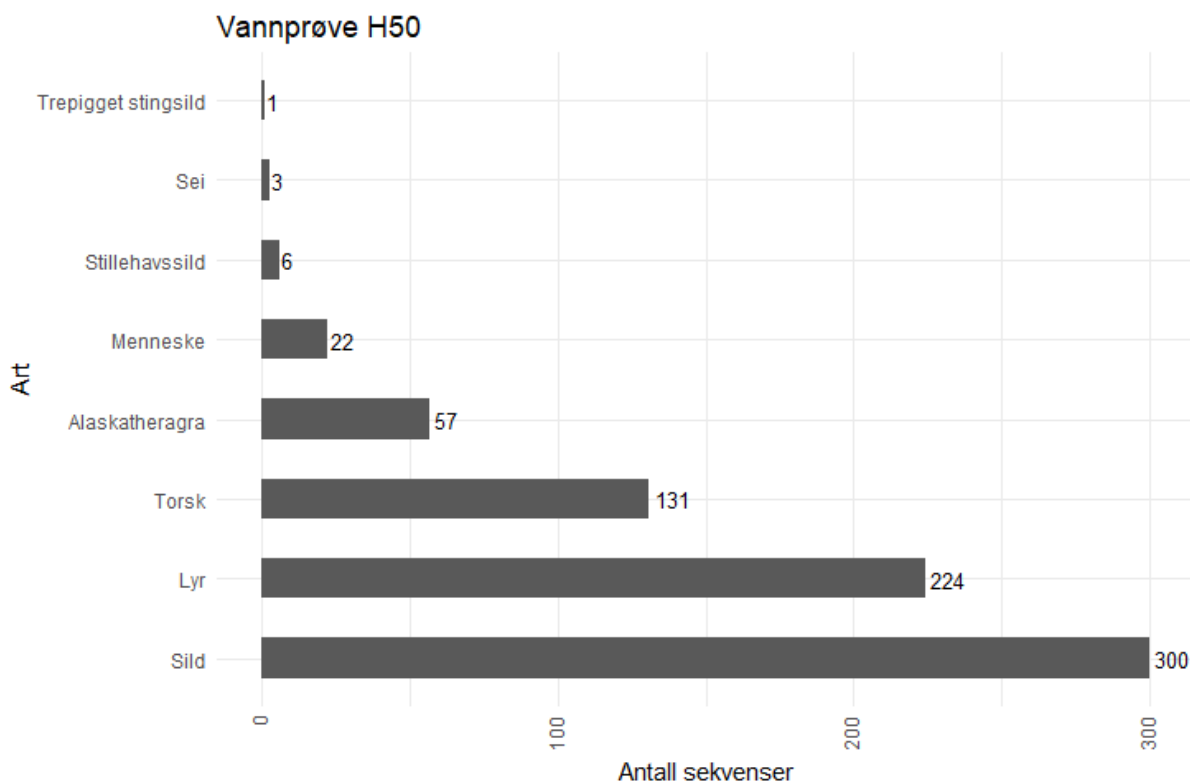
Figur 10: Arter identifisert i vannprøve fra lokalitet G – Sømskilen. Artene med norske artsnavn på y-aksen og antall sekvenser hver art ble identifisert med i prøven på x-aksen.



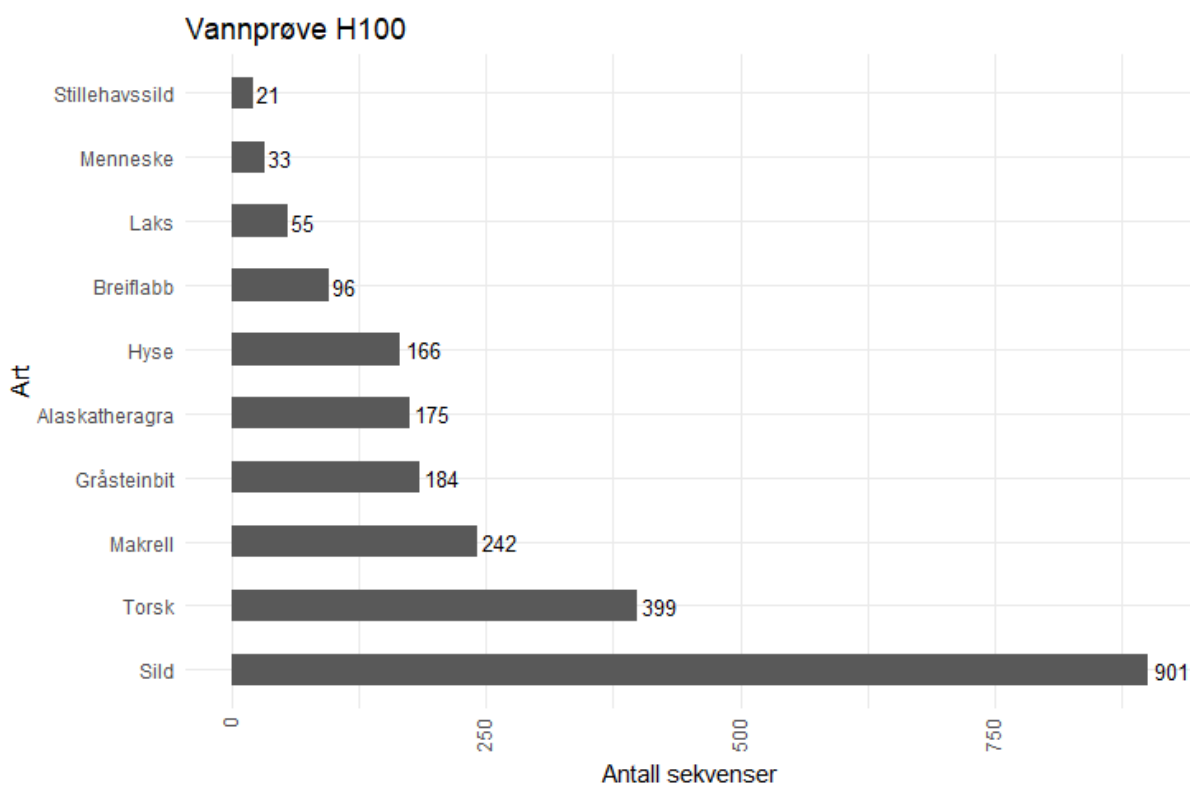
Figur 11: Arter identifisert i vannprøve fra overflaten ved lokalitet H. Artene med norske artsnavn på y-aksen og antall sekvenser hver art ble identifisert med i prøven på x-aksen.



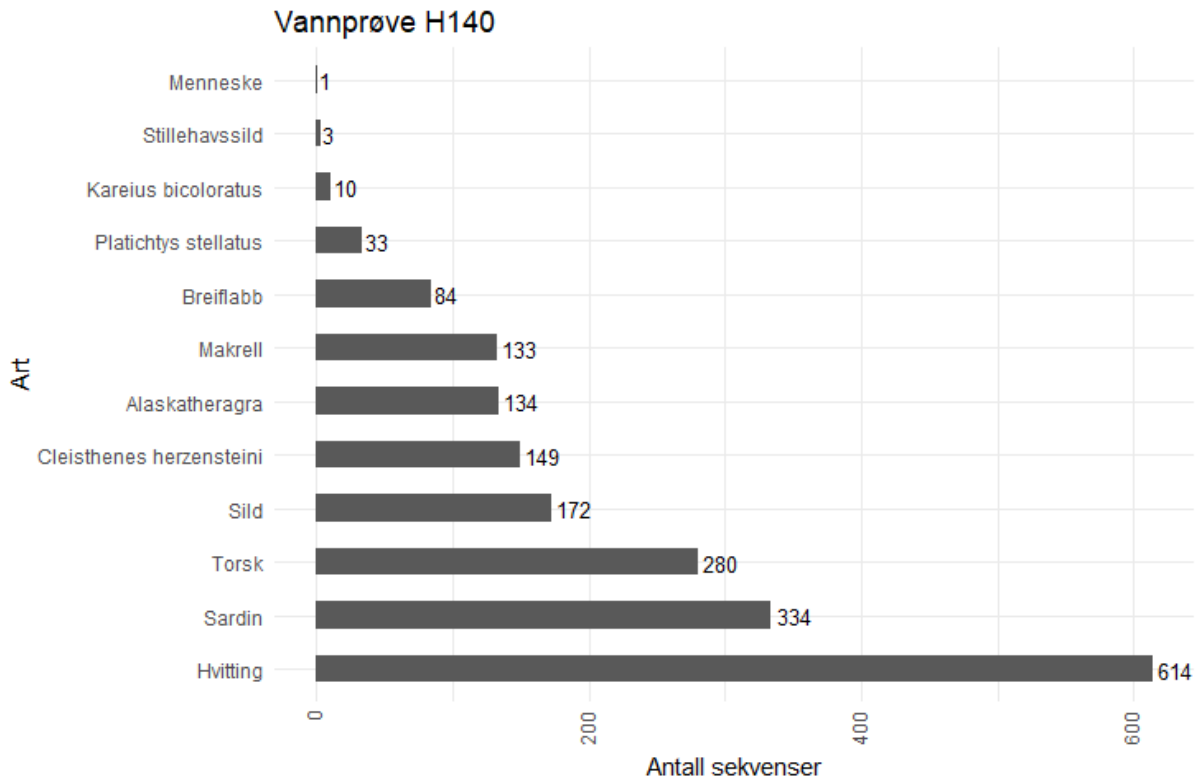
Figur 12: Arter identifisert i vannprøve fra 10 meters dyp ved lokalitet H. Artene med norske artsnavn på y-aksen og antall sekvenser hver art ble identifisert med i prøven på x-aksen.



Figur 13: Arter identifisert i vannprøve fra 50 meters dyp ved lokalitet H. Artene med norske artsnavn på y-aksen og antall sekvenser hver art ble identifisert med i prøven på x-aksen.



Figur 14: Arter identifisert i vannprøve fra 100 meters dyp ved lokalitet H. Artene med norske artsnavn på y-aksen og antall sekvenser hver art ble identifisert med i prøven på x-aksen.



Figur 15: Arter identifisert i vannprøve fra 140 meters dyp ved lokalitet H. Artene med norske artsnavn på y-aksen og antall sekvenser hver art ble identifisert med i prøven på x-aksen.

Sammenlikning av strandnotdata og sekvenseringsresultater

Ifølge data fra Havforskningsinstituttets strandnottokt høsten 2019 ble 12 fiskearter identifisert ved strandnotttrekk ved to stasjoner i Flødeviga (Tabell 4). Av de 12 artene ble 2 funnet ved hjelp av eDNAanalyse av en vannprøve hentet fra Flødeviga (Lokalitet E). Disse artene var torsk (*Gadus morhua*) og makrell (*Scomber scombus*). En siste art funnet i Flødeviga med strandnotttrekk, hvitting (*Merlengius merlangus*), ble også identifisert med eDNAanalyse, men ved lokalitet A og H (Prøve A, H0 og H140). Denne arten ble ikke funnet i Flødeviga ved eDNAanalyse. Torsk og Makrell ble også identifisert ved andre lokaliteter med eDNAanalyse (Tabell 3). 9 arter funnet med strandnotttrekk ble ikke identifisert med eDNAanalyse. De 16 resterende artene detektert med eDNAanalyse av vannprøve E ble ikke funnet ved hjelp av strandnotttrekk i den samme lokaliteten.

Tabell 4: Sammenlikning av arter funnet i Flødeviga med strandnottrekk høsten 2019 og med eDNAanalyse av vannprøver tatt sommeren 2019. *) Artene ble også identifisert i vannprøver tatt fra andre lokaliteter.

Arter	Vannprøve Flødeviga	Strandnottrekk Flødeviga
Torsk (<i>Gadus morhua</i>)	X*	X
Makrell (<i>Scomber scombus</i>)	X*	X
Hvitting (<i>Merlangius merlangus</i>)	*	X
Tangsnelle (<i>Syngnathus typhle</i>)		X
Dvergulke (<i>Taurulus bubalis</i>)		X
Bergnebb (<i>Ctenolabrus rupestris</i>)		X
Berggyllt (<i>Labrus bergylta</i>)		X
Svartkutling (<i>Gobius niger</i>)		X
Sandkutling (<i>Pomatoschistus minutus</i>)		X
Skrubbe (<i>Platichthys flesus</i>)		X
Rødspette (<i>Pleuronectes platessa</i>)		X
Grønngyllt (<i>Symphodus melops</i>)		X
Sei (<i>Pollachius virens</i>)	X	
Sild (<i>Cluoea harengus</i>)	X	
Stillehavssild (<i>Clupea pallasii</i>)	X	
Lyr (<i>Pollachius pollachius</i>)	X	
Europeisk ål (<i>Anguilla anguilla</i>)	X	
Ørret (<i>Salmo trutta</i>)	X	

eDNA analyse for fisk i Raet nasjonalpark

Abbor (<i>Perca fluviatilis</i>)	X	
Hyse (<i>Melanogrammus aeglefinus</i>)	X	
Trepigget stingsild (<i>Gasterosteus aculeatus</i>)	X	
Vanlig ulke (<i>Myoxocephalus scorpius</i>)	X	
Alaskatheragra (<i>Gadus chalcogrammus</i>)	X	
Laks (<i>Salmo salar</i>)	X	
<i>Ammodytes personatus</i>	X	
<i>Kareius Bicoloratus</i>	X	
<i>Platichthys stellatus</i>	X	
<i>Pholis crassispina</i>	X	

Diskusjon

I denne oppgaven har jeg detektert 23 fiskearter ved hjelp av eDNAanalyse av 12 vannprøver samlet ved 8 lokaliteter i og ved Raet nasjonalpark. Jeg har påvist ulike arter ved de forskjellige lokalitetene, og ved en av lokalitetene, påvist ulike arter på forskjellige dyp ned til 140 meter under havoverflaten.

eDNA fra 12 vannprøver, samt genomisk DNA fra europeisk ål ble amplifisert med PCR ved bruk av universelle primere for fisk (MiFish-U), samtidig som at det ikke ble amplifisert DNA fra noen av lab- eller feltkontrollene. Dette viser at DNA fra minimum en organisme som den universelle primeren passer til var til stede i hver prøve, og at det mest sannsynlig ikke har skjedd noen kontaminering av prøver under hverken feltarbeid, transport eller laboratoriearbeid.

Sekvenseringen av PCRprodukter ved nanoporesekvensering var også en suksess. I overkant av 3 000 000 sekvenser ble sekvensert, og de fleste av disse kunne sorteres etter hvilken vannprøve sekvenser opprinnelig kom fra. Dette tyder på at PCRproduktene var av god kvalitet, og at barcoding og «pooling» av prøvene var vellykket.

Hele 24 arter ble identifisert ved å sammenlikne sekvensene funnet etter sekvensering med mitokondrielt DNA fra «Nucleotide»-databasen hentet fra NCBL, hvorav 23 av artene var fiskearter. Menneske (*Homo sapiens*) ble detektert i noen av prøvene. Dette betyr at primeren ikke nødvendigvis er spesifikk for fisk. MenneskeDNA kan ha vært til stedet i vannet hvor vannprøvene er tatt, og kan ha kommet fra blant annet utslipp av avløp, septik fra båter eller noen kan ha badet i området tidligere. Det kan også ha kommet menneskelig DNA i prøvene under prøvetaking eller labarbeid. At den universelle fiskeprimeren også passer til menneskelig DNA er ikke særlig betydningsfullt, siden det i denne oppgaven skal fokuseres på fisk, og detektering av menneskelig DNA trolig ikke vil ha noe å si for detektering av fiskearter.

I de 12 vannprøvene var variasjonen på hvor mange fiskearter som ble identifisert ganske stor. Av overflateprøvene (A-G) ble flest arter detektert i prøve E (18), og færrest arter ble detektert i prøve C (8). At det var stor variasjon på hvor mange arter som ble identifisert ved de ulike lokalitetene er forventet ettersom det er betydelig avstand mellom dem. Det er også en viss diversitet mellom lokalitetene når det kommer til batymetri og naturtyper, og hvor mye vær, vind og havstrømmer lokalitetene er eksponert for. Et slags mønster kan bemerkes med at flere arter er detektert i vannprøver tatt ved de sydvestlige lokalitetene (E-G)

enn ved de mer nordøstliggende (A-D). Lokalitet E, F og G ligger alle relativt nær utløpet av Nidelva. Dette kan ha en betydning for hvor mange arter som ble funnet ved disse lokalitetene fordi lavere salinitet kan gi bedre overlevelse for eDNA (Okabe & Shimazu, 2007), og det kan derfor være lettere å detektere arter som har befunnet seg i området etter en lengre periode. eDNA fra visse ferskvannsarter kan også ha blitt transportert fra elva med strømmen, og kan ha blitt plukket opp med vannprøven. Arter som ørret, laks, abbor og trepigget stingsild, som alle ble detektert ved alle eller noen av disse tre lokalitetene, er eksempler på arter der DNAet kan ha stammet fra elva. En annen forklaring kan være at det med elva kommer næringsstoffer som gir gode levevilkår for et større antall arter i dette området enn ved de andre lokalitetene.

I dypvannsprøvene (H0-H140) var det også en viss variasjon når det kom til hvor mange arter som ble detektert i de forskjellige prøvene. Ved overflaten (H0) ble det detektert flest fiskearter (15), og det ble detektert færrest fiskearter (7) ved 10 og 50 m under havoverflaten (H10 og H50). En så stor variasjon mellom hvor mange arter som ble funnet ved de forskjellige dybdene var mindre forventet siden avstanden mellom prøvene er så liten. Spesielt overraskende er det kanskje at det ble detektert flest arter i prøven tatt ved overflaten (H0). Ifølge Turner et al. (2014) er de fleste partikler som bærer eDNA for tunge til å holde seg suspendert i vannmassene. Man vil derfor forvente å detektere flest arter nederst i vannmassen, ettersom man også vil kunne fange opp DNA fra fisk som har svømt nærmere overflaten. En grunn til at det ble identifisert flere arter i overflateprøven enn i resten av dypvannsprøvene kan være at metoden for prøvetaking for denne prøven var forskjellig fra de andre. Overflateprøven ble tatt ved hjelp av en bølge i enden av et tau, før vann fra bøtten ble overført til en desinfisert 1 liters flaske med skrukork, mens de resterende prøvene ble tatt ved hjelp av Niskinflasker i en rosett. Bøtten som ble brukt brukes vanligvis til å ta vannprøver for testing av vannkjemi, og var ikke desinfisert før bruk. Det er derfor mulig at denne prøven ble kontaminert, hvis bøtten tidligere hadde vært i kontakt med DNA fra fisk. Noe som taler mot dette er at bøtten ikke hadde blitt brukt minimum det siste døgnet, og hadde stått tørt. Det er dermed mindre sannsynlig at DNA fra tidligere bruk ville overlevd og vært av god nok kvalitet til å bli amplifisert ved PCR og detektert ved sekvensering. Ser man derimot bort fra prøven fra overflaten er det et mønster med de resterende prøvene at flere arter ble funnet i prøvene som ble tatt dypest (H10 – 7, H50 – 7, H100 – 9 og H140 – 11). Det er også et stort overlapp på artene detektert ved 10 m under overflaten og prøvene tatt dypere.

Av de 23 identifiserte artene har 17 av artene blitt funnet i norske farvann tidligere, hvorav 14 av disse artene har blitt funnet i eller rundt prøvetakingsområdet (Artsdatabanken, 2020). Mange av disse artene, blant annet makrell, sei, torsk, hyse, ørret og trepigget stingsild, ble identifisert i over halvparten av vannprøvene, og virker å være svært vanlige i store deler av nasjonalparken. Noen av artene, blant annet lyr, europeisk ål, laks og vanlig ulke, ble funnet i omtrent halvparten eller litt under halvparten av vannprøvene, og virker å være mindre utbredt. Enkelte av disse artene virker også å være samlet rundt visse områder, som europeisk ål og laks som begge hovedsakelig er funnet i prøver som er tatt i området rundt utløpet til Nidelva (prøve E-G).

Et par av artene, breiflabb (*Lophius piscatorius*) og gråsteinbit (*Anarhichas lupus*) er kun identifisert i de to dypeste av dypvannsprøvene, ved 100 og 140 meters dyp. Dette er å forvente ettersom begge disse artene er bunnfisk som ofte befinner seg i dypere havområder. Hvitting, som også vanligvis befinner seg dypere i vannmassene ble kun identifisert i tre av vannprøvene, men kun en av disse ble tatt fra et dyp som arten vanligvis befinner seg. Hvitting ble funnet i prøvene A, H0 og H140. I prøve H140, som ble tatt fra 140 meters dyp ble arten identifisert med 614 sekvenser, mens den i de to andre prøvene kun ble identifisert med en enkelt sekvens. Dette kan tyde på at det enten har vært svært lite DNA fra fisken der de to andre prøvene ble tatt, eller at det kan ha skjedd en feil enten under PCR, under sekvensering eller ved analyse av sekvenseringsdata. At arten er detektert i prøve H140 er det derimot svært liten tvil om.

Abbor (*Perca fluviatilis*) er fisk i abborfamilien, en familie i ordenen piggfinnefisker som hovedsakelig er å oppdrive i ferskvann og brakkvann. Abbor er en svært vanlig fisk i norske ferskvann og er observert i små vann i og rundt Raet nasjonalpark, samt i områder tilknyttet Nidelva. Abbor ble identifisert i vannprøve E-G og i overflateprøven tatt ved lokalitet H, med mellom 54 og 780 sekvenser. Ettersom at abbor er en ferskvannsfisk, er det overraskende å detektere den i vannprøver tatt i sjøen. Som diskutert tidligere ligger lokalitetene hvor vannprøve E, F og G ble tatt i nærheten av utløpet til Nidelva. DNA med opphav i elva, eller vann med forbindelse med elva kan ha blitt tatt med ut i sjøen via elveløpet. At slikt DNA skal ha funnet veien helt til lokalitet H er derimot vanskeligere å se for seg, ettersom at lokalitet H ligger langt unna land, og dermed også langt unna elvemunningen. En forklaring på dette kan være at DNA fra en art nært beslektet til abboren som ikke er i gendatabasen kan ha blitt identifisert som abbor under *Blast+*. Det kan også ha

skjedd en feil under PCR, og DNA fra en annen art har blitt amplifisert til å ligne på abborDNA.

2 av de 23 artene detektert i vannprøvene er arter som har blitt påvist i norske farvann, men ikke i eller i nærheten av prøvetakingsområdet tidligere. Disse artene er alaskatheragra (*Gadus chalcogrammus*) og sardin (*Sardinus pilchardus*). Alaskatheragra, også kjent som alaskatorsk, er en art i torskefamilien som hovedsakelig tilhører i Stillehavet, men som i nyere tid også er blitt påvist i norske farvann. I Norge er arten kun påvist langs kysten øst for Nordkapp i Finnmark. Etter eDNAanalyse ble arten detektert i 7 av 12 vannprøver tatt fra eller rundt Raet nasjonalpark. Arten er nært beslektet med torsk, som er en svært vanlig fisk i prøvetakingsområdet. Når en ser på hvilke prøver alaskatheragra ble funnet i så overlapper dette også godt med prøvene hvor torsk ble detektert. Torsk ble også, med unntak av i vannprøve F, detektert med et større antall sekvenser i hver prøve. Dette kan være et tegn på at en feil har skjedd under PCR, og at det som egentlig er toskeDNA har blitt identifisert som alaskatheragra. Det er også en mulighet at torsk og alaskatheragra er såpass like genetisk at det under *Blast+* har skjedd en forveksling mellom de to artene. Videre undersøkelser av sekvensene som ble identifisert som alaskatheragra burde derfor bli gjort for å bekrefte eller avkrefte om det faktisk er denne arten som har blitt detektert.

Sardin er en fiskeart i sildefamilien som sjelden besøker norskekysten. Ifølge artsdatabanken er arten blitt observert i Oslofjorden, samt på kysten nord for Trøndelag. Det er derfor ikke usannsynlig at arten kan befinne seg i eller rundt Raet nasjonalpark. Sardin ble detektert i vannprøver fra lokalitet H ved 10 og 140 meters dyp. Arten er i samme familie som sild (*Clupea harengus*), men her er trolig ikke slektskapet såpass nært at det skulle ha skjedd noen forveksling under *Blast+*. Sardin ble detektert med henholdsvis 73 og 334 sekvenser i prøve H10 og H140, hvor sild ble detektert med henholdsvis 143 og 172 sekvenser. Sild ble derimot også detektert i flere av vannprøvene hvor sardin ikke ble detektert. Det virker derfor mer sannsynlig at sekvensene som ble identifisert som sardin, faktisk stammet fra individer tilhørende denne arten.

De resterende 6 av de 23 identifiserte artene har ifølge artsdatabanken.no ikke vært oppdaget i norske farvann tidligere. Alle disse artene hører til i Stillehavet, men noen av dem har nære slektninger som lever i norske farvann.

Stillehavssild (*Clupea pallasii*) er en av disse artene. Den har sin opprinnelse i Stillehavet, og er nært beslektet med sild (*Clupea harengus*), som er svært vanlig i norske

farvann. Begge disse artene identifisert i de samme vannprøvene, og i de fleste prøvene ble den norske silda detektert med flest sekvenser. Siden stillehavssilda ikke før har blitt påvist i Norge, er det nærliggende å tenke at sekvensene som ble identifisert som stillehavssild, faktisk kommer fra individer av sild. En slik feil kan ha oppstått dersom en mutasjon har oppstått under PCR. Dersom artene er veldig like genetisk kan feilen også ha oppstått under *Blast+*, fordi programmet bare identifiserer en art per sekvens.

Ammodytes personatus ble detektert med mellom 42 og 120 sekvenser i vannprøver D, E, F og H0. *A. personatus* er en fisk i silfamilien (Ammodytidae) som hører til langs kysten i de nordlige deler av Stillehavet. Arten har to nære slektninger i norske farvann som begge deler artens slektsnavn; havsil (*Ammodytes marinus*) og småsil (*Ammodytes tobianus*). Som med stillehavssilden kan det være sannsynlig at sekvensene som ble identifisert som *A. personatus* heller stammer fra individer fra en eller begge av disse slektningene, men en grundigere undersøkelse av sekvensene må til for å bekrefte dette.

Cleisthenes herzensteini, *Kareius bicoloratus* og *Platichthys stellatus* er alle fisk i flyndrefamilien (Plauronectidae) og hører hjemme nord i Stillehavet. Ingen av artene er, ifølge artsdatbanken, noen gang påvist langs norskekysten. Med eDNAanalyse ble *K. bicoloratus* og *P. stellatus* identifisert i vannprøve C-G samt H0 og H140. *C. herzensteini* ble identifisert i vannprøve D, F, G, H0 og H140. Det er altså stor overlapp på hvilke prøver disse fiskene ble identifisert i. I prøvene alle tre artene var til stede i ble *P. stellatus* detektert med flest sekvenser med unntak av i prøve H140, hvor *C. herzensteini* ble detektert med flest sekvenser. *P. stellatus* ble detektert med flest sekvenser av flyndrefiskene også i de tre prøvene hvor *C. herzensteini* ikke ble påvist. Med bakgrunn av at ingen av disse tre artene er påvist i Norge tidligere, og at de tilhører i Stillehavet, så er det liten grunn til å tro at det faktisk er disse artene som har blitt identifisert i disse prøvene. Det er derimot sannsynlig at DNAet som er blitt sekvensert stammer fra andre arter i flyndrefamilien, og DNAet stammer sannsynligvis fra minst to forskjellige arter. I Norge finnes det flere arter fra flyndrefamilien, men noen av de mest sannsynlige kandidatene er kanskje skrubbe (*Platichthys flesus*), som deler slektsnavn med *P. stellatus*, rødspette (*Pleuronectes platessa*), kveite (*Hippoglossoides hippoglossus*) eller sandflyndre (*Limanda limanda*). Ved en nærmere inspeksjon av sekvensene og sammenlikning med flere gendatabaser vil det sannsynligvis være mulig å peke på hvilken eller hvilke arter dette DNAet kommer fra.

Den siste arten, *Pholis crassispina*, er en art som lever hovedsakelig i den nordvestlige delen av Stillehavet, og har heller ikke tidligere blitt påvist i Norge. *P. crassispina* er en fisk i

tangsprellfamilien (Pholidae), en familie med kun en norsk representant; tangsprell (*Pholis gunnellus*). *P. crassispina* ble påvist i vannprøve B-F med alt mellom 1-45 sekvenser i hver prøve. Også her er det skeptisisme over om DNAet som er blitt identifisert som *P. crassispina* faktisk stammer fra individer av denne arten. Ettersom tangsprell er en vanlig art i norske farvann og er nært beslektet med *P. crassispina*, er det nærliggende å tenke at dette DNAet som er amplifisert faktisk stammer fra tangsprellindivider. Som med flere av de tidligere eksemplene kan en feil under PCR ha gjort at tangsprellDNA blir detektert som *P. crassispina*. Dersom DNasekvensen til tangsprell mangler fra gendatabasen vil også denne feilen oppstå. En nærmere kontroll av disse sekvensene må til for å undersøke om slike feil kan ha skjedd.

Felles for alle disse stillehavsartene som tidligere har blitt nevnt er at de har taksonomisk nære slektninger som tidligere er påvist i eller rundt prøvetakingsområdet. De fleste av disse slektningene ble selv ikke detektert i noen av vannprøvene, selv om noen av de er ganske vanlige arter i norske farvann. Videre arbeid med dette temaet burde derfor fokusere på å undersøke om DNA fra disse artene faktisk kan amplifiseres med den universelle fiskeprimeren (MiFish-U). Dette kan gjøres ved å isolere DNA fra disse ulike artene og forsøke å amplifisere dette med primeren. Det burde også undersøkes om gendatabasen inneholder DNasekvenser fra disse artene, eller om en annen database burde vurderes.

For å evaluere effektiviteten til metoden brukt for å detektere fiskearter i denne oppgaven ble resultatene fra eDNAanalyse av vannprøve E, hentet fra Flødeviga sommeren 2019, sammenliknet med data fra Havforskningsinstituttets strandnottokt høsten 2019 (Tabell 4). Data fra stasjon 65 og 66 fra strandnottoktet ble valgt fordi disse overlappet med prøvetakingsområdet for vannprøve E. 14 arter ble funnet ved hjelp av strandnotttrekk og 18 arter ble identifisert med eDNAanalyse av vannprøve E, men kun 2 arter, torsk og makrell, ble funnet med begge metodene. Hvitting ble også funnet med begge metodene, men ikke ved den samme lokaliteten.

Tidligere studier som sammenlikner eDNAanalyse av vannprøver med tradisjonelle metoder for detektering av fiskearter har generelt funnet like mange eller flere arter ved hjelp av eDNA (Thomsen et al., 2012; Yamamoto et al., 2017). Dette samsvarer også med resultatene fra denne oppgaven, selv om overlappet av de to metodene er svært lavt. Det minimale overlappet med hvilke arter som ble funnet med de to metodene kan tyde på at metodene er selektive på ulike arter. Flere av artene funnet med strandnotttrekk og ikke med

eDNAanalyse var arter som ofte befinner seg nær land eller lever langs bunnen, mens mange av artene som bare ble funnet med eDNAanalyse er mer mobile og befinner seg kanskje oftere i de frie vannmassene. Vannprøvetakingen til eDNAanalysene ble gjort fra en båt, og kun vann fra omtrent 1 meters dyp ble tatt med. DNA som befant seg helt i vannkanten eller dypere i vannmassene kan derfor ha blitt utelatt, og arter som hovedsakelig befinner seg i disse områdene kan dermed ha blitt selektert bort. På den andre siden er strandnottrekk hovedsakelig en metode for å fange fisk i strandsonen, og vil muligens ikke fange opp arter som er mer mobile, eller som foretrekker å oppholde seg mer pelagisk.

En forklaring på hvorfor mange av artene funnet med strandnottrekk ikke ble detektert med eDNAanalyse kan være at PCRprimeren som ble brukt til amplifisering av DNA ikke passer disse artene. For å undersøke dette kan DNA fra disse artene isoleres, og PCRamplifikasjon kan forsøkes med de samme primerne. For artene som ble detektert med eDNAanalyse, men ikke med strandnottrekk kan det være at disse artene befant seg utenfor prøveområdet for nottrekkene, eller faktorer som maskestørrelse og notdybde kan ha vært med på å selektere bort visse arter. eDNAanalyse vil også ha muligheten til å detektere fisk ved alle livsstadier, og spesielt gameter kan være en av hovedkildene til eDNA i vannmassene. Egg og tidlige livsstadier av fisk som flyter pelagisk vil kunne bli plukket opp i vannprøver, men disse vil aldri bli detektert med strandnot. Forskjellen i prøvetakingstid kan også ha vært avgjørende for hvilke arter som ble funnet med de ulike metodene.

Selv om hele 23 fiskearter ble detektert totalt ved bruk av eDNAanalyse av vannprøver fra Raet nasjonalpark, viser dataen fra Havforskningsinstituttets strandnottokt at det fortsatt er flere fiskearter og -grupper som ikke blir detektert. Blant annet så er det ikke detektert noen leppefisker (labridae), kutlinger (gobiidae), norske arter i flyndrefamilien (plauronectidae) eller bruskfisker (chondichthyes). Det er selvfølgelig en mulighet at ingen fisk fra noen av disse gruppene var til stede ved lokalitetene under prøvetaking, men det er også sannsynlig at metoden som er blitt brukt ikke er tilstrekkelig for å detektere hele biodiversiteten av fisk i prøvetakingsområdene.

Selve prøvetakingen ble gjort på en måte som skulle være representativ for hele lokaliteten hver prøve ble tatt fra. Flere mindre vannprøver ble tatt fra en båt som kjørte gjennom et større område, og disse ble samlet i en større prøve. På grunn av at disse delprøvene ble tatt fra en båt, ble ikke vann fra helt nær land tatt med i vannprøven. Det ble heller ikke tatt prøver fra områder som var grunnere enn at båten, en Buster XL jolle med påhengsmotor, trygt kunne gå. Dette kan ha selektert ut visse arter som befinner seg i områder

nær land eller på grunt vann. Dersom det skulle vise seg at slike arter faktisk var til stede, men man ikke fikk fanget opp eDNA fra dem med prøvetakingsmetoden, kan det bety at metoder som bruker eDNAanalyse faktisk kan beskrive biodiversitet på en svært liten geografisk skala.

Prøvetakingen er heller ikke utført noe dypere enn omtrent 1 meter under overflaten, med unntak av dypvannsprøvene. Dette kan også være med på å selektere bort arter som lever langs bunnen ved de ulike lokalitetene. For å få med slike arter må muligens vannprøver fra dypere i vannsøylen også vurderes ved alle lokalitetene, selv om dette muligens krever mer avansert prøvetakingsutstyr. Yamamoto et al. (2017) tok både overflate- og bunnprøver under prøvetaking av vannprøver for eDNAanalyse vest i Maizuru Bay i Japanhavet, og fant over 30 arter eksklusivt i bunnprøvene. Resultatene fra dypvannsprøvene i denne oppgaven viser også noe av det samme, hvor to arter ble eksklusivt detektert i de to dypeste prøvene (gråsteinbit og breiflabb).

Under PCR ble det brukt en universell fiskeprimer (MiFish-U), som i utgangspunktet skulle passe til et stort antall fiskearter fra mange ulike taksonomiske grupper (Miya et al., 2015). Primeren har tidligere blitt brukt til å påvise 128 fiskearter i Japanhavet (Yamamoto et al., 2017), og ble under utvikling også testet på både akvarietanker og naturlige sjøvannsprøver, hvor henholdsvis 168 og 93 arter ble detektert (Miya et al., 2015). Begge disse tidligere studiene ble gjort i den nordvestlige delen av Stillehavet, og kan ikke nødvendigvis sammenliknes med en studie gjort langs Skagerrakkysten. Det at hele 23 arter ble detektert, hvorav 17 arter tidligere har blitt påvist i norske farvann tidligere viser at primeren også passer til mange av artene man vil forvente å finne langs norskekysten. Som nevnt tidligere er det også visse fiskearter som ikke har blitt detektert, og dette kan bety at primeren ikke dekker alle artene i den norske undervansfaunaen. For å dekke flere arter kan muligens andre universelle eller spesifikke primere benyttes istedenfor eller i tillegg til MiFish-U primeren. Thomsen et al. (2012) brukte for eksempel to universelle og fire artsspesifikke primere under eDNAanalyse av vannprøver fra Helsingør havn i Danmark. Som også nevnt tidligere burde det utføres et forsøk for å sjekke MiFish-U primeren faktisk passer på arter fra noen av artsgruppene som ikke ble detektert, eller om andre primere må benyttes for å detektere disse artene.

Under PCR ble det også brukt TaqMan® Environmental Master Mix 2.0 (Thermo Fisher). Denne mixen er designet spesifikt til å analysere eDNAprøver, og skal fungere selv om PCRinhibitorer som humussyre er til stede (Applied Biosystems, 2011). Det finnes mange

slike ulike PCRmixer, og flere av dem er mer presis enn TaqMan® Environmental Master Mix 2.0 (Thermo Fisher), men siden vi i denne oppgaven bare skal skille arter, burde presisjonen til TaqMan mixen være god nok.

Sekvenseringen ble gjort med en MinION Flow cell (R9.4.1) (Oxford Nanopore Technologies) i en MinION Sequencing Device (Oxford Nanopore Technologies). Dette er en sekvenseringsmaskin som baserer seg på nanoporesekvenseringsteknologi. Denne kan sekvensere en stor mengde DNA på kort tid, og på bare 19 timer ble det sekvensert over 3 000 000 sekvenser fra de 12 vannprøvene. Sekvenseringsnøyaktigheten til denne maskinen ligger gjennomsnittlig på 92 % (Goldstein et al., 2019), noe som er lavere enn for eksempel Illumina MiSeq plattformer (Judge, Harris, Reuter, Parkhill, & Peacock, 2015). For detektering av arter burde MinION sekvenseringen være nøyaktig nok, men det kan ikke utelukkes at feil under sekvensering kan ha påvirket resultatene av eDNAanalysen.

I den siste delen av metoden, behandlingen og analysen av sekvenseringsdataen, er det flere steg som kan ha påvirket hvilke arter som ble detektert eller ikke. Viktigst av disse er kanskje det siste steget, sammenlikning av sekvensdataen med en database. Denne sammenlikningen ble gjort med *Blast+*, og databasen sekvensdataene ble sammenliknet med inneholdt all sekvensert mitokondrielt DNA fra NCBI sin «Nucleotide»-database. NCBI sin «Nucleotide»-database er en ukuratert database for sekvenserte genomer av alle typer arter fra hele verden. Denne databasen skal i utgangspunktet inneholde sekvensert genom fra alle arter hvor genomet har blitt sekvensert. Ved å velge ut kun mitokondrielt DNA fra denne databasen vil man filtrere bort feil som kan oppstå om sekvensdataen matcher med sekvenser fra andre typer DNA, men man vil i teorien fortsatt kunne detektere alle typer organismer som har mitokondrielt DNA.

Blast+ ble kjørt slik at en art i databasen måtte ha en minimum 90 % sekvenslikhet med en sekvens sekvensert fra vannprøvene for at sekvensen skulle bli identifisert som denne arten. 90 % sekvenslikhet ble valgt for å veie opp for den forholdsvis høye feilraten til nanoporesekvenseringen. Denne grensen kan ha vist seg å ha vært for lav, ettersom at alle sekvensene som ble kjørt *Blast+* på matchet med en art. Hvis *Blast+* fant flere arter i databasen som matchet minimum 90 % med sekvensen, valgte den ut den arten med sekvenslikhet nærmest 100 %. På denne måten fikk hver sekvens bare en match. Etter *Blast+* ble sekvensene filtrert i *R-studio* slik at kun sekvenser som ble matchet med en art med minimum 97 % sekvenslikhet ble vurdert som faktiske matcher. Med dette ble det fjernet falske positive matchede sekvenser, mens det også er en risiko for å ha fjernet faktiske

positive matcher. Til slutt ble disse sekvensene igjen filtrert slik at kun arter som hadde blitt identifisert med totalt 100 eller flere sekvenser totalt fordelt på alle vannprøvene ble vurdert som faktisk detektert. På denne måten ble arter som kanskje hadde blitt identifisert på grunn av en feil under PCR eller sekvenseringen fjernet, men potensielt så ble også sekvenser fra arter som faktisk var til stede i vannprøven fjernet her. På dette siste steget hadde det muligens vært bedre å filtrere bort arter som ble identifisert med et lavt antall sekvenser i hver enkelt prøve. Dette hadde muligens vært en bedre måte å filtrere bort sekvenser med feil fra PCR eller sekvensering.

Ved videre arbeid med deteksjon av arter ved hjelp av eDNAanalyse i Raet nasjonalpark, burde en standardisert metode for analyse av sekvenseringsdata utvikles. Det burde arbeides sammen med noen med god erfaring med bioinformatikk og behandling av slik data for å finne ut hvilke parametere som skal settes for å effektivt og presist filtrere sekvenseringsdata. Disse parametere burde settes på en måte som gjør at færrest mulig feil fra DNAamplifisering og sekvensering får følger for hvilke arter som blir detektert, samtidig som sekvenser fra arter som faktisk er til stede slipper gjennom filtreringen. Hvis dette kan oppnås, burde det også lages en oversiktlig prosedyre, slik at en slik datafiltrering kan gjøres av noen med mindre erfaring og kunnskap om behandling av slike data. Dette ville gjort det mer effektivt å drive slik dataanalyse, og burde sikre at resultatene av en slik analyse faktisk er til å stole på.

Det burde også jobbes med å bygge en database for genomisk data fra arter som det forventes å finne, eller som allerede er påvist i og rundt nasjonalparken. Dette ville gjort det lettere å sette parametere for filtrering av sekvenseringsdata, samtidig som at sekvenser som tilhører arter utenfor denne databasen ville blitt lettere å oppdage. Slike sekvenser måtte da bli gått gjennom og analysert, og dersom det fantes flere like ukjente sekvenser kunne en mer generell database brukes til å identifisere hvilken art disse sekvensene kan tilhøre.

Konklusjon

eDNAanalyse gjør det mulig å effektivt påvise et stort antall arter i og rundt Raet nasjonalpark. Ved å analysere eDNA gjennom PCR med universelle primere, etterfulgt av nestegenerasjons DNAsekvensering har det vært mulig å beskrive deler av biodiversiteten av fisk i nasjonalparken. Det har også vært mulig å se forskjeller i biodiversiteten ved ulike lokaliteter innad i Raet nasjonalpark. En sammenlikning med en mer tradisjonell metode for overvåking av fisk avslører at eDNAanalyse detekterer visse arter mer effektivt enn tradisjonelle metoder, og andre arter mindre effektivt. Mye arbeid gjenstår for å forbedre metoden, men resultatene av denne oppgaven gir en god indikasjon på at eDNAanalyse har et stort potensiale til å brukes som et verktøy for å overvåke og beskrive biodiversiteten av fisk i Raet nasjonalpark.

Referanser

- Acinas, S. G., Sarma-Rupavtarm, R., Klepac-Ceraj, V., & Polz, M. F. (2005). PCR-Induced Sequence Artifacts and Bias: Insights from Comparison of Two 16S rRNA Clone Libraries Constructed from the Same Sample. *Applied and environmental microbiology*, 71(12), 8966-8969. doi:10.1128/aem.71.12.8966-8969.2005
- Applied Biosystems. (2011). TaqMan® Environmental Master Mix 2.0. In. USA: Applied Biosystems.
- Artsdatabanken. (2020). *Artsdatabanken*. Hentet fra <https://artsdatabanken.no/>
- Baird, D. J., & Hajibabaei, M. (2012). Biomonitoring 2.0: a new paradigm in ecosystem assessment made possible by next-generation DNA sequencing. *Molecular Ecology*, 21(8), 2039-2044. doi:10.1111/j.1365-294x.2012.05519.x
- Barceló, C., Ciannelli, L., Olsen, E. M., Johannessen, T., & Knutsen, H. (2016). Eight decades of sampling reveal a contemporary novel fish assemblage in coastal nursery habitats. *Global Change Biology*, 22(3), 1155-1167. doi:10.1111/gcb.13047
- Barnes, M. A., Turner, C. R., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Chadderton, W. L., & Lodge, D. M. (2014). Environmental Conditions Influence eDNA Persistence in Aquatic Systems. *Environmental Science & Technology*, 48(3), 1819-1827. doi:10.1021/es404734p
- Bohmann, K., Evans, A., Gilbert, M. T. P., Carvalho, G. R., Creer, S., Knapp, M., . . . De Bruyn, M. (2014). Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in ecology & evolution*, 29(6), 358-367. doi:10.1016/j.tree.2014.04.003
- Champlot, S., Berthelot, C., Pruvost, M., Bennett, E. A., Grange, T., & Geigl, E.-M. (2010). An Efficient Multistrategy DNA Decontamination Procedure of PCR Reagents for Hypersensitive PCR Applications. *Plos One*, 5(9), e13042. doi:10.1371/journal.pone.0013042
- Clusa, L., & García-Vázquez, E. (2018). A simple, rapid method for detecting seven common invasive fish species in Europe from environmental DNA. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 28(3), 619-629. doi:10.1002/aqc.2890
- Côté, I. M., & Perrow, M. R. (2006). *Ecological Census Techniques: A Handbook* (W. J. Sutherland Ed.): Cambridge University Press.
- Dejean, T., Valentini, A., Duparc, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P., & Miaud, C. (2011). Persistence of Environmental DNA in Freshwater Ecosystems. *Plos One*, 6(8), e23398. doi:10.1371/journal.pone.0023398
- Direktoratet for Naturforvaltning. (2007). *Kartlegging av marint biologisk mangfold*. (DN Håndbok 19-2001). Hentet fra https://www.miljodirektoratet.no/globalassets/publikasjoner/dirnat2/attachment/69/handbok-19-2001rev-2007_marin_nett.pdf
- Forskrift om bevaringssoner i Tvedestrand. (2012). *Forskrift om bevaringssoner i Tvedestrand kommunes sjøområder, Aust-Agder*. (FOR-2012-06-20-617). Hentet fra <https://lovdata.no/forskrift/2012-06-20-617>
- Forskrift om vern av Raet nasjonalpark. (2016). *Forskrift om vern av Raet nasjonalpark, Tvedestrand, Arendal og Grimstad kommuner, Aust-Agder*. (FOR-2017-11-24-1826). Hentet fra <https://lovdata.no/forskrift/2016-12-16-1632>

- 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(1). doi:10.1186/s12864-018-5381-7
- Halvorsen, S. (2019). *Kartlegging av vandringshindre og kvantifisering av europeisk ål (Anguilla anguilla) ved bruk av miljø-DNA*. (Masteroppgave). Universitetet i Agder, Kristiansand.
- Hansen, B. K., Bekkevold, D., Clausen, L. W., & Nielsen, E. E. (2018). The sceptical optimist: challenges and perspectives for the application of environmental DNA in marine fisheries. *Fish and Fisheries*, 19(5), 751-768. doi:10.1111/faf.12286
- Hopkins, G. W., & Freckleton, R. P. (2002). Declines in the numbers of amateur and professional taxonomists: implications for conservation. *Animal Conservation*, 5, 245-249. doi:10.1017/s1367943002002299
- Jain, M., Olsen, H. E., Paten, B., & Akeson, M. (2016). The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. *Genome Biology*, 17(1). doi:10.1186/s13059-016-1103-0
- 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(1). doi:10.1038/s41598-017-07650-6
- Jerde, C. L., Mahon, A. R., Chadderton, W. L., & Lodge, D. M. (2011). "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters*, 4(2), 150-157. doi:10.1111/j.1755-263x.2010.00158.x
- Judge, K., Harris, S. R., Reuter, S., Parkhill, J., & Peacock, S. J. (2015). Early insights into the potential of the Oxford Nanopore MinION for the detection of antimicrobial resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 70(10), 2775-2778. doi:10.1093/jac/dkv206
- Katsanevakis, S., Weber, A., Pipitone, C., Leopold, M., Cronin, M., Scheidat, M., . . . Vöge, S. (2012). Monitoring marine populations and communities: methods dealing with imperfect detectability. *Aquatic Biology*, 16(1), 31-52. doi:10.3354/ab00426
- Kelly, R. P., Port, J. A., Yamahara, K. M., Martone, R. G., Lowell, N., Thomsen, P. F., . . . Crowder, L. B. (2014). Harnessing DNA to improve environmental management. *Science*, 344(6191), 1455-1456. doi:10.1126/science.1251156
- Klymus, K. E., Richter, C. A., Chapman, D. C., & Paukert, C. (2015). Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Biological Conservation*, 183, 77-84. doi:10.1016/j.biocon.2014.11.020
- Knudsen, S. W., Ebert, R. B., Hesselsøe, M., Kuntke, F., Hassingboe, J., Mortensen, P. B., . . . Møller, P. R. (2019). Species-specific detection and quantification of environmental DNA from marine fishes in the Baltic Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 510, 31-45. doi:10.1016/j.jembe.2018.09.004
- Kvist, S. (2013). Barcoding in the dark?: A critical view of the sufficiency of zoological DNA barcoding databases and a plea for broader integration of taxonomic knowledge. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(1), 39-45. doi:10.1016/j.ympev.2013.05.012
- Liu, M., Clarke, L. J., Baker, S. C., Jordan, G. J., & Burridge, C. P. (2020). A practical guide to DNA metabarcoding for entomological ecologists. *Ecological Entomology*, 45(3), 373-385. doi:10.1111/een.12831
- Maruyama, A., Nakamura, K., Yamanaka, H., Kondoh, M., & Minamoto, T. (2014). The Release Rate of Environmental DNA from Juvenile and Adult Fish. *Plos One*, 9(12), 13. doi:10.1371/journal.pone.0114639

- Matheson, C. D., Gurney, C., Esau, N., & Lehto, R. (2010). Assessing PCR inhibition from humic substances. *The Open Enzyme Inhibition Journal*, 3(1).
- Miljødirektoratet. (2018). Naturbase Kart. Hentet fra <https://kart.naturbase.no/>
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., . . . Iwasaki, W. (2015). MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science*, 2(7), 33. doi:10.1098/rsos.150088
- Murakami, H., Yoon, S., Kasai, A., Minamoto, T., Yamamoto, S., Sakata, M. K., . . . Masuda, R. (2019). Dispersion and degradation of environmental DNA from caged fish in a marine environment. *Fisheries Science*, 85(2), 327-337. doi:10.1007/s12562-018-1282-6
- Okabe, S., & Shimazu, Y. (2007). Persistence of host-specific Bacteroides-Prevotella 16S rRNA genetic markers in environmental waters: effects of temperature and salinity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76(4), 935-944. doi:10.1007/s00253-007-1048-z
- Payne, A., Holmes, N., Rakyan, V., & Loose, M. (2018). *Whale watching with BulkVis: A graphical viewer for Oxford Nanopore bulk fast5 files*. Cold Spring Harbor Laboratory. Retrieved from <https://dx.doi.org/10.1101/312256>
- Prosjektgruppa for Raet nasjonalpark. (2016). *Utkast av Forvaltningsplan for Raet nasjonalpark, Hove landskapsvernområde og Søm landskapsvernområde*. Hentet fra <https://fylkesmannen.no/globalassets/fm-agder/dokument-agder/miljo-og-klima/verneomrader/raet-nasjonalpark/raet-np---forvaltningsplanutkast-som-folger-vernevedtaket-raet-nasjonalpark-16122016.pdf>
- Shokralla, S., Spall, J. L., Gibson, J. F., & Hajibabaei, M. (2012). Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Molecular Ecology*, 21(8), 1794-1805. doi:10.1111/j.1365-294x.2012.05538.x
- Sigsgaard, E. E., Nielsen, I. B., Bach, S. S., Lorenzen, E. D., Robinson, D. P., Knudsen, S. W., . . . Willerslev, E. (2017). Population characteristics of a large whale shark aggregation inferred from seawater environmental DNA. *Nature ecology & evolution*, 1(1), 0004.
- 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
- Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Møller, P. R., Rasmussen, M., & Willerslev, E. (2012). Detection of a Diverse Marine Fish Fauna Using Environmental DNA from Seawater Samples. *Plos One*, 7(8), 9. 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
- Tiralongo, F., Lillo, A. O., Tibullo, D., Tondo, E., Martire, C. L., D'Agnesse, R., . . . Azzurro, E. (2019). Monitoring uncommon and non-indigenous fishes in Italian waters: One year of results for the AlienFish project. *Regional Studies in Marine Science*, 28, 100606. doi:10.1016/j.rsma.2019.100606
- Turner, C. R., Barnes, M. A., Xu, C. C. Y., Jones, S. E., Jerde, C. L., & Lodge, D. M. (2014). Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods in Ecology and Evolution*, 5(7), 676-684. doi:10.1111/2041-210x.12206
- Wheeler, Q. D. (2004). Taxonomy: Impediment or Expedient? *Science*, 303(5656), 285-285. doi:10.1126/science.303.5656.285

Yamamoto, S., Masuda, R., Sato, Y., Sado, T., Araki, H., Kondoh, M., . . . Miya, M. (2017). Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Scientific Reports*, 7, 12. doi:10.1038/srep40368