Påvisning av europeisk ål (*Anguilla anguilla)* og ålens svømmeblæremark (*Anguillicoloides crassus)* ved bruk av eDNA og qPCR.

Bacheloroppgave i biologi

Linda Sjåstad Henriksen og Stian Borg-Stoveland

2018

Institutt for naturvitenskapelige fag

Fakultet for teknologi og realfag

Universitetet i Agder

© Linda Sjåstad Henriksen og Stian Borg-Stoveland 2018
UiA Bacheloroppgave i biologi, referansenr.: 122 – Bio

Innlevert som oppgave i emnet: BIO300 Bacheloroppgave, våren 2018, under veiledning av Dr. Audun Slettan

Alle rettigheter reservert. Ingen deler av denne oppgaven kan kopieres uten tillatelse fra forfatteren.

Bacheloroppgaven 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 innestår for de metoder som er anvendt og de konklusjoner som er trukket.

Forord

Denne bacheloroppgaven ble utført ved Universitetet i Agder ved fakultetet for teknologi og realfag. Vi vil rette en stor takk til Dr. Audun Slettan for god hjelp og veiledning i forbindelse med arbeidet på denne oppgaven. Vi vil også takke Per Eikeset Knudsen for god hjelp til å finne labutstyr som manglet.

Sammendrag

I et globalt perspektiv har biodiversiteten hatt en generell nedadgående trend de siste fire tiårene. En art som har hatt en dramatisk nedgang er europeisk ål (*Anguilla anguilla)*, den er i dag vurdert som VU-sårbar i følge Norsk rødliste for arter. Det kan være flere årsaker til denne nedgangen. En av dem er ålens svømmeblæremark (*Anguillicoloides crassus*), en parasitt som angriper svømmeblæren til ål. For at vi skal være i stand til å implementere hensiktsmessige tiltak er effektiv bestandsovervåkning viktig. Frem til i dag har innsamling av informasjon om arten i stor grad vært basert på forskningsfangst, elektrofiske og observasjoner. Bruken av «Environmental DNA» (eDNA) og quantitative PCR (qPCR) er en forholdsvis ny metode som blant annet har blitt tatt i bruk ved påvisning av sjeldne og uønskede arter.

I vår oppgave ønsket vi å undersøke om det var mulig å bruke eDNA og qPCR til å påvise tilstedeværelsen av europeisk ål og ålens svømmeblæremark i Mandalselva, et vassdrag med høy vannføring. Det ble i fjor gjennomført en lignende studie, men denne hadde mindre sideelver og bekker som forsøksområder. I tillegg ønsket vi å teste sensitiviteten til metoden. Vi påviste europeisk ål ved 7 av 10 lokaliteter, noe som indikerer at metoden kan være et viktig supplement til bestandsovervåkning av ål. Svømmeblæremarken ble ikke påvist ved noen av lokalitetene. Det kan være flere årsaker til at vi ikke lyktes med dette, hvor den mest sannsynlige er at arten ikke finnes på lokalitetene hvor prøvene ble hentet fra. Andre forklaringer kan være svømmeblæremarkens kompliserte livssyklus som gjør at det til tider kan være lite DNA tilgjengelig i vannet. PCR-hemmende stoffer i prøvene kan også ha spilt en negativ rolle i forhold til påvisningen av begge artene.

Den minste konsentrasjonen av DNA vi klarte å påvise europeisk ål ved bruk av qPCR var på 0,00418 $\frac{ng}{\mu l}$, og for svømmeblæremark 0,002039 $\frac{ng}{\mu l}$. Den minste konsentrasjonen av celler som kan være i vannprøvene er 1,2 celler/ml, hvilket er en indikasjon på at metoden er sensitiv. Vi fikk en qPCR-effektivitet på 80% og 79% for henholdsvis ål og svømmeblæremark.

Innhold

Introduksjon 7
Europeisk Ål (Anguilla anguilla) 8
Nedgang i europeisk ål 8
Ålens svømmeblæremark (Anguillicoloides crassus) 9
«Environmental DNA» (eDNA) 11
Problemstilling 13
Materiale og metoder 14
Innsamling av vannprøver 14
Isolering av eDNA og genomisk DNA 15
Måling av renhet og konsentrasjon til DNA 17
Design av primer og probe 17
Real-time PCR (qPCR) 18
qPCR-effektivitet og sensitiviteten til påvisningsmetoden 19
Resultater 20
Konsentrasjon av DNA og renheten til prøvene 20
Seksvenssammenligning av primere og probe for svømmeblæremark 20
Påvisning av ål og ålens svømmeblæremark 22
PCR-effektivitet og sensitiviteten til påvisningsmetoden 23
Diskusjon 26
Konklusjon 28
Referanser 30

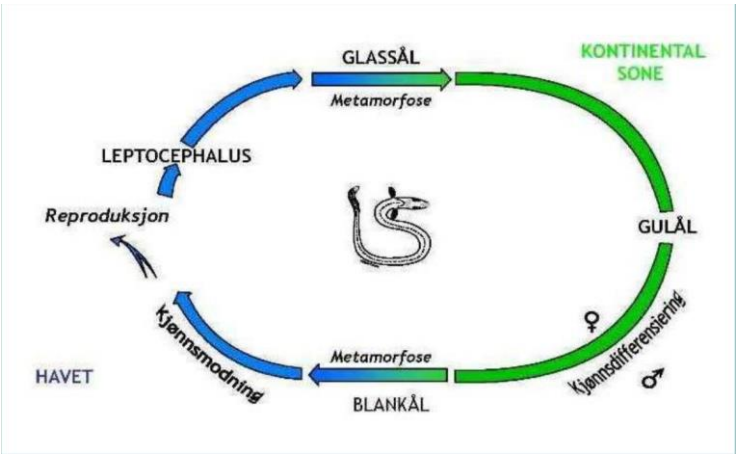
Introduksjon

Biodiversiteten har hatt en tydelig negativ trend de fire siste tiårene (Butchart et al., 2010). I 2002 ble ledere av 190 land enige om at det måtte iverksettes tiltak for å betydelig redusere eller i det minste forsøke å stoppe nedgangen i biodiversitet. Dette ble nedtegnet gjennom "Convention on Biological Diversity" (Unep, 2002). Konserveringsarbeid er et viktig slikt tiltak. Effektiv bestandsovervåkning og kartlegging av truede arter er kritisk for å sikre gode resultater i dette arbeidet. (Sigsgaard, Carl, Møller & Thomsen, 2015). Tradisjonelle metoder for overvåkning i akvatiske og marine miljø er stort sett basert på fangst, elektrofiske og observasjoner. Dette kan være både tidkrevende og dyrt (Doi et al., 2017). Analyse av «Environmental DNA» (se eget avsnitt side 11) for å kartlegge biomasse er en kjent metode innen forskning (Foote et al., 2012; Goldberg, Caren S, Strickler & Pilliod, 2015; Thomsen, P. F. et al., 2012; Thomsen & Willerslev, 2015; Valentini et al., 2016; Valiere & Taberlet, 2000), men få studier er gjort for å kartlegge biomasse i større elvesystemer med høy vannføring (Doi et al., 2017). I 2017 ble det skrevet en bacheloroppgave av en student ved Universitetet i Agder som tok for seg eDNA (se eget avsnitt side 11) og qPCR for å påvise europeisk ål. I den oppgaven ble det kun undersøkt for ål i mindre sidebekker (Halvorsen, 2017). Vi vil se om metoden kan benyttes i vassdrag med høy vannføring.

Europeisk ål har siden slutten av 1970-tallet opplevd en dramatisk bestandsreduksjon og er i dag regnet som en kritisk truet art på rødlisten til The World Conservation Union (Iucn, 2014). På den norske rødlisten for arter er den oppført som VU-sårbar (Artsdatabanken, 2012). Det er flere medvirkende faktorer til nedgangen i ålebestanden i Europa. Overfiske, tap av habitat, forurensing, parasitter, sykdommer, predasjon og klimaendringer er blant årsakene som forskere mener er ansvarlige (Bonhommeau, Chassot & Rivot, 2008; Dekker, 2003; Durif & Skiftesvik, 2007; Feunteun, 2002).

Europeisk Ål (*Anguilla anguilla*)

Europeisk ål er en katadrom fiskeart. Det vil si en art som lever i ferskvann og brakkvannsområder som voksen mens gytingen skjer i havet. Den foretar en av havets lengste gytevandringer på 5000 kilometer fra fastlandseuropa til gyteplassene i Sargassohavet utenfor østkysten av Mellom-Amerika (Schmidt, 1923; Tesch & White, 2008). Derfra bæres avkommet dels for egen maskin og dels ved hjelp av varme havstrømmer til blant annet den europeiske kontinentalsokkel (Schmidt, 1923). Europeisk ål gjennomgår flere ulike stadier (Figur 1) i løpet av sin livssyklus (Tesch & White, 2008). Det første stadiet er et larvestadie som varer i 8-9 måneder. I løpet av dette stadiet driver larvene på blant annet Golfstrømmen mot kontinentet (Schmidt, 1923). Larvene, som kalles leptocephalus, er et felles larvestadie som flere ulike arter ål gjennomfører. Størrelse og utseende på larvene varierer mellom arter (Miller, 2009). Etter larvestadiet gjennomgår dyret metamorfose og forvandles til glassål (Arai, Otake & Tsukamoto, 2000; Tesch & White, 2008). Som glassål svømmer de opp i elvesystemer hvor de gjennomfører en vekstfase som resulterer i gulål. Dette stadiet varer i 6-25 år (Tesch & White, 2008). Etter gulålstadiet vandrer ålen ut i havet igjen som blankål og starter migrasjonen tilbake til gyteplassene i Sargassohavet (Tesch & White, 2008). Kunnskapen om ålens vandring har vært kjent lenge, men likevel fremstår store deler av den som uoppklart (Aarestrup et al., 2009).



Figur 1: Skjematisk fremstilling av livssyklusen til europeisk ål (kilde: http://www.imr.no

Nedgang i europeisk ål

På den norske rødlisten er arten oppført som VU-sårbar (Artsdatabanken, 2012). Flere undersøkelser gjennomføres årlig i Norge for å overvåke ålebestanden, blant annet har Havforskningsinstituttet utført en strandnotundersøkelse langs skagerakkysten siden 1919. Tallrikhetsindeksen fra disse undersøkelsene har lenge vist en negativ trend, og i 2007 ble det for første gang ikke fanget en eneste ål (Skiftesvik & Durif, 2009). I tillegg har Norsk Institutt for Naturforskning (NINA) samlet data fra elven Imsa i Rogaland i en årrekke, og disse

undersøkelsene viser samme trend (Skiftesvik & Durif, 2009). I 1978 ble det registrert 121 818 ål på vei opp elva, mens det i 2007 bare ble registrert 100 ål. Samtidig som antall oppvandrende ål viste en enorm nedgang, ble det også påvist nedgang i produksjonen av blankål som vandrer ut fra Imsa (Skiftesvik & Durif, 2009).

I 2007 ble ål inkludert i CITES (Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora) som omhandler at internasjonal handel av arten må kontrolleres for å ikke utnytte arten i større grad enn det artsbestanden er i stand til å takle (Durif, 2017; Nijman, 2015). Som et aktivt tiltak ble det i 2009 innført et totalt fiskeforbud på ål i Norge (Durif, 2017). Havforskningsinstituttet (HI) har også overvåket ålebestanden siden 1975 ved hjelp av innrapporterte fangsttall fra fiskere. Etter at fiskeforbudet ble innført fikk et utvalg fiskere dispensasjon til å fiske en bestemt mengde ål og rapportere dette til HI, mot at de fikk selge fangsten gjennom salgslag (Durif, 2017). På grunn av CITES-reguleringen oppstod det imidlertid problemer ved salg av fangsten da det ble ulovlig å importere ål inn til EU, og dette resulterte i at forskningsfangsten ble avsluttet i 2010 (Durif, 2017). EU har et felles forvaltningsmål for ål som sier at menneskeskapt dødelighet skal reduseres slik at minst 40 % av blankålene kan starte gytevandringen sin, og alle medlemslandene skal jobbe mot denne målsettingen (Durif, 2017; Skiftesvik & Durif, 2009). Fiskeridirektoratet mente i 2016 at det er behov for mer kunnskap om bestandsituasjonen for å nå dette målet, derfor ble det samme året startet et nytt prosjekt med forskningsfangst for å vurdere lokale bestander (Durif, 2017).

Det er flere ulike metoder som benyttes for overvåking av ål i Europa. I land hvor det ikke er fiskeforbud for ål benyttes ofte fangststatistikk, mens i land med fiskeforbud benyttes gjerne el-fiske, feller, fisketellere, ruser, merking og gjenfangst (Thorstad et al., 2011). Disse metodene er imidlertid tidkrevende og ikke minst invaderende i ålens habitat. Derfor er det ønskelig å finne mer effektive og skånsomme metoder for å kartlegge og overvåke ål, noe vi mener analyse av eDNA (se eget avsnitt side 11) kan være en bidragsyter til.

Ålens svømmeblæremark (*Anguillicoloides crassus*)

Ålens svømmeblæremark er en nematode som stammer fra Japan og lever som parasitter i svømmeblæren hos ål (Lindholm, 2012; Thorstad et al., 2010). Det er ikke funnet at den gjør noe betydelig skade på japansk ål, men europeisk ål blir tydelig svekket av parasitten (Lindholm, 2012). Europeisk ål ble importert til Asia i 1969 på grunn av en økende etterspørsel i det japanske markedet, men den fikk problemer med lokale parasitter, blant

annet ålens svømmeblæremark (Lindholm, 2012). Etter at ål ble fraktet tilbake til Europa ble svømmeblæremarken med som «blindpassasjer», og første funn i Norge ble gjort i 1993 (Lindholm, 2012; Thorstad et al., 2010).

Ålens svømmeblæremark legger egg i svømmeblæren til ålen, som er markens siste vert i dens livssyklusen (De Charleroy, Grisez, Thomas, Belpaire & Ollevier, 1990). I følge De Charleroy et al. (1990) vil eggene etter hvert forlate svømmeblæren passivt via en kanal opp til svelget og videre ut av ålen via fordøyelseskanalen. Ved klekking inneholder eggene larver i andre stadie, og de frie larvene vil feste seg til passende substrat og starte en intensiv sprellebevegelse som skal stimulere predasjon fra små krepsdyr. Når larvene blir spist av en passende mellomvert (ofte hoppekreps) vil de etter noen få dager begynne å vokse i hemocoelet til verten før de når det tredje larvestadiet. Videre kan små glassål spise mellomverten, eventuelt kan mellomverten bli spist av småfisk som deretter blir spist av større ål. Altså kan ål infiseres både som glassål og som voksen. Larvene beveger seg fra tarmen til svømmeblæren ved å gå gjennom tarmveggen og kroppshulrommet (Haenen, Grisez, De Charleroy, Belpaire & Ollevier, 1989). I svømmeblæren vil larvene aktivt suge blod fra ålen, vokse, og nå det fjerde stadiet etter noen få uker (De Charleroy et al., 1990; Van Banning & Haenen, 1990). De vokser så enda mer før de blir seksuelt modne og kan begynne med reproduksjon (De Charleroy et al., 1990). Svømmeblæremarken har blitt funnet i små ål som bare har levd i ferskvann i ca 6-8 uker, og derfor antas det at infeksjonsperioden er ca 6-8 uker (Van Banning & Haenen, 1990).

Overlevelsen til larvene og klekking av eggene er avhengig av vannets temperatur og salinitet. I ferskvann og brakkvann kan larvene overleve i over tre uker, mens i saltvann vil de dø etter 3-4 dager (Charleroy, Thomas, Belpaire & Ollevier, 1989). Parasitten kan imidlertid overleve lengre perioder i saltvann inne i svømmeblæren til ålen (Lindholm, 2012). Optimal temperatur for klekking er mellom 15°C og 30°C, men dette er ikke nødvendigvis optimal temperatur for overlevelsen av larver. Eggene kan overleve en vinter med temperaturer på 4°C for så å klekke på våren når temperaturen stiger (Thomas & Ollevier, 1993). Under stabile forhold i et laboratorium (20 °C) kan en livssyklus fullføres på under 2 mnd (De Charleroy et al., 1990).

Tilstedeværelsen av larver i svømmeblæreveggen og voksne individ i svømmeblærelumen kan føre til betennelse, utvidelse av blodårer, nekrose og fibrose, og alt dette kan igjen gi nedsatt funksjon og ødeleggelse av svømmeblæren eller i ytterste konsekvens, død (Molnár, Baska, Csaba, Glávits & Székely, 1993; Würtz & Taraschewski,

2000). Fibrose i svømmeblæren kan også føre til at denne kommer i kontakt med omkringliggende organ som nyre og tarm. Svømmeblæremarken får da mulighet til å migrere til vev utenfor svømmeblæren, noe som kan gi økt betennelse og irritasjon (Van Banning & Haenen, 1990). Ål i oppdrettsanlegg viser i tillegg tegn til tap av apetitt, unormal adferd og sekundære bakterieinfeksjoner (Van Banning & Haenen, 1990). Infisert ål og ål som har en skadet svømmeblære fra en tidligere infeksjon er ikke like effektive svømmere som en frisk ål (Palstra, Heppener, Van Ginneken, Székely & Van Den Thillart, 2007). Dette kommer av at de må bruke mye mer energi på å svømme på grunn av tap av oppdriftskontroll, i tillegg til at parasittisme i seg selv fører til energitap (Palstra et al., 2007). Siden ål migrerer store avstander til Sargassohavet for å gyte kan dette være problematisk. Det er gjort flere studier for å se hvorvidt parasitten påvirker ålens reproduksjonsevner (Fazio, Sasal, Mouahid, Lecomte-Finiger & Moné, 2012; Lefebvre, Mounaix, Poizat & Crivelli, 2004; Sjöberg, Petersson, Wickström & Hansson, 2009), men det foreligger ingen konkrete bevis for at dette faktisk er tilfellet (Kirk, 2003).

I dag er arten oppført på den norske svartelisten som en svært høy risiko, noe som vil si at den har en sterk negativ effekt på norsk fauna (Artsdatabanken, 2012). Det er derfor viktig å finne gode metoder for å kartlegge utbredelsen av ålens svømmeblæremark slik at eventuelle tiltak kan iverksettes. Vi mener at analyse av eDNA kan være et nyttig tilskudd til dette temaet.

«Environmental DNA» (eDNA)

eDNA er her definert som genetisk materiale som er isolert fra ulike miljø (eksempelvis vann, sediment, jord) som ikke inneholder åpenbare spor etter biologiske organismer. eDNA kan komme fra flere ulike kilder, blant annet urin og avføring (Höss, Kohn, Pääbo, Knauer & Schröder, 1992; Valiere & Taberlet, 2000), hud, hår og fra døde individer (Bunce et al., 2005; Higuchi, Von Beroldingen, Sensabaugh & Erlich, 1988; Lydolph et al., 2005). Det var innen mikrobiologien at termen eDNA først dukket opp, da en gruppe forskere lyktes med å isolere DNA fra marine sedimenter med hensikten om å få en karakteristikk av det mikrobielle samfunnet (Ogram, Sayler & Barkay, 1987). Analyse av eDNA har siden blitt brukt på flere ulike felt, for eksempel innen rettmedisin (Van Oorschot, Ballantyne & Mitchell, 2010) og paleogenetikk (Pedersen et al., 2015). I tillegg er metoden anvendt for å vurdere sammensetningen av makroorganismer, blant annet for å avsløre utdødde pattedyr, fugler og planter (Willerslev et al., 2003). Det at man nå er i stand til å hente ut og analysere DNA

tilhørende levende organismer fra eksempelvis vannprøver, er et stort teknologisk og vitenskapelig gjennombrudd (Thomsen & Willerslev, 2015). Som et verktøy innen konservering av biodiversitet har bruken av eDNA stort sett vært fokusert mot påvisning av arter. Et eksempel er identifisering av invaderende arter, som potensielt kan gjøre stor skade på små og større økosystemer (Mooney & Cleland, 2001) og i flere tilfeller være en direkte årsak til artsutryddelse (Gurevitch & Padilla, 2004). Derfor er det viktig å identifisere og kartlegge slike arter tidlig for å best mulig være i stand til å gjøre mottiltak (Lodge et al., 2006). I tillegg til identifisering av invaderende arter i naturlige omgivelser, er det gjennomført suksessfulle forsøk ved å detektere dem i ballastvannet til skip (Briski, Cristescu, Bailey & Macisaac, 2011; Darling & Tepolt, 2008; Harvey, Hoy & Rodriguez, 2009). Siden transport i ballastvann er en stor bidragsyter til innførsel av uønskede arter (Bailey, Duggan, Jenkins & Macisaac, 2005), er dette interessant da det antakelig muliggjør å stoppe uønskede arter å i det hele tatt nå habitater hvor de kan forårsake potensielt stor skade. eDNA-analyser har vist seg å være en effektiv og pålitelige metode for å påvise forekomster av ulike arter i blant annet ferskvann, samtidig som det er skånsom tilnærming som ikke krever direkte inngripen i dyrets habitat (Rees, Maddison, Middleditch, Patmore & Gough, 2014). I flere tilfeller er det påvist et større antall arter enn det som var mulig med tradisjonelle metoder som fysiske observasjoner og fangst (Valentini et al., 2016). Påvisning av truede og sjeldne arter er også et mål for bruken av eDNA hvor det kan vises til positive resultater (Sigsgaard et al., 2015; Thomsen, P. et al., 2012).

Under visse forhold kan eDNA forbli i omgivelsene i lang tid, noe studier på terrestrisk ur-DNA bekrefter (Lydolph et al., 2005; Willerslev et al., 2003). Likevel er det slik at i de fleste tilfeller vil DNA degrades hurtig etter at det skilles fra organismen (Lindahl, 1993). Hvor lenge DNA overlever i et akvatisk miljø bestemmes av de ulike miljøfaktorene det befinner seg i, hvor blant annet pH, temperatur og kjemisk sammensetning spiller en rolle (Barnes et al., 2014). Flere studier har vist at eDNA kan spores i opp til 1-2 uker, noe som gjør det mulig å si at en art det testes positivt for, faktisk er der (Dejean et al., 2011; Thomsen, P. et al., 2012).

Halvorsen (2017) demonstrerte at metoden som ble utarbeidet for påvisning av ål i mindre sidebekker med lav vannføring gav positive resultater. Denne ønsker vi nå å utvide for å undersøke om vi kan bruke samme metode for å påvise europeisk ål og ålens svømmeblæremark i vassdrag med høy vannføring. Goldberg, Caren S., Pilliod, Arkle og Waits (2011) gjennomførte en studie hvor de med stor suksess klarte å påvise tilstedeværelsen

av ulike amfibier i sammenlignbare miljø som det vi undersøker. Samme år publiserte Jerde, Mahon, Chadderton og Lodge (2011) en studie hvor de kunne vise til lignende resultater med to asiatiske karpefiske som målart.

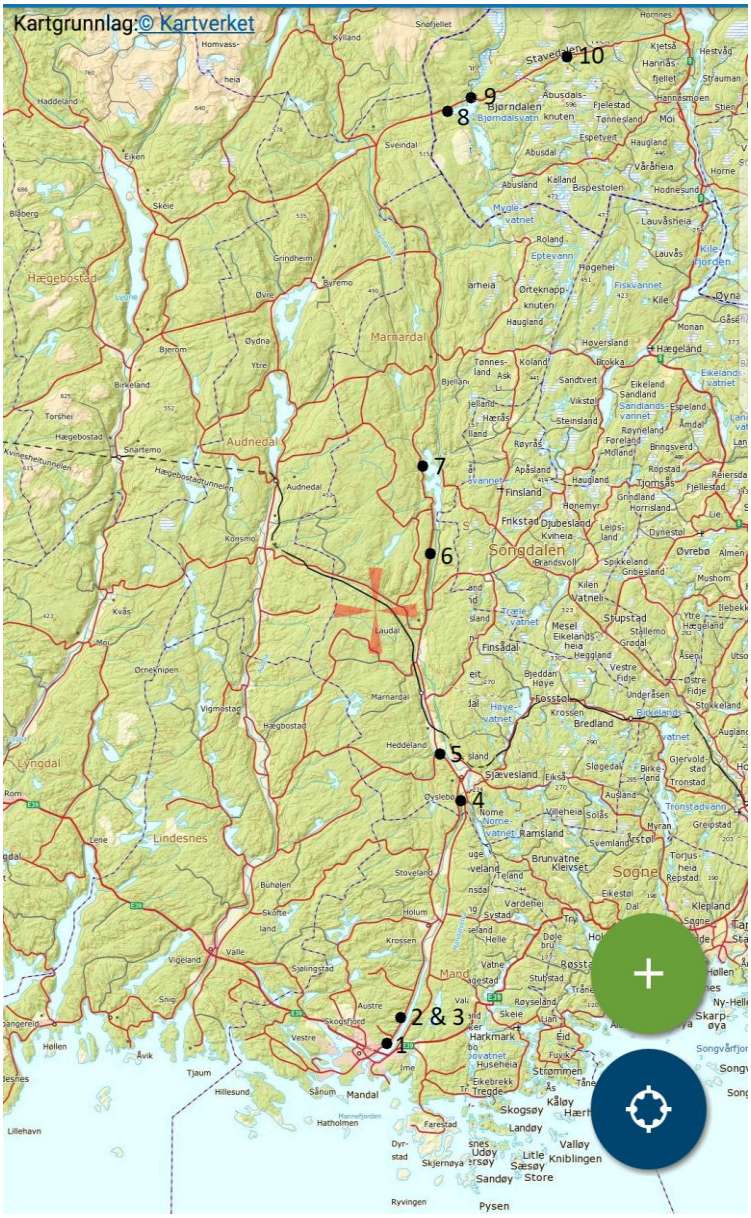
Problemstilling

Vi vil forsøke å etablere en qPCR-basert test for påvisning av ålens svømmeblæremark. Denne skal vi bruke sammen med eksisterende test for europeisk ål og se om vi ved analyse av eDNA kan påvise tilstedeværelse av europeisk ål og ålens svømmeblæremark i vassdrag med høy vannføring. I tillegg vil vi undersøke sensitiviteten til analysemetoden.

Materiale og metoder

Innsamling av vannprøver

Det ble samlet inn 10 vannprøver på 1000 ml fra ulike lokaliteter på en 60 kilometer lang strekning langs Mandalselva og tilknyttede vann i Vest-Agder og Aust-agder (Figur 2 og Tabell 1) 14.11.17. Det var lett regn på innsamlingsdagen, og vannføringen ved punkt 1 (Figur 2) i Mandalselva var ~80 m³/s (NVE, 2017). Hver prøve ble samlet i en merket beholder på 1000 ml. For å kunne hente vann flere steder på samme lokalitet slik at prøven ble mest mulig representativ for lokaliteten ble det brukt et 50 ml oppsamlingsrør. Prøvene ble tatt med tilbake til UIA hvor de ble filtrert samme dag. 400-850 ml av hver prøve (Tabell 1) ble tømt i en filtreringskopp og deretter filtrert gjennom et cellulose-nitratfilter med 0,45 µm porestørrelse (Thermo Scientific Nalgene) ved hjelp av en ILMVAC vakuumpumpe (GmbH). Årsaken til at det ble filtrert ulik mengde fra prøvene var fordi det var ulik mengde av humus i vannprøvene. Dette gjorde at filtrene på et punkt ble tette, og vi avsluttet da filtrering av den aktuelle prøven. Filtratet ble samlet i en kolbe og tømt ut, mens partikler ble liggende igjen på filteret. Filterene ble brettet og lagt i nummererte eppendorfrør før de ble lagret ved -20 °C.



Figur 2: Oversikt over innsamlingspunkt av vannprøver (Kartverket).

Tabell 1: Viser koordinatene til hvor hver enklet prøve ble tatt, samt en kort beskrivelse av forholdene på hver lokalitet og hvor mye av vannprøven som ble filtrert.

Prøve nr.	Koordinater	Miljøforhold	Mengde vann filtrert
1	58.033N 007.47E	Nokså stillestående, dypt.	600 ml
2	58.090N 007.52E	Liten sideelv, medium bevegelse, grunt.	600 ml
3	58.090N 007.52E	Nokså stillestående, grunt.	600 ml
4	58.153N 007.55E	Mye bevegelse, grunt.	600 ml
5	58.180N 007.54E	Nokså stillestående, dypt.	400 ml
6	58.263N 007.52E	Litt bevegelse, grunt med steinbunn.	600 ml
7	58.326N 007.51E	Stillestående, grunt.	600 ml
8	58.504N 007.54E	Grunt, nokså mye humus, islagt.	850 ml
9	58.509N 007.55E	Liten sideelv, grunt og mye humus.	750 ml
10	58.533N 007.66E	Islagt vann, utløp med litt bevegelse.	750 ml

Isolering av eDNA og genomisk DNA

Det ble benyttet DNeasy® Blood and Tissue Kit (Qiagen) for å isolere eDNA fra vannprøvene. Filtrene ble lagt i en petriskål og ved hjelp av en steril skalpell, kuttet opp i små biter på ca 2x2 mm, slik at de deretter kunne plasseres i nummererte 1,5 ml skrukorkrør. Det ble benyttet en ny petriskål for hvert filter. For å lysere cellene ble det tilsatt 720 µl ATL-buffer ved bruk av pipette. Det ble også tilsatt ca. 0,3 gram med Zirconia/Silicakuler (Biospec Products) og prøvene ble plassert i en MagNA Lyser Bead Beater på 2800 opm (oscillasjoner per minutt) i 45 sekunder for at kulene skulle "knuse" filtrene ytterligere. For å effektivisere lyseringsprosessen ble prøvene så inkubert på 56 °C i 30 minutter i varmeblokk. Prøvene ble så ristet en gang til på samme måte som før varmebehandlingen. Deretter ble 80 µl Proteinase K pipettert til hver av prøvene for å degradere proteiner og inaktivere nukleaser som kan ødelegge DNA-et. Prøvene ble satt til inkubasjon på 56 °C i 2 timer. Etter inkubasjonen ble prøvene vortexet i ~10 sekunder og sentrifugert i 1 minutt på 8000 rpm. Mengden supernatant varierte litt mellom prøvene, men vi forsøkte å få ut så mye som mulig fra hver prøve. Supernatanten ble overført til et eppendorfrør og blandet med 1 volum AL-buffer som lyserer celler og eksponerer DNA og 1 volum 96 % etanol. En del av løsningen ble deretter pipettert til en spinnkolonne med 2 ml oppsamlingsrør, DNA-et bindes til filteret i spinnkolonnen. Deretter ble det sentrifugert i 1 minutt ved 8000 rpm. Eluatet ble så tømt ut, og samme

oppsamlingsrør ble benyttet for resten av løsningen i den aktuelle prøven og sentrifugeringen ble gjentatt. Deretter ble 500 µl AW1-buffer tilsatt til spinnkolonnen og sentrifugert i 1 minutt ved 8000 rpm for å vaske ut stoffer som ikke har bundet seg til filteret. Videre ble 500 µl AW2-buffer pipettert til spinnkolonnen og sentrifugert i 3 minutter på 13400 rpm. Eluatet ble kastet og sentrifugeringen ble gjentatt for å sikre at alt som ikke var bundet til filteret ble vasket gjennom. Spinnkolonnene ble så plassert i et mikrosentrifugerør uten lokk. 50 µl AE-buffer ble så pipettert over i spinnkolonnene og prøvene ble stående i 1 minutt i romtemperatur før de ble sentrifugert på 8000 rpm i 1 minutt. Nye 50 µl AE-buffer ble så pipettert i spinnkolonnen og sentrifugeringen ble gjentatt. AE-bufferen gjør at DNA løsner fra filteret og blir skylt ned i mikrosentrifugerøret. Det vil si at innholdet i mikrosentrifugerøret på dette tidspunktet bestod av AE-buffer og DNA. Spinnkolonnen ble fjernet og mikrosentrifugerøret ble plassert på frys i -20 °C.

For å ha positive kontroller måtte vi også isolere DNA fra vevsprøver fra ålens svømmeblæremark og europeisk ål, og her ble også prosedyren til DNeasy® Blood and Tissue Kit benyttet. Eksemplarene av svømmeblæremark var preservert i sprit. En pinsett ble vasket i etanol og destillert vann, deretter plukket vi ut et passende eksemplar som ble lagt i en petriskål. Med en steril skalpell ble det kuttet av en bit på størrelse med et fyrstikkhode. Denne ble overført til et eppendorfrør hvor det ble tilført rikelig med destillert vann for å vaske av spriten. Vaskeprosessen ble gjentatt tre ganger, hver gang med nytt eppendorfrør. Samme pinsett ble benyttet, men den ble vasket i etanol og deretter skylt 2 ganger i destillert vann mellom hver overføring for å sikre at all spriten var vasket vekk. Etter vasking ble prøven, ved bruk av steril skalpell, kuttet opp i så små biter som mulig for å forbedre lyseringsprosessen. Bitene ble så overført til et eppendorfrør. Vevsprøven fra europeisk ål ble hentet fra et eksemplar som hadde ligget på frys. Vi kuttet av en bit på samme størrelse som prøven fra svømmeblæremarken, kuttet den videre opp i mindre biter og overførte til et eppendorfrør. 180 µl ATL-buffer og 20 µl Proteinase K ble tilsatt til hver av prøvene. Prøvene ble vortexet i noen sekunder før de ble satt i varmeblokk på 56 °C i 2 timer. Vevet var etter denne behandlingen oppløst. 200 µl AL-buffer og 200 µl etanol (96%) ble så tilsatt, og løsningene ble vortexet. Løsningene ble pipettert til en spinnkolonne med 2 ml oppsamlingsrør. Dette ble sentrifugert på 8000 rpm i 1 minutt og innholdet i oppsamlingsrøret ble kastet. Prosedyren videre med buffer AW1, AW2 og AE er lik som ved isolering av eDNA. Mikrosentrifugerør med DNA og AE buffer ble lagret i fryser ved -20 °C.

Måling av renhet og konsentrasjon til DNA

Nanodrop One (Thermo Scientific) ble brukt for å finne konsentrasjonen av DNA og renheten i prøvene. Sensoren på maskinen ble vasket med dobbeldestillert vann og tørket av med lofritt/linsepapir før og etter bruk. Apparatet ble så kalibrert ved å tilsette en dråpe AE-buffer på sensoren ved bruk av en mikropipette (1-10µl). Da maskinen var kalibrert tørket vi av sensoren med tørt lofritt /linsepapir, noe som også ble gjort etter hver prøve. Det ble benyttet samme pipette for å tilsette en dråpe fra prøve 1. Apparatet måler forholdet mellom absorbansen ved bølgelengdene 230 nm og 260 nm, i tillegg til 260 nm og 280 nm. Resultatet av analysen blir så vist på en skjerm. Dette ble gjentatt for alle prøvene. Prøvene ble til slutt lagt tilbake i fryseren ved -20 °C.

Design av primer og probe

Primer og probe ble på forhånd designet av veileder fra CO1-genet, men vi ønsker likevel å kort gå i gjennom prosedyren for hvordan det gjøres da vi føler dette er en naturlig del å ha med i oppgaven.

Finn først en sekvens fra den arten og det genet det skal jobbes med. Benytt deretter verktøyet Primer BLAST (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) til å få laget artsspesifikk primer og probe fra denne sekvensen. Velger man å inkludere et MGB protein i proben, slik at den bindes sterkere til templattråden, må man justere probelengden slik at smeltetemperaturen blir riktig. I tillegg ønsker man en så kort probe som mulig for å øke spesifisiteten. Dette gjøres ved hjelp av verktøyet Primer Express 3.0.1 (Applied Biosystems). Primere og probe til ålens svømmeblæremark ble deretter bestilt av veileder fra Eurofins Genomic, primere og probe til europeisk ål fikk vi utlevert av veileder (Tabell 2).

Primere og probe til svømmeblæremark ble testet mot CO1-genet hos andre arter som finnes i Mandalselva (Tabell 4). Sekvensen til CO1-genet hos andre arter ble hentet fra National Center for Biotechnology Information (https://www.ncbi.nlm.nih.gov). De ble deretter sammenlignet ved hjelp av Clustal Omega (https://www.ebi.ac.uk/).

Tabell 2: Sekvensene til primere og probe for ål og ålens svømmeblæremark.

	Sekvens (5'→3')
Ål F-primer	CACCCATACTTCTCCTACAAAGACCTA (27)
Ål R-primer	TCTGGGTCTCCAAGCAGGTT (20)
Ål probe	FAM-TTCATTATGATGCTCACC [MGBEQ] (18)
Svømmeblæremark F-primer	GTTGGGACTGGTTGTGGTACTAGTT (25)
Svømmeblæremark R-primer	TCACACCAGCACAATGAAGACTT (23)
Svømmeblæremark probe	FAM-AGTGTTATTGGCCATTCT [MGBEQ] (18)

Real-time PCR (qPCR)

For å påvise de ønskede artene ble det anvendt Real-time PCR (qPCR) og TaqMan systemet. Før qPCR for eDNA ble kjørt, måtte qPCR for de positive kontrollene kjøres for å få bekreftet at de artsspesifikke primerene og probene virket. Primere og probe til svømmeblæremarken ble tilsendt inntørket, og ble senere løst i AE-buffer til 100 µM stockløsning. Videre ble de fortynnet til 10 µM arbeids-stockløsninger. Primere og probe til europeisk ål var ferdig blandet og klare til bruk. Vi blandet deretter sammen en qPCR-mix til hver art etter følgende oppskrift:

Tabell 3: Viser oppskrift på PCR-mix.

Ingrediens	**Mengde (µl)**
Environmental TaqMan mastermix	10
Primer F 10 µM	1,8
Primer R 10 µM	1,8
Probe 10 µM	0,5
H_2O (PCR-godkjent)	1,9 (3,9 ved genomisk DNA)

Oppskriften er beregnet for én prøve. Alle verdier ble multiplisert med antall prøver + 10% fordi det var ønskelig å ha en sikkerhetsmargin per prøve for å være sikker på at vi hadde tilstrekkelig mengde med PCR-mix. Vi blandet den ferdige miksen forsiktig ved hjelp av en pipette. 18 µl av qPCR-mixen ble overført til hvert av PCR-rørene, deretter 2 µl genomisk DNA. Det ble satt lokk på PCR-rørene før de ble sentrifugert. Kjøringen ble startet med

følgende temperatursyklus: 50 °C i 2 min, 95 °C i 10 min, 95 °C i 15 sekunder og 60 °C i 1 min. Denne syklusen ble repetert i 50 runder.

Det ble så satt opp en kjøring for eDNA. Vi fokuserte på en art av gangen, og benyttet de samme primerene og probene som ved genomisk DNA. Prøvene ble testet i tripletter, i tillegg til negativ og positiv kontroll. qPCR-mix for antall prøver + 10% for både europeisk ål og ålens svømmeblæremark ble preparert. Miksen ble blandet forsiktig ved bruk av pipette før 16 µl PCR-miks etterfulgt av 4 µl eDNA ble overført til hver brønn i PCR-strips. Vi hadde på lokk, sentrifugerte og startet PCR-kjøringen med de samme innstillingene som ved genomisk DNA.

Det ble også satt opp en kjøring for eDNA fra ørret for å kunne utelukke at ødelagte vannprøver var grunnen til en eventuell mangel på positive resultater. Grunnen til at vi valgte ørret er fordi vi vet at ørret er tilstede i elva. Denne kjøringen ble gjennomført på samme måte som forrige kjøring for eDNA fra ål og svømmeblæremark. Positiv kontroll var her eDNA fra en vannprøve det tidligere hadde blitt påvist ørret i.

qPCR-effektivitet og sensitiviteten til påvisningsmetoden

For å teste sensitiviteten til metoden og qPCR-effektiviteten ble det satt opp en fortynningsrekke med genomisk DNA for både ål og svømmeblæremark. Fortynningsrekken ble konstruert ved å starte med 10 µl genomisk DNA og 90 µl PCR-godkjent H_2O i et eppendorfrør. Videre ble 10 µl fra denne løsningen pipettert over på et nytt eppendorfrør, og 90 µl PCR-godkjent H_2O ble igjen tilført. Løsningen er nå fortynnet 10^{-2} ganger. Slik fortsatte vi til løsningen var fortynnet til 10^{-6}. Det er <u>meget</u> viktig å vortexe mye mellom hver fortynning slik at blandingen blir homogen, det anbefales minimum 2 minutter for hver fortynning. PCR-mix ble laget etter samme oppskrift som ble brukt til analyse av genomisk DNA (Tabell 3). Deretter ble 2 µl fra hver fortynning og 18 µl PCR-mix overført til separate PCR-rør. Det ble laget tripletter av hver prøve. To av PCR-rørene ble forbeholdt rent DNA fra ål og svømmeblæremark som positive kontroller.

Metodens sensitivitet ble også testet ved å lage fortynningsrekke av eDNA fra ål. Fortynningsrekken ble laget av eDNA fra vannprøve nummer 3. Fremgangsmåten er lik som ved bruk av genomisk DNA, foruten det ble tilsatt 4 µl fra hver fortynning og 16 µl PCR-mix til PCR-strips.

Resultater

Konsentrasjon av DNA og renheten til prøvene

Som vist i tabell 5 varierer konsentrasjonen av eDNA i vannprøvene fra 3,8-95,0 Ng/µl, men de fleste prøvene har en konsentrasjon på 19,7-32,9 Ng/µl. Konsentrasjonen av genomisk DNA i de positive kontrollene er 41,8 og 203,9 Ng DNA/µl i isolatene fra henholdsvis ål og svømmeblæremark.

A260/A280 er absorbansen målt ved 260 nm dividert på absorbansen målt ved 280 nm, og A260/A230 er forholdet mellom absorbansen målt ved 260 nm og 230 nm. Dette sier noe om renheten til prøvene. Forholdstallet A260/A280 ligger i følge tabell 5 på 1,37-1,81 for eDNA-isolatene, mens de genomisk DNA-isolatene har et høyere forholdstall på 1,96-2,18. Rent DNA gir et forholdstall på 1,8. Forholdstallet A260/A230 ligger på 0,37-0,95 for eDNA-prøvene, mens de positive kontrollene har et generelt høyere forholdstall på 0,85-2,34. Optimalverdi er 2,0-2,2.

Tabell 5: Viser resultater etter måling av DNA-isolatene med sprektrofotometer. A260/A280 = Forholdet mellom absorbansen ved 260 og 280 nm, og dette forholdet sier noe om renheten til prøven. Rent DNA gir forholdstallet 1,8. A260/230 = Renheten av nukleinsyrer, hvor optimal verdi er 2,0-2,2.

Prøve	Ng DNA/µl	A260/A280	A260/A230
1	22,3	1,64	0,95
2	19,7	1,64	0,54
3	23,2	1,58	0,59
4	13,2	1,81	0,37
5	32,7	1,46	0,65
6	20,6	1,77	0,37
7	32,9	1,59	0,52
8	3,8	1,37	0,59
9	95,0	1,41	0,66
10	26,1	1,73	0,88
Ål	41,8	1,96	0,85
Svømmeblæremark	203,9	2,18	2,21

Seksvenssammenligning av primere og probe for svømmeblæremark

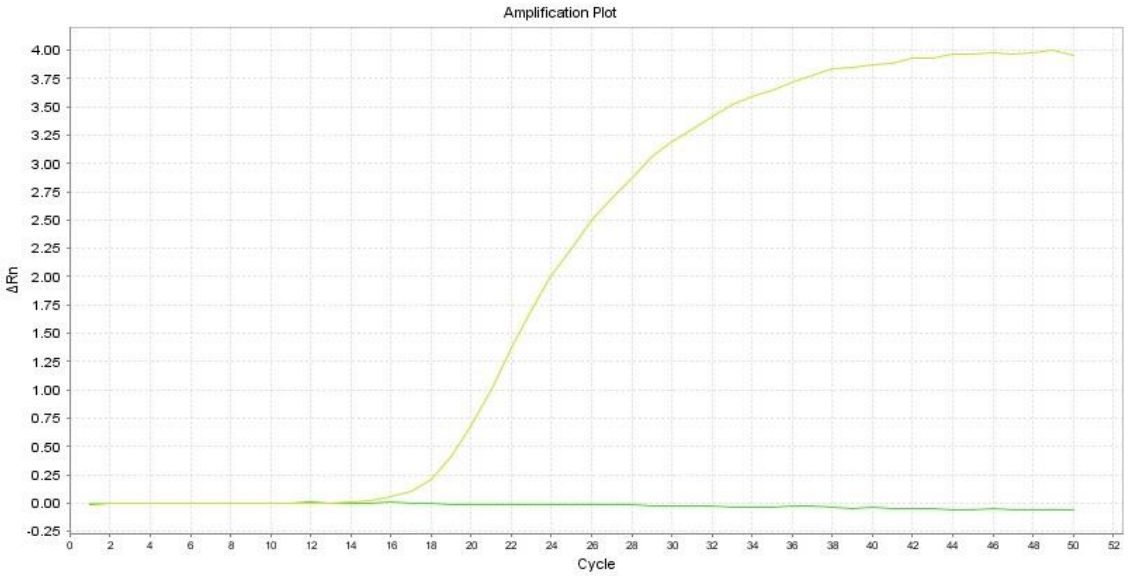
Tabell 4 viser sekvenssammenligningen av primere og probe for ålens svømmeblæremark mot CO1 genet hos andre ferskvannsarter som lever i Mandalselva. Sammenligningen gav ingen betydelig match.

Tabell 4: Sammenligning av CO1-genet hos svømmeblæremark med andre fiskearter i Mandalselva. I kolonnen til høyre vises sekvens fra svømmeblæremarkens probe, F-primer og R-primer. Uthevet skrift viser sekvensen fra arten det testes mot. Stjerner på nederste linje viser hvilke baser som passer sammen.

Ørret (*Salmo trutta*) GenBank: D58400.1	Probe	AGTGTTATTGGCCATTCT **AGTCTTATTCTCGATCCT** *** ***** * ** **
	F-primer	GTTGGGACTGGTTGTGGTACTAGTT **CCTTGGATTCGTAGCTATACTACTT** * *** * ** * ***** **
	R-primer	TCACACCAGCACAATGAAGACTT **TCCTACCTATATAAAGAAAACTT** ** *** * ** *** ****
Laks (*Salmo salar*) GenBank: EU418251.1	Probe	AGTGTTATTGGCCATTCT **GGTAATCATCGCCATACT** ** * * ***** **
	F-primer	GTTGGGACTGGTTGTGGTACTAGTT **GTCGGGATAGATGTAGACACTCGTG** ** **** * * * *** **
	R-primer	TCACACCAGCACAATGAAGACTT **TCACGGCGGCTCAATCAATTCTT** **** * ** **** ** ***
Bekkerøye (*Salvelinus fontinalis*) GenBank: JX960959.1	Probe	AGTGTTATTGGCCATTCT **ATTGTCCTTGGCCATCAT** * *** ******** *
	F-primer	GTTGGGACTGGTTGTGGTACTAGTT **GTTTGAGCTGTATTAGTTACTGCTT** *** * *** * * **** **
	R-primer	TCACACCAGCACAATGAAGACTT **TAATTCGGGCAGAGTTAAGAGTT** * * * *** * * **** **
Trepigget stingsild (*Gasterosteus aculeatus*) GenBank: EU399902.1	Probe	AGTGTTATTGGCCATTCT **AGGGCACCTGGCCATGCC** ** * ******* *
	F-primer	GTTGGGACTGGTTGTGGTACTAGTT **GCCGCGAGGGCCTTTTCACCTACGT** * * ** * * * *** *
	R-primer	TCACACCAGCACAATGAAGACTT **TGCCATGACCACGACGAGGACTG** * ** * *** * ** ****

Påvisning av ål og ålens svømmeblæremark

C_T-verdien viser hvor mange sykluser qPCR-kjøringen trenger for å oppnå nok fluorecens til å avgi et positivt utslag (Figur 3). Jo lavere denne verdien er, dess mer DNA er tilstede i prøven. Som vist i tabell 6 ble det påvist positivt utslag på ål i 7 av 10 prøver, i tillegg til positiv kontroll. Alle prøvene hadde høyere C_T-verdi enn positiv kontroll foruten den ene av triplettene i prøve nummer 2 (Tabell 6). Det ble ikke positivt utslag på noen av prøvene foruten positiv kontroll da det ble testet for svømmeblæremark. Negativ kontroll gav ikke utslag verken for ål eller svømmeblæremark. Kjøringen for ørret gav utslag i prøve 1-8, i tillegg til positiv kontroll. C_T-verdien ligger på 30,9-35,7 for ørret.



Figur 3: Viser et eksempel på hvordan resultater fra en qPCR-kjøring kommer til uttrykk. Gul linje er positiv kontroll for ålens svømmeblæremark. Grønn linje er negativ kontroll for ålens svømmeblæremark.

Tabell 6: Viser CT-verdier for eDNA fra ål, ålens svømmeblæremark og ørret i vannprøvene. Prøvene for ål og ålens svømmeblæremark ble testet i tripletter.

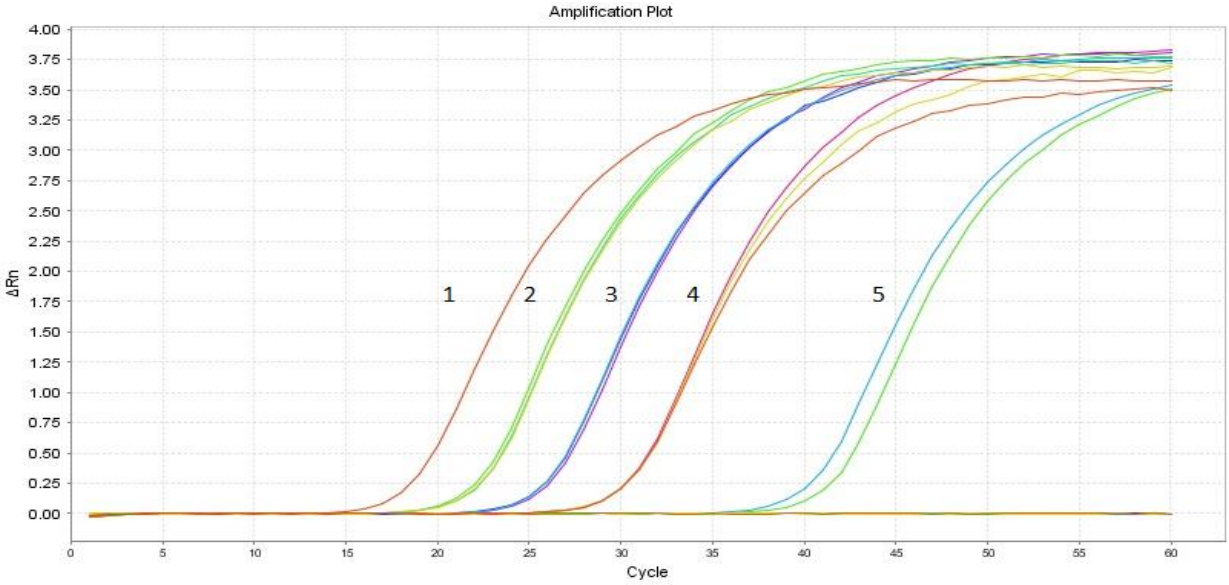
	Prøve	Pos	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Neg
C_T-verdi	Ål	18,1	-	-	37,0	-	-	45,0	-	-	-	44,5	-
			-	-	21,1	-	37,7	-	41,0	-	-	-	
			37,9	10,8	-	-	37,5	45,0	-	-	-	-	
	Sv.b. mark	18,9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Ørret	35,7	32,0	32,6	33,9	33,5	33,2	30,9	32,7	30,9	-	-	-

PCR-effektivitet og sensitiviteten til påvisningsmetoden

Tabell 7 viser at ålens svømmeblæremark har en lavere C_T-verdi enn ål i den ufortynnete prøven, men C_T-verdiene for begge arter øker for hver fortynning. Verdiene øker raskere hos ål før det ikke ble noe utslag i fortynning 4. Hos ålens svømmeblæremark ble det imidlertid utslag i to av tre tripletter i fortynning 4. Fortynning 5 og 6 gav ingen utslag for noen av artene. Tabell 7 viser også at eDNA fra vannprøve 3 gav utslag for ål kun i den ufortynnede prøven, som gav en C_T-verdi på 39,9. Se figur 4 for fortynningsrekken til eDNA fra svømmeblæremark.

*Tabell 7: Viser **C_T**-verdiene for fortynningene av genomisk DNA fra ål og ålens svømmeblæremark. I tillegg viser den **C_T**-verdiene for fortynningene av eDNA fra ål. Alle prøvene foruten ufortynnet ble testet i tripletter.*

	Prøve	Ufortynnet	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6
C_T-verdi (Genomisk DNA)	Ål	26,9	28,6	31,3	42,0	-	-	-
			27,9	31,6	38,1	-	-	-
			28,4	31,0	36,2	-	-	-
	Svømmeblæremark	19,3	23,1	26,7	31,2	42,2	-	-
			22,9	26,7	31,2	-	-	-
			23,1	26,9	31,1	41,2	-	-
C_T-verdi (eDNA ål)	Vannprøve 3	39,9	-	-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-	-
			-	-	-	-	-	-



Figur 4: Viser qPCR-kurvene til fortynningsrekken gjort på genomisk DNA til svømmeblæremark. 1=Ufortynnet genomisk DNA, 2=10^1 fortynning, 3=10^2fortynning, 4=10^3fortynning, 5=10^4fortynning. Fortynning 5 og 6 fikk negativt resultat, de ligger langs X-aksen.

Vi tar utgangspunkt i de genomiske prøvene når vi skal finne hvor lav konsentrasjon av DNA som trengs for å gi positive utslag i qPCR. Grunnen til at vi ikke benytter verdiene fra eDNA er fordi det er ukjent hvor mye av DNA-et i prøven som faktisk er fra arten vi prøver å påvise. I de genomiske prøvene vet vi at alt DNA er fra ål og ålens svømmeblæremark.
Den genomiske prøven for ål inneholder 41,8 ng DNA/µl (tabell 5). Den største fortynningen som gav utslag var 10^3. Vi tilsatte 2 µl DNA fra fortynningen og PCR-volumet totalt var 20 µl. Laveste konsentrasjon av DNA fra ål som kunne detekteres i PCR-reaksjonen var dermed:

$$\left(41{,}8\frac{ng}{\mu l} \times 10^{-3}\right) \times 2\ \mu l\ = 0{,}0836\ ng\ DNA$$

$$0{,}0836\ ng \div 20\ \mu l\ = 0{,}00418\ \frac{ng}{\mu l}$$

I følge Animal genome size database har ål i gjennomsnitt 0,0028 ng DNA i en diploid celle (Genomsize). For å finne ut hvor mange celler som må være tilgjengelig i vannprøven for å få positive resultater antar vi at den ufortynnede prøven av vannprøve 3 (den eneste som gav utslag) har samme mengde DNA som den siste fortynningen av genomisk ål DNA som gav utslag. Det vil si at i de 4 µl vi tilsatte i PCR-rørene var det 0,0836 ng DNA, eller 0,0209 ng/µl, fra ål. 600 ml av vannprøven ble filtrert, og etter vi tilsatte AE-buffer i isoleringen fikk vi ut 100 µl eluat fra vannprøven. Mengde celler som må være tilgjengelig i en vannprøve blir dermed:

$$0{,}0209\frac{ng}{\mu l} \times 100\ \mu l = 2{,}09\ ng\ \text{ål}\ eDNA\ i\ eluatet$$

$$2{,}09\ ng\ \div 0{,}0028\ ng\ i\ ei\ celle = 746\ celler$$

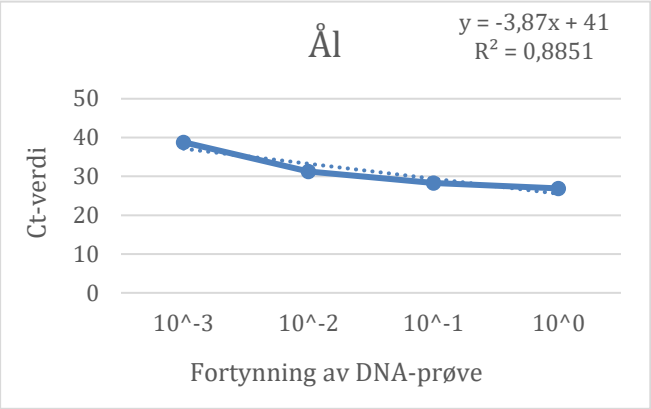
$$746\ celler\ \div 600\ ml = 1{,}24\frac{celler}{ml}$$

Den genomiske prøven for ålens svømmeblæremark inneholder 203,9 ng DNA/µl (tabell 5). Den siste fortynningen som gav utslag var 10^4. Her ble det også tilsatt 2 µl DNA fra fortynningen og volumet totalt var 20 µl. Laveste konsentrasjon av DNA fra ålens svømmeblæremark som kunne detekteres i PCR-reaksjonen var dermed:

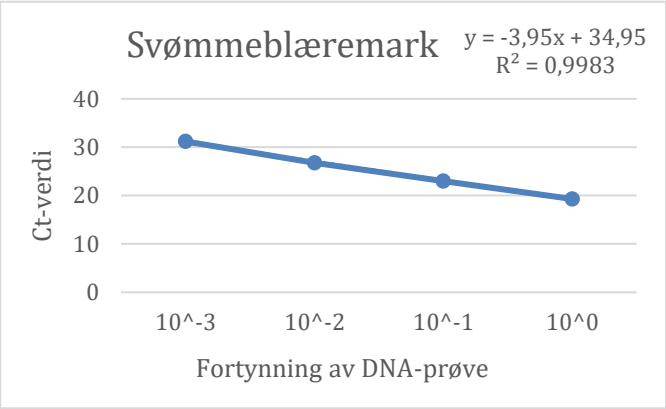
$$\left(203{,}9\frac{ng}{\mu l} \times 10^{-4}\right) \times 2\,\mu l = 0{,}04078\,ng$$

$$0{,}04078\,ng \div 20\,\mu l = 0{,}002039\,\frac{ng}{\mu l}$$

På figur 5 og 6 ser vi sammenhengen mellom DNA-mengde i fortynningene og Ct-verdi. Siden fortynningene ble testet i tripletter er det gjennomsnittet av de tre Ct-verdiene som representeres i figur 5 og 6. Stigningstallet til grafen brukes til å finne effektiviteten til qPCR-testen. Effektiviteten skal helst være 90-110% (stigningstall på ca -3,2). Grafen for svømmeblæremark er brattere enn grafen for ål, og er særlig bratt mellom de to minste fortynningene. I diagrammet for svømmeblæremarken har vi sett bort i fra 10^4 fortynningen da DNA-mengden her var så lav at det ble et unormalt stort hopp på Ct-verdien.



Figur 5: Viser sammenheng mellom mengde DNA på x-aksen og Ct-verdi på Y-aksen.



Figur 6: Viser sammenheng mellom mengde DNA på x-aksen og Ct-verdi på Y-aksen.

Med et stigningstall på -3,87 (Figur 5) er PCR-effektiviteten for ål:

$$10^{-1 \div -3{,}87} = 1{,}8$$

$$(1{,}8 - 1) \times 100\% = 80\%$$

Med et stigningstall på -3,95 (Figur 6) er PCR-effektiviteten for svømmeblæremark:

$$10^{-1 \div -3{,}95} = 1{,}79$$

$$(1{,}79 - 1) \times 100\% = 79\%$$

Diskusjon

Bestanden av europeisk ål er i stadig nedgang, for å bevare arten er det viktig å vite mer om utbredelsen. De konvensjonelle kartleggingsmetodene er hverken tids- eller kostnadseffektive (Doi et al., 2017), i tillegg til at de kan være invaderende i dyrets habitat. Det å finne en mer effektiv og skånsom metode for kartlegging vil derfor være nyttig for å kunne overvåke arten og innføre eventuelle bevaringstiltak. En av truslene mot ål er ålens svømmeblæremark (Van Banning & Haenen, 1990). Derfor vil det også være hensiktsmessig å utvikle en effektiv metode for å kunne påvise denne.

I denne oppgaven var et av målene våre å etablere en qPCR-test for ålens svømmeblæremark. Vi ønsket også å påvise tilstedeværelse av ål og ålens svømmeblæremark i elvestryk med høy vannføring ved bruk av eDNA og qPCR. I tillegg ønsket vi å finne sensitiviteten til metoden.

Vi fikk positivt utslag på ål ved 7 av 10 lokaliteter langs en strekning på omtrent 60 kilometer langs Mandalselva og tilstøtende vassdrag (Tabell 6). Dette er et bra resultat med tanke på at det er svært lav tetthet av ål i Mandalselva (Thorstad et al., 2010). Vi kan anta det er ål vi har testet positivt for, da det i en bacheloroppgave i fjor ble utført en sekvensering av qPCR-produktet fra de samme primerene (Halvorsen, 2017). I tillegg viste analyser in silico ingen homologi mellom detekterende probe og DNA-sekvensen til andre arter (Halvorsen, 2017). I de 3 prøvene hvor ål ikke ble påvist, er det noen elementer som gir rom for en mulig forklaring. Lokalitet 4 (Figur 2 og Tabell 1) var den eneste med mye bevegelse i vannmassene. Dette kan ha en sammenheng med at det ikke var mye DNA i vannprøven (Tabell 5). Samtidig ble det påvist ål både opp -og nedstrøms for lokalitet 4 noe som gir grunn til å tro at det finnes ål også her. Det kan tyde på at eDNA i vannet ikke er homogent distribuert. Det faktum at det kun ble tatt én prøve fra hver lokalitet kan ha påvirket resultatet. Vi burde forvente å finne ål også på lokalitet 4 hvis vi hadde samlet inn flere prøver. En annen mulighet ville vært å lage mer PCR-produkt fra hver lokalitet. Vannprøvene ble testet i tripletter, så det kan være vi ikke fikk med nok DNA fra prøven til at qPCR kunne påvise ål. Prøve 8 og 9 var de eneste prøvene som inneholdt synlig humus. Vi foretok ingen tester av prøvenes humusinnhold i denne oppgaven, antakelsen er kun basert på hva vi observerte. Humus er nedbrutt organisk materiale, og disse danner humussyrer (Waksman, 1925). Humussyrer fungerer som PCR-hemmere og gjør at qPCR ikke fungerer optimalt. En indikasjon på tilstedeværelse av slike PCR-hemmere vil gi utslag i form av lave 260/230

verdier i spektrofotometer, hvor en optimal verdi vil ligge mellom 2.0-2.2. Prøvene fra lokalitet 8 og 9 hadde verdier på henholdsvis 0.59 og 0.66 (Tabell 5). Dette tyder på at PCR-hemmere kan ha vært en medvirkende årsak til at prøve 8 og 9 gav negative resultater. TaqMan environmental mastermix inneholder imidlertid stoffer som gjør at den er svært godt rustet mot PCR-hemmere. I tillegg må det nevnes at kun to av prøvene hadde høyere 260/230-verdi enn prøve 8 og 9 (Tabell 5). For å eliminere sannsynligheten for at PCR-hemmere kan ha påvirket resultatene kunne vi ha testet vannprøvene opp mot en svært liten mengde DNA fra en organisme som ikke er naturlig forekommende i elva, såkalt «spiking», og brukt den som kontroll. Om DNA fra den fremmede organismen hadde oppformert like effektivt i vannprøven som i kvalitetsvann, kunne vi konkludert med PCR-hemmere ikke var årsaken til manglende resultater.

Vi lyktes med å designe og etablere en qPCR-test for svømmeblæremark. Vi gjorde sammenligninger av sekvens for primere og probe til svømmeblæremark mot et utvalg ferskvannsarter uten å finne høy grad av homologi (Tabell 4). For å forsikre oss mot at testen vi har designet ikke vil gi falske positive, ville vi testet primere og probe mot genomisk DNA fra andre arter det ville vært naturlig å finne i en ferskvannlokalitet. Dette hadde vi ikke anledning til å gjennomføre i denne oppgaven på grunn av tid -og ressursmangel. Vi klarte ikke påvise ålens svømmeblæremark i noen av prøvene (Tabell 6). Dette kan det være flere grunner til. Den mest åpenbare og sannsynlige forklaringen er at arten ikke finnes på lokalitetene vi samlet prøvene fra, men dette trenger ikke nødvendigvis å være tilfelle. Ålens svømmeblæremark har en kompleks livssyklus med ulike stadier (De Charleroy et al., 1990). I voksent stadie lever de avstengt fra det ytre miljø, derfor er det rimelig å anta at mengden tilgjengelig DNA i de frie vannmassene er lave. I tillegg ble prøvene samlet inn i november da temperaturene var en del lavere enn optimaltemperatur for klekking som er 15-30°C (Thomas & Ollevier, 1993). Selv om eggene kan overvintre (Thomas & Ollevier, 1993) er det ikke sikkert at allerede klekkede larver overlever så lave temperaturer. Dermed er det mulig at vannet inneholdt for lite DNA fra parasitten til at den kunne påvises. En annen forklaring kan være at det er noe feil med vannprøvene eller at DNA-isolatene fra vannprøvene er ødelagt. Dette er derimot lite trolig da vi påviste både ål og ørret fra de samme prøvene. Selv om vi klarte å påvise svømmeblæremarken i de positive kontrollene er en mulig forklaring at primer og probe for svømmeblæremarken ikke fungerer helt optimalt, noe en PCR-effektivitet på 79% støtter. Det er imidlertid trolig at dette kun har noe å si hvis DNA-mengden i vannet er veldig lav i utgangspunktet. I eventuell videre forskning vil det være naturlig å undersøke en

lokalitet hvor svømmeblæremark allerede er påvist, som for eksempel Storelva (Kroglund, Gjelland, Güttrup, Haraldstad & Hegeland, 2013), Imsa, Drammenselva eller Emningdalselva (Mo, 2009). Det vil også være aktuelt å ta prøver gjennom ulike årstider.

Å vite mengden eDNA som skal til for å påvise en art er interessant siden vi ofte finner eDNA i lave konsentrasjoner. I tillegg starter nedbrytningen av DNA like etter det forlater organismen og brytes ned over tid (Lindahl, 1993), slik at det antageligvis ikke er av like god kvalitet som annet DNA. Metodens sensitivitetstest viste at qPCR er i stand til å detektere DNA fra de genomiske prøvene ned til 0,00418 ng/µl for ål og 0,00239 ng/µl for svømmeblæremark. Fortynningsrekken av vannprøve 3 (Tabell 7) viser at vi kun fikk utslag i den ufortynnede prøven. Det vil si at mengden eDNA fra ål tilgjengelig i 10^1 fortynningen er lik eller mindre enn i 10^3 fortynningen av genomisk DNA fra ål (0,00418 ng/µl). Sensitivitetstesten viste også at det må være 1,2 celler/ml i vannprøvene for at arten skal kunne påvises, noe som tyder på at metoden er sensitiv. Anslaget på 1,2 celler/ml krever at DNA-isoleringen fra prøven er 100 % effektiv, samt at DNA-et i vannprøvene har lik kvalitet som genomisk DNA analysert i denne oppgaven. Det er også et grovt anslag da intervallene i en 10-ganger fortynning er store. For å få et mer nøyaktig mål på metodens sensitivitet kunne vi ha laget en fortynningsrekke med kortere intervaller.

En PCR-effektivitet på 100% vil si at mål-DNA kopieres hver syklus. Vi fikk en PCR-effektivitet på 80% og 79% for henholdsvis ål og svømmeblæremark, mens optimalt resultat ville vært 90-110%. De mest vanlige årsakene til en lavere effektivitet er dårlig design av primer eller suboptimale reagenskonsentrasjoner og reaksjonsforhold (Biosistemika, 2017). En lavere effektivitet kan føre til at det blir produsert færre PCR-produkt i PCR-kjøringen. Ct-verdiene vi får blir dermed generelt høyere enn de ville blitt med 100% effektivitet. Det er også trolig at vi kunne forventet å få flere positive prøver med 100% effektivitet. På figur 5 kan vi se at det er en høy Ct-verdi til 10^3 fortynningen som gjør at stigningstallet er < -3,2. Dette kan skyldes at 10^3 fortynningen inneholder så lite DNA at qPCR-maskinen har vanskelig for å detektere det.

Konklusjon

Vi fikk etablert en qPCR-test for påvisning av svømmeblæremark. Ved bruk av eDNA og qPCR kunne europeisk ål påvises i vannprøver hentet fra lokaliteter med høy vannføring i Mandalselva. Dette er et godt resultat med tanke på at det er lite ål i Mandalselva. Ålens svømmeblæremark kunne ikke påvises i andre prøver enn de positive kontrollene.

På grunn av metodens kostnads -og tidseffektive fordeler mener vi den kan være et godt supplement for å påvise og kartlegge ål. Metoden viser god sensitivitet, også på steder med høy vannføring. For å avgjøre om metoden er like effektiv til å påvise ålens svømmeblæremark mener vi det burde gjøres mer forskning. Vi har foreløpig ikke grunnlag til å si om den er tilstrekkelig. Vi anbefaler at det i videre studier tas vannprøver mer representative for hver lokalitet, samt at prøvene innhentes på ulike tider av året (jf livssyklus til svømmeblæremark). Det bør også tas prøver fra en elv hvor svømmeblæremarken tidligere er påvist. Hvis analyse av eDNA skal kunne benyttes som en mer effektiv metode innen forvaltning mener vi det ville være interessant å undersøke hvordan metoden kan benyttes for å si noe om kvantiteten til artene det undersøkes for.

Referanser

Aarestrup, K., Økland, F., Hansen, M. M., Righton, D., Gargan, P., Castonguay, M., . . . McKinley, R. S. (2009). Oceanic Spawning Migration of the European Eel *Science, 325*(5948), 1660-1660. doi: 10.1126/science.1178120

Arai, T., Otake, T. & Tsukamoto, K. (2000). Timing of metamorphosis and larval segregation of the Atlantic eels Anguilla rostrata and A. anguilla, as revealed by otolith microstructure and microchemistry. *Marine Biology, 137*(1), 39-45. doi: 10.1007/s002270000326

Artsdatabanken. (2012). Norsk svarteliste. Hentet fra https://www.artsdatabanken.no/fremmedearter

Bailey, S. A., Duggan, I. C., Jenkins, P. T. & MacIsaac, H. J. (2005). Invertebrate resting stages in residual ballast sediment of transoceanic ships. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 62*(5), 1090-1103. doi: 10.1139/f05-024

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.

Biosistemika. (2017). Understanding qPCR efficiency and why it can exceed 100%. Hentet fra https://biosistemika.com/blog/qpcr-efficiency-over-100/

Bonhommeau, S., Chassot, E. & Rivot, E. (2008). Fluctuations in European eel (Anguilla anguilla) recruitment resulting from environmental changes in the Sargasso Sea. *Fisheries Oceanography, 17*(1), 32-44. doi: 10.1111/j.1365-2419.2007.00453.x

Briski, E., Cristescu, M. E., Bailey, S. A. & MacIsaac, H. J. (2011). Use of DNA barcoding to detect invertebrate invasive species from diapausing eggs. *Biological Invasions, 13*(6), 1325-1340.

Bunce, M., Szulkin, M., Lerner, H. R. L., Barnes, I., Shapiro, B., Cooper, A. & Holdaway, R. N. (2005). Ancient DNA Provides New Insights into the Evolutionary History of New Zealand's Extinct Giant Eagle. *PLOS Biology, 3*(1), e9. doi: 10.1371/journal.pbio.0030009

Butchart, S. H. M., Walpole, M., Collen, B., van Strien, A., Scharlemann, J. P. W., Almond, R. E. A., . . . Watson, R. (2010). Global Biodiversity: Indicators of Recent Declines. *Science, 328*(5982), 1164-1168. doi: 10.1126/science.1187512

Charleroy, D. d., Thomas, K., Belpaire, C. & Ollevier, F. (1989). The viability of the free living larvae of Anguillicola crassus. *Journal of Applied Ichthyology, 5*(3), 154-156.

Darling, J. A. & Tepolt, C. K. (2008). Highly sensitive detection of invasive shore crab (Carcinus maenas and Carcinus aestuarii) larvae in mixed plankton samples using polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphisms (PCR-RFLP). *Aquatic Invasions, 3*(2), 141-152.

De Charleroy, D., Grisez, L., Thomas, K., Belpaire, C. & Ollevier, F. (1990). The life cycle of Anguillicola crassus. *Diseases of aquatic organisms, 8*(2), 77-84.

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.

Dekker, W. (2003). Did lack of spawners cause the collapse of the European eel, Anguilla anguilla? *Fisheries Management and Ecology, 10*(6), 365-376. doi: 10.1111/j.1365-2400.2003.00352.x

Doi, H., Inui, R., Akamatsu, Y., Kanno, K., Yamanaka, H., Takahara, T. & Minamoto, T. (2017). Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish. *Freshwater Biology, 62*(1), 30-39. doi: 10.1111/fwb.12846

Durif, C. (2017). Forskningsfangst av ål-Sluttrapport HI-prosjekt 81333. *Rapport fra havforskningen*.

Durif, C. & Skiftesvik, A. B. (2007). Europeisk ål. *Kyst og havbruk, 2007*, 88-89.

Fazio, G., Sasal, P., Mouahid, G., Lecomte-Finiger, R. & Moné, H. (2012). Swim bladder nematodes (Anguillicoloides crassus) disturb silvering in European eels (Anguilla anguilla). *Journal of Parasitology, 98*(4), 695-705.

Feunteun, E. (2002). *Management and restoration of European eel population (Anguilla anguilla): An impossible bargain* (Vol. 18).

Foote, A. D., Thomsen, P. F., Sveegaard, S., Wahlberg, M., Kielgast, J., Kyhn, L. A., . . . Gilbert, M. T. P. (2012). Investigating the potential use of environmental DNA (eDNA) for genetic monitoring of marine mammals. *PloS one, 7*(8), e41781.

Genomsize. Genomsize. Hentet fra www.genomesize.com

Goldberg, C. S., Pilliod, D. S., Arkle, R. S. & Waits, L. P. (2011). Molecular Detection of Vertebrates in Stream Water: A Demonstration Using Rocky Mountain Tailed Frogs and Idaho Giant Salamanders. *PLOS ONE, 6*(7), e22746. doi: 10.1371/journal.pone.0022746

Goldberg, C. S., Strickler, K. M. & Pilliod, D. S. (2015). Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. *Biological Conservation, 183*, 1-3.

Gurevitch, J. & Padilla, D. K. (2004). Are invasive species a major cause of extinctions? *Trends in ecology & evolution, 19*(9), 470-474.

Haenen, O., Grisez, L., De Charleroy, D., Belpaire, C. & Ollevier, F. (1989). Experimentally induced infections of European eel Anguilla anguilla with Anguillicola crassus (Nematoda, Dracunculoidea) and subsequent migration of larvae. *Diseases of Aquatic Organisms*.

Halvorsen, S. (2017). Påvisning av europeisk ål (Anguilla anguilla) ved bruk av environmental DNA og quantitative PCR.

Harvey, J. B., Hoy, M. S. & Rodriguez, R. J. (2009). Molecular detection of native and invasive marine invertebrate larvae present in ballast and open water environmental samples collected in Puget Sound. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 369*(2), 93-99.

Higuchi, R., von Beroldingen, C. H., Sensabaugh, G. F. & Erlich, H. A. (1988). DNA typing from single hairs. *Nature, 332*, 543. doi: 10.1038/332543a0

Höss, M., Kohn, M., Pääbo, S., Knauer, F. & Schröder, W. (1992). Excrement analysis by PCR. *Nature, 359*, 199. doi: 10.1038/359199a0

IUCN. (2014). The IUCN Red List of Threatened Species. Hentet fra http://www.iucnredlist.org/details/60344/0

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: doi:10.1111/j.1755-263X.2010.00158.x

Kirk, R. (2003). The impact of Anguillicola crassus on European eels. *Fisheries Management and Ecology, 10*(6), 385-394.

Kroglund, F., Gjelland, K., Güttrup, J., Haraldstad, T. & Hegeland, P. (2013). Overvåking av ål i Storelva og evaluering av tiltak for nedvandring forbi Fosstveit kraftverk. Resultater fra undersøkelser i 2012.

Lefebvre, F., Mounaix, B., Poizat, G. & Crivelli, A. (2004). Impacts of the swimbladder nematode Anguillicola crassus on Anguilla anguilla: variations in liver and spleen masses. *Journal of Fish Biology, 64*(2), 435-447.

Lindahl, T. (1993). Instability and decay of the primary structure of DNA. *nature, 362*(6422), 709.

Lindholm, M. (2012). Ålens svømmeblæremark (Anguillicola crassus). *Vann, 47*(1), 63-67.

Lodge, D. M., Williams, S., MacIsaac, H. J., Hayes, K. R., Leung, B., Reichard, S., . . . Andow, D. A. (2006). Biological invasions: recommendations for US policy and management. *Ecological applications, 16*(6), 2035-2054.

Lydolph , M. C., Jacobsen, J., Arctander, P., Gilbert, M. T. P., Gilichinsky, D. A., Hansen, A. J., . . . Lange, L. (2005). Beringian Paleoecology Inferred from Permafrost-Preserved Fungal DNA. *Applied and Environmental Microbiology, 71*(2), 1012-1017. doi: 10.1128/aem.71.2.1012-1017.2005

Miller, M. J. (2009). Ecology of anguilliform leptocephali: remarkable transparent fish larvae of the ocean surface layer. *Aqua-BioSci. Monogr, 2*(4), 1-94.

Mo, T. A. (2009). Dødelig asiatisk åleparasitt spres i norsk fauna. *Norsk Veterinærtidsskrift, 4*, 350-353.

Molnár, K., Baska, F., Csaba, G., Glávits, R. & Székely, C. (1993). Pathological and histopatnotogical studies of the swimbladder of eels Anguilla anguitla infected by Angutlticpta crassus (Nemafoda: Dracuncuioidea). *Diseases of Aquatic Organisms, 15*(1), 41-50.

Mooney, H. A. & Cleland, E. E. (2001). The evolutionary impact of invasive species. *Proceedings of the National Academy of Sciences, 98*(10), 5446-5451. doi: 10.1073/pnas.091093398

Nijman, V. (2015). CITES-listings, EU eel trade bans and the increase of export of tropical eels out of Indonesia. *Marine Policy, 58*, 36-41.

Ogram, A., Sayler, G. S. & Barkay, T. (1987). The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of microbiological methods, 7*(2-3), 57-66.

Palstra, A., Heppener, D., Van Ginneken, V., Székely, C. & Van den Thillart, G. (2007). Swimming performance of silver eels is severely impaired by the swim-bladder parasite Anguillicola crassus. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 352*(1), 244-256.

Pedersen, M. W., Overballe-Petersen, S., Ermini, L., Der Sarkissian, C., Haile, J., Hellstrom, M., . . . Cappellini, E. (2015). Ancient and modern environmental DNA. *Phil. Trans. R. Soc. B, 370*(1660), 20130383.

Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R. M. & Gough, K. C. (2014). REVIEW: The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology, 51*(5), 1450-1459. doi: 10.1111/1365-2664.12306

Schmidt, J. (1923). Breeding Places and Migrations of the Eel. *Nature, 111*, 51. doi: 10.1038/111051a0

Sigsgaard, E. E., Carl, H., Møller, P. R. & Thomsen, P. F. (2015). Monitoring the near-extinct European weather loach in Denmark based on environmental DNA from water samples. *Biological Conservation, 183*, 46-52.

Sjöberg, N. B., Petersson, E., Wickström, H. & Hansson, S. (2009). Effects of the swimbladder parasite Anguillicola crassus on the migration of European silver eels Anguilla anguilla in the Baltic Sea. *Journal of Fish Biology, 74*(9), 2158-2170.

Skiftesvik, A. B. & Durif, C. (2009). Europeisk ål. *Kyst og havbruk, 2009*.

Tesch, F. W. & White, R. J. (2008). *The eel*: John Wiley & Sons.

Thomas, K. & Ollevier, F. (1993). Hatching, survival, activity and penetration efficiency of second-stage larvae of Anguillicola crassus (Nematoda). *Parasitology, 107*(2), 211-217.

THOMSEN, P., Kielgast, J., Iversen, L. L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M. T. P., . . . Willerslev, E. (2012). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular ecology, 21*(11), 2565-2573.

Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Møller, P. R., Rasmussen, M. & Willerslev, E. (2012). Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS one, 7*(8), e41732.

Thomsen, P. F. & Willerslev, E. (2015). Environmental DNA–An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation, 183*, 4-18.

Thorstad, E. B., Larsen, B. M., Finstad, B., Hesthagen, T., Hvidsten, N. A., Johnsen, B. O., . . . Sandlund, O. T. (2011). Kunnskapsoppsummering om ål og forslag til overvåkingssystem i norske vassdrag. *NINA Rapport, 661*, 69.

Thorstad, E. B., Larsen, B. M., Hesthagen, T., Næsje, T. F., Poole, R., Aarestrup, K., . . . Økland, F. (2010). Ål og konsekvenser av vannkraftutbygging–en kunnskapsoppsummering.

UNEP, C. (2002). Report on the Sixth Meeting of the Conference of the Parties to the Convention on Biological Diversity (UNEP/CBD/COP/6/20/Part 2) Strategic Plan Decision VI/26.

Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., . . . Dejean, T. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology, 25*(4), 929-942. doi: 10.1111/mec.13428

Valiere, N. & Taberlet, P. (2000). Urine collected in the field as a source of DNA for species and individual identification. *Molecular Ecology, 9*(12), 2150-2152. doi: 10.1046/j.1365-294X.2000.11142.x

Van Banning, P. & Haenen, O. (1990). Effects of the swimbladder nematode Anguillicola crassus in wild and farmed eel, Anguilla anguilla *Pathology in marine science* (s. 317-330): Elsevier.

van Oorschot, R. A., Ballantyne, K. N. & Mitchell, R. J. (2010). Forensic trace DNA: a review. *Investigative genetics, 1*(1), 14.

Waksman, S. A. (1925). What is humus? *Proceedings of the National Academy of Sciences, 11*(8), 463-468.

Willerslev, E., Hansen, A. J., Binladen, J., Brand, T. B., Gilbert, M. T. P., Shapiro, B., . . . Cooper, A. (2003). Diverse Plant and Animal Genetic Records from Holocene and Pleistocene Sediments. *Science, 300*(5620), 791-795. doi: 10.1126/science.1084114

Würtz, J. & Taraschewski, H. (2000). Histopathological changes in the swimbladder wall of the European eel Anguilla anguilla due to infections with Anguillicola crassus. *Diseases of Aquatic Organisms, 39*(2), 121-134.