



UNDERSØGELSE AF FOREKOMSTEN AF FLODPERLE- MUSLING (*MARGARITIFERA MARGARITIFERA*) I VARDE Å VED BRUG AF eDNA

Videnskabelig rapport fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi

nr. 224

2017



AARHUS
UNIVERSITET

DCE – NATIONALT CENTER FOR MILJØ OG ENERGI

[Tom side]

UNDERSØGELSE AF FOREKOMSTEN AF FLODPERLE- MUSLING (*MARGARITIFERA MARGARITIFERA*) I VARDE Å VED BRUG AF eDNA

Videnskabelig rapport fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi

nr. 224

2017

Liselotte Wesley Andersen & Peter Wiberg-Larsen

Institut for Bioscience



AARHUS
UNIVERSITET

DCE – NATIONALT CENTER FOR MILJØ OG ENERGI

Datablad

Serietitel og nummer:	Videnskabelig rapport fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi nr. 224
Titel:	Undersøgelse af forekomsten af flodperlemusling (<i>Margaritifera margaritifera</i>) i Varde Å ved brug af eDNA
Forfattere:	Liselotte Wesley Andersen & Peter Wiberg-Larsen
Institution:	Institut for Bioscience
Udgiver:	Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi ©
URL:	http://dce.au.dk
Udgivelsesår:	April 2017
Redaktion afsluttet:	Marts 2017
Faglig kommentering:	Paul Henning Krogh & Jesper Givskov Sørensen, Institut for Bioscience, AU
Kvalitetssikring, DCE:	Jesper R. Fredshavn & Hanne Bach
Finansiel støtte:	Ingen ekstern finansiering
Bedes citeret:	Andersen, L.W. & Wiberg-Larsen, P. 2017. Undersøgelse af forekomsten af flodperlemusling (<i>Margaritifera margaritifera</i>) i Varde Å ved brug af eDNA. Aarhus Universitet, DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi, 28 s. - Videnskabelig rapport fra DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi nr. 224 http://dce2.au.dk/pub/SR224.pdf
	Gengivelse tilladt med tydelig kildeangivelse
Sammenfatning:	Rapporten dokumenterer ved analyse af "environmental" DNA i vand- og sedimentprøver, at flodperlemuslingen stadig forekommer på to delstrækninger af Varde Å. Metoden har et stort potentiale for påvisning af forekomster af truede arter og hvor hyppige disse er. Men den giver ikke mulighed for at beskrive arternes størrelsesfordeling og rekruttering i form af formering.
Emneord:	Flodperlemusling, eDNA, Varde Å
Layout:	Grafisk Værksted, AU Silkeborg
Foto forside:	Peter Wiberg-Larsen
ISBN:	978-87-7156-258-3
ISSN (elektronisk):	2244-9981
Sideantal:	28
Internetversion:	Rapporten er tilgængelig i elektronisk format (pdf) som http://dce2.au.dk/pub/SR224.pdf

Indhold

Forord	5
Sammenfatning	6
Summary	8
1 Baggrund	10
1.1 NOVANA overvågning af flodperlemuslingen	10
1.2 Alternativ metode til påvisning af flodperlemuslingen	11
2 Flodperlemuslingens biologi	12
3 Metoder	13
3.1 Valg af lokaliteter	13
3.2 Prøvetagningstidspunkter	14
3.3 Prøvetagning	15
3.4 Analyser	16
4 Resultater	19
5 Diskussion	21
6 Tak og anerkendelse	24
7 Referencer	25
Bilag 1	28

[Tom side]

Forord

Denne rapport er et resultat af undersøgelser udført i regi af "Center for DNA baserede metoder og kompetencer til biomonitering" ved Aarhus Universitet. Centeret blev oprettet i 2015 via en intern særbevilling og er repræsenteret ved medarbejdere tilknyttet hhv. Institut for Miljøvidenskab (ENVS) og Institut for Bioscience (BIOS), begge placeret under Science & Technology.

Formålet med projektet er overordnet at afprøve eDNA baserede metoder i overvågningssammenhæng som alternativ til traditionelle metoder under NOVANA. Derudover er det ønsket specifikt at undersøge, hvorvidt flodperlemuslingen stadig forekommer i Varde Å, landets eneste kendte naturlige forekomst.

Sammenfatning

Denne rapport dokumenterer, at flodperlemuslingen, *Margaritifera margaritifera*, stadig forekommer på sine historiske levesteder i Varde Å. Således blev arten påvist hhv. 500 m opstrøms for Vagtborghus og ved Varde Sommerland i Varde by. Til gengæld kunne den ikke påvises ved Sig, der ligger ca. 6 km opstrøms herfor.

Påvisningen blev foretaget ved hjælp af eDNA analyser på hhv. 15 mL vandprøver og sedimentprøver. Ud over indsamlingslokaliteterne i Varde Å blev der indsamlet prøver fra to vandløb i Blekinge (Sydsverige), hvor arten forekommer i hhv. meget store og meget små tætheder, samt fra tre danske vandløb (Suså på Sjælland, samt Geelså og Odense Å på Fyn), hvor arten med stor sikkerhed aldrig har levet, men hvor den nært beslægtede tykskallet malermusling (*Unio crassus*) enten forekommer eller har forekommet indtil for relativt nyligt.

Samtlige ekstraktioner af eDNA (hhv. ufiltreret vand og sediment) blev udført ved hjælp af PowerSoil kit (MoBio). Dette minimerer indholdet af uønskede opløste organiske stoffer og partikler i vandet. Det ekstraherede eDNA blev derefter opformeret med primersættet MmaCOI, der var udvalgt blandt tre forskellige primersæt til specielt at opfange eDNA fra flodperlemusling. Primersættet blev forinden optimeret med enzymet (KAPA SYBR® FAST), der anvendes til opformering af DNA (qPCR), på DNA fra vævsprøver af flodperlemusling (*Margaritifera margaritifera*), spids malermusling (*Unio tumidus*), alm. malermusling (*Unio pictorum*), lille dammusling (*Anodonta anatina*) og tykskallet malermusling (*Unio crassus*). Formålet var at gøre primersættet artsspecifikt for flodperlemuslingen. Det ekstraherede eDNA fra vandprøverne blev dernæst opformeret og analyseret ved qPCR. Grænsen for påvisning af DNA fra flodperlemusling i de pågældende vandprøver blev endvidere fastsat ud fra en række af fortyndinger af en DNA-standard koncentration (baseret på flodperlemuslingevæv). De resulterende såkaldte amplifikations-plot blev analyseret visuelt. For at en given prøve (hhv. vandprøve eller sediment prøve) kunne betegnes som positiv, dvs. indeholde DNA fra flodperlemusling, skulle der være mindst to positive triplikat-plot ud af de tre mulige og samtidig skulle værdierne ligge inden for påvisningsgrænsen (angivet ved Ct værdier). For at verificere, at et positivt amplifikations-plot reelt repræsenterede et PCR-bånd i den forventede størrelse, blev de positive prøver yderligere analyseret på gel for at kontrollere at eDNA stykkerne havde den rigtige flodperlemuslingesekvens. Ud over de nævnte prøver blev der foretaget lignende analyser på negative kontroller (prøver uden eDNA).

Flodperlemuslingen blev på baggrund af såvel vand- som sedimentprøver påvist ved de to lokaliteter i Varde Å, samt på de to syd-svenske lokaliteter. Derimod blev den ikke påvist i de tre øvrige danske vandløb (bortset fra en enkelt åbenlyst "falsk positiv" vandprøve fra Odense Å), hvorfra arten heller ikke var forventet, eller længere opstrøms i Varde Å, hvorfra den ikke er kendt.

Den præcise udbredelse af bestanden af flodperlemusling i Varde Å kan ikke fastslås på baggrund af de udførte undersøgelser, idet det udskilte eDNA føres med strømmen. Imidlertid er det rimeligt at antage, at arten findes på en vis strækning såvel opstrøms for Vagtborg, samt ved Varde Sommerland. Det er endvidere (ud fra vandføring og potentielt udskilt eDNA i hhv. Varde Å

og de to svenske vandløb) vurderet sandsynligt, at bestanden ikke er ubetydelig. Analyserne giver ingen konklusioner om individernes aldersfordeling, eller om der forekommer rekruttering af unge muslinger.

Fangsten af et 102 mm langt eksemplar i efteråret 2000 tyder på, at der kan forekomme formeringsdygtige muslinger. Endvidere er vækstforholdene i Varde Å sammenlignelige med tilsvarende i midt-svenske vandløb (samme temperaturforhold i sommerperioden, hvor arten har sin primære vækst), hvor sammenhængen mellem længde og alder er kendt. På den baggrund vurderes det pågældende individ at have været 50-60 år og dermed potentielt formeringsdygtig. Normalt regnes individerne for formeringsdygtige indtil en alder af 90-100 år.

Den anvendte eDNA teknik kan påvise forekomst af flodperlemuslingen, men ikke størrelse og alderssammensætning. Der er derfor stadig stort behov for supplerende og mere traditionelle undersøgelser (som under det hidtidige NOVANA), der kan belyse Varde Å bestandens størrelse, alderssammensætning, vækstforhold, samt om der forekommer rekruttering af ny muslinger, kort sagt om bestanden kan betragtes som levedygtig.

Summary

Very little is known about the status of the River Pearl Mussel, *Margaritifera margaritifera*, at its only historically (and recently) known Danish habitats in River Varde in Western Jutland, and it has been doubted if the species still holds populations there. The species is globally threatened and protected according to the EU Habitats Directive.

Using environmental DNA (eDNA) this report documents that the mussel occurs in River Varde, being located upstream “Vagtborghus” and further downstream at Varde City. It was, however, not found at Sig located 6 km upstream “Vagtborghus” outside its known distributional area.

The presence of the species was also investigated at two streams in Blekinge (South Sweden) where it occurs in high and low density, respectively, and three additional Danish streams (in South Zealand and Funen) where it was not expected to occur. We analysed for eDNA in both 15 mL water samples and samples of the upper 1.5 cm of sandy sediment. Triplicate samples were taken at all sites, and each of these analysed by three subsamples.

All extractions of eDNA were carried out using PowerSoil kit (MoBio), thereby minimising unwanted soluble organic compounds and particles in the solvents. The extracted eDNA was subsequently analysed using the primer MmaCOI, optimised with the qPCR-enzyme KAPA SYBR® FAST (KEM-EN-TECH) to be specific for *M. margaritifera* before carrying out qPCR to amplify present eDNA segments. The “limit of detection” (assessed as Ct) was estimated from a number of dilutions of a known DNA concentration using visual inspection of the resulting amplification-plots. To decide if the mussel was present in a given sample, at least two out of the three triplicate plots should be positive and further the obtained values should be within the Ct-range. Further, positive amplification-plots were additionally run on gel to verify if the plots represented a PCR-band of the expected size for the species. Similar analyses were run on negative controls (i.e. additional samples without including eDNA).

The presence of *M. margaritifera* was confirmed from water as well as sediment samples at two sites in River Varde, the two South Swedish streams, but not (as expected) the other three Danish stream sites (except for one obviously “false positive” sample in one of these) and the most upstream site in River Varde.

The results are not sufficient to establish the precise distribution of the population in River Varde as excreted eDNA may be transported (and dispersed) and, thus, still being detectable over several kilometres. However, because general dilution of eDNA may be extensive due to the high discharge, there are reasons to believe that the population may be of significant size (based on comparison of discharge and population size in the two Swedish streams and the discharge in River Varde). Unfortunately, no conclusions can be made about age structure and recruitment of the population. Thus, despite the obvious potential of eDNA analyses, supplementary traditional monitoring (visual inspection and sampling of specimens) is needed to assess the conservation status of the species in Denmark and to conclude whether the population is viable.

Assuming that the population in River Varde has growth rates similar to those reported for rivers in Mid-Sweden, a single specimen (length 102 mm) caught coincidentally in the autumn 2000 may have been 50-60 years old and thus potentially fertile. If so, it cannot be excluded that the population still have the ability to reproduce.

1 Baggrund

Flodperlemuslingen (*Margaritifera margaritifera* Linnaeus, 1758) har et naturligt udbredelsesområde, som omfatter Europa fra Den Iberiske Halvø mod syd til det nordlige Skandinavien og Rusland mod nord (Araujo & Ramos 2000). Derudover er arten introduceret til det østlige Nordamerika. Imidlertid er det vurderet, at arten nu forekommer inden for et udbredelsesområde, der kun er omkring 5 % af, hvad det var for ca. 100 år siden (IUCN 2016). Denne dramatiske tilbagegang angives primært til at skyldes eutrofiering, intensivning af landbruget, dræning og afskovning, samt udnyttelse i form af perlefiskeri (Mollusc Specialist Group 1996). Arten er i konsekvens heraf placeret på EU's Habitatdirektivets bilag II og V, hvilket betyder at den skal nyde en særlig grad af beskyttelse i medlemslandene. Derudover er disse lande forpligtet til at overvåge dens forekomst og fastslå dens aktuelle bevaringsstatus.

Flodperlemuslingen er også kendt fra Danmark, omend kun naturligt fra Varde Å på en relativt kort strækning nedstrøms for Karlsgårde Vandkraftværk (Mandahl-Barth 1949). Vandløbet blev i 1929 reguleret fra Karlsgårde til Varde by med henblik på at øge faldet over kraftværkets turbiner (Kann 2006). I alt 13 å-slynger blev afsnøret, og bunden blev ved afgravning sænket ½-1 m. Trods reguleringen blev der bevaret ca. 2,5 km af det oprindelige vandløb nedstrøms for tilløbet af Skonager Lilleå (Wiberg-Larsen 2013). Her formodes flodperlemuslingen stadig at forekomme. Det seneste dokumenterede fund omfatter ét stort individ fanget af en sportsfisker på spinner i oktober 2000 omkring udløbet af Skonager Lilleå (Porsgaard 2015). Derudover blev arten fundet ved en dykkerundersøgelse umiddelbart nedstrøms for en 1,4 km lang strækning opstrøms for Varde by (og Varde Sommerland), og umiddelbart før denne strækning blev genslynget i årene 1999-2000 (Kann 2006). De fundne individer var angiveligt "store" og "meget gamle".

Flodperlemuslingen er i årene 1910-1912 udsat i Skjern Å, Sneum Å og Kongeå (Mandahl-Barth 1949). Der er ingen indikationer på, at udsætningerne skulle have resulteret i etablering af egentlige bestande, og individer af arten er så vidt vides ikke registreret efterfølgende.

Flodperlemuslingen indgår i det nationale program for overvågning af natur og vandmiljø, NOVANA. Overvågningen følger en teknisk anvisning (Wiberg-Larsen 2013), som skal sikre, at der kan gives en troværdig vurdering af artens bevaringsstatus, dels på baggrund af ændringer i dens udbredelse, dels ud fra bestandsstørrelser og alderssammensætning. Som minimum skal overvågningen give svar på, om arten stadig forekommer på dens kendte historiske levested.

1.1 NOVANA overvågning af flodperlemuslingen

Flodperlemuslingen er overvåget i 2014 efter den tekniske anvisning (Wiberg-Larsen 2013). Metoden omfatter indledningsvist en kortlægning af potentielt egnede levesteder for arten i Varde Å via brug af undervandsvideo. Kortlægning omfatter strækninger, hvorfra arten enten er kendt eller vurderes at kunne forekomme (to strækninger: hhv. 2,5 km nedstrøms for Skonager Lilleå og 1-2 km omkring Varde Sommerland). På baggrund af kortlægningen undersøges,

såfremt arten bliver lokaliseret, bestandstætheder og aldersfordeling på udvalgte prøvefelter ved brug af dykker. Undersøgelserne forudsætter, at vandet er helt klart, og at de foretages under optimale lysforhold (solskin).

Resultatet af overvågningen i 2014 kunne ikke påvise arten. Det skyldes primært, at vandet i Varde Å var meget uklart pga. okker. Det gjorde det kun muligt at identificere mulige levesteder, men ingen individer. Der blev derfor ikke udført nogen undersøgelse ved dykning. Det blev der derimod i 2015, hvor der blev snorklet i meget begrænset omfang. Heller ikke da blev arten påvist.

1.2 Alternativ metode til påvisning af flodperlemuslingen

På denne baggrund blev der vurderet et behov for at påvise den mulige forekomst af arten i Varde Å med en alternativ metode. Her er analyse af eDNA ("environmental" DNA) en oplagt mulighed og baggrunden for nærværende projekt. Metoden består i en påvisning af DNA udskilt fra dyr eller planter. Det er således vist, at eDNA udskilt til vand har en "holdbarhed" på under en måned (Dejean et al. 2011). Noget tilsvarende må antages at gælde eDNA bundet til den øverste del af sedimentet (fx sandet bund), hvor vandgennemstrømningen er relativt stor og iltforholdene fremmende for nedbrydning. Påvisning af eDNA fra muslingen betyder derfor en aktuel tilstedeværelse og ikke bare et resultat af en "historisk" forekomst. Til gengæld er der det specielle problem i strømmende vand, at eDNA transporteres nedstrøms, og at det derfor kan være vanskeligt at vide, hvor langt opstrøms detekteret eDNA stammer fra. Deiner & Altermatt (2014) har for muslingen *Unio tumidus* (der er en relativt nær slægtning til flodperlemuslingen) fundet, at eDNA fra denne kunne påvises op til ca. 9 km nedstrøms for dens dokumenterede levested. Muligheden for påvisning formodes imidlertid at afhænge af dels vandføringen (og dermed fortyndingen af udskilt eDNA), dels muslingebestandens størrelse/tæthed.

Formålet med det foreliggende projekt er helt overordnet at tilvejebringe og optimere metoder til screening for forekomst af "stormuslinger", herunder specifikt flodperlemuslingen, men også i en senere fase tykskallet malermusling (*Unio crassus*), som ligeledes er opført på Habitatdirektivets bilag II og derfor overvåges specifikt via NOVANA. Begge arter er svære og omkostningskrævende at registrere effektivt ved traditionelle observationer, fordi man så at sige ikke kan undersøge "hver eneste meter vandløb", hvor de kan tænkes at forekomme.

2 Flodperlemuslingens biologi

Flodperlemuslingen (familie: Margaritiferidae) har – lige som andre såkaldte "stormuslinger" (familie: Unionidae) - en meget speciel livscyklus (se nedenfor). Individerne er normalt særkønnede, hvor hannerne gyder deres sæd i det omgivende vand. Det sker i sommerperioden. Hunmuslingerne tager sæden ind med "indåndingsvandet" og æggene befrugtes inde i disse. Fra æggene klækkes glochidierne, der frigives til vandet i perioden sommer til tidligt efterår afhængigt af vandtemperaturen. Den enkelte hun (eller hermafroditisk individ – se nedenfor) producerer 4-16 millioner glochidier per år. Disse kan alene udvikles på gællerne af enten laks eller ørred, og især yngel af disse er særligt egnede som værtsfisk (pga. formindsket immunforsvar mod glochidierne, samt fordi større individer foretager vandringer til saltvand, hvor glochidierne ikke kan overleve). Glochidierne incystreres i værtsfiskenes gællelevæv og vokser her indtil det følgende år, idet de omkring maj-juni falder af og graver sig ned i vandløbsbunden, hvor denne er gruset og vel iltet. Produktionen af disse små muslinger afhænger i høj grad af tætheden af de egnede værtsfisk (Arvidsson et al. 2012). Det efterfølgende stadium, hvor de små muslinger lever nedgravet, er imidlertid det mest kritiske under hele artens livscyklus og varer op til ca. 4 år eller mere. Fasen er kritisk, fordi de små muslinger er meget følsomme over for iltmangel, der kan opstå hvis fx vandgennemstrømningen i sedimentet blokeres ved indlejring af fin-partikulært materiale, eller fordi ophobet organisk materiale nedbrydes under betydeligt iltforbrug. Klarer de små muslinger disse udfordringer, placerer de sig øverst i vandløbsbunden, således at deres åndeåbninger er fri. Her sidder de resten af deres levetid, som er op til ca. 130 år eller mere. Individer på op til 280 år er således kendt fra det nordlige Sverige (Dunca & Mutvei 2001). Den gennemsnitlige samlede levetid for en musling er dog ca. 100 år. For hunnerne er den samlede reproduktive periode, efter at de er blevet kønsmodne, op til ca. 75 år, hvorunder den enkelte hun kan præstere et næsten ufatteligt stort antal glochidier (ca. 2×10^8).

Som nævnt er muslingerne normalt særkønnede, men hvor populationerne er "tynde", kan individerne blive hermafroditter og selv-befrugtning vil være dominerende. Dette kan meget vel tænkes at være tilfældet i Varde Å, såfremt arten stadig findes og individerne stadig er reproduktive. Da Varde Å blev reguleret i 1929, fandtes en velfungerende population med ca. 5 individer per løbende meter (Mandahl-Barth 1949), og bestanden har uden tvivl bestået af særkønnede individer. De individer, som var unge (ca. 5-10 år) umiddelbart før reguleringen vil i dag være ca. 90-100 år gamle og dermed potentielt reproduktive.

3 Metoder

3.1 Valg af lokaliteter

Der blev i 2015 udvalgt i alt 7 lokaliteter til indsamling af prøver for analyse af eDNA. Valget blev foretaget, således at der forekom lokaliteter med dokumenterede forekomster af hhv. flodperlemusling eller tykskallet malermusling, samt lokaliteter i Varde Å, hvor en mulig forekomst af flodperlemuslingen ønskedes verificeret. Indsamlingslokaliteterne fremgår af tabel 3.1.

Ved valget af lokaliteter blev der taget udgangspunkt i kendte forekomster via hhv. NOVANA programmet, publicerede oplysninger (Larsen & Wiberg-Larsen 2006), samt data tilgængelige via den svenske "Musselportalen". For de svenske lokaliteter blev der foretaget en afvejning af kortest mulig transporttid, tilgængelighed, samt hyppighed af flodperlemuslingen.

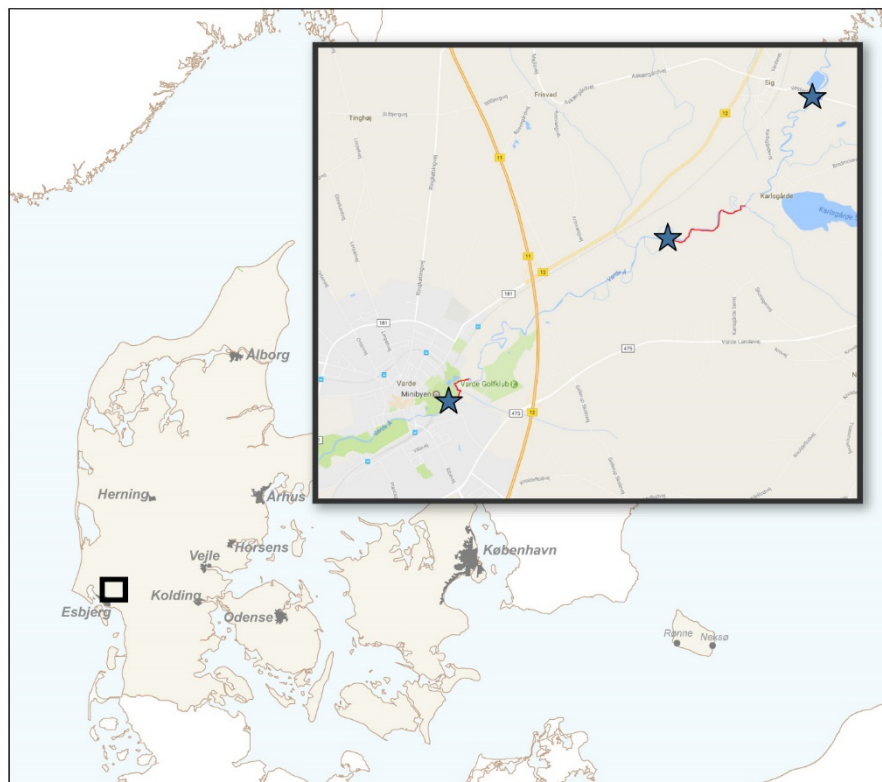
Tabel 3.1. Lokaliteter hvorfra der er indsamlet eDNA prøver til analyse for forekomst af hhv. flodperlemusling (*Margaritifera margaritifera*, Mm) eller tykskallet malermusling (*Unio crassus*, Uc). Desuden er angivet kendte forekomster af de to arter samt andre "stormuslinger".

Lokalitet	Prøver	Flodperle -musling	Tykskallet maler- musling	Andre "stormus- linger"	Bemærkninger
Varde Å – 500 m opstrøms Vagtborghus	eDNA ¹	+	-	+ ²	Historisk forekomst (Mm)
Varde Å – Nedstrøms Varde Sommerland	eDNA ¹	+	-	+ ²	Historisk forekomst (Mm)
Varde Å – Sig ⁵	eDNA ¹	+	-	?	
Silletorpsån - Stockbro, Rosenholm (Blekinge) ⁴	eDNA ¹ /voksen	+	-	-	Stor bestand (Mn, 5 ind./m ²)
Bräkneån -, Evarydskvarn (Blekinge) ⁴	eDNA ¹	+	-	-	Meget lille bestand (Mn)
Odense Å - Ellemølle (Fyn)	eDNA ¹ /voksen	-	+	-	Betydelig bestand (Uc)
Geels Å - Østergårdsvej (Fyn)	eDNA ¹	-	+	-	Nylig historisk forekomst (Uc)
Suså - Vrangstrup (Sjælland)	eDNA ¹	-	+	+ ³	Lille bestand (Uc)

Noter: ¹Vandprøver, GFC-filtre, sediment; ²*U. pictorum*, *Anodonta* spp.; ³*Unio tumidus*; ⁴Data fra SLU (Musselportalen: <http://www.musselportalen.se/Observations.aspx>); ⁵Undersøgt 2016.

Lokaliteterne i Varde Å (hhv. opstrøms Vagtborghus og nedstrøms Varde Sommerland) var placeret umiddelbart nedstrøms for kendte "historiske" forekomster af flodperlemusling (Figur 3.1).

Figur 3.1. Indsamlingslokaliteter for eDNA prøver i Varde Å (2015-2016). De røde strækninger repræsenterer "historiske" forekomster af flodperlemusling



Et udvalg af de anvendte lokaliteter er vist i figur 3.2. Læg mærke til, at de to svenske lokaliteter for flodperlemuslingen er relativt små (bredde 5-7 m), lavvandede med lille sommervandføring (skønnet til ca. 150 L/S), samt brunvandede af humusstoffer fra oplandet. De er også begge stærkt beskyggede af træer langs bredden. Til sammenligning er vandføringen i Varde Å om sommeren langt større (ca. 6000-8000 L/S) og formodentlig mere konstant i løbet af året (pga. stor tilførsel af grundvand), og vandet er tydeligt farvet af okker.

I 2016 blev der undersøgt yderligere en lokalitet i Varde Å, beliggende ved Sig, ca. 6 km opstrøms for Vagtborghus (Tabel 3.1). Flodperlemuslingen er ikke historisk kendt fra denne del af vandløbet. Formålet var at bekræfte/afkræfte denne udbredelse.

3.2 Prøvetagningstidspunkter

I 2015 blev prøver til analyser for eDNA indsamlet den 17. august fra vandløb i Blekinge og på Sjælland, mens øvrige prøver fra Fyn og Jylland blev indsamlet 19. august. Tidspunkterne blev valgt af hensyn til, at vandføringen ønskedes mindst mulig, og dermed "fortyndingen" af eDNA i vandprøver lille, ligesom der forventedes at være en relativt stor chance for forekomst af glochidielarver af flodperlemusling (og potentielt også tykskallet malermusling) som i givet fald kunne "bidrage" til puljen af eDNA.

I 2016 blev der udtaget supplerende vandprøver i perioden 7-9. august (se afsnit 3.3).



Figur 3.2. Lokalteter hvorfra der blev indsamlet prøver til analyse for eDNA m.v.: Øverst tv. – Bräkneåen v. Evarydskvarn (Blekinge); øverst th. – Silletorpsån v. Stockbro (Blekinge); midt tv. – Suså v. Vrangstrup (Sjælland); midt th. – Odense Å v. Ellemølle; nederst tv. - Varde Å 500 m opstrøms Vagtborghus; nederst th. – Varde Å umiddelbart nedstrøms Varde Sommerland.

3.3 Prøvetagning

Der blev i 2015 på hver af de 7 lokaliteter indsamlet eDNA ved brug af tre metoder:

- *Ufiltrerede vandprøver* (fx Jerde et al. 2011, Thomsen et al. 2012). Der blev udtaget 3 x 15 mL vand fra lokaliteten. Disse prøver blev udtaget fra vandoverfladen i 50 mL plastik rør. Der tilsattes umiddelbart herefter 33,5 mL ætanol (96%) og 1,5 mL natrium acetat (3M). Prøverne blev anbragt i kølekasser (5-10 °C) under transport. Ved hjemkomst til laboratoriet blev prøverne opbevaret mørkt ved ± 20 °C.

- *Filtrerede vandprøver* (se fx Pilliod et al 2013). Der blev udtaget 3 x 2 L vand fra lokaliteten. Disse prøver blev udtaget ved vandoverfladen ved at neddykke de anvendte 2 L plastikbeholdere. Vandprøverne blev anbragt i kølekasser under transporten til laboratoriet. Ved hjemkomst blev prøverne filtreret gennem et 47mm 1,2 µm glasfiber filter (GF/C) under vakuum. Filtring blev foretaget inden for 24 timer. Filtrene (triplikater) placeredes i 50 mL beholdere og blev nedfrosset ved ±20°C inden analyse. Der henvises til Jerde et al. (2011). Disse prøver er ikke viderebehandlet pga. utilsigtet procedureafvigelse i forbindelse med filtreringsprocessen.
- *Sedimentprøver af fint sand*. Prøverne indsamledes fra sedimentoverfladen indtil en dybde af ca. 1,5 cm. Der blev anvendt en såkaldt "Skovl-sampler" (modificeret Tolkamp-sampler, se Tolkamp 1980), som dækker et areal på 15 x 10 cm². Ved hjælp af en engangsplastiske blev ca. 100 cm² sediment overført til en 500 mL plastikkops. Der indsamledes 3 prøver fra hver lokalitet, der blev anbragt i kølekasser under transport til laboratoriet. Ved hjemkomst blev prøverne nedfrosset ved ±20°C.

I 2016 blev der yderligere indsamlet ufiltrerede vandprøver fra Varde Å (samme to lokaliteter som i 2015, samt desuden ved Sig), Suså ved Vrangstrup, Odense Å ved Ellemølle, samt Geelså ved Østergårdsvej. Metodikken var præcis den samme som for de tilsvarende ufiltrerede vandprøver indsamlet i 2015.

Samtlige prøver blev bragt til laboratoriet inden for 11 timer.

For at undgå enhver form for kontaminering blev der under al prøvetagning anvendt engangshandsker, der skiftedes ved hver ny lokalitet. De anvendte beholdere til vandprøver var enten ubrugte (50 mL) eller grundigt rengjorte med sæbevand (2 L) og ikke anvendt inden for de seneste 1-2 måneder. Tolkamp-samplern blev rengjort grundigt med klorin (2 % opløsning) mellem hver prøvetagning. Ligeledes anvendtes ny plastiskeer til udtagning af sediment fra samplern ved hver lokalitet. Endelig indsamledes prøver til påvisning af flodperlemusling i Blekinge først fra lokaliteten med lille bestand, dernæst fra den med stor bestand. De danske lokaliteter blev besøgt efter samme princip: Først de, hvor arten ikke skulle forekomme, og til sidst Varde Å lokaliteterne.

Ud over disse prøver blev der indsamlet voksne individer af hhv. flodperlemusling (Silletorpsån, Stockbro, 17.8.2015: 1 stk.), tykskallet malermusling (*Unio crassus*) (Odense Å, Vibæk, juli 2012: 1 stk.), alm. malermusling (*Unio pictorum*) (Thorsø, Virklund, 28.10.2015), spids malermusling (*Unio tumidus*) (Thorsø, Virklund, 28.10.2015), og lille dammusling (*Anodonta anatina*) (Thorsø, Virklund, 28.10.2015). Alle individer blev opbevaret på køl under transport, inden de blev nedfrosset ved ±20°C. Formålet med denne indsamling var at teste funktionen af de tilgængelige primere på de pågældende arter (se nedenfor under analyser).

3.4 Analyser

3.4.1 Optimering af primere til artsbestemmelse

Fra vævsprøver af de indsamlede muslinger, repræsenterende de ovennævnte 5 danske arter (som formodes at forekomme på en-flere af de undersøgte lokaliteter) blev DNA ekstraheret med E.Z.N.A.[®] DNA/RNA Isolation Kit fra Omega leverandør VWR (www.omegabiotek.com) med henblik på at

teste funktionen af tre primersæt: (1) EcoCOI, (2) MmaCOI, og (3) MmaND1. Samtlige disse primere er specielt designet til at påvise nordamerikanske "stormuslinger", inkl. flodperlemuslingen (se tabel 3.2).

Tabel 3.2. Oversigt over hvilke nordamerikanske "stormuslinger" (unionider), som tre forskellige primere er i stand til at påvise (W. Eldrigde, Stoud Water Research Centre, personlig kommunikation) – samt basale egenskaber ved de pågældende primere. Forklaring: X – sikker påvisning; (X) – mindre sikker påvisning.

Arter	EcoCOI	MmaCOI	MmaND1
Forventet produkt størrelse			
(antal basepar)	130	93	78
<i>Alasmodonta marginata</i>	X		
<i>Elliptio complanata</i>	X	X	(X)
<i>Lampsilis cariosa</i>	(X)	(X)	
<i>Lasmigona subviridis</i>	X		
<i>Margaritifera margaritifera</i>	X	X	X
<i>Pyganodon cataracta</i>	X		
<i>Utterbackia imbecillis</i>	X		

Optimeringen af PCR-betingelserne med de tre primersæt blev foretaget med polymerasen benyttet til qPCR med testkittet KAPA SYBR® FAST fra KEM-EN-TECH. På baggrund af Eldrigdes resultater viste vores afprøvning, at MmaCOI primersættet var specifik for flodperlemuslingen ved en "annealing" temperatur (hvor primerne bindes til DNA- strengene) på 64 °C. Primersættet blev afprøvet på alle fem arter, og ved denne temperatur blev der ikke observeret bånd ved nogen af de fire andre arter. Det blev efterfølgende verificeret med såkaldt "Sanger-sekvensering", at det opnåede PCR bånd var fra flodperlemusling

3.4.2 DNA ekstraktion

DNA blev ekstraheret fra de indsamlede 15 mL vandprøver og sedimentprøver. I alt blev der for hvert medie foretaget ni DNA ekstraktioner for hver af de 7 (8) lokaliteter. Det vil sige, at der blev udført tre parallelle ekstraktioner (triplikater = "tekniske" replikater) for hver af de tre prøver (af hvert medie), som var indsamlet fra den enkelte lokalitet ("biologiske" replikater), således at det samlede antal prøver til analyse var 63 for hvert medie. Til alle DNA ekstraktionerne blev der benyttet PowerSoil kit fra MoBio. De 15 mL vandprøver blev centrifugeret og bundfaldet blev benyttet til ekstraktionen. For sedimentprøverne blev ca. 500 mg sediment afvejet og benyttet til DNA ekstraktionen. DNA fra vævsprøverne fra individerne af de fem arter blev ekstraheret med E.Z.N.A. DNA ekstraktions kit (VWR). Ekstraktionen på eDNA prøverne og vævsprøverne foregik i to adskilte laboratorier. Derudover blev eDNA prøverne fra de to forskellige medier ekstraheret på to forskellige dage.

3.4.3 Artspåvisning - flodperlemusling

De i alt 63 prøver (for hvert "medie") blev efterfølgende analyseret ved hjælp af qPCR til påvisning af flodperlemusling i prøverne. For at minimere kontamineringsrisikoen foregik arbejdsgangen i laboratoriet fra rum / -områder dedikeret til præ-PCR håndtering af prøverne til rum dedikeret til post-PCR håndtering af disse. Desuden foregik opsætningen til qPCR analyserne i et laboratorium, hvor kun lav-koncentrationer af DNA blev håndteret, dvs. ikke ekstraheret DNA fra vævsprøver og andre kilder med højkoncentreret DNA.

Samtidig forgik selve opsætningen i strips (rækker af 8 mikrorør der er sammenkoblede), som blev lukket efter tilsætning af enzymmix til PCR og efterfølgende kun lukket op ved tilsætning af eDNA. På denne måde blev kontamineringsrisikoen begrænset til de 8 rør, der var åbne samtidig. Der kunne således ikke kontamineres på tværs af stripsene.

Ved hver analysekørsel blev der medtaget en standard fortyndingsrække på basis af DNA ekstrakter af vævsprøverne. Disse blev håndteret i et laboratorierum adskilt fra det laboratorierum, hvor eDNA prøverne blev håndteret. Denne fortyndingsrække blev benyttet til at vurdere PCR-effektiviteten for hver kørsel. Fortyndingsrækken blev derimod ikke benyttet til kvantificering. Analyserne blev altså udelukkende udført med henblik på ”presence/absence” påvisning (Andersen et al. 2016).

Der blev ligeledes kørt en speciel fortyndingsrække, hvor der blev inkluderet flere fortyndinger af standarder med DNA ekstrakter af vævsprøverne. Formålet var at identificere den laveste standard med en Ct værdi (”threshold cycle”), der gav et måleligt PCR produkt. Denne angiver det antal cykler, som qPCR skal køre for at give et signal i prøverne. En lav Ct angiver en høj koncentration af DNA, mens en høj Ct værdi angiver en lav koncentration af DNA i den pågældende prøve. Ct værdien for den laveste koncentration med måleligt signal benævnes også LOD = ”limit of detection”. Den defineres typisk som den standard qPCR med den laveste koncentration, hvor mindst én af de udførte tre biologiske replikater gav en positiv qPCR (Hunter et al. 2017, Andersen et al. 2016, Bustin et al. 2009). Konkret blev LOD estimeret til Ct = 40 ud fra bilag 1A-D. Heraf fremgår, at fortyndingsrækken giver den forventede lineære omvendte sammenhæng mellem koncentration og Ct, altså jo lavere koncentration, des højere Ct værdi (standardkurven har således en negativ hældning (bilag 1A) indtil omkring 40 Ct (jf. amplifikations-plots i bilag 1C, grønne og orange kurver). For de efterfølgende fortyndinger med den meget lave DNA koncentration, forsvinder denne sammenhæng. Figuren viser skæringspunktet lige efter Ct=40 og indeholder derfor blot tre punkter. I dette tilfælde bliver standardkurven nærmest vandret (bilag 1Bb), hvilket antyder at signalet er tilfældigt. De tilhørende amplifikations-plots (bilag 1D) ligger meget tæt på Ct= 40, som derfor blev benyttet til at vurdere, om en qPCR prøve var positiv sammen med de opnåede amplifikations-plots og smeltekurver. De sidste blev analyseret visuelt som en understøttelse af de opnåede Ct værdier for prøverne. For at en vandprøve eller sedimentprøve kunne betegnes som positiv, dvs. indeholde DNA fra flodperlemusling, har vi valgt en konservativ tilgang end i sammenlignelige undersøgelser (fx Sigsgaard et al. 2015), dvs. der skulle være mindst to positive triplikat-plot ud af de tre mulige med en Ct < 40 (Tabel 4.1). For at verificere at et positivt amplifikations-plot repræsenterede et PCR-bånd i den forventede størrelse, blev de positive prøver yderligere kørt på gel. Ud fra dette blev der udvalgt 14 positive prøver til sekvensering for at verificere, at der reelt var tale om flodperlemusling. Der blev medtaget i alt 72 ”negative kontroller” (hvor der naturligvis ikke bør forekomme DNA fra flodperlemusling). Kun for 3 af disse blev der observeret amplifikations-plots ”positivt” for flodperlemusling. Dette svarer til et fejl-påvisningsniveau (falsk positiv rate) på 4,2% for den enkelte prøve. Fejl raten må dog antages at være væsentligt lavere, da alle resultaterne fra kørslerne med ”falske positive” er ekskluderet fra analyserne og ikke medtaget ved vurderingen af påvisning.

På denne baggrund antager vi, at de opnåede positive triplikat-plot kan betragtes som påvisninger af flodperlemuslingen i de respektive vandløb.

4 Resultater

Resultaterne af vandprøver indsamlet i både 2015 og 2016 samt sedimentprøverne fra 2015 fremgår af tabel 4.1.

Med de valgte kriterier ($Ct < 40$, 2 ud af 3 tekniske replikater skulle være positive) for påvisning, viste analyserne, at flodperlemuslingen forekom i prøverne fra begge de svenske lokaliteter, hvor arten med sikkerhed vides at forekomme (jf. seneste data fra 2013-2014). Særlig tydelig var påvisningen i Silletorpsån, hvor arten vides at forekomme i meget stor tæthed. Desuden blev den med sikkerhed påvist ved begge lokaliteterne i Varde Å, hvorfra arten er kendt historisk (seneste fund fra 1994/2000) med forekomst i både vand- og sedimentprøver fra 2015 og i vandprøver fra 2016.

Derimod blev arten ikke påvist fra Suså, Geelså og Varde Å ved Sig. Der var imidlertid positiv påvisning i én vandprøve fra Odense Å fra 2015, hvor arten ikke forventedes at forekomme. Analyser af vandprøverne indsamlet i 2016 påviste ikke arten, hvorfor resultatet fra 2015 må betragtes som en falsk positiv. Arten blev dog ikke påvist i sedimentprøverne fra dette vandløb.

Resultatet opnået ved Sanger sekvensering af udvalgte positive qPCR prøver er vist i tabel 4.2 eksemplificeret ved en enkelt af disse prøver. Det skal bemærkes, at der var "udfald" for to nukleotider, men at dette "udfald" var generelt for samtlige sekvenserede prøver inklusive vævsprøven. Kromatogrammet indikerede dog, at nukleotiderne var til stede, men disse var blot ikke tydelige. Dette skyldes formodentlig den relativt korte DNA-streng, som kan være vanskelig at sekvensere. Uanset dette blev der opnået match på 96,2 % med flodperlemusling, og der blev ikke fundet match med andre mulige muslingearter i vandløbene.

Boks: Kan det tænkes at bunden i Varde Å stedvis ser sådan ud med tætsiddende flodperlemuslinger? (Foto: Paul Aspholm)



Tabel 4.1. Prøver (vand og sediment) vurderet som positive for forekomst af flodperlemusling ved 8 undersøgte vandløbslokaliteter i Sverige og Danmark ved anvendelse af kriteriet, at mindst 2 ud af 3 tekniske triplikater var positive med Ct<40 ("Positive/total" – påvisninger angivet med blå farve). Angivne Ct-værdier er gennemsnit af de tekniske triplikater. No Ct: Intet qPCR produkt. Forekomst: Seneste dokumenterede forekomst af arten.

Lokaliteter	Prøvekode	Ufiltreret vand 2015		Ufiltreret vand 2016		Sediment 2015		Forekomst
		Ct-	Positive	Ct-	Positive	Ct-	Positive	
		værdi	/total	værdi	/total	værdi	/total	
Varde Å, Vagtborg	VAG1-15, VAG1-16	36.7	2/3	36.38	2/3	38.49	3/3	Dokumenteret 2000
	VAG2-15, VAG2-16	37.43	1/3	39.9	1/3	39.36	2/3	
	VAG3-15,VAG3-16	No Ct	0/3	36.24	2/3	No Ct	0/3	
Varde Å,	VV1-15	35.76	2/3	37.5	2/3	39.37	2/3	Dokumenteret 1994
Varde Sommerland	VV2-15	34.79	3/3	37.52	2/3	41.04	1/3	
	VV3-15	32.98	2/3	39.09	1/3	No Ct	0/3	
Varde Å, Sig	VAS1-16			No Ct	0/3			Ikke dokumenteret hi- storisk eller nylig
	VAS2-16			42.37	0/3			
	VAS3-16			41.86	1/3			
Silletorpsån,	SS1	33.29	2/3			29.4	3/3	Dokumenteret 2014
Stockbro (Sverige)	SS2	33.72	3/3			34.08	3/3	Stor og selvreproduce- rende bestand
	SS3	32.84	3/3			33.62	3/3	
Bräkneån, Evaryds- kvarn (Sverige)	BE1	34.36	3/3			No Ct	0/3	Dokumenteret 2013 - meget lille bestand (<< 0,1 individ/m²)
	BE2	35.19	1/3			38.42	2/3	
	BE3	34.32	1/3			37.19	3/3	
Odense Å, Ellemølle (Fyn)	OEÅ1, OEE1-16	36.85	3/3	42.8	0/3	No Ct	0/3	Usandsynlig forekomst
	OEÅ2,OEE2-16	No Ct	0/3	42.88	0/3	38.98	1/3	
	OEÅ3,OEE3-16	No Ct	0/3	43.03	0/3	40.12	0/3	
Geels Å, Østergårds- vej (Fyn)	GE1, GE1-16	No Ct	0/3	43.34	0/3	No Ct	0/3	Usandsynlig forekomst
	GE2, GE2-16	No Ct	0/3	41.21	0/3	No Ct	0/3	
	GE3, GE3-16	No Ct	0/3	40.64	1/3	No Ct	0/3	
Suså, Vrangstrup (Sjælland)	SV1, SU1-16	39.92	1/3	43.37	0/3	No Ct	0/3	Usandsynlig forekomst
	SV2, SU2-16	36.61	1/3	No Ct	0/3	No Ct	0/3	
	SV3, SU3-16	No Ct	0/3	45.86	1/3	36.47	1/3	

Tabel 4.2. Sekvens opnået fra Sanger sekvensering af qPCR produktet fra Varde Å v. Varde Sommerland (VV1) vandprøve samt output match fra den globale gendatabase GenBank fra National Center for Biotechnology Information (NCBI). Manglende/utydelige nukleotider i sammenligning med den matchende sekvens fra NCBI på flodperlemusling er angivet ved N*.

Sekvens VV1-vand:

TTTGGGGGCTATTAACCTTATTNCGACTGTTGGTAACATACGTTCTCCGGGAG

NCBI output

Margaritifera margaritifera isolate VJMnh10 cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene, partial cds; mitochondrial; Sequence ID: KX056490.1 Length: 658 Number of Matches: 1

Related Information:

Range 1: 427 to 479 GenBank Graphics Next Match Previous Match

Score	Expected	Identities	Gaps	Strand
91.6 bits(49)	9e-16	51/53(96%)	0/53(0%)	Plus/Plus
<u>Query_1</u>	TTTGGGGGCTATTAACCTTATTNCGACTGTTGGTAACATACGTTCTCCGGGAG			53
<u>Sbjct_427</u>	TTTGGGGGCTATTAACCTTATTNCGACTGTTGGTAACATACGTTCTCCGGGAG			479

5 Diskussion

Det lykkedes at opfylde formålet med nærværende pilotprojekt, nemlig at påvise tilstedeværelse af flodperlemusling i Varde Å, endda på begge de undersøgte lokaliteter med "historisk" forekomst ved hhv. Varde Sommerland (umiddelbart opstrøms for Varde by) og opstrøms for Vagtborghus og både i 2015 og 2016. Arten forekommer således stadig i vandløbet. Det er til gengæld ikke muligt at afgøre, hvor præcist den forekommer og i hvor store tætheder. Reelt set kan det kun konkluderes med sikkerhed, at arten forekommer opstrøms for Vagtborghus. Det kan nemlig ikke udelukkes, at det påviste eDNA ved Varde Sommerland reelt stammer fra strækningen opstrøms Vagtborghus. Vi vurderer det imidlertid for sandsynligt, at der også findes individer tæt på Varde by, fordi påvisningen var mere tydelig her end opstrøms for Vagtborghus (se tabel 4.1). Til gengæld blev arten ikke påvist i Varde Å ved Sig, beliggende ca. 4 km opstrøms for den strækning, hvor den er kendt historisk.

Teoretisk set (og i praksis) skulle det være muligt at foretage en kvantificering af mængden af eDNA, for derigennem at kunne give et estimat af bestandens størrelse eller tætheden af denne (Lodge et al. 2012, Thomsen et al. 2012). Vi forsøgte imidlertid ikke ved vore analyser at kvantificere mængden af eDNA fra flodperlemusling i prøverne. Alligevel kan vores resultater perspektivere bestandenes størrelse. Således var påvisningen af flodperlemusling langt tydeligst i Silletorpsån (alle prøver positive), hvor bestanden vides at være meget tæt. Til sammenligning var påvisningen mindre tydelig (færre positive prøver), men af stort set samme omfang i Bräkneån og Varde Å. Ud fra den betragtning, at det udskilte eDNA fortyndes i den på det pågældende tidspunkt forekommende vandføring, som var mindst 40 gange større i Varde Å end Bräkneån, er det nærliggende at antage, at bestanden (tætheden) er større i Varde Å end i det sydsvenske vandløb (hvor bestanden er mindre end 0,1 individer/m²). At muslingen ikke kan være meget fåtallig i Varde Å understøttes af den tilfældige fangst af et stort individ ved spindefiskeri efter ørred/laks i oktober 2000 (Porsgaard 2015). Chancen for at fange én ud af meget få individer (for slet ikke at tale om det eneste) må således formodes at være forsvindende lille. Det skal i den forbindelse nævnes, at flodperlemuslinger tidligere har været opfisket systematisk i Varde Å ved anvendelse af belastede slæbetråde, trukket hen over vandløbsbunden (Porsgaard 2015).

Brugen af eDNA kan til gengæld ikke anvendes til at belyse størrelsesfordelingen af de tilstedeværende individer af en given art. Det er derfor nødvendigt at opfiske og opmåle individerne. Længden af det allerede nævnte lystfiskerfangne individ kunne (ud fra et foto, der viser muslingen sammen med et blink af kendt længde, og stillet til rådighed af J. Porsgaard) beregnes til 102 mm. Der har tydeligvis været tale om et ældre individ. Spørgsmålet er blot, hvor gammelt det kan tænkes at have været, og om det har været i stand til at formere sig. Svaret på dette spørgsmål kræver viden om miljøforholdene i Varde Å og viden om flodperlemuslingens vækst i sammenlignelige vandløb.

Flodperlemuslingen kan blive meget gammel – i gennemsnit omkring 100 år – og jævnlige op til 150 år eller meget ældre i ekstreme tilfælde. Den vokser langsomt, hvilket ikke er overraskende, fordi den kun forekommer i vandløb, hvor kalkindholdet er lavt, typisk under en total-alkalinitet på 0,50 meq/l – og endda helt ned til omkring 0,10 meq/L (Morales m.fl. 2004, Outeiro m.fl.

2007, Bernaldo de Siqueira m.fl. 2007, Henrikson & Alexanderson 2009). Total-alkaliniteten er ikke målt på de aktuelle strækninger af Varde Å, men målinger fra 21 stationer i Varde Å-systemet viser en medianværdi på 0,68 meq/L (variation 0,29-0,97) (Wiberg-Larsen et al. 2012). Koncentrationerne hvorunder den danske population lever er således formodentlig ret tæt på, hvad der er fundet i udlandet, omend i den øvre del af "skalaen". Svenske undersøgelser tyder dog på, at alkaliniteten er af relativt mindre betydning for væksten (Dunca et al. 2011). Til gengæld afhænger væksthastigheden i afgørende grad af vandtemperaturen (Dunca et al. 2011). Især øges den med vandtemperaturen i sommerperioden, hvor den største tilvækst finder sted.

Der er ingen viden om flodperlemuslingens væksthastighed i Varde Å, fx via optælling/måling af skallernes årsvækstringe. Antages det imidlertid, at væksten svarer til forholdene i svenske vandløb (med normal vækst for arten), kan der forsigtigt skønnes en alder på 50-60 år for det lystfiskerfangne individ (se Dunca et al. 2011, figur 6A). Det er derved forudsat, at temperaturforholdene i de svenske vandløb om sommeren ikke er væsensforskellige fra, hvad der forekommer i den grundvandfødte Varde Å. For sidstnævnte er middel- og median vandtemperaturen i månederne juni-august hhv. 16,2 og 16,3 °C (data beregnet for NOVANA stationen ved Vagtborghus, perioden 1995-2015, i alt 74 målinger). Til sammenligning fandt Österling (2010) middelværdier på ca. 16 °C for 19 stationer i Ljungans vandsystem (Midt-Sverige), der husede såvel reproducerende som ikke-reproducerende bestande af flodperlemuslingen. Det har ikke været muligt at finde andre tilgængelige målinger af vandtemperatur fra svenske vandløb. Med dette forbehold er det sandsynligt, at bestanden i Varde Å omfatter individer, som potentielt stadig er formeringsdygtige.

Anvendelse af eDNA vurderes at være et udmærket supplement til den hidtidige overvågning af arten via NOVANA. Metoden kan således give viden om artens faktiske udbredelse ved at undersøge stationer op igennem vandløbet. Det kan fastlægge artens "øvre" udbredelse, mens det kan være mere vanskeligt at angive den "nedre", fordi eDNA transporteres med strømmen og kan detekteres indenfor måske ca. 10 km fra en opstrøms beliggende bestand (Deiner & Altermatt 2014).

Det er desuden muligt, at bestandens relative størrelse kan følges, idet det dog næppe er muligt at omregne til individantal. Det vil i givet fald kræve en korrelation mellem muslingetætheder (og størrelser) og areal med forekomst af muslinger, og eDNA koncentrationer. Sammenhængen vil dog også afhænge af forhold som fx tidspunktet for målinger og vandføring.

For at kunne give en vurdering af flodperlemuslingens status i Varde Å er det således nødvendigt at fortsætte den hidtidige overvågning. Grundige undersøgelser ved brug af dykker er her afgørende for en fastlæggelse af bestandsstørrelse og alderssammensætning, om muligt suppleret med undersøgelser af forekomst af unge individer. Det vil også være ønskeligt at undersøge hvor hurtigt muslingerne vokser, dvs. opstille relationer mellem størrelse og alder. Dette kræver indsamling af få individer, og efterfølgende måling af antallet (og størrelsen) af årringe.

Anvendelse af eDNA teknik er ikke uproblematisk i forhold til kontaminering. Kontaminering kan principielt ske på flere forskellige niveauer: Under selve prøvetagningen i felten, under transporten til laboratoriet, ved selve håndteringen af prøverne under evt. filtrering, ved selve ekstraktionen af

eDNA, samt under selve qPCR analysen. Alle disse niveauer skal være gennemtænkte i forbindelse med metoden. Kontaminering ved prøvetagning og under transport er enkel at undgå, mens risikoen er størst under ekstraktion og analyser. Ud over kontaminering er det afgørende, at analyserne har mindst samme omfang, som ved nærværende undersøgelse.

Ved nærværende undersøgelse blev der analyseret på to forskellige typer af prøver. Det er vanskeligt aktuelt at pege på én prøvetype som den mest optimale, da der skete en fejlhåndtering af filterprøverne. Der har imidlertid i lignende undersøgelser for andre arter været gode erfaringer med analyser på 15 mL vandprøver (fx Sigsgaard et al. 2015), mens filter-prøver, hvor eDNA er "opkoncentreret", har været optimale i andre undersøgelser og derfor anbefalet (Laramie et al. 2015, Thomsen et al. 2016).

Vi anvendte et konservativt påvisningskriterium for, om flodperlemuslingen reelt var til stede i et givet vandløb samtidig med, at vi medtog et stort antal negative kontroller for at monitorere kontamineringsrisikoen. Dette er ikke gængs procedure ved andre rapporterede eDNA undersøgelser (se fx Andersen et al. 2016, Sigsgaard et al. 2015, Thomsen et al. 2012). Således skulle to af tre triplikater være positive for hver af de analyserede prøver for hver prøvetype, for at vi betragtede muslingen for påvist. Til sammenligning benyttede Sigsgaard et al. (2015) et langt lempeligere påvisningskriterium for dyndsmusling i 15 mL vandprøver. Således skulle blot én ud af fire eller otte analyserede replikater for eDNA være positiv, for at arten blev betragtet som påvist på en given lokalitet. Eftersom koncentrationen af eDNA fra flodperlemusling i prøverne typisk lå relativt tæt på detektionsgrænsen, ville der have været betydelig risiko for påvisning, hvis vi havde valgt et lignende påvisningskriterium.

Vurderingen af resultater fra qPCR analyser af eDNA har ikke hidtil været standardiseret, men subjektiv (se ovenfor). Meget få studier har som vores benyttet LOD ved evalueringen og samtidig inkluderet et stort antal negative kontrol prøver i analyserne (se Hunter et al. 2017). Vores LOD analyse er dog baseret på færre (tre) replikater af hver fortynding end hos Hunter et al. (2017), der anvendte 10 replikater. Hunter et al. (2017) giver anbefalinger til, hvordan fremtidige qPCR analyser, tolkningen af positive og negative eDNA prøver, samt vurderingen af om en art kan betragtes som påvist, kan standardiseres. Bl.a. anbefales, at der ved alle qPCR baserede analyser af eDNA bliver foretaget en LOD analyse, baseret dels på prøver med kendt indhold af DNA fra den pågældende (som i nærværende undersøgelse), dels på en fortyndingsrække, der spænder over den forventede koncentration af eDNA i en given prøve for hver analyse runde. Ligeledes anbefales, at der medtages flere negative kontroller for at estimere raten af falske positive (også som i nærværende undersøgelse). Hunter et al. (2017) har endelig udviklet modeller, der beskriver hvordan grænserne for LOD bør fastsættes og tilhørende 95% konfidensinterval estimeres. De resulterende Ct værdier fra qPCR analyserne bør dernæst justeres i forhold til 95% konfidensintervallerne. Dette er ikke foretaget i nærværende undersøgelse pga. for få tekniske replikater (3 i forhold til de anbefalede 10 replikater/fortynding) der i givet fald skulle benyttes i modelleringen af LOD (Hunter et al. 2017). Vi har dog vurderet eDNA resultaterne i forhold til LOD, hvilket også anbefales af Hunter et al. (2017).

Med den valgte tilgang og på baggrund af ovenstående overvejelser betragter vi de opnåede resultater som troværdige.

6 Tak og anerkendelse

Vi takker i særdeleshed William H. Eldridge, Adjunct scientist (PhD) ved Stoud Water Research Center, Avondale, USA, som venligst stillede sekvenserne for primers til vores disposition.

Desuden var Jan Porsgaard behjælpelig med oplysninger (inkl. fotos) i forbindelse med fundet af flodperlemuslingen i 2000.

7 Referencer

- Andersen, J.H., Kallenbach, E., Hesselsøe, M., Knudsen, S.W., Møller, P.R., Bekkevold, D., Klitgaard Hansen, B. & Thaulow, J. (2016) Steps toward nationwide monitoring of non-indigenous species in Danish marine waters under the Marine Strategy Framework Directive. Rapport L.NR. 7022-2016- DK3.
- Araujo, R. & Ramos, M.A. (2000) Action plan for *Margaritifera margaritifera* in Europe. Council of Europe. T-PVS (2000) 10: 1-38. Strasbourg.
- Arvidsson, B.L., Karlsson, J. & Österling, E.M (2012) Recruitment of the threatened mussel *Margaritifera margaritifera* in relation to mussel population size, mussel density and host density. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 22: 526-532.
- Bespalaya, Y.V., Bolotov, I.N. & Makhrov, A.A. (2007) State of the population of the European Pearl Mussel *Margaritifera margaritifera* (L.) (Mollusca, Margaritiferidae) at the Northeastern boundary of its range (Solze River, White Sea Basin). *Russian Journal of Ecology* 38: 204–211.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M. Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., Vandesompele, J. & Wittwer, C.T.1 (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 55, 1-12.
- Deiner, K. & Altermatt, F. (2014) Transport Distance of Invertebrate Environmental DNA in a Natural River. *PLOS ONE* (www.plosone.org), February 2014, Volume 9, Issue 2.
- 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* (www.plosone.org), August 2011, Volume 6, Issue 8.
- Dunca, E., Söderberg, H. & Norrgrann, O. (2011) Shell growth and age determination in the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera* in Sweden: natural versus limed streams. *Ferrantia* 41: 48-58.
- Dunca, E. & Mutvei, H. (2001) Comparison of microgrowth pattern in *Margaritifera margaritifera* shells from south and north Sweden. *American Malacological Bulletin* 16: 239-50.
- Henrikson, L. & Alexanderson, S. (2009) International Conference: “Aquatic Conservation with focus on the Freshwater Pearl Mussel *Margaritifera margaritifera*, Sundsvall, 12-14 August 2009, Conference Document, Länsstyrelsen Västernorrland & WWF Sweden.
- Hunter, M.E., Dorazio, R.M., Butterfield, J.S.S., Meigs-Friend, G., Nico, L.G. & and Ferrente, J.S. (2017) Detection limits of quantitative and digital PCR assays and their influence in presence-absence surveys of environmental DNA. *Molecular Ecology Resources* 17, 221–229.
- IUCN (2016) The IUCN Red List of Threatened Species. *Margaritifera margaritifera* (Freshwater Pearl Mussel). <http://www.iucnredlist.org/details/12799/0>

- 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: 150-157.
- Kann, O. (2006) Varde Å, Ribe Amt, gensnoning og udlægning af gydebanker. Pp. 67-70, I: Madsen, S. & Debois, P. (red.) Vandløbsrestaurering i Danmark – 24 eksempler. Storstrøms Amt, Teknik- og Miljøforvaltningen, 97 pp.
- Larsen, F.G. & Wiberg-Larsen P. (2006) Udbredelse og hyppighed af Tykskallet Malermusling (*Unio crassus* Philipson, 1788) i Odense Å-systemet. *Flora og Fauna* 112: 89-98.
- Laramie, L.B., Pilliod, D.S., Goldberg, C.S. & Strickler, K.M. (2015) Collection of Environmental Data—Environmental DNA Sampling Protocol—Filtering Water to Capture DNA from Aquatic Organisms. Chapter 13 of Section A, Biological Science Book 2. <https://pubs.usgs.gov/tm/02/a13/tm2a13.pdf>.
- Lodge, D.M., Turner, C.R., Jerde, C.L., Barnes, M.A., Chadderton, L., Egan, S.P., Feder, J.L., Mahon, A.R. & Pfrender, M.E. (2012) Conservation in a cup of water: estimating biodiversity and population abundance from environmental DNA. *Molecular Ecology* 21, 2555-2558 (News and views).
- Mandahl-Barth, G. (1949) Bløddyr. III Ferskvandsbløddyr. *Danmarks Fauna* 54, 249 pp.
- Mollusc Specialist Group (1996) *Margaritifera margaritifera*. The IUCN Red List of Threatened Species 1996: e.T12799A3382532.
- Morales, J.J., Negro, A.I., Lizana, M., Nez, A.M. & Palacios, J. (2004) Preliminary study of the endangered populations of pearl mussel *Margaritifera margaritifera* (L.) in the River Tera (North-west Spain): habitat analysis and management considerations. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 14: 587-596.
- Outeiro, A., Ondina, P., Fernandez, C., Amaro, R. & San Miguel, E. (2007) Population density and age structure of the freshwater pearl mussel, *Margaritifera margaritifera*, in two Iberian rivers. *Freshwater Biology* 53: 485-496.
- Pilliod, D.S., Goldberg, C.S., Arkle, R.S. & Waits, L.P. (2013) Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 70: 1123-1130.
- Porsgaard, J. (2015) Flodperlemuslingen i Varde Å. Medieudvalget i VSF. <http://varde-sportsfiskerforening.dk/flodperlemusling-varde-aa/>
- 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.
- Thomsen, P.F., Kielgast, J.O.S., Iversen, L.L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M.T.P., Orlando, L. & Willerslev, E. (2012) Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology* 21: 2565–2573.

Thomsen, P.F., Rask Møller, P, Sigsgaard, E.E., Knudsen, S.W., Ankjær Jørgensen, O. & Willerslev, E. (2016) Environmental DNA from Seawater Samples Correlate with Trawl Catches of Subarctic, Deepwater Fishes. *PLOS ONE* DOI:10.1371/journal.pone.0165252

Tolkamp, H.H. (1980) Organism-substrate relationships in lowland streams. Agric. Res. Rep. (Versl. Landbouwk. Onderz.), Wageningen. 211 pp.

Wiberg-Larsen, P. (2012) Artsovervågning af tykskallet malermusling (*Unio crassus*). Teknisk anvisning V13 (version 1). DCE - Nationalt Center for Energi og Miljø, AU, 21 pp.

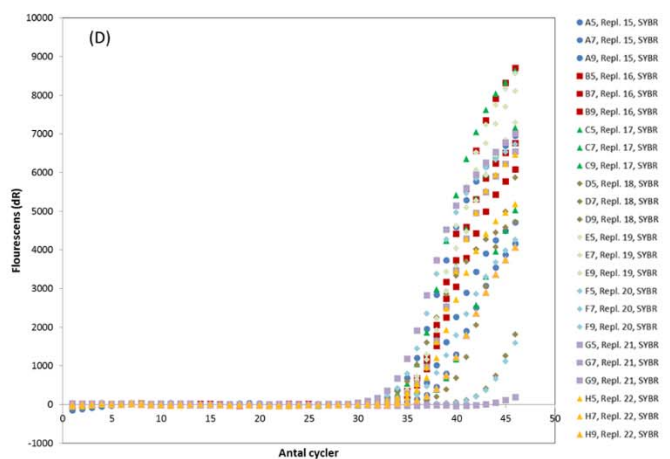
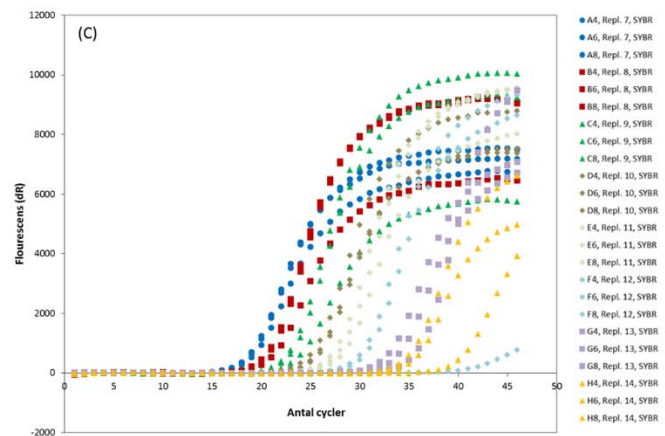
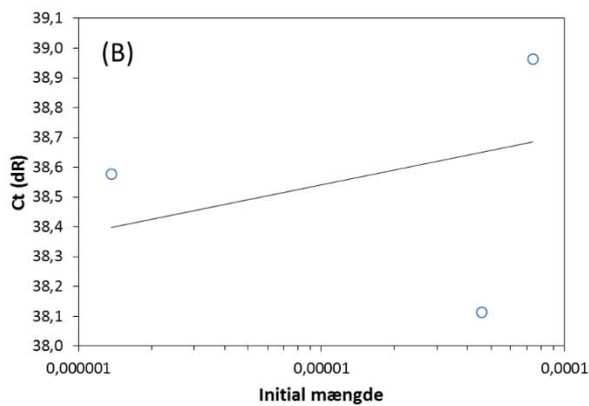
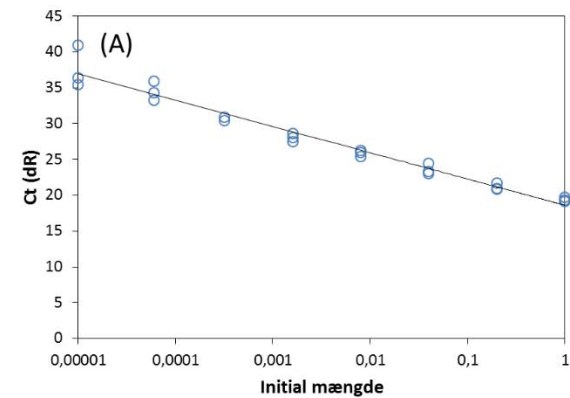
Wiberg-Larsen, P. (2013) Artsovervågning af flodperlemusling (*Margaritifera margaritifera*). Teknisk anvisning V12 (version 1). DCE - Nationalt Center for Miljø og Energi, AU, 20 pp.

Wiberg-Larsen, P., Larsen, S.E., Bøgestrand, J. & Kjeldgaard, A. (2012) Fokus: Kemisk karakteristik af danske vandløb – resultater fra det vandløbsøkologiske program. Pp. 53-69, I: Wiberg-Larsen, P., Windolf, J., Bøgestrand, J., Larsen, S.E., Thodsen, H., Ovesen, N.B., Kronvang, B. & Kjeldgaard, A. 2012: Vandløb 2011 - NOVANA. *Videnskabelig rapport fra DCE – Nationalt Center for Miljø og Energi* nr. 32, 70 pp. Aarhus Universitet. (<http://www.dmu.dk/Pub/SR32.pdf>).

Österling, E.M. (2010) Biotiska och abiotiska faktorerers betydelse för flodpärlmusslans fortplantning och överlevnad i Ljungans biflöden. Forskningsrapport, Karlstad University Studies 2010, 38 pp.

Bilag 1

Standardkurve og amplifikations plot for fortyndingsrækken benyttet til at bestemme LOD: (A) Standardkurven for fortyndingsrækken gående fra en 5x fortynding af den oprindelige DNA opløsning til en 14x5 (390625x fortynding), (B) fortyndingsrækken fortsat fra en 15x5 til 22x5 fortynding, (C) amplifikations-plots for fortyndingsrækken under A, (D) amplifikations-plots for fortyndingsrækken under B.



[Tom side]

UNDERSØGELSE AF FOREKOMSTEN AF FLODPERLE-
MUSLING (*MARGARITIFERA MARGARITIFERA*)
I VARDE Å VED BRUG AF eDNA

Rapporten dokumenterer ved analyse af "environmental" DNA i vand- og sedimentprøver, at flodperlemuslingen stadig forekommer på to delstrækninger af Varde Å. Metoden har et stort potentiale for påvisning af forekomster af truede arter og hvor hyppige disse er. Men den giver ikke mulighed for at beskrive arternes størrelsesfordeling og rekruttering i form af formering.

ISBN: 978-87-7156-258-3
ISSN: 2244-9981