

eDNA– Fiskinventering vid Spjutmo kraftverk.



STOCKHOLM, DECEMBER 2017

Beställare:

Rapporten är framtagen av AquaBiota Solutions på uppdrag av Fortum Sverige, AB.

Författare:

Micaela Hellström (micaela.hellstrom@aquabiota.se)

Johan Spens (johan.spens@aquabiota.se)

Bilder:

Omslagsbild: Micaela Hellström. Bilder på målarter är tagna från Wikimedia Commons med tillstånd för spridning även i kommersiellt syfte.

Kontaktinformation:

AquaBiota Solutions AB

Adress: Löjtnantsgatan 25, 115 50 Stockholm

Tel: +46 8 522 302 40

www.aquabiota.se

Kvalitetsgranskad av:

Martin Isaeus (martin.isaeus@aquabiota.se), Johan Näslund

(johan.naslund@aquabiota.se)

Distribution:

Fri

Internetversion:

Nedladdningsbar hos www.aquabiota.se

Citera som:

Hellström, M & Spens, J. 2017. eDNA – Fiskförekomst vid Spjutmo kraftverk.
AquaBiota Rapport 2017:12. 29 sid.

Ämnesord: eDNA, fiskförekomst, metabarkodning, Siljan, vattendrag,
Österdalälven

AquaBiota Report 2017:10

Projektnummer:

ISBN: 978-91-85975-69-3

ISSN: 1654-7225

© AquaBiota Solutions 2017



AquaBiota
SOLUTIONS

eDNA – Fiskinventering vid Spjutmo Kraftverk

INNEHÅLL

Innehåll.....	5
Sammanfattning.....	5
1. Inledning	6
2. Material och Metoder	8
2.1. Fältarbete.....	8
2.2. Laboratoriearbete.....	9
2.3. Analys, jämförelser och artsammansättningsmodell	12
3. Resultat och diskussion	13
3.1. Sekvenseringsresultat.....	13
3.2. Fiskartförekomst – sammanlagd översikt	13
3.3. Fiskarternas förekomst – rumslig översikt	14
3.4. Fiskartsförekomst – eDNA vs. befintliga elfisken och intervjuer	14
3.5. Fiskarter.....	17
3.6. Lokala fisksamhällen	20
4. Slutsatser	23
5. Rekommendationer och fortsatta undersökningar.....	25
Tack	24
Referenser	28
Bilaga 1. Metastreckkodning genom NGS	28
Bilaga 2. Fiskarter relativ biomassa per lokal	29

SAMMANFATTNING

Akvatiskt miljö-DNA eller eDNA (från engelskans environmental DNA) har under det senaste decenniet visat sig vara ett lovande verktyg för inventering av vattenorganismer för miljöövervakning. Undersökningsmetoden baserar sig på det faktum att alla levande organismer, både växter och djur, kontinuerligt avger genetiska avtryck i miljön i form av slem, avföring, svett och döda celler. Dessa genetiska spår kallas eDNA. Akvatiskt eDNA är spåren som organismer avger i vattenmiljön. Detta genetiska material kan utvinnas ur en halv liter vatten och genom molekylära analyser ange vilka arter som befinner sig inom ett område utan att man varken ser eller fångar organismen. Eftersom eDNA i vattenmassan är kortlivat ger analyserna en bild av artförekomst i nutid.

AquaBiota har på uppdrag av Fortum Sverige, AB utfört en pilotundersökning av fisksammansättningen ovanför och nedanför Spjutmo kraftverk med hjälp av akvatiskt eDNA genom metabarkodning (flerartstudie). Arbetet är en del av en utvärdering för att bedöma precision av eDNA för att fastställa fisksamhällen i sjön samt bedömning av relativ biomassa som underlag för åtgärder i sjön. Resultaten från eDNA undersökningen jämfördes med befintliga elfisken, rapporter och en stor intervjubaserad riksundersökning om fiskförekomst vid Spjutmomagasinet. Vidare intervjuades fiskexperter vid länsstyrelsen i Dalarna och sportfiskare i området om fiskfaunan i Spjutmo.

Fältarbetet utfördes i juni 2017 och de genetiska proverna analyserades under året. På de 13 utvalda provpunkterna detekterades sammanlagt 20 fiskarter av vilka 19 i Spjutmomagasinet och 20 arter då lokalerna nedströms kraftverket räknas med, jämfört med 10 arter baserat på elfisken. Detta betyder att 90 % fler arter detekterades i sjön genom eDNA jämfört med sammanslagna historiska elfisken över 28 år och 100% då vattendraget nedströms inkluderas. Vidare rapporterade riksinventeringen från 1996, baserad på intervjuer, 10 verifierade och 2 troligtvis saknade (ål och ruda) arter i Spjutmosjön där eDNA detekterade 19 arter. Arter så som id nedanför dammen, riklig förekomst av stensimpa både i vattendragen och i sjön samt, braxen, småspigg, sarv, löja och stäm har undgått lokalbefolkningen och myndigheternas uppfattning om fiskfaunan i Spjutmosjön. Vidare framkom att stensimpan är mycket vanlig i området. Räknat på antalet arter har Spjutmosjön behållit nästan hela sin fiskfauna på 19+ arter (sannolikt med undantag av id), trots det absoluta fiskvandringshindret Spjutmo kraftverk som isolerat sjön från nedströms liggande rikare fiskfauna i Österdalälven och Siljan. Lax och ål har dock stoppats att vandra upp hit långt nedströms Siljan närmare havet, oberoende av Spjutmo kraftverk. Denna undersökning är den första karteringen av Spjutmosjöns fiskbestånd som kommer i närheten av dess sanna biologiska mångfald i form av fiskarter. eDNA-analys har en hög potential att användas som effektivt icke-destruktivt verktyg för inventering av fiskartsammansättning över stora geografiska områden över kortast möjliga tidsintervall. Vidare är metoden den känsligaste att kunna upptäcka arter som är nyetablerade, sällsynta eller som undgår traditionella provfisken. Eftersom informationen om fiskartsammansättning vid kraftverk är av stor betydelse som underlag för åtgärdsbeslut föreslår vi eDNA som en lämplig metod för inventeringar.

1. INLEDNING

EU's vattendirektiv (EUVD) för att åstadkomma god eller hög status i Europas och Sveriges vatten baserar sig i första hand på ekologiska (biologiska), men även på fysiska och kemiska kvalitetsfaktorer. För åtgärdsprogram finns en femskalig statusklassificering med klasserna hög, god, måttlig, otillfredsställande och dålig status (ec.europa.eu 2016). EUVD's 'ekologisk status'-bedömningar kan sägas vara nära kopplad till biologisk mångfald. De ekologiska bedömningsgrunderna för status i en sjö eller ett vattendrag inom vattendirektivet baserar sig nu på förekomst av vattenlevande kärlväxter, påväxtalger, bottenlevande ryggradslösa djur, växtplankton och fisk. Enligt EUVD är målet att alla sjöar och vattendrag skall nå god eller hög status samt att vattendrag med lägre status bör åtgärdas för att uppnå önskad status (ec.europa.eu 2016). Arter som försvinner eller utrotas innebär normalt irreversibla konsekvenser. Hög biologisk mångfald för ett givet geografisk område ger stabilitet till ekosystemet, och utrotning av arter leder generellt till så kallade kaskadeffekter för ekosystemet (Sanders m.fl. 2018). Ett viktigt första steg i statusklassificering och beslut för åtgärdsprogram är att öka dataunderlaget och sträva till att verifiera faktiska förekomster av arter i akvatiska miljöer, vilket har visat sig problematiskt. Detta illustreras med ett citat från Länsstyrelsen i Dalarnas hemsida: "I vårt sjörika land är kunskapen om enskilda vattens djur- och växtplankton, bottendjur, fisk och strandvegetation begränsad. Våra bedömningar är därför ofta baserade på kemiska och fysikaliska bedömningar". EUVD strävar tvärtom till att få medlemsstaterna att sträva mot att basera status på biologiska normer.

Klassificering av status baserad på fisk är speciellt relevant för vattenkraft eftersom kraftverken ger förnyelsebar koldioxidfri elproduktion. Samtidigt utgör kraftverken vandringshinder och andra svårigheter för fiskarter. Baserat på information om fiskartsförekomst samt förändringar av fiskfaunans sammansättning vid kraftverk fattas beslut om åtgärdsprogram.

Undersökningar av biologisk mångfald av fisk i akvatiska ekosystem har historiskt i huvudsak skett genom traditionella fysiska, akustiska och visuella metoder. Exempel på dessa är nätfiske, elfiske, telemetri, undervattensvideo, snorkling, fällor och undervattenssonar. Dessa metoder har begränsningar eftersom de är selektiva och ingen enskild metod beskriver hela mångfalden av fisk. Vidare är vissa konventionella metoder destruktiva eller letala eftersom de kräver att utföraren av studierna rör eller skadar sitt studieobjekt vilket är ett potentiellt problem i bevarandekologiska undersökningar (Wheeler m.fl. 2010). Elfisken har visats ge betydande skelettskador hos fisk (50% ryggradsskador; Sharber och Carotes 1988). En annan begränsning av konventionella metoder är att sällsynta, invasiva och svår fångade arter inte upptäcks, och deras förekomst underrapporteras vilket ger stora felmarginaler i insamlade data (Price m.fl. 2012; Trigal & Degerman 2015). Elfisken visar en felmarginal i statusklassificering mellan god och dålig status på EUs femgradiga skala med 56% i grundmodellen i relation till konnektivitet, d.v.s. fiskars framkomlighet mellan olika vattensystem (Beier m.fl. 2007). Nätfisken visar en felmarginal i grundmodell och tillämpning på 37% (Holmgren m.fl. 2007).

Undersökningsmetoden miljö-DNA eller eDNA (environmental DNA) baserar sig på det faktum att alla levande organismer, -både växter och djur, -kontinuerligt avger genetiska fotavtryck i miljön i form av slem, avföring, respiration, svett och döda celler (Pedersen m.fl. 2015). Definitionen på eDNA är 'det DNA som kan studeras från dessa spår i miljön utan att målorganismen är närvarande i provet' (Taberlet m.fl. 2012). Akvatiskt eDNA är genetiska spår som organismer avger till vattenmiljön. Detta genetiska material kan utvinnas ur en halv till några liter vatten och genom molekylära analyser ange vilka arter som befinner sig inom ett område utan att man varken ser eller fångar organismen. Eftersom eDNA i vattenmassan är kortlivat (ca. 1-2 veckor) ger analyserna en bild av artförekomst i nutid. DNA-signalerna försvinner snabbt från vattenpelaren och sjunker ner till botten och bryts ner till korta DNA-bitar som bevaras i sedimenten (Pedersen m.fl. 2015). Under de senaste 10 åren har metoden utvecklats (Spens m.fl. 2017) och visat sig ha en stor potential som verktyg för inventering av vattenorganismer för ekologiska undersökningar, bevarandekologi, uppföljning av invasiva arter och miljöövervakning (Bohmann m.fl. 201, Leese m.fl. 2016, Deiner m.fl. 2017).

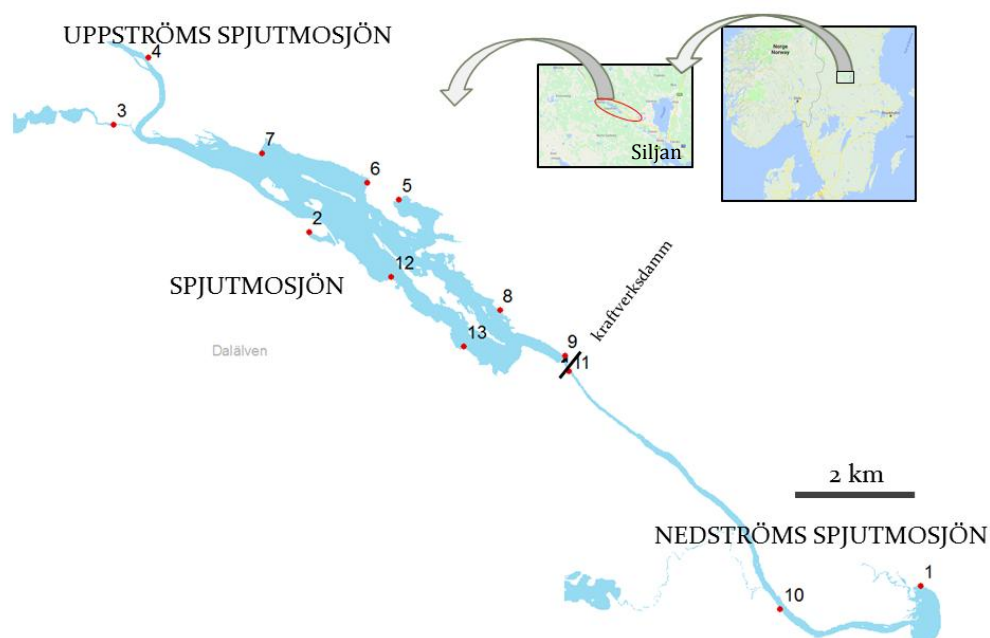
AquaBiota har på uppdrag av Fortum Sverige AB utfört en undersökning av fisksammansättningen i anslutning till Spjutmo kraftverksmagasin. Detta är en flerartstudie som utförs genom så kallad metabarkodning för att inventera hela fisksamhällen inklusive enskilda arter. Arbetet är även en utvärdering för att bedöma precisionen i eDNA-metoden för att fastställa sammansättningen av fiskarter ovanför och nedanför Spjutmomagasinet samt i Spjutmosjön. Arternas förekomst verifierades med hjälp av sammanslagna data från existerande rapporter, publicerade intervjuer, och el-provfisken samt intervjuer med fiskexperter vid länsstyrelsen samt lokala sportfiskare i Dalarna.

2. MATERIAL OCH METODER

2.1. Fältarbete



Lokal 9. Spjutmosjön ovanför kraftverket.



Figur 1. Karta över provlokalerna i Spjutmosjön, nordväst om Sjön Siljan. Kraftverksdammen anges mellan punkt 9 och 11.

Fältarbetet utfördes i Älvdalen under 18-20 juni 2017. Provtagningspunkter anges i figur 1 och i tabell 1. Koordinaterna anges som decimalgrader i WGS84. Lufttemperaturen mätte 18-20 °C.

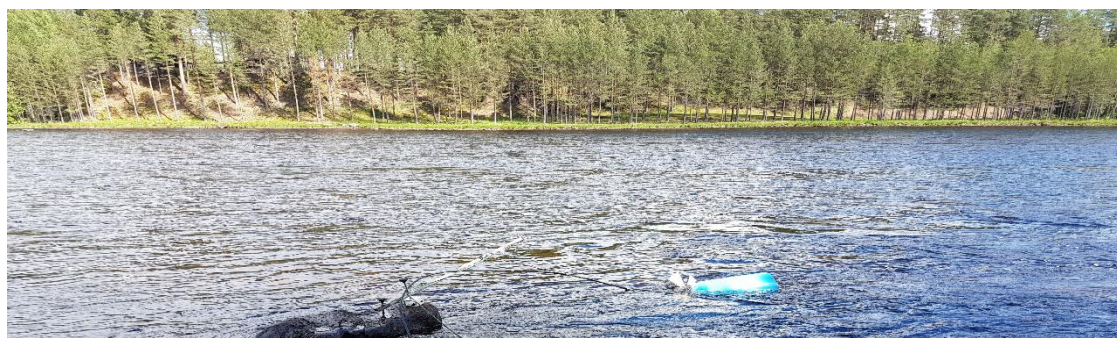
Innan provtagningen genomfördes i fält, steriliserades all provtagningsutrustning. Vid varje lokal samlades 3 liter vatten in från den littorala zonen (grunda strandzonen) av tränade fältarbetare som klarade att upprätthålla sterila insamlingsförhållanden samt filtrering och fixering. Negativa fältkontroller utgjordes av sterilt vatten som kördes genom filtren på plats för att utesluta kontaminering av DNA mellan prover eller från provtagare. Insamling och fixering följde Spens m.fl. (2017).

Tabell 1. Provpunkter. Position, tidpunkt vid provtagningen, vattentemperatur, antal filter (replikat) per provpunkt och total volym filtrerat vatten. Lokaler 1–4 samt 10 och 11 anger rinnande vatten där VD = vattendrag..

Provpunkt namn	Läge	Latitud (N)	Longitud (Ö)	Tid	H ₂ O °C
2. Gopshusvik	VD Ovan Spjutmosjön	61,10326	14,23665	18:00	15
3. Oxbergsån	VD Ovan Spjutmosjön	61,11986	14,17069	21:10	15
4. Dalälven ovan Spjutmo	VD Ovan Spjutmosjön	61,13088	14,18162	21:45	14
5. Spjutmo badplatsbrygga	Spjutmosjön	61,10893	14,26633	22:08	17
6. Garberg	Spjutmosjön	61,11148	14,25565	18:47	16,5
7. Blybergsåudde	Spjutmosjön	61,11586	14,22039	19:58	15,5
8. Sydöststrand	Spjutmosjön	61,09148	14,30079	20:15	16
9. Ovan Spjutmo damm	Spjutmosjön	61,08432	14,32273	13:29	17
12. Jonsängsudden	Spjutmosjön	61,09633	14,26424	17:00	16,5
13. Sydvästpunkt	Spjutmosjön	61,08541	14,28899	18:27	16
11. Nedan Spjutmodamm	VD Nedan Spjutmosjön	61,08181	14,32422	16.30	14,5
10. Gutdalen	VD Nedan Spjutmosjön	61,04422	14,39630	14:15	16
1. Salunäv naturreservat	VD Nedan Spjutmosjön	61,04840	14,44288	14:33	15

2.2. Laboratoriearbete

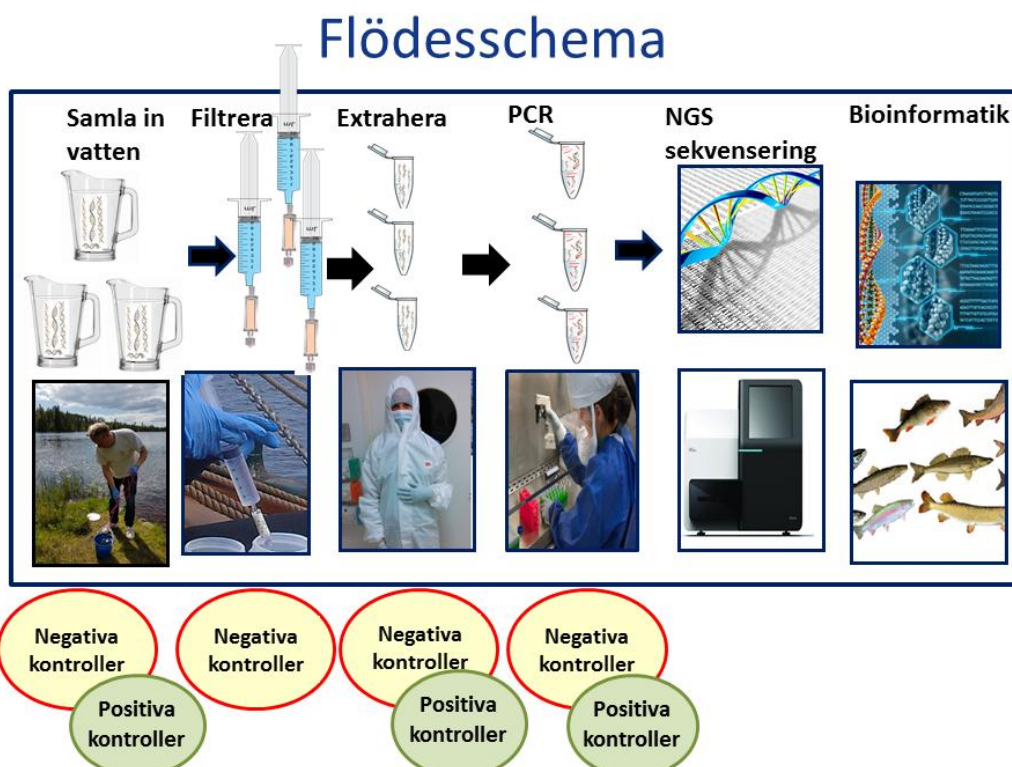
2.2.1. Extraktion, PCR och sekvensering



Lokal 10. Gutdalen. Vattendrag nedanför Spjutmosjön.

Flödesschemat i figur 2 beskriver eDNA-processen från insamling till analys.

eDNA utvanns (extraherades) enligt protokoll i Spens m.fl. (2017) i sterila laboratorier speciellt byggda för analyser av akvatiskt eDNA. Detta kunde ske genom ett exklusivt samarbete med MoRe Research i Örnsköldsvik. Extraktionerna utfördes av molekylärbiologiska tekniker som är tränade i att extrahera eDNA. Proverna analyserades för förekomst av fisk, där en analys anger alla arter istället för en art i gången med hjälp av metabarkodning och Next Generation Sequencing (NGS). Två markörer användes. Principerna för metabarkodning förklaras mer utförligt i Bilaga 1. Vidare användes DNA från den tropiska sötvattenfisken *Rhamphochromis esox* som positiv kontroll.



Figur 2. Flödesschema. En översikt av eDNA provtagning från insamling till analys. Notera att negativa kontroller tas vid varje steg för att kontrollera för kontaminering.

2.2.2. Bioinformatik och verifiering



Lokal 5. Spjutmosjön. Spjutmo badplatsbrygga

Varje enskild art har en unik streckkod (Se bilaga 1) eller sekvens. Varje unik sekvens fick en molekylär identitet. De olika sekvenserna kördes mot en internationell databas (tillgänglig för allmänheten, som grundar sig på GenBank och upprätthålls av National Center for Biotechnology Information, NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) där sekvenser på mer än 370 000 kända arter finns tillgängliga (Benson m.fl. 2017, bilaga 1) med 0,6 miljarder sekvenser och 2,6 biljoner baspar enligt NCBI:s hemsida. De olika sekvenserna matchades mot databasen och fick på så sätt en fiskidentitet. Tack vare nya framsteg inom metabarkodning för fisk är det möjligt att få träffar på artnivå istället för enbart familje- eller genus- nivå.

Antalet läsningar per art gav en relativ uppskattning av hur mycket eller litet arten förekom i ett prov.

2.3. Analys, jämförelser och artsammansättningsmodell

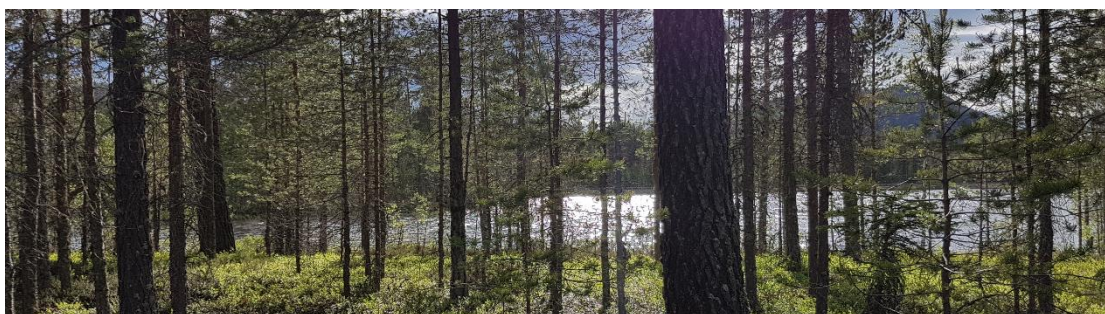


Lokal 7. Spjutmosjön. Zorn Gopshus.

Resultaten och artlistorna från eDNA kördes mot elfiskedatabasen SERS. En beräkning av möjliga artförekomster baserades även på en spridningsmodell som beskrivs av Spens (2008). Antalet lokaler som varje art förekom i angavs enligt följande: 1/10 lokaler för siklöja samt 13/13 lokaler för stensimpa. För lokalerna jämfördes artförekomster som anges av sammanslagna historiska elfiskedata (sammanlagt 53 utfisken över 28 år) med förekomster i eDNA-data. Analyserna delades upp i 3 delar; Vattendrag ovanför Spjutmosjön, Spjutmosjön, samt vattendrag nedanför Spjutmo sjön. Vidare jämfördes resultaten från eDNA med riksfiskintervju-data om fiskförekomst (Appelberg m.fl. 2004) och 16 sammanslagna elfisken (16 utfisken) med en eDNA lokal (punkt 7).

Data för de lokala fisksamhällena angående lithofila arter (fiskarter som kräver rena bottenar och strömmande vatten), känsliga, tåliga och neutrala arter i förhållande till eutrofa förhållanden registrerades för varje provpunkt.

Vidare indikeras näringsnivån med kvoten av relativ biomassa (eDNA läsningar) mellan abborrfiskar och karpfiskar (*Percidae/Cyprinidae*). Låga värden tyder på högre näringsgrad. Notera även att abborre ofta är överrepresenterad i nätfisken vilket betyder att kvoten ger ett lägre värde då eDNA används.



Lokal 13. Spjutmosjön. Sydvästpunkt.

3. RESULTAT OCH DISKUSSION

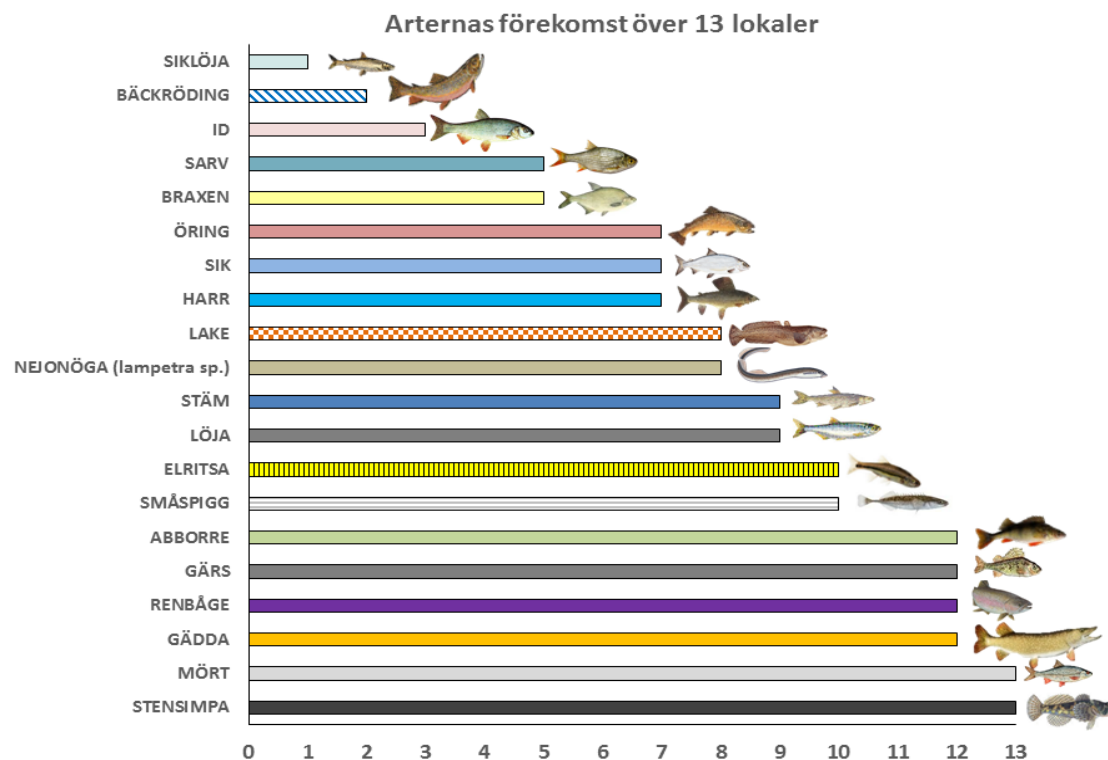
3.1. Sekvenseringsresultat

Av sekvenserna för metabarkodning brukar en bråkdel (ofta mellan 1 % och 40 %) resultera i sekvenser för målarter och en mycket stor del av läsningarna kan inte läsas alls. Vidare har problemet varit att DNA från människa täcker 20-60 % av läsningarna. I denna studie matchade för båda markörerna, ca 75 % av läsningarna målarterna fiskar, fåglar, groddjur och däggdjur. Andelen av de totala läsningarna utgjorde för människa 15 %, bakterier 3 %, medan endast 7 % var utan match. Den höga frekvensen av målarternas sekvenser gör att resultaten är mer tillförlitliga för vidare ekologiska analyser och slutsatser.

De negativa fältkontrollerna visade ett lågt antal läsningar för människa och bakterier. De negativa laboratoriekontrollerna var helt negativa. Den positiva kontrollen kom upp som positiv.

3.2. Arternas förekomst – sammanlagd översikt

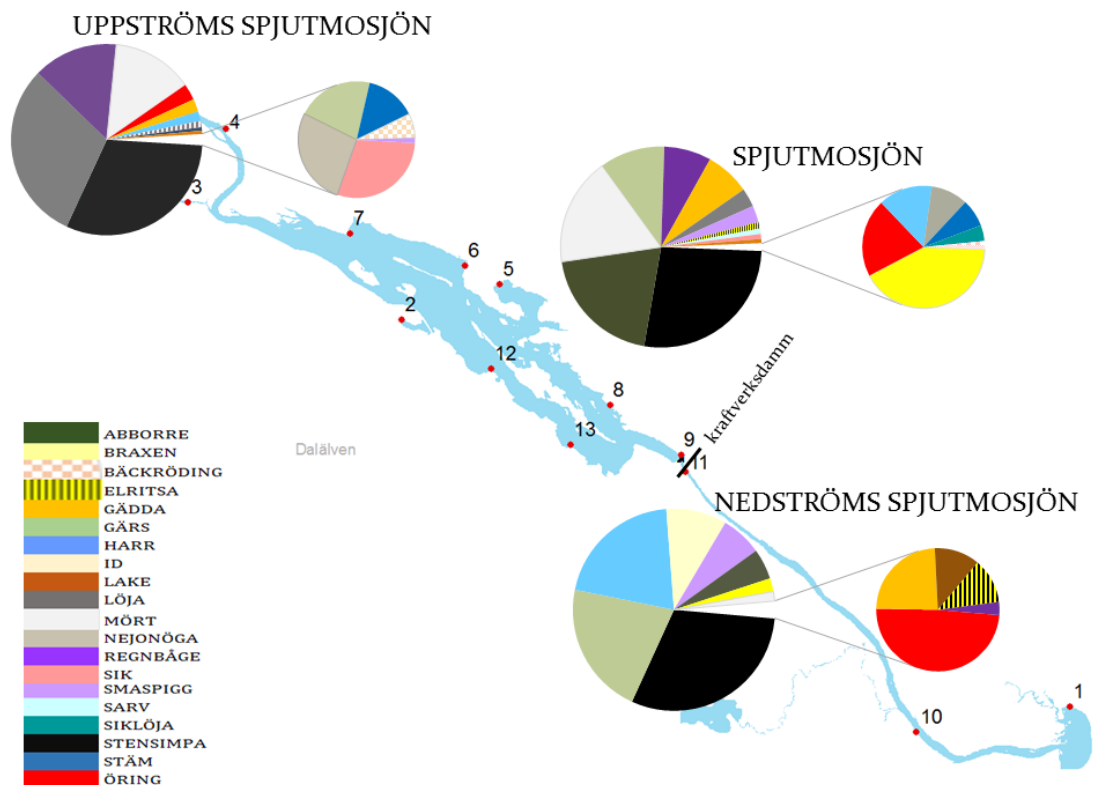
Sammanlagt 20 fiskarter påträffades i eDNA analyserna. Figur 4 anger arternas förekomst över lokalerna. Siklöja påträffades i en lokal medan mört och stensimpa påträffades i alla lokaler.



Figur 4. Antal lokaler där de enskilda fiskarterna påträffades (siklöja förekom i en lokal, mört och stensimpa förekom i alla lokaler).

3.3. Fiskarternas förekomst – rumslig översikt

Fiskarternas förekomst och dominansförhållanden i Spjutmosjön samt ovan och nedanför sjön anges i figur 6 samt bilaga 2. Antalet fiskarter per lokal varierade mellan 7 och 18 med en median på 13 arter.



Figur 6. Arternas fördelning uppströms Spjutmosjön (2,3,4) i sjön (5,6,7,8,9,12,13) samt nedanför kraftverket (1,10,11). Cirkarna anger arternas dominans genom antalet lästa sekvenser per art. Infällda cirklar visar fördelningen bland arter med lägre antal lästa sekvenser. De små pajdiagrammen anger arter som är fåtaliga och svåra att urskilja i ett enkelt pajdiagram

3.4. Jämförelse mellan eDNA och befintliga elfisken och intervjustudier

Sammanlagt 20 fiskarter påträffades i eDNA analyserna av vilka 19 är uppströms Spjutmo kraftverk. Elfiskedata sammanslaget över 28 år (sammanlagt 28 elfisken med 53 utfisken) rapporterade 10 arter i vattendragen ovanför, nedanför i anslutning till Spjutmosjön. Alla dessa elfisken (inom ett avstånd av 0,4-4 km från eDNA provpunkterna) sammanslagna inom varje lokal jämfördes med den närmaste eDNA-provpunkten, tabell 2. Vidare jämfördes både en (punkt 7) och alla 7 eDNA provpunkter i Spjutmosjön med Riksinventeringen för fisk baserad på intervjuer som genomfördes 1996 (Appelberg m.fl. 2004). Antal detekterade fiskarter på lokalerna genom en eDNA session med två markörer, sammanslaget historiskt elfiskedata samt intervjuundersökning visas i tabell 2. Venn -diagrammet i figur 7 visar arter som registrerats genom de olika metoderna.

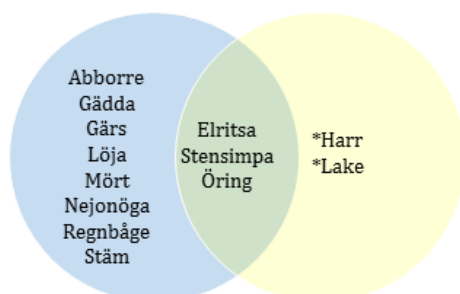
Tabell 2. Antal fiskarter per lokal som upptäcktes med eDNA, historiska elfiskedata från de olika vattendragen. Vidare jämfördes Spjutmosjön med Riksfiskinventeringen från 1996 (Appelberg m.fl. 2004). Antalet arter detekterade genom 1) intervjuer = #Int, 2) eDNA = #eDNA och 3) elfisken = #el. För historiska elfiskedata anges antal utfisken. Lokal anger eDNA provlokal.

Lokal	#eDNA	# el	# Int	HISTORISKA DATA (el-utfisken eller intervjustudie)
1	13	6		4 utfisken 2005, 2007 (1,3 km uppströms)
2	10	6		10 utfisken 1989,1996,2003,2005 (0,5-1km uppströms)
3	7	4		3 utfisken 1989, 1996 (4 km uppströms)
7	18	8		16 utfisken 1994, 1996, 2001 (0,4-3 km uppströms)
10	11	7		20 utfisken 1987,1989,1996,2001,2012,2013, 2014, 2015 (1-3km uppströms)
Sjön	19		10 (12)	Riksinventering 1996. Intervjuer.

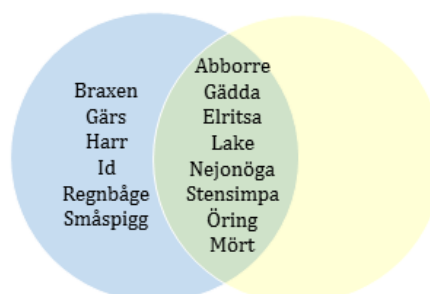
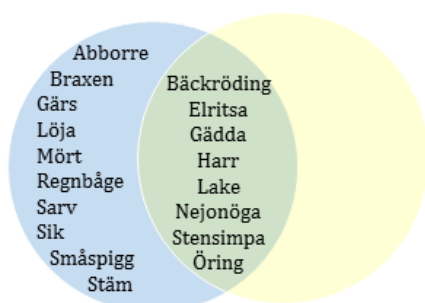
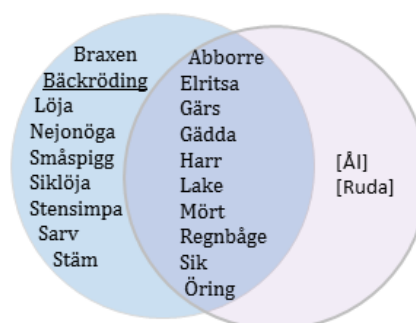
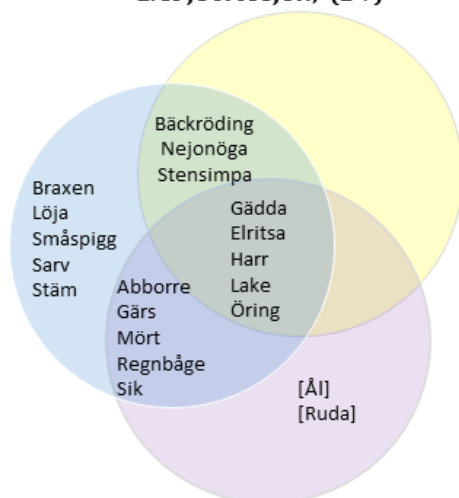
Där elfiskedata i vattendrag ovanför Spjutmosjön fanns tillgängligt detekterades 92% av fiskarterna med eDNA och 38% av arterna med 13 utfisken. eDNA punkt 4 uppströms som låg mer än 4 km från provfiskepunkterna registrerade den återstående 8% för eDNA. I Spjutmosjön vid punkt 7 registrerade eDNA 100% av arterna och elfisken 57% (16 utfisken, i huvudsak c:a 0,05-0,5 km från sjön). Nedanför Spjutmodammen registrerade eDNA 100% av arterna och elfisken 44%. Vidare vid jämförelse mellan eDNA och riksfiskinventeringen 1996 som baserades på ett mycket stort antal intervjuer (Appelberg m.fl. 2004) registrerade eDNA 100% (92%) av arterna och intervjuerna 52%. Intervjustudierna nämner även ål och ruda i Spjutmosjön. Ålen begränsas av flera vandringshinder från havet genom Dalälven till Siljan långt före Spjutmosjön och antas nu vara utrotad i Spjutmosjön, oberoende av Spjutmo kraftverk. Uppgiften om ruda kan mynnas från en beteshink (1995 eller tidigare), utan att komma från ett reproducerande bestånd. Denna uppgift är inte verifierad. AquaBiota detekterade ruda med eDNA analyser genom identiska metabarkodningsmetoder i Norrbotten 2017 (Hellströms & Spens 2017).

Vidare jämfördes data från alla provfiskeansträngningar (SERS) med eDNA undersökningen. De sammanslagna historiska elfisken detekterade i medeltal 3,4 arter per provfiske och 1,8 arter per utfiske (under en elfiskesession tas vanligen 1-3 replikat, varje replikat är ett utfiske). Detektionen för eDNA visade ett medeltal på 10,3 arter per prov och en median på 13 arter med ett spann mellan 11 och 18 arter per prov. En session och 13 ansträngningar detekterade 20 fiskarter. Två olika markörer för eDNA användes vilket försäkrade detektion av flera arter än om en enda markör hade använts.

Appelberg m.fl. (2004) diskuterar diskrepansen mellan intervjustudier och provfisken (el och nät), där vissa arter undgår fisken p.g.a. habitatval eller beteende. Gädda och sarv hör till dessa arter. Småspigg (*Pungitius pungitius*) som förekommer i glesa bestånd har den lägsta uppmätta fångstbarheten i Dalarna där 64 nätnätter krävts för att få en fångst (Lundvall 2016). Småspigg anses vara en av de ovanligaste fiskarterna i Dalälven. I denna studie gav 10 av 13 provlokaler utslag för småspigg.

eDNA vs. ELFISKEN**A. VATTENDRAG UPPSTRÖMS KV
(L-2, 3)**

*Harr och lake detekterades även i L-4.

**B. VATTENDRAG NEDSTRÖMS KV
(L-1, 10)****eDNA vs. INTERVJUER****C. SPJUTMOSJÖN, (L-7)****D. SPJUTMOSJÖN (L-5, 6, 7, 8,9, 12, 13)****eDNA vs. ELFISKEN vs. INTERVJUER****E. SPJUTMOSJÖN, (L-7)**

Figur 7. Venndiagram. Jämförelser mellan artfynd genom; 1) enbart eDNA (blå cirkel), 2) 53 sammanslagna utfisken utförda på max 4 km avstånd från provpunkterna (gul cirkel) 3) både eDNA OCH utfisken (delad grön yta). Venndiagrammet D jämför eDNA (blå cirkel) med intervjustudier (ljus lila cirkel). Arter registrerade med både eDNA och intervjuer anges i blållila. Venndiagram E jämför en eDNA provpunkt (L-7) med 18 utfisken och riks fiskintervjustudie som täcker hela Spjutmosjön. eDNA ger högre utslag än kombinerat data från intervjuer och 18 sammanslagna elfisken. L= eDNA lokal, [] anger arter som troligtvis försvunnit, * anger arter som hittades i provpunkter uppströms i eDNA utanför 4 km radien och inkluderades därför inte i analysen för eDNA.

Resultaten i denna rapport visar dock att både traditionella fisken och intervjustudier ger en underrepresentation av arter. eDNA upptäckte 100% flera arter än sammanslagna elfiskedata över 28 år. Inga arter fångades med elfiske som inte kunde detekteras med eDNA totalt (detta inkluderar Spjutmosjön, vattendragen uppströms respektive provpunkterna nedströms Spjutmo kv.) i denna undersökning. Detta överensstämmer med publicerade eDNA-studier som jämför eDNA och provfisken (ex Hänfling m.fl. 2016, Olds m.fl. 2016, Shaw m.fl. 2016, Valentini m.fl. 2016, Wilcox m.fl. 2016, Hellström och Spens 2017) där det framgick att eDNA ger säkrare utslag på antal arter och även på relativ biomassa. Beroende på typ av provfiske och biotopförhållanden kan eDNA och traditionella metoder komplettera varandra, alternativt kan eDNA ersätta andra metoder, särskilt om syftet är att beskriva mångfalden av fiskarter. Data på nätprovfiske i Spjutmosjön finns inte tillgängliga.

3.5. Fiskarter



Lokal 4. Österdalälven ovanför Spjutmosjön.

Notera att provfisken med översiktsnät ger en överskattning av **Abborre** (*Perca fluviatilis*) eftersom de lättare fastnar i dessa. I denna studie fanns enbart elfisken tillgängliga och abborre var underrepresenterad i elfiskeproverna. Abborre detekterades med eDNA i alla lokaler förutom i ett vattendrag (lokal 3) där den de facto finns. Abborre är en s.k. lugnvattenfisk och är sämre anpassad för höga vattenhastigheter i Österdalälven.

Braxen (*Abramis brama*) förekom i två lokaler i Spjutmodammen samt i alla lokaler nedanför dammen. Braxen är en lugnvattenart som är känslig för försurning men tål betydande eutrofiering.

Bäckröding (*Salvelinus fontinalis*) förekom med låga signaler i lokal 7 där en känd bäckrödingbäck mynnar ut i övre Spjutmodammen samt i Österdalälven uppströms Spjutmosjön. Arten är en invasiv amerikansk art som riskerar att ta över de minsta biflödena från naturliga öringpopulationer runt Spjutmo.

Elritsa (*Phoxinus phoxinus*) är en liten strömlevande karpfisk som kräver syrerika vatten. Fynd av elritsa genom eDNA gjordes i 6 av de 7 lokalerna i Spjutmosjön samt i vattendragen uppströms och nedströms sjön.

Gädda (*Esox lucius*) är etablerad naturligt uppströms och nedströms Spjutmodammen med eDNA signaler vid 11/13 provlokaler. Den utgör nu sannolikt den huvudsakliga begränsande faktorn för förekomst av större öring- och harrbestånd. På dessa breddgrader klarar små öringar normalt inte av predationen från gädda i stagnanta vatten om det inte handlar om stora djupa sjöar som t ex Siljan. Stora lekande Siljans-öringar nedanför dammen kunde bidra till ett kraftigare uppväxande öringbestånd uppströms de stagnanta miljöerna om ett omlöp byggs förbi kraftverket. Det saknades eDNA-signaler från gädda direkt nedströms Spjutmodammen och i forslokalen vid Gutdalen i Österdalälven, även fast dessa miljöer är tillgängliga, men möjligen olämpliga. Gädda missgynnas i kraftig forsmiljö. Gädda uppvisar generellt en låg fångstbarhet vid provfiske,

Gärs (*Gymnocephalus cernua*) anses ibland vara en besvärlig, invasiv art som hotar inhemska fiskbestånd på flera platser i världen t ex i Nordamerika. Här i Sverige är den dock ett naturligt romätande inslag i fiskfaunan. Den kan äta nattaktivt och är ofta bottenlevande på djupare områden.

Harr (*Thymallus thymallus*) är bland de viktigaste sportfiskarna i området. Dammen i Spjutmo hindrar harrens uppströmsvandring förbi kraftverket till lekplatser i Österdalälven. I denna provtagning registrerades en hög koncentration harr direkt nedströms dammen. Ett omlöp förbi dammen skulle kunna vara till nytta för harr om betydande outnyttjade lek- och uppväxtplatser finns uppströms dit denna grupp harrar då skulle kunna nå. Detta under förutsättning att nedströmsvandrande utlekta harr-individer och yngel överlever nedströms kraftverkspassage. I själva Spjutmodammen detekterades endast tre lokaler med harr, medan huvudvattendraget både uppströms och nedströms om dammen uppvisade harr.

Id (*Leuciscus idus*) förekom enbart nedströms Spjutmodammen i Österdalälven (3 lokaler). Ett omlöp förbi dammen skulle gynna idbeståndet. Det är möjligt att id förekom längre uppströms tidigare innan dammen stängde av förbindelsen från Siljan. Historiska uppgifter saknas då gemene mans förmåga att särskilja id från andra vitfiskar är svag.

Lake (*Lota lota*) är den enda torskfisken som förekommer i sötvatten. Den detekterades både upp- och nedströms dammen. Kallvattenarten lake är rödlistad bl. a p g av oro för varmare klimat. Arten klassas som 'Nära hotad' (NT) baserat på den pågående minskningen i utbredningsområdet. Eftersom många lakbestånd är vandrande kan de ha påverkats negativt av utbyggnaden av vattenkraft och olika typer av vandringshinder. I Spjutmo har lakbestånd överlevt både uppströms och nedströms trots det absoluta hindret Spjutmodammen.

Löja (*Alburnus alburnus*) detekterades i knappt hälften av lokalerna, både i vattendrag och sjömiljö. Löjan är ytterst svårångad i elfisken och underrepresenterad i intervjustudier. Den uppträder ofta i stora stim tätt under ytan i långsamma floder och sjöar. Den registrerades med högsta relativa förekomsten av alla 20 fiskarterna på en lokal i denna undersökning.

Mört (*Rutilus rutilus*) är en försurningskänslig art som förekom i alla provlokaler. Riklig förekomst indikerar sannolikt att lokalerna inte är försurningsdrabbade. Stora mängder mört i relation till små mängder abborre kan indikera eutrofiering (Lappalainen m.fl. 2001) vilket inte var fallet i Spjutmosjön.

Nejonöga (*Lampetra fluviatilis* eller *L. planeri*) De olika formerna av nejonöga (havs-, flod- eller bäck-) är omöjliga att skilja på genetiskt (på samma sätt som öringformer: havs-, sjö- eller bäck-) men formen som detekterats med eDNA uppströms dammen är det icke-parasitiska bäcknejonögat, som är den vanligaste formen och vida utbredd, ända högt upp i vattensystemen. Flodnejonögat kan dock vara av formen flodnejonöga nedan Spjutmo kraftverk (eftersom de finns i Siljan) men inga detekterades i Österdalälven nedan dammen. Alla former kräver både tillgång till sand- eller grusbotten för lek samt mjukbotten som uppväxtområden. Om omlöpet vid Spjutmo byggs finns det möjlighet för formen flodnejonöga att kolonisera uppströms Spjutmosjön.

Regnbåge (*Oncorhynchus mykiss*) som detekterats i Österdalälven bedöms inte utgöra någon risk (om fullt friska) för de naturliga fiskbestånden då vattendraget är för kallt för att kunna etablera en naturligt förökande population. Dessutom förekommer gädda som utgör ett nära nog oöverkomligt predationstryck för regnbåge att kunna etableras i älven. Detta bestånd härstammar från utsläpp ifrån fiskodlingen enligt intervjuer med lokalbefolkningen i trakten och från länsstyrelsetjänstemän. En tydlig gradient kan observeras med de högsta koncentrationerna eDNA närmast fiskodlingen för att sedan avta genom Spjutmo-magasinet och nästan inte detekterbar nedströms damm. Om odlingen riskerar sprida överförbar smitta till öring, harr, sik m fl. så innebär nuvarande spridning av regnbåge ett hot mot naturbestånden och restaureringsinsatserna (omlöp, Siljansöring, harrlek mm).

Ruda (*Carassius carassius*). Rudan är en mycket eutrofieringstålig kallvattenfisk. Den lever ofta i glesa bestånd och är då normalt svår fångad i provfisken. Notera att ruda kanske aldrig funnits i Spjutmo, då intervjuuppgiften aldrig bekräftats.

Sarv (*Scardinius erythrophthalmus*) Sarven söker sig ofta till vegetationsrika och varma grunda vatten. Den är detekterbar med eDNA i Spjutmosjön i de flesta lokaler. Arten har eventuellt spridits till Spjutmosjön genom sportfiske eftersom arten kan användas som betesfisk (David Lundvall, muntligt medd. 2017). Sarv undgår ofta provfisken på grund av sitt biotopval, den återfinns ofta långt inne i vegetationsbältet åtminstone under provfiskesäsongen. Sarven kan lätt förväxlas med mört och mörtfiskar vilket gör att den lätt förblir oregistrerad i provfisken och intervjustudier (Appelberg m.fl. 2004).

Sik (*Coregonus maraena*) Det polyploida sikkomplexet har en genetisk plasticitet att snabbt evolvera fram en mängd ekotyper, från planktonätare till bottenfaunaätare och toppredatorer (Etheridge m.fl. 2012; Öhlund 2012; Siwertsson m.fl. 2013; Lundsgaard-Hansen m.fl. 2013). Sikarnas taxonomiska uppdelning är omdiskuterad och i Sverige anses alla sikvarianter vara olika former av en och samma art och går under kollektivnamnet *Coregonus maraena* (Nationalnyckeln efter beslut från Naturhistoriska

Riksmuseet och Sötvattenslaboratoriet), Om andra arter försvinner kan sik-komplexet därför ha potential att rädda kvar en mängd speciella separata ekologiska funktionella roller. De kan bilda separata "underarts"-bestånd relativt snabbt i samma miljö. I denna studie påträffades sik-eDNA i flera delar av Spjutmosjön och i dess huvudtilllopp Österdalälven. Arten har även rapporterats från intervjuer.

Siklöja (*Coregonus albula*) är en kallvattenfisk som sommartid behöver ha tillgång till kallt vatten, ofta djupare sjöar (Lundvall 2016). Den detekterades svagt med eDNA vid Spjutmo badplatsbrygga. Siklöja finns i populationer uppströms Spjutmo och detta fynd kan vara en början på en nypopulation därifrån. Vi bedömer att ytterligare verifieringar krävs för att fastställa om detta är en reell reproducerande population.

Småspigg (*Pungitius pungitius*) har den lägsta uppmätta fångstbarheten i Dalarna där 64 nätnätter krävts för att få en fångst (Lundvall 2016). Den har beräknats vara bland de ovanligaste fiskarterna, men detta kan även bero på att fångstbarheten vid glesa spiggbestånd ger fångst så pass sällan. Här är eDNA sannolikt överlägsen inventeringsmetod eftersom småspigg påträffades i 10 av de 13 eDNA lokalerna. Småspigg tål extremt låga pH-värden.

Stensimpa (*Cottus gobio*) kräver syrerika hårbottenar och klart vatten för att trivas. Arten är en god indikator för vattenkvalitet. Stensimpan är nattaktiv och svårfiskad eftersom den lever gömd under stenar och grus. Stensimpan är listad i EU:s Annex II lista till EU:s habitatdirektiv. Det är den sötvattenfisk som det satsats mest på i EU:s LIFE-restaureringsprojekt. Tyvärr har inga uppföljningar av dessa genomförts avseende stensimpa. eDNA-metoden kan avhjälpa detta med förbättrade detektioner i både storälvar och sjöar, vilka är synnerligen svårinventerade traditionella inventeringsmetoder. Den är den vanligast förekommande fiskarten i denna inventering i biomassa (antalet träffar) och förekom i samtliga provpunkter. Arten undgår ofta provfisken i sjöar eftersom den sällan fångas i nät. Verifiering via elfisket i denna studie gjordes vid ett inlopp till Spjutmosjön eftersom nätfiske-jämförelser inte fanns att tillgå.

Stäm (*Leuciscus leuciscus*) är beroende av att goda vandringsförhållanden finns då lek sker högt upp i vattendragen. I sjöar förekommer stäm ofta i anslutning till vattendrags mynnningar i sjöar t ex provpunkt 2 och 7. Arten förekom i 9 provpunkter. Delar av tidigare stämpopulation i Österdalälven påstås redan ha dött ut uppströms Spjutmo (Lundvall 2016).

Öring (*Salmo trutta*) förekommer i Siljansområdet- Österdalälven som både insjööring och bäcköring, vilket är olika former av samma art. Varje vattens bestånd av öring har unika egenskaper och anpassningar, likt laxen. Sjölevande öring vandrar normalt uppströms såsom Siljansöring, men ibland även nedströms, till lek- och uppväxtområden efter någon eller några säsongers tillväxt i sjön. Bäcköringen i biflödena uppströms Spjutmosjön stannar hela livet i rinnande vatten och är stationära. Öringen leker på rena grusbottenar i rent strömmande vatten. Öringarna ovanför Spjutmo kraftverk är små och blir lätt byte för gäddor. Ett omlöp förbi Spjutmodammen skulle vara av viss betydelse för Siljansöringen då betydande lekplatser finns uppströms

som denna storvuxna öringstam skulle kunna nå. Öring detekterades svagt med eDNA vid 3 lokaler av 7 i Spjutmomagasinet. Öringförekomsten i Spjutmomagasinet är litet i själva sjön utifrån eDNA-signalen. Öring begränsas främst av gäddan i dämningssmagasinet. Stor uppvandrande Siljansöring skulle eventuellt förbättra rekryteringen av uppväxande småöring i Österdalälven uppströms Spjutmosjön.

3.6. Lokala fisksamhällen



Lokal 2. Vattendrag ovan Spjutmosjön. Gopshusvik.

Lokala fisksamhällen gällande lithofila arter (fiskarter som kräver rena bottenar och strömmande vatten) samt känsliga, tåliga och neutrala arter i förhållande till övergödning anges i tabell 3. Vidare indikeras näringsgrad av förhållandet av relativ biomassa (eDNA-läsningar) mellan abborrfiskar och karpfiskar (*Percidae/Cyprinidae*). Låga värden kan indikera högre näringsnivå, eventuellt också övergödning. Här bör noteras att abborrfiskar är lugnvattenfiskar och saknas i områden med kraftigt strömmande vatten. Andelen laxfiskar associeras oftast till god vattenkvalitet och högre ekologisk status. En principiell felkälla i ett sådant resonemang är dock att laxfisk normalt sett gynnas av högre **lutning** (vilket naturligtvis inte kan direktkopplas till orsak/verkan för närsaltbelastningen) i vatten där rovdjur som gädda förekommer, vilka å sin sida missgynnas när lutningen blir för hög.

Tabell 3. Naturligt förekommande arter utifrån eDNA, andelen lithofila (rena bottenar, rinnande vatten), tåliga och känsliga arter, abborr/karpfisk kvot samt andel laxfiskar. VD = vattendrag i rinnande vatten. O = ovanför Spjutmosjön, N = nedanför Spjutmosjön, SS = Spjutmosjön, rm=relativ mängd

Lokal	Läge	Naturlig	Lithofil %	Tålig %	Känslig %	Tålig % rm	Känslig % rm	eDNA abborrfisk/ karpfisk	Lax fisk %
2	VD O Spjutmos	10/10	50	30	30	63	33	2	5
3	VD O Spjutmos.	6/7	43	29	14	71	1	0,5	0
4	VD O Spjutmos.	12/14	64	21	36	4	58	57	6
5	Spjutmos.	12/13	54	31	23	64	5	46	0,1
6	Spjutmos.	14/15	55	30	27	39	48	39	1
7	Spjutmos.	16/18	56	28	28	40	37	144	1
8	Spjutmos.	11/12	50	25	17	40	13	535	0
9	Spjutmos.	12/13	46	31	15	45	30	865	0
12	Spjutmos.	13/14	43	29	21	17	31	247	1
13	Spjutmos.	11/12	50	33	17	64	16	62	0
11	VD N Spjutmos.	12/13	38	38	15	21	41	868	36
10	VD N Spjutmos.	10/11	55	27	27	5	91	93	6
1	VD N Spjutmos.	12/13	46	31	23	14	38	9	0,5

Provpunkt 3 följt av punkt 2 har de lägsta abborrfisk/karpfisk-kvoterna (karpfiskdominans) av alla lokaler vilket kan reflekteras av den högre näringsnivån i dessa lokaler på grund av koncentrerad bebyggelse med fler personekvivalenter närsalter per vattenmängd i mindre åar. Vattendraget vid punkt 3 karakteriseras också av lugnvattenarter p g av det sjönära läget och låg lutning. Punkt 3 har även lägst andel "känsliga" och högst andel "tåliga" arter, räknat som relativa mängden eDNA-träffar. Provpunkten direkt nedanför kraftverket visade den högsta abborrfisk/karpfisk-kvoten på grund av massförekomst av gärs, mest "tåliga" arter och lägst mängd "känsliga" samt få "lithofila" arter vilket speglar den lokalt kraftigt störda miljön. Detta övergår sedan till det omvända förhållandet på punkt 10. Lokalen representerar en högklassig forsmiljö, med närapå minsta andel mängd "tåliga" arter och största mängd "känsliga" arter av alla lokaler. Den känsligaste miljön registrerades i Österdalälvens huvudfåra (lokal 4 uppströms Spjutmo), där den högsta andelen "lithofiler" och "känsliga" arter påträffas. Endast 4 % relativ mängd "tåliga" arter påträffas här. Höglutande vattendrag (provlokal 2, 4, 10 och 11) har mer laxfisk i jämförelse med Spjutmosjön bl. a p.g.a. det skydd strömmiljön ger från rovdjur (främst gädda). Provlokal 2, 4 med högt-lutande laxfisk-refugier i anslutning till låg-lutande gäddlokaler och ger således en illusion i dessa eDNA prov, av både hög % laxfisk och gädda på samma ställe.

4. SLUTSATSER

eDNA ger en snabb överblick av vilka arter som är närvarande i ett vattendrag och skapar en solid bas för grundkartering av fiskesamhället i varje enskilt ekosystem. Det är bl. a. av stor vikt för att kunna utforma åtgärds- och kontrollprogram optimalt.

Metoden gör det möjligt att undersöka stora geografiska områden på kort tid. Metoden anger fiskarterna som är närvarande några dagar till en vecka (maximalt några veckor) före provtagningen. För att få en uppfattning om arters närvaro vid olika årstider är det av vikt att göra eDNA inventeringar vid olika tider för att erhålla information om säsongsbetonad variation. Det är viktigt att identifiera vilka aspekter av ett vattenekosystem man vill undersöka med hjälp av eDNA. Analyser från prov som samlats in under reproduktionsperioden ger de reproducerande arterna en större relativ eDNA-signal eftersom både könsceller, yngel, småfisk och lekfisk detekteras. Under vintern är vattendjurs metabolism i allmänhet lägre eftersom de är mindre aktiva. Detta betyder att de avger mindre mängder eDNA. I en tidigare studie var eDNA läsningarna ändå höga eftersom DNA i vattnet inte bryts lika fort ner då vattnet är kallt och UV ljusstyrkan låg.

eDNA är ett bra komplement till el- och nätfisken och ger en snabb översikt på närvarande arter som motsvarar 50-70 års provfisken vilket visats i stora studier i sjöar (Hänfling m.fl. 2016, Hellström m.fl. opublicerat data). Studien i Spjutmo utfördes i både rinnande vatten och sjömiljö. Därför jämfördes eDNA resultaten med tidigare utförda elfisken i anslutning till 5 provpunkter tagna nu samt en intervjuundersökning för Spjutmosjön från 1996.

eDNA genom metabarkodning med mitokondriellt DNA anger inte fiskens ålder, identitet, individstorlek eller kön. Problemet med eDNA har tidigare varit att markörerna som använts inte klarat av att skilja på närbesläktade arter. Denna studie använde en markör inom konserverade regioner av DNA. Idag har vi inte upptäckt huruvida någon art kan bli allvarligt under/överrepresenterad med eDNA, såsom är regel vid normalt provfiske. Kvantitativa försök behöver genomföras med kända mängder fisk i naturvatten för att få indikationer om detta.

Denna pilotstudie analyserade vatten vid 6 punkter knutna till vattendrag (Österdalälven samt några av dess biflöden varav 3 ovan och 3 nedan Spjutmo kraftverk) och sju stycken i Spjutmosjön. Studien gav goda resultat. Vattnet var insamlat med hjälp av en teknik som gör att även små mängder DNA ger utslag.

Huvudresultaten visade (trots de små vattenvolymer) att:

- eDNA detekterade 19 fiskarter i Spjutmosjön och ytterligare en art, id, nedströms Spjutmo kraftverk. eDNA utökade den estimerade fiskfaunan med 90% i jämförelse med tidigare intervjuundersökning från 1996. För de lokaler där elfisken fanns att tillgå hade hälften av arterna fångats i jämförelse med eDNA.
- Id, påträffades enbart nedströms om Spjutmo k.v. i jämfört med uppströms områden. Om fri vandringsväg bereds förbi Spjutmo k.v. genom omlöpet får id möjlighet att kolonisera Spjutmosjön med tiden.
- Räknat på antalet arter har Spjutmosjön behållit nästan hela sin fiskfauna på 19 arter (sannolikt med undantag av id), trots byggandet av det absoluta fiskvandringshindret Spjutmo kraftverk som isolerat sjön från nedströms liggande rikare fiskfauna i Österdalälven och Siljan. På sikt är de irreversibla konsekvenserna av lokala artutrotningar vid varje lokal exploatering av naturen den allvarligaste grundläggande utarmningen av den biologiska mångfalden. Förhoppningsvis livskraftiga bestånd med 19/20 fiskarter i sjön - trots absolut isolering mellan nedströms och uppströms Spjutmo k.v. - är glädjande och förvånande. Även id-beståndet finns kvar nedströms för att kunna återkolonisera vattnet uppströms.
- Havsvandrande lax och ål har dock utrotats permanent från området på grund av nedströms liggande dammar närmare havet oavsett vilka beslut som tas i Spjutmo, om inte fiskvandrings-situationen förändras betydligt längre nedströms i Dalälven.
- Även om stationär öring finns kvar i tillrinnande vattendrag till Spjutmosjön (och i själva sjön) så kan inte formen Siljansöring fungera här utan att ett omlöp förbi dammen skapas. På samma sätt kommer sannolikt formen flodnejonöga (nejonöga finns dock i Spjutmo) att främjas av ett omlöp.
- Betydande bestånd harr som finns nedströms Spjutmo kraftverk kommer sannolikt att kolonisera Österdalälven uppströms Spjutmosjön och blandas sig med det lokala harrbeståndet om omlöpet förbi Spjutmo k.v. fungerar som avsett. Det är dock osäkert hur stor dödligheten av uppvandrad utlekt harr och nyproducerad småharr vid dess nedströmsvandring förbi kraftverket kommer att uppgå till (om det överväger ökningen av naturlekproduktionen ovan Spjutmo). Om dödligheten nedströms förbi kraftverket överväger eller om lekbeståndet ovan Spjutmo redan kan anses vara mättat idag, så går det inte att hävda att omlöpet skulle gynna harrbeståndet.
- eDNA detekterar 100% av fiskpopulationerna vid ett tillfälle i vattendragen jämfört med 56 % för sammanlagda elfisken under ett spann av 28 år tillbaka i tiden.
- eDNA detekterade totalt 20 arter vid detta provtillfälle mot 10 arter vid beaktande av sammanlagda elfisken upp till 28 år tillbaka i tiden.
- Arternas relativa abundans (hierarki eller dominansförhållanden) kan fastställas genom eDNA.

eDNA-studier utförda under de rigorösa förhållanden som krävs för både fält- och laboratorie- arbete är en effektiv metod för fiskinventering. Viktiga faktorer som leder till pålitliga resultat förutsätter;

- optimal design av eDNA fältarbetet och val av provtagningspunkter och metod för provtagningen,
- tränad fältpersonal som arbetar under sterila förhållanden
- laboratorier avsedda uteslutande för eDNA
- tränad laboratoriepersonal med god kunskap om molekylär-genetiskt arbete

eDNA – Fiskinventering vid Spjutmo Kraftverk

- en fungerande bioinformatik, som gör det möjligt att på några dagar omvandla miljontals sekvenser till listor på artförekomst och antal läsningar per art
- rigorös kvalitetskontroll i alla stadier av provtagningen, fram till slutgiltiga resultat.

5. REKOMMENDATIONER AVSEENDE FORTSATTA UNDERSÖKNINGAR

Vi föreslår att flera vattendrag i Siljan/Ore-systemet undersöks med samma metod, men att antalet provpunkter i varje vattendrag och provtagningssäsong utökas. Provtagningspunkter väljs utifrån vattendragets lutning, vandringshinder och avstånd till närmaste sjö för att erhålla representativa resultat. I dessa åar/älvar kommer eDNA behövas för att bevisa att fiskfaunan restaureras efter genomförda och planerade åtgärder: Österdalälven, Spjutmosjön och Siljan. Kvantifiering av fisk-eDNA är särskilt lämpligt för övervakning av biologisk mångfald, design av åtgärdsprogram/effektkontroll, före och efter fiskpassage-byggen, rivande av dammar och restaureringar. Vidare är metoden lämplig för att utröna konnektivitet av olika fiskarter.

Då studien genomfördes under försommar är det svårt att göra en fullständig analys av betydelsen för vandringsfisk. Studier bör med fördel läggas under övrig lektid (höst, vår och vinter) för att utreda betydelsen för vandringsfisk. AquaBiota har tillgång till markörer för musslor som särskiljer alla musselarter. En flerartstudie på stormusslor med fokus på flodpärlmusslan vore en studie som både kunde ge nya insikter i stormusslornas möjligheter i kraftälvarna och deras beroende av olika fiskarter som värdorganismer. Ett exempel på detta är öring och den hotade flodpärlmusslan.

TACK

Ett stort tack till teknikerna vid MoRe Research för hjälp med DNA-extraktionerna i det exklusiva samarbetet med AquaBiota AB. Tack till Joe och Hayley för laboratorie-assistans och hjälp med bioinformatik. Projektet finansierades genom Fortum Hydro, Sverige. Proverna användes även som test underlag för en separat metodstudie finansierad av EU COST DNAquaNet och Hydro Fortum.

REFERENSER

- Appelberg, M., Ridderborg, S. & Beier U. 2004. En nationell inventering av den svenska fiskfaunan 1996 Fiskeriverket Sötvattenslaboratoriet, Drottningholm 20014:1. ISSN 1404-8590
- Beier U, Degerman E, Sers B, Bergquist B & Dahlberg M .(2007.) Bedömningsgrunder för fiskfaunans status i rinnande vatten - utveckling och tillämpning av VIX. Fiskeriverkets sötvattenlaboratorium. Finfo 2007:5
- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Lipman, D. J., Ostell, J., & Sayers, E. W. (2017). GenBank. Nucleic acids research, 45:D37.
- Bohmann, K., A. Evans, M. T. P. Gilbert, G. R. Carvalho, S. Creer, M. Knapp, D. W. Yu, och M. de Bruyn. 2014. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. Trends in Ecology & Evolution 29:358 – 367.
- Deiner, K., H. M. Bik, E. Mächler, M. Seymour, A. Lacoursière-Roussel, F. Altermatt, S. Creer, I. Bista, D. M. Lodge, N. de Vere, M. E. Pfrender, och L. Bernatchez. 2017. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. Molecular Ecology 26:5872-5895.
- ec.europa.eu http://ec.europa.eu/environment/water/water-framework/info/intro_en.htm
- Hellström, M & Spens, J.** 2017. eDNA - Fiskförekomst i 10 kustmynnande vattendrag, Norrbottens län AquaBiota Rapport 2017:10. 30 sid. ISBN: 978-91-85975-67-9
- Holmgren, K., Kinneback, A., Pakkasmaa, S., Bergquist, B & Beier, U. (2007). Bedömningsgrunder för fiskfaunans status i sjöar. Utveckling och tillämpning av EQR8. Finfo 2007:3.
- Hänfling, B., L. Lawson Handley, D. S. Read, C. Hahn, J. Li, P. Nichols, R. C. Blackman, A. Oliver, och I. J. Winfield. 2016. Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. Molecular Ecology
- Kelly, R.P., Port, J.A., Yamahara, K.M. och L.B. Crowder. 2014. Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm. PloS One 9 (1): e86175
- Lappalainen, A., Rask, M., Koponen, H., & Vesala, S. (2001). Relative abundance, diet and growth of perch(*Perca fluviatilis*) and roach(*Rutilus rutilus*) at Tvaerminne, northern Baltic Sea, in 1975 and 1997: responses to eutrophication?. Boreal Environment Research, 6(2), 107-118.
- Leese, F., Altermatt, F., **Hellström M.**,+ 103 authors & Stenke, D (2016). DNAqua-Net: Developing new genetic tools for bioassessment and monitoring of aquatic ecosystems in Europe. Research Ideas and Outcomes (Rio), 2, e11321.
- Lundvall D. 2016. Fiskar i Dalarna. Förekomst och utberedning. Rapporter från Länsstyrelsen i Dalarnas län. 2016: 03 ISSN: 1654-7691
- Olds, B. P., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Li, Y., Evans, N. T., Turner, C. R., ... Shirey, P. D. (2016). Estimating species richness using environmental DNA. Ecology and Evolution, 6, 4214–4226.
- Pedersen, M. W., S. Overballe-Petersen, L. Ermini, C. D. Sarkissian, J. Haile, M. **Hellstrom, J. Spens**, m.fl. 2015. Ancient and modern environmental DNA. Philosophical Transactions of the Royal Society B **370**:20130383
- SERS <https://www.slu.se/institutioner/akvatiska-resurser/databaser/elfiskeregistret/>
- Sanders, D., Thébault, E., Kehoe, R., & van Veen, F. F. (2018). Trophic redundancy reduces vulnerability to extinction cascades. Proceedings of the National Academy of Sciences, 115(10), 2419-2424
- Sharber, N.G. & S.W. Carothers. 1988. Influence of electrofishing pulse shape on spinal injuries in adult rainbow trout. North American Journal of Fisheries Management 8:117-122.
- Shaw, J. L., Clarke, L. J., Wedderburn, S. D., Barnes, T. C., Weyrich, L. S., & Cooper, A. (2016). Comparison of environmental DNA metabarcoding and conventional fish survey methods in a river system. Biological Conservation, 197:131–138.
- Siwertsson, A., Knudsen, R., Adams, C.E., Praebel, K., Amundsen, P.A. 2013. Parallel and non-parallel morphological divergence among foraging specialists in European whitefish (*Coregonus lavaretus*). Ecology and Evolution, 3:1590-1602.
- Spens, J.** 2008. Using GIS to predict landscape-scale establishment and extinctions of lacustrine salmonids: impact from keystone species, exotics, chemical & physical factors. Swedish University of Agricultural Sciences, Umeå. ISSN 1652-6880 ISBN 978-91-86195-04-5
- Spens, J.**, A. R. Evans, D. Halfmaerten, S. W. Knudsen, M. E. Sengupta, S. S. T. Mak, E. E. Sigsgaard, och **M. Hellström**. 2017. Comparison of capture and storage methods for aqueous

- macrobial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution*, **8**(5), 635-645
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21, 1789-1793
- Trigal, C., & Degerman, E. (2015). Multiple factors and thresholds explaining fish species distributions in lowland streams. *Global Ecology and Conservation*, **4**, 589-601.
- Wheeler, Q. D., Raven, P. H., & Wilson, E. O. (2004). Taxonomy: Impediment or expedient? *Science*, 303, 285-285.
- ec.europa.eu http://ec.europa.eu/environment/water/water-framework/info/intro_en.htm
- Wilcox, T. M., K. S. McKelvey, M. K. Young, A. J. Sepulveda, B. B. Shepard, S. F. Jane, A. R. Whiteley, W. H. Lowe, and M. K. Schwartz. 2016. Understanding environmental DNA detection probabilities: A case study using a stream-dwelling char *Salvelinus fontinalis*. *Biological Conservation* 194:209-216.
- Öhlund, G. 2012. Ecological and evolutionary effects of predation in environmental gradients. Dissertation thesis. Department of Ecology and Environmental Science. Umeå Universitet
- Författarnamn i **fet stil** anger medarbetare på AquaBiota

BILAGOR

BILAGA I.

Metastreckkodning (metabarcoding eller flerartsanalyser) genom NGS (Next Generation Sequencing)

Varje levande art utsöndrar arvsmassa eller DNA. Vissa delar av en individs DNA är helt unikt för just den individen, medan andra delar av DNA delas med just den individens art, och sedan finns det DNA som ser likadant ut hos alla organismer i en grupp.

Med hjälp av jättelika databaser som är tillgängliga för alla (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) kan forskarna välja ut en liten bit DNA som man kan kopiera industriellt. Dessa små bitar kallas primers. Eftersom primern är artspecifik fastnar den enbart på DNA för den valda arten. Resultatet, dvs. en liten bit av DNA som primern kopierar kallas barcode (streckkod), och kan liknas vid en streckkod som används för att betala för varor i affärer. Dessa primers, en droppe eDNA, ett enzym och salter blandas i ett provrör. Provröret placeras i en maskin som gör massor av DNA kopior för just den arten. Detta kallas för PCR (Polymerase Chain Reaction) och bygger på proteinsyntesen.

Metastreckkodning eller Metabarcoding innebär att man designar en primer som är gemensam för alla arter inom en grupp – i denna rapport vertebrater med fokus på fisk. Primerna för metastreckkodning tillverkas så att de plockar upp en bit DNA som är likadana för alla arter inom en grupp, t.ex. alla fiskar, men DNAt som blir avläst varierar mellan olika arter och visar en unik kod. Eftersom man analyserar flera olika arter på en gång kallas metoden metastreckkodning.

För att veta vilka arter man har läser man av PCR produkterna i en sekvenseringsmaskin som heter MiSeq och då flera arter sekvenseras samtidigt kallas detta NGS (Next Generation Sequencing). Flera miljoner läsningar av DNA finns osorterade och färdiga efter en NGS körning.

Flerartsanalyser- bioinformatik

Då resultaten är klara har man enorma mängder data som innehåller miljontals olika sorter av DNA. För att få ordning på data och för att veta vilka arter man har i ett prov använder man olika programmerings metoder som sorterar upp data. Enorma datafiler som motsvarar upp till flera terabyte (TB) data analyseras med hjälp av program som skiljer de olika DNA koderna åt. Denna process kallas bioinformatik. Då bioinformatiken är klar och sekvenserna har sorterats skapas en lista av olika DNA-identiteter. Dessa jämförs med olika databaser och varje unik bit av DNA får en identitet. Ett flertal databaser finns tillgängliga och varje gång en genetisk artikel publiceras läggs DNA sekvensen ut på nätet. Om en art inte är beskriven genetiskt under bioinformatikens gång men kommer in på databaserna senare, kan man köra om bioinformatiken och få de tidigare oidentifierade sekvenserna identifierade.

Resulterande rådata sammanställs i en Excel fil som anger arter och hur många kopior av DNA som lästs in för varje art inom varje enskild lokal. På basen av detta kan arterna som finns i vattnet identifieras och den relativa förekomsten av arten anges.

BILAGA 2.

Antalet DNA läsningar per art inom lokalerna

Tabell B2. Antalet eDNA läsningar per art inom de olika provlokalerna. # träff anger hur många gånger en sekvens blivit läst på artnivå och anger relativ biomassa. Varje enskild art avger eDNA olika och har därför olika gränsvärden för detektion. För denna studie har vi använt arts specifika algoritmer som anger gränsvärdet för varje enskild MiSeq sekvensering och markör. Metodiken har tagits fram med flera samarbetspartners i empiriska undersökningar 2017. Resultaten har visat att denna metodik fungerar utmärkt och ger ett mer representativt resultat. Två olika markörer har använts. Träffar angivna med * är detekterade med markör II.

ART	UPPSTRÖMS (VATTENDRAG)			SPJUTMOSJÖN							NEDSTRÖMS (VATTENDRAG)		
	2	3	4	5	6	7	8	9	12	13	11	10	1
Abborre (<i>P. fluviatilis</i>)	*4 336		*5 003	29 979	26 966	40 331	61 297	74 116	4 259	31 409	*23 970	5 187	3 495
Braxen (<i>A. brama</i>)					*920	6 112					*2 784	227	9 754
Bäckröding (<i>S. fontinalis</i>)			971			*372							
Elritsa (<i>P. phoxinus</i>)	*1 344		6 626	746		2 214	*2 178	*1 533	*3 837	*3 699		1 684	129
Gädda (<i>E. lucius</i>)	12 242		4 018	10 400	4 525	901	59 615	7 091	1 468	13 066	*447		2 761
Gärs (<i>G. cernua</i>)	544	498	*2 005		3 388	9 500	16 901	28 466	68 732	*8 655	116 097	250	1 723
Harr (<i>T. thymallus</i>)			12 287		1 265	227			*75		112 923	637	216
Id (<i>L. idus</i>)											141	3 043	50 475
Lake (<i>L. lota</i>)			4 231		*4 956	*742		*2 681	*231		*663	103	176
Löja (<i>A. alburnus</i>)	215 998	13 489		916	10 251	17 111		2 221	*1 938	*1 017	*2 097		
Mört (<i>R. rutilus</i>)	16 715	81 212	5 662	63 351	65 996	5 962	5 974	*6 876	18 307	67 149	*3 243	885	971
Nejonöga (<i>Lampetra</i> sp.)	*2 784		*1 084		*984	*240	*44	*96	*846	*33			
Regnbåge (<i>O. mykiss</i>)		35 378	73 029	32 486	16 774	23 862	5 502	*3 608	16 310	3 534	142	168	214
Sik (<i>Coregonus maraena</i>)			4 220	250	6 536	*472	134	2 350		*134			
Småspigg (<i>P. pungitus</i>)			*204	779	*1 398	*1 348	11 163	*3 034	1 728	16 617	34 627		1 720
Sarv (<i>S. erythrophthalmus</i>)				511		*2 624	*6 356	*1 224	*221				
Siklöja (<i>C. albula</i>)				712									
Stensimpa (<i>C. gobio</i>)	100 874	1 362	131 649	7 058	127 452	62 639	25 771	58 045	53 930	29 710	*2 136	107 432	43 017
Stäm (<i>L. leuciscus</i>)	100	1 929		183	*79	689	*122		100	*744			
Öring (<i>S. trutta</i>)	19 648		1 274	139	*1 768	*1 568					*257	7 157	330

inventering vid Spjutmo Kraftverk

www.aquabiota.se