

Inventering av fiskarter med fokus på lax (*Salmo salar*) m.h.a eDNA i Piteälv, Norrbottens Län.

Micaela Hellström & Johan Spens



STOCKHOLM, NOVEMBER 2018

Beställare:

Rapporten är framtagen av AquaBiota Solutions på uppdrag av Piteälvens Vattenråd.

Författare:

Micaela Hellström (micaela.hellstrom@aquabiota.se)

Johan Spens (johan.spens@aquabiota.se)

Bilder:

Omslagsbild: Micaela Hellström. Lokal 7, Varjisån utlopp.

Bilder på målarter är tagna från Wikimedia Commons med tillstånd för spridning även i kommersiellt syfte. Övriga Bilder; Micaela Hellström, Pähr Hellström

Kontaktinformation:

AquaBiota Solutions AB

Adress: Löjtnantsgatan 25, 115 50 Stockholm

Tel: +46 8 522 302 40

www.aquabiota.se

Kvalitetsgranskad av:

Nicklas Wijkmark (nicklas.wijkmark@aquabiota.se), Johan Näslund

(johan.naslund@aquabiota.se)

Distribution:

Fri

Internetversion:

Nedladdningsbar hos www.aquabiota.se

Citera som:

Hellström, M & Spens, J. 2018. Inventering av fiskarter med fokus på lax (*Salmo salar*) med hjälp av eDNA i Piteälv, Norrbottens län. AquaBiota Rapport 2018:12. 12 sid.

Ämnesord: eDNA, *Salmo trutta*, metabarkodning, fiskfauna, Norrbottens Län, Piteälv

AquaBiota Report 2018:12

Projektnummer:

ISBN: 978-91-85975-81-5

ISSN: 1654-7225

© AquaBiota Solutions 2018



INNEHÅLL

Innehåll.....	4
Sammanfattning.....	5
1. Inledning	6
2. Material och Metoder	7
2.1. Fältarbete.....	7
2.2. Laboratoriearbete.....	8
2.2.1 Extraktion, PCR och sekvensering	8
2.2.2 Bioinformatik och verifiering	8
3. Resultat och diskussion.....	9
3.1 Sekvenseringsresultat.....	9
3.2 Fiskarternas förekomst – sammanlagd översikt.....	9
3.3 eDNA kvalitetskontroll.....	11
Tack	11
Referenser	12
Bilaga 1 Enarts och flerartsanalyser vid eDNA undersökningar.....	13
Bilaga 2 Kvalitetssäkring av eDNA	14
Bilaga 3 Kvalitetskontroller som redovisas vid flerartsanalyser	15
Bilaga 4 Resultat – Kvalitetskontroller	16

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. eDNA 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 utförde på uppdrag av Piteälven vattenråd en undersökning för att främst verifiera förekomst/frånvaro av lax (*Salmo trutta*) i restaurerade områden i Piteälven, Norrbottens län. I analysen framkom även fisksammanställningen på de olika provlokalerna. Fältarbetet utfördes 20 september 2018. De genetiska proverna analyserades senare under hösten.

Sammanlagt 15 fiskarter detekterades. På de 10 utvalda provpunkterna detekterades lax i sex av tio lokaler.

Metoden visade sig lämplig både för att identifiera arters förekomst i älven, få en bild av artsammansättning och ge en uppfattning om arternas dominansförhållanden till varandra. Arter som inte normalt detekteras i provfisken detekterades vilket kommer att jämföras i en framtida studie.

1. INLEDNING

Undersökningar av biologisk mångfald med avseende på 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 svårfångade 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 anges som; "det DNA som kan studeras från dessa spår i miljön utan att målorganismen är närvarande i provet" (Taberlet m.fl. 2012). I akvatiska miljöer kan detta material utvinnas ur små mängder 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. eDNA har visat sig ha en stor potential som verktyg för inventering av vattenorganismer (Bohmann m.fl. 2014, Leese m.fl. 2016, Olds m.fl. 2016, Deiner m.fl. 2017). Vidare har flera studier visat att eDNA i sjöar och rinnande vatten detekterar fler arter än vad provfisken gör (Hänfling m.fl. 2016, Hellström & Spens 2017 a, b, c, Hellström m.fl. 2018)

AquaBiota har på uppdrag av Piteälven vattenråd utfört en eDNA undersökning för fiskdiversitet. Uppdragets mål var:

- att verifiera förekomst/frånvaro av lax (*Salmo trutta*) i restaurerade områden i Piteälven, Norrbottens län.
- att få information om fiskarters förekomst i området för senare jämförelser med existerande provfisken.

2. MATERIAL OCH METODER

2.1 Fältarbete



Fältarbete. Jan Isaksson mäter vattentemperaturen, Pähr Hellström samlar in prover. Pähr och Micaela filtrerar vatten.

Fältarbetet utfördes 21-23 augusti 2018. Provtagningspunkter anges i figur 1 och i tabell 1. Koordinaterna anges som decimalgrader i WGS84. Lufttemperaturen mätte 5-15 °C. Provpunkternas position bestämdes i samråd med uppdragsgivaren.

Innan provtagningen genomfördes i fält, steriliserades all provtagningsutrustning. Filtreringsutrustning köptes in som sterila DNA-fria engångsförpackningar. Sex liter vatten samlades in i form av 10 stycken underprover 50 m i vardera riktningen från provpunkten. Vattnet blandades och filtrerades. Negativa fältkontroller utgjordes av rent vatten som filtrerades 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 och vattentemperatur. Alla prover togs på <0,5 meters djup.

Provpunkt namn	WGS 84 Lat (Ö)	WGS 84 Long (Ö)	RT 90 X	RT 90 Y	H ₂ O °C
1. Vitbäcken utlopp	65,904326	20,326933	7318961	1705903	8,0
2. Sikån Jägen	65,955845	20,120338	7324056	1696137	7,9
3. Skräcksel	65,931277	20,142151	7321330	1697354	8,2
4. Sikån Norden	66,033741	19,99404	7332330	1690049	7,4
5. Varjisån väg 45	66,013742	19,811259	7329570	1681711	8,6
6. Björntorp koja	65,994541	19,959214	7327852	1688513	9,0
7. Varjisån utlopp	65,860751	20,413661	7314404	1710225	9,4
8. Vistån utlopp	65,799504	20,601385	7308308	1719385	12,1
9. Stockfors	65,760266	20,943995	7305148	1735322	8,2
10. Tvärån	65,562062	21,106466	7283734	1744607	10,5

2.2 Laboratoriearbete

2.2.1. Extraktion och PCR

Flödesschemat i bilaga 2 beskriver eDNA-processen från insamling till analys. eDNA utvanns (extraherades) enligt protokoll från 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 med flerartsanalyser för förekomst av fisk (bilaga 2) samt andra vertebrater. Varje PCR prov utfördes i 12 replikat som sammanslogs under bioinformatiken. En DNA markör som amplifierar 230 bp av DNA på 12S rDNA regionen användes (Miya m.fl 2015). Principerna för metabarkodning förklaras mer utförligt i bilaga 1. Vidare användes en positiv DNA kontroll med känd artsammansättning som standard för jämförelse. Negativa kontroller analyserades för att säkerhetsställa kvalitetskrav (bilaga 2).

2.2.2. Bioinformatik och verifiering

Varje enskild art har en unik streckkod eller sekvens (se bilaga 1). 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 fisk, däggdjurs, groddjurs identitet. 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.



Redo för eDNA extraktioner (Foto: Jessica Sjöstedt)

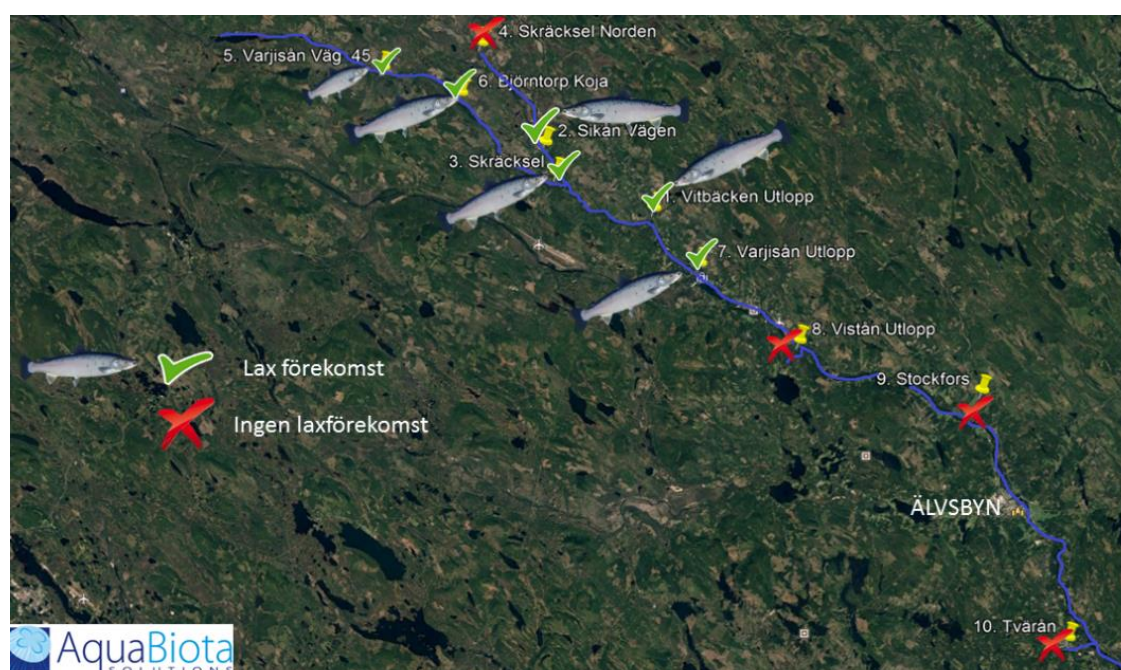
3 RESULTAT OCH KONKLUSION

3.1 Sekvenseringsresultat

I denna studie matchade 97,5% av de kvalitetssäkrade läsningarna målarterna fiskar, groddjur och däggdjur. Förutom 15 olika fiskarter, påträffades även vanlig älg, groda och mindre vattensalamander.

3.2 Arternas förekomst – sammanlagd översikt

Lax förekom vid de restaurerade provlokalerna och spår hittades även högst upp vid provpunkt 5, Varjisån Väg 45 (figur 1) eftersom små DNA mängder av lax detekterades.



Figur 1. Laxförekomst på de olika provpunkterna i Piteälven.



Tabell 2. Fiskarternas förekomst på de olika lokalerna. Förekomst av lax anges i rött.

ART	1. Vitbäcken utlopp	2. Sikån Jägen	3. Skräcksel	4. Sikån Norden	5. Varjisån väg 45	6. Björntorp koja	7. Varjisån utlopp	8. Vistån utlopp	9. Stockfors	10. Tvärån	
Braxen (<i>Abramis brama</i>)										x	
Benlöja (<i>Alburnus alburnus</i>)								x		x	
Sik (<i>Coregonus maraena</i>)					x		x				
Stensimpa (<i>Cottus gobio</i>)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Gädda (<i>Esox lucius</i>)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Gärs (<i>Gymnocephalus ceruna</i>)	x		x	x			x	x		x	
Lake (<i>Lota lota</i>)	x	x	x	x	x	x		x	x		
Abborre (<i>Perca fluviatilis</i>)		x	x	x	x	x	x	x		x	
Elritsa (<i>Phoxinus phoxinus</i>)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Mört (<i>Rutilus rutilus</i>)	x	x			x			x	x	x	
Lax (<i>Salmo salar</i>)	x	x	x		x	x	x				
Öring (<i>Salmo trutta</i>)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
Am bäckröding (<i>Salvenius fontinalis</i>)	x	x			x				x		
Harr (<i>Thymallus thymallus</i>)	x	x	x	x	x	x	x		x	x	
Nejonöga (<i>Lampetra sp.</i>)	x	x	x	x	x		x	x	x	x	
TOTALT ANTAL	15	11	11	10	9	12	8	10	10	9	11

Tabell 2 anger fiskarternas förekomst över lokalerna (närvaro/frånvaro) och tabell 3 anger den relativa biomassan angivet som antal läsningar av just den artens sekvens. Stensimpa påträffas sällan i nätfiske men påträffades i denna studie. Braxen förekom enbart vid ett lugnt biflöde. Resultaten visar att Piteälv är en artrik älv. Resultaten kommer att analyseras tillsammans med Pite älven vattenråd för jämförelser mellan eDNA och elfiske samt vidare behovsanalyser för eDNA.

Braxen (*Ambramis brama*) är en lugnvattensfisk och påträffades enbart vid det långsamt rinnande biflödet Tvärån vid provpunkt 10.

De arter som förekom på alla provlokaler var öring, stensimpa och elritsa. Nästa steg är att jämföra artlistorna från Piteälv med data från historiska provfisken. eDNA vore även lämpligt för undersökning av flodpärlmusslans utbredning, eftersom verifierade data under analys av AquaBiota har visat sig vara mycket pålitlig för detektion av sötvattensmusslor. Musselmarkörerna fungerar även utmärkt för flodpärlmusslan.

Tabell 3. Antalet eDNA läsningar per art inom de olika provlokalerna. Siffrorna anger hur många gånger en sekvens blivit läst på artnivå och anger relativ biomassa, eller arternas dominansförhållanden till varandra.

ART	LOKAL									
	1. Vitbäcken utlopp	2. Sikån Jägen	3. Skräcksel	4. Sikån Norden	5. Varjisån väg 45	6. Björntorp koja	7. Varjisån utlopp	8. Vistån utlopp	9. Stockfors	10. Tvärån
Braxen (<i>Abramis brama</i>)										617
Benlöja (<i>Alburnus alburnus</i>)							415			50
Sik (<i>Coregonus maraena</i>)					41		486			
Stensimpa (<i>Cottus gobio</i>)	16 623	9832	13023	24830	20934	13672	13505	24267	13975	9533
Gädda (<i>Esox lucius</i>)	8092	3467	2327	1938	755	1145	2627	1026	886	4887
Gärs (<i>Gymnocephalus ceruna</i>)	3129		3001	56			4431	1104		1477
Lake (<i>Lota lota</i>)	362	1031	271	1511	103	52		259	373	
Abborre (<i>Perca fluviatilis</i>)		130	736	453	1033	144	3290	1273		436
Elritsa (<i>Phoxinus phoxinus</i>)	30371	21813	31323	21739	35733	25786	20643	24782	4648	35961
Mört (<i>Rutilus rutilus</i>)	342	817			64			1471	1055	876
Lax (<i>Salmo salar</i>)	624	442	3494		47	2636	4195			
Öring (<i>Salmo trutta</i>)	11856	21966	30226	37487	28255	25667	9599	10265	49612	4405
Am bäckröding (<i>Salvenius fontinalis</i>)	2600	93			95				1306	
Harr (<i>Thymallus thymallus</i>)	3677	2403	1336	7379	729	369	4344		2237	1558
Nejonöga (<i>Lampetra sp</i>)	3248	2002	270	3008	214		2375	80	2992	6853
TOTALT ANTAL	15	11	11	10	12	8	10	10	10	11

3.3 eDNA kvalitet samt kvalitetskontroll

Kvalitetskontrollerna samt mängden följer direktiven i bilaga 3 och anges i bilaga 4.

TACK

Ett stort tack till Jan Isaksson vid Pite Älv ekonomiska förening för diskussioner innan provtagningen, engagemang, guidning till de olika provlokalerna samt diskussioner om fiskar i Piteälven. Tack till Pähr Hellström för en fantastisk fältassistans. Tack till Johan Näslund och Nicklas Wijkmark för hjälp med redigering och kommentarer av rapporten.

REFERENSER

- 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.
- Hellström, M & Spens, J.** 2017 a. eDNA - Fiskförekomst i 10 kustmynnande vattendrag, Norrbottens län AquaBiota Rapport 2017:10. 30 sid. ISBN: 978-91-85975-67-9
- Hellström, M & Spens J.** 2017 b. eDNA - Fiskinventering vid Spjutmo kraftverk. AquaBiota Rapport 2017:12. 29 sid. ISBN: 978-91-85975-69-3
- Hellström, M & Spens J.** 2017 c. eDNA - Fiskinventering vid Spjutmo kraftverk. AquaBiota Rapport 2017:12. 29 sid. ISBN: 978-91-85975-69-3
- Hellström, M., Wijkmark N & Spens, J.** 2018. Fisk inventering med hjälp eDNA i Ore Älv, Dalarnas län. AquaBiota Rapport 2018:11. 23 sid. ISBN: 978-91-85975-80-8
- 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
- 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.
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., ... & Kondoh, M. (2015). MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society open science*, 2(7), 150088.
- 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
- 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 microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(5), 635-645
- 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.
- 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.

Författarnamn i **fet stil** anger medarbetare på AquaBiota

Bilaga 1. Enarts- och flerartsanalyser vid eDNA undersökningar

Varje levande art utsöndrar genetisk arvs massa eller DNA i sin omgivning genom respiration, rörelser, filtrering, avföring, döda hudceller osv. Detta DNA som lämnas kvar i miljön utan att individen i sig provtas kallas miljödDNA eller eDNA (från engelskans environmental DNA).

Vissa delar av en arts DNA är helt unikt för just den arten, medan andra delar av DNA ser likadant ut hos alla organismer i en grupp. Med hjälp av jättelika databaser över DNA-sekvenser, som är öppet tillgängliga för alla (ex <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), kan man 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 den streckkod som används för att betala för just den enskilda varan i affärer. Dessa primers, en droppe eDNA, ett enzym och salter blandas i ett provrör. Provröret placeras i en maskin som gör DNA kopior för just den arten. Detta kallas för PCR (Polymerase Chain Reaction) och bygger på hur levande celler kopierar sin arvs massa vid celledelning.

Enartsstudier qPCR eller ddPCR levereras ej i detta projekt

Inventering av förekomst av en enstaka art med eDNA görs med så kallad qPCR. Frågeställningen för dessa studier är: **Finns art X här?** Varje art analyseras med en markör som är specifik för precis den arten. Provs varen anger närvaro/frånvaro av just den arten och en relativ eDNA-abundans mellan olika provtagningslokaler. Minst 12 qPCR replikat skall analyseras för att ge tillförlitliga resultat.

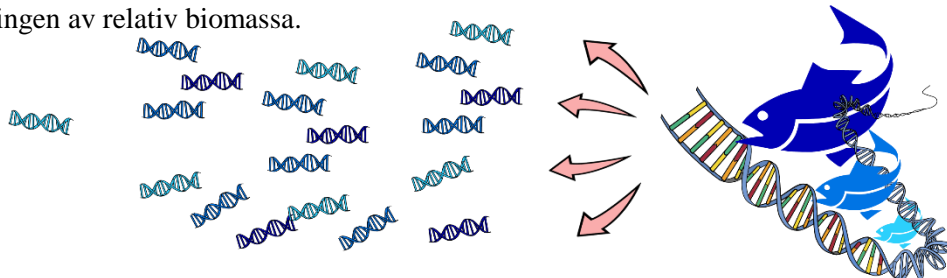
Om flera arter undersöks med enartsanalyser kan data över relativa abundanser mellan art A och art B inte jämföras med varandra eftersom markörerna för varje art skiljer sig markant från varandra. Som exempel kan nämnas att 1000 DNA kopior av gädda inte motsvarar 1000 kopior av abborre och analyserna kan inte tillförlitligt svara på vilken av arterna som är mest förekommande.

Flerartsstudier –Metastreckkodning genom NGS (Next Generation Sequencing)

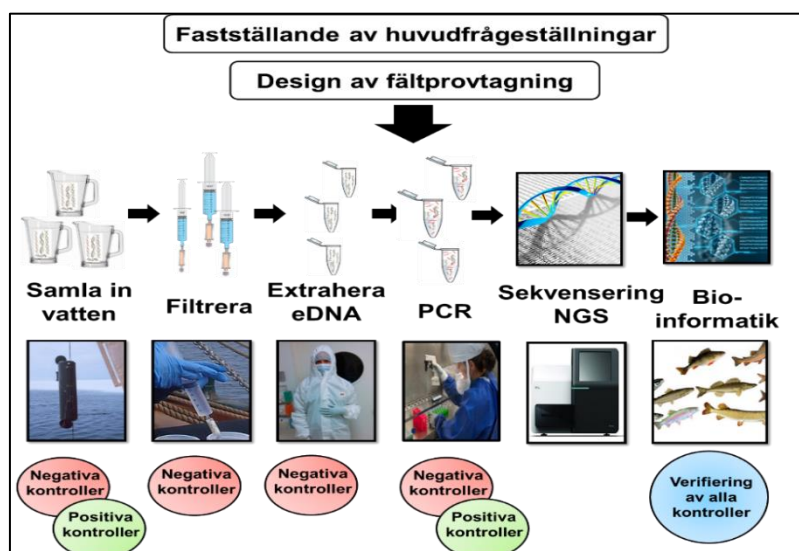
Frågeställningen för flerartsstudier är; **Vilka arter finns här och vilka av dessa är vanliga eller sällsynta?** Med andra ord behöver man inte på förhand veta vad man letar efter.

Metastreckkodning eller metabarcoding innebär att man designar en primer som är gemensam för alla arter inom en grupp – indelade exempelvis med fokus på fisk, fokus på groddjur eller fokus på musslor. Eftersom man analyserar flera olika arter på en gång kallas metoden metastreckkodning. Anledningen till att man inte kan analysera alla djurgrupper samtidigt med en primer är det inte finns lämpliga målregioner i genomen som både är gemensamma för alla arter men samtidigt varierar så pass mycket att enskilda arter kan identifieras.

Invasiva eller skygga arter kan identifieras och antalet arter som kommer upp i en analys är obegränsat. Om man inventerar 3 eller fler arter är denna metod att föredra, och blir snabbt mer kostnadseffektiv än enartsanalyser. Flerartsanalyser visar även vilka arter man har fått och vilket dominansförhållande dessa har till varandra i ett vattendrag. Med andra ord kan den relativa biomassan räknas ut. Notera dock att under parningstiden förekommer DNA av de arter som förökar sig i större mängder då könsceller släpps ut i vattnet, vilket kan interferera med bestämningen av relativ biomassa.



Bilaga 2. Kvalitetssäkring av eDNA



Figur B2-1. Flödesschema

Därför är kontrollprover nödvändiga vid eDNA-provtagning

En undersökning med hjälp av eDNA som saknar positiva och negativa kontroller kan inte ge tillförlitliga resultat. Detta gäller egentligen för alla DNA-undersökningar och innefattar alla utövare. **Om en utförare avviker från denna praxis är resultaten inte tillförlitliga och därmed oanvändbara.**

Utöver generella huvudprinciper för DNA-undersökningar (Griffiths m.fl. 2016) finns speciella regelverk för kriminaltekniska (Hedmanm.fl., 2017) och medicinska (SFMG, 2011) undersökningar. Strikta riktlinjer för ett standardiserat utövande av eDNA-undersökningar tas just nu fram inom EU med utgångspunkt från Goldberg m.fl. (2016). Dessa regler kommer att kräva negativa och positiva kontroller som ett grundläggande krav.

Negativ kontroll; Ett prov med vatten som inte innehåller DNA filtreras vid inventerade lokaler med samma provtagningsmetodik. Detta prov kallas för negativ kontroll. Vidare analyseras DNA-fria prover i olika steg av undersökningen så att man kan försäkra sig om att kontaminering inte förekommer i fält eller laboratorium och orsakar falska positiva provsvar. Om DNA-sigener för målsekvenser hittas i en negativ kontroll innebär det att undersökningen måste göras om.

Konsekvenserna av en kontaminerad negativ kontroll kan i praktiken innebära att:

- | | |
|---|--|
| a) en frisk person får en cancerdiagnos | b) fel person binds till ett brott |
| c) faderskapstest anger fel far till ett barn | d) arter som inte finns i ett område detekteras (falsk positiv) |

Positiv kontroll; En positiv kontroll innebär att ett prov som innehåller ett känt DNA testas för att verifiera att den använda metodiken fungerar som den skall. Om DNA-sigener inte hittas i en positiv kontroll innebär det att metodiken måste justeras och analysen eller undersökningen måste göras om.

Konsekvenserna av en positiv kontroll utan DNA-signal kan i praktiken innebära att:

- | | |
|---|--|
| a) en cancersjuk person blir inte diagnostiserad och dör | b) en skyldig person kan inte bindas till brottet |
| c) ett faderskapstest kan inte knyta rätt far till barnet | d) arter som finns i ett område detekteras inte (falsk negativ) |

Bilaga 3: Kvalitetskontroller som redovisas vid flerartsanalyser

1. Mängden insamlat/filtrerat vatten dokumenteras för att kunna avgöra hur mycket prov som samlats in totalt. *Alla eDNA-mätningar ställs i relation till hur mycket vatten som samlats in.*
2. Total eDNA koncentration för samtliga prov (inkl. negativa) anges. *Koncentrationen varierar avsevärt naturligt men ger ändå en första indikation om hur eDNA extraktionen lyckats.*
3. Inhibitionskontroll dokumenteras och redovisas. Inhibition betyder risk för att arter som finns i proverna inte detekteras därför att DNA inhiberas av humus etc. Detta går att åtgärda så länge inhibitionstest utförs. *Resultatet av antiinhibering före och efter utförandet redovisas så att resultatens tillförlitlighet kan bedömas.*
4. Band på gel efter målinriktad PCR dokumenteras (närvaro/frånvaro) inklusive negativa kontroller. *Detta visar att PCR har fungerat och kontroll av vilka prover som har spår av målarter, eller riskerar vara kontaminerade, kan utföras.*
5. Negativa kontroller indelade i a) fält-negativa (filter-negativa) b) extraktions-negativa samt c) PCR-negativa utförs och utfallet redovisas. *Detta möjliggör en kontroll av vilka prover som riskerar vara kontaminerade och vid vilket steg detta i så fall skett.*
6. Prov från ett artificiellt sammansatt samhälle ("mock community") används som positiv kontroll vid PCR och sekvensering. Falska positiva prover redovisas. *De positiva proverna försäkrar att PCR och bioinformatiken fungerar som avsett.*
7. Det totala antalet sekvenseringsläsningar, samt andel (%) av målarterna i läsningarna redovisas. *Detta ger en bild av hur väl sekvenseringen av målarterna lyckats.*
8. Andel sekvenser (%) av människa, ko, och gris (vildsvin) och bakterier som förekommer som bakgrundssekvenser redovisas. *Detta möjliggör en kontroll av att tillräckligt många läsningar täcker målarterna.*
9. Minst 12 PCR replikat per art/artgrupp och eDNA prov utförs. Maximalt 4 av dessa sammanslås i sekvenseringen. *Färre replikat minskar analys säkerheten avsevärt.*
10. Antal prover för en specifik MiSeq-körning (sekvensering) överstiger inte 100 stycken exklusive sekvenseringskontroller. *Detta säkerställer att antalet läsningar per prov inte ska bli alltför lågt för att kunna detektera ovanligare arter.*

Referenser:

- Goldberg, Caren S., m.fl. 2016. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*, 7.11: 1299-1307.
- Griffiths Anthony et al. 2016. *An Introduction to Genetic Analysis*. 11th edition. WH Freeman. New York. ISBN-13: 978-1464109485.
- Hedman, Johannes m.fl. 2017. Pre-PCR processing-projektet, P4 Stärkt beredskapskapacitet via rationell laboratoriediagnostik samt förenklad provberedning. -*Nationellt Forensiskt Centrum, NFC 2017-05-07. NFC Rapport Avdelningskansliet 2017:04*
- SFMG, Svensk Förening för Medicinsk Genetik. 2011. Riktlinjer för kvalitetssäkring i klinisk genetisk verksamhet. http://sfmg.se/download/riktlinjer/Kvalitetsriktlinjer/sfmg_riktlinjer-for-kvalitetssakring_rev101228.pdf

Bilaga 4: Resultat av kvalitetskontroller

Bakgrunden till kvalitetskontrollerna anges i Bilaga 3. Värderna för kontrollerna anges i tabell B4_1. DNA var rent och visade hög kvalitet. De negativa kontrollerna var negativa för målarter, mycket svag bakgrund visades för stensimpa. De positiva kontrollerna var positiva. Kontaminant-DNA tillhörande ko, gris och människa som är vanliga i reagenser och vattnet runtomkring oss togs bort från analysen.

MiSeq parvis sekvensering för Miya markören (230) baspar gav 789 509 sekvenser av vilka 90 % godkändes genom alla kvalitetsfilter. Detta är en indikation på hög kvalitet på eDNA och slutgiltigt data. Sekvenseringsdata för båda markörerna analyserades genom en pipeline som är specialdesignad av NatureMetrics Ltd. Datat testades mot både NCBI och NatureMetrics kurerade referensdatabaser.

Notera att de negativa kontrollerna visade c 60 läsningar medan proverna visade ett medeltal på 756 000. Målartskontaminering var noll för fältnegativ och visade en försumbar kontaminering av lab-negativ där sekvenserna föll bort under bioinformatikens kvalitetsgranskning, vilket betyder att proven inte har påverkat varandra under sekvenseringen. Alla negativa PCR- och sekvenserings- kontroller var negativa.

Tabell B4-1. Kvalitetsgranskning av eDNA och kontroller. eDNA koncentrationen uppmättes med Qubit Fluorometric Quantitation (Fisher Scientific). Inhiberingskontroll utfördes med qPCR. Band på gel av målarter efter PCR visar att provanalyserna har fungerat. PCR negativ innefattar 12 replikat. Procent ko och människa gäller enbart för flerartsanalyser och inte för enartsanalyser. Filtrerad volym sjövattnen anges i liter, eDNA koncentration ng/µl, inhibering samt anti-inhibering, gel Miya anger om markören Miya för målarterna visade band på gel för närvaro före sekvenseringen. Kont% anger % av sekvenser från ko, gris och människa och togs bort som naturlig kontaminering.

Provlokal	H2O V (L)	eDNA (ng/uL)	Inhibering	Anti-inhibition	Gel Miya	# PCR Miya	kont% Miya	ma kont% Miya
PT_01	1,8	1,14	Nej	Nej	Ja	12	0,01	0
PT_02	3	2,03	Nej	Nej	Ja	12	0,15	0
PT_03	3	2,74	Nej	Nej	Ja	12	0,09	0
PT_04	2,6	2,82	Nej	Nej	Ja	12	0,08	0
PT_05	3	4,50	Nej	Nej	Ja	12	0,00	0
PT_06	2,5	1,96	Nej	Nej	Ja	12	0,03	0
PT_07	3	4,20	Nej	Nej	Ja	12	0,00	0
PT_08	2,6	2,76	Nej	Nej	Ja	12	0,03	0
PT_09	1,14	2,54	Nej	Nej	Ja	12	0,41	0
PT_10	1,96	7,10	Nej	Nej	Ja	12	0,00	0
Fält neg 1	1	0,236	Nej	Nej	Nej	12	0,00	0
Lab Neg	0,5	<0,02	Nej	Nej	Nej	12	1,40	92

www.aquabiota.se