

Strandnära eDNA-analyser för inventering av fisk i Blekinges kustområde

AquaBiota Report 2018:18

Författare: Johan Näslund, Micaela Hellström & Johan Spens

STOCKHOLM, DECEMBER 2018

Beställare:

Rapporten är utförd av AquaBiota Water Research för Länsstyrelsen i Blekinge Län.

Kontaktinformation:

AquaBiota Water Research AB
Adress: Löjtnantsgatan 25, 115 50 Stockholm
Tel: +46 8 522 302 40
Mail: info@aquabiota.se
www.aquabiota.se

Kvalitetsgranskad av:

Nicklas Wijkmark (nicklas.wijkmark@aquabiota.se)

Distribution:

Fri

Internetversion:

Nedladdningsbar hos www.aquabiota.se

Citera som:

Näslund J., Hellström M. & Spens J. 2018. Strandnära eDNA-analyser för inventering av fisk i Blekinges kustområde. AquaBiota Report 2018:18. 24 sid.

AquaBiota Report 2018:18

Projektnummer:

ISBN: 978-91-85975-87-7

ISSN: 1654-7225

© AquaBiota Water Research 2018



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 små mängder vatten (0,1 – 5 liter) och genom molekylära analyser ange vilka arter som befinner sig inom ett område utan att man varken ser eller fångar organismen. eDNA ger en uppskattning artförekomst om nutid eftersom DNA i vatten sönderfaller inom några dagar efter det att en specifik art lämnat miljön.

Denna rapport redovisar resultaten från en eDNA-metabarkodningsanalys av fisk i 10 strandnära prover tagna längs med kusten från Ölandsbron till Ystad och jämför resultaten med alla tillgängliga data från nätprovfisken inom samma kustområde. En direkt metodjämförelse är inte möjlig då olika lokaler provtagits med de olika metodikerna, provtagning har skett under olika säsonger och syftena med undersökningarna skiljer sig. Vid de 1570 nätprovfisken som utförts på 899 stationer i studieområdet (Östra Skåne, Blekinge och Södra Kalmar) 2002–2018 identifierades 60 978 fiskar av 43 arter med i medeltal $4,1 \pm 0,1$ arter (95% konfidensintervall) per provfiske. Från de 10 eDNA-proverna tagna i samma studieområde, men enbart från strandnära lokaler, detekterades 36 fiskarter med i medeltal $14,2 \pm 1,7$ arter per provtagning. Med antagandet att data från nätprovfiskena och e-DNA inventeringarna är direkt jämförbara behövs ca 400 nätprovfiskade stationer i studieområdet för att detektera samma antal arter som tio eDNA-prov, vilket motsvarar en fångst av ca 15 000 fiskar. Vid nätprovfiskena fanns även registrerade bifångster av sjöfåglar, bland annat den rödlistade ejdern (*Somateria mollissima*). eDNA-analyserna detekterade både rödlistade arter samt främmande arter.

INNEHÅLL

Sammanfattning.....	3
Innehåll.....	4
1. Inledning	5
2. Material och Metoder	5
2.1. Fältarbete – eDNA	5
2.2. Laboratoriearbete – eDNA	6
2.3. Datasammanställning – nätprovfisken	8
3. Resultat och diskussion	8
Referenser	17
Bilaga 1. Enarts- och flerartsanalyser vid eDNA undersökningar.....	19
Bilaga 2. Kvalitetssäkring av eDNA	20
Bilaga 3: Kvalitetskontroller som redovisas vid flerartsanalyser	21
Bilaga 4: Vetenskapliga namn på identifierade fiskar i studien.....	22

1. INLEDNING

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). En annan begränsning av konventionella metoder är att sällsynta, invasiva och svårångade arter inte upptäcks, och deras förekomst underrapporteras vilket ger stora felmarginer i insamlade data (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 ser eller fångar organismen. Eftersom eDNA i vattenmassan är relativt kortlivat ger analyserna en bild av artförekomst i nutid (uppskattningsvis ca 2-10 dagar). 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 flera arter än vad standardiserade provfisken gör (Hänfling m.fl. 2016, Hellström & Spens 2017 a, b, c, Hellström m.fl. 2018). eDNA-metodiken är särskilt lämplig för arter som är svåra att samla in eller att identifiera morfologiskt.

2. MATERIAL OCH METODER

2.1. Fältarbete – eDNA

I oktober 2017 utförde AquaBiota vattenprovtagningar för eDNA vid 10 lokaler längs med kusten från Färjestaden vid Ölandsbron till Ystad i Sydöstra Skåne. eDNA-provtagningen i studien var avgränsad till lokaler som kunde provtas utan tillgång till båt. Provtagningpunkter anges i Tabell 1 och Figur 2. Provtagning utfördes vid platser där svartmunnad smörbult är känt etablerad, vid platser där den misstänktes förekomma samt vid utvalda hamnar. Syftet med provtagningen var inte att samla in data för jämförelser mot nätprovfisken. Vattentemperaturen mätte 10,6–13,8 °C i proverna (vatten insamlat från 0–0,5m djup).

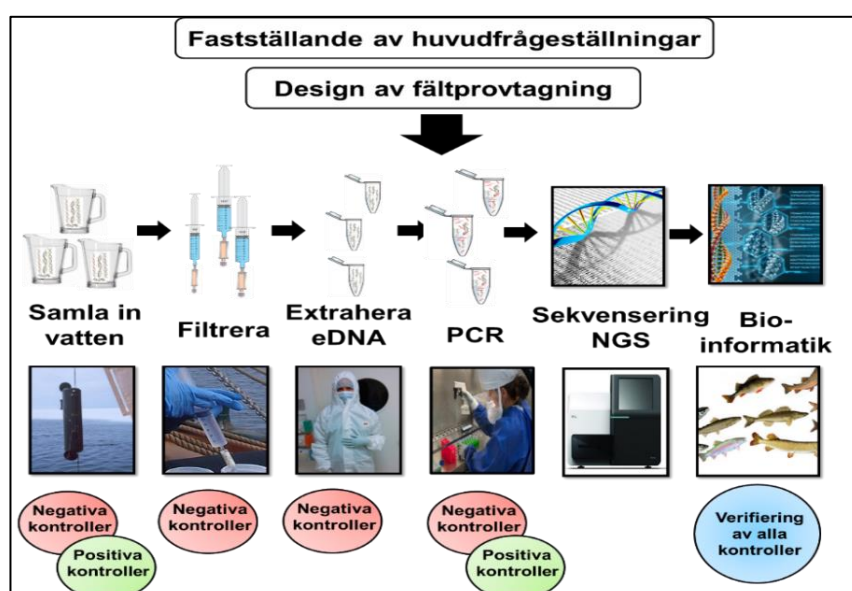
Innan provtagningen genomfördes i fält, steriliserades all provtagningsutrustning. Filtreringsutrustning köptes in som sterila DNA-fria engångsförpackningar. På de provtagningspunkterna samlades 6 liter vatten in i form av 10 stycken underprover 50 ml i vardera riktningen från provpunkten. Vattnet blandades och filtrerades. Negativa fältkontroller utgjordes av rent vatten som hanterades med samma provtagningsutrustning och filtrerades i fält för att utesluta kontaminering av DNA mellan prover eller från provtagare. Insamling och fixering följde Spens m.fl. (2017).

Tabell 1. Provpunkter. Latitud och longitud anges som decimalgrader i WGS84, datum och tidpunkt för provtagningen samt vattentemperatur.

Provpunkt	Latitud	Longitud	Datum	Tid	H ₂ O °C
1. Färjestaden, småbåtshamn	56,649	16,464	15 okt	15:35	13,8
2. Kristianopel, fiskehamn	56,256	16,044	15 okt	11:08	12,5
3. Karlskrona, hamnområde	56,157	15,594	15 okt	10:20	12,7
4. Tromtö, bro	56,165	15,460	15 okt	09:50	13,1
5. Ronneby, hamnområde	56,169	15,307	15 okt	09:29	12,5
6. Pukavik, Blekinge	56,160	14,685	14 okt	09:56	11,9
7. Tosteberga, fiskehamn	55,997	14,445	14 okt	11:24	12,2
8. Vitemölla, fiskehamn	55,699	14,207	14 okt	14:09	10,6
9. Kåseberga, småbåtshamn	55,383	14,063	14 okt	15:59	12,7
10. Ystad, hamnområde	55,425	13,815	14 okt	17:26	13,6

2.2. Laboratoriearbete – eDNA

2.2.1. Extraktion, PCR och sekvensering



Figur 1. Flödesschema som visar de olika stegen för eDNA undersökningar.

Flödesschemat i Figur 1 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. Proverna analyserades med flerartsanalyser för förekomst av fisk. Varje PCR prov utfördes i 12 replikat som sammanslogs under bioinformatiken. Markörer som amplifierar rDNA på 12S genen användes för fisk (Miya m.fl 2015). Principerna för metabarkodning förklaras mer utförligt i bilaga 1. Vidare användes en positiv DNA "mock community" kontroll med känd artsammansättning av tropiska fiskar som standard för jämförelse. Negativa kontroller analyserades också för att bedöma kvalitetsparametrar (se bilaga 2).

2.2.2. Bioinformatik och verifiering

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. Sekvenserna lagrade hos NCBI är endast delvis kurerade (verifierade av taxonomer) och kan ibland vara felaktiga. Efter kvalitetsfiltrering av data kördes därför alla sekvenser även mot en kurerad databas över alla Europas fiskar som upprätthålls av NatureMetrics Ltd. Artidentifiering baserar sig på fullständig match mot en referens. I vissa fall kan arter ha en likadan sekvens och då nämns båda arterna i resultattabellerna. Databaserna uppdateras löpande och arter som inte har referenssekvenser inkluderas när de blir tillgängliga. Naturhistoriska Riksmuseet i Stockholm innehar en databas på mitokondriella genomet hos Sveriges alla fiskarter vilka förväntas bli allmänt tillgängliga eftersom denna information har stor samhällsnytta och sparar på resurser för att förbättra eDNA resolution på artnivå.

De olika sekvenserna matchades mot databasen och fick på så sätt fisk, däggdjurs och groddjurs identitet. Tack vare nya framsteg inom metabarkodning är det möjligt att få träffar på artnivå istället för enbart familje- eller genusnivå för många djurgrupper. Antalet läsningar per art gav en relativ uppskattning av hur mycket eller litet arten förekom i ett prov.

Ju mer DNA från en viss fisk i provet, desto fler läsningar. Förenklat så är den relativa mängden DNA från en viss art proportionellt mot den relativa biomassan i samhället. Det finns arts specifika faktorer som komplicerar till det hela en del, vilket man måste justera för (exempelvis kopieras vissa arters DNA mer effektivt än andras). Detta beror även på hur proverna samlas in samt analyseras så det finns många studier med annan metodik som inte ser detta samband men det finns flera studier i dammar och sjöar som visar att det är en god överensstämmelse mellan den relativa andelen DNA-träffar och den relativa andelen biomassa. Det är mycket som påverkar så det är inte ett 100%-igt samband men det är absolut inte heller för nätprovfisken.

Sambandet biomassa och antalet läsningar finns att hämta i Hänfling mfl, 2016, Evans mfl 2016 och Ushio mfl 2018. Osäkerheterna är minst lika stora som för nätprovfiske men det är svårt att dra några generella slutsatser med det kunskapsläge vi har idag. Från AquaBiotas ännu opublicerade studier i extremt väl undersökta svenska sjöar finns ett

tydligt samband mellan relativa biomassa av fisk och antalet lästa DNA-sekvenser för en specifik art. Samma sak gäller för de skotska sjöar som Hänfling mfl (2016) har undersökt.

2.3. Datasammanställning – nätprovfisken

Data från nätprovfisken utförda på uppdrag av Länsstyrelsen i Blekinge Län på 89 positioner under 2018 (data tillhandahölls av Jenny Hertzman, Länsstyrelsen) samt provfisken från 2002-2017 i SLU Aquas databas KUL (dataägare Naturvårdsverket, Länsstyrelsen samt Havs- och vattenmyndigheten) sammanställdes i en databas. Det sammanlagda data utgjorde 1570 nätprovfiskena på 899 positioner i studieområdet Östra Skåne, Blekinge och Södra Kalmars Län med 60 978 infångade och identifierade fiskar. Data från kustfiskeövervakningen utförd av SLU fanns inte uppfört i databasen i November 2018 då data för denna rapport analyserades.

3. RESULTAT OCH DISKUSSION

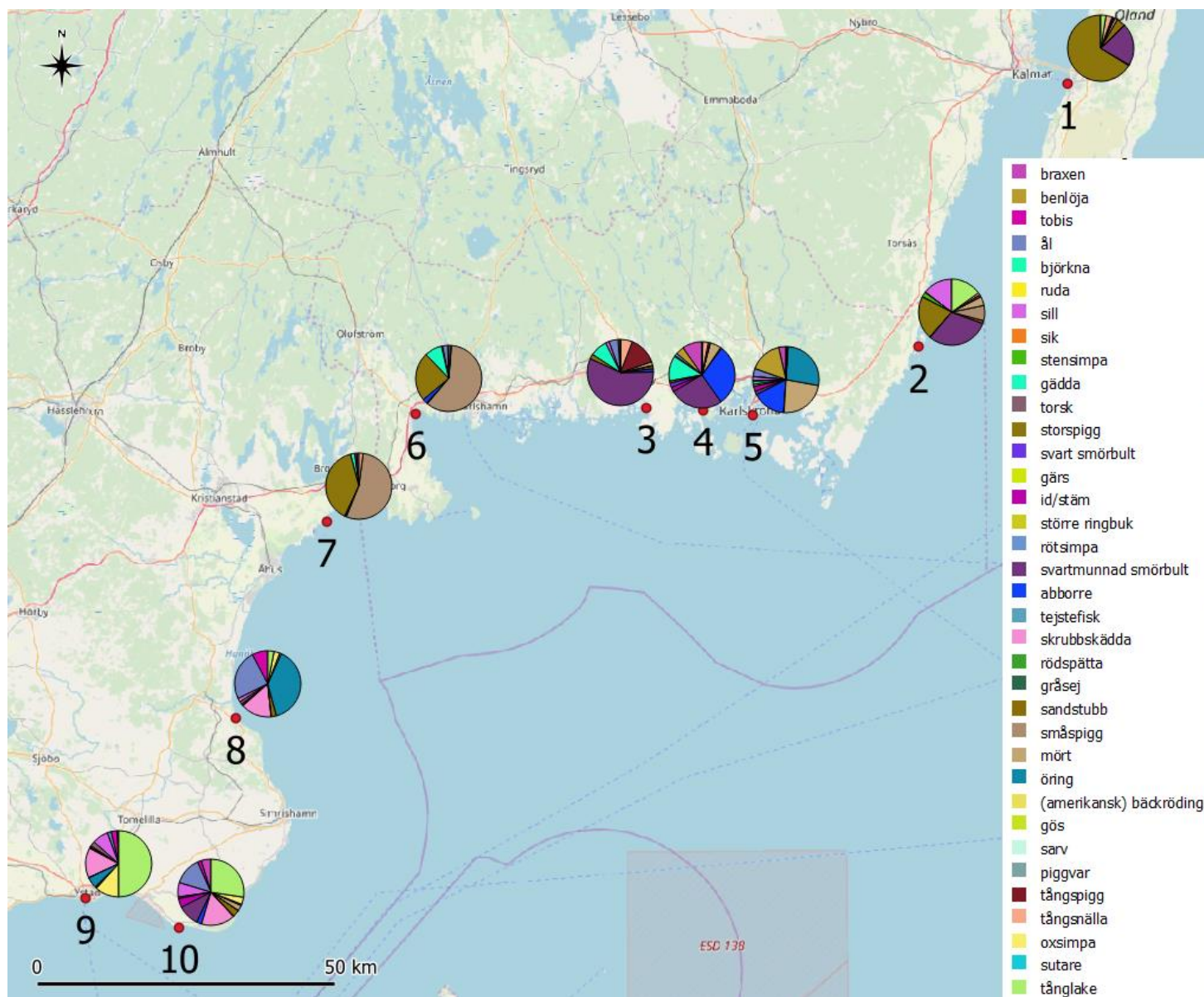
De vanligast förekommande arterna på lokalerna provtagna med eDNA-proverna var sill, storspigg, småspigg, mört, benlöja, sandstubb och ål som alla förekom på 7 av 10 lokaler (Tabell 2). Provfiske med nät utfördes för länsstyrelsen i Blekinge i Blekinge skärgård 2018 där förvånansvärt mycket spår av ål påträffades i näten (Johan Spens pers. kommunikation). Se bilaga 4 för vetenskapliga namn på fiskarna i studien. De vanligast förekommande arterna i de 1570 nätprovfiskena var abborre (detekterad vid 1105 provfisken), mört (931 detektioner) sill (503 detektioner), benlöja (463 detektioner) och skrubbskädda (457 detektioner). Vid de 1570 nätprovfiskena som utförts detekterades totalt 43 arter med i medeltal $4,1 \pm 0,1$ arter (95% konfidensintervall) per provfiske och 18 arter detekterades i mindre än 1 % av provfiskena. Vid de 10 eDNA-stationerna som analyserades i studieområdet detekterades 36 arter med i medeltal $14,2 \pm 1,7$ arter per provtagning. Abborre skulle troligtvis ha dominerat nära typiska abborrlokaler. Proverna togs i oktober och provtagningen var riktad mot svartmunnad smörbult.

Tabell 2A. Andel biomassa (%) av målarterna fiskar inom varje lokal. *antalet läsningar på kusttobis/havstobis ** antalet läsningar på id/stäm *** antalet läsningar på släktet Zoarces (se text för mer information).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
braxen				9.7	3.6				0.8	4.8
benlöja	0.1	0.1	1.1	4.1	16.1	0.5	1.0			
kusttobis/havstobis*	0.2						1.0	7.7	2.8	1.8
ål			4.5	1.3	3.8	2.6		24.6	1.9	13.7
björkna				0.5	0.1					
ruda	0.0									
sill		14.5	1.7		2.1	0.5		1.8	7.8	7.0
sik		0.3			0.2					
stensimpa		2.4								
gädda		0.1	8.5	12.4	1.5	8.6	2.0			
torsk								1.4	2.5	0.8
storspigg	65.9	21.0	2.3	1.1		24.0	38.9	0.6		
svart smörbult		0.2		2.1			0.3			
gärs					1.0					
id/stäm**	0.4	0.2		2.3	2.5				0.7	4.4
större ringbuk									0.3	
rötsimpa									0.3	
svartmunnad smörbult	20.5	30.6	57.1	26.3	1.8					10.4
abborre	0.0		1.6	30.1	16.3	2.3				2.4
tejustefisk								0.3		
skrubbskädda	0.3					0.2	0.5	15.1	14.7	16.4
rödspätta								0.2	0.2	0.2
gråsej										0.2
sandstubb	4.1	1.4	1.3		0.2	0.3		2.4		3.3
småspigg	1.5	7.5	0.3	0.6		59.9	54.1			0.2
mört	0.1	4.4	1.8	5.5	23.1	0.4				2.7
öring				0.3	26.8			39.0	5.3	0.7
bäckröding						0.1				
gös	0.4									
sarv				0.7	0.3	0.8				
piggvar	0.6							0.9	0.4	
tångspigg	0.1	1.2	13.8						0.5	
tångsnälla	3.0	1.1	5.7	2.7	0.3		2.0			
oxsimpa								2.8	11.7	3.5
sutare				0.3	0.4					
Tånglake***	2.6	15.0	0.2					3.0	50.0	27.4
Summa	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Antal arter	16	15	13	16	17	12	8	13	15	17
Shannon H'	1,12	1,89	1,54	1,99	1,97	1,19	0,99	1,73	1,67	2,23

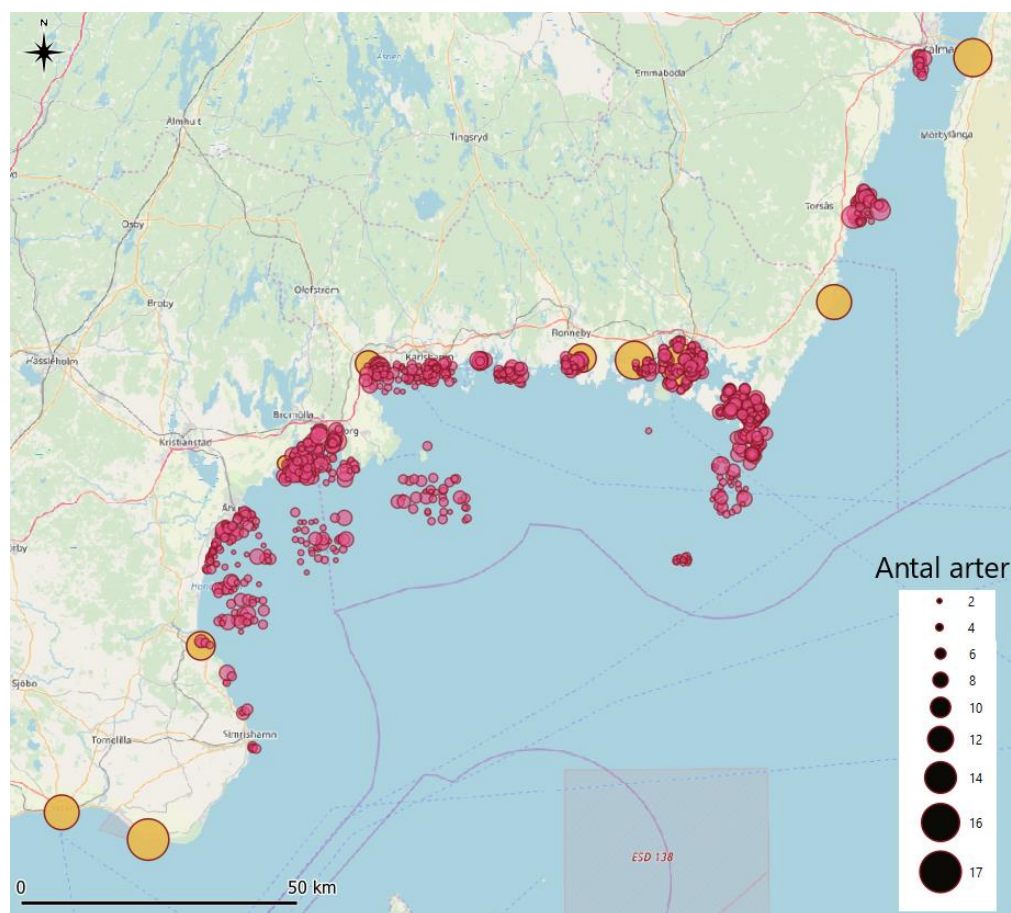
Tabell 2B. Antal eDNA-läsningar på målarterna fiskar inom varje lokal. Antalet läsningar på kusttobis/havstobis ** antalet läsningar på id/stäm *** antalet läsningar på släktet Zoarces (se text för mer information).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
braxen				4773	1448				279	1008
benlöja	48	53	416	2010	6532	143	363			
kusttobis/havstobis	148						349	2826	973	384
ål			1630	649	1564	750		9009	663	2854
björkna				245	43					
ruda	37									
sill		7240	626		837	134		670	2670	1460
sik		148			99					
stensimpa		1202								
gädda		67	3082	6084	597	2493	705			
torsk								520	847	167
storspigg	51453	10526	846	563		6972	13500	233		
svart smörbult		87		1028			118			
gärs					397					
id/stäm	336	96		1114	1010				228	923
större ringbuk									106	
rötsimpa									112	
svartmunnad smörbult	16018	15331	20725	12917	727					2179
abborre	36		590	14804	6622	664				511
tejstefisk								118		
skrubbskädda	240					62	187	5535	5006	3436
rödspätta								60	61	36
gråsej										41
sandstubb	3239	698	490		84	91		892		687
småspigg	1202	3736	96	281		17427	18783			43
mört	57	2188	652	2691	9398	102				555
öring				166	10918			14302	1818	143
bäckröding						32				
gös	346									
sarv				348	126	237				
piggvar	504							318	133	
tångspigg	83	607	5011						181	
tångsnälla	2377	549	2068	1314	128		708			
oxsimpa								1030	4011	733
sutare				171	160					
tånglake	2001	7508	74					1115	17070	5729
Summa	78125	50036	36306	49158	40690	29107	34713	36628	34158	20889



Figur 2. Översiktskarta med provtagningslokalerna (röda punkter) och pajdiagram med fördelningen av fiskarter per lokal (andel eDNA-träffar). Se tabell 2 för exakta värden för antal träffar per art vid respektive lokal. Bakgrundskarta © OpenStreetMap contributors, CC-BY-SA.

Fisksamhällen inventerade med eDNA skiljer sig från de som normalt detekteras i traditionella nätprovfisken. Den största skillnaden att betydligt fler antal arter detekteras med eDNA-provtagning per provtagen station (Figur 3). Att till viss del andra arter detekterats än vid nätprovfisken är inte förvånande och beror på många faktorer. Till exempel så inriktar sig eDNA provtagningen på en strandnära miljö som sällan provfiskas, nästan alla provfisken i området görs med nätfiske under augusti, vilket gör att både säsong samt provtagningsplats skiljer sig åt (nätfiske måste utföras på djupare lokaler). Det är dessutom väl känt att rörliga och pelagiska arter är överrepresenterade vid nätprovfisken till skillnad från bottenlevande arter. Vid fiskinventeringar med eDNA i sjöar och vattendrag har det visat sig att bottenlevande arter ofta är vanligare än man tidigare trott just på grund av detta metodfel.



Figur 3. Översiktskarta där storleken på punkterna reflekterar antalet funna fiskarter per lokal i studieområdet. Nätprovfisken är markerade med rosa punkter och eDNA provtagningslokalerna med orangea punkter. Bakgrundskarta © OpenStreetMap contributors, CC-BY-SA

De fiskarter som inte detekterades med de 10 kustnära eDNA-proverna men hittats med nätprovfiske i Blekinge län är antingen sällsynta i datat: horngädda (0,1% av nätprovfiskena), mindre havsnål (0,5 % av nätprovfiskena), nors (1,2 % av nätprovfiskena), sandskädda (0,3% av nätprovfiskena), vitling (0,3 % av nätprovfiskena) eller lever pelagiskt på djupare vatten: skarpsill (9,8 % av nätprovfiskena) eller

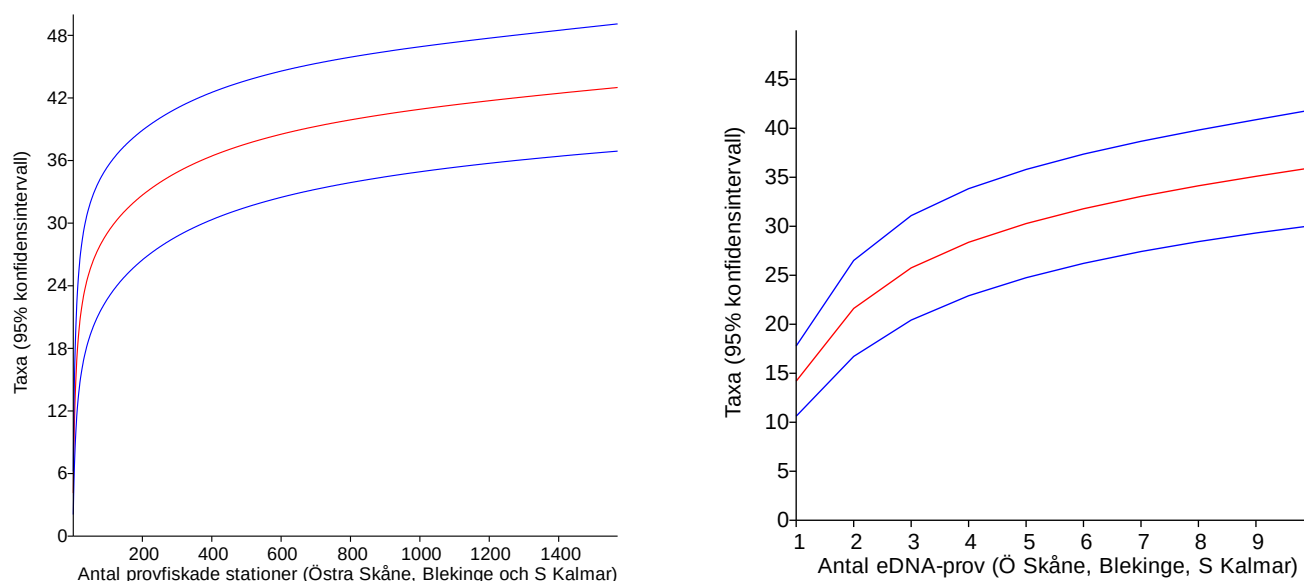
uppehåller sig på djupare vatten vid den provtagna perioden: vimma (3,3 % av nätprovfiskerna) och tobiskung (6,5 % av nätprovfiskerna).

Det är viktigt att notera att provfiskerna utförts på helt andra platser samt vid en annan säsong än eDNA-inventeringen, vilket gör en direkt jämförelse omöjlig men några generella slutsatser kan ändå dras. För att kunna jämföra resultaten från traditionella provfiskeri i havsmiljön med eDNA-inventeringar måste provtagningarna utföras under samma säsong/tid och på samma lokaler, liknande det som redan gjorts i extensivt provfiskade sjöar och rinnande vattendrag i bland annat Storbritannien, Frankrike och Sverige. Med antagandet att datat i studieområdet från nätprovfiskeri och eDNA-inventeringarna trots allt är direkt jämförbara skulle det enligt så kallade artackumulationskurvor behövas ca 400 nätprovfiskade stationer i studieområdet för att detektera samma antal arter som tio eDNA-prov, vilket motsvarar ca 15 000 fiskar (Se Figur 4). På motsvarande sätt kan man förväntas hitta ca 15 ± 5 fiskarter (95%-konfidsensintervall) med 10 nätprovfiskelokaler i studieområdet vilket kan jämföras med de 36 arter som hittades med eDNA-inventering.

Tabell 3. Kvalitetskontroll av eDNA och kontroller. Volym anger medelvolum filtrerat vatten i de två replikaten. eDNA koncentrationen uppmättes med Qubit Fluorometric Quantitation (Fisher Scientific). Inhiberingskontroll utfördes med qPCR, antiinhibering anger om denna utfördes. Band på gel av målarter efter PCR visar att provanalyserna har fungerat, PCR negativ innefattar 12 replikat. Andel (%) icke målartsläsningar anger hur stor andel av det totala antalet läsningar som träffat icke-målarter per prov. Människa (%) anger hur stor andel av läsningarna som är på människa i provet.

	Volym filtrerat vatten (ml)	eDNA konc. (ng/ul)	Inhi-bering	Anti- inhibering	Band på gel	PCR replikat per markör	Icke-målart %	Männi ska %
1	3000	11	Nej	Nej	Ja	9	0	0
2	660	6	Nej	Nej	Ja	9	0,35	0,13
3	1500	5	Nej	Nej	Ja	9	0,50	0,27
4	1440	8	Nej	Nej	Ja	9	0	0
5	1200	6	Nej	Nej	Ja	9	0,24	0,10
6	660	5	Nej	Nej	Ja	9	1,42	1,25
7	1000	10	Nej	Nej	Ja	9	0,43	0,27
8	1000	8	Nej	Nej	Ja	9	0	0
9	1200	8	Nej	Nej	Ja	9	0,11	0
10	270	6	Nej	Nej	Ja	9	0	0
Fältneg	450	1	Nej	Nej	Ja	9	100	40
Labneg	-	<0,01	Nej	Nej	Nej	9	85	39

Antalet fiskar som fångats i svenska provfiskeri var totalt 6 411 934 individer under 2016 enligt Jordbruksverket (Ljung&Bornestaf, 2018), vilket ger ett betydande antal fiskar som avlivas med främsta syfte att samla in information om biologisk mångfald. I några av nätprovfiskerna som sammanställts i studieområdet förekom även bifångster i form av sjöfåglarna skäggdopping samt ejder (listad som VU, sårbar på svenska rödlistan). Denna typ av bifångster är dock relativt sällsynta och risken för bifångster varierar mellan olika områden. Vid eDNA-inventeringar är risken för bifångster av exempelvis hotade fågel- och däggdjursarter obefintlig, samtidigt som inga fiskar behöver skadas, plågas eller dödas till skillnad från nätprovfiskeri.



Figur 4. Artackumulationskurvor som visar hur många taxa (fiskarter) man förväntas kunna hitta i området vid ett visst antal nätprovfiske (vänster) och eDNA-prover (höger). De röda linjerna visar medelvärden och de blå linjerna 95%-konfidensintervall.

Då eDNA är relativt kortlivat i vattenmiljön (normalt några dagar till 2 veckor) ger resultaten en bild av fisksamhället för en kort period innan provtagningstillfället. Detta medför att målarter av särskilt intresse som utnyttjar områden under en begränsad period av året, för exempelvis lek, är det av vikt att genomföra provtagningen när förhållandena är lämpliga och vid rätt vattentemperatur. Detta gäller naturligtvis även inventeringar med nätprovfiske. Exempelvis lever svartmunnad smörbult (*Neogobius melanostomus*) normalt på djupare botten under vintern och är därför lämpligast att provta vid strandnära lokaler under vår, sommar och höst (vattentemperatur över ca 9°C).

Erfarenheter av eDNA-provtagning och metabarkodning i havsmiljön är i dagsläget begränsade men ny forskning i områden med tidvatten (Kelly mfl, 2018) har visat att strandnära samhällen inventerade med eDNA är liknande mellan tidvattencykler men att det relativa bidraget från icke-strandnära arter till samhället förändras när fysikalisk-kemiska vattenparametrar förändras (dvs när olika typer av vattenmassor kommer in med olika tidvattenscykler). Inventeringar med eDNA längs 4 km långa transekter ut från kusten har även visat att inventerade samhällen skiljer sig inom transekterna och att skillnader mellan samhällen ökar med ökat geografiskt avstånd (O'Donnell mfl 2017). Det finns även en stor utspädningseffekt av eDNA i havsmiljön på grund av de stora vattenvolymer. En viktig fråga för pågående och framtida studier är hur den rumsliga och temporala spridningen av akvatiskt eDNA fungerar i olika miljöer och hur inventeringsdata matchar traditionella provtagningsmetoder (Shelton mfl, 2016). Det vi kan säga idag är att majoriteten av eDNA-läsningarna för prover tagna i strandnära miljöer representerar den provtagna miljön (på en skala mellan några hundratals meter till kilometer) och kan ha mindre inslag av arter som lever längre ut från stranden genom

att DNA transporteras med vattenrörelser. För att kunna svara på frågan om på vilket avstånd fiskarter kan detekteras med eDNA i havsmiljön behövs fortsatt forskning men vi vet redan idag att det är ett komplext svar och att det är väldigt plats- och metodberoende. Genom uteslutningsmetoden kunde en del fiskar artbestämmas även om de inte direkt gick att identifieras till artnivå med den genetiska markör och det genetiska referensbibliotek som använts. Tånglake identifierades genetiskt till genusnivå (*Zoarces*) men tånglake (*Zoarces viviparus*) är den enda arten i släktet som förekommer i Östersjön. Id/stäm är så närbesläktade att de inte kunde skiljas åt genetiskt med den markör som använts. Id är också en art som hybridiserar med flera karpfiskar i olika släkten och är därmed i många fall väldigt svår att identifiera på artnivå morfologiskt. För att kunna identifiera alla taxa direkt till artnivå kan flera genetiska markörer användas, vilket dock har nackdelen kostnaden för provanalys ökar. Det genetiska referensbiblioteket som finns tillgängligt förbättras även kontinuerligt, främst via olika taxonomiska forskningsprojekt och det är viktigt att detta arbete fortsätter på global nivå. Problematiken med att närbesläktade arter inte alltid kan skiljas åt förekommer även vid traditionella inventeringar av fisk (exempelvis skiljer man sällan på kusttobis/havstobis i den nationella miljöövervakningen) och är ofta särskilt problematiskt när det gäller identifiering av fisklarver och juveniler, vilka dessutom är svåra att fånga in med traditionella metoder.



Figur 5. Jämförelse mellan traditionella fiskemetoder och eDNA.

I denna undersökning var målet att detektera strandnära fiskarter, deras förekomst/icke förekomst samt relativa biomassa vid de olika provpunkterna. Detta utfördes med hjälp av artmarkörer. För analyser av lek av tex. gädda och sik kan prover tas vid lektiden och efteråt, eftersom eDNA är oproportionerligt högt för arter vid lek. Artspecifika analysmetoder existerar som kan bekräfta lek vid provtagingstillfälle och ange gameter av arter i vattnet.

Analys av eDNA med metabarkoding är en metodik som kan användas för att inventera och tydligt visa den mångfald av fiskarter som förekommer längs med den svenska Östersjökusten. Trots att lokalerna som har provtagits i flera fall ligger i eller i nära anslutning till påverkade områden som hamnar visar de upp en hög grad av biologisk mångfald i form av antal fiskarter. I 9 av 10 eDNA-prover identifierades även minst en rödlistad fiskart i jämförelse med ca 1 av 3 nätprovfisken (530 av 1570). Ål är listad som akut hotad (CR) på Sveriges, HELCOMs samt den globala rödlistan (CR). Sik är listad som sårbar (VU) på den globala rödlistan (Freyhof, 2011) och starkt hotad (EN) på HELCOMs rödlista. Torsk är listad som sårbar (VU) på den svenska samt HELCOMs rödlista.

HELCOMs rödlista har även listat tånglake och piggvar som nära hotad (NT) och öring som sårbar (VU).

I både eDNA-proverna samt nätprovfisken från de senaste åren var det vanligt med fynd av den invasiva främmande arten svartmunnad smörbult, vilken nu utgör en signifikant andel av fisksamhället i Blekinge. Det relativa antalet eDNA-träffar för flerartsstudier med metabarkodning på fisksamhällen har i flera studier visat vara proportionellt till relativa abundanser av fiskars biomassor med R^2 -värden för regressioner mellan ca 0,6–0,9 (se exempelvis Hänfling mfl, 2016, Evans mfl 2016 och Ushio mfl 2018) och sambandet anses idag vara relativt gott till skillnad för några år sedan. Det finns dock många faktorer som påverkar sambandet mellan antalet eDNA-läsningar och biomassor, bland annat vattentemperatur och kan påverkas starkt av metodval som val av genetisk markör, anpassningar av laboratorieanalyser samt bioinformatiken (Pont mfl, 2018). Mycket forskning pågår kring hur eDNA-inventeringar ska kunna ge tillförlitligare uppskattningar av relativa biomassor i fisksamhällen och ett stort metodsteg framåt har varit var inkluderingen av en intern standard i form av positiva kontrollsamhällen till prover (se exempelvis Ushio mfl 2018). Noterbart är också att vattentemperatur även är en faktor som kraftigt påverkar nätprovfisken med nordiska översiktsnät (se exempelvis Linløkken & Haugen 2006 och Olin mfl, 2017). Exempelvis har en norsk studie i sjöar visat att en ökning eller sänkning av vattentemperaturen med 5°C från ett fångstoptimum för abborre vid 15°C får en medeleffekt på fångsten som motsvarar ungefär en halvering av populationsdensiteten av abborre (Linløkken & Haugen 2006).

I eDNA-proverna detekterades även bäckröding som likt svartmunnad smörbult är en art som inte är inhemsk i Sverige. Bäckröding, ibland kallad amerikansk bäckröding, har sitt ursprung i Nordamerika och har satts ut i svenska vattendrag och sjöar från slutet av 1880-talet, inklusive i Blekinge. Det är dock väldigt ovanligt att den hittas i Östersjön, men individer har hittats exempelvis vid Upplandskusten och det är känt att arten kan vandra ut till havet en tid för att sedan återvända till sötvatten. Detektionen skulle därmed kunna handla om någon enstaka individ som har vandrat ut till havet eller kontamination från avlopp eller fiskrensning. Detektionen kan även bero på rensad fisk som använts för bete i ryssja/långrev.

Den relativt höga andelen öring vid provtagningsplatserna i Ronneby och Vitemölla kan bero på eDNA-rester från fångad och rensad fisk, inte osannolikt att det skett eftersom proverna tagits i anslutning till hamnar där fiskefartyg lägger till. För att eDNA-analyser ska ge en rättvisande bild av fisksamhället i provtagningspunkten och inte inkludera exempelvis fisk insamlad av fiskare bör provtagning utföras vid platser med lägre grad av mänsklig aktivitet. En relaterad problematik att utsläpp från reningsverk och enskilda avlopp, samt avföring från rovdjur också kan utgöra en källa till eDNA. eDNA-metodiken är också mycket känslig för kontaminering och det är nödvändigt att både positiva och negativa kontrollprover används i alla genetiska studier (se Bilaga 2 och 3). Fågelavföring kan även innehålla eDNA som ger signaler. Detta kan verifieras genom att undersöka förekomsten av fågelsekvenser med markörer som detekterar en större vidd av ryggradsarter.

Kostnaden för att inventera 10 eDNA-prover tagna i de delområden som de två nätprovfiskerna i Blekinge 2018 (med båt samt analyser och rapport) uppskattas i dagsläget till en storleksordning av ca 30–50 % av kostnaden för de båda provfiskestudierna tillsammans men kostnadsjämförelser är svåra då olika typer av data samlas in med de olika metoderna och kostnaden per prov för eDNA-inventeringar minskar med ett ökat antal prover i samma område. För att kunna bedöma kostnadseffektivitet med olika metoder måste syftena för datainsamlingen definieras. Om syftet är att inventera biologisk mångfald i form av antalet fiskarter i akvatiska miljöer är redan idag eDNA-inventeringar mycket kostnadseffektiva. Om syftet däremot är att exempelvis utvärdera fisksamhällets storleksfördelning (längd och vikt för respektive fiskart) är eDNA inte kostnadseffektivt då ingen information om fiskars antal eller individuella storlek fås med metoden. Om vi antar att de monetära kostnaderna för att detektera alla fiskarter inom ett visst område med eDNA-metodik och nätprovfisken är motsvarande finns ändå starka etiska fördelar med e-DNA. Genom att eDNA är en icke-destruktiv metod så finns fördelar ur ett djurskyddsetiskt (flera tusen fiskar behöver inte avlivas eller utsättas för smärta vid nätfångsten) samt bevarandeetiskt perspektiv (vi behöver inte skada eller störa den biologiska mångfald vi vill skydda).

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.
- 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
- 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.
- Evans, N. T., B. P. Olds, M. A. Renshaw, C. R. Turner, Y. Li, C. L. Jerde, A. R. Mahon, M. E. Pfrender, G. A. Lamberti & D. M. Lodge, 2016. Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources* 16: 29–41.
- Freyhof, J. 2011. *Coregonus maraena*. The IUCN Red List of Threatened Species 2011: e.T135672A4176316. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T135672A4176316.en>.
- 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.
- Kelly, RP, 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
- Kelly RP, Gallego R, Jacobs-Palmer E. (2018) The effect of tides on nearshore environmental DNA. *PeerJ* 6:e4521 <https://doi.org/10.7717/peerj.4521>
- Kornis, M.S. Twenty years of invasion: a review of round goby *Neogobius melanostomus* biology, spread and ecological implications. *J Fish Biol.* 2012 Feb;80(2):235-85.
- Kullander, O, Nyman, Jilg & Delling, 2012. Nationalnyckeln till Sveriges flora och fauna. Ryggsträngsdjur: Strålfeniga fiskar. Chordata: Actinopterygii.
- 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.

- Linløkken, A. and Haugen, T.O., 2006. Density and temperature dependence of gill net catch per unit effort for perch, *Perca fluviatilis*, and roach, *Rutilus rutilus*. Fisheries Management and Ecology, 13(4), pp.261-269.
- Ljung, Per E & Cecilia Bornestaf. Användning av försöksdjur i Sverige under 2016. Jordbruksverket 2018-03-07, Dnr: 5.2.17-12670/17.
- 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.
- O'Donnell JL, Kelly RP, Shelton AO, Samhouri JF, Lowell NC, Williams GD. (2017) Spatial distribution of environmental DNA in a nearshore marine habitat. PeerJ 5:e3044 <https://doi.org/10.7717/peerj.3044>
- 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
- Pont, D., Rocle, M., Valentini, A., Civade, R., Jean, P., Maire, A., Roset, N., Schabuss, M., Zornig, H. and Dejean, T., 2018. Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. Scientific reports, 8(1), p.10361.
- Shelton, A. O., O'Donnell, J. L., Samhouri, J. F., Lowell, N., Williams, G. D., & Kelly, R. P. (2016). A framework for inferring biological communities from environmental DNA. Ecological Applications, 26(6), 1645–1659. doi:10.1890/15-1733.1
- 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
- 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.
- Ushio M, Murakami H, Masuda R, Sado T, Miya M, Sakurai S, Yamanaka H, Minamoto T, Kondoh M (2018) Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing. Metabarcoding and Metagenomics 2: e23297.
- Wheeler, Q. D., Raven, P. H., & Wilson, E. O. (2004). Taxonomy: Impediment or expedient? Science, 303, 285–285.

Bilaga 1. Enarts- och flerartsanalyser vid eDNA undersökningar

Varje levande art utsöndrar genetisk arvsmassa 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 miljöDNA eller eDNA (från engelskans environmental DNA) och kan samlas in och renas fram. 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 i ett område av intresse inom genomer som kan kopiera industriellt. Man tillverkar dessa små bitar som även kallas oligo, primer eller markör, för att de enbart skall analysera den del av genomet man är intresserad av, detta gör att analyserna tar kort tid och är lätta att hantera i jämförelse med hela genomstudier. Markören för en art kan ibland matcha en hel artgrupp så som fiskar vilket forskare kan dra nytta av eftersom den då kopierar DNA för ett specifikt område för en hel artgrupp. Resultatet, dvs en liten bit av DNA som markören kopierar kallas barcode (streckkod), och kan liknas vid den streckkod som används för att betala för just den enskilda varan i affärer. Dessa markörer en droppe eDNA, ett enzym och salter blandas i ett provrör. Provröret placeras i en maskin som gör DNA kopior för just den artgruppen. Detta kallas för PCR (Polymerase Chain Reaction) och bygger på hur levande celler kopierar sin arvsmassa. Med hjälp av en sekvenseringsmaskin kan man sedan läsa sekvenserna för DNA-kopiorna. Denna information jämförs sedan mot databaser över arter och deras DNA-sekvenser för att bestämma vilken eller vilka arter DNA-sekvenserna tillhörde.

Enartsstudier qPCR eller ddPCR levereras ej i detta projekt

Inventering av förekomst av en enskild 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. Provsvarer 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.

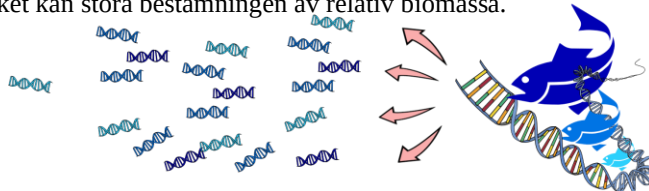
Om flera arter undersöks med enartsanalyser kan data över relativa abundanser mellan art A och art B inte jämföras med varandra eftersom markörerna för varje art skiljer sig markant från varandra. Som exempel kan nämnas att 1000 DNA kopior av gädda inte motsvarar 1000 kopior av abborre och analyserna 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 uppskattas. Notera dock att under parningstiden förekommer DNA av de arter som förökar sig i större mängder då könsceller släpps ut i vattnet, vilket kan störa bestämningen av relativ biomassa.



Bilaga 2. Kvalitetssäkring av eDNA

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 (Hedman m.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-signaler 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-signaler 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. Många PCR replikat per art/artgrupp och eDNA prov utförs. Maximalt 4 av dessa sammanslås i sekvenseringen. *Färre replikat minskar analyssäkerheten 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://sfmng.se/download/riktlinjer/Kvalitetsriktlinjer/sfmng_riktlinjer-for-kvalitetssakring_rev101228.pdf

Bilaga 4: Vetenskapliga namn på identifierade fiskar i studien

Svenskt namn

abborre	<i>Perca fluviatilis</i>
björkna	<i>Blicca bjoerkna</i>
braxen	<i>Abramis brama</i>
bäckröding	<i>Salvelinus fontinalis</i>
gråsej	<i>Pollachius virens</i>
gädda	<i>Esox lucius</i>
gärs	<i>Gymnocephalus cernua</i>
gös	<i>Sander lucioperca</i>
id/stäm	<i>Leuciscus idus/ Leuciscus leuciscus</i>
benlöja	<i>Alburnus alburnus</i>
mört	<i>Rutilus rutilus</i>
oxsimpa	<i>Taurulus bubalis</i>
piggvar	<i>Scophthalmus maximus</i>
ruda	<i>Carassius carassius</i>
rödspätta	<i>Pleuronectes platessa</i>
rötsimpa	<i>Myoxocephalus scorpius</i>
sandstubb	<i>Pomatoschistus minutus</i>
sarv	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>
sik	<i>Coregonus maraena</i>
sill	<i>Clupea harengus</i>
skrubbskädda	<i>Platichthys flesus</i>
småspigg	<i>Pungitius pungitius</i>
stensimpa	<i>Cottus gobio</i>
storspigg	<i>Gasterosteus aculeatus</i>
större ringbuk	<i>Liparis liparis</i>
sutare	<i>Tinca tinca</i>
svart smörbult	<i>Gobius niger</i>
svartmunnad smörbult	<i>Neogobius melanostomus</i>
tejstefisk	<i>Pholis gunnellus</i>
tobis (kusttobis/havstobis)	<i>Ammodytes marinus /A. tobianus</i>
torsk	<i>Gadus morhua</i>
tånglake	<i>Zoarces viviparus</i>
tångsnälla	<i>Syngnathus typhle</i>
tångspigg	<i>Spinachia spinachia</i>
ål	<i>Anguilla anguilla</i>
öring	<i>Salmo trutta</i>



www.aquabiota.se

