

eDNA-inventering av fisk och musslor i Byskeälvens avrinningsområde kring Arvidsjaur

AquaBiota Report 2019:22

Författare: Johan Näslund, Pähr Hellström & Micaela Hellström

AquaBiota Water Research



STOCKHOLM, DECEMBER 2019

Beställare:

Rapporten är utförd av AquaBiota Water Research för Vattenrådet för Åby- Byske- och Kåge älvar.

Författare:

Johan Näslund (johan.naslund@aquabiota.se), Pähr Hellström & Micaela Hellström

Omslagsbild:

Lokal 06, Allejaureälven (foto: Micaela Hellström)

Kontaktinformation:

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

Kvalitetsgranskad av:

Martin Isaeus

Ämnesord: eDNA, lax (*Salmo salar*), metabarkodning, fiskfauna, Norrbottens Län

Internetversion:

Nedladdningsbar hos www.aquabiota.se

Citera som:

Näslund J., Hellström P. & Hellström M. 2019. eDNA-inventering av fisk och musslor i Byskeälvens avrinningsområde kring Arvidsjaur. AquaBiota Report 2019:22.

AquaBiota Report 2019:22

ISBN: 978-91-89085-09-1

© AquaBiota Water Research 2019



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 vare sig 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.

Huvudsyftet med denna rapport var att utreda om laxyngel skall sättas ut i Byskeälvens avrinningsområde nära Arvidsjaur i Norrbottens län, efter restaureringsåtgärder i delar av vattendrag. Frågeställningen är om lax (*Salmo salar*) har lyckats ta sig upp i systemet eller om nya populationer behöver sättas ut i form av yngel för att återkolonisera systemet. Med hjälp av eDNA-flerartsanalyser utreddes både närvaro av lax, samt andra fiskarter som förekommer i den undersökta delen av vattensystemet. Vidare utfördes eDNA analyser för att detektera dammusslor, inklusive den hotade flodpärlmusslan vilken är beroende av lax eller öring för sin fortplantning och spridning.

Av de 12 fiskarter som detekterades på 13 lokaler förekom inte lax. De vanligast förekommande fiskarterna på lokalerna provtagna med eDNA var lake (rödlistad), abborre, sik samt öring. Stensimpa som är listad i art- och habitatdirektivets bilaga 2 detekterades också. Tre musselarter detekterades bl.a. den rödlistade flodpärlmusslan som förekom på flera lokaler.

INNEHÅLL

Sammanfattning	3
Innehåll	4
1. Inledning	5
2. Material och Metoder	6
2.1. Fältarbete	6
2.2. Laboratoriearbete – eDNA.....	8
3. Resultat och diskussion.....	9
Referenser.....	14
Bilaga 1. Enarts- och flerartsanalyser vid eDNA undersökningar	16
Bilaga 2. Kvalitetssäkring av eDNA	17
Bilaga 3: Kvalitetskontroller som redovisas vid flerartsanalyser	18

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 bevarandeeekologiska 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 felmarginaler i insamlade data (Trigal & Degerman 2015). Elfisken visar en felmarginal i statusklassificering mellan god och dålig status på EU:s femgradiga skala med 56% i grundmodellen i relation till konnektivitet, d.v.s. fiskars framkomlighet mellan olika vattensystem (Beier 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 molekyllära 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 beroende på miljöförhållanden). 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 2017a&b, Hellström m.fl. 2018). eDNA-metodiken är särskilt lämplig för arter som är svåra att samla in eller att identifiera morfologiskt som till exempel sedimentlevande musslor.

Huvudsyftet med denna undersökning var att inventera förekomsten av lax i Byskeälvens avrinningsområde kring Arvidsjaur i Norrbottens län. Anledningen till att laxens förekomst är av intresse vid de undersökta lokalerna är att utreda om lax (*Salmo salar*) förekommer i älven efter restaureringsåtgärder har utförts, eller om lax behöver sättas ut för att stödja återskapandet av laxpopulationer i älven. Andra förekommande fiskarter är också av intresse, samt förekomsten av dammusslor, främst flodpärlmussla (*Margaritifera margaritifera*) vilken är beroende av lax eller öring för sin reproduktion och spridning. Resultaten av denna undersökning kommer att utgöra information som är nödvändig för beslut om laxutsättning samt för att få en bild av fiskars och musslors förekomst för eventuella skyddsåtgärder i systemet.

2. MATERIAL OCH METODER

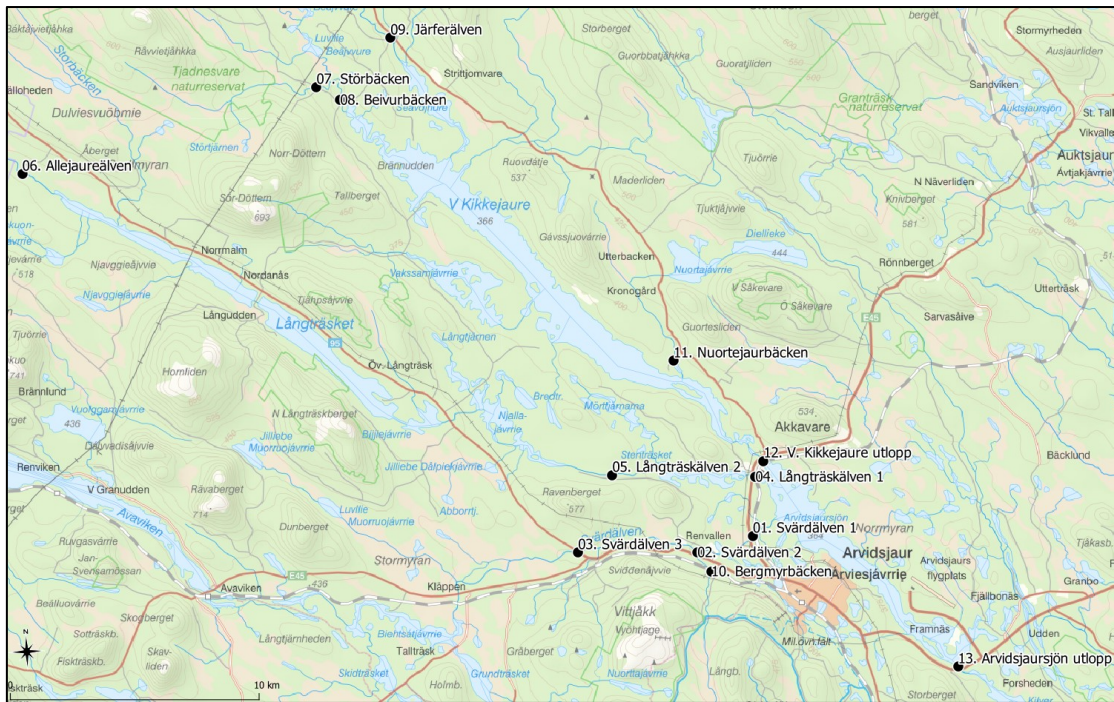
2.1. Fältarbete

I september 2019 utfördes vattenprovtagningar för eDNA vid 13 lokaler i Byskeälvens avrinningsområde av Micaela och Pähr Hellström. eDNA-provtagningen i denna studie var avgränsad till lokaler som kunde provtas utan tillgång till båt och valdes ut i samråd med uppdragsgivaren. Provtagningspunkter anges i Tabell 1 och Figur 2. Vattentemperaturen vid insamling var ca 0,5 °C (vatten insamlat från ca 0,5 m djup).

Innan provtagningen genomfördes i fält, steriliserades all provtagningsutrustning. Filtreringsutrustning köptes in som sterila DNA-fria engångsförpackningar. På provtagningspunkterna samlades 5 liter vatten in i form av 5 stycken underprover 50 ml i vardera riktningen från provpunkten där så var praktiskt möjligt. Vattnet blandades och filtrerades med inkapslade (slutna) engångsfiltre 5/0,8 µm för att minska risken för kontaminering. 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. Provpunkt och provnummer. Latitud och longitud anges som decimalgrader i WGS84, datum och tidpunkt för provtagningen, vattentemperatur samt målgruppsarter (fisk, musslor).

	Provpunkt och nummer	Latitud	Longitud	Datum	Tid	H ₂ O °C	Fisk	Musslor
	Byskeälvens avrinningsomr.							
01	Svärdälven 1	65,6149	19,12813	2019-10-22	08.45	1	X	X
02	Svärdälven 2	65,61042	19,07897	2019-10-21	14.01	0,7	X	X
03	Svärdälven 3	65,613	18,97517	2019-10-21	14.15	0,7	X	X
04	Långträskälven 1	65,63626	19,13374	2019-10-21	17.22	0,5	X	X
05	Långträskälven 2	65,64007	19,00926	2019-10-22	09.43	0,6	X	X
06	Allejaureälven	65,76124	18,50973	2019-10-21	14.59	0,3	X	X
07	Störbäcken	65,78639	18,77187	2019-10-21	15.57	0	X	X
08	Beivurbäcken	65,7814	18,7919	2019-10-21	15.36	0	X	X
09	Järferälven	65,80254	18,83931	2019-10-21	16.29	0,7	X	X
10	Bergmyrbäcken	65,60321	19,08997	2019-10-22	08.30	1	X	X
11	Nuortejaurbäcken	65,67983	19,06905	2019-10-21	15.56	0,5	X	X
12	V. Kikkejaure utlopp	65,6417	19,14179	2019-10-21	17.14	0,2	X	X
13	Arvidsjaursjön utlopp	65,5629	19,29881	2019-10-22	10.47	0,7	X	X



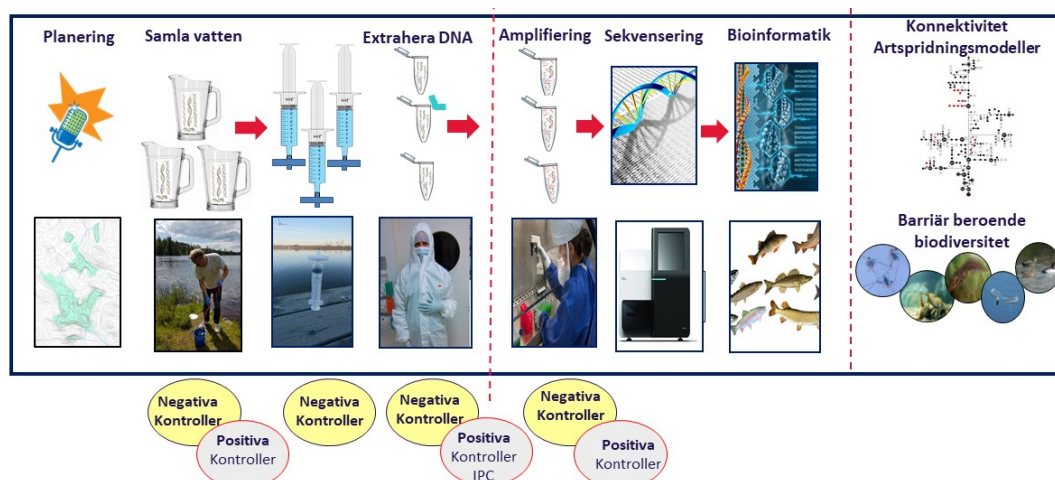
Figur 1. Översiktskarta över provtagningslokalerna. Bakgrund CC0 Lantmäteriet.



Figur 2. Exempelbilder från de provtagna lokalerna. Lokal 01 (två bilder ovan); Lokal 10 (två bilder nedan).

2.2. Laboratoriearbete – eDNA

2.2.1. Extraktion, PCR och sekvensering



Figur 3. Flödesschema som visar de olika stegen för eDNA undersökningar.

Flödesschemat i Figur 3 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) samt sötvattensmusslor (Nature Metrics, opublicerat manuskript). 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 som upprätthålls av NatureMetrics Ltd. Artidentifiering baserar sig på fullständig match mot en referens. Databaserna uppdateras löpande och arter som inte har referenssekvenser inkluderas när de blir tillgängliga. De olika sekvenserna matchades mot databasen och fick på så sätt fisk, sötvattensmusslor, 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 art i provet, desto större andel läsningar erhålls vid analys. Förenklat så är den relativa mängden DNA från en viss art proportionellt mot den relativa biomassan i samhället. Det finns artspecifika faktorer som komplicerar sambandet, vilket man kan justera för (exempelvis kopieras vissa arters DNA mer effektivt än andras). Detta beror även på hur proverna samlas in samt analyseras och det finns många studier med olämplig metodik som inte ser detta samband. Flera välkontrollerade studier i dammar och sjöar visar dock en god överensstämmelse mellan den relativa andelen DNA-träffar och den relativa andelen biomassa. Sambandet mellan fiskbiomassa och antalet läsningar finns exempelvis beskrivet i Hänfling mfl, 2016, Evans mfl 2016 och Ushio mfl 2018. Från AquaBiotas ännu opublicerade studier i extremt väl undersökta svenska sjöar finns ett tydligt samband mellan relativa biomassor av fisk och det relativa antalet lästa DNA-sekvenser för en specifik art. Samma sak gäller för de skotska sjöar som Hänfling mfl (2016) har undersökt. En nyligen utkommen undersökning i Östersjön visade också att eDNA-prover tagna direkt i anslutning till nätprovfisker visade god samstämmighet mellan andelen fångst av vanligt förekommande arter (mört och abborre) och andelen läsningar (Näslund m.fl., 2019).

3. RESULTAT OCH DISKUSSION

De vanligast förekommande arterna på lokalerna provtagna med eDNA var lake, abborre, sik samt öring som alla förekom på 12 av 13 lokaler (Tabell 2, Figur 4). Två rödlistade arter detekterades: lake (*Lota lota*) samt flodpärlmussla. Stensimpa som är listad i art- och habitatdirektivets bilaga 2 detekterades också. Vid de 13 lokaler som provtogs för eDNA detekterades 15 arter, varav 12 fiskar och 3 musslor, med i medeltal $9 \pm 1,5$ målarter per lokal (95 % konfidensintervall). Fiskarna och musslorna som detekterades var typiska för de besökta lokalerna inklusive uppströms liggande vatten. Den rödlistade flodpärlmusslan (*Margaritifera margaritifera*) som var en av de huvudsakliga målarterna detekterades vid fyra lokaler, Svärdälven 1 samt 2, Nuortejaurbäcken och V. Kikkejaure utlopp. Vid 15 lokaler detekterades lake (*Lota lota*) som också är rödlistad (nära hotad).

Kvalitetskontrollerna uppvisade förväntade resultat och alla positiva kontroller var positiva och alla negativa kontroller var negativa (se Bilaga 3). Lokal 10, Bergmyrbäcken var betydligt kraftigare påverkad av mänsklig kontamination än övriga lokaler (Tabell B1, Bilaga 3) och hade en hög andel läsningar av människa i provet samt innehöll även stark signal från matfisken torsk, vilken bedömts som en förorening. Vid lokalen detekterades öring och sik, vilka också är vanliga matfiskar. I och med den tydliga påverkan på resultaten från mänsklig kontamination, möjligen avlopps- eller dagvatten från den relativt närbelägna campingen, är resultaten för Bergmyrbäcken osäkra även om det inte är osannolikt att öring är den enda fisken närvarande. Detektionen av sik vid denna lokal kan bero på antingen kontamination från mänsklig konsumtion/exkrement (likt den tydliga detektionen av torsk) eller förekomst av någon enstaka individ.

Id (*Leuciscus idus*) och stäm (*Leuciscus leuciscus*) som detekterades vid 10 lokaler är genetiskt mycket lika varandra och kunde inte skiljas med markören som användes. Arterna kan också hybridisera med varandra.

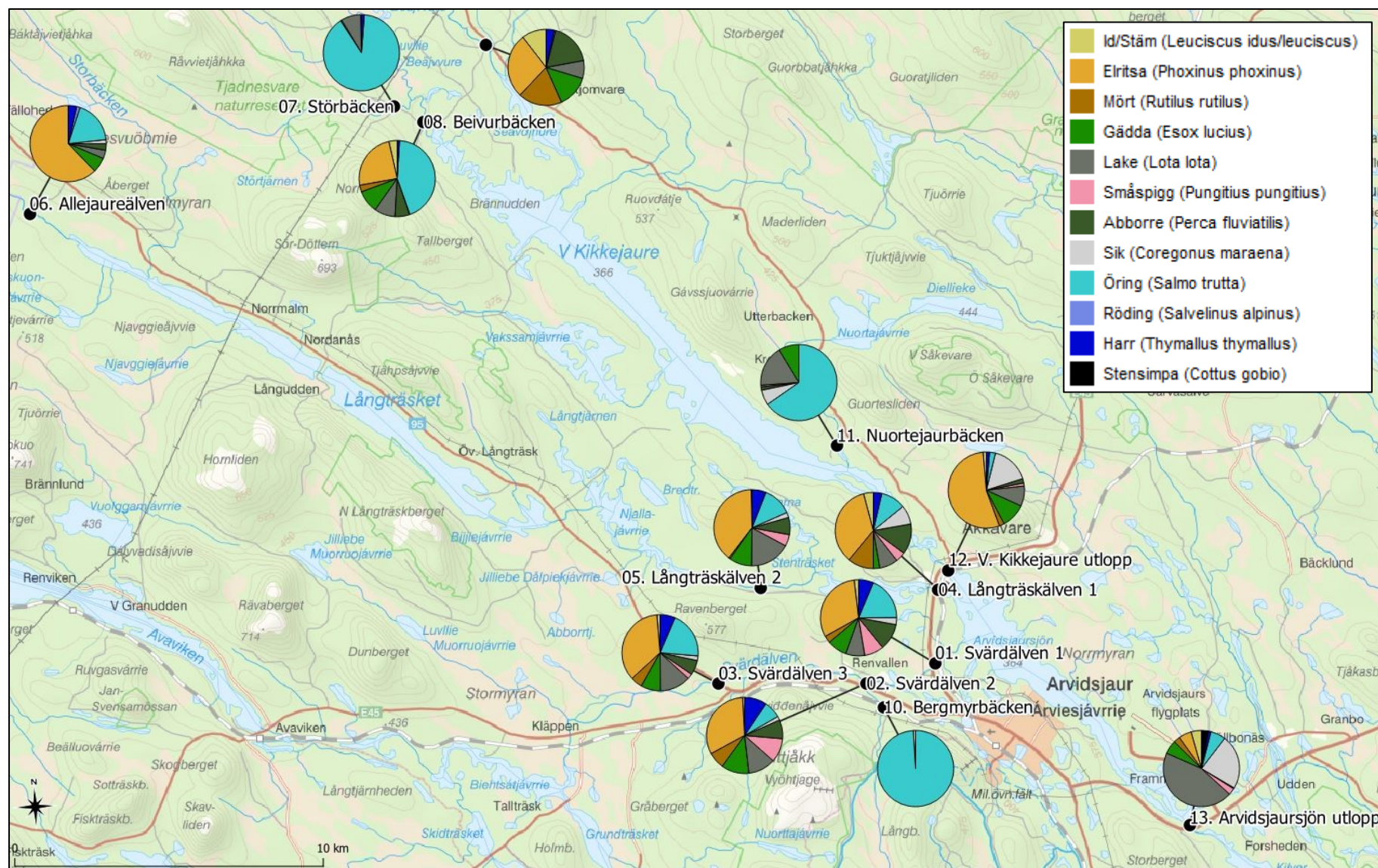
Lax (*Salmo salar*) detekterades inte vid någon av de provtagna lokalerna. Den använda metodiken är mycket detektionskänslig och det är osannolikt att lax har förekommit inom åtminstone några kilometer uppströms de provtagna lokalerna omkring tidpunkten för provtagning.

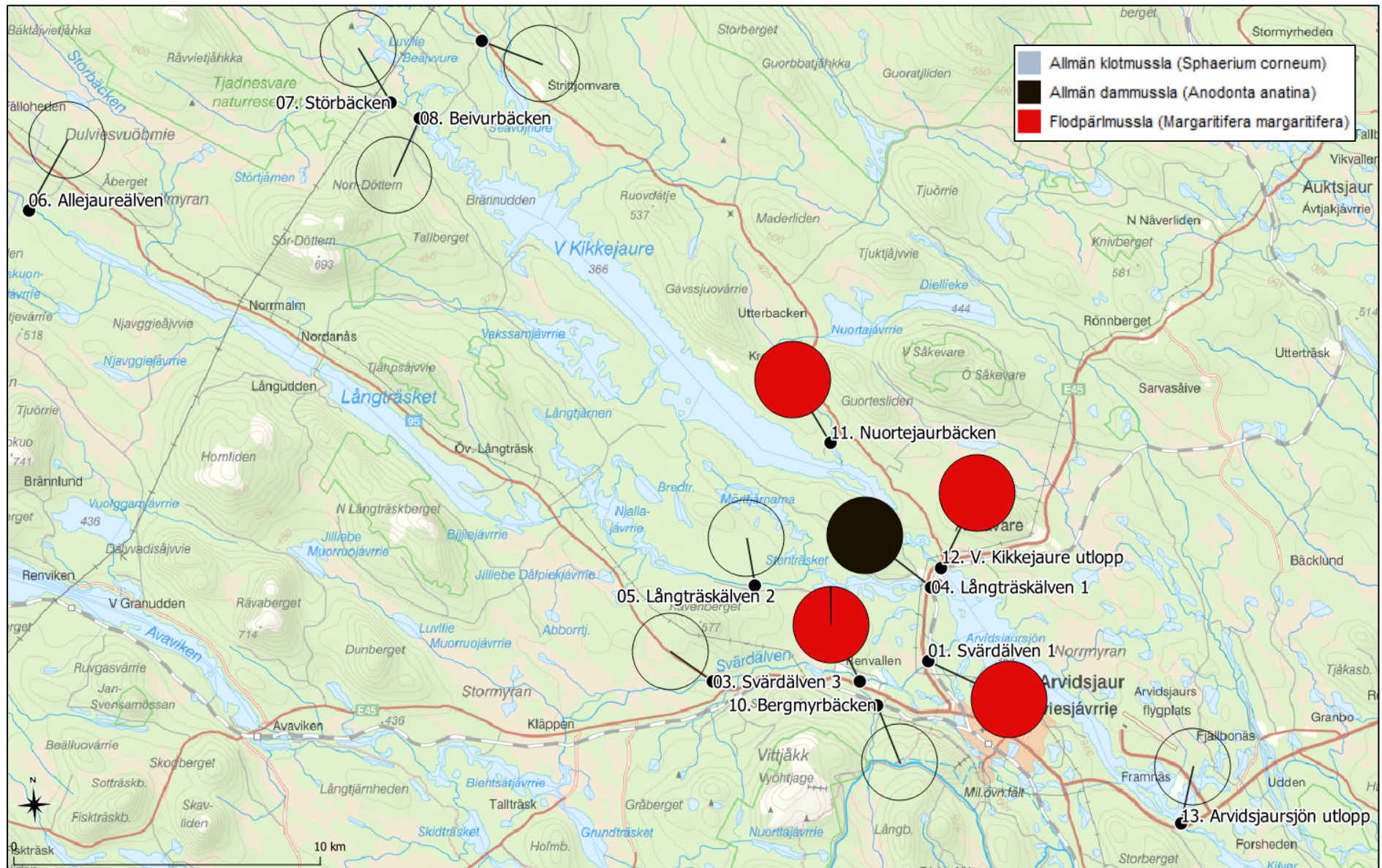
Totalt bestämdes 2 099 776 sekvenser som passerade kvalitetskontroll och kunde identifieras med bioinformatik.

Tabell 2. Andel läsningar (%) inom respektive målartsgrupp (fiskar samt musslor) för varje lokal och totala antalet läsningar av målarter. *Lokal 10 är tydligt influerad av mänsklig inferens (sannolikt avloppsvatten) och resultaten från lokalen gällande fisk är därför osäkra.

Lokalnr/Art	Fiskar												Musslor			Totalt antal läsningar, målarter	Totalt antal målarter
	Id/Stäm (<i>Leuciscus idus/leuciscus</i>)	Elritsa (<i>Phoxinus phoxinus</i>)	Mört (<i>Rutilus rutilus</i>)	Gädda (<i>Esox lucius</i>)	Lake (<i>Lota lota</i>)	Småspigg (<i>Pungitius pungitius</i>)	Abborre (<i>Perca fluviatilis</i>)	Sik (<i>Coregonus maraena</i>)	Öring (<i>Salmo trutta</i>)	Röding (<i>Salvelinus alpinus</i>)	Harr (<i>Thymallus thymallus</i>)	Stensimpa (<i>Cottus gobio</i>)	Allmän klotmussla (<i>Sphaerium corneum</i>)	Allmän dammussla (<i>Anodonta anatina</i>)	Flodpärlmussla (<i>Margaritifera margaritifera</i>)		
01	1,9	31,2	3,0	8,4	8,1	8,2	11,3	3,0	18,6		6,3				100	135872	11
02	0,9	32,0	7,1	11,8	11,7	10,1	8,1	1,6	7,3		9,4		0,3		99,7	122883	12
03	1,4	35,5	5,0	8,4	13,1	2,2	6,3	1,9	19,9		6,4					95915	10
04	4,1	34,9	11,0	2,8	7,8	4,2	13,0	8,1	10,5		3,6			100		195972	11
05	0,3	39,2	0,6	9,7	17,3	4,9	7,3	2,2	12,5		5,9					134003	10
06		62,3		6,4	3,5		2,8	1,7	18,2	1,4	3,6					107085	8
07	0,3				8,4		0,5		89,6		1,2					103061	5
08	3,5	24,3	2,9	9,5	8,9		6,2	0,2	43,6		1,0					129949	9
09	10,5	27,5	18,7	13,7	7,6		18,1	0,5			3,6					172818	8
10*								1,0	99,0							69553	2
11				8,7	17,4	0,7	1,4	6,4	65,4						100	262639	7
12	1,4	54,2	2,2	10,5	8,5	1,3	1,9	16,3	2,5		1,4				100	174024	11
13	4,4	5,4	2,8	5,8	44,8	2,8	0,4	23,1	6,4		1,1	2,9				82829	11
Antal Förekomster	10	10	9	11	12	8	12	12	12	1	11	1	1	1	4	1786603	15

Figur 4. Översiktskartor som visar den relativa andelen läsningar per målartsgrupp för de 22 lokalerna. Lokal 10 bär spår av mänsklig påverkan (troligen avlopp) och resultaten gällande fisk från lokalen är därför osäkra.





Fisksamhällen inventerade med eDNA skiljer sig från de som normalt detekteras i traditionella provfisken. Den största skillnaden är att betydligt fler arter detekteras med eDNA-provtagning per provtagen station. Att till viss del andra arter detekterats än vid standardiserade provfisken beror på många faktorer. Till exempel så kan eDNA provtagning utföras i miljöer som sällan provfiskas med standardiserade metoder (exempelvis vissa grunda miljöer, större strömmande vattendrag) samt under hela året. Det är dessutom väl känt att rörliga och pelagiska arter är överrepresenterade vid nätprovfisken till skillnad från bottenlevande arter och att elprovfiske är inriktat på laxfiskar. Vid fiskinventeringar med eDNA i sjöar och vattendrag har det också visat sig att bottenlevande arter ofta är vanligare än man tidigare trott just på grund av detta metodfel och stensimpa är betydligt mer vanligt förekommande i Norra Sverige än vad som framkommer vid nät- och elfisken. Lake förekommer också ofta i eDNA-prover tagna på vinterhalvåret i Norrländska kustmynnande vattendrag (se exempelvis Hellström&Spens 2017a). Lake förekommer mer sällan vid el eller nätprovfiske vilket normalt utförs under sommarhalvåret.

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 eller migration, är det av vikt att genomföra provtagningen när förhållandena är lämpliga och vid rätt vattentemperatur. Detta gäller exempelvis lax.

Flodnejonöga och bäcknejonöga skiljs inte åt eftersom de är genetiskt lika och har även visat sig kunna reproducera med varandra. Denna typ av artkomplex är troligtvis likt det för vandrande kontra icke vandrande öring som visat sig vara samma art och t.o.m. kan utveckla olika vandringsmönster även om de härstammar från en och samma äggansamling. Havsnejonöga skiljer sig genetiskt från flod/bäcknejonöga artkomplexet.

Med de genetiska markörer och det genetiska referensbibliotek som använts var det inte möjligt att skilja mellan id och stäm. Id och stäm är väldigt närbesläktade och kan dessutom hybridisera med flera karpfiskar i olika släkten och är i många fall även väldigt svår att identifiera på artnivå morfologiskt. Problematiken med att närbesläktade arter inte alltid kan skiljas åt förekommer även vid traditionella inventeringar av fisk och är ofta särskilt problematisk när det gäller identifiering av fisklarver och juveniler, vilka dessutom är svåra att fånga med traditionella metoder.

Antalet fiskar som fångats i svenska provfisken 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. Vid eDNA-inventeringar behöver inga fiskar skadas, plågas eller dödas till skillnad från i standardiserade provfisken.

Om syftet är att inventera biologisk mångfald i form av antalet fiskarter samt stormusslor i akvatiska miljöer är redan idag eDNA-inventeringar mycket kostnadseffektiva. Dessutom finns starka etiska fördelar med e-DNA inventeringar jämfört med destruktiva

inventeringsmetoder såsom provfiske då vi inte behöver skada eller störa den biologiska mångfald vi vill skydda. Sammanfattningsvis är analys av eDNA en metodik som med fördel kan användas för att inventera och tydligt visa den mångfald av fiskarter samt stormusslor som förekommer i både större och mindre vattendrag.

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.
- 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., Wijkmark N & Spens, J. 2018. Fiskinventering 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.
- 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.
- Näslund J., Didrikas T., Hellström P, Hellström M., (2019) Inventering av fiskfaunan i Gåsefjärden, Karlskrona Skärgård, med nätprovfiske och eDNA. AquaBiota Rapport 2019:15. ISBN: 978-91-89085-02-2
- O'Donnell JL, Kelly RP, Shelton AO, Samhuri JF, Lowell NC, Williams GD. (2017) Spatial distribution of environmental DNA in a nearshore marine habitat. *PeerJ* 5:e3044

- 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.
- 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 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 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 kopieras 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 som exempelvis fiskar vilket man kan dra nytta av eftersom markören 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 arvs massa. 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

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.

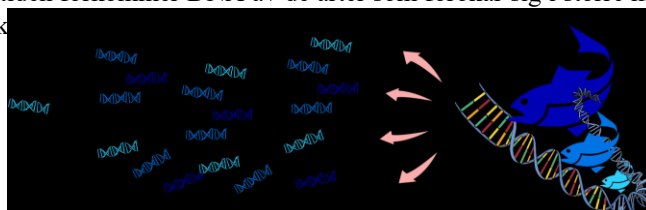
Om flera arter undersöks med enartsanalyser kan data över relativa abundanser mellan art A och art B inte jämföras med varandra eftersom markörerna för varje art skiljer sig markant från varandra. Som exempel kan nämnas att 1000 DNA kopior av gädda inte motsvarar 1000 kopior av abborre och analyserna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



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) |

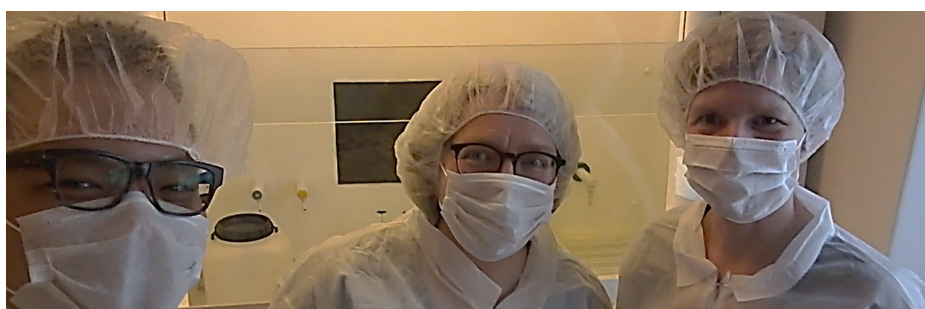
Positiv kontroll; En positiv kontroll innebär att ett prov som innehåller ett känt DNA testas för att verifiera att den använda metodiken fungerar som den skall. Om DNA-signaler inte hittas i en positiv kontroll innebär det att metodiken måste justeras och analysen eller undersökningen måste göras om.

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 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

Tabell B1. Kvalitetskontroll av eDNA och kontroller. Volym anger medelvolum filtrerat vatten. 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 för de två markörerna sammanslaget.

Prov nr	Volym filtrerat vatten (ml)	eDNA konc. (ng/ul)	Inhibering	Anti- inhibering	Band på gel	PCR replikant per markör	Icke- målart %	Torsk %	Människa %
1	2060	7,44	Ja	Ja	Ja	12	0,2%	0,0%	0,1%
2	2060	7,12	Ja	Ja	Ja	12	0,9%	0,0%	0,9%
3	2800	10,7	Ja	Ja	Ja	12	0,8%	0,0%	0,8%
4	3000	1,27	Ja	Ja	Ja	12	2,9%	0,0%	2,4%
5	2000	10,5	Ja	Ja	Ja	12	0,1%	0,0%	0,1%
6	2600	13,4	Ja	Ja	Ja	12	0,0%	0,0%	0,0%
7	2500	2,22	Ja	Ja	Ja	12	4,1%	0,0%	3,8%
8	1800	1,21	Ja	Ja	Ja	12	0,9%	0,0%	0,5%
9	1860	5,34	Ja	Ja	Ja	12	0,0%	0,0%	0,0%
10	2500	0,43	Ja	Ja	Ja	12	13,6%	15,5%	11,3%
11	3000	5,72	Ja	Ja	Ja	12	0,0%	0,0%	0,0%
12	3000	2,62	Ja	Ja	Ja	12	0,4%	0,0%	0,4%
13	3000	11,6	Ja	Ja	Ja	12	0,9%	0,0%	0,9%
Fält neg 1	500	<0,02	Nej	Ja	Nej	12	100%	0,0%	100%
Lab neg 1	-	<0,02	Nej	Ja	Nej	12	100%	0,0%	100%



www.aquabiota.se

