

eDNA-inventering av fisk, groddjur och musslor i Skellefteälvens avrinningsområde

AquaBiota Report 2019:16

Författare: Johan Näslund, Micaela Hellström & Pähr Hellström

AquaBiota Water Research



AquaBiota
WATER RESEARCH

STOCKHOLM, NOVEMBER 2019

Beställare:

Rapporten är utförd av AquaBiota Water Research för Skellefteå kommun.

Författare:

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

Omslagsbild: Lokal 08, Norsjöån där både flodpärlmussla och dess värd öring detekterades (Johan Näslund)

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:

Tom Staveley

Distribution:

Fri

Internetversion:

Nedladdningsbar hos www.aquabiota.se

Citera som:

Näslund J., Hellström M. & Hellström P. 2019. eDNA inventering av fisk, groddjur och musslor i Skellefteälvens avrinningsområde. AquaBiota Report 2019:16. 22 sid.

AquaBiota Report 2019:16
ISBN: 978-91-89085-03-9

© 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.

Denna rapport redovisar resultaten från flerartsanalyser med hjälp av eDNA med målgrupperna fisk, groddjur och sötvattensmusslor vid 20 lokaler i Skellefteälvens avrinningsområde samt en i vardera av Kågeälvens och Bureälvens avrinningsområden (totalt 22 lokaler). Totalt detekterades 17 fiskarter, 5 arter av sötvattensmusslor och 2 groddjur samt som tilläggsinformation 3 däggdjursarter. Tre rödlistade arter detekterades: flodpärlmussla, flat dammussla och lake. En främmande invasiv art detekterades: (amerikansk) bäckröding. Fynden av flat dammussla är de nordligaste fynden någonsin för Sverige och visar tydligt på eDNA-metodikens fördelar som basinventeringsmetodik för akvatisk biologisk mångfald i form av musslor och fiskar.

INNEHÅLL

Sammanfattning.....	3
Innehåll.....	4
1. Inledning	5
2. Material och Metoder	5
2.1. Fältarbete.....	5
2.2. Laboratoriearbete – eDNA	8
3. Resultat och diskussion	9
Referenser	15
Bilaga 1. Enarts- och flerartsanalyser vid eDNA undersökningar.....	17
Bilaga 2. Kvalitetssäkring av eDNA	18
Bilaga 3: Kvalitetskontroller som redovisas vid flerartsanalyser	19

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 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 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 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.

Syftet med denna undersökning var att inventera flodpärlmussla samt fisk i Skellefteälven och ett flertal intressanta biflöden till älven eftersom ett stort bestånd av flodpärlmussla i Skellefteälven har upptäckts i ett av kraftverksmagasinen.

2. MATERIAL OCH METODER

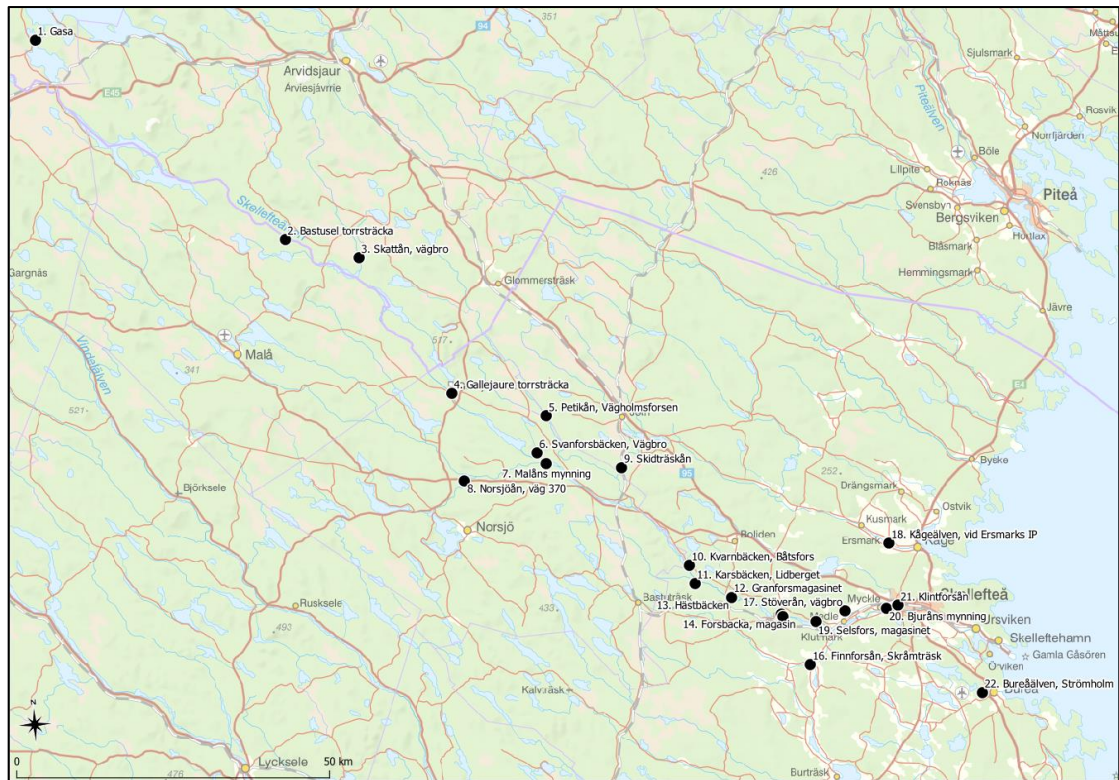
2.1. Fältarbete

I september 2019 utfördes vattenprovtagningar för eDNA vid 20 lokaler i Skellefteälvens avrinningsområde, 1 lokal i Kågeälvens avrinningsområde och 1 lokal i Bureälvens avrinningsområde av Johan Näslund 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 Skellefteå kommun. Provtagningspunkter anges i Tabell 1 och Figur 2. Vattentemperaturen vid insamling var ca 10 °C (vatten insamlat från ca 0,5m 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 praktiskt möjligt. Vattnet blandades och filtrerades med inkapslade (slutna) engångsfilter 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, groddjur).

Provpunkt och nummer	Latitud	Longitud	Datum	Tid	H ₂ O °C	Fisk	Musslor	Groddjur
Skellefteälvens avrinningsomr.								
01 Gasa	65,65250	18,10906	2019-09-10	10:45	8	X	X	X
02 Bastusel torrsträcka	65,34644	18,93208	2019-09-10	13:00	8,2	X	X	X
03 Skattån, vägbro	65,31360	19,18073	2019-09-10	13:50	8,2	X	X	
04 Gallejaure torrsträcka	65,11047	19,46436	2019-09-10	14:50	9	X	X	X
05 Petikån, Vägholmsforsen	65,06801	19,77988	2019-09-10	16:10	8,2	X	X	X
06 Svanforsbäcken, Vägbro	65,01645	19,73879	2019-09-10	17:00	8,4	X	X	
07 Malåns mynning	64,99963	19,76785	2019-09-10	18:30	12	X	X	X
08 Norsjöån, väg 370	64,98407	19,48656	2019-09-10	19:45	9	X	X	
09 Skidträskån	64,98617	20,02137	2019-09-11	09:15	11	X	X	
10 Kvarnbäcken, Båtsfors	64,83838	20,22230	2019-09-11	10:10	11	X	X	
11 Karsbäcken, Lidberget	64,81198	20,23492	2019-09-11	10:45	9	X	X	X
12 Granforsmagasinet	64,78841	20,35441	2019-09-11	12:00	12	X	X	X
13 Hästbäcken	64,78765	20,35430	2019-09-11	12:00	8	X	X	X
14 Forsbacka, magasin	64,75711	20,51603	2019-09-11	13:20	13	X	X	X
15 Krångbäcken	64,75397	20,52074	2019-09-11	14:10	10	X	X	
16 Finnforsån, Skråmträsk	64,68164	20,59860	2019-09-11	15:30	10	X	X	X
17 Stöverån, vägbro	64,75425	20,72838	2019-09-11	16:10	9,5	X	X	
19 Selsfors, magasinet	64,74271	20,62922	2019-09-11	17:00	14	X	X	X
20 Bjuråns mynning	64,75212	20,86847	2019-09-11	19:15	7,5	X	X	X
21 Klintforsån	64,75477	20,90919	2019-09-11	20:00	10,5	X	X	X
Kågenälvens avrinningsomr.								
18 Kågeälven, vid Ersmarks IP	64,84486	20,89849	2019-09-11	18:45	10	X	X	X
Bureälvens avrinningsomr.								
22 Bureåälven, Strömholm	64,61908	21,16202	2019-09-12	08:00	13	X	X	



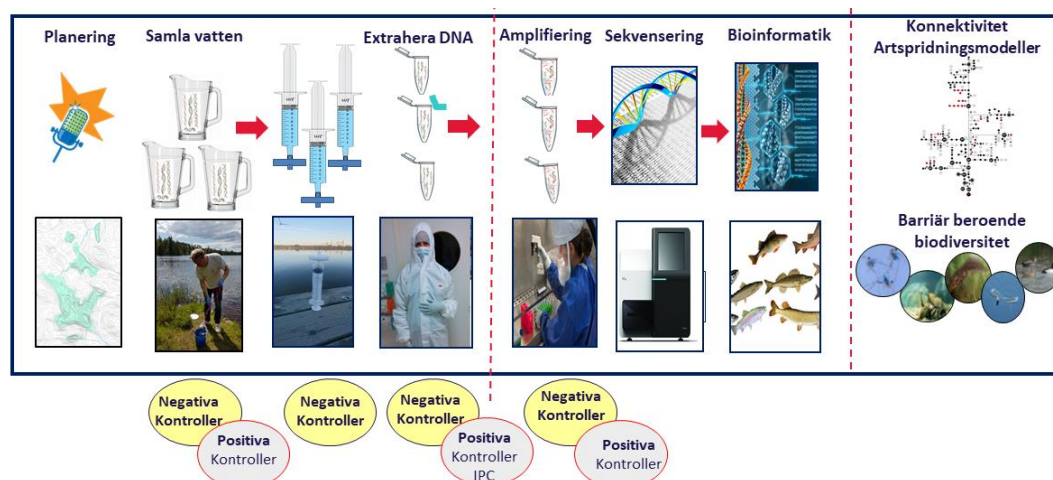
Figur 1. Översiktskarta över provtagningslokalerna, skala 1:500 000. Bakgrund CC0 Lantmäteriet.



Figur 2. Exempelbilder från de provtagna lokalerna. Lokal 07, Malåns mynning (ovan); Lokal 19 Selsforsmagasinet (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), sötvattensmusslor (Nature Metrics, opublicerat manuskript) samt groddjur (Kelly, 2014). 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. Osäkerheterna är minst lika stora som för nätprovfiske och det är svårt att dra 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 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 nätprovfisken visade god samstämmighet mellan andelen fångst av vanligt förekommande arter (mört och abborre) och andelen läsningar (Näslund mfl, 2019).

3. RESULTAT OCH DISKUSSION

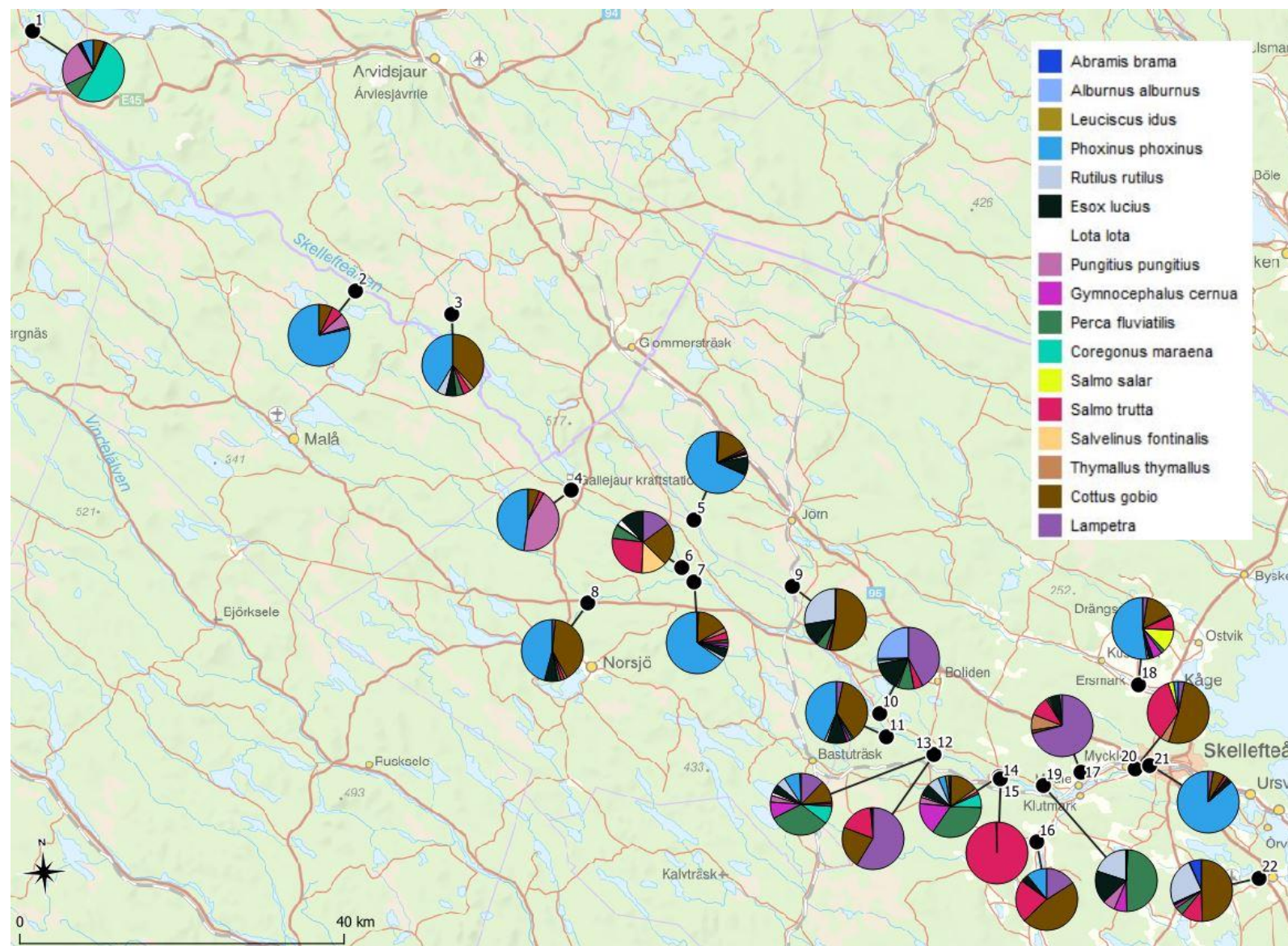
De vanligast förekommande arterna på lokalerna provtagna med eDNA var stensimpa (*Cottus gobio*) samt öring (*Salmo trutta*) som förekom på 20 av 22 lokaler (Tabell 2, Figur 4). Stensimpa är listad i art- och habitatdirektivets bilaga 2. Vid de 22 lokaler som provtogs för eDNA detekterades 27 arter, varav 17 fiskar, 5 musslor, 2 groddjur samt 3 däggdjur som biinformation med i medeltal 10 ± 1 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 flera lokaler, inklusive lokalerna 07 Malåns mynning, 14 Forsbacka vattenmagasin samt 16 Finnforsån, Skråmträsk där tidigare kända förekomster av arten finns (Tabell 2, Figur 4). Dessutom detekterades flera fynd av den rödlistade flat dammussla (*Pseudanodonta complanata*), vilken aldrig tidigare hittats så långt norrut i Sverige. Fynd på motsvarande latituder av arten är dock kända ifrån Finland. Flat dammussla förväxlas ofta med andra arter och det skulle vara önskvärt att eftersökningar av denna art görs vid någon eller några av lokalerna där den detekterats för att bekräfta dessa nya fynd och kvantifiera populationerna. Vid 15 lokaler detekterades lake (*Lota lota*) som också är rödlistad (nära hotad). I eDNA-provet från lokal 06 Svanforsbäcken detekterades bäckröding som är en art som inte är inhemsk i Sverige. Bäckröding, ibland kallad amerikansk bäckröding, har sitt ursprung i Nordamerika och har satts ut i flera svenska vattendrag och sjöar redan från slutet av 1880-talet. Tre förekomster av groddjur detekterades, två med vanlig groda och en med vanlig padda.

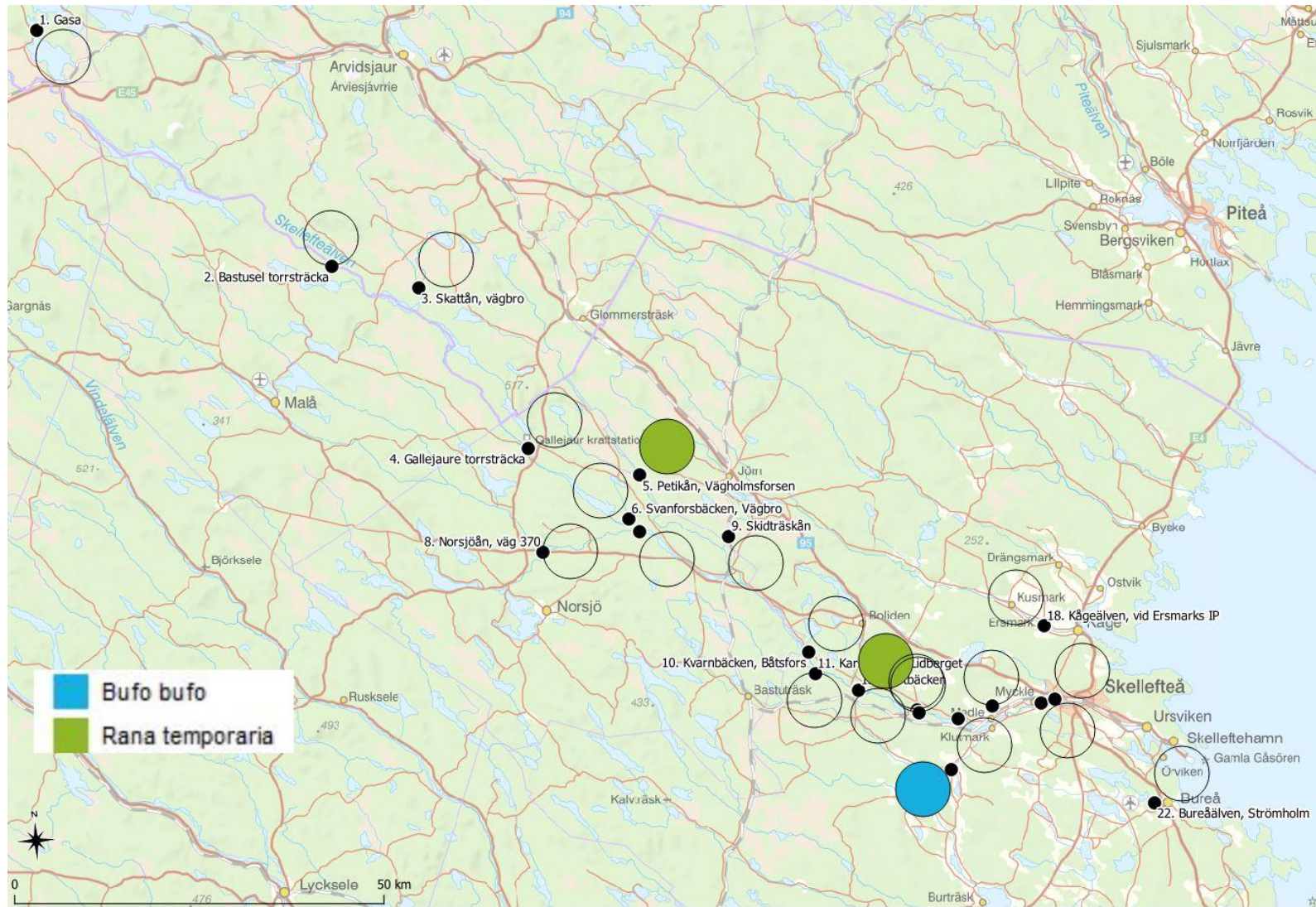
Kvalitetskontrollerna uppvisade förväntade resultat och alla positiva kontroller var positiva och alla negativa kontroller var negativa (Tabell B1 i Bilaga 3). Totalt bestämdes 3 046 061 sekvenser som passerade kvalitetskontroll och kunde identifieras med bioinformatik.

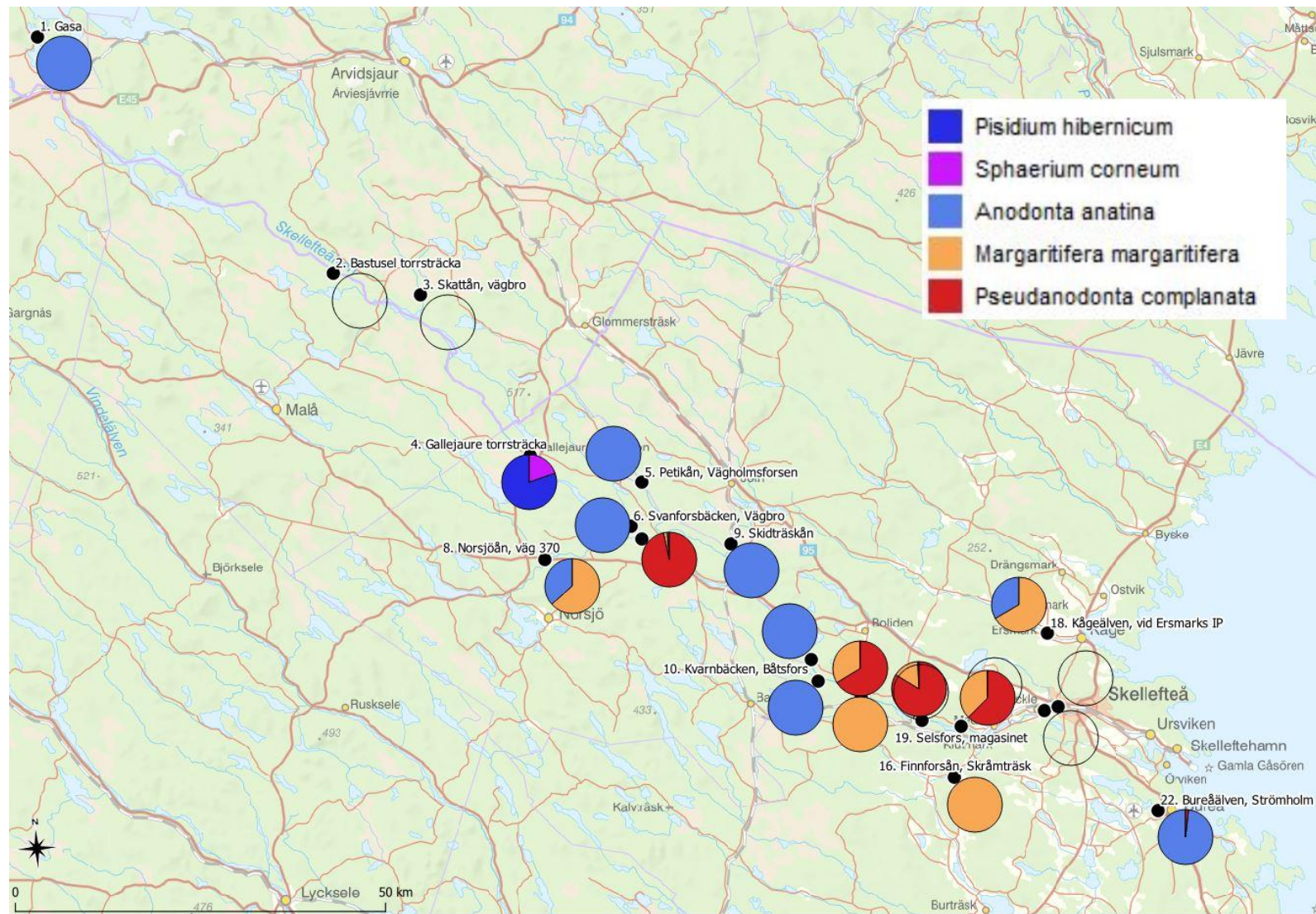
Tabell 2. Andel läsningar (%) inom respektive målartsgrupp (fiskar, groddjur samt musslor) för varje lokal, totala antalet läsningar av målarter och förekomster av däggdjur som biinformation.

Fiskar																	Groddjur		Musslor						Däggdjur				
Lokalnr/Art	<i>Abramis brama</i> (braxen)	<i>Alburnus alburnus</i> (löja)	<i>Leuciscus idus</i> / <i>L. leuciscus</i> (id/stäm)	<i>Phoxinus phoxinus</i> (elritsa)	<i>Rutilus rutilus</i> (mört)	<i>Esox lucius</i> (gädda)	<i>Lota lota</i> (lake)	<i>Pungitius pungitius</i> (småspigg)	<i>Gymnocephalus cernua</i> (gärs)	<i>Perca fluviatilis</i> (abborre)	<i>Coregonus maraena</i> (sik, artkomplex)	<i>Salmo salar</i> (lax)	<i>Salmo trutta</i> (öring)	<i>Salvelinus fontinalis</i> (bäckröding)	<i>Thymallus thymallus</i> (harr)	<i>Cottus gobio</i> (stensimpa)	<i>Lampetra</i> sp. (flod- /bäcknejonöga)	<i>Bufo bufo</i> (vanlig padda)	<i>Rana temporaria</i> (vanlig groda)	<i>Pisidium hibernicum</i> (glatt ärtmussla)	<i>Sphaerium corneum</i> (allmän klotmussla)	<i>Anodonta anatina</i> (vanlig dammussla)	<i>Margaritifera margaritifera</i> (flodpärlmussla)	<i>Pseudanodonta complanata</i> (flat dammussla)	Totalt antal läsningar, målarter	Totalt antal målarter	<i>Alces alces</i> (älg)	<i>Castor fiber</i> (bäver)	<i>Arvicola amphibius</i> (vattensork)
01				6,6	0,2	1,6	0,2	24,0		8,7	51,6		1,1		0,3	5,8									107499	11			
02				78,4		0,4	0,8	7,0		0,4			5,7			7,2									146484	7			
03				41,5	4,9	5,3				4,0			4,0		2,3	38,0									72729	7			
04				47,9				43,7		0,1			2,4			5,9				80,4	19,6				121462	7			
05				68,2	0,6	9,1	1,4	0,3	0,3	0,3			0,9		1,1	16,7	0,9	100			100				140418	13	x	x	
06						12,4	3,1		0,5	7,1			26,3	13,5		22,3	14,9				100				53632	9			
07		0,3		64,8	2,1	4,8	1,0		2,0	1,6			4,0		2,5	16,3	0,5				1,3	2,2	96,6		151891	14			
08				45,9		7,0				1,6			1,9		1,5	40,7	1,4				36,5	63,5			96785	9			
09					27,6	11,2	0,4		0,7	5,4			1,5		0,6	52,2	0,4				100				111951	10			
10		25,2		1,1	1,8	15,5	0,9			8,5			4,7				42,3				100				97970	9			
11				43,6	1,4	10,5			1,6	1,5					0,8	37,3	3,3				100				64368	9	x		
12			0,8	8,5	4,9	4,6	1,7	3,4	8,6	32,1	9,4		1,3		0,9	11,8	12,1				0,2	33,5	66,3		146636	16	x	x	
13				0,5	0,4		0,5						17,8			22,1	58,7	100				100			176493	8		x	x
14		1,0	1,7	3,8	6,2	6,3	1,1	3,3	16,9	34,1	7,3		1,3		2,0	14,7	0,2				0,9	15,4	83,7		114826	17	x		
15							0,5						99,5												65682	2			
16				10,8	0,6	2,5	0,5			0,6			22,1		0,1	46,9	16,0	100				100			193248	11	x	x	
17					1,4	5,6	0,8			1,0			10,3		8,3	1,7	70,9								32702	8			
18		0,2		51,9	1,1	2,3			4,9	2,0		11,8	7,5		0,7	15,3	2,4				33,4	66,6			193964	13		x	
19			0,2		19,8	16,9	0,2	6,5	6,6	49,0	0,4					0,2					0,3	37,3	62,3		157450	12			
20				2,5								2,8	35,1		4,5	51,9	3,1								100971	6			
21				86,4		2,9	0,2						1,6		0,2	6,2	2,5								141703	7		x	
22	6,4	0,4			25,0	1,1			1,9	4,4			11,2			49,6					98,2		1,8		119409	10			
Antal																		1	2	1	1	13	8	5	24	4	6	2	
Förekomster	1	5	3	16	15	18	15	7	10	18	4	2	20	1	14	20	15	1	2	1	1	13	8	5	24	4	6	2	

Figur 4. Översiktskartor som visar den relativa andelen läsningar per målartsgrupp för de 22 lokalerna.







Fisksamhällen inventerade med eDNA skiljer sig från de som normalt detekteras i traditionella provfisken. Den största skillnaden att betydligt fler antal 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.

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.

Med de genetiska markörer och det genetiska referensbibliotek som använts var det inte möjligt att skilja mellan id och stäm samt mellan flodnejonöga och bäcknejonöga. 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. Flodnejonöga och bäcknejonöga har visat sig vara identiska på genetisk nivå och anses av vissa tillhöra samma art. 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 är dessutom risken för bifångster av exempelvis hotade fågel- och däggdjursarter obefintlig, samtidigt som inga fiskar behöver skadas, plågas eller dödas till skillnad från 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 kan användas för att inventera och tydligt visa den mångfald av fiskarter, groddjur 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., 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, Samhoury 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. Provsvarerna 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.

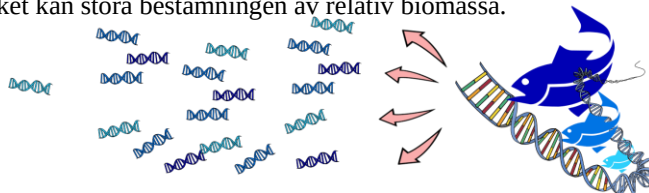
Om flera arter undersöks med enartsanalyser kan data över relativa abundanser mellan art A och art B inte jämföras med varandra eftersom markörerna för varje art skiljer sig markant från varandra. Som exempel kan nämnas att 1000 DNA kopior av gädda inte motsvarar 1000 kopior av abborre och analyserna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

Flerartsstudier –Metastrekkodning 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.

Metastrekkodning 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 metastrekkodning. 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 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://sfmng.se/download/riktlinjer/Kvalitetsriktlinjer/sfmng_riktlinjer-for-kvalitetssakring_rev101228.pdf

Tabell B1. 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 för de tre markörerna sammanslaget.

Prov nr	Volym filtrerat vatten (ml)	eDNA konc. (ng/ul)	Inhi- bering	Anti- inhibering	Band på gel	PCR replikat per markör	Icke-målart %	Människa %
1	3000	12,5	Ja	Ja	Ja	12	37,1%	36,9%
2	3000	22,4	Ja	Ja	Ja	12	2,5%	2,5%
3	1000	17,8	Ja	Ja	Ja	12	0,0%	0,0%
4	3000	10,5	Ja	Ja	Ja	12	7,8%	7,8%
5	1140	5,62	Ja	Ja	Ja	12	1,7%	1,7%
6	2300	6,64	Ja	Ja	Ja	12	0,0%	0,0%
7	3000	4,5	Ja	Ja	Ja	12	13,8%	13,8%
8	2000	12,9	Ja	Ja	Ja	12	0,0%	0,0%
9	1000	20,8	Ja	Ja	Ja	12	0,0%	0,0%
10	3000	15,8	Ja	Ja	Ja	12	0,0%	0,0%
11	1500	15,3	Ja	Ja	Ja	12	4,6%	4,6%
12	3000	17,9	Ja	Ja	Ja	12	23,1%	23,1%
13	800	4,4	Ja	Ja	Ja	12	6,9%	6,9%
14	3000	11,4	Ja	Ja	Ja	12	31,5%	31,5%
15	730	5,98	Ja	Ja	Ja	12	0,0%	0,0%
16	780	4,8	Ja	Ja	Ja	12	3,4%	3,4%
17	800	8,42	Ja	Ja	Ja	12	0,3%	0,0%
18	1380	7,54	Ja	Ja	Ja	12	1,7%	1,7%
19	3000	24	Ja	Ja	Ja	12	17,1%	16,9%
20	1000	13,2	Ja	Ja	Ja	12	12,0%	12,0%
21	2400	24	Ja	Ja	Ja	12	11,2%	11,2%
22	3000	23,8	Ja	Ja	Ja	12	25,2%	25,2%
Fält neg 1	1000	0,348	Nej	Ja	Ja	12	100,0%	89,4%
Fält neg 2	500	<0,02	Nej	Ja	Ja	12	100,0%	99,2%
Lab neg 1	-	<0,02	Nej	Ja	Nej	12	100,0%	100,0%



www.aquabiota.se

