



eDNA-analys av fisksamhällen och vattenpest i Jönköpings län 2021



eDNA-analys av fisksamhällen och vattenpest i Jönköpings län 2021

Meddelande nr 2024:15

Meddelande	nummer 2024:15
Författare	Marina Panova, Lili Cluzel-Burgalat, Matthias Obst och Per Sundberg Juni, 2024
Kontaktperson	Maria Carlsson, Länsstyrelsen i Jönköpings län, Telefon: 010-223 63 98, e-post: maria.k.carlsson@lansstyrelsen.se
Webbplats	www.lansstyrelsen.se/jonkoping
Fotografier	Foto framsida: Länsstyrelsen i Jönköpings län, övriga foton, se respektive bild
ISSN	1101-9425
ISRN	LSTY-F-M—2024/15--SE

© Länsstyrelsen i Jönköpings län 2024

Innehållsförteckning

Sammanfattning	5
Inledning	6
Provtagning och provtagningslokaler	7
Provtagning	7
Provtagningslokaler	7
Metodutveckling och analyser	8
Extraktion DNA och dPCR.....	8
Test och optimering av assay för vattenpest	9
<i>Elodea canadensis</i>	9
<i>Elodea nuttallii</i>	9
Test och utvärdering av assay	9
Analys av nyzeeländsk tusensnäcka	10
Analys av fisk samhällen.....	10
Bibliotek för sekvenseringen	10
Sekvensering och bioinformatisk analys	11
Resultat	12
Målartsanalys vattenpest och smal vattenpest	12
Analys av fiskarter Nissan.....	13
Diskussion	17
Målartsanalys vattenpest och smal vattenpest	17
Metabarcoding fisk samhällen.....	17
Referenser	19
Bilagor	20
Bilaga 1 Provtagningslokaler för analys av fisk samhällen, nyzeeländsk tusensnäcka, vattenpest och smal vattenpest	20
Bilaga 2 – digital PCR (dPCR)	23

Sammanfattning

Djur och växter lämnar efter sig spår av DNA i miljön (eDNA, eller miljö-DNA) och genom dessa spår går det att kartlägga biologisk mångfald och förekomst av arter. Den ena delen av studien gjordes för att undersöka fisksamhället i Nissan och den andra för att se om vi kunde mäta förekomst av vattenpest och smal vattenpest i Emåns och Motala Ströms vattensystem. Fisksamhället undersöktes med hjälp av metabarcoding, där man enkelt uttryckt skannar vattnets samlade DNA-innehållet för ”alla” fiskarter. Vattenpestarterna eftersöktes med målartsanalys med hjälp av så kallade assays. Det är en känsligare metod som kan upptäcka mindre mängder DNA och är säkrare än metabarcoding.

I uppdraget ingick också att utveckla och testa en så kallad assay för vattenpest och smal vattenpest. I det här sammanhanget kan en assay förklaras som en artspecifik identifieringsmetod baserad på DNA från arten som sedan ska eftersökas.

17 fiskarter kunde identifieras i Nissan efter matchning av DNA-sekvenser mot speciella referensbibliotek inriktade mot fisk. Dock kan förekomst av arter representerade med väldigt få sekvenser vara osäker och 12 av de 17 bedöms som säkra förekomster, samtliga dessa är vanliga, inhemska arter.

De publicerade assayerna för de två arterna vattenpest var inte helt artspecifika (gav svag signal även för den andra arten), därför analyserades alla prover med assayerna för bägge arterna. Vattenpest kunde bara identifieras i ett fåtal vattenprover. Tekniken för eDNA och övervakning av vattenpest behöver utvecklas och testas mer, till exempel utreda vid vilken tidpunkt på året som proverna bäst tas och på vilket sätt.

Rapporten är skriven av SeAnalytics och språkligt redigerad av Länsstyrelsen i Jönköpings län. Slutsatserna i rapporten är konsultens egna bedömningar.

Inledning

Djur lämnar spår efter sig i naturen i form av DNA från till exempel urin, fjäll, celler och kanske också i form av rena DNA-molekyler. Även växter avsätter DNA-spår i naturen även om mekanismerna skiljer sig jämfört med djur. Detta DNA benämns eDNA från engelskans environmental DNA, eller miljö-DNA. Det kan användas för att påvisa förekomst av en art utan att man behöver observera eller fånga individer. Miljöövervakning som inkluderar förekomst av arter sker traditionellt annars just genom visuella observationer. När det gäller undersökningar av förekomst av fisk används ofta icke-selektiva metoder som nätprovfiske eller elfiske. eDNA är ett nytt verktyg inom miljöövervakningen som kan komplettera, och i vissa fall ersätta, en del av de nuvarande metoderna – beroende på frågeställningen. Nätprovfiske är dessutom en dödlig inventeringsmetod vilket skulle kunna undvikas i de fall eDNA bedöms vara fullgott alternativ. Även om inventering av invasiva vattenväxter inte är destruktiv för andra arter, så skulle eDNA inventeringar kunna vara ett bättre alternativ vid eftersök av växter eftersom insamlingsmetoden inte är speciellt arbetskrävande. Det finns också studier som visar att eDNA kan spridas rätt långt i rinnande vatten och därför kan ett prov nedströms indikera på förekomst av en art i vattendraget uppströms.

Vattenburet eDNA kan samlas genom filtrering som därefter extraheras för vidare analys för att få svar på frågor om vilka arter som finns eller har funnits i vattnet (så kallad metabarcoding), eller om en specifik och eftersökt art finns där, så kallad målartsanalys. Det finns idag ett stort antal vetenskapliga artiklar som bekräftar att tekniken fungerar, med många empiriska belägg när det gäller fisk. Fiskar är relativt sett stora organismer; de simmar runt, släpper ifrån sig exkrementer och fjäll och de andas genom gälar vilket sammantaget gör att de lämnar många DNA-spår. För många avrinningsområden finns goda referensbibliotek med DNA-sekvenser för fiskarterna i det aktuella området. När det gäller övervakning av vattenpest (*Elodea canadensis*) och eDNA finns det en studie i Norge som visar att tekniken fungerar (d'Auriac et al. 2019). Dock varierar eDNA-koncentrationen mycket över säsongen med de högsta koncentrationerna uppmätta på hösten i den studien.

I den här rapporten redovisar vi analyser av sammansättningen av fiskarter i Nissan i Jönköpings län baserat på insamling av eDNA följt av metabarcoding och bioinformatisk analys. I uppdraget ingick också att testa och vidareutveckla tidigare publicerade assays (analysmetoder) för de två invasiva främmande arterna smal vattenpest (*Elodea nuttallii*) och vattenpest (*E. canadensis*) på ett antal vattenprover.

Provtagning och provtagningslokaler

Provtagning

All insamling av vattenprover genomfördes av Länsstyrelsen i Jönköpings län 2021. Inför provtagningen hade personal från SeAnalytics en utbildningsdag för berörd personal för att gå igenom olika tekniker och procedurer för att förhindra kontamination.

Insamling av vattenproverna skedde med engångshinkar, 1 liter vatten per prov. Flera delprover slogs samman till denna liter för att sprida insamlingen i vattnet. Vattenprovet filtrerades i direkt anslutning till provtagningen i sterila 0.45µm Sterivex-filter och dessa fixerades i 95 % etanol för att sedan förvaras i frys -20°C fram till extraktion.

Vid varje plats producerades dessutom ett blankprov bestående av destillerat vatten som hanterades på samma sätt som provvattnet och som analyserades tillsammans med de riktiga proverna. Blankprov tas för att säkerställa att det inte förekommer kontamination i provtagningsprocessen.



Bild 1. Personal instrueras i tekniker för vattenprovtagning för eDNA. Foto Per Sundberg

Provtagningslokaler

Prover togs på flera lokaler för dels vattenpest och smal vattenpest, dels för analys av fisk-samhällen. Bilaga 1 anger lokalers position, tidpunkt och annan metadata.

Metodutveckling och analyser

Extraktion DNA och dPCR

DNA extraherades från filtren med Nucleospin eDNA Water (Machery-Nagel). Totala mängden DNA mättes med Qubit fluorometer för att säkerställa att extraktionerna har fungerat. Notera att total mängd av DNA mäts, alltså inte bara DNA från mål-arten/-arterna.

För att påvisa förekomsten av DNA från målarterna vattenpest och smal vattenpest användes en applikation av kvantitativ PCR: digital PCR (dPCR). Metoden beskrivs i Bilaga 2 och på QiaGens webbplats ([Digital PCR for beginners, QiaGen \(Webbplats på engelska\)](#)).



Bild 2. QiAcuity One systemet och den typ av 24-plattor som använts (Foto: Alizz Axberg©).

Proverna preparerades inför analysen med QiAcuity One med Probe MM kit (QIAGEN). Varje prov, inklusive positiva och negativa prover, analyserades i duplikat för att öka tillförlitligheten. DNA extraherat från vävnad användes som positiv kontroll i analysen, och avjoniserat vatten (destillerat vatten) som negativ kontroll.

Extraherat DNA från varje lokal/prov applicerades på en 24-provplatta. 40 µl reaktionsvolym innehållande 10 µl Qiagen mix x4 för analys med prober, 2 µl primer-probe assay 20x (Bio-Rad), 10 µl DNA från prov och 18 µl vatten. Den assay (primers + prob) som användes har utvecklats i SeAnalytics laboratorium (nedan) för de två arterna vattenpest. Varje prov analyserades i duplikat för att öka sannolikheten att hitta målarten.

Test och optimering av assay för vattenpest

Elodea canadensis

Primer och prob assay är från d'Auriac et al. (2019) baserad på den molekylära markören trnL-trnF "intergenic spacer". Assayn benämns EctrnL i de interna protokollen.

Primrarna amplifierar ett genfragment på 103 baspar och en fluorescent prob med FAM-färgämne sätter sig på DNA-fragmentet mellan primrarna.

EctrnL_F TTTCTCCTTCATTGTATCTTTCACA

EctrnL_R TGTGTGATTCTATCTGTATGTAGAC

EctrnL_P FAM-TCCGAACAGAAATGCCTCTCTCTTATCC

Elodea nuttallii

Primerna är från Gantz et al. (2018) baserad på den molekylära markören ITS1. Assayn benämns Enut ITS1 i de interna protokollen.

Enut ITS1_1Fb (5'-GCGTTGCTCTATTTGGAT-3') and Enut ITS1_1Rb (5'-GAGCAGCCCTTCAAGGCAACA-3'), ger en produkt på 122 baspar.

I dPCR-analysen används även en artspecifik prob. Detta fanns inte i Ganz et al. (2018) utan designades av SeAnalytics.

Enut_probe: FAM-CTTGTTCGATTGAACCCTAGACGT

Test och utvärdering av assay¹

I både Gantz et al. (2018) och d'Auriac et al. (2019) användes i hybridiseringssteget en temperatur på 62°C för Enut ITS1 och 58°C för EctrnL. Detta var framtaget för qPCR och är därför inte direkt överförbart till dPCR. Som ett första steg i testet/utvärderingen av dPCR-assayn användes dessa temperaturer på prover av vävnad från bägge arterna: *Elodea nuttallii* (fem vävnadsprover) och *E. canadensis* (tre vävnadsprover). Vid dessa temperaturer amplifierades båda arterna, det vill säga de kunde inte skiljas åt. Därför ökades temperaturen stegvis med 2°C och nya analyser genomfördes. Vid 64°C för Enut ITS1 och 60°C för EctrnL blev signalen för målarten cirka 100 gånger starkare än för den andra arten, men det fanns fortfarande en svag signal för den andra arten. Högre temperaturer skulle inhibera dPCRn. Därför analyserades alla prover för bägge vattenpest-arterna; om ett prov visade en stark signal för den ena arten och en svag signal för den andra arten räknades bara den första arten. Tabell 1 anger PCR/termocykling som har använts.

¹ Assay: PCR primrar och prob-kombination specifika för målarten med tillhörande validerad PCR protokoll.

Tabell 1. Protokoll för dPCR termocykler.

Cykler	Temperatur	Tid
<i>Elodea nuttalli</i>		
1x	95° C	2 min
40 x	95° C	30 sek
40 x	64° C	1 min
<i>Elodea canadensis</i>		
1x	95° C	2 min
40 x	95° C	30 sek
40 x	60° C	1 min

Analys av nyzeeländsk tusensnäcka

Proverna från Vättern skulle även analyseras för nyzeeländsk tusensnäcka. Det fanns en publicerad qPCR assay (Goldberg et al. 2013), men dPCR-analysen gav inte utslag vare sig för känt positivt prov eller på proverna från Vättern. Metoden behöver utvecklas och detta rymdes inte i projektet.

Analys av fisksamhällen

DNA extraherades från filtren på det sätt som beskrivits ovan. DNA-koncentrationer varierade mellan 12 och 356 ng/μl. Inför PCR späddes alla DNA-prover till cirka 10 ng/μl.

Bibliotek för sekvenseringen

12S är den markören som främst används för flerartsanalys (metabarkoding) av fiskar (Miya et al. 2015). Ett fragment av 12S mitokondriell gen amplifierades med hjälp av primrar MiFish-U-F GTCGGTAAACTCGTGCCAGC och MiFish-U-R CATAGTGGGG-TATCTAATCCCAGTTTG, framtagna för benfiskar (Miya et al 2015). Dessa primrar skapar ett cirka 200 baspar långt genfragment som kan urskilja de flesta fiskarter, med undantag för vissa nära besläktade arter. Primrar innehåller också så kallade adaptrar - sekvenser som behövs för nästa PCR.

PCR reaktioner utfördes i 25 μl volym med 12 μl KaPa HiFi HotStart ReadyMix 2x (Roche), 1 μl 10mM forward och revers primrar, 2 μl DNA och 9 μl vatten. PCR-cykeln innehöll ett första steg med 98 °C i 2 min; sedan 35 varv med 98 °C i 40 s, 65 °C i 30s, 72 °C i 30 s min; och ett sista varv med 72 °C i 5 min. 5 μl från varje PCR-reaktion analyserades med hjälp av gel elektrofores för att säkerställa att PCR fungerade. Två PCR-reaktioner gjordes för varje prov och poolades för att minimera slumpmässig variation i amplifieringen. PCR-produkter rengjordes från rester av primer med hjälp av magnetiska beads (mikroskopiska magnetiska korn) AMPure XP beads (Beckman Coulter) enligt Illumina protokoll².

² [16S Sample Preparation Guide \(illumina.com\)](https://www.illumina.com/documents/guides/sample/sample_prep_guide/sample_prep_guide.pdf)

Rensade PCR-produkter amplifierades i nästa PCR för att fästa barkoder (korta DNA-sekvenser olika för varje prov) och primrar för sekvenseringen i en Illumina maskin. PCRen gjordes i 50 µl volym med 25 µl KaPa HiFi HotStart ReadyMix 2x (Roche), 5 µl barkoder från Eurofins Genomics, 10 µl rensade PCR produkten och 10 µl vatten. PCR cycling var 95 °C i 2 min; 10 varv med 95 °C i 30 s, 55 °C i 30s, 72 °C i 30 s min; och sista steg 72 °C i 5 min. PCR-produkter (nu kallade "bibliotek") rensades igen med magnetiska beads som fångar PCR-produkter för att ta bort rester av primrar, lösa nukleotider och salter. Bibliotekens koncentrationer mättes med Qubit. Lika mängder DNA från varje bibliotek poolades i ett rör och skickades till Eurofins Genomics, Tyskland för sekvenseringen.

Förutom proverna inkluderades en positiv och en negativ kontroll. En positiv kontroll är ett blandat DNA från tio kända fiskarter. Den används för att säkerställa att PCR och sekvenseringen fungerade väl, det vill säga alla tio fiskarter kan hittas i sekvenserna. En negativ kontroll består av vatten i stället för DNA och används för att säkerställa att ingen kontaminering har skett under bibliotekpreparationen. Kontrollerna processades på samma sätt som proverna.

Sekvensering och bioinformatisk analys

Biblioteken sekvenserades med Illumina MiSeq, 2 x 300bp teknik hos Eurofins Genomics. De levererade sekvenserna var redan separerade per prov enligt barkoderna. Sekvenserna kontrollerades för kvalitet med hjälp av FastQC verktyg; sekvenser med låg kvalitet och rester av adapterar filtrerades bort med hjälp av cutadapt verktyg (paired-end mode; cutadapt -a CTGTCTCTTATA -q 20,20-j 0 -m 125) och kvalitet kontrollerades igen. Den bioinformatiska analysen utfördes med hjälp av mothur pipelinen (Schloss et al. 2009) enligt algoritmen från Aylagas & Rodriguez-Ezpeleta (2016). Forward och reversläsningar för varje sekvens sattes ihop; de som hade olika nukleotider i forward och reversläsningar eller fel fragmentlängd filtrerades bort. Efter det sorterades sekvenserna till unika; de som förekom bara en gång (så kallade singletons) och de som visade sig vara en sammansättning av två olika PCR fragment (så kallade chimeras) filtrerades bort; dessa har med största sannolikhet uppkommit som PCR-fel. Sekvenserna jämfördes med egen 12S sekvensdatabas med hjälp av knn (k-Nearest Neighbor) algoritmen. Databasen innehåller alla sekvenser från NCBI publika databasen (Genbank) som potentiellt kan amplifieras med 12S primrar och är gjort med hjälp av in silico ecoPCR (Ficetola et al. 2010). Sekvenserna grupperades enligt deras taxonomi och antal sekvenser för varje art räknades i varje prov.

Resultat

Målartsanalys vattenpest och smal vattenpest

Flera prover togs på lokaler där det fanns anledning att tro att det fanns vattenpest och/eller smal vattenpest, och i ett vattendrag spreds också vävnad aktivt av provtagningspersonal (Bilaga 1). Tabell 2 visar resultatet av dPCR-analysen. eDNA-analysen kunde påvisa förekomst av smal vattenpest på två lokaler från Svartån. I fallet med Åsvallehultsdammen var antalet positiva partitioner mycket högt, alltså en tydlig och stark signal. När det gäller vattenpest kunde det endast påvisas spår på en lokal, Södra Vixens utlopp. Notera att den angivna mängden i kolumnen *Totalt DNA* avser allt DNA som extraherats från filtret och alltså inte specifikt för vattenpestarter i det här fallet. Se även Bilaga 1 för mer detaljer om provtagningen. För dPCR-analysen anges medeltalet positiva partitioner från två analyser.

Tabell 2. Resultat av dPCR-analysen med avseende på vattenpest och smal vattenpest.

Lokaler/namn på prov		Totalt DNA (ng/μl)	dPCR Elodea nuttallii	dPCR Elodea canadensis
Vättern	Brevik 1	16.4	-	-
	Brevik 2	17.6	-	-
	Granvik 1	10.8	-	-
	Granvik 2	10.6	-	-
Blank		0.192	-	-
Svartån	Nedstr Säbysjön 1.1	22	-	-
	Nedstr Säbysjön 1.2	20	-	-
	Huges marina 2.1	23.6	172	-
	Huges marina 2.2	För högt	67	-
	Åsvallehultsdammen 3.1	20.4	20 300	-
	Åsvallehultsdammen 3.2	20.4	-	-
Blank		0.178	-	-
Emån	Fjärsjö utlopp 1.1	17.6	-	-
	Fjärsjö utlopp 1.2	15.2	-	-
	Södra Vixen utlopp 1.1	9	-	-
	Södra Vixen utlopp 1.2	7.76	-	40
	Södra Vixen S Koudden	21.2	-	-
Blank		0.452	-	-
Svartån	Noen, inlopp from Valen 1.1	För högt	-	-
	Noen, inlopp from Valen 1.2	För högt	-	-
	Noen, utlopp from Noån 1.1	17.5	-	-
	Noen, utlopp from Noån 1.2	18.5	-	-
	Ralången, utlopp 1.1	23.2	-	-
	Ralången, utlopp 1.2	23.2	-	-
Blank		0.312	-	-

Analys av fiskarter Nissan

Metabarcodingen baserat på 12S kunde påvisa förekomsten av sammanlagt 21 arter, se tabell 3, 4 och 5. Fyra av arterna anses dock som uppenbart omöjliga och har markerats med en asterisk *. Se Bilaga 1 för beskrivning och benämning av lokaler.

Tabell 3. Vetenskapliga och svenska namn på de 17 förekommande arterna, samt ytterligare 4 som bedöms som orimliga och markerats med en *.

Taxonomi (Eukaryota; Chordata; Actinopteri)	Svenskt namn
Cypriniformes; Cyprinidae; Rutilus; Rutilus rutilus;	Mört
Perciformes; Percidae; Perca; Perca fluviatilis;	Abborre
Esociformes; Esocidae; Esox; Esox lucius;	Gädda
Cypriniformes; Cyprinidae; Alburnus; Alburnus alburnus;	Löja
Cypriniformes; Cyprinidae; Abramis; Abramis brama;	Braxen
Perciformes; Percidae; Gymnocephalus; Gymnocephalus cernua;	Gärs
Perciformes; Cottidae; Cottus; Cottus poecilopus;	Bergsimpa
Gadiformes; Lotidae; Lota; Lota lota;	Lake
Cypriniformes; Cyprinidae; Tinca; Tinca tinca;	Sutare
Perciformes; Percidae; Sander; Sander lucioperca;	Gös
Cypriniformes; Cyprinidae; Leuciscus; Leuciscus idus;	Id
Siluriformes; Siluridae; Silurus; Silurus glanis;	Mal
*Gobiiformes; Gobiidae; Ptereleotris; Ptereleotris zebra;	Tropisk akvariefisk zebra goby
*Spariformes; Nemipteridae; Nemipterus; Nemipterus bathybius;	Havsruda Spondyllosoma cant-harius?
*Cypriniformes; Cyprinidae; Devario; Devario devario;	Tropisk karpfisk - fel i barcode-databasen?
Cypriniformes; Cyprinidae; Squalius; Squalius cephalus;	Färna
Cypriniformes; Cyprinidae; Scardinius; Scardinius erythrophthalmus;	Sarv
*Cypriniformes; Cyprinidae; Cabdio; Cabdio morar;	Tropisk karpfisk - fel i barcode-databasen?
Cypriniformes; Cyprinidae; Blicca; Blicca bjoerkna;	Björkna
Cypriniformes; Cyprinidae; Leuciscus; Leuciscus leuciscus;	Stäm
Cypriniformes; Cyprinidae; Vimba; Vimba vimba;	Vimma

Tabell 4 Antalet läsningar, totalt och per art och lokal. Se Bilaga 1 för beskrivning och benämning av lokaler. * är arter som bedömts som orimliga

Svenskt namn	Total	N5_1	N5_2	N6_1	N6_2	N7_1	N7_2	N8_1	N8_2	N9_1	N9_2	Unb2_1	Unb2_2
Mört	133954 1	77867	90719	44853	86227	0	88522	10298 7	10919 2	54272	36034	181093	53663
Abborre	100890 3	33324	70301	19251	46957	38023	27949	21863	31677	72841	80539	174735	35050
Gädda	208846	6396	2112	19624	0	0	0	9481	6655	32647	21609	13	0
Löja	208698	9517	5261	0	0	0	9662	25246	16742	18777	9111	67825	10141
Braxen	198306	0	6680	0	0	0	2825	0	1232	8280	9797	9	5037
Gärs	161487	0	6744	10909	0	0	0	0	0	3795	810	0	0
Bergsimpa	93233	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Lake	39693	0	0	0	0	0	0	0	0	5595	1698	1	0
Sutare	13252	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gös	4095	0	0	4094	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Id	1853	85	91	25	36	0	78	156	285	124	159	217	54
Mal	516	0	0	0	0	0	0	0	0	516	0	0	0
*Tropisk akvariefisk zebra goby	396	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
*Havsruda Spondylioma cantharus?	118	0	0	0	0	0	118	0	0	0	0	0	0
*Tropisk karpfisk - fel i databasen?	90	0	0	0	0	0	90	0	0	0	0	0	0
Färna	10	0	4	0	0	0	1	0	4	0	0	1	0
Sarv	8	0	0	0	0	0	1	0	0	0	4	2	0
*Tropisk karpfisk - fel i databasen?	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	0
Björkna	3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Stäm	2	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
Vimma	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0

Tabell 5 Antalet läsningar per art och lokal fortsättning av tabell 4. * är arter som bedömts som orimliga

svenskt namn	B1_1	B1_2	N10_1	N10_2	N11_1	N11_2	N12_1	N12_2	N3_1	N3_2	N4_1	N4_2
Mört	79897	71148	0	24814	19732	22298	10512	37983	55071	28442	28487	35728
Abborre	67908	62540	0	0	34213	29817	9886	27281	1	110	64961	59676
Gädda	25742	5660	0	17227	0	10436	5304	7691	0	26	18018	20205
Löja	0	2713	0	0	0	0	9102	6115	8825	9661	0	0
Braxen	2228	10384	7743	16062	0	16022	49658	50269	12080	0	0	0
Gärs	6858	9415	8324	18454	0	0	5	38538	11376	21438	16120	8701
Bergsimpa	0	0	0	0	0	0	2	0	8570	30858	13427	40376
Lake	0	0	5717	0	0	0	0	4526	14	10	12038	10094
Sutare	0	0	0	0	0	0	9513	3739	0	0	0	0
Gös	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Id	55	80	0	33	8	34	35	134	85	27	28	24
Mal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
*Tropisk akvariefisk zebra goby	0	0	0	0	396	0	0	0	0	0	0	0
*Havsroda Spondylioma cant-harius?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
*Tropisk karpfisk - fel i databasen?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Färna	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sarv	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
*Tropisk karpfisk - fel i databasen?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Björkna	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Stäm	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vimma	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Totalt identifierades 21 olika fiskarter. Den vanligaste gruppen av arter som identifierades med många sekvenser i de flesta vattenprover var mört, abborre, gädda, löja, braxen och gärs. Förekomst av stora populationer för dessa arter i Nissan kan betraktas som säker. Dock kan inte antal sekvenser användas att direkt jämföra bestånd av olika arter med varandra eftersom stora och aktiva fiskar förmodligen släpper ut mer DNA än små eller inaktiva individer. Mängden DNA för en viss art i provet beror också på ett fysiskt avstånd mellan provtagningsstället och den typiska livsmiljön för arten (till exempel prover tagna vid stranden kommer troligen innehålla mindre DNA från djuplevande arter, och tvärtom).

Nästa grupp är arter som identifierades med relativt många sekvenser men i ett begränsat antal prover: bergsimpa, lake, sutare och gös. Dessa arter kan leva i mer fragmenterade habitat i Nissan. Id däremot identifierades i de flesta prover men med relativt få sekvenser.

Sekvenser från mal påträffades i ett prov men i relativt stor mängd, som tyder på en säker förekomst av mal i vattendraget. Dock kan man inte säga med säkerhet att arten finns enbart på den lokalen, se avsnittet Diskussion om falska negativa resultat.

Några tropiska fiskarter påträffades också i sekvensanalysen. Dessa förekom på en lokal och kan troligen komma från akvarier- eller dammar- som släppts i ån, alternativt från DNA som kommit med vattenavrinning från dammar.

Till sist ska det påpekas att identifiering av vissa nära besläktade arter (till exempel karpfiskar) kan vara osäker med hjälp av DNA. Bland annat mört, id och stäm har väldigt lika sekvenser i det analyserade genfragmentet. Samtidigt visar andra arter en stor genetisk variation/olika sekvensvarianter inom en och samma art, som är fallet för mört och björkna. Det kan leda till felidentifiering av dessa arter och förekomst med väldigt få sekvenser i provet ska betraktas med försiktighet. De ovanliga/mindre sannolika karpfiskar som påträffats i väldigt låg koncentration skulle behöva bekräftas med målartsanalys eller el-/nätprovfiske.

Diskussion

Målartsanalys vattenpest och smal vattenpest

Tester av assayn för de två arterna visade på möjligheten att påvisa artspecifikt DNA med dPCR genom användning av assayer för bägge arterna. Från Svartån finns det bekräftad förekomst av smal vattenpest upp till Åsvallehultsdammen och där har identifiering med hjälp av eDNA fungerat. Det väldigt höga antalet positiva partitioner i ett av proverna från dammen tyder på att det har funnits vävnad från vattenpest som har fastnat i filtret. I det andra provet från samma lokal fanns inga spår.

Både Södra Vixen och Fjärasjö har dokumenterat förekomst av vattenpest. I Fjärasjö finns även smal vattenpest noterad från 2013, men osäkert huruvida arten bestämts korrekt. dPCR-analysen kunde bekräfta förekomsten av vattenpest i ett av proverna från Södra Vixen. På en av lokalerna (Vixen S Koudden) mosades vattenpest och spreds i vattnet innan provtagningen. Detta har emellertid inte lett till några positiva partitioner i analysen. Från Vättern finns inga observationer av smal vattenpest, och där kan de negativa resultaten betraktas som trovärdiga.

Ojämnheter i analysresultaten belyser vikten av en bättre förståelse för hur DNA:t finns i vattnet och hur det sprids från växterna. Det är uppenbart från resultaten att det inte handlar om en jämnt fördelad förekomst av DNA utan resultaten talar i stället för att förekomsten är mer fläckvis. Detta ställer krav på en provtagningsdesign som täcker ett större område. Även tid på året kanske också behöver beaktas? Om målartsDNA:t är knutet till vävnadsbitar som har lossnat kanske en provtagning med planktonhåv skulle vara effektivare eftersom då också en större volym lätt kan provtas. Studien av d'Auriac et al (2019) visade att vattenpest-DNA var högre i prover tagna nära botten än från yta, och att högsta DNA-koncentration uppmätts i maj och oktober; inget vattenpest-DNA alls detekterades i ytprover samlade i juni och juli (se Figur 4 i d'Auriac et al. 2019). Vattenpest-proverna i denna undersökning samlades i september då vattenpest-DNA-koncentration borde vara relativt hög, såvida inte säsongvariation är olika för olika vattendrag.

Metabarcoding fisk samhällen

Tolv fiskarter kunde identifieras i Nissan med säkerhet, det vill säga i många prover och/eller med stora mängden sekvenser. De tolv arterna var mört, abborre, gädda, löja, braxen, gärs, bergsimpa, lake, sutare, gös, id och mal.

Referensdatabaser förbättras ständigt och, enligt vår erfarenhet, kan de pålitligt identifiera de flesta svenska sötvattensfiskar. De finns dock undantag, till exempel vissa nära besläktade karpfiskar som har väldigt lika DNA-sekvenser och/eller inomartsvariation kan förväxlas med varandra. Mört, id och stäm är ett sådant exempel. Deras sekvenser skiljer sig åt enbart i enstaka positioner och PCR- eller avläsning-fel kan lätt leda till fel-identifiering. Därför ska väldigt låga förekomster av en av dessa arter i prover som innehåller mycket DNA från en annan vanlig karpfisk (till exempel mört) betraktas med försiktighet. Arter av tropiska karpfiskar som påträffades i några prover är också osäkra och kan vara någon annan akvarie- eller dammfisk från samma familj.

Fel-identifiering från DNA-sekvenserna kan således orsaka felaktig rapportering av en art som inte finns vilket också kallas för **falska positiva resultat**. En annan typ av falska positiva resultat uppstår när artens DNA påträffas i vatten utan att det finns levande organismer. Till exempel om DNA kommer med avrinning från dammar eller liknande.

Falska negativa resultat, det vill säga att arten finns, men upptäcks inte med DNA-analys är också ett känt problem. Det gäller främst sällsynta arter och det kan finnas flera olika orsaker till falska negativa resultat, både under provtagningen och under följande analys. Om det är låga koncentrationer av artens DNA i vattnet är sannolikheten att det påträffas i ett begränsat prov liten. Särskilt om provtagningen genomförts på ett längre avstånd från arten. Vidare, även om några få kopior DNA från arten finns i vattenprovet kan man ändå missa dem i analysen, om de konkurreras ut av andra DNA-molekyler. Universella primrar som används i metabarcoding-analys är framtagna för att amplifiera ett genfragment hos alla arter från en organismgrupp, till exempel benfiskar som i detta projekt. Primrarnas effektivitet, eller ”affinity”, beror dock mycket på den specifika DNA-sekvensen i genfragmentet och varierar mycket mellan arterna. Det gör att i ett blandat DNA-prov amplifieras genfragmentet från vissa arter mycket lättare än från andra, och det finns alltid en risk att missa arter som är representerade av få DNA-kopior och svårare att amplifiera.

Det är en stor utmaning att utföra provtagningen och analysen på ett sätt som maximerar chans att upptäcka alla de olika arterna samtidigt. Därför bör ett negativt resultat, då en sällsynt art inte hittas i metabarcoding-analys baserat på ett litet antal prover, tolkas som en indikation att arten inte finns. Men för att bli mer säker kan i stället målartsanalys väljas. I undersökningar med fokus på enskilda sällsynta arter är målartsanalysmetoder att föredra, eftersom de är mer känsliga för låga mål-DNA-koncentrationer och deras utfall är inte beroende av andra DNA-molekyler i provet.

Referenser

Aylagas E & Rodriguez-Ezpeleta N (2016). Analysis of Illumina MiSeq metabarcoding data: Application to benthic indices for environmental monitoring. In: Bourlat SJ (ed.) Marine Genomics: Methods and Protocols. Methods in Molecular Biology, vol. 1452, Springer New York: 237-249.

d'Auriac AMB, Strand DA, Mjelder M, Demars BOL. & Thaulow J (2019). Detection of an invasive aquatic plant in natural water bodies using environmental DNA. PLoS ONE 14(7): e0219700. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0219700>

Ficetola GF (2010). An in silico approach for the evaluation of DNA barcodes. BMC Genomics 11: 434.

Ganz CA, Renshaw MA, Erickson D, Lodge DM. & Egan SP (2018). Environmental DNA detection of aquatic invasive plants in lab mesocosm and natural field conditions. Biological Invasions 20:2 535-2552.

Goldberg CS, Sepulveda A, Ray A, Baumgardt J, & Waits LP (2013). Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarium*). Freshwater Science 32: 792-800.

Miya M, Gotoh RO & Sado T (2020). MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples. Fisheries Science 86: 939–970.

Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB et al. (2009) Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. Applied and Environmental Microbiology 75(23): 7537-41. <https://mothur.org>

Bilagor

Bilaga 1 Provtagningslokaler för analys av fisk-samhällen, nyzeeländsk tusensnäcka, vattenpest och smal vattenpest

Prov togs för:

- vattenpest och smal vattenpest på lokalerna Fjärasjö, Södra Vixen, Almnäs, Brevik, Granvik. Säbysjön. Huges marina och Åsvallehultsdammen
- Nyzeeländsk tusensnäcka på lokalerna Almnäs, Brevik. Granvik.
- Flerartsanalys för fisk på lokaler i Nissan.

Provtagningslokaler med positioner och olika metadata redovisas i tabellen nedan.

Provnamn_Benämning	Vattendrag/sjö	SWEREF (N/E)	Datum	Temp Vatten (°C)	Strömförhållanden	Filtrerad volym (l)
Bäckshult 1.1 _ B1	Nissan	6358629/414389	2021-08-24	18	Lugnflytande	0,9
Bäckshult 1.2 _ B1	Nissan	6358629/414389	2021-08-24	18	Lugnflytande	0,9
Uppströms Nissafors bruk 2.1 _ Unb2.1	Nissan	6367357/419261	2021-08-24	19,5	Lugnflytande	0,72
Uppströms Nissafors bruk 2.2 _ Unb2.2	Nissan	6367357/419261	2021-08-24	19,5	Lugnflytande	0,6
Blankprov 210824	Blankprov	X	2021-08-24	x	x	0,48
Almnäs 1	Vättern	6456625/456928	2021-09-02	15	Lugnflytande	0,9
Almnäs 2	Vättern	6456625/456928	2021-09-02	15	Lugnflytande	0,96
Brevik 1	Vättern	6477616/467270	2021-09-02	18	Lugnflytande	0,96
Brevik 2	Vättern	6477616/467270	2021-09-02	18	Lugnflytande	0,84
Granvik 1	Vättern	6498942/473584	2021-09-02	18	Lugnflytande	0,96
Granvik 2	Vättern	6498942/473584	2021-09-02	18	Lugnflytande	0,84
Blankprov 210902	Blankprov	X	2021-09-02	x	x	0,48
Nedstr Säbysjön 1.1	Svartån	6429432/496025	2021-09-03	16	Lugnflytande	0,84
Nedstr Säbysjön 1.2	Svartån	6429432/496025	2021-09-03	16	Lugnflytande	0,84

Provnamn_Benämning	Vattendrag/sjö	SWEREF (N/E)	Datum	Temp Vatten (°C)	Strömförhållanden	Filtrerad volym (l)
Huges marina 2.1	Svartån	6433208/499407	2021-09-03	17	Lugnflytande	0,84
Huges marina 2.2	Svartån	6433208/499407	2021-09-03	17	Lugnflytande	0,84
Åsvallehultsdammen 3.1	Svartån	6431430/498262	2021-09-03	17	Stillastående	0,84
Åsvallehultsdammen 3.2	Svartån	6431430/498262	2021-09-03	17	Stillastående	0,84
Blankprov 210903	Blankprov	X	2021-09-03	x	x	
Fjärarsjö utlopp 1.1	Emån	6385207/514899	2021-09-06	17	Svagt strömmande	0,9
Fjärarsjö utlopp 1.2	Emån	6385207/514899	2021-09-06	17	Svagt strömmande	0,9
Södra Vixen utlopp 1.1	Emån	6388013/492880	2021-09-06	16	Lugnflytande	0,9
Södra Vixen utlopp 1.2	Emån	6388013/492880	2021-09-06	16	Lugnflytande	0,9
Södra Vixen S Koudden vattenpest-prov	Emån	6385766/494292	2021-09-06		Stillastående	0,48
Blankprov 210906	Blankprov	X	2021-09-06	x	x	0,48
Noen, inlopp från Valen 1.1	Svartån	6429116/482193	2021-09-07	15	Lugnflytande	0,9
Noen, inlopp från Valen 1.2	Svartån	6429116/482193	2021-09-07	15	Lugnflytande	0,9
Noen, utlopp Noån 1.1	Svartån	6421205/484914	2021-09-07	15	Lugnflytande	0,9
Noen, utlopp Noån 1.2	Svartån	6421205/484914	2021-09-07	15	Lugnflytande	0,9
Ralången, utlopp 1.1	Svartån	6421540/488984	2021-09-07	16	Lugnflytande	0,6
Ralången, utlopp 1.2	Svartån	6421540/488984	2021-09-07	16	Lugnflytande	0,6
Blankprov 210907	Blankprov	X	2021-09-07		x	0,48
Nissan 3.1 _ N3.1	Nissan uppströms N.Gussjö	6371018/420482	2021-09-09	14	Lugnflytande	0,48
Nissan 3.2 _ N3.2	Nissan uppströms N.Gussjö	6371018/420482	2021-09-09	14	Lugnflytande	0,48
Nissan 4.1 _ N4.1	Västerån uppströms N.Gussjö	6370857/419615	2021-09-09	14	Lugnflytande	0,9
Nissan 4.2 _ N4.2	Västerån uppströms N.Gussjö	6370857/419615	2021-09-09	14	Lugnflytande	0,9

Provnamn_Benämning	Vattendrag/sjö	SWEREF (N/E)	Datum	Temp Vatten (°C)	Strömförhållanden	Filtrerad volym (l)
Nissan 5.1 _ N5.1	Nissan nedströms Hammarsjön	6366632/418227	2021-09-09	17	Lugnflytande	0,9
Nissan 5.2 _ N5.2	Nissan nedströms Hammarsjön	6366632/418227	2021-09-09	17	Lugnflytande	0,9
Nissan 6.1 _ N6.1	Nissan uppströms Vikaresjön	6364711/417527	2021-09-09	17	Lugnflytande	0,9
Nissan 6.2 _ N6.2	Nissan uppströms Vikaresjön	6364711/417527	2021-09-09	17	Lugnflytande	0,84
nollprov 3.1-6.2	Blankprov	X	2021-09-09		x	0,48
Nissan 7.1 _ N7.1	Nissan nedströms Vikaresjön	6363072/416235	2021-09-10	17	Strömmande	0,9
Nissan 7.2 _ N7.2	Nissan nedströms Vikaresjön	6363072/416235	2021-09-10	17	Strömmande	0,9
Nissan 8.1 _ N8.1	Nissan nedströms S.Gussjön	6360404/415153	2021-09-10	18	Strömmande	0,9
Nissan 8.2 _ N8.2	Nissan nedströms S.Gussjön	6360404/415153	2021-09-10	18	Strömmande	0,9
Nissan 9.1 _ N9.1	Nissan Gislaved	6354012/412795	2021-09-10	18	Lugnflytande	0,9
Nissan 9.2 _ N9.2	Nissan Gislaved	6354012/412795	2021-09-10	18	Lugnflytande	0,9
Nissan 10.1 _ N10.1	Nissan nedströms Gislaved_N10.1	6344382/409752	2021-09-29	xx	Lugnflytande	0,48
Nissan 10.2 _ N10.2	Nissan nedströms Gislaved_N10	6344382/409752	2021-09-29	xx	Lugnflytande	0,48
Nissan 11.1 _ N11.1	Nissan nedströms Skeppshult	6328524/401399	2021-09-29	xx	Lugnflytande	0,42
Nissan 11.2 _ N11.2	Nissan nedströms Skeppshult	6328524/401399	2021-09-29	xx	Lugnflytande	0,48
Nissan 12.1 _ N12.1	Nissan uppströms Hyltebruk	6319023/397945	2021-09-29	xx	Lugnflytande	0,48
Nissan 12.2 _ N12.2	Nissan uppströms Hyltebruk	6319023/397945	2021-09-29	xx	Lugnflytande	0,48
Nollprov 29/9	Blankprov	X	2021-09-29			0,48

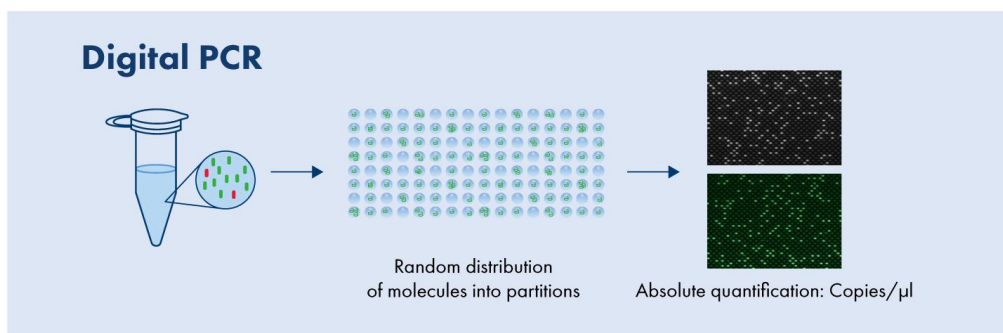
Bilaga 2 – digital PCR (dPCR)

Analys med PCR (Polymeras Chain Reaction) bygger på att en kort DNA-sekvens som är unik för arten som ska inventeras (målarten) mångfaldigas (amplifieras) i PCR-reaktionen. Det är den processen som kan detekteras på olika sätt, beroende på vilken teknik som används.

Det första steget i en målartsanalys baserad på den här tekniken är att designa och testa ett primerpar som är unikt för arten så att det med säkerhet går att säga att det bara är DNA från den eftersökta arten som amplifieras i PCR-reaktionen. Det här steget innefattar också test med närliggande arter och att hitta just den molekylära markör (till exempel COI, 12S, 16S) som ger en unik sekvens för arten. I det här steget används vävnad (eller topsat DNA) från individer som har identifierats till korrekt art. Många eDNA analyser/protokoll avslutas med dessa steg, men tekniken bör också verifieras med "skarpa" test i fält-situationer för att kunna säkerställa att de fungerar som övervakningsmetod. Med detta menas att prover tas på lokaler med bekräftad förekomst av målarten. Ett ytterligare steg är att försöka få fram en statistisk power-funktion för hur många prover som måste tas för att minimera risken för falska negativa. Falska negativa är förstås ett speciellt stort problem när det kommer till övervakning av invasiva främmande arter, där en missad förekomst kan ställa till stora problem. Falska positiva är inte ett lika stort problem eftersom flera undersökningar tyder på ganska kort livslängd för DNA i vattnet. Ett oväntat resultat kan alltså kontrolleras genom ett nytt prov någon vecka senare för att se om arten fortfarande finns kvar eller om det exempelvis kanske rörde sig om något DNA från fågelspillningar.

SeAnalytics använder för målarts-analyser QIAcuity (QiaGen), ett system för digital PCR (dPCR) som är en form av mikrofluid teknik där varje enskild PCR-reaktion delas upp i ett stort antal (runt 26 000) partitioner. Detta gör dels att det blir lätt att kvantifiera i hur många partitioner det sker en PCR-reaktion (blir alltså ett direkt mått på mängden målarts-DNA). Uppdelningen innebär också att annat DNA inte stör amplifieringen som annars kan ske, och detta gör att känsligheten ökar. dPCR har en högre känslighet än qPCR och kan detektera även väldigt låga koncentrationer av DNA-molekyler i ett prov.

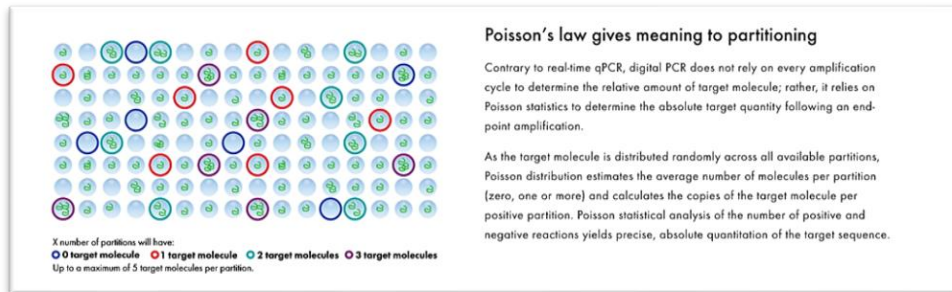
Nedan visas schematiskt och grafiskt de olika stegen i analysen. Figurerna är hämtade från www.qiagen.com/us/applications/digital-pcr/beginners



I första steget blandas det extraherade DNA med olika reagenser (gröna prickar DNA från målarten och rött bakgrunds-DNA). I det här steget läggs också till negativa (blanka) prov som test av kontamination plus positiva prov med DNA från målarten. Nästa steg är att partitionera lösningen i flera tusen individuella reaktioner där en PCR-reaktion sker i varje partition. Partitioner med målarts-DNA är här markerade grönt, mängden positiva

partitioner är kopplat till antalet ursprungs-molekyler. Positiva partitioner detekteras genom att ett fluorescerande ämne aktiveras i fungerande PCR och som kan avläsas i systemet.

I nästa steg görs en beräkning av medeltalet positiva partitioner baserat på en Poisson-fördelning.



Det går att beräkna mängden DNA utifrån denna analys och även konfidensintervall. Men, dessa värden är beroende av totalmängden DNA i provet, och det varierar mellan olika prover (även från samma lokal).



Länsstyrelsen
i Jönköpings län