

DNA-baserad övervakning av invasiva främmande arter

Resultat från undersökningar vid tre
marinor i Stockholms län



SEANALYTICS AB
Species and Ecosystem Analyses 



Länsstyrelsen
Stockholm

Titel: DNA-baserad övervakning av invasiva främmande arter – Resultat från undersökningar vid tre marinor i Stockholms län

Författare: SeAnalytics AB
Författare: Per Sundberg, Marty Breidenbach, Naurus Daraghmeh, Tim Dorup, Marina Panova och Matthias Obst (SeAnalytics AB)

ISBN: 978-91-7937-295-8

Rapportnummer: 2024:12 i Länsstyrelsen Stockholms rapportserie

Utgivningsår: 2024

Omslagsbild: SeAnalytics AB

Förord

Under de senaste decennierna har DNA-baserade metoder utvecklats snabbt. Länsstyrelsen i Stockholms län har utforskat möjligheterna med dessa metoder i flera projekt, bland annat inom arbetet med invasiva främmande arter. I denna rapport presenteras resultaten från en screening av invasiva främmande arter med DNA-baserade metoder i tre hamnar/mariner i Stockholms län sommaren 2023. Prover har tagits på vatten och plankton från Bullandö marina (Värmdö), Nynäshamns gästhamn och Södertälje hamnområde (Wasa Yachts). Resultaten jämförs också med resultat från andra övervakningsmetoder. Projektet utgör en del i arbetet med att hitta övervakningsmetoder för att både tidigt upptäcka, och följa spridningen av, invasiva främmande arter.

SeAnalytics AB har gjort provtagning och analys. SeAnalytics AB har också skrivit rapporten och är ansvariga för dess slutsatser. Projektet har finansierats av medel från Havs- och vattenmyndighetens anslag 1:11, avseende invasiva främmande arter.

Innehåll

Sammanfattning	5
Övervakning av invasiva främmande arter	6
Lokaler, provtagning och extraktion av DNA	8
Lokaler	8
Provtagning.....	10
Extraktion av DNA.....	11
Metabarcoding och bioinformatisk analys	12
Bibliotek och sekvensering	12
Bioinformatisk analys.....	14
Resultat och diskussion	15
Slutsatser och rekommendationer	18
Referenser	19
Bilaga 1 – Bioinformatisk analys	21
Referenser.....	22

Sammanfattning

Främmande arter som bedöms som invasiva utgör ett hot mot den inhemska biologiska mångfalden och kan också ha hälsoeffekter och få stora ekonomiska konsekvenser. När det gäller akvatiska arter är sjöfarten en viktig vektor för introduktionen av främmande arter genom påväxt på skrov och sjökistor, och via barlastvattnet. Därför är stora kommersiella hamnar med internationell trafik viktiga att övervaka för att om möjligt få en tidig indikation på förekomsten av en invasiv art. Även marinor med fritidsbåtar är intressanta att övervaka även om de förmodligen inte är den primära inkörsporten för främmande arter. Fritidsbåtar kan däremot utgöra en vektor för sekundär spridning av arter, speciellt kanske de båtar som har sin hemmahamn i närheten av en stor kommersiell hamn som till exempel i Södertälje.

Övervakningen av främmande arter i hamnar styrs av olika nationella och internationella direktiv och bör baseras på effektiva och träffsäkra metoder. Havs- och Vattenmyndigheten startade 2019 ett förenklat övervakningsprogram: "Rapid assessment survey" (RAS), som senare under perioden utvecklades till eRAS ("extended RAS"). I metoden ingår undersökningar av påväxt på uthängda paneler, avskrap från hårda ytor i undersökta hamnar, artificiella habitat (burar) som ska fånga mobil fauna, och visuella observationer i vattnet efter synbara främmande arter. Flera jämförande studier har visat att DNA-baserade metoder för identifiering av främmande arter är mer effektiva och hanterar också olika livsformer (larver, juveniler) som är svåra att identifiera med traditionella metoder.

Här redovisar vi hur DNA-baserad identifiering (vatten och plankton) har använts för att övervaka främmande arter i tre hamnar/marinor i Södertälje, Nynäshamn och på Värmdö (Bullandö). Vi kan påvisa förekomsten av nio invasiva/främmande arter. I Nynäshamn och Bullandö genomfördes parallellt och samtidigt en undersökning av främmande arter enligt eRAS-protokollet som del i ett annat uppdrag. I det fallet hittades tre främmande arter.

Övervakning av invasiva främmande arter

En art (underart) definieras som främmande om den har introducerats (med eller utan människans hjälp) utanför sin historiska eller nutida utbredning. Vad som bedöms som "främmande" är en definitionsfråga och här utgår vi ifrån definitionen i Strand et al. (2018) som klassificerar en art som främmande om den förts in i landet med människans hjälp efter år 1800. De arter som påverkar miljön och ekosystemen på ett mycket negativt sätt och som utgör ett hot mot den biologiska mångfalden, och även kan ha direkta hälsoeffekter på människor och andra djur och växter klassas som invasiva.

I den akvatiska miljön är sjöfarten förmodligen en betydande källa till att invasiva främmande arter introduceras och sprids, via påväxt på skroven eller via det ballastvatten som fartyg tar in/släpper ut i samband med lastning och lossning. Därför är hamnar och farleder speciellt intressanta när det gäller kontroll och övervakning av främmande arter eftersom de är platser där introduktionen ofta sker (Bergkvist et al. 2020a). Det kan också finnas en sekundär spridning med fritidsbåtar från de större hamnarna och då sprids arter via påväxt eller redskap (exempelvis ankare). Det kan därför också vara intressant att övervaka fritidsbåtsmarinor, även om de förmodligen inte är den primära platsen för introduktion av dessa arter.

Övervakningen av främmande arter styrs av ramdirektivet för vatten, havsmiljödirektivet, ballastvattenkonventionen (IMO), havsmiljökonventionerna Helcom och Ospar, och EU:s förordning om invasiva främmande arter. I övervakningen av främmande arter är det avgörande att kunna bestämma individer till art – i andra övervakningsprogram kan man kanske nöja sig med att rapportera individer till högre (som släkte, familj, fylum) taxon, men per definition innebär övervakning av invasiva arter också att kunna identifiera individer till art.

Traditionellt identifieras arter utifrån morfologiska karaktärer vilket kräver god kunskap om de grupper som skall bestämmas. Med tanke på den stora artrikedomen och generella diversiteten i den akvatiska (speciellt marina) miljön är det inte möjligt för enskild expert att kunna identifiera alla arter. Till detta kommer svårigheter att kunna identifiera juvenila former av arter som kan se helt olika ut som adult, eller att kunna bestämma larver och ägg. Havs- och Vattenmyndigheten påbörjade 2019 ett förenklat övervakningsprogram: "Rapid assessment survey" (RAS), som senare under perioden utvecklades och benämndes därefter eRAS ("extended RAS"), beskrivet i exempelvis Bergqvist et al.

(2020b). I metoden ingår undersökningar av påväxt på uthängda paneler, avskrap från hårda ytor i undersökta hamnar, artificiella habitat (burar) som ska fånga mobil fauna, och visuella observationer i vattnet efter synbara främmande arter.

Under 2020 genomfördes en studie i och omkring kommersiella hamnar utmed västkusten (Sundberg et al. 2022) för att undersöka om DNA-baserad identifiering av arter kunde användas inom övervakningen. Undersökningen baserades på den typ av påväxt-paneler (Figur 1) som används inom det internationella ARMS-MBON projektet (<http://arms-mbon.github.io>) med en standardiserad hantering tillsammans med planktonprover under tre tillfällen från lokaler i och runt Göteborg.



Figur 1. Ihopsatt ARMS system med betongplatta i botten färdigt att läggas ut. Påväxtpanel efter tre månader på botten i inloppet till Göteborgs hamn (Från Sundberg et al. 2022).

Under 2022 genomfördes en mer direkt jämförelse mellan DNA-baserad övervakning och eRAS i hamnen Wallhamn på Tjörn (Obst et al. 2023). Här baserades jämförelsen på DNA från bulkprover (påväxt ARMS och plankton) samt eDNA från vattenprover. Bägge dessa undersökningar visade att DNA-baserad identifiering av främmande arter hittar många fler än eRAS, samt att artsammansättningen varierar lite mellan om DNA:t kommer från settlingspaneler, planktonprover eller vattenprover och är inte helt överlappande (Obst et al. 2023; Sundberg et al. 2022).

I ljuset av dessa resultat (liksom tidigare undersökning i Sundberg et al. 2018) genomfördes en provtagning i tre hamnar/marinor på uppdrag av Länsstyrelsen i Stockholm under för-/efter-sommaren 2023 för att utvärdera möjligheten att använda eDNA för mer kontinuerlig övervakning av främmande arter. Parallellt med detta togs även prover enligt eRAS protokollet (t ex Bergkvist et al. 2020b) i två av dessa hamnar (Nynäshamn och Bullandö) som en del i det nationella övervakningsprogrammet för främmande arter. I de fallen har vi också då möjlighet till en direkt jämförelse mellan olika tekniker för övervakning.

Lokaler, provtagning och extraktion av DNA

Lokaler

Vatten och planktonprover togs på tre lokaler: Södertälje vid Wasa Yachts, Nynäshamn gästhamn (två platser) och Bullandö Marina (Värmdö) (Tabell 1). Nynäshamn gästhamn valdes av logistiska skäl framför den närliggande kommersiella hamnen som med tanke på internationell trafik kan förväntas vara en mer betydande inkörsport för främmande arter. Med tanke på närheten till den kommersiella hamnen kunde det betraktas som samma lokal.

Tabell 1. Lokaler där eDNA och planktonprov togs, position, antal prov och datum (period) för provtagningen.

Lokal	Position (latitud/longitud)	Antal prover 6–8 juni	Antal prover 8–10 september
Södertälje (Wasa Yachts)	59.16755N 17.66970E		
eDNA		4	2
plankton		2	2
Nynäshamn gästhamn A	58.89918N 17.95371E		
eDNA		2	1
plankton		1	1
Nynäshamn gästhamn B	58.90040N 17.95491E		
eDNA		2	1
plankton		1	1
Bullandö marina	59.29732N 18.64977E		
eDNA		4	2
plankton		2	2

Bilder nedan från Nynäshamn och Bullandö tagna i juni (Figur 2,3) och Södertälje hamnområde (Wasa Yachts) i juli (Figur 4).



Figur 2. Nynäshamn gästhamn (Foto Marty Breidenbach).



Figur 3. Bullandö marina (Foto Marty Breidenbach).



Figur 4. Wasa Yachts, Södertälje hamnområde (Foto Länsstyrelsen Stockholm)

Provtagning

Planktonprover togs med vertikala drag från cirka 10 meters djup, eller grundare om djupet var mindre på lokalen. Plankton samlades med en Hydro-Bios Apstein 90 μm håv, diameter 40 cm öppning, som resulterade i en provtagningsvolym på upp till 1,25 m³ per prov.

Proverna fixerades i sterila engångsburkar med en mängd alkohol som beräknades innebära en koncentration på minst 60–70 %. Efter provtagningen och när provet lagt sig på botten av burken dekanterades en del av alkoholen bort och ersattes med ny (95 %) för att säkerställa att halten var minst 70 %. Proverna sparas i -20°C fram till extraktion.

Vattenproverna togs med en Ruttner vattenhämtare (Figur 5) på lite olika djup och delproverna samlades i en steril 1-litershink som då utgjorde provet från den lokalen/replikaten. All insamling gjordes med engångsutrustning där möjligt för att förhindra kontamination och Ruttner-hämtarna steriliserades med 10 % klorinlösning mellan provlokaler/provtillfällena. Vattenproverna filtrerades och fixerades i anslutning till insamlingen (högst fyra timmar efter provet tagits). Detta

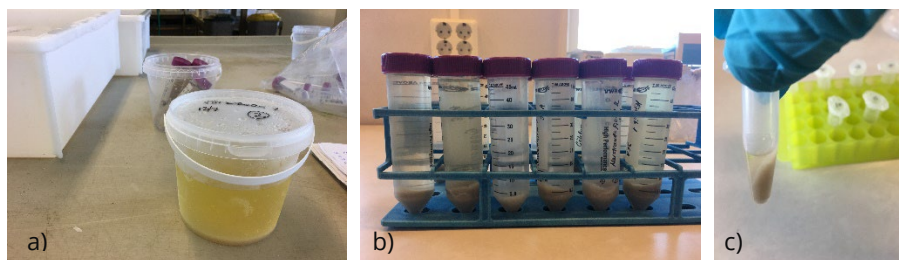
är viktigt eftersom flera studier visar att DNA:t ganska snabbt bryts ner efter det lämnat källan. Proverna filtrerades i sterila och inkapslade Sterivex® filter (0,45 µm porstorlek) vilka sedan fixerades i 95 % etanol och förslöts med proppar. Varje filter placerades därefter i 50 ml Falcon-rör för att förhindra korskontamination mellan filter. Filtren placerades vid hemkomst i -20°C frysa fram till extraktion av DNA. På en av provplatserna filtrerades 0,5 liter DNA/RNA fritt vatten som negativ kontroll.



Figur 5. Ruttner vattenhämtare av den typ som används för insamling av vatten till eDNA-analys (Foto Lise-Lotte Sundberg) och planktonhäv (Foto Jens Kosterhed).

Extraktion av DNA

Planktonproverna fixerades i etanol (minimum 70 %) och första steget i extraktionen är att ta bort etanolen från proverna (Figur 6).



Figur 6. De olika stegen för att ta bort etanolen från proverna (från Sundberg et al. 2022).

Först får planktonen lägga sig i botten på insamlingskärlet (Figur 6a), därefter dekanteras etanol av så att det kvarstår 100–150 ml. Efter detta skakas proverna om så att det sker en ordentlig blandning plankton/etanol. Proverna förs över till 50 ml Falcon rör (Figur 6b) och centrifugeras 10 min i 12 000 rpm vid 10°C så att det bildas en tydlig

pellet i botten på röret. Överskjutande etanol dekanteras av och cirka 0,5 gram vått material förs över till mindre Eppendorf-rör och dessa centrifugeras (12 000 rpm, 10 minuter, 10°C) (Figur 6c) varefter etanolen sugas upp med pipett. Provet lämnas att torka (cirka 45 minuter) för att dunsta bort återstående etanol innan extraktion av DNA med Qiagen DNeasy Power Soil Kit. De intorkade proven från sista steget ovan re-suspenderades i lysis buffer (60 µL C1 buffer-vätska från "power beads tubes", ingår i kitet), återfördes till "power beads tubes" och extraherades enligt tillverkarens protokoll.

DNA extraherades från filtren med Nucleospin eDNA water kit (Macherey-Nagel) med den teknik och standard som utvecklats i laboratoriet. Koncentration av DNA i extrakten mättes med Qubit® fluorometer. Notera att detta mäter koncentrationen av all DNA i provet och inte specifikt DNA från målarten.

Metabarcoding och bioinformatisk analys

Bibliotek och sekvensering

Metabarcoding bibliotek gjordes med COI markör speciellt framtagen för evertebrater (Tabell 2) med PCR som beskrivs i Tabell 3.

Tabell 2. Metabarcoding sekvens (COI) använd i den här studien.

Målgrupp	Primer	Referens
evertebrater COI 367nt	mICOIintF: GGWACWGGWTG AACWGTWTAYCC YCC dgHCOI2198: TAIACYTCIGGRTGI CCRAARAAYCA	Leray et al. 2013, Geller et al. 2013

Tabell 3. Ingående delar i PCR-reaktion.

COI	µl
KaPa Buffer A, 10x	3
MgCl₂, 25 mM	0,6
dNTPs, 10 mM each	0,8
KaPa Taq polymerase, 5U/µL	0,9
Forward primer, 10 µM	1,8
Reverse primer, 10 µM	1,8
BSA, 20 mg/mL	0,6
PCR-grade H₂O	18,5
DNA template, 10 ng/µL	2*

*För prover med låga DNA koncentrationer: 10 µl DNA och 10,5 µl vatten.

PCR-cyklingen gjordes enligt nedanstående:

COI (touchdown PCR): 95 °C för 5 min; 16 cykler 95 °C för 10 s, 62 °C (-1 °C / cykel) för 30 s, 72 °C för 1 min; 24 cykler 95 °C för 10 s, 46 °C för 30 s, 72 °C för 1 min; 72 °C för 7 min.

Fem µl från varje PCR-reaktion analyserades med gel-elektrofores för att säkerställa att PCR fungerade. Två PCR-reaktioner gjordes för varje prov och slogs samman för att minimera slumpmässig variation i amplifieringen. PCR-produkter rengjordes från rester av primer och annat med hjälp av magnetiska beads AMPure XP beads (Beckman Coulter) enligt Illumina protokoll.

(https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.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. PCR:en gjordes i 50 µl volym med 25 µl KaPa HiFi HotStart ReadyMix 2x (Roche), 5 µl barkoder från Eurofins Genomics, 10 µl rensade PCR-produkter och 10 µl vatten. PCR-cykling var 95 °C för 2 min; 10 cykler med 95 °C för 30 s, 55 °C för 30 s, 72 °C för 30 s; och sista steget 72 °C för 5 min. PCR-produkter (nu kallade "bibliotek") rensades igen med magnetiska beads och bibliotek-koncentrationer mättes med Qubit. Lika mängder DNA från varje bibliotek kombinerades i ett rör och skickades till Eurofins Genomics, Tyskland som utförde index PCR och sekvenseringen med Illumina MiSeq platform med 2 x 300bp teknik.

Den negativa kontrollen från DNA-extraktionen processades tillsammans med proverna. För att kontrollera kontaminering under preparation av biblioteken gjordes en ytterligare negativ kontroll i varje PCR med vatten i stället för DNA–inget band hittades i någon PCR.

I analyserna inkluderades också positiva kontroller. Dessa användes för att säkerställa att PCR, sekvenseringen och analyserna fungerade väl. För COI användes ett blandat DNA från åtta kända evertebrat-arter.

Bioinformatisk analys

Sekvenser levererades separat för varje prov och kontrollerades för kvalitet. Accepterade sekvenser analyserades med DADA2 R package (Callahan et al. 2016). Cutadapt användes för att hitta och klippa ut primrar från sekvenser. Sekvenserna filterades för kvalitet och längd och troliga fel korrigerades enligt DADA2 modell. Forward- och revers-sekvenserna sattes ihop, därefter filterades chimeras och singletons bort. Alla unika sekvenser i datasetet (ASV, amplicon sequence variants) identifierades och räknades per prov efter filtrering. För taxonomisk identifiering användes BOLD-databas (<http://www.boldsystems.org/>) tillsammans med BOLDigger (Buchner & Leese 2020).

Se Bilaga 1 för en mer detaljerad beskrivning av den bioinformatiska analysen.

Resultat och diskussion

Den totala mängden DNA mättes med Qubit fluorometer för att säkerställa att extraktionerna hade fungerat. DNA-koncentrationer varierade mellan "ej mätbart" (EM) till 183 ng/μl (Tabell 4). Inget DNA kunde mätas i negativa kontrollen.

Tabell 4. Total mängd DNA uppmätt i de olika proverna. Notera att detta är den totala mängden DNA. EM = ej mätbart

Lokal	Konc. DNA (ng/μl per prov) i prover tagna i juni (jfr Tabell 1)	Konc. DNA (ng/μl per prov) i prover tagna i september (jfr Tabell 1)
Södertälje (Wasa Yachts)		
eDNA	EM / EM / EM / EM	17,9 / 17,7
plankton	62,4 / 183	82,7 / EM
Nynäshamn gästhamn A		
eDNA	9,2 / 8,87	16,6
plankton	25,1	103
Nynäshamn gästhamn B		
eDNA	4,41 / 12,9	23,5
plankton	6,1	76
Bullandö marina		
eDNA	13 / 14,1 / 11,6 / 10,3	17,1 / 20,6
plankton	42,7 / 89,3	120 / 98

Generellt så är det mer DNA i planktonproverna vilket vi kan förvänta oss med tanke på att de innehåller vävnad från organismer. Dessa prover är också mindre slumpmässiga när det kommer till DNA-förekomst – vilket återigen inte är så förvånande. Vi vet inte i detalj hur DNA finns i de fria vattenmassorna, förmodligen en kombination av fria molekyler och bundet till olika slag av partiklar. Resultaten visar på vikten av att ta flera prover, men notera att "ej mätbara" värden på totala DNA-koncentrationen inte behöver betyda total frånvaro av molekyler.

Tabell 5 redovisar de totalt nio invasiva främmande arter som identifierades i undersökningen samt på vilken lokal och vid vilket provtillfälle.

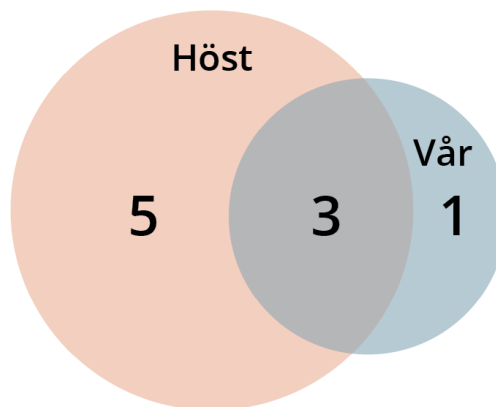
Tabell 5. Förekomst av invasiva främmande arter bekräftade med DNA-identifiering från plankton prover (P) och filtrerade eDNA vattenprover (V) från de tre lokalerna: Södertälje (S); Nynäshamn (N); Bullandö (B) och provtagningstillfälle (vår/tidig sommar respektive höst). Se Tabell 1 för mer detaljer.

Art	Svenskt namn	Funnen på lokal	Vår	Höst	NIS-lista ¹
<i>Acartia tonsa</i>	kräftdjur ²	N, B, S	2	4	Helcom
<i>Amphibalanus improvisus</i>	slät havstulpan	N, B, S	2	3	HaV, Adb
<i>Cercopagis pengoi</i>	rovvattenloppa	B, S	0	2	HaV, Adb, Helcom
<i>Gammarus tigrinus</i>	tigermärla	S	0	1	HaV, Adb, Helcom
<i>Marezzelleria arctica</i>	havsborstmask ²	B, S	0	2	Adb, Helcom
<i>Marezzelleria neglecta</i>	havsborstmask ²	S	1	1	HaV, Adb, Helcom
<i>Marezzelleria viridis</i>	havsborstmask ²	N, B	1	0	HaV, Adb, Helcom
<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	nyzeeländsk tusensnäcka	B, S	0	2	HaV, Adb
<i>Rangia cuneata</i>	amerikansk trågmussla	S	0	2	HaV, Adb, Helcom

¹ Förekommande i checklista med potentiella främmande och invasiva arter utfärdad av Havs- och Vattenmyndigheten (HaV), Artdatabanken (Adb), och Helcom

² inget svenskt namn tillgängligt

Figur 7 visar överlapp mellan säsonger i ett Venn-diagram och visar att vi hittat fler arter vid höstprovtagningen (8) jämfört med vår/tidig sommar (4). En art (*Marezzelleria viridis*) hittades bara i vårprovtagningen. Resultatet visar att provtagning behöver upprepas under säsongen och det kanske också vid ytterligare tillfällen än de två som använts här.



Figur 7. Diagrammet visar antalet arter per säsong och överlapp mellan provtagningar.

I den ovannämnda parallella undersökningen baserat på eRAS-protokollet (till exempel Bergkvist et al. 2020b) hittades tre invasiva arter: svartmunnad smörbult, elegant tångräka och vandrarmussla. Smörbulten hittades i Nynäshamn i de artificiella habitaterna som är designade för att plocka upp mobil fauna som exempelvis fiskar. Den arten hittades inte i eDNA-proverna som är baserade på COI-markören. Arten kan i princip hittas med den markören men ska man leta specifikt efter invasiva fiskar så är det bättre att basera undersökningen på en fisk-specifik markör (till exempel 12S). I eRAS-undersökningen ingick också skrap på hårda ytor och det var i ett sådant skrap som räkan hittades i Nynäshamn. Vandrararmusslan återfanns på påväxtpaneler i Bullandö som hängt ute under hela säsongen.

Länsstyrelsen Stockholm hade artificiella habitat, liknande dem som används inom eRAS, ute i Södertälje hamnområde (Wasa Yachts) mellan 3 juli och 15 augusti 2023. Dessa kunde visa på förekomst av svartmunnad smörbult samt vitfingrad brackvattenskrabba (en liten individ). Tidigare undersökningar har också visat att vitfingrad brackvattenskrabba inte fångas upp med eDNA i fältsituation (Panova et al. 2022).

Slutsatser och rekommendationer

Det övervakningsprogram baserat på eRAS som har genomförts i svenska hamnar 2019–2023 har identifierat ett 15-tal främmande arter i ett 25-tal hamnar och marinor från Strömstad till Piteå. Det är tydligt från flera studier (till exempel Sundberg et al. 2022; Husa et al. 2024) och den här, att DNA-baserade metoder hittar fler främmande och invasiva arter och från och med 2024 kommer det nationella övervakningsprogrammet för främmande arter i hamnar/farleder baseras på DNA-identifiering (Hasslow, A. /HaV pers. comm.). Den exakta utformningen av övervakningen är under diskussion men det kommer att bli en kombination av vattenprover (eDNA) och bulk-prover (plankton och påväxtpaneler).

Den här studien visar att vi hittar många arter med DNA som förmodligen hade förblivit oupptäckta med eRAS-metoden. Samtidigt ser vi att några arter har missats. Elegant tångräka och vandrarmussla hittades på paneler och i skrap-tekniker som därför kan användas som komplement till eDNA och planktonproverna. Förmodligen hade också fler arter hittats på paneler och i skrap om de identifierats med DNA-metoder, nu gjordes det utifrån visuella observationer och morfologisk habitus.

Förekomsten av svartmunnad smörbult upptäcktes inte med DNA, en orsak kan vara att den använda markören (COI) inte är den optimala för fisk utan där skulle i så fall 12S ha använts. Men, det är få invasiva/främmande fiskarter så är man specifikt ute efter svartmunnad smörbult vore det bättre att använda kvantitativ PCR med specifik assay för just den målarten. När det kommer till mer synliga arter som smörbult går det ju också att till stor del förlita sig på medborgarforskning och rapportering till den web-baserade appen "Rappen".

Den övergripande slutsatsen är att framtida övervakning av främmande arter bör i huvudsak baseras på DNA-identifiering av arter. Omfattningen av provtagningen får styras av budget och praktiska möjligheter. Det kan också finnas en vinst i att kombinera dessa metoder med traditionella metoder baserade på visuella observationer, men det får i slutändan bli en fråga om budget och utfall. Om en art har upptäckts i ett område kan det finnas anledning att följa dess utbredning i närheten med mer artspezifisk mål-artsanalys.

Referenser

Bergkvist J., Magnusson M., Obst M., Sundberg P., Andersson G. (2020a) Provtagningsdesign för övervakning av främmande arter. Övervakning i marin miljö. Havs- och Vattenmyndighetens rapport 2020:22. ISBN 978-91-88727-86-2.

Bergkvist J., Fransson K., Norlinder E. (2020b). Övervakning av främmande arter i hamnar med förenklad provtagning enligt eRAS-metoden – Fältrapport 2019. Havs- och vattenmyndighetens rapport 2020:2.

Buchner D., & Leese F. (2020). BOLDigger – a Python package to identify and organise sequences with the Barcode of Life Data systems. *Metabarcoding and Metagenomics* 4: E53535, 4, e53535-. <https://doi.org/10.3897/MBMG.4.53535>.

Callahan B.J., McMurdie P.J., Rosen M.J., Han A.W., Johnson A.J.A., Holmes S.P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13:581–583.

Geller J., Meyer C., Parker M., Hawk H. (2013). Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. *Molecular Ecology Resources* 13: 851–61.

Husa V. et al. (2024). Monitoring marine alien species in Norway. A pilot study for implementing a national program. *Rapport fra havforskningen* 2024-1. 72 pp.

Leray M., Yang J.Y., Meyer C.P., Mills S.C., Agudelo N., Ranwez V. et al. (2013). A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in Zoology*, 10:1–14.

Obst M., Källström B., Panova M., Breidenbach M., Sundberg P. (2023) Övervakning av främmande arter: jämförelse eRAS och DNA-baserad inventering Wallhamn (Tjörn). SeAnalytics rapport 2023:2.

Panova M., Breidenbach M., Sundberg P., Barthel Svedén J. & Reid N. (2022). Inventering av vitfingrad brackvattenskrabba (*Rhithropanopeus harrisi*) med eDNA-metodik – en pilotstudie. SeAnalytics, rapport 2022:10.

Sundberg P., Obst M., Bourlat S.J., Bergkvist J., Magnusson M. (2018) Utvärdering av ny övervakning av främmande arter. Metodjämförelse

mellan traditionell och DNA-baserad identifiering. Havs- och vattenmyndighetens rapport 2018:24.

Sundberg, P., Axberg, A., Daraghme, N., Panova, M., Obst, M. (2022) Genetic methods in environmental monitoring. Early detection and monitoring of non-indigenous species based on DNA. Havs- och Vattenmyndighetens rapport 2022:4.

Strand M., Aronsson M., Svensson M. (2018). Klassificering av främmande arters effekter på biologisk mångfald i Sverige - Artdatabankens risklista. Artdatabanken Rapport 21. Artdatabanken, SLU, Uppsala.

Bilaga 1 – Bioinformatisk analys

Huvuddelen av den bioinformatiska analysen utfördes i R-miljön (R Core Team, 2023). Primersekvenser togs bort från råsekvensläsningar med cutadapt (Martin, 2011). Därefter användes DADA2 (Callahan et al., 2016) för att rekonstruera amplikonsekvensvarianter (ASV). Läsningar filtrerades baserat på sekvenseringskvalitet, en felmodell genererades och troliga sekvenseringsfel korrigerades med DADA2:s kärnalgorithm. Pseudopooling användes för att möjliggöra både högre känslighet för ASV rekonstruktion och rimlig beräkningstid. Framåt- och bakåt-avläsningar av varje DNA-fragment slogs samman och en ytterligare längdfiltrering tillämpades för att bara behålla läsningar som visar den förväntade amplikonlängden. Slutligen togs chimära sekvenser (dvs. två olika DNA fragment som är ihopsatta) och singletoner (dvs. ASV:er som förekom bara en gång) bort. För att ytterligare kureras datamängden togs misstänkta nukleära mitokondriella pseudogener (NUMTs) bort. COI ASV:erna filtrerades med hjälp av MACSE (Ranwez et al., 2018) i R för att identifiera och ta bort COI-sekvenser som innehöll stoppkodon i läsramen, ramförskjutningar eller insättningar, eller mer än tre deletioner i läsramen på aminosyrnivån. Innan ASV:er klustrades i molekylära operationella taxonomiska enheter (MOTUs), tillämpades en negativ kontrollkorrigering för att ta bort alla MOTUs för vilka avläsningsantalet inom DNA extraktion- eller PCR- negativa kontroller stod för mer än 10 % av deras totala avläsningsantal. Klustring av ASV till MOTUs utfördes med hjälp av Swarm v2 (Mahé et al., 2015), med $d = 13$. Resulterande COI MOTUs kurerades ytterligare med LULU (Frøslev et al., 2017) för att ta bort troligen felaktiga MOTUs. Taxonomi tilldelades COI MOTUs med hjälp av två referensdatabaser och två klassificeringsverktyg. Referensbibliotek som användes är Barcode of Life Data System (BOLD; Ratnasingham & Hebert, 2007) med BOLDigger-cline v2.2.1 (Buchner & Leese, 2020) med standardgränsvärden för likheter för varje taxonomisk nivå. Alla sekvenser med likhet med referenssekvenser under 85 % bedömdes som oklassificerade. Dessutom analyserades taxonomi med MIDORI2 referensbibliotek (Leray et al., 2022) och RDP-klassificeraren (Wang et al., 2007) med en konfidensgräns på 0,7; alla sekvenser under denna tröskel betraktades som oklassificerade. Vi jämförde sedan klassificering baserad på MIDORI2 och BOLD för att få fram en slutlig artslista. För MOTUs där båda klassificeringar överensstämde på respektive nivå behölls denna information. Om BOLDigger och MIDORI2 inte var överens för en given taxonomisk nivå av en MOTU, behölls BOLDiggers korrigerade toppträff. Där BOLDigger inte hade någon träff på en given nivå, men MIDORI2 hade, behölls den senare. Till

sist slogs MOTUs och deras läsmängder samman om de visade samma artnivåklassificering.

Referenser

Buchner, D., & Leese, F. (2020). BOLDigger – a Python package to identify and organise sequences with the Barcode of Life Data systems. *Metabarcoding and Metagenomics* 4: E53535, 4, e53535-.

<https://doi.org/10.3897/MBMG.4.53535>.

Callahan, B. J., McMurdie, P. J., Rosen, M. J., Han, A. W., Johnson, A. J. A., & Holmes, S. P. (2016). DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 2016 13:7, 13(7), 581–583.

<https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.

Frøsløv, T. G., Kjølner, R., Bruun, H. H., Ejrnæs, R., Brunbjerg, A. K., Pietroni, C., & Hansen, A. J. (2017). Algorithm for post-clustering curation of DNA amplicon data yields reliable biodiversity estimates. *Nature Communications* 2017 8:1, 8(1), 1–11.

<https://doi.org/10.1038/s41467-017-01312-x>.

Leray, M., Knowlton, N., & Machida, R. J. (2022). MIDORI2: A collection of quality controlled, preformatted, and regularly updated reference databases for taxonomic assignment of eukaryotic mitochondrial sequences. *Environmental DNA*, 4(4), 894–907.

<https://doi.org/10.1002/EDN3.303>.

Mahé, F., Rognes, T., Quince, C., de Vargas, C., & Dunthorn, M. (2015). Swarmv2: Highly-scalable and high-resolution amplicon clustering. *PeerJ*, 2015(12), e1420.

<https://doi.org/10.7717/PEERJ.1420/SUPP-1>.

Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.Journal*, 17(1), 10–12.

<https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>.

R Core Team. (2023). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>.

Ranwez, V., Douzery, E. J. P., Cambon, C., Chantret, N., & Delsuc, F. (2018). MACSE v2: Toolkit for the Alignment of Coding Sequences Accounting for Frameshifts and Stop Codons. *Molecular Biology and Evolution*, 35(10), 2582–2584.

<https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSY159>.

Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2007). bold: The Barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Molecular Ecology Notes*, 7(3), 355–364.

<https://doi.org/10.1111/J.1471-8286.2007.01678.X>.

Wang, Q., Garrity, G. M., Tiedje, J. M., & Cole, J. R. (2007). Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(16), 5261–5267.
https://doi.org/10.1128/AEM.00062-07/SUPPL_FILE/SUMMARY_BYHIERARCHY.ZIP.



Länsstyrelsen
Stockholm

www.lansstyrelsen.se/stockholm