

Inventering av fiskförekomst med eDNA i sjön Långhalsen, Södermanlands län

AquaBiota Rapport 2019:20

Författare: Patrick Hernvall, Micaela Hellström & Johan Näslund



STOCKHOLM, NOVEMBER 2019

Beställare:

Undersökningen är utförd av AquaBiota Water Research för Torps Fiske Samfällighetsförening

Författare:

Patrick Hernvall (Patrick.hernvall@aquabiota.se), Micaela Hellström (micaela.hellstrom@aquabiota.se) & Johan Näslund(johan.naslund@aquabiota.se)

Figurer:

Omslagsbild: lokal 02 (Micaela Hellström)

Kontaktinformation:

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

Kvalitetsgranskad av:

Martin Isaeus (martin.isaeus@aquabiota.se)

Citera som:

Hernvall P, Hellström, M & Näslund J. Inventering av fiskförekomst med eDNA i sjön Långhalsen, Södermanlands län. AquaBiota Rapport 2019:20. ISBN: 978-91-89085-07-7

Ämnesord:

eDNA, Fiskfauna, Långhalsen, Nätfiske, Södermanland, Sörmland

AquaBiota Rapport 2019:20

ISBN: 978-91-89085-07-7

ISSN: 1654-7225

© AquaBiota Water Research 2019



INNEHÅLL

Innehåll.....	3
Sammanfattning.....	4
1. Inledning	7
2. Material och Metoder	7
2.1 Fältarbete.....	7
2.2 Laboratoriearbete.....	9
3. Resultat	10
3.1. Sekvenseringsresultat	10
3.2. Arternas förekomst	10
TACK	13
Referenser	14
Bilaga 1. Enarts- och flerartsanalyser vid eDNA undersökningar.....	15
Bilaga 2. Kvalitetssäkring av eDNA	16
Bilaga 3: Kvalitetskontroller som redovisas vid flerartsanalyser	17
Bilaga 4: Resultat av kvalitetskontroller.....	18

SAMMANFATTNING

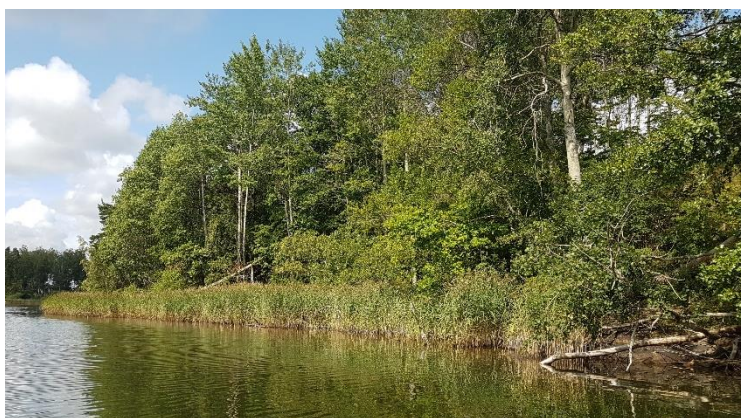
Akvatiskt miljö-DNA eller eDNA (från engelskans environmental DNA) har under det senaste decenniet visat sig vara ett lovande verktyg för inventering av vattenorganismer för miljöövervakning. Undersökningsmetoden baserar sig på det faktum att alla levande organismer, både växter och djur, kontinuerligt 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 (100 mL – 3 L) och genom molekylära analyser ange vilka arter som befinner sig inom ett område utan att man vare sig ser eller fångar organismen. Eftersom eDNA i vattenmassan är kortlivat ger analyserna en bild av artförekomst i nutid.

I augusti 2019 utförde AquaBiota på uppdrag av Torps Fiske Samfällighetsförening en eDNA-inventering av fiskarternas förekomst i sjön Långhalsen i Sörmlands län. Nio vattenprover från olika lokaler samlades in för undersökningen och analyserades.

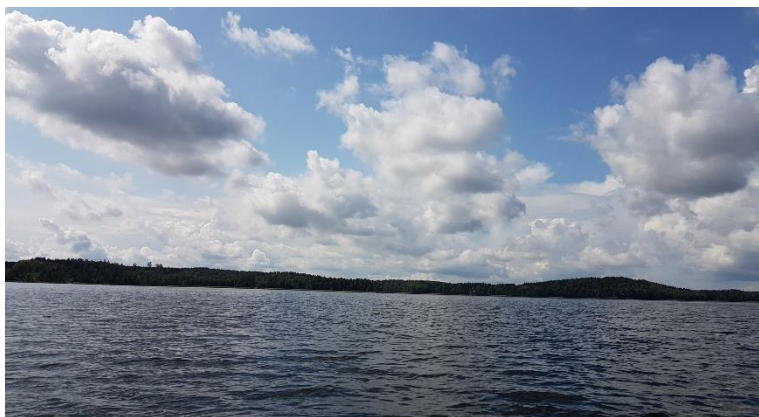
I sjön påträffades 18 olika fiskidentiteter av vilka 16 kunde bestämmas till artnivå. Arter som är svårfångade i provfisken påträffades i sjön.



Lokal LH_01. Östra Torpfjärden i nära anslutning till Husbyån.



Lokal LH_02. Sättraviken, NV Torpfjärden.



Lokal LH_03. Mellersta Torpfjärden.



Lokal LH_04. SV Torpfjärden.



Lokal LH_05. Sund mellan Snickartorp och Sättra ö.



Lokal LH_06. Målsundet.



Lokal LH_07. Malmviken.



Lokal LH_08. Flåstaön.



Lokal LH_09. Nyköpingsån, Täckhammar.

1. INLEDNING

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 varken ser eller fångar organismen. Eftersom eDNA i vattenmassan är kortlivat (ca. 1-2 veckor) ger analyserna en bild av artförekomst i nutid. 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 provfiskeri gör (Hänfling m.fl. 2016, Hellström & Spens 2017 a, b, c, Hellström m.fl. 2018).

I augusti 2019 utförde AquaBiota på uppdrag av Torps Fiske Samfällighetsförening en eDNA-inventering av fiskars förekomst i sjön Långhalsen, Södermanlands län. Undersökningens syfte var att få en bild av fiskförekomsten i sjön.

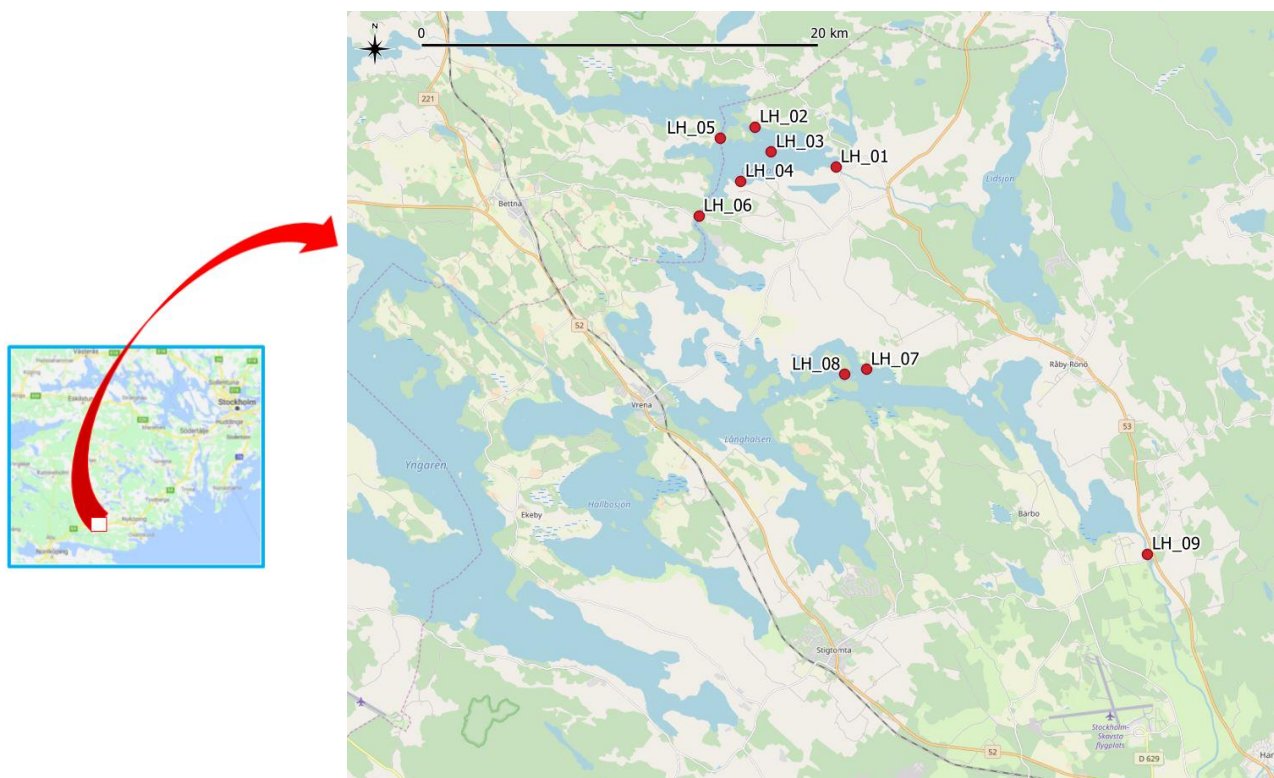
2. MATERIAL OCH METODER

2.1 Fältarbete

Fältarbetet utfördes i augusti 2019. Provtagningspunkter anges i tabell 1. Lufttemperaturen mätte 20 °C. Provpunkternas position bestämdes i samråd med uppdragsgivaren och proverna fördelades mellan vattenägarna. Provtagningsdjupet varierade mellan 0,5 och 10 meter.

Innan provtagningen genomfördes i fält, steriliserades all provtagningsutrustning. Filtreringsutrustning köptes in som sterila DNA-fria engångsförpackningar. Vatten samlades in på varje punkt i form av ca 5 underprover vid varje provpunkt. Vattnet

blandades och filtrerades med slutna filter för att minska risken för kontamination. För två lokaler LH_03 och LH_04 användes en Ruttnerhämtare för att provta den djupare delen av vattenmassan. Vattenprovtagaren rengjordes mellan lokalerna genom behandling med DNA-nedbrytande vätska och efterföljande sköljning med rent vatten. Negativa fältkontroller utgjordes av rent vatten som filtrerades på plats för att identifiera eventuell kontaminering av DNA mellan prover eller från provtagare. Insamling och fixering följde Spens m.fl. (2017).



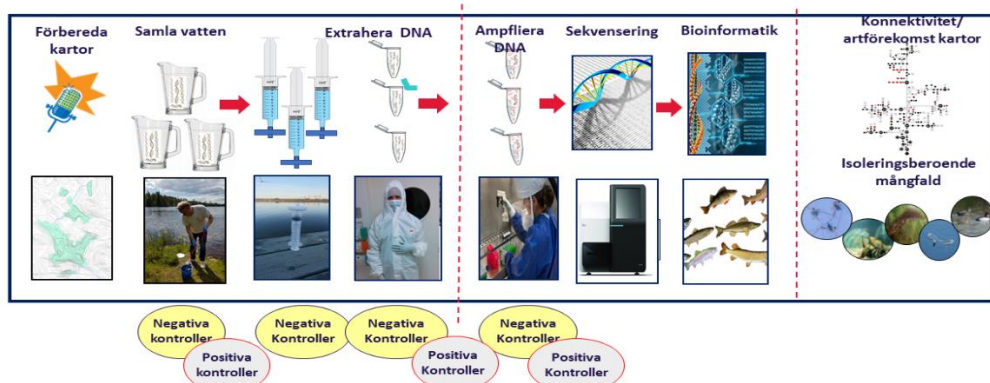
Figur 1. Karta över provtagningslokalerna.

Tabell 1. Provpunkter. Position (decimalgrader, WGS84), djup av provtagna vattnet, vattentemperatur och volym filtrerat vatten (mL). Proven samlades in 8 augusti 2019.

Provpunkt namn	Latitud	Longitud	Djup	H ₂ O °C	Volym (mL)
LH_01	58,915823	16,786216	0.50	21	4000
LH_02	58,925180	16,749603	0,50	22	4400
LH_03	58,919317	16,756938	10.00	15.8	4200
LH_04	58,912446	16,743048	7.50	19	4000
LH_05	58,922526	16,733693	0,5	21.1	5000
LH_06	58,904382	16,724217	0.50	19.5	5000
LH_07	58,868457	16,799922	1.00	22	2400
LH_08	58,867278	16,790329	1.00	22.4	2500
LH_09	58,825223	16,927203	0.50	21.5	3000

2.2 Laboratoriearbete

2.2.1 Extraktion, PCR och sekvensering



Figur 2. Flödesschema som visar de olika stegen för eDNA undersökningar.

Flödesschemat i figur 2 beskriver eDNA-processen från insamling till analys. eDNA utvanns (extraherades) enligt protokoll från Spens m.fl. (2017) i ultrarena laboratorier speciellt byggda för analyser av akvatiskt eDNA. Proverna analyserades med flerartsanalyser för förekomst av fisk (bilaga 1). Varje PCR prov utfördes i 12 replikat som sammanslogs under bioinformatiken. En modifierad markör som amplifierar 12S rDNA regionen användes (Miya m.fl 2015). Modifieringarna innebär att betydligt fler arter kan detekteras (exempelvis mal, *Silurus glanis*, samt nejonöga, *Lampetra* sp.). Principerna för metabarkodning förklaras mer utförligt i bilaga 1. Vidare användes en positiv DNA kontroll med känd artsammansättning som standard för jämförelse. Negativa laboratoriekontroller analyserades för att säkerhetsställa kvalitetskrav (Bilaga 2). Normer för kvalitetskontroller finns i bilaga 3.

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 med 0,8 miljarder sekvenser och 3,6 biljoner baspar enligt NCBI:s hemsida (GenBank, december 2018). De olika sekvenserna matchades mot databasen och fick på så sätt fiskars identitet. Tack vare nya framsteg inom metabarkodning för fisk är det möjligt att få träffar på artnivå istället för enbart familje- eller genusnivå. Eftersom referensdatabaserna för fiskar i Sverige inte är fullständiga användes även interna referenser från NatureMetrics, vilka läggs ut kontinuerligt på NCBI. Antalet läsningar per art gav en relativ uppskattning av hur mycket eller litet arten förekom i ett prov.

3. RESULTAT

3.1. Sekvenseringsresultat

I denna studie matchade 95,3 % av sekvenserna fiskar med hjälp av fiskmarkören vilket är en indikation på data av mycket hög kvalitet. Resultaten av kvalitetskontroller anges i bilaga 4.

3.2. Arternas förekomst

Antalet fiskidentiteter (olika fiskar) per lokal var 18 av vilka 16 identifierades på artnivå, en identitet var stäm eller id och en identifierades som vimma (*Vimba vimba*) och/eller björkna (*Blicca bjoerkna*).

Antalet arter per lokal varierade mellan 8–15 varav flest återfanns i prov LH_01 vid Östra Torpfjärden i nära anslutning till Husbyån. Medelantalet fiskarter per lokal var 12±1 arter (95% konfidensintervall). Den vanligaste arten var abborre som identifierades i samtliga prover med procentuellt höga antal läsningar (vilket är proportionellt till biomassa). Även braxen var vanlig, särskilt i en av de djupa stationerna (LH_03) mitt på Torpfjärden. På denna station identifierades också den enda förekomsten av siklöja, vilken är en kallvattenart. Andra arter som förekom i mindre utsträckning var ål, småspigg, nors och lake.

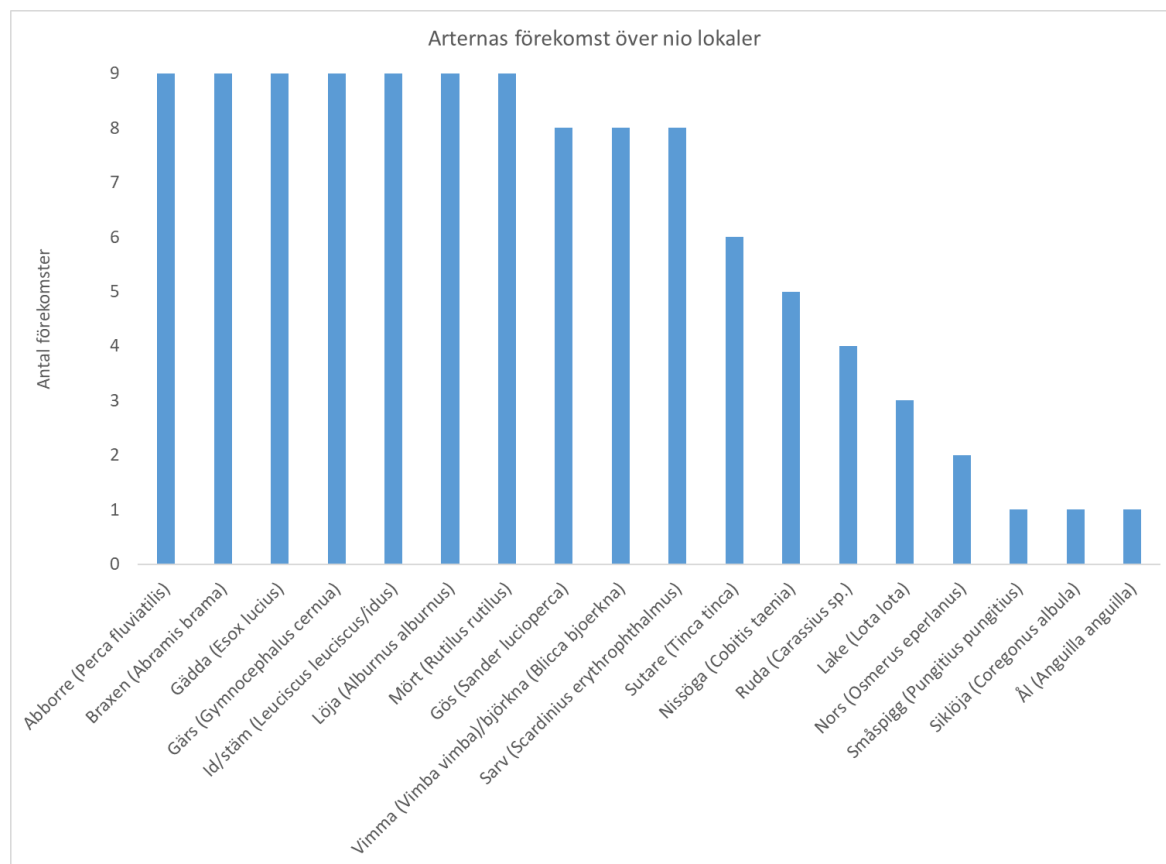
Fiskarternas förekomst och dominansförhållanden i Långhalsen anges i tabell 2 och 3 samt i figur 4.

Tabell 2. Fiskarternas förekomst på de olika lokalerna.

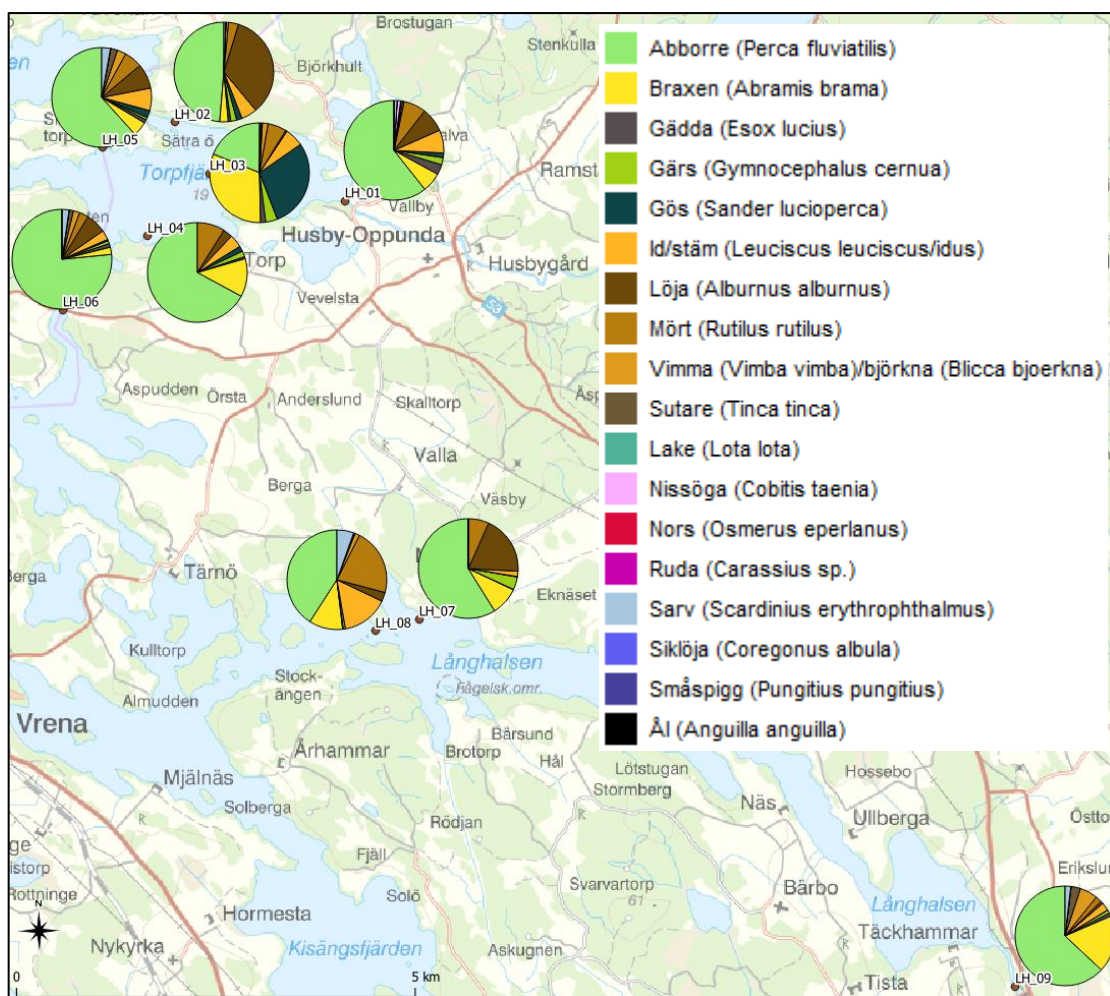
	LH_01	LH_02	LH_03	LH_04	LH_05	LH_06	LH_07	LH_08	LH_09	Antal/ Summa
Abborre (<i>Perca fluviatilis</i>)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	9
Braxen (<i>Abramis brama</i>)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	9
Gädda (<i>Esox lucius</i>)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	9
Gärs (<i>Gymnocephalus cernua</i>)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	9
Gös (<i>Sander lucioperca</i>)	X	X	X	X	X	X	X		X	8
Id/stäm (<i>Leuciscus leuciscus/idus</i>)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	9
Vimma (<i>Vimba vimba</i>)/Björkna (<i>Blicca bjoerkna</i>)	X	X	X		X	X	X	X	X	8
Lake (<i>Lota lota</i>)	X	X							X	3
Löja (<i>Alburnus alburnus</i>)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	9
Mört (<i>Rutilus rutilus</i>)	X	X	X	X	X	X	X	X	X	9
Nissöga (<i>Cobitis taenia</i>)	X	X			X	X			X	5
Nors (<i>Osmerus eperlanus</i>)	X		X							2
Ruda (<i>Carassius carassius</i>)					X	X		X	X	4
Sarv (<i>Scardinius erythrophthalmus</i>)	X	X	X		X	X	X	X	X	8
Siklöja (<i>Coregonus albula</i>)			X							1
Småspigg (<i>Pungitius pungitius</i>)	X									1
Sutare (<i>Tinca tinca</i>)	X	X			X	X		X	X	6
Ål (<i>Anguilla anguilla</i>)						X				1
Antal arter	15	13	12	8	13	14	10	11	14	18

Tabell 3. Antalet eDNA läsningar per art inom de olika provlokalerna. Siffrorna anger hur många gånger en sekvens blivit läst på artnivå och anger relativ biomassa. * id och stäm skiljs inte med markören. ** referens saknas för sekvensen och närmaste match är vimma (Vimba vimba) samt björkna (Blicca bjoerkna)

	LH_01	LH_02	LH_03	LH_04	LH_05	LH_06	LH_07	LH_08	LH_09	Antal/ Summa
Abborre (<i>Perca fluviatilis</i>)	60,7%	48,7%	18,9%	67,1%	61,7%	76,6%	58,9%	40,9%	63,0%	9
Braxen (<i>Abramis brama</i>)	6,4%	2,8%	31,4%	12,4%	4,8%	2,3%	9,1%	10,9%	18,5%	9
Gädda (<i>Esox lucius</i>)	3,3%	0,8%	1,7%	0,7%	1,1%	1,2%	0,1%	0,2%	1,1%	9
Gärs (<i>Gymnocephalus cernua</i>)	2,3%	2,0%	3,8%	1,9%	0,8%	1,0%	4,1%	0,7%	1,1%	9
Gös (<i>Sander lucioperca</i>)	1,5%	1,8%	28,8%	1,8%	2,3%	0,4%	0,1%		0,1%	8
Id/stäm (<i>Leuciscus leuciscus/idus</i>)*	7,4%	5,1%	6,1%	4,2%	7,3%	3,1%	1,7%	15,2%	2,6%	9
Vimma (<i>Vimba vimba</i>)/Björkna (<i>Blicca bjoerkna</i>)	0,5%	0,8%	1,8%		2,9%	2,1%	0,1%	1,5%	5,8%	8
Lake (<i>Lota lota</i>)	0,0%	0,0%							0,0%	3
Löja (<i>Alburnus alburnus</i>)	7,9%	34,2%	0,5%	3,1%	8,1%	6,6%	19,2%	2,9%	0,8%	9
Mört (<i>Rutilus rutilus</i>)	7,2%	3,3%	6,1%	8,9%	5,9%	2,9%	6,6%	21,7%	2,1%	9
Nissöga (<i>Cobitis taenia</i>)	1,1%	0,0%			0,0%	0,0%			0,0%	5
Nors (<i>Osmerus eperlanus</i>)	0,0%		0,4%							2
Ruda (<i>Carassius carassius</i>)					0,1%	0,0%		0,3%	0,0%	4
Sarv (<i>Scardinius erythrophthalmus</i>)	1,0%	0,6%	0,1%		2,8%	2,3%	0,0%	5,5%	1,8%	8
Siklöja (<i>Coregonus albula</i>)			0,4%							1
Småspigg (<i>Pungitius pungitius</i>)	0,0%									1
Sutare (<i>Tinca tinca</i>)	0,6%	0,1%			2,2%	1,3%		0,2%	3,1%	6
Ål (<i>Anguilla anguilla</i>)						0,0%				1
Antal läsningar	90867	95435	130426	120912	92527	128695	122402	113920	99978	995162
Antal arter	15	13	12	8	13	14	10	11	14	18



Figur 3. Arternas förekomst över de nio lokalerna.



Figur 4 Pajdiagram. Arternas procentuella eDNA förekomst inom proverna.

Resultat från eDNA-studier har flera praktiska användningsområden så som detektion av sällsynta arter, jämförelse av flora och fauna före och efter åtgärdsprogram, samt intresse för sportfiskare som har nytta av att veta vilka arter som befinner sig i sjön. Metodiken kan även användas för provtagning av arter, miljöer och vatten som inte är möjliga eller svåra att provta med traditionella metoder. Exempelvis är ofta gädda och braxen kraftigt underrepresenterade i nätprovfiske. Mal detekterades inte i proverna trots att denna misstänks förekomma i form av enstaka individer i området. Eftersom den använda metodiken är mycket känslig och lokalt kan detektera ned till enskilda individer av fiskar som förekommer eller uppehållit sig på en provtagen plats inom de senaste dagarna är det relativt osannolikt att mal funnits kring de provtagna platserna upp till några dagar före provtagningen. Mal är en art som kan förflytta sig flera kilometer i jakt på föda eller lämpliga vistelsemiljöer.

Sekvensen för björkna och vimma är identisk, baserat på diskussioner med ägarna runt sjön som fiskar ofta är det troligtvis björkna som finns i proverna.

Två negativa kontroller användes, varav den ena uppvisade kontamination av abborre. Källan till kontamineringen har identifierats (användning av ett felaktigt rengjort

samlingskärl för den negativa kontrollen) och slutsatsen är att kontamineringen inte har påverkat resultaten av proverna från de provtagna lokalerna eftersom den negativa kontrollen utan kontamination rengjordes på samma sätt som de tagna proverna.

En av de stora fördelarna med eDNA är att fältansträngningen och de totala kostnaderna är mindre än vid provfisken när det gäller att inventera arters förekomst. Större geografiska områden kan undersökas och prover kan tas under hela året. eDNA är definitivt mer lämpligt för att utröna vilka arter som finns i ett vatten och kan även ge utslag för sällsynta arter.

Fiskarnas förekomst i förhållande till fysiska och kemiska faktorer kan vara av stort intresse och vidare undersökningar där eDNA jämförs med befintligt miljödata insamlat av Nynäsåarnas Vattenvårdsförbund skulle vara intressant.

TACK

Tack till Torps Fiske samfällighetsförening, särskilt Gunnar Ewetz och Daniel Hellsten för starkt engagemang, för uppehålle och för att ni var med oss ute i fält hela dagen. Tack till alla er som bor runt Långhalsen för vänligt bemötande, tillstånd att gå över era marker och många fiskediskussioner. Ett stort tack till Jerry Persson och Anneli Carlén vid Nyköpingsåarnas Vattenvårdsförbund för diskussioner innan provtagningen, engagemang och samordnandet av föredragskväll i Nyköping om eDNA i Bålsjön och Långhalsen. Tack till Hannah Phillips för fältarbete och filtrering. Tack till MoRe Research och NatureMetrics för samarbete och eDNA extraktioner respektive HTS analyser.

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.
- 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.
- 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 & Spens J. 2017 c. eDNA - Fiskinventering vid Spjutmo kraftverk. AquaBiota Rapport 2017:12. 29 sid. ISBN: 978-91-85975-69-3
- Hellström, M., Wijkmark N & Spens, J. 2018. Fisk inventering med hjälp eDNA i Ore Älv, Dalarnas län. AquaBiota Rapport 2018:11. 23 sid. ISBN: 978-91-85975-80-8
- Hänfling, B., L. Lawson Handley, D. S. Read, C. Hahn, J. Li, P. Nichols, R. C. Blackman, A. Oliver, och I. J. Winfield. 2016. Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Molecular Ecology*
- 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.
- 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.
- 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
- 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

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 miljödDNA eller eDNA (från engelskans environmental DNA).

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 som man kan kopiera industriellt. Dessa små bitar kallas primers. Eftersom primern är artspecifik fastnar den enbart på DNA för den valda arten. Resultatet, dvs en liten bit av DNA som primern kopierar kallas barcode (streckkod), och kan liknas vid den streckkod som används för att betala för just den enskilda varan i affärer. Dessa primers, en droppe eDNA, ett enzym och salter blandas i ett provrör. Provröret placeras i en maskin som gör DNA kopior för just den arten. Detta kallas för PCR (Polymerase Chain Reaction) och bygger på hur levande celler kopierar sin arvs massa vid celledelning.

Enartsstudier qPCR eller ddPCR levereras ej i detta projekt

Inventering av förekomst av en enstaka 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. Provs varen anger närvaro/frånvaro av just den arten och en relativ eDNA-abundans mellan olika provtagningslokaler. Minst 12 qPCR replikat skall analyseras för att ge tillförlitliga resultat.

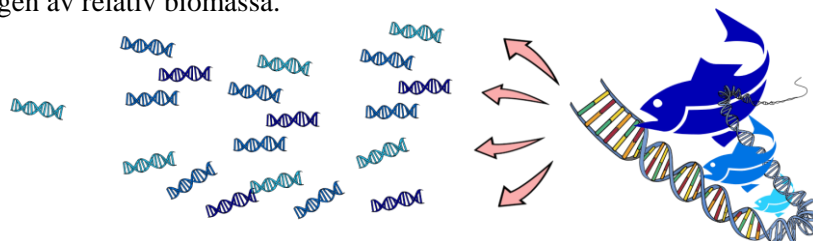
Om flera arter undersöks med enartsanalyser kan data över relativa abundanser mellan art A och art B inte jämföras med varandra eftersom markörerna för varje art skiljer sig markant från varandra. Som exempel kan nämnas att 1000 DNA kopior av gädda inte motsvarar 1000 kopior av abborre och analyserna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

Flerartsstudier –Metastreckkodning genom NGS (Next Generation Sequencing)

Frågeställningen för flerartsstudier är; **Vilka arter finns här och vilka av dessa är vanliga eller sällsynta?** Med andra ord behöver man inte på förhand veta vad man letar efter.

Metastreckkodning eller metabarcoding innebär att man designar en primer som är gemensam för alla arter inom en grupp – indelade exempelvis med fokus på fisk, fokus på groddjur eller fokus på musslor. Eftersom man analyserar flera olika arter på en gång kallas metoden metastreckkodning. Anledningen till att man inte kan analysera alla djurgrupper samtidigt med en primer är det inte finns lämpliga målregioner i genomen som både är gemensamma för alla arter men samtidigt varierar så pass mycket att enskilda arter kan identifieras.

Invasiva eller skygga arter kan identifieras och antalet arter som kommer upp i en analys är obegränsat. Om man inventerar 3 eller fler arter är denna metod att föredra, och blir snabbt mer kostnadseffektiv än enartsanalyser. Flerartsanalyser visar även vilka arter man har fått och vilket dominansförhållande dessa har till varandra i ett vattendrag. Med andra ord kan den relativa biomassan räknas ut. Notera dock att under parningstiden förekommer DNA av de arter som förökar sig i större mängder då köns celler släpps ut i vattnet, vilket kan interferera med 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 ifall källan inte kan identifieras och konsekvenserna fastställas.

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. Minst 12 PCR replikat per art/artgrupp och eDNA prov utförs. Maximalt 4 av dessa sammanslås i sekvenseringen. *Färre replikat minskar analyssäkerheten avsevärt.*
10. Antal prover för en specifik MiSeq-körning (sekvensering) överstiger inte 100 stycken exklusive sekvenseringskontroller. *Detta säkerställer att antalet läsningar per prov inte ska bli alltför lågt för att kunna detektera ovanligare arter.*



Referenser:

- Goldberg, Caren S., m.fl. 2016. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*, 7.11: 1299-1307.
- Griffiths Anthony et al. 2016. *An Introduction to Genetic Analysis*. 11th edition. WH Freeman. New York. ISBN-13: 978-1464109485.
- Hedman, Johannes m.fl. 2017. Pre-PCR processing-projektet, P4 Stärkt beredskapskapacitet via rationell laboratoriediagnostik samt förenklad provberedning. -*Nationellt Forensiskt Centrum, NFC 2017-05-07. NFC Rapport Avdelningskansliet 2017:04*
- SFMG, Svensk Förening för Medicinsk Genetik. 2011. Riktlinjer för kvalitetssäkring i klinisk genetik verksamhet. http://sfmg.se/download/riktlinjer/Kvalitetsriktlinjer/sfmg_riktlinjer-for-kvalitetssakring_rev101228.pdf

Bilaga 4: Resultat av kvalitetskontroller

Bakgrunden till kvalitetskontrollerna anges i Bilaga 3. Värden för kontrollerna anges i tabell B4_1. DNA var rent och visade hög kvalitet. Alla negativa kontroller var negativa för målarter. De positiva kontrollerna var positiva. Kontaminant DNA tillhörande ko, gris och människa som är vanliga i reagenser och vattnet runtomkring oss togs automatiskt bort från analysen.

MiSeq parvis sekvensering för Miya markören (230) baspar gav 411 000 sekvenser av vilka 357 023 godkändes genom alla kvalitetsfilter fram till godkända fiskidentiteter. Detta är en indikation på hög kvalitet på eDNA och slutgiltigt data. Sekvenseringsdata analyserades genom en pipeline som är specialdesignad av NatureMetrics Ltd. Datat testades mot både NCBI och NatureMetrics kurerade referensdatabaser.

Tabell B4-1. Kvalitetsgranskning av eDNA och kontroller. eDNA koncentrationen uppmättes med Qubit Fluorometric Quantitation (Fisher Scientific). Inhiberingskontroll utfördes med qPCR. Band på gel av målarter efter PCR visar att provanalyserna har fungerat. PCR negativ innefattar 12 replikat. Filtrerad volym vatten (H₂O V) anges i liter, eDNA koncentration ng/μl, inhibering samt anti-inhibering gel Miya anger om målarterna visade band på gel för närvaro före sekvenseringen. Kont% anger % av sekvenser från hund och människa som togs bort som naturlig kontaminering.

Provlokal	H ₂ O V (L)	eDNA (ng/μL)	Inhibering	Anti-inhibition	# PCR Miya	Gel Miya	kont% Miya
1. LH_01	4,0	<20	Ja	Ja	12	12/12	4.0%
2. LH_02	4,4	11	Ja	Ja	12	12/12	0.6%
3. LH_03	4,2	10.6	Ja	Ja	12	12/12	3.5%
4. LH_04	4,0	6.06	Ja	Ja	12	12/12	0.0%
5. LH_05	5,0	<20	Ja	Ja	12	12/12	0.9%
6. LH_06	5,0	11.8	Ja	Ja	12	12/12	0.5%
7. LH_07	2,4	<20	Ja	Ja	12	12/12	0.0%
8. LH_08	2,5	<20	Ja	Ja	12	12/12	3.1%
9. LH_09	3,0	<20	Ja	Ja	12	12/12	0.4%
Lab neg	1,0	<0,01	Nej	Ja	12	0/12	0%
Fält neg 1	1,0	0.112	Nej	Ja	12	8/12	66,0%
Fält neg 2	1,0	0,08	Nej	Ja	12	0/12	100%

www.aquabiota.se