

eDNA-inventering av fiskfaunan i Gullspångsälven med fokus på Gullspångslax

Patrick Hernvall, Viktor Birgersson & Micaela Hellström



MIX Research
Sweden

eDNA-inventering av fiskfaunan i Gullspångsälven med fokus på Gullspångslax

Utgiven av:	MIX Research Sweden AB
Datum:	2023-01-30
Uppdragsgivare:	Fortum
Författare:	Patrick Hernvall, Viktor Birgersson & Micaela Hellström
Kartor:	Rasmus Emanuelsson
Granskare:	Författarna samt uppdragsgivarna
Omslagsbild	Provtagning på station 3 (Patrick Hernvall)
Fältarbete	Patrick Hernvall, Viktor Birgersson, Rasmus Emanuelsson
Uppdraget utfördes av:	MIX Research Sweden AB Adress: Uppsala Science Park, Dag Hammarskjölds väg 34A, 75237 Uppsala E-post: info@mixresearch.se Telefon: 070-782 03 10
Rapporten citeras som:	Hernvall, P. Birgersson, V. Hellström, M. 2022. eDNA-inventering av fiskfaunan i Gullspångsälven med fokus på Gullspångslax. MIX Research Sweden. Rapport 2023:01.



MIX Research
Sweden

SAMMANFATTNING

Miljö-DNA, eller eDNA (från engelskans environmental DNA), är samlingsnamnet på de genetiska avtryck som alla levande organismer lämnar efter sig i miljön i form av till exempel fotspår, svett, slem och fingeravtryck. Eftersom genetiska analyser utvecklats mycket under de senaste decennierna är det fullt möjligt att fånga upp dessa avtryck för att identifiera arter som finns i en given miljö. eDNA kan utvinnas från en liten mängd vatten och med hög precision ange vilka arter som är närvarande i till exempel sjöar, dammar, floder och hav. Detta verktyg är välutvecklat i vattenmiljöer och har visat sig vara användbart för miljöövervakningen. eDNA är vidare relativt kortlivat i vattenmassan och ger därför en bild av arters förekomst i nutid.

Den 24–25 oktober 2022 utförde MIX Research Sweden AB, på uppdrag av Fortum, en eDNA-undersökning med flerartsanalys av fisk med fokus på lax. Sammanlagt inventerades 13 lokaler i Gullspångsälven. Studiens syfte var att undersöka fisksamhället i stort med särskilt fokus på eventuella förekomster av Gullspångslax.

Totalt detekterades 19 unika fisksekvenser i undersökningen. Bland de mest frekvent detekterade arter fanns abborre, mört, braxen och löja. Sett till sekvensantal var öring den vanligast förekommande arten och stod för 21,9 % av det totala sekvensantalet. Lax detekterades på 11 av 13 lokaler.

Resultaten i denna rapport visar att Gullspångsälven är ett artrikt system som fortsatt innehar en viktig funktion som reproduktionsområde för både lax och öring. Undersökningen bekräftar vidare att eDNA är en effektiv metod för att studera artmångfald och förekomst i akvatiska system som rinnande vatten. Kombinerade inventeringsmetoder med eDNA och traditionella metoder blir ett kraftfullt verktyg för att erhålla goda underlag för åtgärder samt beslut inom förvaltning och miljöövervakning.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning.....	3
Innehållsförteckning.....	5
1 Inledning.....	6
2 Metoder.....	7
2.1 Fältarbete	7
2.2 Laboratoriearbete	9
2.3 Analyser DNA.....	9
3 Resultat.....	10
3.1 Sekvenseringsresultat.....	10
3.2 Fiskarternas förekomst på lokalerna.....	12
4. Diskussion.....	13
5. Referenser	14
Bilaga 1. Vad menas med enarts- och flerartsanalyser?	15
Bilaga 2. Laboratoriearbete.....	16
Bilaga 3. Kvalitetssäkring av DNA - kontroller	17
Bilaga 4: Kvalitetskontroller som redovisas	18
Bilaga 5: Resultat av kvalitetskontroller för flerartsanalyser	19
Bilaga 6: Rådata för detekterade arter, antal verifierade läsningar.....	20

1 INLEDNING

Miljö-DNA eller eDNA (från engelskans environmental DNA) är samlingsnamnet på de genetiska avtryck som alla levande organismer lämnar efter sig i miljön i form av bland annat fotspår, svett, slem och fingeravtryck (Pedersen m.fl. 2015). Taberlet m.fl. (2012) definierar eDNA som ”det DNA som kan studeras från efterlämnade spår i miljön utan att målorganismen är närvarande i provet”. Då genetiska analyser har utvecklats mycket under de senaste decennierna är det fullt möjligt att genom vatten- eller jordprov fånga upp dessa avtryck och med precisa metoder identifiera de arter som finns i en given miljö. eDNA kan utvinnas från en liten mängd vatten och med hög precision ange vilka arter som är närvarande. Detta verktyg är välutvecklat i vattenmiljöer och har visat sig vara användbart inom miljöövervakningen (Harper m.fl. 2018, Lawson-Handley 2015, Leese m.fl. 2016, Olds m.fl. 2016, Deiner m.fl. 2017, Bruce m. fl. 2021). eDNA är vidare relativt kortlivat i vattenmassan (maximalt cirka två veckor beroende på yttre faktorer) och ger därför en bild av arters förekomst i nutid (Brys m.fl. 2021).

Artinventeringar i svenska vatten dateras tillbaka till 1500 talet, och information om arters förekomst, levnadsvillkor och biologi är grundläggande som underlag för myndigheter då beslut skall fattas om artskydd, åtgärder eller tillståndsprövningar etc. Traditionella artinventeringar kan vara både tids- och resurskrävande vilket gör storskaliga undersökningar av arters utbredning och förekomster dyra och svåra att genomföra. Destruktiva inventeringsmetoder påverkar dessutom sällsynta eller hotade arter negativt. Eftersom eDNA-metoden är en icke-dödande metod är den idealisk för kartläggning av biologisk mångfald. Informationen kan användas för att lokalisera områden som kräver traditionella metoder för vidare undersökningar av arter gällande ålder, storleksfördelning, och reproduktionsframgång. En korrekt analys och tolkning av eDNA-resultat kräver kontinuerlig uppdatering av traditionell och genetisk taxonomi, molekylära metoder och arters ekologi.

Insjölevande bestånd av lax är sällsynt och förekommer bara på några få platser inom artens utbredningsområde. I Väneren finns två sådana populationer som nyttjar Klarälven och Gullspångsälven som lekområden (Kullander m. fl. 2012). Gullspångslaxen tillhör alltså en av få naturligt reproducerande bestånd av vild sötvattenslevande lax och är därmed skyddsvärd både ur ett nationellt och internationellt perspektiv.

Innan förra sekelskiftet fanns lekområden som nyttjades långt upp i Gullspångsälvens avrinningsområde. I samband med kraftverksutbyggnaden och uppförandet av Gullspångs kraftverk (1908) försvårades emellertid tillgängligheten och idag sker lek endast i Lilla Åråsforsen, Stora Åråsforsen och i Gullspångsforsen nedströms Gullspångs kraftverk (Bark m. fl. 2019).

I oktober 2022 utförde MIX Research Sweden, på uppdrag av Fortum, en eDNA-undersökning med flerartsanalys av fisk med fokus på Gullspångslax. Totalt 13 lokaler inkluderades i undersökningen varav dubbelprover togs ifrån en station. Studiens syfte var att undersöka fisksamhället i stort med särskilt fokus på eventuella förekomster av Gullspångslax.

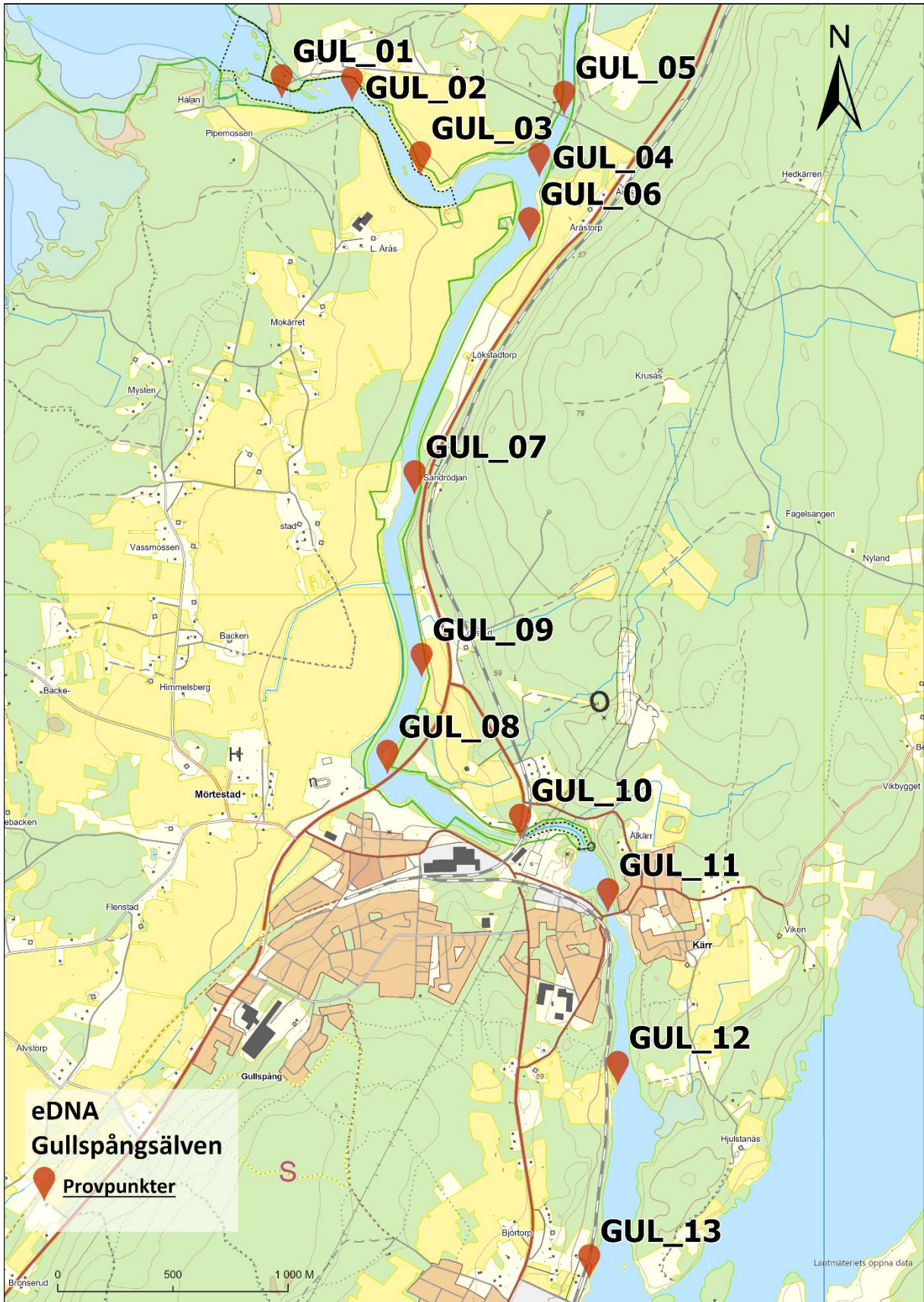
2 METODER

2.1 FÄLTARBETE

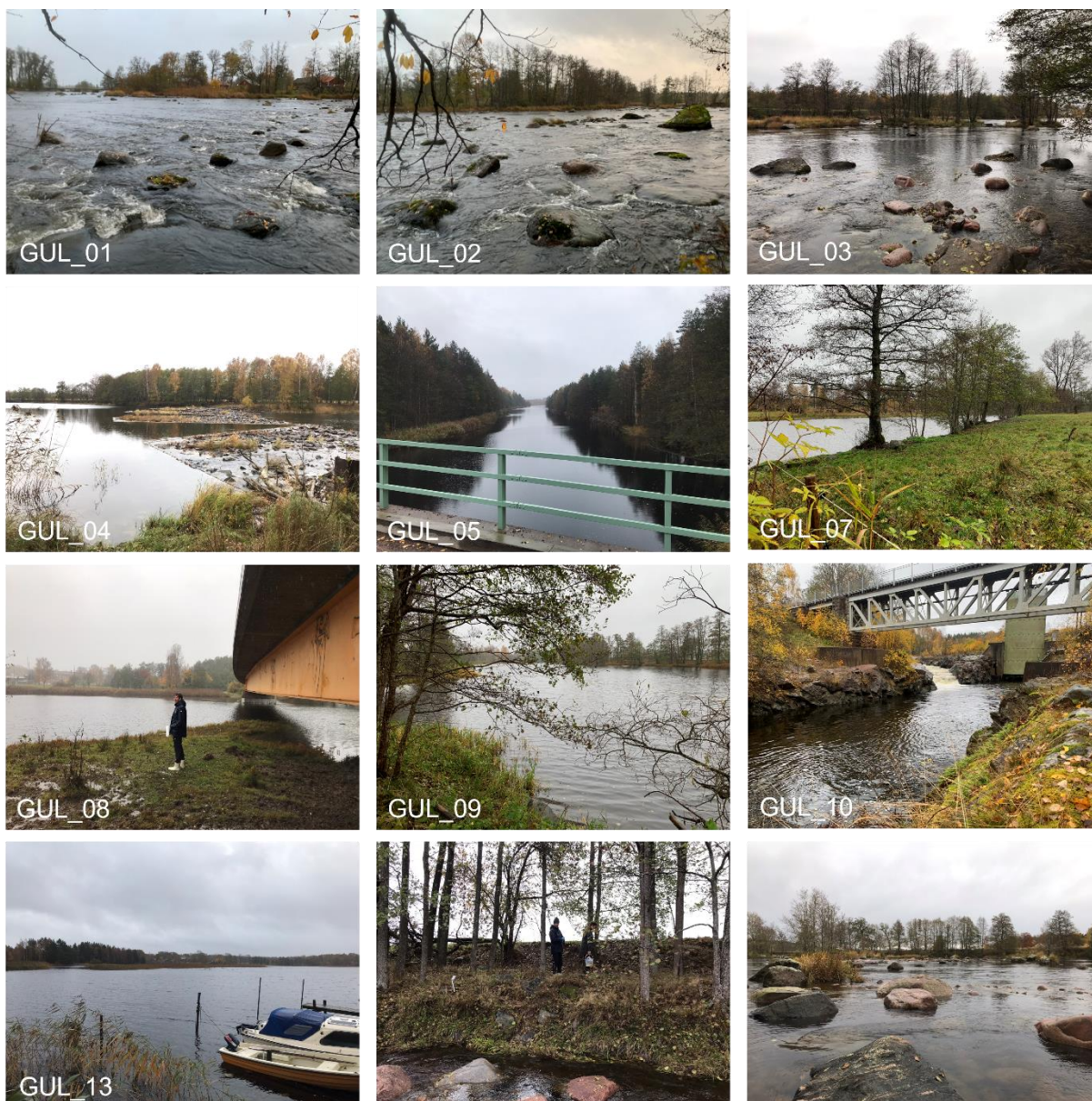
Fältarbetet utfördes den 24 – 25 oktober 2022 (Tabell 1, Figur 1 & 2). Innan eDNA-provtagningen genomfördes steriliserades all provtagningsutrustning. Filtreringsutrustning köptes in som sterila och DNA-fria produkter. För varje lokal samlades fem liter vatten in i form av delprover som slogs ihop till ett samlingsprov för ett representativt resultat (Spens m.fl. 2017, Harper m.fl. 2018, Kačergytė m.fl. 2021, Bruce m.fl. 2021). Omkring tre liter vatten filtrerades med hjälp av en peristaltisk fältpump (Burkle GMBH) genom 5 µm GF/0,8 µm PES inkapslade filterenheter (NatureMetrics, UK). Filtren tömdes på vatten och placerades i -20°C fältfrys innan de transporterades till MIX Research Swedens laboratorier för vidare analyser. Provtagningsutrustning steriliserades mellan lokalerna.

Tabell 1. Information om de undersökta lokalerna.

Lokalnamn	Datum	V ml	T °C H ₂ O	Djup (m)	Tid	Koordinat SWEREF 99 TM	
						Nord	Öst
GUL_01	2022-10-24	3000	9	1-2	17:20	6542152	447646
GUL_02	2022-10-24	3000	9	1-2	17:00	6542140	447951
GUL_03	2022-10-24	3000	9	1-2	16:15	6541818	448248
GUL_04	2022-10-24	3000	9	1-2	15:20	6541812	448764
GUL_05	2022-10-24	2700	9	1-2	14:45	6542080	448872
GUL_06	2022-10-24	3000	9	1-2	15:45	6541531	448721
GUL_07	2022-10-25	3000	9	1-2	14:50	6540433	448223
GUL_08	2022-10-25	3000	9	1-2	13:30	6539219	448105
GUL_09	2022-10-25	3000	9	1-2	14:00	6539639	448253
GUL_10	2022-10-25	3000	9	1-2	12:50	6538941	448681
GUL_11	2022-10-25	3000	9	1-2	12:15	6538618	449062
GUL_12	2022-10-25	3000	10	1-2	12:00	6537868	449105
GUL_13	2022-10-25	3000	10	1-2	11:30	6537028	448981



Figur 1. Översikt av provtagningslokalernas placering i undersökningsområdet.



Figur 2. Bilder över provtagningslokaler. Notera att bild saknas för station 6, 11 och 12.

2.2 LABORATORIEARBETE

Insamlat eDNA extraherades enligt protokoll från Spens m.fl. (2017) i sterila laboratorier specifikt byggda för analyser av eDNA. Samtliga prover analyserades med flerartsanalys för förekomst av fisk (Miya m.fl. 2015). Varje PCR-prov utfördes i 12 replikat som sammanslogs till ett prov under sekvenseringen och erhållna sekvenser matchades i första hand mot den internationella databasen NCBI för att identifiera arternas förekomst. Principerna för extraktioner och flerartsanalyser förklaras utförligare i Bilaga 1 – 4.

2.3 ANALYSER DNA

På en kort region av 12S-genen har fiskarter unika arts specifika variationer som kan liknas vid streckkoder som identifierar olika varor i butiker, där varje enskild art alltså innehar en unik DNA-streckkod. Varje gång en sekvens detekteras i sekvenseringsmaskinen, registreras den

vilket resulterar i ett specifikt antal detektioner per art. Antal detektioner ger en indikation på arternas relativa biomassa. En art med hög förekomst ger därmed upphov till fler detektioner än en art med låg förekomst (Bilaga 2). Detta ger en indikation på arternas relativa biomassa. I studier där eDNA-provtagning genomförts några dagar efter att en bestämd biomassa av fisk har planterats ut i en tidigare tom damm påvisades en stark korrelation mellan fiskbiomassa och antalet eDNA-detektioner av respektive art (Li m.fl. 2019). Bioinformatiken beskrivs i Bilaga 2 (anger relativ biomassa från mest till minst dominerande art). Kvalitetskontroller anges i Bilaga 4.

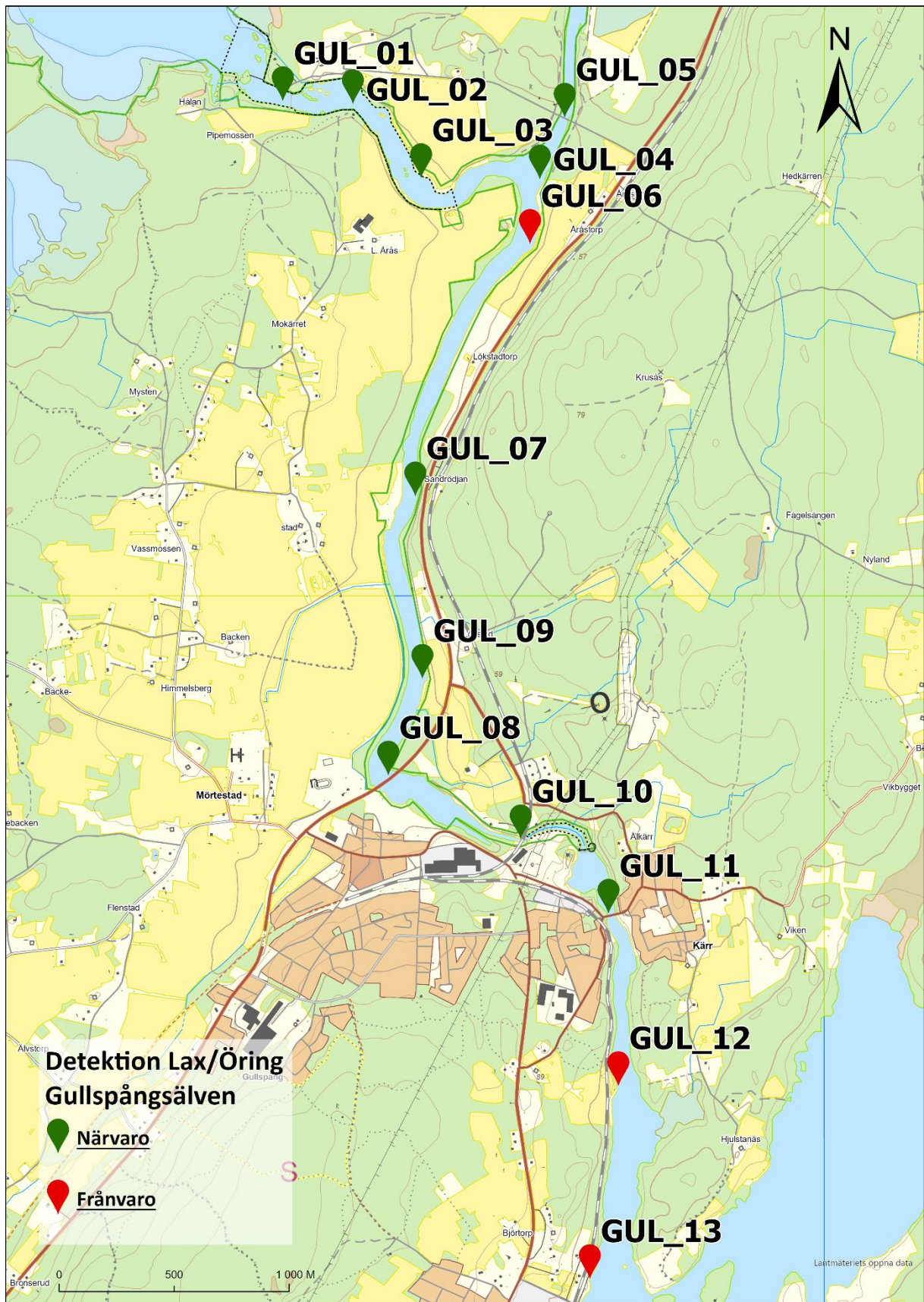
3 RESULTAT

3.1 SEKVENSERINGSRESULTAT

Totalt detekterades 19 unika fisksekvenser i denna undersökning (Bilaga 6). Av dessa identifierades 17 till artnivå medan två sekvenser utgjorde artkomplex. Artkomplex i detta sammanhang innebär att två arter maskeras som en eftersom de har identiska gensekvenser inom den del av DNA-regionen som analyseras (i detta fall en liten del av 12S genen). I denna studie kunde inte artkomplexen vimma (*Vimba vimba*) /björkna (*Blicca bjoerkna*) och id (*Leuciscus idus*) /stäm (*Leuciscus leucicus*) särskiljas genom markörerna. Lax (*Salmo salar*) och öring (*Salmo trutta*) detekterades på 11 av 13 lokaler, detektionerna av dessa arter gjordes vidare på samma lokaler (Figur 3).

Den genomsnittliga artdiversiteten var 14,14 och varierade från 11 arter i prov GUL_12 till 16 arter i GUL_02, GUL_05 och GUL_10. Det totala antalet detekterade arts specifika sekvenser för fiskmarkören i undersökningen var 1 082 374, vilket är höga värden och en indikation på högkvalitativ analys samt provtagning (Bilaga 5).

Prov GUL_08 visade även förekomst av rådjur (*Capreolus capreolus*) och GUL_13 visade förekomst av mindre vattensalamander (*Lissotriton vulgaris*).

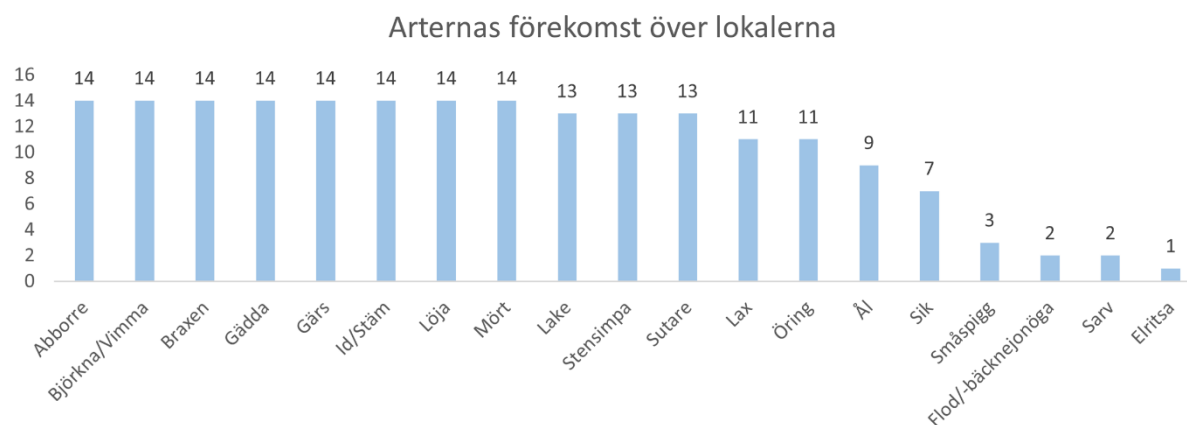


Figur 3. Översikt av provtagningslokalerna med detektion av lax och öring.

3.2 FISKARTERNAS FÖREKOMST PÅ LOKALERNA

Tre rödlistade arter (SLU Artdatabanken, 2020) registrerades – ål (*Anguilla anguilla*, CR), lake (*Lota lota*, VU) och vimma (NT). Vidare detekterades även två arter inkluderade inom åtgärdsprogram för hotade arter (ÅGP) – vimma och id.

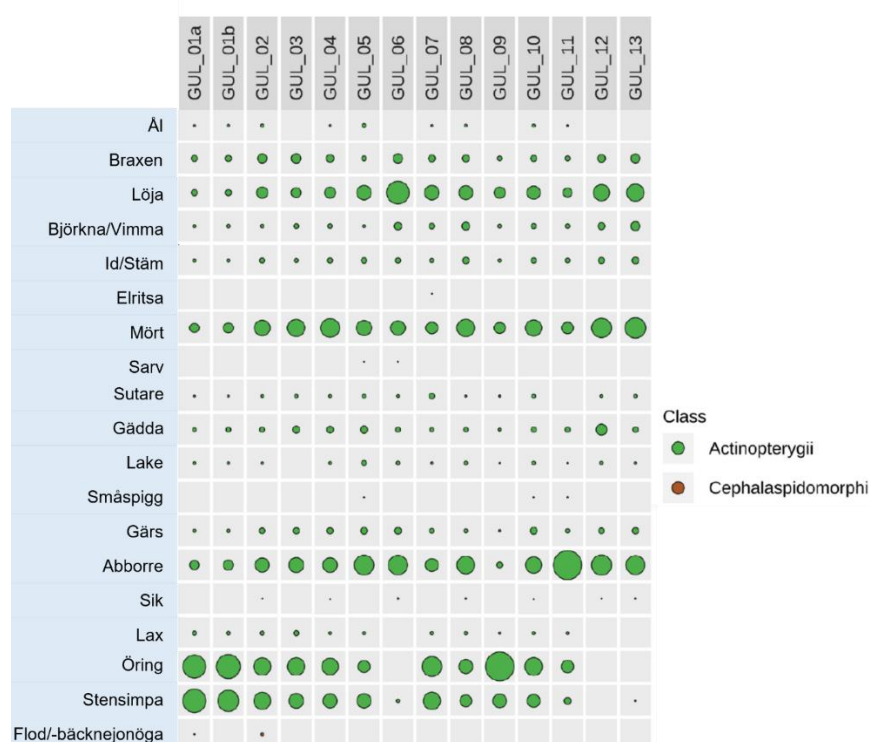
Bland de mest frekvent detekterade arter fanns abborre (*Perca fluviatilis*), mört (*Rutilus rutilus*), braxen (*Abramis brama*) och löja (*Alburnus alburnus*), dessa arter detekterades i samtliga prov (Figur 4). Arternas förekomst på lokalerna visas i Figur 4.



Figur 4. Arternas förekomst över de undersökta lokalerna.

Sett till sekvensantal var öring den vanligast förekommande arten och stod för 21,9 % av det totala sekvensantalet och utgjorde mellan 0–62 % av andelen detektioner i varje prov.

Arternas relativa biomassa inom varje prov visas i Figur 5.



Figur 5. Fiskarternas dominans inom de olika provtagningslokalerna. Den relativa biomassan anger hur många gånger en sekvens av en art blivit läst (kolumner). Varje kolumn visar hur många procent en art är läst av totalt 100 %.

4. DISKUSSION

Undersökningen bekräftar att eDNA är en effektiv metod för att studera artmångfald och förekomst i akvatiska system som rinnande vatten. Resultaten i denna rapport visar att Gullspångsälven är ett artrikt system som fortsatt innehar en viktig funktion som reproduktionsområde för både lax och öring.

Provtagning av eDNA är tidseffektivt och kan ske i svårtillgängliga områden vilket innebär att undersökningar kan genomföras på stor geografisk skala. På detta sätt kan metoden generera stora dataset på ett sätt som tidigare inte varit möjligt. Storskaliga eDNA-inventeringar kan på så sätt bidra till eventuella åtgärdsbeslut eller inducera uppföljande, mer detaljerade inventeringar. Metoden är ett användbart verktyg i miljöövervakningen och är till nytta för att inventera arter före och efter åtgärder, som vid exempelvis utrivningar av kraftverksdammar eller anläggning av fiskvägar. Kombinerade inventeringsmetoder med eDNA (artförekomst) och traditionella metoder på utvalda platser (ålder, storlek, kön) blir ett kraftfullt verktyg som ger större resolution och bättre dataunderlag för åtgärder samt beslut inom förvaltning och miljöövervakning.

5. REFERENSER

- SLU Artdatabanken (2020). Rödlistade arter i Sverige (2020). SLU, Uppsala.
- Bark, J., Cronander, J., Larsson, M., Wengström, N. (2019). Ursprungliga och nuvarande uppväxtmiljöer för Gullspångslax och Gullspångsöring. Sportfiskarna. Sveriges Sportfiske- och Fiskevårdsförbund.
- Bruce, K. Bourlat, S. Blackmann, R., **Hellström, M.**, m.fl. & Deiner, K. (2021). A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment". PenSoft Publishers Bulgaria 2021. ISBN 978-619-248-052-3 (paperback), ISBN 978-619-248-053-0 (e-book) DOI: 10.3897/ab.e68634
- Brys, R., Haegeman, A., Halfmaerten, D., Neyrinck, S., Staelens, A., Auwerx, J., & Ruttink, T. (2021). Monitoring of spatiotemporal occupancy patterns of fish and amphibian species in a lentic aquatic system using environmental DNA. *Molecular ecology*, 30(13), 3097-3110.
- 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.
- Harper, L. R., Buxton, A. S., Rees, H. C., Bruce, K., Brys, R., Halfmaerten, D., ... & Priestley, V. (2018). Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. *Hydrobiologia*, 1-17.
- Kačergytė, I., Petersson, E., Arlt, D., **Hellström, M.**, Knappe, J., Spens, J., Žmihorski, M. & Pärt, T. (2021). Environmental DNA metabarcoding elucidates patterns of fish colonisation and co-occurrences with amphibians in temperate wetlands created for biodiversity. *Freshwater Biol.* 66, 1915–1929.
- Kullander, S.O., Nyman, L., Jilg, K., Delling, B. (2012). Nationalnyckeln till Sveriges flora och fauna. Strålfeniga fiskar. Actinopterygii. ArtDatabanken, SLU, Uppsala.
- Lawson-Handley, L., 2015. How will the "molecular revolution" contribute to biological recording? *Biological Journal of the Linnean Society* 115: 750–766.
- 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.
- Li, J., Lawson Handley, L. J., Harper, L. R., Brys, R., Watson, H. V., Di Muri, C., & Hänfling, B. (2019). Limited dispersion and quick degradation of environmental DNA in fish ponds inferred by metabarcoding. *Environmental DNA* 1 (3): 238–250.
- 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, ... **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. VAD MENAS MED ENARTS- OCH FLERARTSANALYSER?

Enartsstudier - qPCR eller ddPCR

Inventering av förekomst av en enstaka art med eDNA görs med så kallad qPCR eller ddPCR. Frågeställningen för dessa studier är: Finns art X här? Varje art analyseras med en markör som är specifik för precis den arten. Provsvaren anger närvaro/frånvaro av den specifika arten.

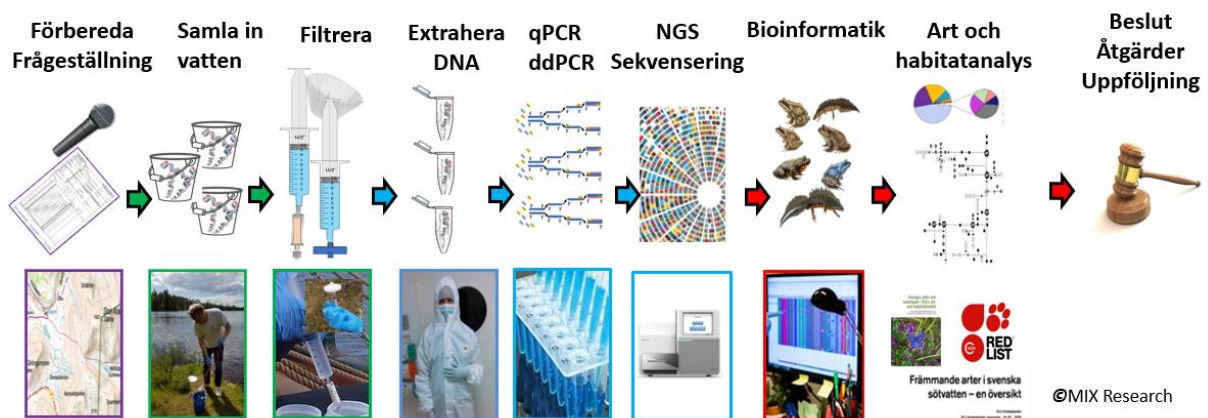
Om flera arter undersöks med enartsanalyser kan data över relativa abundansen mellan art A och art B inte jämföras med varandra eftersom markörerna för varje art skiljer sig markant från varandra. Analystiden för enartsanalyser är kortare än analystiden för flerartsanalyser.

Flerartsstudier - Metastreckkodning genom NGS (Next Generation Sequencing)

Frågeställningen för flerartsstudier är: Vilka arter finns här och hur hög är deras förekomst? Med andra ord behöver man inte på förhand veta vad man letar efter.

Invasiva och skygga arter kan identifieras och antalet arter som detekteras i en analys är obegränsat. Om man inventerar tre eller fler arter är denna metod att föredra och blir snabbt mer kostnadseffektiv än enartsanalyser. Analystiden för flerartsanalyser är längre än analystiden för enartsanalyser men mängden av data och information är så pass stor att inventeringarna kan producera "stort data" som inte har varit möjligt före eDNA- metastreckkodning (Figur B1-1)

Jämförelser mellan data som erhålls genom enarts- och flerartsanalyser visas i figur B1-2.



Figur B1-1. Flödesdiagram som visar de olika stegen för flerartsanalyser från fältplanering till beslut och åtgärder (laboratoriearbete och bioinformatik beskrivs i Bilaga 2).

Enartsanalys - Barkodning	CGCCGCGTTATACGAGA	Ja/Nej	Artlista	Dominans
	CGCCGCGTTATACGAGA	OTU 1	Match →	10 %
Flerartsanalys - Metabarkodning	CACCGCGTTATACGAGA	OTU 2	Match →	65 %
	CGCCGCGTTACACCACT	OTU 3	Match →	5 %
	CGCCGCGCTACACCGTG	OTU 4	Match →	20 %

Figur B1-2. Typ av data som erhålls genom enartsanalyser och flerartsanalyser. Enartsanalyserna anger om en art är närvarande eller inte, medan flerartsanalyser resulterar i en artlista samt arternas dominans i förhållande till varandra inom ett prov.

BILAGA 2. LABORATORIEARBETE

Extraktion

eDNA utvanns (extraherades) enligt protokoll från Spens m.fl. (2017) i sterila laboratorier speciellt byggda för analyser av akvatiskt eDNA.

Flerartsanalyser

Flerartsanalyser för fisk analyserades med en markör i 12 S regionen som detekterar fisk (Miya m. fl. 2015). Varje PCR-prov utfördes i 12 replikat som sammanslogs igen till ett prov under sekvenseringen. Som positiv laboratoriekontroll används ett prov med känd artsammansättning av tropiska arter som standard för jämförelse. Negativa kontroller analyseras för att säkerhetsställa kvaliteten och tillförlitlighet av resultat.

Bioinformatik och verifiering

Varje enskild art har en unik streckkod eller DNA-sekvens. De unika sekvenserna jämfördes med 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 närmare 504 000 kända arter finns tillgängliga med 2,5 miljard sekvenser och 15,3 triljoner baspar enligt GenBank och NCBI hemsida (Sayers, m.fl. 2021). De olika sekvenserna matchades i första hand mot NCBI databasen och fick på så sätt fram arternas identitet. Vidare används en verifierad (vilket betyder att arterna som används för referens-DNA är verifierade av en auktoriserad taxonom) intern databas. Tack vare nya framsteg inom metastreckkodning för vertebrater och evertebrater är det möjligt att få träffar på artnivå istället för enbart familje- eller genusnivå.

Antalet läsningar per art ger en relativ uppskattning (relativ biomassa) av hur mycket eller litet arten förekommer i ett prov.

Referenser

- 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.
- NCBI websida <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Sayers, E. W., Cavanaugh, M., Clark, K., Pruitt, K. D., Schoch, C. L., Sherry, S. T., & Karsch-Mizrachi, I. (2021). GenBank. *Nucleic acids research*, 49(D1), D92-D96.
- Spens, J., A. R. Evans, ... 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.

BILAGA 3. KVALITETSSÄKRING AV DNA - KONTROLLER

Positiva och negativa kontrollprov

För tillförlitliga resultat vid eDNA-provtagning är positiva och negativa kontroller nödvändiga för att utesluta kontamineringar eller andra felkällor. Detta gäller 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 (Goldberg, m.fl. 2016, 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 under COST aktionen DNAquaNet.

Negativ kontroll: Ett prov med kommersiellt DNA fritt vatten (nukleas fritt vatten renat för molekylära undersökningar ex. Nuclease Free Water från Fishing Scientific) eller kolsyrat mineralvatten som ingår i fältmaterialet vid inventerade lokaler med samma provtagningsmetodik som vattenproverna. Detta prov kallas för negativ kontroll. Under hela undersökningen från fält till slutsekvensering bör negativa kontroller införas i varje steg av analyserna. De DNA-fria proverna analyseras så att kontaminering kan uteslutas och falska positiva provsvar inte uppkommer. Om DNA-signaler av mållartsgrupperna hittas i en negativ kontroll innebär det att undersökningen måste göras om ifall källan inte kan identifieras och konsekvenserna av kontamineringen fastställas.

Konsekvenserna av en kontaminerad negativ kontroll kan i praktiken innebära att arter som inte finns i en miljö 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.

En positiv kontroll utan DNA-signal kan i praktiken visa att arter som finns i en miljö inte detekteras (falsk negativ).

Referenser

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

BILAGA 4: KVALITETSKONTROLLER SOM REDOVISAS

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 filtrerats.
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 att 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 att vara kontaminerade och vid vilket steg detta i så fall skett.
6. Positiva kontroller (används inte alltid): a) Fält-positiva där ett område känt för artförekomst provtas för kontroll att arten detekteras i fält. b) PCR-positiva för enartsanalyser (gäller qPCR och ddPCR) där DNA från målartern testas. c) Positiv flerartskontroll, där 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. För enartsanalyser anges närvaro och frånvaro av arten, för flerartsanalyser anges andel (%) av målarterna i ett givet prov. 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 12st. PCR-replikater per art/artgrupp och eDNA-prov utförs. Dessa sammanslås i sekvenseringen. Färre replikater minskar analys säkerheten avsevärt.
10. Antal prover för en specifik MiSeq-körning (sekvensering) överstiger inte 100 stycken exklusive sekvenseringskontroller. Detta säkerställer att antalet läsningar per prov inte ska bli alltför lågt för att kunna detektera ovanligare arter.

BILAGA 5: RESULTAT AV KVALITETSKONTROLLER FÖR FLERARTSANALYSER

Värden för kontrollerna anges i tabell B5-1. DNA-koncentrationer var normala. Miya 12S markören för fisk resulterade i 1 082 374 målartsläsningar.

Tabell B5-1. Kvalitetsgranskning av eDNA och kontroller. eDNA-koncentrationen uppmättes med Qubit Fluorometric Quantitation (Fisher Scientific). Inhiberingskontroll utfördes med qPCR. PCR-negativ innefattar 12 replikat.

Prov	DNA koncentration (ng/μL)	Markör	Positiva PCRs	Index koncentration (ng/μL)	Rå-sekvenser #	Rapporterade målartssekvenser #
GUL_01a	139,20	12S	11	9,259	88 710	84 311
GUL_01b	132,15	12S	12	8,469	87 689	83 129
GUL_02	162,85	12S	12	7,716	90 603	85 303
GUL_03	151,30	12S	12	8,029	1 882	1 607
GUL_04	145,10	12S	12	8,318	68 109	64 030
GUL_05	144,70	12S	11	7,199	82 801	77 186
GUL_06	186,25	12S	11	7,551	91 149	87 087
GUL_07	172,90	12S	12	7,645	89 982	83 116
GUL_08	96,30	12S	12	7,401	92 141	86 367
GUL_09	185,90	12S	12	7,405	89 657	85 580
GUL_10	117,30	12S	10	7,74	101 278	94 539
GUL_11	168,70	12S	6	8,646	89 228	85 017
GUL_12	155,90	12S	12	8,453	77 882	74 698
GUL_13	188,00	12S	12	7,284	52 928	50 848
GUL_NEG	<0,01	12S	7	6,423	51 402	39 556

BILAGA 6: RÅDATA FÖR DETEKTERADE ARTER, ANTAL VERIFIERADE LÄSNINGAR

Tabell B6_1. Antalet eDNA-läsningar per detekterad art inom de olika provlokalerna. Siffrorna anger hur många gånger en sekvens blivit läst på artnivå och anger relativ biomassa. Flera läsningar anger högre biomassa. Notera att den negativakontrollen

Arter (latin)	Arter	Similarity	GUL_01a	GUL_01b	GUL_02	GUL_03	GUL_04	GUL_05	GUL_06	GUL_07	GUL_08	GUL_09	GUL_10	GUL_11	GUL_12	GUL_13	GUL_NEG
<i>Anguilla anguilla</i>	Ål	100,00	103	283	492	-	131	658	-	146	296	-	437	152	-	-	-
<i>Abramis brama</i>	Braxen	100,00	2004	1974	5 036	99	2 428	1 056	5 281	2 671	2 881	1 156	2 284	1 312	3 116	2 839	-
<i>Alburnus alburnus</i>	Benlöja	100,00	2020	1961	7 680	106	5 520	11 636	33 171	12 652	12 160	7 473	11 774	4 743	14 438	11 054	23 190
<i>Blicca bjoerkna/Vimba vimba</i>	Björkna/Vimma	100,00	342	649	577	22	796	277	3 117	1 614	3 552	721	1 456	999	2 376	2 768	-
<i>Leuciscus idus/Leuciscus leuciscus</i>	Id/Stäm	100,00	412	445	1 314	15	1 079	1 487	1 499	823	2 404	512	1 600	1 139	1 880	1 506	-
<i>Phoxinus phoxinus</i>	Elritsa	100,00	-	-	-	-	-	-	-	34	-	-	-	-	-	-	6 732
<i>Rutilus rutilus</i>	Mört	100,00	5 621	6 466	16 434	372	17 730	13 813	14 265	8 931	20 904	8 113	19 364	8 834	22 192	16 635	-
<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	Sarv	100,00	-	-	-	-	-	21	33	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Tinca tinca</i>	Sutare	100,00	105	133	309	11	337	548	397	1 752	136	201	651	-	267	311	-
<i>Esox lucius</i>	Gädda	100,00	608	1 132	1 288	53	1 853	2 765	1 277	745	1 001	403	1 619	1 414	6 200	960	-
<i>Lota lota</i>	Lake	100,00	259	248	168	-	286	1 241	700	189	666	72	591	86	454	113	-
<i>Pungitius pungitius</i>	Småspigg	100,00	-	-	-	-	-	31	-	-	-	-	45	102	-	-	-
<i>Gymnocephalus cernua</i>	Gärs	100,00	394	557	1 687	40	1 585	2 403	2 592	1 127	746	245	2 982	890	1 515	1 320	9 634
<i>Perca fluviatilis</i>	Abborre	100,00	5 146	5 871	12 352	259	9 877	21 997	24 021	9 953	20 104	1 906	18 426	52 926	22 237	13 265	-
<i>Coregonus maraena</i>	Sik	100,00	-	-	25	-	29	-	129	-	82	-	29	-	23	37	-
<i>Salmo salar</i>	Lax	100,00	813	678	780	24	306	338	-	520	566	227	403	395	-	-	-
<i>Salmo trutta</i>	Öring	100,00	3 294	3 524	18 785	358	12 878	7 736	-	23 832	12 285	53 112	21 798	9 526	-	-	-
<i>Cottus gobio</i>	Stensimpa	100,00	3 350	2 748	18 011	248	9 195	11 179	605	18 127	8 584	11 439	11 080	2 499	-	40	-
<i>Lampetra fluviatilis/-planeri</i>	Flod/-bäcknejonöga	100,00	33	-	365	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			84 311	83 129	85 303	1 607	64 030	77 186	87 087	83 116	86 367	85 580	94 539	85 017	74 698	50 848	39 556
<i>Lissotriton vulgaris</i>	Mindre vattensalamander	100,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	-
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14,00	0
<i>Anas platyrhynchos</i>	Gräsand	100,00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1 080
			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 080
<i>Bos taurus</i>	Ko	100,00	-	-	-	-	-	-	-	-	569	51	-	-	-	-	-
<i>Capreolus capreolus</i>	Rådjur	100,00	-	-	-	-	-	-	-	-	36	-	-	-	-	-	-
<i>Homo sapiens</i>	Människa	99,00	-	-	32	-	-	-	-	-	-	22	-	-	-	-	10 766
			0	0	32	0	0	0	0	0	605	73	0	0	0	0	10 766
Totalt antal sekvenser			84 311	83 129	85 335	1 607	64 030	77 186	87 087	83 116	86 972	85 653	94 539	85 017	74 698	50 862	51 402



MIX Research
Sweden