Länsstyrelsen
i Jönköpings län

Meddelande nr 2024:16

eDNA-analys av invasiva arter av fisk och musslor i Jönköpings län 2022

eDNA-analys av främmande invasiva fiskar och musslor i Jönköpings län 2022

Meddelande nr 2024:16

Meddelande	nummer 2024:16
Författare	Marina Panova, Marty Breidenbach och Per Sundberg Seanalytics Maj, 2024
Kontaktperson	Maria Carlsson, Länsstyrelsen i Jönköpings län, Telefon: 010-223 63 98, e-post: maria.k.carlsson@lansstyrelsen.se
Webbplats	www.lansstyrelsen.se/jonkoping
Fotografier	Foto framsida: Länsstyrelsen i Jönköpings län, övriga foton, se respektive bild
ISSN	1101-9425
ISRN	LSTY-F-M—2024/16--SE

© Länsstyrelsen i Jönköpings län 2024

Innehållsförteckning

Sammanfattning **5**

Inledning **6**

Provtagning och provtagningslokaler **7**

Provtagning **7**

Utveckling och test av dPCR-assayer **9**

Analys av vattenprover för förekomst av målarter **12**

Resultat **14**

Utveckling och test av assayer **14**

Analys av vattenprover för förekomst av målarter **15**

Diskussion **18**

Slutsatser och rekommendationer **20**

Tack **21**

Referenser **22**

Sammanfattning

Denna studie gjordes för att se om det fanns DNA av främmande invasiva arter i några utvalda vatten i Jönköpings län. Fiskarter som eftersöktes var solabborre, karp, guldfisk, svart dvärgmal, bandslätting samt mal. De musslor som eftersöktes var vandrarmussla och kvaggamussla. Inga av de eftersökta målarterna påträffades i de prover som togs.

Djur och växter lämnar efter sig spår av DNA i miljön (environmental DNA (eDNA), även kallat miljö-DNA) och genom dessa spår går det att kartlägga biodiversitet och förekomst av arter. I den här rapporten presenteras resultat av eDNA-analyser, genomförda i Jönköpings län, för flera invasiva fiskarter (mal, karp, guldfisk, svart dvärgmal, solabborre och bandslätting) samt två invasiva söttvattensmusslor (vandrarmussla och kvaggamussla) utförda med digital PCR (dPCR). Rapporten redovisar också utvecklingen och test av dPCR-assayer för arter som tidigare saknades. Ordet assay kan i detta sammanhang förklaras som en artspecifik identifieringsmetod baserad på DNA från arten som eftersöks. Dessa nya assays kan bli till stor nytta för kommande eDNA-studier av dessa arter.

Analyserna kunde inte påvisa någon av de efterfrågade målarterna i de aktuella vattendragen eller sjöarna. Även om vi inte kan utesluta falska negativa, alltså att vi får ett negativt resultat trots att arten finns, så finns det inga andra oberoende undersökningar som indikerar att arterna finns i de provtagna miljöerna. Med tanke på att den använda formen av kvantitativ PCR (dPCR) är extremt känslig och kan upptäcka väldigt små mängder målarts-DNA samt att assayerna fungerar kan vi rekommendera undersökningsmetoden för tidig upptäckt av invasiva främmande arter.

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

Inledning

Djur lämnar spår efter sig i naturen i form av DNA från till exempel urin, fjäll, celler och kanske också i form av rena DNA-molekyler. Detta DNA benämns eDNA (från engelskans ”environmental DNA”), eller miljö-DNA, och det kan användas för att påvisa förekomst av en art utan att man behöver observera eller fånga individer. Fördelar med eDNA är att det är en icke-destruktiv metod och kan ge en mer komplett överblick över akvatiska samhällen i jämförelse med till exempel visuella observationer. Det är också en känslig metod för att detektera sällsynta arter som förekommer i låga tätheter och kan därför vara en effektiv metod för tidig upptäckt av invasiva och främmande arter.

Vattenburet eDNA kan samlas genom filtrering som därefter extraheras för vidare analys för att få svar på frågor om vilka arter som finns eller har funnits i vattnet (så kallad metabarkoding) eller för att upptäcka en specifik art, så kallad målartsanalys). Om undersökningen gäller en eller endast få arter finns det många fördelar med målartsanalys jämfört med eDNA metabarkoding: den är snabbare och billigare per prov, kräver ingen bioinformatisk analys, är oberoende av referensdatabaser och kan även vara känsligare för detektion av sällsynta arter (Schenekar et al. 2020). Analysen förutsätter att det finns specifika metoder ("assays") för de aktuella arterna. I takt med att eDNA blir allt vanligare metod i miljöundersökningar kommer det ut målartsanalysmetoder för fler och fler arter. Men för många arter saknas metoder fortfarande och de måste tas fram och valideras innan de rutinmässigt kan användas för undersökning av vattenprover.

I den här rapporten presenteras resultat av DNA analyser för sex invasiva fiskarter (mal, karp, guldfisk, svart dvärgmal, solabborre och bandslätting) samt två invasiva söttvattensmusslor: vandrarmusslan och kvaggamusslan utförda med digital PCR (dPCR). I uppdraget ingick utveckling av dPCR-assayer för arter som saknades och test av simultan analys av prover för flera fiskarter.

Provtagning och provtagningslokaler

Provtagning

Insamlingen av vattenprover genomfördes av personal från Länsstyrelsen i Jönköping 2022.

På varje lokal togs flera subprover på olika djup och platser med hjälp av sterila 1-litersburkar som poolades till ett gemensamt prov varifrån 1 liter filtrerades. Detta skedde i direkt anslutning till provtagningen i sterila 0.45µm Sterivex-filter, vilka fixerades i 95% etanol för att sedan förvaras i frys -20°C fram till extraktion.

Provtagarna preparerade dessutom blankprov bestående av destillerat vatten som behandlades på samma sätt som provvattnet och som analyserades tillsammans med de riktiga proverna. Blankprov tas för att säkerställa att det inte förekommer kontamination i provtagningsprocessen.

Totalt ingick 65 prover i projektet:

- 15 prover för analys av förekomst av mal.
- 34 prover för analys av fem invasiva främmande fiskarter: karp, guldfisk, solabborre, svart dvärgmal och bandslätting.
- 16 prover för analys av förekomst av två invasiva främmande musslor: kvaggamussla och vandrarmussla.

Antal prover inkluderar prover från olika vattendrag, fältkontroller (destillerat vatten filtrerat i samband med provtagningen) och kontroller för DNA-extraktion. Lista på prover, DNA-koncentrationer och målarter finns i Tabell 1.

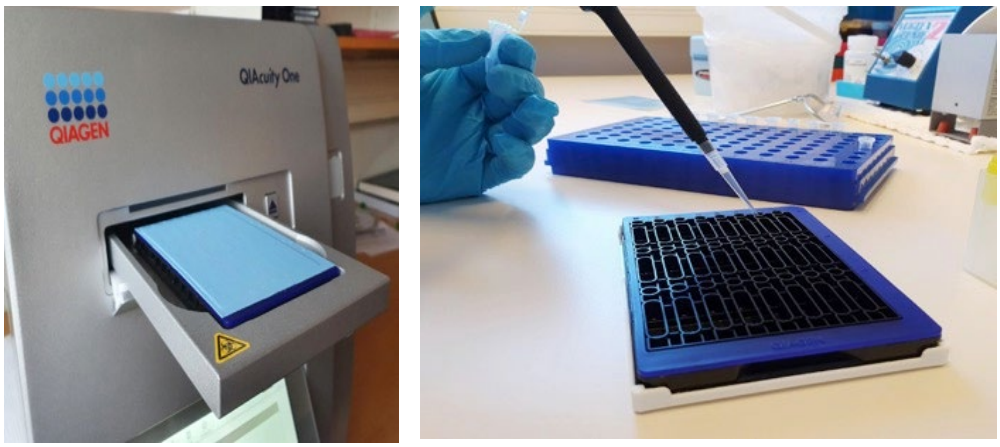
Tabell 1. Prover för målartanalys med DNA koncentrationer. DNA koncentration anger totala mängden i provet och inte bara för aktuella målarter.

Delprojekt	Provnamn	Målart(er)	DNA konc (ng/µl)
Småvatten	Guldfiskdammen 1	Fem fiskarter	4,2
Småvatten	Guldfiskdammen 2	Fem fiskarter	8,8
Småvatten	Guldfiskdammen 3	Fem fiskarter	9,9
Småvatten	Guldfiskdammen 4	Fem fiskarter	7,8
Småvatten	Bergadammen 1	Fem fiskarter	23,8
Småvatten	Bergadammen 2	Fem fiskarter	31,4
Småvatten	Bergadammen 3	Fem fiskarter	10,2
Småvatten	Bergadammen 4	Fem fiskarter	12,2
Småvatten	Arnedammen 1	Fem fiskarter	19,9
Småvatten	Arnedammen 2	Fem fiskarter	18,8
Småvatten	Arnedammen 3	Fem fiskarter	22,0
Småvatten	Arnedammen 4	Fem fiskarter	20,8
Småvatten	Söderbydammen 1	Fem fiskarter	15,1
Småvatten	Söderbydammen 2	Fem fiskarter	15,8

Delprojekt	Provnamn	Målart(er)	DNA konc (ng/µl)
Småvatten	Söderbydammen 3	Fem fiskarter	21,4
Småvatten	Söderbydammen 4	Fem fiskarter	8,7
Småvatten	Extraktion Blank 1	Fem fiskarter	0,0
Småvatten	Fridskulla 1	Fem fiskarter	4,6
Småvatten	Fridskulla 2	Fem fiskarter	8,4
Småvatten	Fridskulla 3	Fem fiskarter	5,8
Småvatten	Fridskulla 4	Fem fiskarter	5,5
Småvatten	Fridslund 1	Fem fiskarter	30,4
Småvatten	Fridslund 2	Fem fiskarter	33,7
Småvatten	Fridslund 3	Fem fiskarter	30,7
Småvatten	Fridslund 4	Fem fiskarter	37,4
Småvatten	Blank 1	Fem fiskarter	0,0
Småvatten	Blank 3	Fem fiskarter	0,5
Småvatten	Ingelsbo 1	Fem fiskarter	11,6
Småvatten	Ingelsbo 2	Fem fiskarter	10,6
Småvatten	Granelund 1	Fem fiskarter	17,9
Småvatten	Granelund 2	Fem fiskarter	30,6
Småvatten	Dolda Dammen 1	Fem fiskarter	6,1
Småvatten	Dolda Dammen 2	Fem fiskarter	4,9
Småvatten	Extraktion Blank 2	Fem fiskarter	0,0
Malprov	Gussjön 1	Mal	4,3
Malprov	Gussjön 2	Mal	4,2
Malprov	Gussjön 3	Mal	6,2
Malprov	Gussjön 4	Mal	5,4
Malprov	Nissan 1	Mal	3,3
Malprov	Nissan 2	Mal	6,1
Malprov	Nissan 3	Mal	6,9
Malprov	Nissan 4	Mal	5,3
Malprov	Mossebosjön 1	Mal	11,1
Malprov	Mossebosjön 2	Mal	11,0
Malprov	Mossebosjön 3	Mal	10,3
Malprov	Mossebosjön 4	Mal	9,8
Malprov	Blank 6	Mal	0,4
Malprov	Blank 7	Mal	0,0
Malprov	Extraktion Blank 3	Mal	0,0
Malprov	Blank 2	Vandrarmussla, kvaggamussla	0,0
Vattendrag/kvaggamussla	Blank 4	Vandrarmussla, kvaggamussla	0,4
Vattendrag/kvaggamussla	Blank 5	Vandrarmussla, kvaggamussla	0,0
Vattendrag/kvaggamussla	Mycklaflon 1	Vandrarmussla, kvaggamussla	9,3
Vattendrag/kvaggamussla	Mycklaflon 2	Vandrarmussla, kvaggamussla	9,4
Vattendrag/kvaggamussla	Mycklaflon 3	Vandrarmussla, kvaggamussla	7,2

Delprojekt	Provnamn	Målart(er)	DNA konc (ng/µl)
Vattendrag/kvaggamussla	Mycklaflon 2(4)	Vandrarmussla, kvaggamussla	8,7
Vattendrag/kvaggamussla	Norra Bron 1	Vandrarmussla, kvaggamussla	7,5
Vattendrag/kvaggamussla	Norra Bron 2	Vandrarmussla, kvaggamussla	10,6
Vattendrag/kvaggamussla	Norra Bron 3	Vandrarmussla, kvaggamussla	8,8
Vattendrag/kvaggamussla	Norra Bron 4	Vandrarmussla, kvaggamussla	10,2
Vattendrag/kvaggamussla	Södra Bron 1	Vandrarmussla, kvaggamussla	8,0
Vattendrag/kvaggamussla	Södra Bron 2	Vandrarmussla, kvaggamussla	14,4
Vattendrag/kvaggamussla	Södra Bron 3	Vandrarmussla, kvaggamussla	9,8
Vattendrag/kvaggamussla	Södra Bron 4	Vandrarmussla, kvaggamussla	15,9
Vattendrag/kvaggamussla	Extraktion Blank 4	Vandrarmussla, kvaggamussla	0,0

Utveckling och test av dPCR-assayer[1]



Figur 1. QiAcuity One systemet och den typ av 24-plattor som använts (Foto: Alizz Axberg©).

För att testa förekomst av arter i vattenprover användes digital PCR (dPCR) i QiACuity One system från QIAGEN (Figur 1). I denna applikation upptäcks arter med hjälp av art-specifika assayer som består av två primrar och en prob som matchar artens DNA. Ordet assay används genom hela rapporten och kan enkelt förklaras med en arts specifika identifieringsmetod. Primrarna amplifierar målartens DNA i PCR-reaktion. Proben är en kort DNA-sträng som bär på ett fluorescerande ämne och så kallade ”quencher” som förhindrar fluorescens. Quenchern släpper fluorescerande ämnet när proben fäster sig på PCR-produkten och fluorescenssignal registreras av skannern i dPCR-systemet.

För att kunna analysera prover för flera arter samtidigt, kan man använda olika fluorescerande ämnen som skiljer sig åt med avseende på våglängd, upp till fem olika färger. I detta projekt användes kombination av FAM- och HEX-färger för de två arterna av Dreissena-musslor och en kombination av fem färger (FAM, HEX, ROX, TAMRA, CY5) för analys

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

av de fem fiskarterna (alla fiskarter förutom mal i Tabell 2). Assayer för mal och musslor beställdes från Bio-Rad som färdigblandade med primer prob-koncentration 900 nM:250 nM. Assayer för de fem fiskarterna beställdes i stock-koncentration från Eurofins Genomics och blandades på laboratoriet till primer: prob koncentration 600 nM:300 nM (den högre probkoncentration rekommenderas för analys av flera arter samtidigt).

Artspecifika assayer som användes i analyser av vattenprover finns angivna i Tabell 2. Alla assayer är utvecklade för mitokondriella gener eftersom mitokondriellt DNA förekommer i många kopior per cell och därför är lättare att upptäcka än nukleärt DNA. För bandslätting och mal finns publicerade assayer som uppfyller krav för dPCR (Manfrin et al. 2022 och Roy et al. 2018). Det finns en publicerad assay för karp (Doi et al. 2015); dock var problängd och temperatur för hybridiseringssteg inte optimala för dPCR och vi designade därför andra primrar och prob för samma genfragment. För vandrarmussla och kvaggamussla finns publicerade qPCR primer assayer (Blackman et al. 2020).Dessa assayer kompletterades med prober. Assayen för solabborre har tidigare tagits fram av SeAnalytics. Assayer för guldfisken och svart dvärgmal utvecklades av SeAnalytics för detta projekt. Det finns publicerade primrar som passar både svart dvärgmal och brun dvärgmal från Clusa L & García-Vázquez 2018.

Utveckling, eller modifiering, av assayer har gjorts enligt följande:

- sekvenserna för målarten laddades ner från BOLD-databasen[2] (COI-genen) eller NCBI databasen[3] (övriga gener)
- förekomsten i Sverige av andra arter från samma släkte kontrollerades i Artdatabanken (artfakta.se) och deras sekvenser laddas också ner
- Geneious program användes för aligna sekvenser samt för att designa primrar och prob som är specifika för målarten och uppfyller dPCR-rekommendationer.

Guldfisk (*Carassius auratus*) kunde urskiljas från ruda (*C. carassius*) men inte från silverruda (*C. gibelio*). Dessa två arter har identiska sekvenser och assayen för guldfisk tabell 2 reagerar också på silverruda. Bägge arter är invasiva och främmande. Svart dvärgmal (*Ameiurus melas)* är genetiskt väldigt likt brun dvärgmal (*A. nebulosus*). Primer och prob för svart dvärgmal har bara 2 nukleotiders skillnad från den bruna dvärgmalens DNA och kan troligen därför ge en svagare signal även vid förekomsten av brun dvärgmal. Båda arterna är främmande och invasiva.

[2] https://boldsystems.org/index.php/databases

[3] https://www.ncbi.nlm.nih.gov/

Tabell 2. dPCR assayer för invasiva främmande arter som användes i projektet.

Art	Forward primer, reverse primer och prob	Gen	Källa
Solabborre Lepomis gibbosus	Leppgib_F: GGACACGGGGCTAAACCAAAT Leppgib_R: GGGCTCTTAGTTGTGGAATTGCA Leppgib_p: FAM-ACCCCCACGTGGACTGGAAT-BHQ1	16S	SeAnalytics
Guldfisk Carassius auratus	Caurat_F: TGCATTCCACTTCCTCCTAC Caurat_R: CAGTCCGATGGGGTTATTTGAT Caurat_p: HEX-CGCCGCCGCTACTGTCATT-BHQ1	Cytb	SeAnalytics
Bandslätting Pseudorasbora parva	Ppar_F: CCCTGACATAGCATTCCCC Ppar_R: AGAGGCTAAGAGTAGGAGGA Ppar_p: TAMRA-AAGGGGGAAGTAGTCAGAAGCT-BHQ1	COI	Manfrin et al. 2022
Karp Cyprinus carpio	Carp_F: CAATGAATCTGAGGTGGGTTC Carp_R: TTGATCCTGTTTCGTGGAGG Carp_p: ROX-CACTAACACGATTCTTCGCATTCCA-BHQ1	Cytb	Doi et al. 2015, modifierad
Svart dvärgmal Ameiurus melas	Amel_F: CCGAATGATATTTCCTGTTTGC Amel_R: TGTAATAGGGGGACAACTATCAG Amel_p: CY5-TCTTAGCCCTCCTCCTCTCTATCTT-BHQ1	Cytb	SeAnalytics
Mal Silurus glanis	mal-COI_F: GACTTCTCCCTCCTTCATTCCTG mal-COI_R: AAGCACCTGCGTGGGCG mal-COI_P: FAM-CGGAGTCGAAGCGGGC-Iowa Black	COI	Roy et al. 2018
Vandrarmussla Dreissena polymorpha	DP1_F: CACGGGTTTTAGTGTTCTTATTCG DP1_R: AGCCCATGAGTGGTGACAAT DP1_p: FAM-CCTGGAAGCGTCCTTGGTGATTT-Iowa Black	COI	Blackman et al. 2020, modifierad
Kvaggamussla Dreissena rostriformis bugensis	DRB1_F GGAAACTGGTTGGTCCCGAT DRB1_R GGCCCTGAATGCCCCATAAT DRB1_p HEX-AGTGAGGGCGGATTTGGTGG-Iowa Black	COI	Blackman et al. 2020, modifierad

För att kunna testa en artspecifik assay och även kontrollera senare provanalyser behövs positiva kontroller i form av målartens DNA, se Tabell 3. Vävnadsprover för mal och solabborre fanns i vårt laboratorium sen tidigare. Resten av positiva kontroller införskaffades för detta projekt med hjälp av Naturhistoriska museerna i Stockholm och Göteborg och från kollegor. DNA extraktioner från karp och guldfiskprover från Naturhistoriska Museet i Göteborg gav dock inget DNA, förmodligen för att proverna tidigare har fixerats och förvarats i formalin. Därför togs det nya prover från ett akvarium och från en karpdamm. Ett prov av kvaggamusslan var särskilt svår att hitta; arten har ännu inte rapporterats i Sverige och saknas i museisamlingar.

Alla assayer testades först på positiva kontroller. Varje art testades var för sig och PCR parametrar justerades vid behov för att få en stark och tydlig signal i den positiva kontrollen.

Efter det testades en analys för två eller flera arter samtidigt. När metoden fungerade väl för positiva kontroller applicerades den på proverna.

Tabell 3. Positiva kontroller för test och utveckling av assayer som användes i projektet.

Art	Provtyp	Insamlad av
Solabborre	Vävnad	SeAnalytics, tidigare projekt
Guldfisk	Tops levande fisk	SeAnalytics, från privat akvarium
Bandslätting	Vävnad	Från museum samlingar
Karp	Vatten eDNA från karpdamm	SeAnalytics, Spegeldammen, Botaniska trädgård
Svartdvärgmal	Vävnad	Från museum samlingar
Mal	Vävnad	Länsstyrelsen i Jönköpings län
Vandrarmussla	Vävnad	Från museum samplingar
Kvaggamussla	DNA	Från forskare på Wien universitet

dPCR gjordes i 26K dPCR-plattor. Cirka 26 000 partioner, eller oberoende PCR-reaktioner per prov, se metodbeskrivning på QIAGEN:s webbplats https://www.qiagen.com/us/applications/digital-pcr/beginners. PCR-reaktioner för positiva kontroller innehöll 10 µl QIAGEN mastermix för prober, 2 µl primer-prob assay per målart, 2 µl DNA (med koncentration 0,2 ng/µl) och vatten upp till 40 µl reaktionsvolym. Termocyklingsparametrar för PCR för de olika arter anges i Tabell 4 och Tabell 5.

Analys av vattenprover för förekomst av målarter

DNA extraherades från filtren med Nucleospin eDNA Water (Machery-Nagel), totala mängden DNA mättes med Qubit fluorometer för att säkerställa att extraktionerna har fungerat. DNA-koncentration i proverna varierade mellan 4–33 ng/µl (Tabell 1). Detta är den totala DNA-koncentrationen, från alla organismer i provet, som visar att DNA extraktionerna fungerade väl. Inget DNA detekterades i negativa extraktionskontroller. Några av negativa fältkontroller visade låga DNA koncentrationer.

PCR-reaktioner innehöll 10 µl QIAGEN mastermix för prober, 2 µl primer-prob assay per målart, 10 µl DNA och vatten upp till 40 µl reaktionsvolym. Några prover innehöll PCR-inhibitorer (ämnen som förhindrar PCR). Dessa prover analyserades en gång till med minskad volym DNA, 1 µl. PCR-parametrar för de olika arter anges i Tabell 4 och Tabell 5.

Proverna analyserades i 26K plattor som rymmer 24 prover med ca 25 500 partitioner (separata PCR-reaktioner) per prov. Varje platta innehöll, förutom prover, positiva kontroll(er) för målart(er) enlig testprotokollen ovan och minst en negativ kontroll (PCR-reaktion utan tillsatt DNA). Varje prov och kontroll analyserades i duplikat för att öka tillförlitligheten.

Tabell 4. Protokoll för dPCR termocykler. Mal, vandrarmussla och kvaggamussla.

Cykler	Temperatur	Tid
1x	95° C	2 min
40 x	95° C	30 sek
40 x	60° C	1 min

Tabell 5. Protokoll för dPCR termocykler. Fem fiskarter.

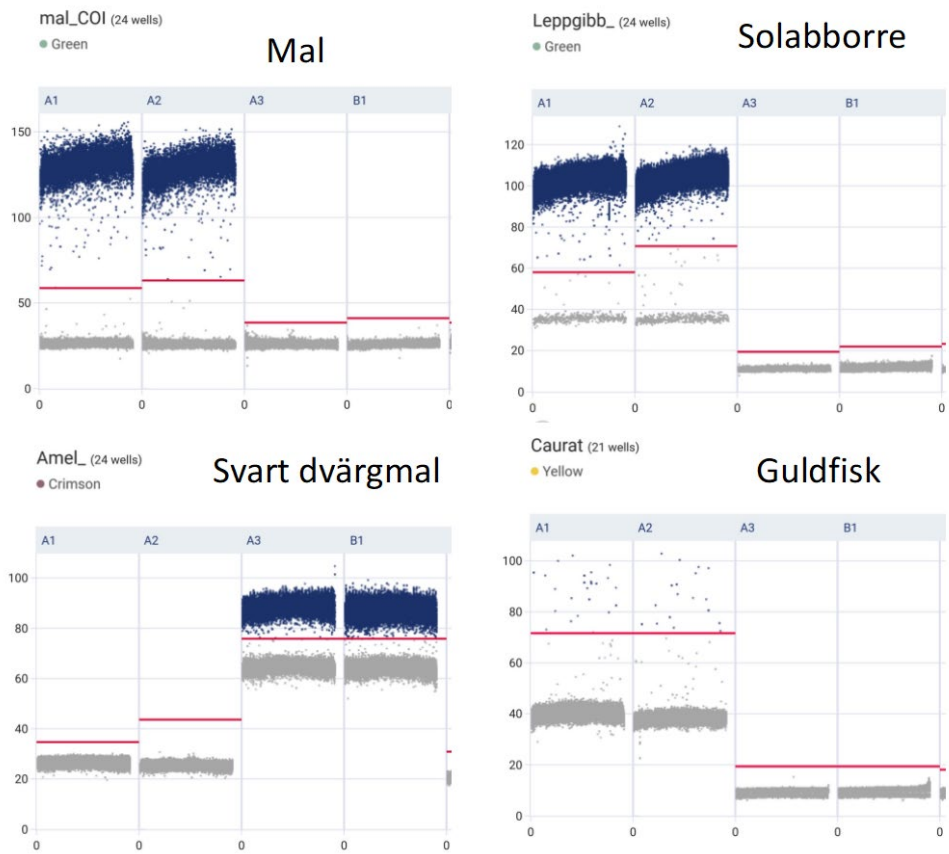
Cykler	Temperatur	Tid
1x	95° C	2 min
40 x	95° C	15 sek
40 x	60° C	30 sek

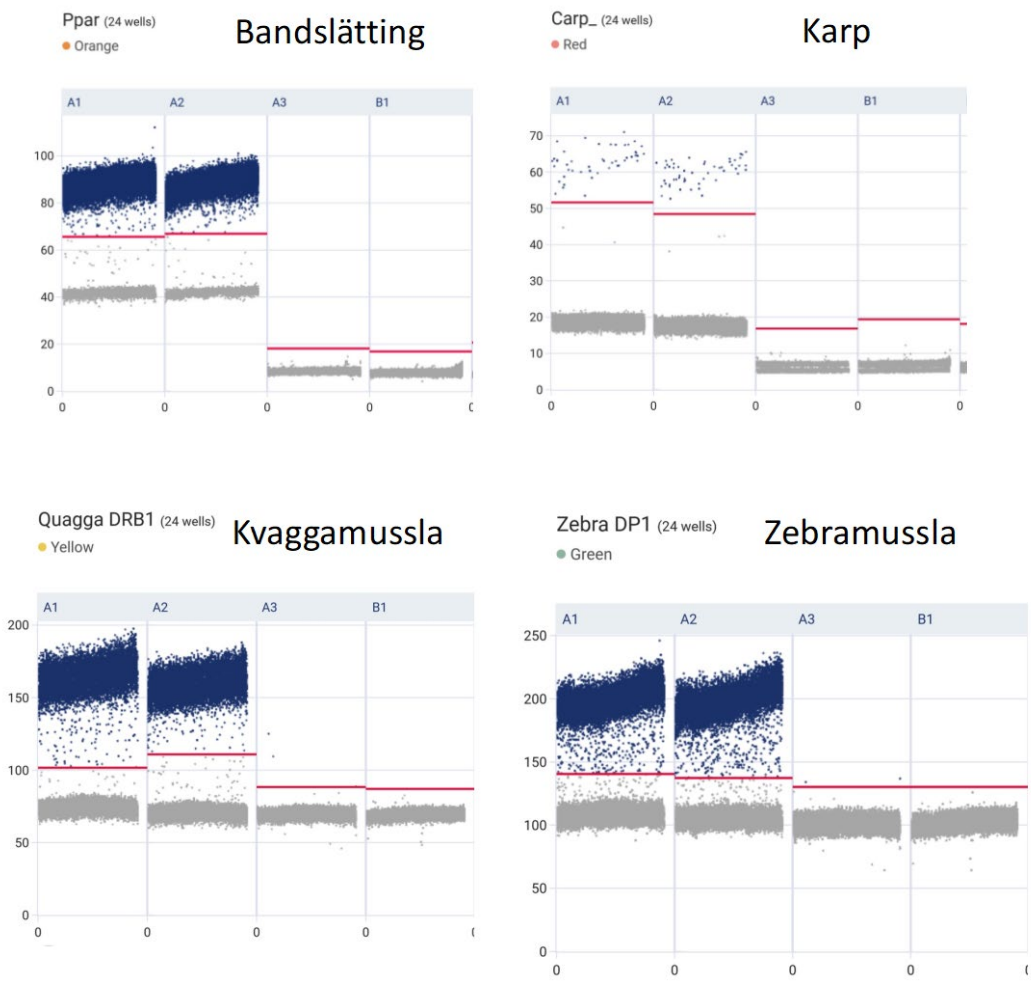
Resultat

Utveckling och test av assayer

Assayen för mal fungerade väl i första försöket. Likaså assayer för vandrarmussla och kvaggamussla, som gav bra resultat både var för sig och i kombination med varandra. Med ”bra resultat” anses stark och tydlig signal i positiva kontroller som lätt urskiljer dem från negativa kontroller, figur 2.

Assayer för de fem fiskarterna fungerade väl var för sig men inte när alla fem användes samtidigt, då 3 av 5 färger visade ingen eller väldigt låg fluorescens i positiva kontroller. Att använda fem färgämnen samtidigt i sig bör inte vara problematiskt; kombination av dessa färgämnen rekommenderas av QIAGEN och har använts i våra tidigare projekt. En möjlig orsak är att vissa primrar och prober interagerar med varandra i blandningen, vilket förhindrar PCR-reaktionen. För att komma runt problemet identifierades assayer som fungerade väl tillsammans: karp plus solabborre och guldfisk plus svart dvärgmal. Alla prover analyserades med dPCR för dessa kombinationer medan dPCR för bandslätting gjordes enskilt.





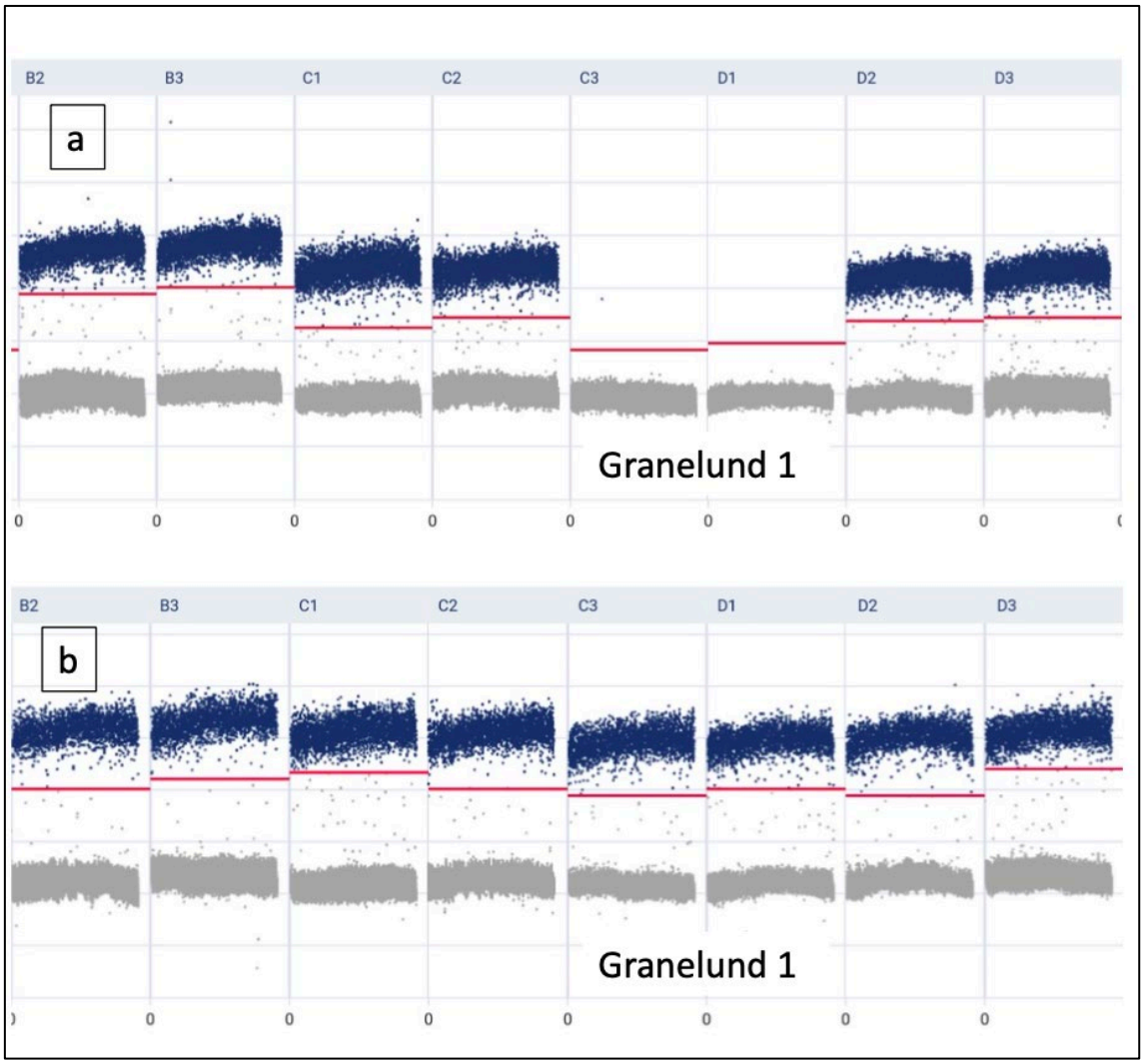
Figur 2 Diagrammen visar exempel av dPCR resultat för positiva och negativa kontroller för varje målart. Signal i positiva kontroller för guldfisk och karp är lägre eftersom vi använde tops och vatten (i stället för vävnad som för övriga arter) för att extrahera DNA men är ändå tydlig. Observera att vandrarmusslan även kallas zebramussla och att det namnet använts i figuren.

Analys av vattenprover för förekomst av målarter

Prover avsedda för analys för mal kördes i två plattor. Ett prov (Gussjön 2) hade en positiv partition av cirka 25 400 i bägge replikaten. Eftersom även negativ kontroll hade en positiv partition analyserades Gussjön 2 provet en gång till med högre och lägre volym av DNA, 20 µl och 5 µl, men visade ingen signal. Inga andra prover hade signal för målarten. Alla dPCR hade > 25 000 partitioner och positiva kontroller hade en tydlig signal för målarten (Figur 2).

Ingen signal för någon av de fem fiskarterna (karp, guldfisk, solabborre, svart dvärgmal och bandslätting) detekterades i prover tagna för dessa arter. Alla dPCR hade > 25 000 partitioner, alla positiva kontroller hade en tydlig signal (som i Figur 2) och alla negativa kontroller saknade signal för målarterna.

När inget av vattenproverna visade signal för någon av fiskarterna kontrollerades proverna för PCR-inhibitorer. Det vill säga om DNA-extraktioner innehåller kemiska ämnen som interagerar med DNA eller polymerasen och förhindrar amplifiering. I inhibitionstestet blandades 0.1 ng DNA från en känd art (japanskt jätteostron*, Magallana gigas*) i 10 µl DNA från prover (samma volym som användes i dPCR analyser av prover) och testades med en assay för japanska ostron. I fyra prover (Fridskulla 3, Fridslund 4, Arnedammen 4 och Granelund 1) upptäcktes PCR-inhibering, det vill säga ostrontestet blev negativ (Figur 3) trots känd förekomst av DNA. Inhiberingseffekten försvann när volym för prov-DNA minskades till 1 µl (Figur 3). Dessa vattenprover analyserades en gång till med 1 µl DNA men visade fortfarande ingen signal för någon av de invasiva främmande fiskarterna.



Figur 3. Exempel på resultat från inhiberingstest med DNA från prover med det japanska jätteostronet blandade med 10 µl (a) och 1 µl (b) DNA från vattenprover. PCR inhiberas med 10 µl DNA från Granelund 1 (a) och fungerar med 1 µl DNA från Granelund 1 (b).

Prover för vandrarmussla och kvaggamussla kontrollerades inte med inhibitorstest utan analyserades både med 10 och 1 µl DNA ifall det finns PCR-inhibering. Alla dPCR hade >25 000 partitioner och alla positiva kontroller hade en tydlig signal för bägge arterna. Negativa kontroller hade 0 – 3 positiva partitioner (av cirka 25 400). De flesta prover hade inga positiva partioner och enstaka hade 1 - 3, det vill säga i nivån med negativa kontrollen och betraktades som negativa.

Diskussion

I detta projekt analyserades vattenprover insamlade i olika vatten i Jönköpings län. Tre olika frågeställningar behandlades.

- Förekomst av fem invasiva främmande fiskarter (karp, guldfisk, svart dvärgmal, solabborre och bandslätting)
- Förekomst av mal, en för det aktuella vattendraget främmande fisk
- Förekomst av två invasiva främmande söttvattensmusslor (vandrarmussla och kvaggamussla).

Analyserna gjordes med hjälp av dPCR-teknik. För mal och bandslätting användes publicerade assayer, befintliga assayer för karp och musslor modifierades för dPCR och assayer för svart dvärgmal, solabborre och guldfisk togs fram av SeAnalytics.

Assayer för alla arter testades först för positiva kontroller, DNA från vävnad eller levande organismer, för att säkerställa att PCR fungerar väl och ger stark signal på målartens-DNA. I nästa steg analyserades DNA från vattenprover tillsammans med negativa och positiva kontroller. Analyserna påvisade inget DNA från någon av målarterna.

PCR-inhibitorer förekommer i till exempel förorenade eller humusrika vatten (Schrader et al. 2012; Sidstedt et al. 2020) och kan orsaka falska negativa resultat i målartsanalys av eDNA-prover (Karlsson et al. 2022). PCR-inhibering upptäcktes i fyra prover och dessa prover analyserades på nytt, men då med en lägre volym av DNA som inte visade PCR-inhibering. Det negativ resultat kvarstod.

För prover ämnade för analys av de fem invasiva främmande fiskarterna var målsättningen att utveckla en metod för att analysera alla fem arter samtidigt. Detta har inte lyckats trots många optimeringsförsök och hjälp från dPCR specialister från QIAGEN. Eftersom assayerna fungerade väl var för sig eller i par ligger problemet troligen i en interaktion mellan primrar och prober från olika assayer. Om det finns ett behov för en standardanalysmetod för att undersöka dessa fem arter samtidigt kan man göra ytterligare optimeringsförsök. Till exempel genom att variera koncentrationer för de olika primrar och prober, testa annan temperatur för hybridiseringssteg och (om det finns sekvensunderlag) designa nya primrar och prober. I detta projekt fick proverna analyseras för en eller två arter i taget.

Som slutsats kan vi säga med säkerhet att inget av proverna innehöll DNA från de undersökta invasiva främmande arterna. Om detta kan betraktas som bevis för att arterna inte finns i de undersökta vattendragen eller sjöarna är en svårare fråga. PCR-baserad målartsanalys av vattenprover är numera en etablerad metod för att detektera förekomster av akvatiska organismer. Det finns många exempel i litteratur där metoden används för olika fiskarter (e.g. Clusa & García-Vázquez 2018; Roy et al. 2018; Hernandez et al. 2020). Förekomst av flera fiskarter från detta projekt har tidigare påvisats med hjälp av vatten eDNA: mal (Schenekar et al. 2020), karp (Eichmiller et al. 2014) och bandslätting (Clusa & García-Vázquez 2018; Manfrin et al. 2020). I vårt laboratorium har vi tidigare använt metoden för att detektera invasiva fiskarter, som solabborre och svartmunnad smörbult. Även musslor har tidigare detekterats med målartsanalys. I en studie från Storbritannien visade eDNA signal för vandrarmussla och kvaggamussla i alla lokaler med känd förekomst (Blackman et al.

2020). I vårt laboratorium har vi kunnat detektera inhemska arter av sötvattenmusslor i kända och även nya lokaler i Kalmar län.

Utifrån litteraturen och den egna erfarenheten är det osannolikt att det kan finnas större etablerade populationer av dessa invasiva främmande arter i de undersökta vattnen, i så fall borde det finnas DNA-signal i proverna. Det finns heller inga andra oberoende observationer av dessa arter (genom till exempel provfiske, dykning) i de undersökta vattendragen eller sjöarna.

dPCR är den mest känsliga metoden som finns just nu och kan detektera väldigt låga DNA-nivåer, ner till 10 DNA-kopior per liter insamlat vatten. Men låga förekomster av arter är svårt att utesluta helt utifrån ett begränsat antal prover per vattendrag. Sannolikheten att målartsDNA finns i vattenprovet beror på (förutom populationsdensitet) många olika faktorer så som typ av vattendrag, provtagningsdjup, avstånd till levande individer, artens beteende och ekologi, årstid och så vidare. Det finns studier som visar att eDNA-prover i vissa fall kan missa invasiva främmande fiskar. I en undersökning av en sjö i Minnesota med en yta på 65 hektar och ett bestånd av karp var enbart 63 % av proverna positiva när proverna togs i habitat som sällan besöks av arten (Eichmiller et al. 2014). I en analys av vattenprover från vattendrag i Italien med väldigt låga koncentrationer av DNA från bandslätting var vissa replikat positiva och andra negativa (Manfrin et al. 2022). Det är dock svårt att säga om dessa resultat kan extrapoleras till små svenska vatten som provtagits i denna studie. Det vore intressant att testa dPCR-metoden om det rapporteras en observation av någon invasiv fiskarart i svenska små vattendrag i framtiden.

Slutsatser och rekommendationer

Studien gjordes för att se om det fanns främmande invasiva arter i ett antal provtagna vatten i Jönköpings län. Fiskarter som eftersöktes var solabborre, karp, guldfisk, svart dvärgmal, bandslätting. I Nissan eftersöktes mal, som är en främmande art för vattensystemet. De musslor som eftersöktes var vandrarmussla och kvaggamussla. Inga av de eftersökta mål-arterna påträffades i de prover som togs.

Verifierade, artspecifika identifieringsmetoder (assays) för eDNA fungerade väl för alla målarter i denna undersökning. Analyserna kunde inte påvisa någon av efterfrågade målarterna i de aktuella vattendragen eller sjöarna. Även om vi inte kan utesluta falska negativa svar så finns det inga andra oberoende undersökningar som indikerar att arterna finns i de provtagna miljöerna. Med tanke på att den använda formen av kvantitativ PCR (dPCR) är extremt känslig och kan upptäcka väldigt små mängder målarts-DNA samt att assayerna fungerar kan vi rekommendera undersökningsmetoden för tidig upptäckt av invasiva främmande arter.

Tack

Vi vill tacka alla kollegor som hjälpte oss med prover för positiva kontroller i detta projekt: Kennet Lundin från Göteborgs naturhistoriska museum, Kjell Arne Johanson, Sebastian Kvist och Bo Delling från Naturhistoriska riksmuseet, Hanna Tornevall från Göteborgs botaniska trädgård, Andreas Wanninger och Christian Baranyi från Wien universitet och Yale Passamaneck från Hydraulics Investigations and Laboratory Services i Denver.

Vi tackar också Nikolaj Steinmann Madsen från QIAGEN för tips och råd angående optimeringen av dPCR för flerartsanalyser.

Referenser

Blackman RC, Benucci M, Donnelly RC, Hänfling B, Harper LR, Sellers GS, Lawson Handley L (2020). Simple, sensitive and species-specific assays for detecting quagga and zebra mussels (*Dreissena rostriformis bugensis* and *D. polymorpha*) using environmental DNA. *Management of Biological Invasions* 11(2): 218–236. https://doi.org/10.3391/mbi. 2020.11.2.04

Clusa L, García-Vázquez E (2018). A simple, rapid method for detecting seven common invasive fish species in Europe from environmental DNA. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems* 28:619–629. https://doi.org/10.1002/aqc.2890

Doi H, Uchii K, Takahara T, Matsuhashi S, Yamanaka H, Minamoto T (2015). Use of Droplet Digital PCR for Estimation of Fish Abundance and Biomass in Environmental DNA Surveys. *PLoS ONE* 10(3): e0122763. doi:10.1371/journal.pone.0122763

Eichmiller JJ, Bajer PG, Sorensen PW (2014). The Relationship between the Distribution of Common Carp and Their Environmental DNA in a Small Lake. *PLoS ONE* 9(11): e112611. doi:10.1371/journal.pone.0112611

Hernandez C, Bougas B, Perreault- Payette A, Simard A, Côté G, Bernatchez L (2020). 60 specific eDNA qPCR assays to detect invasive, threatened, and exploited freshwater vertebrates and invertebrates in Eastern Canada. *Environmental DNA* 2:373–386. https://doi.org/10.1002/ edn3.89

Karlsson E, Ogonowski M, Sundblad G, Sundin J, Svensson O, Nousiainen I, Vasemägi A (2022). Strong positive relationships between eDNA concentrations and biomass in juvenile and adult pike (*Esox lucius*) under controlled conditions: Implications for monitoring. *Environmental DNA* 4(4): 881-893.

Manfrin C, Mirimin L, Zanetti M, Pizzul E, Giulianini PG, Pallavicini A (2022). Highly sensitive environmental DNA detection of topmouth gudgeon, *Pseudorasbora parva*: a comparison of qPCR and microfluidic qdPCR. *Biological Invasions* 24(7): 2121-2133.

Roy M, Belliveau V, Mandrak NE, Gagné N (2018). Development of environmental DNA (eDNA) methods for detecting high-risk freshwater fishes in live trade in Canada. *Biological Invasions* 20(2): 299–314. https://doi.org/10.1007/s10530-017-1532-z

Schenekar T, Schletterer M, Lecaudey LA, Weiss SJ (2020). Reference databases, primer choice, and assay sensitivity for environmental metabarcoding: Lessons learnt from a re-evaluation of an eDNA fish assessment in the Volga headwaters. *River Research and Applications* 36(7): 1004-1013.

Schrader C, Schielke A, Ellerbroek L, Johne R (2012). PCR inhibitors–occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology* 113(5): 1014-1026.

Sidstedt M, Rådström P, Hedman J (2020). PCR inhibition in qPCR, dPCR and MPS - mechanisms and solutions. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 412(9): 2009-2023.

Länsstyrelsen
i Jönköpings län