



SEANALYTICS AB

Species and Ecosystem Analyses



Övervakning av flodpärlmussla med eDNA - en pilotstudie

2019-01-08

Övervakning av flodpärlmussla med eDNA – en pilotstudie

Rapportdatum: 2019-01-08

Version: 1.2

Projektnummer: 3343

Uppdragsgivare: Länsstyrelsen i Jönköpings län

Utförare: Medins Havs och Vattenkonsulter AB
Företagsvägen 2, 435 33 Mölnlycke
Tel +46 31-338 35 40 | www.medinsab.se | Org. nr 556389-2545

SeAnalytics AB
SAMSMARKA 14
475 37 Bohus-Björkö

Författare: Per Sundberg & Martin Liungman

Medverkande: Svante Martinsson, Matthias Obst, Mårten Klinth, Thomas Dahlgren - SeAnalytics
K-M Johansson - Lst Jönköping, Niklas Wengström - Sportfiskarna

Allt bildmaterial i rapporten omfattas av © Medins Havs och Vattenkonsulter AB, om inte annat anges

Innehållsförteckning

Inledning	4
Metodik.....	5
Provtagning och filtrering av prover	5
Provtagning 2017 – Jönköpings län	5
Provtagning 2018 - Västra Götalands län	7
Filtrering	8
Analys.....	9
Primerdesign.....	9
DNA-extraktion	9
ddPCR	9
Resultat.....	10
Diskussion	12
Referenser.....	13

Inledning

I samarbete med Länsstyrelsen i Jönköping har SeAnalytics AB och Medins Havs och vattenkonsulter AB utfört en pilotstudie av hur eDNA kan användas i den akvatiska miljövervakningen. I studien analyserades vatten från ett antal vattendrag med verifierade bestånd av den rödlistade flodpärlmusslan *Margaritifera margaritifera*. Syftet var att dels utveckla en praktisk tillämpbar metod för



Flodpärlmussla.

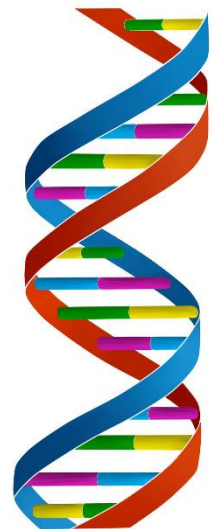
provtagning, dels att undersöka analysmetodens säkerhet med avseende på att identifiera förekomst av mussel-DNA. Vattenprover togs också i kända vattendrag där pärlmussla inte finns som ett test på metodens känslighet och risken för att få felaktiga positiva svar om förekomst.

Allmänt om eDNA

eDNA (miljö-DNA, environmental DNA) är en beteckning på de spår av arvs massa som organismer lämnar efter sig i miljön där de lever. Dessa spår av DNA är artspecifika och man kan därför i efterhand spåra vilka arter som befunnit sig på en plats. Tekniken har funnits ett tag men de praktiska tillämpningarna är fortfarande relativt få. Det finns ännu inga av myndigheter standardiserade metoder, samtidigt som tekniken utvecklas hela tiden mot billigare och snabbare analyser. Liksom andra DNA-baserade metoder för att identifiera arter, kan eDNA tekniker idag användas för att besvara två typer av frågor:

- Finns en viss art (målart) i vattendraget?
- Vilka arter finns i vattendraget?

Analysen, och de förutsättningar som krävs, är olika beroende på vilken av dessa frågor som är aktuell. Övervakning av målart(er) använder sig oftast av qPCR eller ddPCR, medan den andra frågan kräver sekvensering och ”metabarcoding”.



© B. de Groot

Metodik

Provtagning och filtrering av prover

Provtagning utfördes vid två olika tidpunkter, och i två geografiskt skilda områden. Vid den andra provtagningen användes en lite annan teknik när det gäller den molekylärbiologiska analysen (kombination av primer och artspecifik prob) som dels gjorde analysen lättare att tolka och också säkrare att verkligen "fånga upp" den eftersökta arten.

Provtagning 2017 – Jönköpings län

Under 2017 provtogs fyra vattendrag på sammanlagt 12 stationer (Figur 1 och bilaga 1). I tre vattendrag med bekräftade musselbestånd togs prover uppströms, strax nedströms samt ett par km nedströms ståndorten. I ett vattendrag utan musslor togs istället två separata prover från samma station. Utöver dessa prover genomfördes även en blank kontroll med avjoniserat RECTAPUR-vatten som fylldes i likadana provkärl som övriga prover. På varje station samlades 2 l vatten in i en aseptisk plastflaska. För att minimera risken för kontaminering användes nya engångshandskar på varje station, och vattnet samlades genom att hålla flasköppningen uppåt i strömriktningen. Ingen del av provtagare eller provkärls utsida kom därmed i kontakt med provet.



Figur 1. Provstationerna vid undersökningen av flodpärlmussla i Jönköpings län 2017. Blå lokal = kända bestånd av flodpärlmussla; röd lokal = inga kända bestånd av arten.

I samband med provtagningen vid ett bekräftat bestånd topsades även levande individer av musslor för att ha som referensprov, och för att verifiera att analysen identifierade arten. Topsning anses vara den mest skonsamma metoden för att få vävnadsprov från musslor (Karlsson et al 2013), vilket är viktigt när man hanterar känsliga arter som flodpärlmusslan.



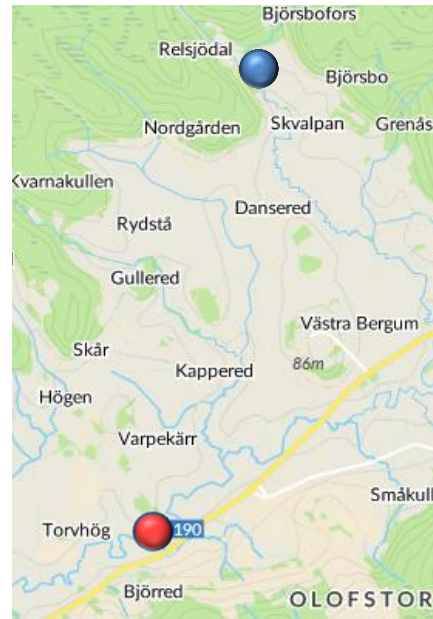
Figur 2. Provtagning och topsning av flodpärlmussla.

Provtagning 2018 - Västra Götalands län

Under 2018 togs sex prover från en å norr om Bergum (Figur 3, 4) med känt bestånd av flodpärlmussla. I samarbete med Niklas Wengström, Sportfiskarna region väst Göteborg, togs två prover från ståndorten, två 50 meter nedströms, och ytterligare två 200 meter nedströms. Prover togs med 2 liters engångskärl, och filtrerades samma dag (se nedan). Ett prov tilläts stå i fyra dagar utomhus i skugga som ett litet test av hur snabbt DNA bryts ned.

Ytterligare prov togs i Hällebäcken vid ett senare tillfälle, på en lokal där inventeringar inte har hittat flodpärlmussla och som därför kan betraktas som negativ lokal. Dessa prover filtrerades samma dag.

Vid provtagningen topsades även en mussla för positiv kontroll i ddPCR analysen.



Figur 3. Provstationerna vid undersökningen av flodpärlmussla i Västra Götalands län 2018. Blå lokal = känt bestånd av flodpärlmussla; röd lokal = inga känt bestånd av arten.



Figur 4. Lokal Bergum nära Olofstorp. Vid ståndorten

Filtrering

Ett finporigt filter användes för att fånga upp DNA-partiklar från vattenproverna. Det finns flera olika alternativ (Bohman 2018) och vi har valt Millipore Sterivex™ (porstorlek 0.22 µm) filter (Figur 5-7). Det är en fördel att själva filtret är inneslutet i en kapsel och att efterföljande DNA-extraktion kan ske inne i kapseln, eftersom detta radikalt minskar risken för korskontamination på laboratoriet. Ju mer vatten från provlokalen som kan filtreras, desto större är sannolikheten att hitta DNA från målarten. Optimalt filtreras 1 liter vatten (eller mer) genom filtret, men den slutliga volymen är i praktiken beroende på hur mycket partiklar det är i vattnet (Tabell 1).

Efter filtreringen tömdes filterkapseln på vatten, sedan tillslöts i utgångsöppningen med speciellt anpassade lock och kapseln fylldes med 95-99% etanol (Figur 6) för att förhindra nedbrytningen av DNA. Kapseln placerades slutligen i ett skyddande provrör och förvarades i -20°C i väntan på DNA extraktion och fortsatt behandling.



Figur 5. Vattenproverna filtrerades genom ett Sterivex-filter.



Figur 6. Därefter konserverades proverna med etanol.



Figur 7. Slutligen förslöts kapseln och provet lagrades i frys.

Analys

DNA-analyserna utfördes av SeAnalytics AB i nära anslutning till provtagningarna. För att påvisa förekomst av målarten flodpärlmussla användes ddPCR (droplet digital PCR, ©BioRad), en teknik som jämfört med det mer använda qPCR är känsligare och lättare att tolka och kvantifiera. En utförlig beskrivning av tekniken, inklusive extraktion av DNA direkt från filtren beskriv i detalj i Bohman et al. (2018) och nedan ges bara huvuddragen i analysgången.

Primerdesign

För att kunna nyttja ddPCR för att upptäcka målarten krävs artspecifika primerpar som hjälper till att kopiera flodpärlmusslans DNA från vattenproverna. Vi utgick från publicerade COI-sekvenser för arten och designade det artspecifika primerparet i enlighet med primertillverkarens rekommendationer. När det gäller proverna från Bergum/Olofstorp designades dessutom en probsekvens som ligger mellan de två primer-sekvenserna (också i enlighet med tillverkarens rekommendationer). Fördelen med att använda en prob i kombination med primerparet är att artspecifiteten ytterligare ökar. Det blir därmed en bättre relation mellan brus och signal, vilket innebär att resultaten blir lättare att tolka.

DNA-extraktion

DNA extraherades direkt från filtret med ett kommersiellt kit ”DNeasy Power-Water Sterivex Kit” (Qiagen). Mängden extraherat DNA mättes med Qubit fluorometer som mäter den totala mängden DNA (dvs. även icke-målarts-DNA).

ddPCR

Vid PCR används temperatur och enzymer i repeterande cykler för att masskopiera specifika delar av DNA. Tack vare det tidigare designade och artspecifika primerparet kopieras då endast målartens DNA och inte andra arters DNA som kan finnas i vattenprovet. Vi har använt ddPCR (©BioRad), en teknik som bygger på många tekniska replikat från ett DNA-prov (ca 20 000 droppar). I varje droppe sker sedan en PCR-reaktion. Genom att antalet falska negativa fel minskar erhålls en förbättrad noggrannhet samtidigt som den statistiska sannolikheten att hitta spår av arten förbättras. Varje prov delas upp i fyra replikat i analysen vilket medför att antalet tekniska replikat ökade per biologiskt prov med upp till cirka 80 000 droppar (4 x 20 000).

Innan ddPCR-analysen kontrollerades primerparets specificitet och PCR:n optimerades baserat på DNA från topsade musslor.

Resultat

En sammanställning av resultaten från analyserna redovisas i Tabell 1. På grund av negativa resultat från första provomgången när det gäller Emån kompletterades proverna med ytterligare prover vid två senare tillfällen (se Diskussion). Resultaten visade att tekniken fungerade, men att svaren varierade i styrka. Analysen av Bergumproverna visade att kombinationen primer-prob gav ett tydligare svar som dessutom var lättare att tolka. Vår slutsats är att kombinationen eDNA och ddPCR fungerar för att påvisa flodpärlmussla men att provtagningen måste optimeras för att minska risken för falska negativa resultat.

Tabell 1. eDNA resultat från provtagningarna 2017 och 2018

Förklaring: Minustecken = ingen signal dvs inga spår av målarten, plustecken = signal dvs målarten har detekterats (flera plus betyder starkare signal)

Datum	Lokal	Provtagare	Filtrerad volym (l)	Resultat	Kommentar	Analysmetod
170215	Hökesån uppströms	Martin Liungman	1	-		ddPCR
170215	Hökesån ståndort	Martin Liungman	1	+++		ddPCR
170215	Hökesån nedströms	Martin Liungman	0.5	++		ddPCR
170215	Hornån uppströms	Martin Liungman	0.5	+	Svag signal, oväntat resultat	ddPCR
170215	Hornån ståndort	Martin Liungman	0.3	++		ddPCR
170215	Hornån nedströms	Martin Liungman	0.4	-	Oväntat resultat	ddPCR
170215	Emån uppströms	Martin Liungman	1	-		ddPCR
170215	Emån ståndort	Martin Liungman	1	-	Oväntat resultat	ddPCR
170215	Emån nedströms	Martin Liungman	1	-	Oväntat resultat	ddPCR
171009	Emån ståndort	Martin Liungman	0,7	++	Nya prover + erfarnare utvärdering	ddPCR
171009	Emån nedströms	Martin Liungman	0,7	++	Nya prover + erfarnare utvärdering	ddPCR
171103	Emån ståndort	Per Sundberg/Matthias	0.5	++	Nya prover + erfarnare utvärdering	ddPCR
171103	Emån ståndort	Per Sundberg/Matthias	0.5	++	Nya prover + erfarnare utvärdering	ddPCR
171103	Emån nedströms	Per Sundberg/Matthias	0.6	++	Nya prover + erfarnare utvärdering	ddPCR
171103	Emån nedströms	Per Sundberg/Matthias	0.6	++	Nya prover + erfarnare utvärdering	ddPCR
170215	Negativ lokal Tabergsån/Bårarp1	Martin Liungman	0.7	-	flodpärlmussla har inte observerats på lokalen	ddPCR
170215	Negativ lokal Tabergsån/Bårarp1	Martin Liungman	0.5	-	flodpärlmussla har inte observerats på lokalen	ddPCR
170215	Destillerat vatten	Martin Liungman	1	-		ddPCR
180504	Bergum topsad mussla (positivkontroll)	Per Sundberg		+++		ddPCR+probsekvens
180504	Bergum ståndort	Per Sundberg	0.75	++		ddPCR+probsekvens
180504	Bergum ståndort	Per Sundberg	0.70	+		ddPCR+probsekvens
180504	Bergum ståndort (sammanslaget prov)	Per Sundberg	0.75	++		ddPCR+probsekvens
180504	Bergum 50 m nedströms ståndort	Per Sundberg	0.75	+++		ddPCR+probsekvens
180504	Bergum 50 m nedströms ståndort	Per Sundberg	0.70	+++		ddPCR+probsekvens
180504	Bergum200 m nedströms ståndort	Per Sundberg	0.80	++		ddPCR+probsekvens
180504	Bergum200 m nedströms ståndort	Per Sundberg	0.80	+		ddPCR+probsekvens
180509	Bergum ståndort	Per Sundberg	0.45	-	provet har stått 4 dagar	ddPCR+probsekvens
180525	Olofstorp negativ lokal	Per Sundberg	0.30 + 0.30	-	flodpärlmussla har inte observerats på lokalen	ddPCR+probsekvens

Diskussion

Våra resultat visar att eDNA är en teknik som kan användas för att spåra och övervaka förekomst av flodpärlmussla, och därigenom går det att på ett mer kostnadseffektivt sätt ta fler prover och täcka större områden jämfört med traditionella metoder. Det negativa resultatet från första provomgången i Emån är något förvånande med tanke på att det med säkerhet finns ett bestånd av musslor där prover tagits. Vid provtagningen i november samma år vid ståndorten fick vi ett klart positivt resultat (Tabell 1). Vi har ingen klar uppfattning varför det inte gick att påvisa arten vid första försöket. Emellertid har detta varit en pilotstudie och många av momenten (både provtagning och vidare analyser) var nya i början vilket kan ha medfört olika typer av handhavandefel. Vi såg också att analyserna gav ett tydligare svar när vi gick över till primer+prob, vilket vi också nu rekommenderar vid fortsatt provtagning.

Det är viktigt att provtagningen optimeras på ett sätt så att risken för att missa en målart minimeras. Det skall samtidigt betonas att detta är en "finns/finns inte"-analys och chansen att träffa på målartens DNA beror på flera olika faktorer. Det går därför inte att utesluta att vissa prover kommer att vara negativa trots att arten finns i vattendraget. Det räcker dock med att några prover är positiva för att påvisa arten. Det går inte att dra slutsatsen att arten saknas i området för att några prov är negativa om det samtidigt finns positiva provsvar. Tekniken är så känslig att det är svårt att förklara positiva svar med annat än att målarten är närvarande, men det kan finnas många förklaringar till ett negativt svar.

eDNA-metodik (Bohman 2018; Taberlet et al. 2018) tillför utan tvivel delar till miljöövervakningen som dagens traditionella metoder har svårare att lyckas med. Metodiken är mycket noggrann och kan därför upptäcka arter i ett vatten med enbart några fåtal individer. Dessutom innebär eDNA-analyser ett enklare provtagningsförfarande samt en mindre invasiv provtagning i och med att inga organismer behöver avlivas under analysen. Exempelvis vid traditionell provfiskemetodik fångas stora mängder fisk, som sedan måste avlivas eller rent utav självdör. Om eDNA kan användas mer frekvent vid provfiske skulle därför det stora antal fiskar som avlivas kunna minska väsentligt. Även möjligheten att identifiera rödlistade arter utan att skada dessa är ett argument för eDNA-analyser.

Denna undersökning visade att metoden redan idag enkelt och effektivt kan nyttjas vid specifika frågeställningar, såsom vid sökande efter så kallade målarter. Det enda som saknas nu är fantasi och kreativitet för att identifiera fler frågeställningar där eDNA-metoden kan utgöra ett viktigt bidrag till mer kunskap. Sedan undersökningen utfördes har tekniken utvecklats ännu mer, och det är troligt att resultaten med nuvarande teknik skulle vara ännu säkrare och billigare.

Referenser

- Bohman, P. (2018). eDNA i en droppe vatten. Vattenprovtagning av DNA från fisk, kräftor och musslor – en kunskapssammanställning. Aqua reports 2018:18. Institutionen för akvatiska resurser, Sveriges lantbruksuniversitet, Drottningholm Lysekil Öregrund. 184 s.
- Bohman, P, Sundberg, P., Klinth, M.& Obst, M. 2018. Jakten på solabborren (*Lepomis gibbosus*). En eDNA-studie i Kungsbackaån. Aqua reports 2018:21. Institutionen för akvatiska resurser, Sveriges lantbruksuniversitet, Drottningholm Lysekil Öregrund. 44 s.
- Karlsson, S., Mejdell Larsen, B., Eriksen, L. & Hagen, M. 2013. Four methods of non-destructive DNA sampling from freshwater pearl mussels *Margaritifera margaritifera* L. (*Bivalvia:Unionoida*). *Freshwater Science*, 2013, 32(2):525–530.
- Taberlet, P., Bonin, A., Zinger, L. & Coissac, E. (2018). *Environmental DNA for biodiversity research and monitoring*. Oxford University Press, New York 253 pp.