



Aqua reports 2018:18

eDNA i en droppe vatten

Vattenprovtagning av DNA från fisk, kräftor och musslor
– en kunskapssammanställning

Patrik Bohman



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Department of Aquatic Resources

eDNA i en droppe vatten

Vattenprovtagning av DNA från fisk, kräftor och musslor – en kunskapssammanställning

Patrik Bohman

Sveriges lantbruksuniversitet, Institutionen för akvatiska resurser,
Stångholmsvägen 2, 178 93 Drottningholm

september 2018

Aqua reports 2018:18

ISBN: 978-91-576-9594-9 (elektronisk version)

E-post till ansvarig författare:

patrik.bohman@slu.se

Rapportens innehåll har granskats av:

Ann-Britt Florin, **Sveriges lantbruksuniversitet**, Institutionen för akvatiska resurser

Kerstin Holmgren, **Sveriges lantbruksuniversitet**, Institutionen för akvatiska resurser

Vid citering uppge:

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.

Nyckelord:

eDNA, miljöDNA, metabarcoding, fisk, kräftor, musslor, PCR, sekvensering

Rapporten kan laddas ned från:

<http://pub.epsilon.slu.se/>

Uppdragsgivare och finansär:

SLU, Forska Utan Djurförsök

Chefredaktör:

Noél Holmgren, prefekt, institutionen för akvatiska resurser, Lysekil

Framsida: Provtagning av eDNA. Foto: Patrik Bohman

Förord

Tanken med denna rapport var från början enbart att redovisa våra erfarenheter att driva eDNA-projekt och att applicera metodiken inom miljöövervakning. Under tiden vi drev projektet kom det många frågor från personer som ville starta upp olika typer av eDNA-projekt, men inte riktigt visste hur de skulle göra. Så vi beslöt att även inkludera en beskrivning över hur du praktiskt kan göra för att spåra fisk, kräftor och musslor i sötvatten med hjälp av vattenprover.

Det är mycket att tänka på för att få ett eDNA-projekt att gå i lås, men vi kan inte blunda inför att denna teknik är här för att stanna. En del hävdar att eDNA endast kan utföras av experter inom specialiserade företag eller vid universitet. Denna rapport visar att så inte är fallet. DNA-metodiken är till viss del ganska enkel att utföra, men du måste tänka på att utföra metoderna strikt enligt speciella ”protokoll”, dvs. du följer en handledning. Sedan går det bra att köpa olika tjänster av företag eller vid universitet, t.ex. för att utföra vissa laboratorieanalyser eller tolka resultat.

Idag är många intresserade av att använda eDNA-teknik inom miljöövervakningen, t.ex. vid biodiversitetsundersökningar eller vid övervakning av främmande eller sällsynta arter. Det är ju inte så konstigt eftersom det i slutändan handlar om hur vi allt effektivare, snabbare och billigare kan "ta tempen" på naturen och föreslå kostnadseffektiva handlingsplaner.

Eftersom DNA-tekniken utvecklas så pass snabbt så är det möjligt att denna rapport kommer att vara föråldrad inom några år. Under denna föränderliga tid är det viktigt att vi använder eDNA på rätt sätt. Därför beskriver rapporten även hur vi stegvis kan lära oss att granska processen kritiskt, från hur vi ställer rätt vetenskapliga frågor, genomför fältarbetet, hanterar våra prover och kontaktar ett ackrediterat laboratorium som sedan genomför analyser för att matcha proverna till rätt arter. Genom att vi själva sätter oss in i alla olika delsteg kan vi också ställa krav på de utförare som idag är mindre professionella eller hanterar eDNA på ett icke vetenskapligt sätt. Lär vi oss ställa krav får vi också en starkare kontroll över arbetet, vilket leder till en förbättrad styrning av hela projektet.

Vi hoppas att denna rapport kan öka förståelsen för eDNA-metodikens möjligheter och begränsningar inom miljöövervakningen. Vi hoppas också att DNA-tekniken kommer att sprida sig till många utförare, så att utvecklingen både kan förbättras och vidareutvecklas av allt fler. Genom samarbete mellan

myndigheter, forskare, beställare och utförare – både inom privat och offentlig sektor – kan vi komma långt. Men detta kräver också att vi är öppna med våra data, så att utförda studier kontinuerligt kan granskas och förbättras.

Patrik Bohman, projektledare, institutionen för akvatiska resurser (SLU Aqua)

Prof. Erik Petersson, institutionen för akvatiska resurser (SLU Aqua)



Figur 1. eDNA kan provtas i alla typer av miljöer. I denna rapport skriver vi enbart om provtagning i sötvatten. Bilden är från eDNA-provtagning i Svennevadsån 2014 (foto: Patrik Bohman, SLU).

Sammanfattning

eDNA (miljö-DNA) är den ”cocktail” av alla organismers DNA som du kan hitta runt om i miljön, i luft, jord eller vatten. I vatten kan du t.ex. förvänta dig att de arter som lever i en sjö lämnar olika spår i form av DNA. Det kan röra sig om ägg, spermier, larver, slem, fjäll, avföring, hudfragment eller annan död vävnad. Genom att ta vattenprover så fångar du upp dessa DNA-spår och kan därmed identifiera vilka arter som förekommer på platsen. Denna möjlighet, att identifiera arter från i stort sett vilken miljö som helst, öppnar upp för oanade möjligheter inom miljöövervakningen. Utvecklingen inom DNA-tekniken har gått utomordentligt snabbt de senaste åren. Alltifrån 2008, då studier av eDNA i vattenprover för första gången applicerades på invasiva arter, har intresset för denna typ av metodik ökat i stort sett exponentiellt. Detta har inneburit delvis sänkta kostnader och en allt mer omfattande användning och utveckling av eDNA-metoder. eDNA kan därför tillföra delar till miljöövervakningen som dagens traditionella metoder har svårare att lyckas med. Metoderna är mycket noggranna och kan upptäcka arter i ett vatten med enbart några fåtal individer. Olika metodik används beroende på om enskilda arter eller hela samhällen studeras. eDNA-metodik ger precisa artbestämningar av annars mycket svårbestämda livsstadier och arter. Den är icke-förstörande och därmed bra för svårinventerade eller känsliga miljöer. Den passar bra för kostnadseffektiva och heltäckande inventeringar, även om slutkostnaderna för eDNA-undersökningar kan diskuteras.

Trots alla dessa möjligheter, svarar inte eDNA på alla frågor. eDNA säger t.ex. ingenting om beståndens längd- eller könsfördelning, skador eller hälsostatus. Det är dessutom svårt att beräkna beståndens biomassa, antal eller storlek i förhållande till den mängd eDNA som finns i dina vattenprover. eDNA säger heller ingenting om varifrån ditt målarts-DNA kommer, hur långt det har färdats eller om det handlar om döda eller levande individer. Du kan inte heller upptäcka hybrider eller skilja olika individer av samma art i din eDNA-analys. Men med resultat från eDNA-analys kan värdefulla och kompletterande data till dagens miljöövervakning erhållas.

Själva processen för planering och genomförande (av provtagning och laboratorieanalyser) är i vissa delar lik de traditionella metoderna inom miljöövervakningen. Men eDNA-undersökningar skiljer sig markant från dessa typer av provtagningar genom att de bl.a. kräver en helt ny typ av hantering av fält- och laboratorierutiner. Detta beror bl.a. på att föroreningar från externt DNA (även i mycket små mängder) kraftigt påverkar slutresultatet. Det är därför viktigt att inkludera kontroller för att kunna styrka var i metodkedjan

som en eventuell kontamination eller bias har uppkommit. Dessutom syns inte vad som fångas i proverna, vilket innebär att verifieringen av resultaten måste ske *efter* färdig provtagning och laboratorieanalys. Det innebär att det ibland kan kännas svårt att hänga med i metodkedjan från provtagning, via laboratorieanalyser till verifiering av resultat.

Idag finns kraftiga påtryckningar för att använda eDNA som metod inom miljöövervakningen. Mängder av vetenskapliga artiklar publiceras i ämnet och många företag har börjat specialisera sig på att utföra eDNA-provtagningar och analyser. Men, då ingen standard finns och eDNA-metoderna varierar så mycket, är det svårt att finna enhetlighet vid tolkning av resultat. Kvaliteten varierar dessutom vid rapporteringen, och en del undersökningar saknar underlag för att vetenskapligt kunna bedömas. När allt fler vill inkorporera eDNA-undersökningar inom miljöövervakningen så uppkommer följande grundproblem:

1) Vissa utförare lovar mer än vad som är möjligt att uppnå med eDNA. Dessutom saknas ibland transparens i undersökningarna, vilket gör det svårt att bedöma resultaten.

2) Beställare, myndigheter & finansiärer förlitar sig i nuläget på vad utförare lovar, men de vet inte riktigt hur de ska bedöma metodernas noggrannhet.

En möjlig väg framåt är därför att kalla samman oberoende experter, myndigheter & finansiärer för att definiera kvalitetsstandarder. Sedan bör samma processer genomföras som för andra kontrakt, dvs. man låter oberoende laboratorier analysera samma prover och göra en jämförelse för att se hur pass robusta och replikerbara metoderna är.

Summary

eDNA (environmental DNA) is a mixture of DNA from all organisms you will find around the environment, in air, soil or water. In water you can expect that species living in a lake leave different traces in the form of DNA, e.g. eggs/larvae, sperm, mucus, scales, faeces, skin fragments or carcass. By taking water samples, you can capture these DNA tracks and thus identify which species are present on the site. This possibility, identifying species from virtually any environment, opens up for interesting opportunities within environmental monitoring. DNA technology has developed extraordinarily fast in recent years. Since 2008, when the first studies of eDNA in water samples were applied to invasive species, the interest for this type of methodology has increased nearly exponentially. This has resulted in partially reduced costs, more extensive use and further development of eDNA methods. The eDNA methodology can therefore add other elements to environmental monitoring, which traditional methods are lacking. eDNA methods are very accurate and can detect species in a lake with only a few individuals. Different methodology are used for single species detection and analysis on community level (metabarcoding). eDNA methodology provides precise determinations of otherwise very cryptic life stages and species. It is non-destructive and is therefore a good choice for sensitive species and environments. It also fits well for cost effective and comprehensive surveys, although the final costs can be discussed.

Despite all of these possibilities, eDNA leaves several questions unanswered. eDNA doesn't reveal a population's length or gender distribution, injuries or health status. It is difficult to calculate the stock biomass, numbers or sizes in relation to the amount of eDNA present in water samples. Also, eDNA gives no information about where your source DNA comes from, how far it has traveled, or whether it originates from dead or living individuals. You cannot detect hybrids or closely related individuals in your eDNA analysis. eDNA, however, provides us with valuable and complementary data in today's environmental monitoring.

The process of planning and implementation (for sampling and lab analyses) is in some respects similar to traditional methods in environmental monitoring. Nevertheless, eDNA surveys differ significantly in the execution of field and laboratory routines. This is due to the fact that pollutants from external DNA strongly affect the final results (even in very small amounts). It is therefore important to include controls to check where in the method-chain a possible contamination or bias has occurred. In addition, we cannot see what

we capture in our samples, which means that verification of our results must be done *after* we have completed both field sampling and lab analysis. Therefore, it can sometimes be difficult to understand the different steps, from field sampling via lab work to final verification of the results. It may feel like you are blindfolded when doing these kind of surveys.

Today, serious efforts are being made to use eDNA as a method in environmental monitoring. Numerous scientific articles are published on the subject and many companies have begun to specialize in performing eDNA sampling and analysis. However, since no eDNA-standard yet exists and the different methods vary so much, it is difficult to find consistency when interpreting results from eDNA surveys. The quality also varies considerably in the reporting, and many studies may lack the possibility of scientific assessment.

As more and more people want to incorporate eDNA surveys in environmental monitoring, the following basic problems arise:

- 1) Some performers promise more than what is possible to achieve with eDNA. In addition, there are sometimes no transparency in the surveys, which makes the results difficult to assess.

- 2) Stakeholders, authorities and financiers are currently dependent on what the performers promise, but they may not always know how to assess the accuracy and reliability of the methods.

One possible way forward is therefore to gather independent experts, authorities and financiers to define quality standards. Then the same processes should be performed as for other contracts, which means that independent laboratories are allowed to analyze the same samples and make a comparison to see how robust and replicable the methods are.

Innehållsförteckning

| | |
|--|-----------|
| Ordlista | 10 |
| 1 Syfte och struktur | 14 |
| 1.1 Varför en rapport om eDNA? | 14 |
| 1.2 Rapportens struktur | 15 |
| 2 Fyra vanliga frågor om eDNA | 17 |
| 3 Egna erfarenheter från eDNA-projekt (2014-2016) | 20 |
| 3.1 Upptäcktarfasen | 20 |
| 3.2 Nybyggarfasen | 21 |
| 3.3 Utvecklingsfasen | 21 |
| 4 eDNA jämfört med traditionell miljöövervakning | 23 |
| 4.1 Vad är eDNA? | 23 |
| 4.2 Kort historik om eDNA | 24 |
| 4.3 Fördelar med eDNA | 24 |
| 4.4 Nackdelar med eDNA | 27 |
| 4.5 Stora utmaningar för eDNA | 30 |
| 5 Viktigt att verifiera eDNA-undersökningar | 36 |
| 6 Samarbeten för gemensamma standarder | 39 |
| 7 Att försöka förstå eDNA | 42 |
| 7.1 DNA och artidentifiering | 42 |
| 7.2 Hur uppträder DNA i vatten? | 43 |
| 7.3 Är mängd DNA = biomassa? | 47 |
| 8 Innan provtagningen | 50 |
| 8.1 Planera projektets arbetsflöde | 50 |
| 8.2 Genomför en pilotstudie | 54 |
| 8.3 Utrustningslista för fältprovtagning | 55 |
| 9 Hantering av förorening och felkällor i fält | 57 |
| 9.1 Minimera risken för kontamination | 57 |
| 9.2 Använd olika typer av kontroller | 61 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 10 | Provtagning i fält | 64 |
| 10.1 | VAR provtar du? | 65 |
| 10.2 | NÄR provtar du? | 69 |
| 10.3 | HUR provtar du? | 72 |
| 10.4 | Målarternas ekologi bestämmer | 82 |
| 10.5 | Vattnets egenskaper påverkar | 85 |
| 11 | Filtrering | 87 |
| 11.1 | Vilken typ av filter bör användas? | 87 |
| 11.2 | Hur direktfiltrerar du i fält? | 91 |
| 11.3 | Transportera prover och filtrera på laboratorium | 98 |
| 12 | Fällning av vattenprover | 101 |
| 13 | Hantering av prover och filtrat | 103 |
| 14 | Att genomföra laboratorieanalyser | 106 |
| 14.1 | Arbetsflöde för labbanalyser | 107 |
| 14.2 | Kontakta ett laboratorium | 112 |
| 15 | Hantering av förorening och felkällor på labb | 117 |
| 15.1 | Hantering av kontamination | 117 |
| 15.2 | Kontroller ger spårbarhet | 121 |
| 16 | Artidentifiering med markörer och primers | 124 |
| 16.1 | Att välja genetisk markör | 124 |
| 16.2 | Primerdesign: att finna rätt arter | 127 |
| 17 | DNA-extraktion | 132 |
| 17.1 | Homogenisering av prover? | 132 |
| 17.2 | Färdiga extraktionskit | 133 |
| 17.3 | Hur genomförs en extraktion? | 135 |
| 18 | Kontrollera och kvantifiera DNA | 137 |
| 19 | Förberedelser inför PCR | 140 |
| 20 | PCR | 142 |
| 20.1 | Hur går PCR till? | 142 |
| 20.2 | qPCR: kvantifierar och ökar specificiteten | 146 |
| 20.3 | ddPCR: förbättrad precision | 147 |
| 20.4 | PCR multiplexing analyserar fler arter | 148 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 21 | Förberedelser inför sekvensering | 149 |
| 22 | Sekvensering | 151 |
| 23 | Bioinformatik: att tolka resultat | 153 |
| 24 | Slutlig utvärdering av resultat | 158 |
| 25 | Lagring av prover och data | 159 |
| 26 | Barcodingbibliotek | 161 |
| 27 | Med eDNA in i framtiden | 163 |
| 28 | Kostnader för eDNA-undersökningar | 165 |
| | Referenslista | 170 |
| | Tack | 184 |

Ordlista

| | |
|---------------------------|--|
| Adaptor | Korta nukleotid-”svansar” som behövs för att märka upp prover inför Illumina-sekvensering. |
| Amplifiering | Att kopiera (mångfaldiga) en DNA-sekvens i ditt prov med hjälp av PCR (se PCR). |
| Amplikon | De miljontals nya DNA-fragment som nytillverkas vid PCR (templetet amplifieras till amplikon). |
| Barcoding | Används ofta synonymt med ”DNA-streckkodning”. Det är ett sätt att identifiera från vilken art DNA:t i ett prov kommer. |
| Barcodingbibliotek | Stora referensdatabaser som lagrar olika organismers sekvenseringsdata (streckkoder). |
| Baspar | Den genetiska kodens byggstenar, som består av komplementära nukleotider som fäster vid varandra för att bygga upp DNA-spiralens två strängar (T-A, C-G, A-T, G-C...). |
| Bioinformatik | Metoder och mjukvaror för analys av biologiska data med hjälp av biologi, matematik, statistik och datavetenskap. |
| Buffert | Kemisk lösning med ett visst pH-värde, som ofta används för att bevara, extrahera eller rena DNA. |
| Chimär | Oönskad PCR-artefakt som utgörs av två eller fler kombinerade sekvenser. Chimärer kan störa PCR och minska möjligheten till korrekta beräkningar. |
| cp-DNA | Hos växter finns ytterligare en typ av DNA i kloroplaster, kloroplast-DNA (cpDNA). För växter finns de vanliga streckkodsmarkörerna (matK, rbcL trnL etc) i kloroplast-DNA. |
| ddPCR | Står för ”droplet digital” PCR, och är en noggrann PCR-metod som tillverkar väldigt många tekniska replikat från ett DNA-prov. Det innebär att noggrannheten ökas samtidigt som falska negativa fel jämnas ut. |

| | |
|-----------------------------|---|
| DNA | Deoxyribonukleinsyra. Den ena av två former av nukleinsyra (den andra formen är RNA). DNA består av två komplementära kedjor av nukleotider som binds till en dubbelhelix-spiral) som finns i levande celler. Det genetiska materialet för allt liv. |
| DNA-polymeras | Ett DNA-enzym som används för att bygga upp DNA-helixen vid replikering. |
| eDNA | Från eng environmental DNA. Kan översättas till miljö-DNA på svenska. eDNA definieras som ”genetiskt material erhållet direkt från miljöprover (jord, sediment, vatten etc.) utan några uppenbara tecken på biologiskt källmaterial” av (Thomsen & Willerslev 2015). |
| EDTA | Etylendiamintetraättiksyra är en svag syra som ofta används för att bevara och extrahera DNA. |
| Eluera | Det sista laborativa steget vid extraktion för att få ut det renade DNA:t, som samlas i ett provrör. |
| Eppendorfrör | Små provrör (0,5–2 ml) som bl.a. används vid centrifugering och extraktion av DNA |
| Extraktion | En process där en optimerad mängd DNA utvinns från miljö- eller vävnadsprover. |
| Filterkapsel | Ett filter som innesluts i en plastbehållare för att minska kontamination. |
| Fylogenetik | Område inom genetik som studerar den evolutionära historien och relationerna mellan individer eller grupper av organismer (t ex arter eller populationer). |
| Fällning | Ett sätt att rena DNA i vattenprover. |
| Gel-elektrofores | Metod som används efter PCR för att storleksseparera och kontrollera att amplifieringen fungerat. Färgämnen binds först till DNA:t som sedan placeras i en gel. När gelen utsätts för ett elektriskt fält, förflyttar sig DNA-fragment olika långt beroende på deras storlek. Efter detta steg kan DNA-fragmenten iaktas som band i gelen då man belyser den med ett UV-ljus. |
| Humusämnen | Organiska ämnen som bildas vid nedbrytning av biologiskt material. Ger ofta vattnet en brunaktig färg. |
| Illumina MiSeq | Sekvenseringsmaskin som läser sekvenser vid flerartsanalyser. |
| Inhibitor/inhibering | Ett ämne (t.ex. humus, urea, metalljoner, salter) som hämmar PCR-reaktionen, och därmed amplifieringen av målarternas-DNA. |
| Kluster | Används inom sekvensering för att separera OTU:s, vilka ofta ses som separata arter, släkten eller familjer beroende på val av upplösning. |
| Kontamination | Förorening av något slag, ofta bestående av DNA från andra organismer än målarterna. |
| Kryptisk art | En art som antingen är svår att hitta i naturen eller vars utseende gör den svår att skilja från andra arter. |

| | |
|--------------------------|--|
| Lysera | Celler behandlas med värme och enzymer, så att cellerna går sönder och släpper ifrån sig mer DNA. |
| Markör | Den DNA-sekvens som studeras vid en viss analys. Vid eDNA-analyser handlar det i regel om mitokondriellt DNA (mtDNA). |
| Metabarcoding | Likställs ofta med ”flerartsanalys”, dvs. möjligheten att kunna identifiera många arter med hjälp av deras sekvenser. |
| mtDNA | DNA i organismers mitokondrier som ofta används som markörer vid eDNA-analyser. Mitokondriernas genom är skilt från DNA som kommer från cellernas kärna, och kodar därmed för andra proteiner (som används specifikt av mitokondrierna). |
| Multiplex | Den process där många olika primers blandas och behandlas på samma gång. Det innebär att flera arter kan analyseras samtidigt, vilket sparar tid och reagenser. |
| Målart/målarter | Den art eller grupp av arter som man koncentrerar sig på att finna under sin eDNA-undersökning. |
| Negativ kontroll | Ett sätt att kontrollera validitet, kontamination och bias vid fält- och laboriearbete. Prov utan målarts-DNA (t.ex. destillerat vatten eller naturvatten) får genomgå samma procedurer som andra prover (filtrering, provhantering, extraktion, PCR etc.). Påvisas DNA i negativa kontroller indikerar det också att andra prov är kontaminerade. |
| NGS | Next Generation Sequencing. Används ofta inom eDNA för att beskriva en teknik som möjliggör läsningen av allt DNA i ett prov, oavsett om det kommer från flera olika organismer. |
| Oligonukleotid | En kort syntetisk och enkelsträngad DNA-molekyl. |
| OTU | Står för “Operational Taxonomic Units”. OTU används vid sekvensering för att separera unika enheter, som ofta betraktas som separata arter, då avståndet till andra kluster är tillräckligt stort. |
| PCR | Polymerase chain reaction. En metod som använder temperatur och enzymer i repeterbara cykler för att masskopiera specifika delar av DNA. |
| PCR-cykel | En PCR-cykel består av denaturering, hybridisering och förlängning. Antalet cykler beror på provets karaktär (t.ex. vävnad, sediment, jord eller vatten). Vattenprover innehåller ofta mycket lite DNA, och ofta behöver ca 40 cykler köras för att tillräckligt med DNA ska kopieras. |
| Peristaltisk pump | En pump som använder sig av slangar för att pumpa vätska med hjälp av tryck. |
| Pipelines | De dataprogram & dataplattformar som behövs för att kunna genomföra eDNA-analyser. |
| Pooling | Sammanblandning av t.ex. flera olika biologiska replikat till ett enda prov. |
| Positiv kontroll | Ett sätt att kontrollera validitet och bias vid fält- och laboriearbete. Du tillför en känd mängd DNA av en specifik art, ofta en exotisk art som inte |

kan förekomma vid din provtagning, men som kan amplifieras av dina designade primers, t.ex. 12S vid flerartsanalys. Får du inget resultat (amplifiering) av det tillsatta DNA:t så är något i processen felaktigt och du måste stega tillbaka.

| | |
|-----------------------------|---|
| Primer | En kort enkelsträngad DNA-sekvens som används för att bestämma vilket DNA som ska amplifieras vid PCR. Primers förekommer i par och fäster i varsin ända av en enkel DNA-sträng (3' och 5' ändarna). De framställs syntetiskt för att passa till utvalda DNA-sekvenser. Primers kan vara specifik (för en art), eller universell (för flera arter). Universella primers används vid flerartsanalyser. |
| Primer dimer | En felaktighet som kan uppkomma vid PCR, då en primer fäster vid en annan primer istället för vid rätt målarts-DNA. Detta påverkar ofta hela PCR-reaktionen eftersom färre amplikon tillverkas. Vid qPCR kan primer dimers störa en korrekt kvantifiering. |
| Prob | En märkt oligonukleotid (s.k. fluorophore) som identifierar och fäster vid komplementära eller homologa molekyler. Används vid qPCR och ddPCR, vilket ökar noggrannheten och kvantifieringsmöjligheterna. |
| Protokoll | En manual som förklarar hur en viss metod utförs, t.ex. DNA-extraktion med DNeasy Blood and Tissue kit. |
| qPCR | Står för "kvantitativ" PCR. Metoden kvantifierar DNA mer noggrant än traditionell (endpoint) PCR. |
| Replikat | Två eller fler upprepningar (delprov). Biologiska replikat är detsamma som delprov, och flera biologiska replikat kan öka chanserna att fånga målarts-DNA. Tekniska replikat används för att kontrollera att man får lika resultat vid körningar med PCR och sekvensering. |
| Replikering | Kopiering av DNA vid PCR. |
| Sekvensering | Vid DNA-sekvensering bestäms ordningen av nukleotider för en specifik DNA-sekvens. Det finns många olika metoder inom sekvenseringen, t.ex. Sanger sekvensering eller pyrosekvensering. |
| Sekvenseringsläsning | Sekvenseringsmaskinen läser sekvensen från en enda DNA-molekyl. Läsningen upprepas för samliga molekyler som ska sekvenseras, och en sekvensering kan generera miljontals läsningar. |
| Singleton | En enskild sekvens eller OTU som läses vid sekvenseringen. Betraktas som en felaktighet. |
| Templat | Den ursprungliga mängd av DNA som används som grund för att kopiera upp många likadana DNA-strängar vid PCR (templetet amplifieras till amplikon). |

1 Rapportens syfte och struktur

1.1 Varför en rapport om eDNA?

Syftet med denna rapport är att beskriva möjligheter att spåra fisk, kräftor och musslor i *sötvatten* med hjälp av *vattenprover*. Anledningen till varför rapporten överhuvudtaget kom till är flera:

1) Projektet ”Fisk, kräftor och musslor som eDNA” var en del i en satsning på framtida och innovativa metoder inom den fortlöpande miljöövervakningen (FOMA; Fig. 1 och 2). Det är viktigt att redovisa våra resultat, och att försöka beskriva den snåriga väg som lett fram till intressanta slutsatser inom projektet. Normalt brukar inte de mer negativa sidorna av projekt redovisas, men i detta fall är det viktigt eftersom vi annars kommer att få svårt att förstå hur eDNA-metodiken fungerar praktiskt. Centrum för genetisk identifiering vid Naturhistoriska riksmuseet hjälpte oss med det laborativa arbetet.

2) Det saknas idag en svensk övergripande handledning som beskriver vad eDNA är och hur det kan användas inom miljöövervakningen. En viktig uppgift med denna rapport är därför att på ett enkelt sätt redovisa vad som krävs för att kunna analysera DNA från vattenprover. Det är viktigt att först förstå principen bakom din eDNA-undersökning. Sedan kan metodik väljas utifrån detta. Rapporten ger rekommendationer för hur sådana val kan göras.

3) Myndigheter, allmänhet och privata företag har ställt många frågor till oss på SLU Aqua om hur eDNA fungerar, hur provtagningen går till, hur pass säkra metoderna är, och om metodiken snart kommer att ersätta traditionell miljöövervakning (t.ex. provfiske). Vi tror att denna skrift ska ge svar på de flesta av dessa frågor, och förhoppningsvis skapa ett intresse att söka sig vidare till mer djupgående litteratur inom ämnet. Tanken med denna rapport är därför också att påvisa var stora brister finns och var mer forskning behövs.

4) Idag utförs eDNA-undersökningar med en mängd olika metoder. Eftersom så många forskargrupper använder så olika metodik, kan det verka mycket förvirrande att välja metod utifrån olika vetenskapliga studier. Därför är denna rapport tänkt att vägleda dig i djungeln av beskrivna metoder. Rapporten ger också flera alternativ som du kan välja mellan när det gäller typ av provtagning, filtrering, extraktion etc. Det är ju trots allt så att många olika metoder fungerar bra.

5) Inom miljöövervakningen genomförs allt fler eDNA-undersökningar. Det finns därmed en risk att undersökningarna förlorar i kvalitet och vetenskaplig analysbarhet. Denna rapport presenterar sätt att kritiskt granska och utvärdera delar i eDNA-processen vilket är värdefullt då du driver egna eDNA-projekt eller ska anlita olika utförare.

Allt detta sammantaget har gjort att SLU Aqua vill fortsätta att sprida kunskap om eDNA. Rapporten får anses övergripande eftersom det idag inte finns några generella eller slutgiltiga metoder för hur eDNA-provtagningar och -analyser egentligen ska genomföras. Dessutom är detta ett område som snabbt utvecklas, vilket innebär att metoder som används idag ständigt förnyas och ersätts av andra med allt större precision, robusthet och bättre hanterbarhet. På EU-nivå håller arbetsgrupper på att försöka enas om standardiserade metoder, men vi är inte i mål ännu (Weigand et al. 2017; CEN 2018).

1.2 Rapportens struktur

Det går lätt att följa rapporten från inledningen då olika begrepp inom eDNA-forskningen förklaras, via de olika praktiska stegen i eDNA-processen (t.ex. experimentdesign och provtagning, filtrering och DNA-extraktion, PCR och sekvensering), sätt att verifiera eDNA-studier, till slutdiskussion om framtida användningsområden för eDNA. Det finns både praktiska och teoretiska tankar bakom denna rapport:

1) Det *praktiska* syftet är att texten ska ge handgripliga instruktioner för arbete med eDNA. Du ska kunna förstå vad det är och även kunna använda metoden, t.ex. bläddra mellan de olika stegen då du vill genomföra vattenprovtagning eller filtrering av DNA i sötvatten. Det ska påpekas att det finns betydligt fler metoder än de som redovisas i denna text, då rapporten inte har möjlighet att presentera samtliga metoder som används idag. Dessutom kan eDNA-metoder kombineras på en mängd olika sätt (t.ex. genom att använda olika provtagningsvolym, realtidsfiltrering, typer av filter, DNA-extraktionskit och PCR-metodik). Rapporten redovisar en del av SLU Aquas egna erfarenheter av eDNA-projekt och ger dessutom lite råd om de möjligheter och svårigheter som dessa nya metoder ger oss.

2) Den *teoretiska* dimensionen är att beskriva vad eDNA är, dess möjligheter och brister, samt att diskutera den senaste forskningen. Genom att förstå principerna bakom analyserna så går det lättare att välja ut rätt metoder. Ytterligare en fördel med att förstå metoderna kring eDNA är att det då blir lättare att ta fram avtal och diskutera lösningar med externa utförare/laboratorier. Det finns många delar inom eDNA där forskningen inte är helt klarlagd. Det gäller t.ex. så pass grundläggande frågor som *hur uppträder DNA i våra vatten, hur mycket DNA utsöndras, när binder DNA till partiklar, och hur följer DNA vattnets flöden?* Detta är exempel på fundamentala frågor och kan ofta vara avgörande för hur vi bör designa och planera vår eDNA-provtagning.

Ofta används uttrycket *eDNA-metodik*. Det betyder inte att endast en metod används, utan innefattar många tillgängliga metoder.

2 Fyra vanliga frågor om eDNA

Kan ett vattenprov avslöja vilka arter som finns i en sjö?

Kort svar är JA, men det beror helt och hållet på frågeställningen, samt vilka organismer du vill spåra (och hur mycket målarts-DNA du räknar med finns i vattnet). Dessutom så finns alltid risker av kontamination av externt DNA. Fisk är generellt lättare att spåra än musslor och kräftor, för att de släpper mer DNA. Att spåra fisk med hjälp av eDNA har visat sig vara mer effektivt än att fånga arter med traditionella fångstmetoder, speciellt om de är få till antalet, dessutom är metoden icke-förstörande (se Fördelar med eDNA). Idag används huvudsakligen två generella metoder: enartsanalyser (för enstaka kända arter) och flerartsanalyser för många okända arter. Vid enartsanalyser används PCR (se PCR) och vid flerartsanalyser används både PCR och sekvensering (se Sekvensering). Eftersom eDNA är på stark frammarsch finns önsknningar att integrera metoden inom miljöövervakningen. Forskare och privata aktörer har därför börjat standardisera delar av metodiken, men det finns fortfarande delar som är osäkra och måste utredas bättre (se Stora utmaningar för eDNA).

Hur genomförs en eDNA-provtagning?

Först och främst är det viktigt att du har en klar frågeställning om vad provtagningen ska leda till (se Innan provtagningen). Utifrån denna frågeställning går du vidare och bestämmer hur, var och när du ska genomföra din provtagning. För att kunna dra ekologiska slutsatser är det också viktigt att känna till arternas beteende och hur deras levnadsmönster ser ut (se Målarternas ekologi bestämmer). Ibland kan det vara bra att använda statistiska modeller för att optimera provtagningen och samtidigt erhålla så mycket DNA som möjligt från de arter du är ute efter (se Provtagning i fält). Det finns flera olika metoder som du kan använda. Du kan t.ex. samla in vatten i en-litersflaskor eller filtrera direkt i fält (se Filtrering). Provtagningsmetodiken skiljer sig från de metoder som ekologer normalt är vana vid, framförallt eftersom du vill få bort kontamination i samtliga delsteg från insamling till labbanalys. Det handlar ju trots allt om väldigt små mängder DNA som du vill kunna spåra från dina

vattenprover. För att öka precision och kontroll är det viktigt att använda replikat inom de lokaler du undersöker. Negativa (och även positiva) kontroller är viktiga för att kunna granska eventuell bias och kontamination både i fält och på labb (se Hantering av förorening och felkällor i fält; Hantering av felkällor på labb). Du behöver också ta kontakt med ett ackrediterat och pålitligt eDNA-laboratorium och diskutera om de kan utföra rätt analyser för att kunna spåra dina målarter av fisk, kräftor eller musslor från vattenprover (se Kontakta ett laboratorium).

Vad kostar en eDNA-analys?

För att reda ut vad en eDNA analys kostar måste du först och främst fundera på vad du letar efter. Är du ute efter att spåra en invasiv art i ett mindre område eller är du ute efter samtliga fiskarter i ett helt avrinningsområde? Din provtagnings- och analysmetodik anpassas till på din ursprungliga frågeställning (se Att genomföra laboratorieanalyser). Antalet provtagningar anpassas till områdets storlek. Det finns stora skillnader i prisbilden om du enbart använder qPCR eller ddPCR för några få kända arter, eller om du istället väljer att sekvensera samtliga arter (inklusive okända). Om du har behov att kvantifiera resultaten krävs ofta fler biologiska och tekniska replikat, vilket kan göra undersökningen något dyrare. Trots detta ökar normalt inte kostnaden linjärt med antalet prover inom eDNA-studier. Istället minskar kostnader *per prov* ju fler eDNA-prover du tar. Du måste även fundera på vad du själv kan utföra i projektet och vad du behöver hjälp med. Det bästa är att kontakta ett externt laboratorium som utför eDNA-analyser och diskutera direkt med dem. Det finns även tjänster att köpa när det gäller att tolka data (bioinformatik). En del företag föredrar att arbeta med helhetslösningar, dvs. de utför allt ifrån provtagning till färdig analys, inklusive tolkning av resultat och rapportskrivning. Vill du ha bättre kontroll över processen, vilket är att rekommendera, ta då ställning till vad du vill ha hjälp med i ditt projekt (se Kontakta ett laboratorium; Kostnader för eDNA-undersökningar).

Vad säger egentligen en eDNA-rapport?

Hur informativ en eDNA-rapport är beror på hur studien är genomförd, samt vilken metodik som använts. Har studien lagts upp med en optimal design kan resultaten redovisas alltmer kvantitativt, men är studien undermåligt utförd så minskar möjligheterna till att kvantifiera. eDNA-rapporter svarar på allt möjligt från vilka fiskar som finns i vattnet till mer kvantitativa slutsatser om fiskmängder och populationer. En del rapporter jämför med andra traditionella övervakningsmetoder på ett mer eller mindre nyanserat sätt. eDNA-rapporter redovisar resultat med stor variation, både när det gäller saklighet och kvantitativa slutsatser. Allt fler eDNA-rapporter kommer ut idag, vilket ökar kraven på transparent redovisning och möjlighet att vetenskapligt verifiera resultaten (se Viktigt att verifiera eDNA-undersökningar).



Figur 2. eDNA-studie av Norasjön i Södermanland 2015 (foto: Fanny Tomband, SLU).

3 Egna erfarenheter från eDNA-projekt (2014-2016)

SLU Aqua har drivit flera projekt om eDNA de senaste åren. Ett av dessa projekt handlade om att testa olika DNA-metoder för övervakning av fisk, kräftor och musslor i sötvatten (Bohman 2016). Detta projekt genomfördes mellan 2014-2016, och finansierades med FOMA-medel inom SLU. Vi samarbetade med laboratoriet Centrum för genetisk identifiering (CGI) vid Naturhistoriska riksmuseet. Inom det tre år långa projektet passerade vi flera olika faser.

3.1 Upptäcktarfasen

2014 testade vi och, baserat på tidigare publicerade artiklar, trodde nog att vi hade receptet för att upptäcka våra målarter med god träffbild. Mängden eDNA-artiklar med positiva detektions-resultat var omfattande. Forskare verkade hitta alla möjliga arter med hjälp av vattenprover. Fyra sjöar (Mälaren, Öre sjö, Norasjön och Stensjön) och två vattendrag (Svartälven och Svennevadsån) valdes ut som lokaler för fältförsöken. På samtliga lokaler var förekomster av fisk, kräftor och musslor väl kända genom tidigare inventeringar. Vattenprover togs på de olika lokalerna och på olika djup. Sammanlagt togs 10 prover per vattenobjekt (50 L/lokal), samt några 0-prover, totalt ca 70 stycken 5-litersprover. Provtagningen utfördes med Rambergsrör (djup >0,5 m) eller direkt i flaska (yta). Vi följde flera artiklars protokoll och arbetade med CGI, som är ett ackrediterat DNA-laboratorium. Resultaten från analyserna var nedslående och endast en bråkdel av förekommande arter kunde detekteras. När vi granskade arbetsflödet, så visade det sig att vi hade bristfällig kunskap om eDNA-metodiken, och det var därmed viktigt att förbättra både provtagningsrutiner och laboratorieanalyser. Vi var nu tvungna att se över fallgropar och misslyckanden för att mer metodiskt förnya vårt tillvägagångssätt (Bohman 2016).

3.2 Nybyggarfasen

2015 genomfördes pilotförsök under kontrollerade former (i akvarium), där vi tillsammans med CGI mer systematiskt testade olika eDNA-protokoll, bl.a. filtreringsteknik, DNA-extraktionsmetod och PCR-metodik. I akvariet satte vi in sju fiskarter, en kräftart och tre musselarter. Rovfiskar (gädda och abborre) separerades med en perforerad plastskiva (Fig. 3). Provtagning gjordes efter två timmar respektive 24 timmar. Resultatet visade att vi kunde detektera samtliga arter med god noggrannhet (Gyllenstrand 2016). DNA-koncentrationen från samtliga arter är förstås betydligt högre i ett akvarium än ute i naturvatten. Flera forskare vi har pratat med har också haft god träffbild i akvarier och försöksanläggningar, men senare misslyckats med att detektera arter i naturvatten. Efter att ha prövat olika markörer och genomfört pilotstudien visade det sig att protokoll från vissa amerikanska och sydeuropeiska studier inte kunde användas vid provtagning i svenska naturvatten. En av anledningarna var att svenska vatten ofta innehåller mycket organiska föreningar (humus). Detta stör PCR-processen och minskar möjligheten att upptäcka målarter (Sidstedt et al. 2015). Under 2015 togs vattenprover i samma vatten som under 2014 (fyra sjöar och två vattendrag). Vi förbättrade och modifierade våra fält- och laboratorieprotokoll jämfört med 2014. Till exempel användes en "kontaminationsfri" vattenhämtare (Limnos/Hydro-Bios) och fler replikat togs (vattnet förvarades i 2 x 1-liters flaskor). Vattenproven frystes ned efter provtagning, vilket minskade kontaminationen som uppkommer vid vakuumfiltreringen. Alla processer från filtrering till PCR genomfördes på kontaminationsfritt labb. Vattenproverna tinades i kallvattenbad, DNA extraherades med en betydligt mer effektiv extraktionsmetod än tidigare år. Resultaten förbättrades men metodiken var fortfarande inte helt optimal (Bohman 2016).

3.3 Utvecklingsfasen

2016 förbättrades vårt tillvägagångssätt avsevärt. Dels användes ny utrustning, som bättre hanterade kontamination, och dels förbättrades protokollen både i fält och på labb. Fältproverna direktfiltrerades nu med en peristaltisk pump tillsammans med filterkapslar (Sterivex 0,22 μm och 0,45 μm , samt Envirochek 1,0 μm), vilket både minskade kontaminationsrisken, underlättade provhantering, och minimerade sönderdelning av DNA. Filterkapslarna hölls frysta fram till DNA-extraktion. Vi använde mer precisa labbmetoder för specifika arter i form av qPCR, samt testades andra genetiska markörer (Bohman 2016; Gyllenstrand 2016). Processen började stabiliseras, men trots hårt arbete från våra kollegor vid CGI var vi fortfarande inte i mål. Vi fick god mängd DNA, men hade problem med att tillverka stabila bibliotek inför sekvenseringen (se Förberedelser inför sekvensering).

De tre åren av kontinuerlig utveckling inom detta eDNA-projekt visar på svårigheter att finna enkla tillvägagångssätt för att få precisa och rättvisande resultat. Det är viktigt att konstatera att många forskare som genomför eDNA-studier är skolade inom ekologiska vetenskaper och därmed måste lära sig mer om molekylärbio-logiska metoder både i fält och på labb. Idag finns det allt större kunskap inom eDNA-området, och det är en bra idé att inkludera genetiker, ekologer och bioinformatiker vid planering och genomförande av eDNA-projekt. Dessutom bör man anlita ett ackrediterat laboratorium som kan utföra labbanalyserna (se Kontakta ett laborato-rium).



Figur 3. eDNA-försök i akvarium med flera arter och organismgrupper (fisk, kräftor och musslor) vid SLU Aqua Sötvattenslaboratorium. Vänster: En perforerad plastskiva separerade rovfiskar från övriga arter (foto: Patrik Bohman, SLU).

4 eDNA jämfört med traditionell miljöövervakning

4.1 Vad är eDNA?

eDNA kommer från engelskans "environmental DNA", och kan översättas till "miljö-DNA" på svenska. Begreppet "eDNA" beskriver den cocktail av olika organismers "genetiska material som erhålls direkt från miljöprover (vatten, mark, luft etc.) utan några uppenbara tecken på biologiskt källmaterial" (definition enligt Taberlet et al. 2012). Det kan röra sig om allt ifrån levande djur eller djurdelar, till exempel ägg, spermier och larver, men även dött material som urin, avföring, slem, fiskfjäll eller fritt flytande DNA, samt mikroorganismer och växter (Fig. 4). eDNA kan tas med vattenprov, och eftersom samtliga organismers DNA är specifik går det att koppla de olika DNA-fragmenten till rätt art. Med hjälp av det eDNA som flyter omkring i våra sjöar och vattendrag kan vi alltså spåra vilka arter av fisk, musslor och kräftor som befinner sig i området.



Figur 4. Genetiskt material (DNA), i form av t.ex. urin och hudfragment, avges från fiskar och hamnar i vattnet. Tillsammans med DNA som släppts från övriga organismer kallas denna "cocktail" för eDNA. Bilden visar en smörbult utanför Ringhals i Halland 2015 (foto: Patrik Bohman, SLU).

4.2 Kort historik om eDNA

Idén om att spåra organismer via deras DNA direkt från miljöprover uppkom under senare hälften av 1980-talet. Tidigare hade forskare kommit fram till att laboratorieodlade bakteriesamhällen inte var representativa för naturliga samhällen, eftersom många arter överhuvudtaget inte kunde odlas. Därför förväntades DNA från miljöprover ge forskarna unik information om bakteriernas genetiska uppsättningar. I slutet av 90-talet och början av 2000-talet genomfördes många lyckade studier av mikroorganismers DNA i mark, is, sötvatten och marin miljö. Dessa studier har gett oss värdefull information för att öka förståelsen för dessa organismers diversitet och funktionella genetik (Thomsen & Willerslev 2015).

eDNA-metodik för att studera större organismer användes först på sedimentkärnor i början av 2000. Forskarna hittade då DNA-spår från utdöda däggdjur, fåglar och växter. Senare studerades insekter och svamp på liknande sätt från sedimentprover. Studier följde sedan från många olika miljöer, bl.a. från sjösediment, iskärnor och jordprover. Studier av makroorganismer och invasiva arter i sötvatten kom först 2008, i och med Ficetolas studie av oxgroda (*Rana catesbeiana*) i Nordamerika (Ficetola et al. 2008). Denna studie gav upphov till ett allt större växande intresse för eDNA-undersökningar i akvatiska miljöer. Fram till idag har en mängd olika lyckade undersökningar i sötvatten successivt utvecklat möjligheterna att inkludera eDNA i miljöövervakningen.

4.3 Fördelar med eDNA

Eftersom eDNA kan samlas in med ett vattenprov finns det all anledning att utveckla metodiken, framförallt pga. att provtagningen är enkel och snabb. De allra tidigaste studierna har beskrivit metodiken som enkel, precis och kostnadseffektiv (Ficetola et al. 2008), även om senare studier har nyanserat denna bild något (Goldberg et al. 2016; Deiner et al. 2017a). Flera forskargrupper har också jämfört eDNA-metodik med traditionell provtagning. eDNA-metoderna som användes uppvisade högre detektionsgrad och större kostnadseffektivitet än traditionella provtagningsmetoder (se t.ex. de 31 olika studier som finns sammanställda i Lugg et al. 2017, supplement 1). eDNA har klassats som ett av de 15 viktigaste ämnena för globalt artbevarande, och spås också bli en ”game changer” för övervakning av biodiversitet (Sutherland et al. 2013). Med tanke på den snabba utveckling som idag råder inom DNA-tekniken, så kan nya eDNA-metoder mycket väl komplettera miljöövervakning av fisk, kräfter och musslor under de närmsta åren (Fig. 5). Idag har eDNA-metoder integrerats med olika miljöövervakningsprogram för enstaka arter. Det gäller t.ex. de invasiva arterna marmorkarp (*Hypophthalmichthys nobilis*) och silverkarp (*Hypophthalmichthys molitrix*) i Mississippifloden och Stora sjöarna (USFWS 2017),

samt kräftpest (*Aphanomyces astaci*) och laxparasiten *Gyrodactylus salaris* i Norge (Vrålstad et al. 2018 och Hytterød et al. 2017). eDNA-metodik har också använts för att utvärdera utrotningsförsök av fiskarter (Dunker et al. 2016; Davison et al. 2017). På senare tid hävdar flera forskare att eDNA har samma eller till och med bättre möjligheter att bedöma ekologisk status i sjöar och vattendrag än många traditionella metoder (Hering et al. 2018; Pawlowski et al. 2018; Pont et al. 2018). Detta har att göra med att nuvarande övervakningsmetoder, t.ex. elfiske, inte heller alltid kan räkna fram arters abundans på ett kvantitativt sätt (Price et al. 2010).



Figur 5. SLU Aqua genomför traditionell miljöövervakning av fisk, kräftor & musslor (från vänster till höger: elfiske, burfiske och dykning). Foto: Magnus Kokkin, SLU (vänster och mitt), Patrik Bohman, SLU (höger).

eDNA-metodik kan utan tvivel tillföra delar till miljöövervakningen som dagens traditionella metoder har svårare att lyckas med. Här följer några exempel:

1) *Precis artbestämning*. Yngel, ägg och kryptiska arter kan vara besvärliga att artbestämma. Det kan därför bli tidskrävande och dyrt, och ibland svårt att hitta rätt taxonomisk expertis. Det kan även uppstå många felaktigheter vid morfologisk artbestämning, och ofta kan man inte bestämma ner till artnivå, utan får nöja sig med släkte eller familj (Thomsen & Willerslev 2015). Genom genetiska metoder kan en mer noggrann och objektiv identifiering göras ända ner till artnivå (Handley 2015). Dessutom kan man inom ett enda standardiserat prov, potentiellt analysera DNA från flera djursamhällen och över många taxonomiska grupper samtidigt.

2) *Sällsynta och invasiva arter*. Eftersom eDNA-metodiken kan spåra några få DNA-fragment i ett vattenprov till specifika arter, är metoden betydligt mer känslig än nuvarande traditionella metoder (Fig. 5; Lugg et al. 2017). Genom dess känslighet är eDNA ett bra sätt att spåra sällsynta arter (Laramie et al. 2015a; Thomsen et al. 2012b; Bergman et al. 2016) eller invasiva arter (Jerde et al. 2011; Takahara et al. 2013), som t.ex. svartmunnad smörbult (Fig. 6; Nevers et al. 2018; Adrian-Kalchauer & Burkhardt-Holm 2016) eller signalkräfta (Agersnap et al. 2017; Harper et al. 2018b). Få övervakningsmetoder kan tidigt upptäcka främmande arter under

deras invasionsfas. Vanligast är istället att arten upptäcks då den redan har etablerats i större antal, vilket gör motåtgärder både kostsamma och svårhanterliga (Bohman & Edsman 2013). Sällsynt förekommande arter fångas inte alls vid provfischen (NORS 2018). Vanligare arter fångas inte heller alltid på ett representativt sätt med traditionella övervakningsmetoder. Det gäller t.ex. gäddor i nätprovfischen eller simpor i elfisken (Dunker et al. 2016; NORS 2018; SERS 2018).



Figur 6. Svartmunnad smörbult är en invasiv art som är viktig att spåra innan den etablerats i svenska sötvatten (foto: Richard Gustavsson, SLU).

3) *Kostnadseffektiva & omfattande inventeringar.* Inventering av många specifika arter kräver ofta omfattande åtgång på tid och kunskap från specialutbildad expertis. Det kan t.ex. gälla dykinventeringar av stormusslors förekomst och täthet. Det är önskvärt att få ner tiden i fält och kostnaden kring inventeringar, vilket eDNA-provtagningar kan hjälpa till med. Studier har också visat att det går att inventera stora områden på kort tid och med god precision (Hänfling et al. 2016; McKelvey et al. 2016; Larson et al. 2017). Om du t.ex. vill identifiera *en eller några få arter* i ett vatten kan du med eDNA-metodik vanligtvis få svar inom några få timmar. Vill du analysera ett helt vattensystems alla fiskarter (metabarcoding) tar det lite längre tid, men är fullt möjligt (Keskin et al. 2016; Shaw et al. 2016; Valentini et al. 2016). Olika enarts- och flerartsstudier finns sammanställda i Evans & Lamberti 2018, appendix 1. Studier har också visat att allmänheten, dvs. personer som inte är utbildade biologer, kan utföra eDNA-undersökningar med gott resultat (Biggs et al. 2015; Larson et al. 2017). Sammantaget skulle detta kunna leda till

både kostnadseffektiva och heltäckande undersökningar, vilka i sin tur kan leda till effektivare och snabbare myndighetsbeslut (Kelly 2014). eDNA-analyser är dock inte alltigenom billiga, och ibland kan de till och med vara dyrare att genomföra än mer traditionella miljöövervaknings-metoder (Smart et al. 2016; Evans et al. 2017).

4) *Icke-förstörande*. eDNA samlas in genom vattenprovtagning, vilket är en icke-förstörande metod för både miljö och arter. Detta kommer att bli alltmer betydelsefullt i framtiden. Vid traditionell provfiskemetodik fångas stora mängder fisk, via t.ex. trål, ryssjor eller nät, som sedan måste avlivas eller rent utav självdör. Om eDNA kan användas mer frekvent vid provfisken skulle därför det stora antal fiskar som avlivas kunna minskas väsentligt. Om du endast vill veta förekomst (inte antal eller storlek) av olika fiskarter skulle provfiske kunna uteslutas helt och hållet.

5) *Bra för svårinventerade och känsliga miljöer*. Svårinventerade eller känsliga lokaler kan ofta inte övervakas med traditionella metoder. Det gäller till exempel djupa vattendrag med dålig sikt, hamnar (Sundberg et al. 2018a) och ballastvatten (Egan et al. 2015) eller hårt strömmande vatten (Wilcox et al. 2016) där fiske eller dykning är omöjligt, samt svårtillgängliga sjöar. I dessa miljöer kan det vara lättare att istället ta vattenprov för eDNA. Port genomförde t.ex. en eDNA-studie i ett öppet system i marin miljö och visade att det går bra att t.o.m. detektera arter som är svårbestämda vid transektdykning (Port et al. 2016).

4.4 Nackdelar med eDNA

Många vetenskapliga studier redovisar långtgående möjligheter med eDNA inom framtidens miljöövervakning (Thomsen et al. 2012b; Turner et al. 2012; Smart et al. 2015; Hänfling et al. 2016; Deiner et al. 2017a). Trots det svarar inte eDNA på alla frågor (Roussel et al. 2015; Ficetola et al. 2015, Goldberg et al. 2015; Rees et al. 2015; Taberlet et al. 2018). Flera forskare påpekar också att eDNA-metodiken behöver ytterligare förbättras och verifieras innan den införlivas med miljöövervakningens provtagningsundersökningar (Shelton et al. 2016; Evans et al. 2017; Kelly et al. 2017; Perez et al. 2017; Ulibarri et al. 2017). Här följer några exempel på vad eDNA har svårt att svara på 2018:

1) *Längd- och könsfördelning, samt hälsostatus*. eDNA matchar mot specifika arter men säger t.ex. ingenting om beståndens längd- eller könsfördelning (Fig. 7). Detta gör det omöjligt att, enbart med hjälp av eDNA, uppskatta fiskbeståndens produktion och reproduktionskapacitet (Hansen et al. 2018). Dessutom ger eDNA-tekniken inga svar på beståndens hälsostatus (t.ex. när det gäller frekvensen av skador och sjukdomar). Detta gör att traditionell och standardiserad miljöövervakning kommer att fortsätta användas ett långt tag framöver.



Figur 7. Längd, kön och hälsostatus är något som eDNA-metodiken ännu inte kan svara på. Bild på flodkräfta från ett av SLU Aquas nationella provfisken 2017 (foto: Patrik Bohman, SLU).

2) *Biomassa, antal och storleksförhållanden.* Det är svårt att idag beräkna beståndens biomassa, antal eller storlek i förhållande till den mängd eDNA som finns i vattenprover (Hansen et al. 2018). Trots detta har flera studier kunnat korrelera mängden individer från provfisken med halten eDNA i vattenprover (Thomsen et al. 2016; Wilcox et al. 2016). Kvantitativa beräkningar har mestadels gjorts i kontrollerade akvariemiljöer (t.ex. Evans et al. 2016). Forskarna har kunnat visa att DNA-halterna ökar i närvaro av fler fiskar i vattendrag (Doi et al. 2017a) och sjöar (Lacoursiere-Roussel et al. 2016b). Men innan vi direkt kan översätta antalet eDNA-kopior (eller antal sekvenseringsläsningar) till fiskbiomassa i våra sötvatten, så återstår det mycket att göra. Innan en god kvantifiering kan ske, måste flera osäkerheter utredas (se Är mängd DNA = biomassa?).

3) *Ursprung, transport och utdöda populationer.* eDNA säger ingenting om varifrån målarts-DNA:t kommer, hur långt det har färdats eller om det handlar om döda eller levande individer (se Hur uppträder DNA i vatten?). Det innebär att det finns en viss risk att DNA från arter som egentligen inte finns på provtagningslokalen fångas upp i dina vattenprover. Ett annat exempel är om du t.ex. studerar flodpärlmusslor i vattendrag så ger DNA från utdöda populationer också utslag i vattenprover, om än i mycket mindre omfattning (Stoeckle et al. 2015). Ytterligare exempel på denna typ av felkälla är då några forskare placerade gäddkadaver i gäddfria sjöar och påträffade gädd-DNA efter så lång tid som 230 dagar (Dunker et al. 2016). Dessutom så kan storskaliga undersökningar, som genomförs med få provtagningar,

inte redovisa *var* arterna egentligen finns inom systemet. Detta försvårar också våra möjligheter att kvantifiera olika bestånd i naturvatten utifrån mängden DNA i dina vattenprover. Mer forskning behövs för att förstå den komplexa rums- och tidsmässiga dynamiken vid eDNA-provtagning (Deiner et al. 2017a; se Provtagning i fält).

4) *Hybrider och genetisk variation*. Eftersom eDNA-undersökningar använder sig av mitokondriellt DNA (vilket nedärvs från modern) så kan metodiken inte upptäcka hybrider (Giles et al. 1980). Det går inte heller att skilja olika individer av samma art i en eDNA-analys. Vi kan inte heller säga så mycket om genetisk variation, genetisk drift eller fitness, inom eller mellan olika bestånd. Det skulle krävas betydligt mer målarts-DNA (vävnadsprover) för att kunna göra sådana jämförelser. En intressant studie av Elbrecht (2018) har försökt att spåra genetisk variation inom arter med hjälp av sekvensering av insekters haplotyper. Kan vi med eDNA spåra genetisk variation inom en art kan det ge oss svar på hur det är möjligt för organismer att t.ex. anpassa sig till miljöförändringar. Detta betyder att mer forskning inom detta område är att vänta (se Med eDNA in i framtiden). Flera andra författare har genomfört intressanta studier av genetisk diversitet för haplotyper för bl.a. hajar och benfiskar (Sigsgaard et al. 2016; Sousa-Santos et al. 2016).

5) *eDNA svarar ofta på andra frågeställningar*. Resultat från eDNA-analyser kan idag ge oss värdefulla och komplimenterande data till dagens miljöövervakning, men de svarar ofta på andra typer av frågeställningar (Evans et al. 2016; Kelly et al. 2017). Ta elfiske som exempel. Det kan vara frestande att jämföra resultat från eDNA med resultat från elfiskeundersökningar och snabbt konstatera att eDNA upptäcker fler fiskarter än elfiske och sedan dra långtgående slutsatser om artsammansättningar och diversitet utifrån detta (se t.ex. Hellström & Spens 2017). Större delen av elfiskeundersökningar syftar dock inte till att fånga vattendragets alla fiskarter. Ofta är det istället mer komplexa och detaljerade frågeställningar som elfisken svarar på gällande t.ex. rekrytering av specifika arter som lax och öring. Studier har till och med visat att det kan vara mindre kostnadseffektivt att undersöka enskilda arter med eDNA-metodik istället för att använda elfiske (Evans et al. 2017).

Sammanfattningsvis måste vi inse att ingen övervakningsmetod ger oss ett fullständigt svar. Olika metoder kan istället komplettera varandra och tillsammans hjälpa oss att bygga upp en förbättrad förståelse när det t.ex. gäller fiskbiodiversitet inom ett avrinningsområde. Eftersom antalet eDNA-analyser kommer att öka är det viktigt att tänka igenom vad resultaten egentligen svarar på (vad är vår grundfråga) innan vi börjar jämföra med andra miljöövervakningsmetoder. Det är nödvändigt att tänka nyanserat när det gäller denna nya metodik, och inte hasta iväg och snabbt ersätta väl utprovade, traditionella och standardiserade miljöövervakningsmetoder. Det finns fortfarande många frågetecken och utmaningar som eDNA-metodiken

ännu inte helt har löst. Det gäller t.ex. att markörer ännu inte finns framtagna för alla organismer. Dessutom kostar utvecklingen av detta mycket pengar, t.ex. upprättandet av mer fullständiga barcodingbibliotek (se Stora utmaningar för eDNA). Det har också visat sig att beroende på frågeställning så är vissa traditionella övervakningsmetoder fortfarande mer effektiva än eDNA-metodik (se t.ex. Evans et al. 2017; Ulibarri et al. 2017; Perez et al. 2017), även om både Ulibarri och Perez blivit kritiserade för stora brister i eDNA-metodiken (Wilcox et al. 2018). Det innebär trots allt att vi måste vidareutveckla metoder för att kunna jämföra, granska och verifiera eDNA-resultat. Det blir annars svårt att ens komplettera standardiserade metoder som elfiske och nätprovfiske med icke-standardiserad metodik, som eDNA (se Viktigt att verifiera eDNA-undersökningar). De flesta publicerade eDNA-studier har dessutom hittills enbart svarat på enklare kvalitativa frågeställningar om arter kan identifieras/inte identifieras i provtagningsområdet. Trots det så misslyckas många av våra traditionella provtagningsmetoder att få fram säkra och kvantitativa data för diversitet eller populationsstatus (Hering et al. 2018). Detta öppnar upp för möjligheter att ersätta delar av miljöövervakningens mer ”trubbiga” metodik (Pawlowski et al. 2018).

4.5 Stora utmaningar för eDNA

Vi måste förbereda oss på att eDNA-metodiken utgör ett (eller flera) verktyg som kommer att inkluderas inom miljöövervakningen under de närmaste åren. Så pass viktigt är detta område. Men eDNA-metoderna som används idag är många och diversa. I stort sett varje studie utför analyser på olika sätt. Detta gör att vi står inför nya och omfattande prövningar kommande år. Här är några exempel på de utmaningar som eDNA-teknologin står inför:

1) DNA:s ursprung, mängd och rörelser. Vi vet idag ganska lite om DNA:s ursprung, dvs. från vilka vävnader som specifikt DNA kan spåras (Barnes & Turner 2016; Stoeckle et al. 2017a). Visste vi mer om ursprunget skulle vi kunna beräkna hur stora de flesta DNA-fragmenten är, vilket i sin tur påverkar hur DNA uppträder i vattnet (Turner et al. 2014). Det är också svårt att svara på hur stora mängder DNA som släpps från olika livsstadier beroende på art och organismgrupp (Klymus et al. 2015). En viktig fråga, som vi inte vet detaljerna kring, är hur DNA rör sig i vattenmiljön (Jerde et al. 2016; se Hur uppträder DNA i vatten?). *Hur mycket DNA har möjlighet att binda till partiklar eller organiska föreningar? Hur mycket DNA förs vidare i vattenmassan och hur mycket faller ner och binds till sedimentet och ”ut ur” systemet?*

2) *Standardisering*. Trots många lyckade studier är eDNA-forskningen fortfarande i en utvecklingsfas. Forskargrupper och utförare använder många olika typer av eDNA-metoder. Trots studiernas metodologiska olikheter och mycket små mängder DNA så lyckas de ofta identifiera sina målarter. Detta betyder att det går att använda en rad olika eDNA-metoder och ändå få godtagbara resultat. Det är t.ex. möjligt att använda olika typer av provtagning, filtrering, DNA-extraktion, PCR och val av markörer och primers och ändå utföra en korrekt artbestämning. Svårigheten att jämföra studier sinsemellan ökar behoven att finna standardiserade metoder för eDNA-metodik. Det finns delar i eDNA-processen som mycket väl skulle kunna standardiseras redan idag (Geerts et al. 2018), även om det kan röra sig om många olika typer av standarder, bl.a. beroende på organismgrupp (Wilcox et al. 2018). Idag arbetar forskare och näringsliv tillsammans i flera nationella och europeiska projekt med att försöka finna gemensamma standarder (Leese et al. 2016). Även CEN (den europeiska kommittén för standardisering) arbetar med att försöka standardisera delar av eDNA-metodik (CEN 2018; se Samarbeten för gemensamma standarder).

3) *Svårigheter att återupprepa publicerade resultat*. Från och med 2016 har många eDNA-studier förbättrat metodbeskrivningarna väsentligt när det gäller detaljer för hela förloppet från provtagning till färdig analys. eDNA-studier blir därmed allt bättre beskrivna och ofta finns både protokoll och markörer (inklusive färdiga primers) tillgängliga. Trots detta är det ibland svårt att återskapa den goda träffbild som många studier redovisar. Det har visat sig vara ett allmänt problem att inte kunna reproducera experimentella studier (The Academy of Medical Sciences 2015). En anledning till detta är att det fortfarande finns en hel del detaljer som inte beskrivs i studierna. Lösningen är bl.a. förbättrade riktlinjer och en öppnare redovisning vid publicering (Bustin et al. 2009; Cramond et al. 2016; Se Viktigt att verifiera eDNA-undersökningar).

4) *eDNA inom miljöövervakningen*. Idag finns kraftiga påtryckningar för att använda eDNA som metod inom miljöövervakningen. Men, då ingen standard finns och metoderna varierar så mycket, *vad beskriver eDNA-resultaten egentligen? Kan vi hitta någon slags referenspunkt för att standardisera eDNA-analyser? Hur kan eDNA-resultat jämföras med de standardiserade traditionella metoder som används idag?* Det finns många frågor att ställa sig innan vi fullständigt kan integrera eDNA som en ny miljöövervakningsmetod, eller snarare metoder (Hansen et al. 2018). Trots detta kommer det forskningsrapporter som sakligt och adekvat diskuterar möjligheterna och nödvändigheten att inkorporera eDNA inom miljöövervakningen (Leese et al. 2018; Pawlowski et al. 2018). Det är framförallt viktigt att resultat från olika undersökningar kan jämföras, granskas och återupprepas. För att kunna göra

detta är det viktigt att studierna uppvisar transparens, dvs. att metodiken och experimenten beskrivs i detalj. Dessutom måste studierna uppfylla vissa kvalitetskriterier och följa gemensamma riktlinjer, något som tidigare föreslagits av olika forskare (Bustin et al. 2009; Darling & Mahon 2011; Goldberg et al. 2016; Leese et al. 2016, Trebitz et al. 2017). Idag studerar forskarna även den osäkerhet som råder inom övrig provtagning och studerar de områden där eDNA metodiken kan förbättra uppskattningar av populationer och bestånd (Yoccoz 2012; Hering et al. 2018, Pawlowski et al. 2018; Se Viktigt att verifiera eDNA-undersökningar).

5) *Optimering av genetiska markörer och primers.* För att överhuvudtaget kunna identifiera en art via dess DNA, så måste specifika områden i genomet användas, s.k. markörer. Dessutom måste man framställa korta och artspecifika primers, som fäster vid rätt arts DNA under PCR-amplifieringen. Trots att detta idag finns framtaget för de flesta arter inom grupperna fisk, kräftor och musslor, så har forskare visat att vissa arter inte alltid upptäcks i den mängd de antagit (Tréguier et al. 2014; Pillipod et al. 2014). Vissa arter kan maskeras, och därför vara svåra att skilja åt, om man använder en viss markör. För att kunna identifiera sina målarter så är det helt centralt att välja ut rätt markörer och primers (Wilcox et al. 2013; Freeland et al. 2017). Tack vare förfinade analysmetoder och optimering av artspecifika och universella primers kommer detta att kunna hanteras allt bättre (Taberlet et al. 2018; se Artidentifiering med markörer och primers).

6) *Monopolisering och patentering.* Idag finns allt fler organisationer, myndigheter och företag som vill utföra eDNA-undersökningar. Men det är ännu en ung och relativt komplex disciplin, med få experter, vilket ger en obalans mellan antalet beställare (många) och utförare (få). För kreativa företag finns det därför stora möjligheter att dominera marknaden, vilket ökar risken att eDNA-processen monopoliseras. Då alltför få utförare existerar på marknaden finns också en risk att priserna stiger. Dessutom kan du som beställare riskera att binda upp dig vid dåliga avtal, t.ex. att betala dyrt för primers eller att utförare trugar sig med på publicerade artiklar. Då företag utvecklar specifika primers och optimerar sina labbprotokoll, så finns möjlighet till patent, vilket är rimligt då de använt egna resurser för denna utveckling. Det är idag tillåtet att söka patent för primers inom Europa, men det är dock oklart hur många laboratorier som verkligen söker patent (Mehta 2015). Blir denna patent-verksamhet omfattande skulle den kunna ge vissa problem, både då eDNA-standarder ska utvecklas och då en förbättrad transparens för eDNA-studier ska genomföras. Om vissa primers rekommenderas som standard inom eDNA, så promotas vissa företag över andra. Primer-patent kan också fördyra eDNA-analyserna (eftersom patent kostar pengar), vilket skulle kunna ge en sämre utveckling för miljöövervakningen. Generellt kan patenterade primers användas utan specifika restriktioner inom forskningen, om de publicerats, men vid kommersiell verksamhet

(olika undersökningar och miljöövervakning) så kan kostnaderna komma att öka (se Kontakta ett laboratorium).

7) *Kontamination och inhibering.* eDNA kräver mycket specifika fält- och laboratorierutiner. Främst beror detta på att kontamination från organismers DNA (även i mycket små mängder) kraftigt påverkar slutresultatet. Negativa, och ibland även positiva, kontroller är därför viktigt att inkludera för att kunna verifiera var i metodkedjan som kontamination eller bias kan uppkomma (se Hantering av förorening och felkällor i fält; Hantering av förorening och felkällor på labb). Dessutom finns det kemiska föreningar i våra svenska vatten som kraftigt minskar möjligheterna att upptäcka DNA i våra vattenprover. Denna s.k. ”inhibering” uppkommer ofta pga. provtagning i humösa eller algrika vatten (Matheson et al. 2010; Jane et al. 2015). Det finns idag sätt att minska denna negativa påverkan, men det är viktigt att specifika kontroller då genomförs (Hedman & Rådström 2013; Goldberg et al. 2016; se Vattnets egenskaper påverkar).

8) *Små mängder DNA.* Vattenprover innehåller mycket små mängder DNA, till skillnad från t.ex. diet- eller bulkprover (Taberlet et al. 2018). Förekommer arterna i mycket liten mängd i förhållande till andra arter som du får i dina prover, så kan det bli svårare att upptäcka de mer sällsynta arternas DNA. Detta har man t.ex. studerat då man slår ihop (poolar) prover från olika delar av ett vatten (Sato et al. 2017). De arter som förekommer mer sällsynt tenderar att maskeras vid analyserna, då de ”drunknar” i allt sidobrus (se HUR provtar du?).

9) *Komplexa analyser och metodutveckling för specialister.* Då vi inte ser arterna vi ska analysera blir själva analysprocessen ganska abstrakt. Den molekylärbiologiska teknik som används kan dessutom lätt uppfattas som komplicerad, bl.a. eftersom alltmer tekniskt avancerade metoder används, som ddPCR och sekvensering. Ekologer måste med hjälp av bioinformatiker och statistiska program lära sig att tolka analysresultaten. Tillsammans måste vi också ständigt förbättra de statistiska metoder och algoritmer som hjälper oss att tyda våra resultat, så att felmarginalerna successivt minskar. Ofta är det laboratoriernas personal, bioinformatiker eller molekylärbiologer som har djup förståelse för hur metodiken kan förbättras inom eDNA. Detta kan ge en snedvridning när det gäller metodutvecklingen, eftersom ekologer med kunskap om arterna och deras miljö ofta inte är med i denna utveckling (se Bioinformatik: att tolka resultat).

10) *Tidsserieanalyser.* För att kunna säga något om trender i våra data (t.ex. hur en invasiv art successivt etableras inom ett avrinningsområde, eller påverkar naturlig fauna) måste vi arbeta med tidsserieanalyser. Detta kräver att vi har tillgång till äldre dataserier, vilka i sin tur måste interkalibreras mot varandra. Möjligheter till jämförelser försvåras av att eDNA-undersökningar genomförs på väldigt olika sätt.

Problemet blir tydligare då resultat jämförs kvantitativt. Flera frågor måste redas ut, bl.a:

- Hur hanteras data som analyserats med olika typer av eDNA-metodik (t.ex. med olika provtagningsvolym, filtrering, typ av DNA-extraktion, PCR- och sekvenseringsteknik)?
- Hur jämförs studier som är utförda i olika typer av vatten, vars inneboende egenskaper påverkar mängden DNA i våra resultat?
- Hur sammanfogas eDNA-resultat med dataserier från traditionella miljöövervakningsmetoder, som elfisken, nätprovfisken, dykobobservationer eller trålning?
- Hur lagras prover och data på bästa sätt (och med vilken infrastruktur) för att kunna testas, jämföras och kalibreras med nya metoder?

11) Fördyrande kostnader. eDNA framhålls ofta som en överlägset billig metod i jämförelse med andra traditionella övervakningsmetoder, i alla fall när det gäller själva provtagningen. Kostnader tillkommer dock då olika delar i eDNA-metodiken måste testas ut och finslipas. Dessutom kan det bli ganska dyrt om du upptäcker kontamination i dina prover, vilket innebär att delar av provtagningen måste göras om. För att erhålla en förbättrad precision är du ofta tvungen att öka antalet kontroller och replikat, vilket fördyrar eDNA-projektet. Så, trots att sekvenseringskostnaderna successivt minskar, är vissa delar i eDNA-processen fortfarande relativt dyra (Handley 2015; Smart et al. 2016; se Kostnader för eDNA-undersökningar). Idag pågår flera initiativ att utveckla mer eller mindre standardiserade protokoll vilket ytterligare kommer att förbättra prisbilden (Leese et al. 2018).

12) Hantering av stora datamängder. Efter färdiga sekvenseringsanalyser är det en stor utmaning att kunna hantera all digital data (Keck et al. 2017). Vissa sekvenseringar (som idag gör miljontals läsningar från vattenprovers eDNA) genererar data på flera hundra GB. I framtiden kommer detta att öka (se Lagring av prover och data). Frågor som bör ställas redan idag är: *hur kvalitetssäkras, lagras och säkerhetskopieras eDNA-data under en längre tid? Hur lagras biologiska prover (t.ex. frysta filter) för att kunna återanalyseras då eDNA-metodiken har förbättrats några år senare?*

13) Utveckling av barcodingbibliotek. Många organismgrupper (t.ex. växter, insekter, nematoder och svampar) saknar idag fullständiga och kvalitetssäkrade barcodingbibliotek, dvs. bibliotek med pålitliga genetiska sekvenser som används vid artbestämning (Hovmöller et al. 2017). Det blir då omöjligt att matcha sekvenserade ”arter” mot sekvenser som inte finns. Även inom välutvecklade barcodingbibliotek (som för fisk) finns flera frågetecken. Många bibliotek är t.ex. inte kvalitetssäkrade (t.ex. GenBank), vilket gör sekvenserna opålitliga och tidsödande att

söka efter (Taberlet et al. 2018). Dessutom har forskare funnit att tidigare standardiserade markörer, som CO1, inte passar lika bra för alla arter (Deagle et al. 2014). Barcodingbiblioteken måste därför fortsätta att fyllas på med flera olika sekvenser, och från olika geografiska regioner, så att felmarginalerna vid artidentifieringen minskar (se Barcodingbibliotek).

14) Förbättrat miljötänkande. Även om eDNA anses vara mycket skonsam mot miljön då vattenprover tas så finns fortfarande delar inom metodiken som är mer miljöbelastande, t.ex.:

- Det används mängder av engångsartiklar av plast (pipetter, provrör, handskar) då DNA ska analyseras med PCR eller sekvensering. Engångsmaterial i plast används också flitigt för att inte kontaminera mellan provtagningar i fält, t.ex. filterkapslar och pumpslangar.
- Vid laboratorieanalyser används många ämnen som kan vara både miljö- och hälsovådliga (kloroform, tungmetaller etc). Ibland redovisas inte allt innehåll i tillverkarnas färdigproducerade ”kit” som används vid olika analyser.
- Vid rengöring av utrustning används ofta stora mängder klorin som är hälsovådligt.

Eftersom eDNA kommer att användas allt mer inom miljöövervakningen, så måste också metoderna anpassas till att bli allt mindre miljö- och hälsovådliga. Det behövs mer forskning och en mer komplett analys av detta område.

5 Viktigt att verifiera eDNA-undersökningar

Intresset för eDNA har den senaste tiden ökat kraftigt. Idag genomförs allt fler studier, utredningar och pilotförsök om eDNA. Men kvaliteten varierar, och fortfarande saknas gemensamma riktlinjer för att kunna validera många undersökningar (Goldberg et al. 2016; Kelly et al. 2017). På grund av detta ökar också mängden frågor: *Vad visar dessa studier egentligen? Kan vi lita på att de redovisar resultat på ett objektiva sätt? Går de överhuvudtaget att bedöma vetenskapligt?* När allt fler utförare vill inkorporera eDNA-metodik inom miljöövervakningen så uppkommer följande grundproblem:

- Vissa utförare lovar ibland mer än vad som är möjligt att uppnå med eDNA. Dessutom saknas transparens i en del undersökningar, vilket gör dem svåra att validera.
- Beställare, myndigheter & finansierare förlitar sig i nuläget ofta på vad utförare lovar, men de vet inte riktigt hur de ska bedöma metodernas noggrannhet.
- Då riktlinjerna att verifiera eDNA-studier idag är otillräckliga, så är risken stor att trovärdigheten för eDNA-undersökningar minskar.

Gemensamma kvalitetsstandarder. För att utveckla eDNA-metodiken till något konstruktivt kan oberoende experter, myndigheter & finansierare kallas samman för att definiera kvalitetsstandarder. Sedan bör samma processer genomföras som för andra kontrakt, dvs. man låter oberoende laboratorier analysera samma prover och göra jämförelser för att se hur pass robusta och replikerbara metoderna är. Det kan t.ex. ske med s.k. ringtester. Vid ett ringtest skickas ”blindprov” med de vanliga provtagningarna till laboratoriet. Blindprovet innehåller kända mängder DNA från olika arter, något som enbart den som skickar in proverna känner till. Laboratoriet som utför analyserna är däremot ovetande om detta. Samtliga prover analyseras på samma sätt, vilket innebär att du då kan få ett mått på analysens kvalitet (hur många arter som saknas från blindprovets ursprungliga sammansättning, hur noggrant de olika sekvenserna läses vid sekvenseringen etc.). Man kan också skicka blindprover

med samma DNA-mängder till flera olika labb för att se om analysresultaten överensstämmer.

Tydligare kontrollverktyg. Trots att eDNA-metodik har både högre precision och fångar fler arter än traditionella metoder, så krävs även någon form av interkalibrering med andra undersökningstyper. Det finns idag inga specifika riktlinjer för hur detta ska göras, och det finns därför en risk att miljöövervakningen får ta emot en mängd eDNA-data som både är svåra att tyda och jämföra över tid (Cowart et al. 2015; Kelly et al. 2017). Om eDNA-undersökningar ska ligga till grund för en vidareutveckling av miljöövervakningen så måste det utvecklas tydligare kontrollverktyg. Exempel på kontrollverktyg skulle kunna vara någon form av kvalitets-säkringsindex i form av: 1) osäkerhetsanalyser som kan utföras med relativt enkla medel (standardavvikelse/varians eller konfidensintervall) utifrån studiens samlade data, 2) redovisning av variationer mellan falska positiva/negativa och faktiska resultat (tidigare mätdata), samt möjligheter att finna målarter, vilket ger ett sannolikhetsmått, 3) redovisning av gränsvärden (LOD – Limit of Detection), optimalt antal PCR-cykler eller hur djupt sekvenseringen körts etc.

Krav på utförare. Då eDNA-undersökningar ska upphandlas på länsstyrelser, kommuner, hos organisationer eller fiskevårdsområdesföreningar så måste tydliga krav ställas på utförarna. Dessa krav kan formuleras i de avtal som upprättas mellan utförare och beställare (se Kontakta ett laboratorium). Det är då viktigt att beställaren har kontroll över processen. Tveksamheter och sådant som är otydligt måste direkt redas ut mellan parterna. Det kan gälla allt ifrån vem som äger data, kostnader för patenterade primers, tveksamma krav att laboratoriet ska stå med på publicerade artiklar, deadline för leverans av resultat, till transparens av metodik och förtydligande av resultat. Skriv inte under förrän du är nöjd med avtalet. Exempel på utförarkrav kan vara:

- *eDNA måste användas på ett rättvisande sätt.* Vissa rapporter överskattar möjligheterna med eDNA, vilket leder till direkta felaktigheter med vad som kan uppnås med hjälp av eDNA-metodiken. Ett exempel på detta är att flera tidigare eDNA-studier har låtit bli att redovisa för ofullständig detektion då de jämförts med traditionella provtagningsmetoder (Lugg et al. 2017). Då forskare underlåter att redovisa för ofullständig detektion enbart för eDNA-metoder kan det resultera i en alltför optimistisk överskattning av eDNA-metodikens möjligheter i jämförelse med traditionella metoder.
- *Provtagnings- och analysdesign måste anpassas till de vetenskapliga grundfrågeställningarna.* En del författare drar lite väl långtgående slutsatser utifrån rapporternas ursprungliga syfte. Det är t.ex. skillnad på kvalitativa (*vilka fiskar finns här?*) och mer kvantitativa frågeställningar (*hur mycket av olika fiskar finns*

här?). Det finns därmed en viss risk för felaktigheter då resultat från qPCR eller sekvenseringsläsningar likställs med fiskbiomassa (se Är mängd DNA = biomassa?). Anledningen till denna förenkling och osaklighet kan t.ex. vara att man som utförare vill visa på styrkor med att använda eDNA jämfört med traditionella metoder. I slutändan är risken är att man förenklar andra provtagningsmetoders styrkor och svagheter. Detta kan i värsta fall leda till misstro mot eDNA-metodikens användbarhet.

- *Redovisa metodik och resultat med öppenhet.* Det måste kunna styrkas att en viss utförare (vare sig privat eller offentlig) använder objektiva och transparenta metoder som kan jämföras, granskas och återupprepas. Därför måste samtliga steg i metodikkedjan redovisas tydligt, inklusive statistisk bearbetning av resultat. T.ex. måste olika typer av felkällor (som kontamination och bias) kontrolleras och hanteras tydligt i rapporterna.

För att komma vidare är vi tvungna att påpeka bristerna i eDNA-studier och bistå med konstruktiva förslag på förbättringar. Flera forskare har föreslagit olika typer av guidelines som definitivt kan användas för att förbättra kvaliteten i eDNA-studier (Bustin et al. 2009; Iversen et al. 2015; Goldberg et al. 2016; Taberlet et al. 2018; Wilcox et al. 2018). Slutligen är det värt att påpeka att objektiva, robusta och repeterbara eDNA-metoder måste utvecklas för respektive organismgrupp, t.ex. för fisk, kräfter eller musslor. Det innebär rent konkret att t.ex. fler benchmarkingtest utförs, där både metodernas pålitlighet och olika laboratoriers resultat jämförs och kvalitetssäkras. Under dessa tester anpassas metodiken successivt till respektive organismgrupp och typ av analys (t.ex. enarts- eller flerartsanalys). Hela tanken med dessa tester är att förbättra möjligheterna att jämföra och återskapa olika studiers resultat, samt öka möjligheterna att integrera eDNA med miljöövervakningens mer traditionella metodik. Det behövs därmed mer forskning och fler studier som använder objektiva strategier och jämförbara eDNA-metoder för att vi ska nå dit vi vill.

6 Samarbeten för gemensamma standarder

För att utveckla eDNA-metodiken i rätt riktning och ta fram ackrediteringsverktyg och gemensamma standarder är det viktigt att utveckla goda samarbeten mellan forskare, privata aktörer, myndigheter och utförare. Flera världsomspännande initiativ drivs just nu för att förbättra förutsättningarna för artidentifiering med genetiska metoder. För tillfället görs stora framsteg när det gäller förbättrad genetisk identifiering av arter, vilket innebär nydanande och alternativa markörer, allt mer moderniserad teknisk utrustning och standardisering av vissa delar inom DNA-metodiken.

Erfarenhet och resultat från SLU Aquas egna eDNA-projekt visar att det inte är helt enkelt att anpassa och utveckla eDNA-tekniken till lättanvända metoder inom miljöövervakningen (Bohman 2016). För att göra eDNA mer användbar som metod inom miljöövervakningen måste bl.a. följande klargöras:

- Utveckla det pågående arbetet med att undersöka vilka delar i eDNA-metodik-kedjan som kan standardiseras och hur detta ska ske. Idag sker detta inom olika internationella arbetsgrupper (iBol, DNAqua-Net, CEN) och verkar ha stor möjlighet att lyckas inom provtagning, samt hantering och lagring av prover. Standardisering inom ett område där utvecklingen går snabbt kan vara problematisk (se Stora utmaningar för eDNA).
- Få till ett kvalitetssäkringsverktyg för eDNA-metodiken, så att olika studier kan granskas och verifieras bättre.
- Vidareutveckla eDNA:s användbarhet som kvantifieringsverktyg vid beståndsanalyser.
- Säkerställa behandlingen av felkällor på ett mer standardiserat sätt.
- Utse datavärdar för kvalitetssäkring och lagring av eDNA-data.

Det finns många nationella och internationella initiativ för att utveckla och förbättra standarder kring eDNA-metodiken. Här nedan ges några exempel på de mest tongivande.

International Barcode of Life (iBOL; <http://ibol.org>) arbetar för att sammanställa och standardisera alla organismers genetiska artmarkörer i stora bibliotek (Fig. 8). Liknande arbete på mer lokal nivå finns inom SweBOL (i Sverige) och NorBOL (Norge). SweBOL har de senaste åren bidragit till att samordna svenska aktörer (Hovmöller et al. 2017). FishBOL är en undergrupp till iBOL och försöker skapa ett standardiserat barcodingbibliotek för världens fiskarter (<http://fishbol.org>). FishBOL kompletterar och förbättrar befintliga informationsresurser, inklusive Fishbase (<http://fishbase.org>) och Catalog of Fishes (<https://www.calacademy.org/scientists/projects/catalog-of-fishes>).



Figur 8. Vänster: International barcode of life (iBOL) arbetar bl.a. med att standardisera organismers artmarkörer (källa: <http://ibol.org>). Höger: Fish barcode of life (FishBOL) är en underorganisation till iBOL och arbetar med barcoding av fiskar. Källa: <http://fishbol.org>.

DNAqua-Net (www.dnaqua.net) är en arbetsgrupp inom EU-programmet COST, vars uppgift är att försöka standardisera barcodingens olika metodiska delar gällande vatten (Fig. 9; Weigand et al. 2017). Det är ett omfattande arbete som äger rum och som omfattar samtliga organismgrupper. Programmet pågår mellan 2016-



Figur 9. DNAqua-Nets arbetsgrupper försöker standardisera eDNA-metodikens olika delar. Källa: <http://dnaqua.net/>.

2020 och består av flera olika arbetsgrupper som alla hanterar olika områden inom DNA barcoding:

- Barcodingbibliotek
- Mätvärden och index

- Fält- och laboratorieprotokoll
- Dataanalys och lagring av data
- Implementeringsstrategi och juridiska frågor

CEN (European committee for standardization). CEN (Fig. 10) är en av tre standardiseringsorganisationer som officiellt accepterats av EU och EFTA (Europeiska frihandelssammanslutningen) för att utveckla och definiera standarder på europeisk nivå. Under de närmsta åren från och med 2018 kommer CEN bl.a. att arbeta med standardiseringar inom eDNA-metodiken (CEN 2018). CEN tar delvis över det standardiseringsarbete som förts inom COST-programmet DNAqua-Net.



Figur 10. CEN (europeiska standardiseringskommittén). Källa: <https://www.cen.eu>.

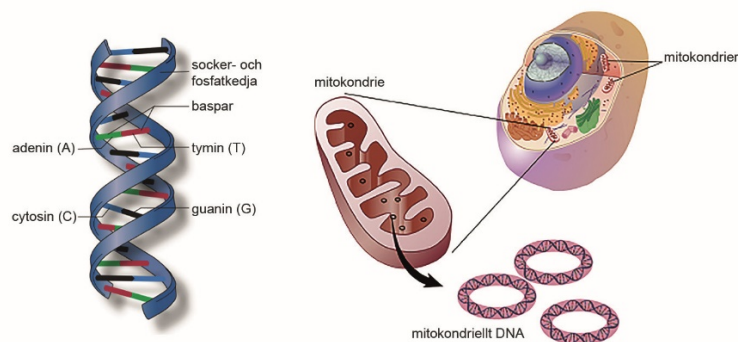
Flera forskargrupper vid många olika universitet ligger långt fram när det gäller utveckling av DNA-metoder inom miljöövervakningen. Vid SLU används idag genetiska metoder som ett temaoområde inom den fortlöpande miljöanalysen (FOMA). Nätverket EDNA, som koordineras av SLU, arbetar med utveckling, informationsbildning och infrastruktur när det gäller olika typer av DNA-metoder inom miljöövervakningen.

7 Att försöka förstå eDNA

För att förstå hur eDNA fungerar och bör provtas behöver detaljerna och egenskaperna hos DNA studeras lite närmare. Detta kapitel försöker svara på många olika frågor, t.ex. hur DNA uppträder i miljön och hur det rör sig i vatten, vilken typ av DNA som studeras då eDNA provtas, samt hur en artidentifiering egentligen går till. Det är fortfarande mycket vi idag inte vet om dessa processer.

7.1 DNA och artidentifiering

DNA (deoxiribonukleinsyra) finns hos alla världens kända organismer, och innehåller organismens hela genetiska information. Det är en komplex molekyl bestående av kvävebaser och sockerfosfater (Fig. 11). Kvävebaserna består av nukleotider, adenin (A), tymin (T), guanin (G) och cytosin (C). Nukleotiderna paras ihop i kompletterande par, och bildar då ett baspar (A-T, G-C etc.). Denna byggnad ger DNA dess speciella struktur och funktion. Hos djur finns DNA dels i cellernas kärna, och dels i cellernas mitokondrier. Hos växter finns DNA även i kloroplasten.



Figur 11. Vänster: schematisk bild av DNA (inklusive nukleotider, socker och fosfat). Ett baspar är två kompletterande nukleotider (t.ex. A-T eller G-C). Höger: mtDNA är formade som små ringar inuti mitokondrierna. Källa National Institutes of Health, National Human Genome Research Institute (<https://www.genome.gov>).

Även om det mesta av en organisms DNA är förpackat i kromosomer inuti cellernas kärna, innehåller mitokondrierna också en viss mängd DNA. Detta genetiska material är känt som mitokondriellt DNA (mtDNA). Mitokondriernas uppgifter är bl.a. att producera energi till cellens olika funktioner. mtDNA finns som små ”ringar” inuti mitokondrierna och kodar för deras funktioner (Fig. 11). Inom eDNA används ofta mtDNA för att identifiera arter. Några av anledningarna till detta är att mitokondrier är små och relativt lättstuderade (innehåller inte så många kvävebaser att analysera), samt att varje cell innehåller hundratals eller tusentals mitokondrier med mtDNA. mtDNA har ett eget genom, skiljt från kärn-DNA, men trots detta kodar mtDNA för tillräckligt många egenskaper för att skilja arter från varandra (Ingman & Gyllensten 2006).

För att spåra målarters DNA används så kallade ”genetiska markörer”. Dessa markörer är korta, specifika områden i genomet, som ger oss ett bra verktyg att identifiera arter (Hebert & Gregory 2005; Fig. 59). Metodiken kallas för ”DNA barcoding” på engelska, vilket på svenska ofta översätts med ”DNA-streckkodning”, och baseras på att alla arter har olika DNA-sekvenser, eller streckkoder. Streckkoderna motsvaras av den specifika ordning som kvävebaserna utgör på DNA:t. Då flera arter identifieras i samma prov kallas det för metabarcoding. 2003 tog några forskare fram en specifik standardiserad genregion för ryggradsdjur, kallad cytokrom c oxidas subenhet I (CO1) i mtDNA:t (Hebert et al. 2003). Idag har det visat sig att CO1 inte alltid är optimalt för att spåra fisk i vattenprover (Deagle et al. 2014), och därför har olika forskarlag utvecklat andra markörer som är bättre på att identifiera fisk (Valentini et al. 2016). T.ex. används ofta markören 12S vid metabarcoding av fisk (Taberlet et al. 2018). För kräftor används ofta mtDNA-markörerna CO1 och Cyt b och för musslor används ITS, som är nukleärt DNA och inte mtDNA (se Artidentifiering med markörer och primers).

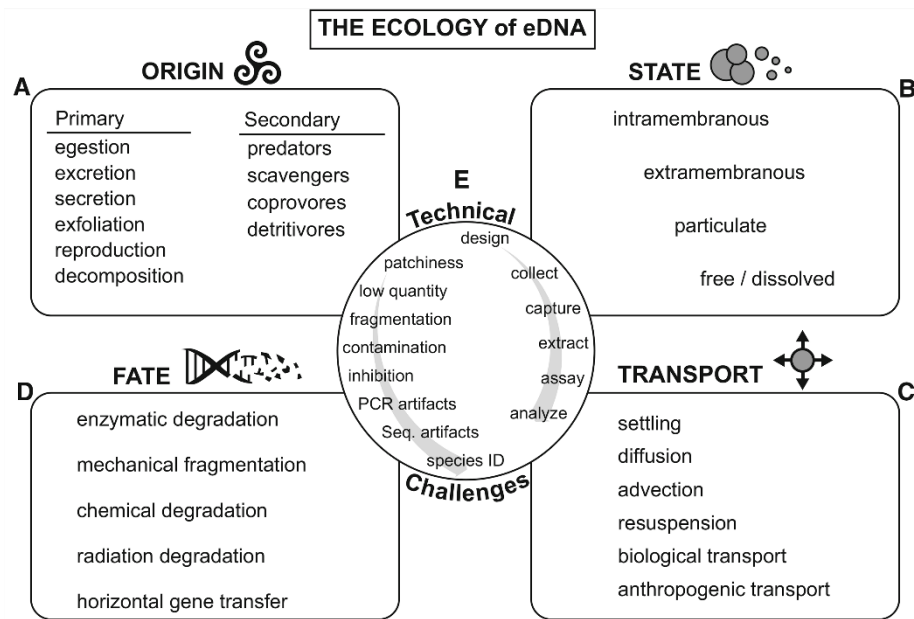
7.2 Hur uppträder DNA i vatten?

Fisk, kräftor och musslor släpper genetiskt material (intracellulärt eller extracellulärt DNA) i sin miljö först genom att ömsa vävnader och hela celler. Sedan bryts dessa celler ner och släpper ut DNA fritt i miljön (Fig. 12). Det finns få studier som verkligen visar exakt varifrån organismers DNA härstammar, eftersom DNA-fragment ännu inte kan kopplas till specifika vävnader eller celler (Maruyama et al. 2014; Klymus et al. 2015). Det innebär att vi fortfarande får uppskatta vilka vävnader som arterna mestadels ömsar utifrån tidigare studier (Barnes & Turner 2016; Stoeckle et al. 2017a). Klymus (2015) visade dock att karpfisk släpper mest DNA då de äter, i form av fekalier.

Hur rör sig DNA i sjöar och vattendrag?

Det verkar som om fritt eDNA snabbt bryts ner av antingen hydrolyt (DNA-molekylen sönderdelas efter att den bundit till vatten) eller mikrobiska extracellulära enzymer som ofta finns i stora mängder i akvatiska system (Barnes & Turner 2016). DNA får därmed varierande storlek och längd (antal baspar) i vattnet, vilket också inverkar på dess egenskaper. Det har visat sig att längre DNA-fragment snabbare bryts ner än kortare (Jo et al. 2017). En viktig egenskap hos fritt DNA är att det lätt binder (adsorberas) till positivt laddade partiklar. Längre DNA-fragment verkar också binda hårdare till partiklar i vattnet. Detta innebär att det är troligare att du fångar upp mer partikelbundet än fritt flytande DNA. Partiklarnas storleksfördelning i ett specifikt vatten inverkar alltså på filtrering (t.ex. val av porstorlek) och DNA-extraktion av dina prover. Två studier av karp (från en sjö) och bäckröding (i ett vattendrag) visade att det mesta *partikelbundna* DNA:t som fångades upp höll sig inom storleksklassen 1-10 μ m (Turner et al. 2014; Wilcox et al. 2016). Det är intressant att konstatera att detta påminner om storleken hos mitokondrierna i en cell (5-8 μ m). Studierna måste dock kompletteras så att det går att säga något även om andra arter. DNA som är bundet till partiklar eller ligger inuti mitokondrier är delvis skyddade och tar därmed längre tid att bryta ner än fritt flytande DNA (Barnes & Turner 2016). Partikelbundet DNA följer vattnets rörelser, liksom fint sediment (Pont et al. 2018). Beroende på partiklarnas densitet i förhållande till vattenmassan kan DNA antingen sedimentera till botten och därigenom ”försvinna” från vattenmassan, eller följa med vattenströmningar till andra platser i systemet.

Då DNA faller till botten och sedimenterar så kan det bevaras under längre tid (Willerslev et al. 2003). Men med hjälp av mikrobiella processer, bioturbation (djurs omblandning av sedimentet), vattenturbulens och förändrade temperaturer kan dock tidigare sedimenterat DNA återcirkulera till vattenmassan (Poté et al. 2009). Några studier har jämfört fisk-DNA i det övre sedimentlagret (1-2 cm ner) med DNA i det fria vattnet. Turner och hans kollegor kom fram till att det ytliga sedimentlagret innehöll mer koncentrerat (8-1800 gånger så mycket) DNA, men färre arter, än vattenmassan ovanför (Turner et al. 2015). Buxtons forskarlag extraherade mindre mängd DNA från sedimentet i förhållande till vad de hittade i vattnet (Buxton et al. 2018). Shaw (2016) ansåg att provtagning direkt i vattenkolumnen verkade mer effektivt att artbestämma fiskfaunan i en sjö än att ta ytliga sedimentprov, vilket förefaller stämma med Turners och Buxtons resultat.



Figur 12. Figuren beskriver var DNA kommer ifrån (origin), hur det bryts ner (fate), i vilken form det förekommer (state) och hur det transporteras (transport). Mittcirkeln visar på de tekniska utmaningar som uppkommer då eDNA provtas och analyseras. Källa: Barnes & Turner 2016.

Allt som allt ger DNA:s rörelser upphov till stora variationer när det gäller detektion av eDNA i sötvatten (Jerde et al. 2016). I mindre sjöar kan koncentrationen eDNA från fisk variera kraftigt, även på avstånd mindre än 100m mellan provtagningspunkterna (Eichmiller et al. 2014). I vattendrag, där vattnets egenskaper kan ändras snabbt, varierar detektionsområdet för eDNA stort. Några studier kan inte upptäcka DNA längre än några 10-tal meter från källan (Phillipod et al. 2014; Stoeckle et al. 2015). Andra forskare har visat att eDNA från kan transporteras betydligt längre (upp till 10 km) nedströms i ett vattendrag (Deiner & Altermatt 2014). Nya forskningsresultat visar att vattendragens storlek spelar stor roll för hur långt från ursprungskällan som eDNA kan upptäckas. Ett franskt forskarlag upptäckte eDNA några kilometer nedströms källan i mindre vattendrag, medan de kunde detektera eDNA flera hundra kilometer nedströms källan i större floder (Pont et al. 2018). Rent praktiskt får dessa resultat stora genomslag då eDNA-studier designas och provtagningen planeras. Möjligheten att upptäcka DNA påverkar dessutom de svar som erhålls från eDNA-studier: *varifrån kommer egentligen det DNA vi hittar i våra prover? Hur långt färdas det?* Dessa frågor öppnar upp för behov av mer forskning kring de mekanismer och processer som styr hur eDNA transporteras i våra vattensystem. Då DNA följer fint sediment i vattnet så bör modelleringar av ett

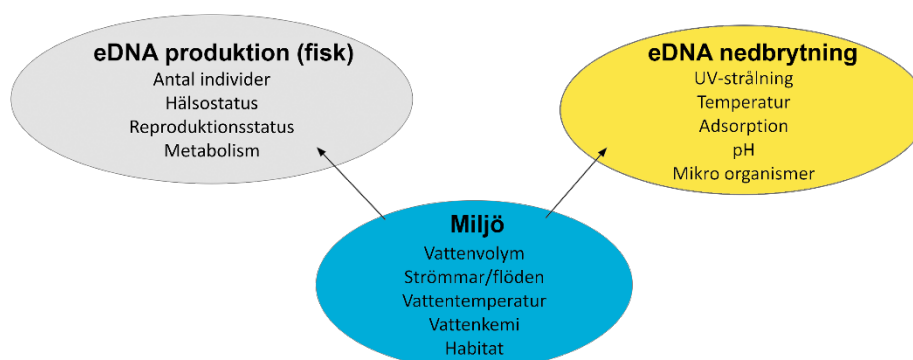
sötvattenssystems strömningar öka möjligheterna att upptäcka var eDNA hamnar i systemet (Song et al. 2017).

Hur snabbt bryts DNA ned i vatten?

Enligt tidigare studier tar det mellan några dagar och upp till fyra veckor att bryta ner DNA i sötvatten (Dejean et al. 2011; Thomsen et al. 2012b; Pillipod et al. 2014). I havsvatten tar det ca en vecka (Thomsen et al. 2012a). Pga. den relativt korta tid som DNA uppehåller sig i vattnet får du vid provtagningen en ögonblicksbild (likt ett fotografi) av de arter som finns i vattnet vid en specifik tidpunkt och på en viss plats. Det är också en av förklaringarna till varför eDNA-metodiken kan komma att bli så användbar inom miljöövervakningen: *de arter som visar sig i dina prover är de arter som verkligen finns på provplatsen just nu*. Men det hela är dock inte riktigt så enkelt.

Den mängd DNA som återfinns i vattnet är differensen mellan produktion och nedbrytning av eDNA (Fig. 13). Produktionen påverkas t.ex. av antal individer, deras hälso- och reproduktionsstatus och metabolism. Det är många faktorer som påverkar nedbrytningshastigheten, bl.a. vattnets kemiska förutsättningar, enzymer (endonukleaser) och bakteriers/svampars aktivitet. 2001 visade Matsui att DNA-fragment (plasmider från växter) på ca 400 baspar, dvs. en medellång DNA-kedja, kan finnas kvar i en vecka i sjöar med 18°C vattentemperatur (Matsui et al. 2001). Dejean visade 2011 att detta förhållande även gällde för fisk och grodor (Dejean et al. 2011). Han kom bl.a. fram till att DNA kunde upptäckas i mindre än en månad efter det att målarterna avlägsnats. Individernas täthet (hur många som fanns på platsen) påverkade så klart också DNA:s spårbarhet i vattenproverna. 2012 undersökte Thompsen detektionsgränsen för DNA i havsvatten (Thomsen et al. 2012a). Thomsen visade att förutsättningarna i havet gjorde att DNA bröts ner betydligt snabbare än i sötvatten. I rinnande vatten minskar möjligheten att finna spår av eDNA ännu snabbare, från några dagar (Barnes & Turner 2016; Seymour et al. 2018) till några timmar (Pillipod et al. 2014). I början trodde forskarna att främst solljus (UVA och UVB) hade störst inflytande när DNA bröts ned. Senare forskning har visat att dessa samband inte är helt tydliga (Andruszkiewicz et al. 2017), och att det finns vissa oklarheter när det gäller variationer under säsongen. Stricklers forskargrupp visade att kallare, och mer alkaliska, vatten med mindre solinstrålning sönderdelade DNA mindre än de vatten som var varmare, soligare och neutrala/sura (Strickler et al. 2015). Helt klart är att man bör protokollföra vattnets olika ekologiska egenskaper noggrant då en eDNA-provtagning genomförs (Barnes et al. 2014; se Vattnets egenskaper påverkar).

$$[eDNA] = \text{produktion} - \text{nedbrytning}$$



Figur 13. Ovalerna i figuren visar hur både produktion och nedbrytning av DNA påverkas av olika miljövariabler (illustration: Patrik Bohman, SLU, efter en idé av Laramie 2014).

7.3 Är mängd DNA = biomassa?

Säger mängden DNA något om hur mycket fiskbiomassa det finns i ett vatten? Det ligger nära till hands att vilja översätta mängden DNA till biomassa eller mängd/storlek på målarter för att mer exakt kunna uppskatta dominansförhållanden mellan arter och deras funktion i näringsväven. Den här sortens mätmetoder kommer att bli betydelsefulla både för forskning och för kommersiellt fiske i framtiden. Men det kan vara ganska komplexa processer som tillsammans påverkar hur mycket DNA som finns på en lokal under en viss tid (Fig. 13). Dessutom finns det en hel del felkällor som måste förutses för att kunna tolka resultatet på rätt sätt.

Många eDNA-studier har visat på en tydlig koppling mellan mängd individer och DNA-halt (se t.ex. Takahara et al. 2012; Thomsen et al. 2012b; Phillipod et al. 2013a; Hänfling et al. 2016; Doi et al. 2017a). Nevers (2018) kopplade märkning och återfångst-försök till halt av detekterad eDNA från svartmunnad smörbult i Stora sjöarna i USA och konstaterade positiv korrelation. Men mängden DNA som avges från organismer varierar mycket beroende på art och livsstadium, och är ännu inte helt utrett (Iversen et al. 2015; Kelly 2016; Taberlet et al. 2018). Ett exempel är fiskar som lever i stim (nors och braxen) i kontrast till solitärer (t.ex. gädda). Trots att gäddan har ett kraftigare slemlager över kroppen så förflyttar den sig troligen över mycket små ytor (vass och vikar), till skillnad mot stimfisken som jagar över stora delar av sjöarna. Detta kan resultera i att du får olika mängd DNA i dina vattenprover, beroende på art. Det är inte heller alltid så att större individer avger mer DNA än små, vilket också kan komplicera beräkningen av biomassa i fält. Vid en

undersökning av blågälad solabborre (*Lepomis macrochirus*) släppte t.ex. de juvenila stadierna mer DNA/gram kroppsvikt än de större (Maruyama et al. 2014). Detta gäller troligen även för småkräftor, som ömsar skal oftare än större då de vanligen växer snabbare än större individer. Det blir därmed svårt att uppskatta antalet då vi inte vet om det är många små eller få stora som avgett DNA på platsen. Därför är det viktigt att noggrant tolka sina data så att man undviker att överskatta biomassan om populationen domineras av juveniler. Det är också svårt att hitta en tydlig korrelation mellan mängd utsöndrad DNA och olika miljövariabler, som t.ex. vattentemperatur. Några studier med karpfisk kunde t.ex. inte koppla DNA-utsöndring till vattentemperatur (Klymus et al. 2015; Takahara et al. 2012). Lacoursiere-Roussels försök med bäckröding visade dock på ett tydligt temperaturberoende (2016a). Det är visserligen möjligt att olika arter, eller varm- respektive kallvattenfiskar, släpper DNA i olika mängd beroende på temperatur.

Flera forskare har även visat att det finns mer detaljerade samband mellan mängden DNA och biomassa. Än så länge har de flesta av dessa studier (där mängden DNA korrelerar positivt till biomassa) varit under någorlunda kontrollerade förhållanden. Forskarna har antingen gjort mesokosm-försök (Maruyama et al. 2014; Doi et al. 2015; Evans et al. 2016) eller så har de i samband med DNA-provtagningen i naturvatten utfört olika typer av kontrollfisker (Thomsen et al. 2016; Yamamoto et al. 2016; Hänfling et al. 2016). Yamamoto jämförde (2016) t.ex. DNA från vattenprover i Maizuru-viken (Japanska havet) med mängden japansk taggmakrill (*Trachurus japonicus*) som registrerades med ekolod. På så sätt skapade de ett index som visade förhållandet mellan eDNA och mängd ekoregistrerad fisk. Ett DNA-prov visade sig ge en pålitlig uppskattning av makrillbeståndet på upp till 150 meter från provtagningsplatsen. Dock saknas det studier som korrelerar eDNA till *absolut* fiskbiomassa, t.ex. i form av naturvatten som tömts eller behandlats med rotenon (Dunker et al. 2016).

För att kunna dra *kvantitativa slutsatser* från eDNA-studier, så måste du noga överväga flera faktorer, bl.a. ursprunglig mängd DNA, transportvägar, nedbrytningshastighet, inhibitorer, slumpfaktorer mm. Dessutom behövs det mer forskningsresultat när det gäller i vilka mängder som olika arter släpper DNA. DNA-koncentrationen kan också variera stort mellan olika dagar eller till och med timmar, speciellt under reproduktionsperioder (Tillotson et al. 2018). I naturvatten, där det inte går att kontrollera förutsättningarna helt och hållet, är det förstås svårare att nå ett sammanhängande resultat. Detta måste vi vara mycket medvetna om, trots att flera studier delvis har lyckats hitta samband mellan mängd eDNA och en mer eller mindre kvantifierbar artabundans (Lacoursiere-Roussel et al. 2016b; Elbrecht & Leese 2015; Doi et al. 2015; Hänfling et al. 2016).

På senare tid har forskare försökt att genom olika typer av korrigeringsindex få analyser från sekvenseringsberäkningar att bättre kunna kvantifieras (Thomas et al.

2016; Ushio et al. 2017). Ushio (2017) använde t.ex. kvantitativ PCR och interna positiva kontroller för att justera sekvenseringen. Det innebär att forskarna nu sakta kan börja närma sig en lösning för att kvantifiera delar av fiskfaunan med hjälp av flerartsanalyser. Trots det finns både biologisk och teknisk bias som påverkar möjligheten att kvantifiera relativ abundans från flerartsanalyser (Goldberg et al. 2015; Valentini et al. 2016). Inom miljöövervakningen kan detta bli en allt viktigare fråga eftersom flera av nuvarande metoder är ganska grova vid sin bedömning av fiskens status och då kan eDNA vara ett alternativ.

Sammanfattningsvis kan det konstateras att det *inte helt enkelt går att översätta mängd DNA till biomassa*. Mängd DNA är bara just ”mängd DNA”, och huruvida detta korrelerar bra eller dåligt med abundans och/eller biomassa beror på många okända faktorer. Mängd DNA verkar dock i flera fall relatera någorlunda bra till både abundans och biomassa, vilket indikerar någon form av relativ abundans. För att komma närmare ett mer kvantitativt tillvägagångssätt krävs fler forskningsstudier där fler arter och fler samverkande variabler kan undersökas i fler olika typer av vatten.



Figur 14. Dykning i Mälaren för att införskaffa stormusslor till ett akvarieförsök för att testa eDNA-metodik vid SLU Aqua 2015 (foto: Teresa Soler, SLU).

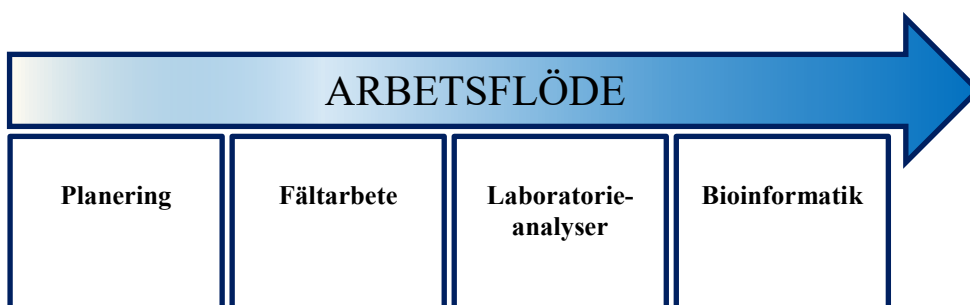
8 Innan provtagningen

Hantering av DNA skiljer sig mycket åt från den traditionella miljöövervakningen av fisk, kräftor och musslor. Ekologer är ofta ovana att använda molekylärbio-logiska metoder i fält. Eftersom eDNA är osynligt vid vattenprovtagningen går det inte att veta *vad* som fångats förrän efter labbanalyserna. Därför är det mycket viktigt att planera arbetet noggrant. Det är bra att tänka igenom sin frågeställning och att använda robusta statistiska metoder vid provtagningsdesign och analys av resultat. Detta kapitel tar upp hur du översiktligt kan tänka då du planerar att genomföra ett eDNA-projekt i fält.

8.1 Planera projektets arbetsflöde

För att bättre planera arbetsgången inom ett eDNA-projekt kan arbetsflödet delas i fyra faser (Fig. 15):

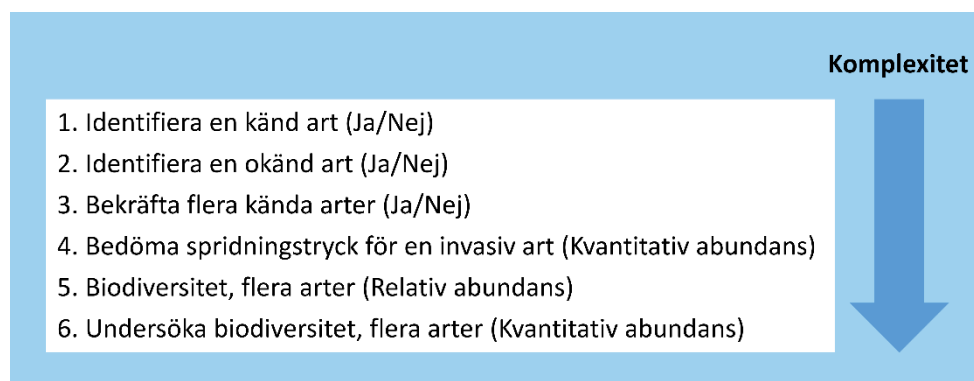
- Planering (frågeställning och projektdesign)
- Fältarbete (provtagning och filtrering)
- Labbanalyser (extraktion och PCR/sekvenseringsanalyser)
- Bioinformatik (utvärdering och bearbetning av resultat)



Figur 15. Arbetsflödets olika faser från planering till bioinformatik inom ett eDNA-projekt (illustration: Patrik Bohman, SLU efter en idé av Hobbs et al. 2016).

Senare kapitel förklarar varje fas i denna metodikkedja, och det är bra att du som projektledare sätter dig in i de olika faserna. På detta sätt kan ett eDNA-projekt delas upp i allt mindre och mer detaljerade delar. Detta leder i sin tur till en ökad kontroll över projektet. Det är bra om du kan ha kontroll över större delen av ditt eDNA-projekt. Vissa laborativa delar kan dock kännas alltför svårgripbara att ha full insyn i. Risken kan också vara överhängande att du väljer en extern utförare som gör allt åt dig i en ”paketlösning”. Trots att detta ofta kan kännas bekvämt så finns vissa problem med denna typ av strategi. Du riskerar t.ex. att förlora kontrollen över delar i projektet och kan sedan få svårt att tolka dina resultat. Du behöver alltså själv vara med att planera upplägget, samt helst även delta vid provtagning i fält, för att få en förståelse för styrkor och svagheter med eDNA-metodiken.

Det är bra att noga förbereda sig innan man åker ut i fält för att provta eDNA. Därför måste frågeställningar och hypoteser klargöras i detalj, eftersom detta avgör hur du sedan lägger upp din studie, samt vilka analyser du bör använda. *Är du ute efter en art eller flera? Är arterna kända eller okända?* Dessa frågor spelar stor roll då du ska designa din provtagning och välja analysmetodik senare i processen (Fig. 49). Beroende på vilka typer av analyser du väljer så blir kostnaderna olika, och olika analyser tar också olika lång tid att utföra. Utifrån detta kunskapsläge förhandlar du även om ett avtal med ett externt laboratorium (se Kontakta ett laboratorium).



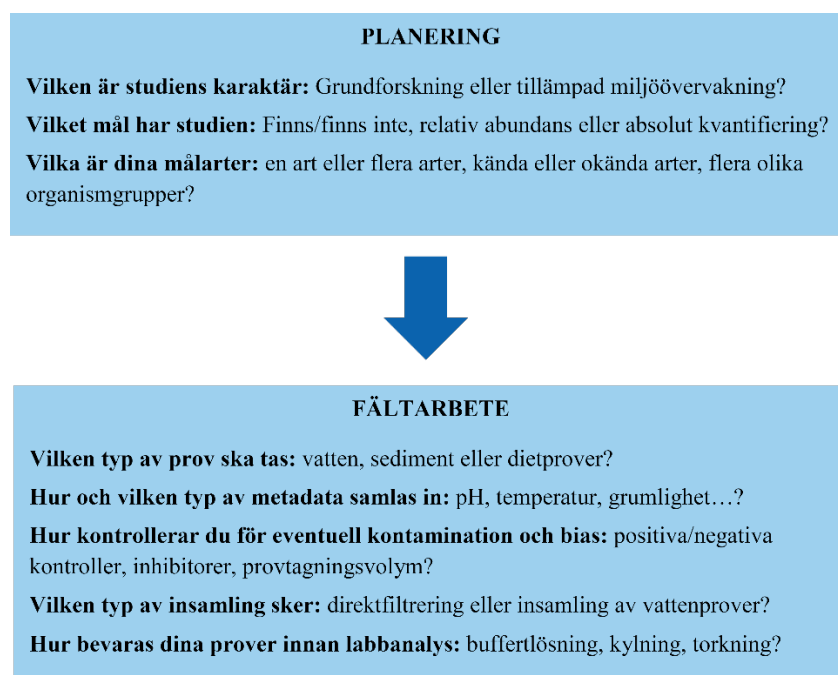
Figur 16. Frågans komplexitet bestämmer hur du bör genomföra fältarbete och labbanalyser (illustration: Patrik Bohman, SLU efter en idé av Darling & Blum 2007).

Formulera tydliga frågeställningar

Om vi återgår till grundfrågeställningen om vad studien ska besvara, så kan man gå från enklare frågor till mer komplexa (Fig. 16). De enklare frågorna är mer kvalitativa (t.ex. *finns arten eller finns den inte*) och behöver därmed inte lika omfattande laboratorieanalyser. Du ökar komplexiteten i din studie genom att analysera flera

arter (metabarcoding), och du höjer ribban ytterligare om du dessutom vill öka kvantifieringsgraden.

Varje fas i Fig. 15 kan t.ex. fyllas av frågor för att bättre förtydliga vad som egentligen behöver utföras i de olika stegen (Fig. 17). *Vad vill du egentligen ha svar på? Vilka arter är du intresserad av? Hur stort är området du vill undersöka? Hur hanterar du eventuella felkällor och bias?* Genom att svara på frågor som dessa kommer eDNA-processen att bli lättare att hantera. Det är också viktigt att veta hur miljön ser ut där du ska provta. Sjöar och vattendrag kan se väldigt olika ut, vilket har betydelse för både planering och utförande (se Provtagning i fält). Områdets storlek är dessutom viktigt, bl.a. när det gäller hur många prover som du behöver ta och hur proverna ska fördelas mellan olika delar av området. Antal prover har även med din ursprungsfråga att göra: *vad ska du studera och hur noggrann är studien?*



Figur 17. Exempel på viktiga frågeställningar vid planering och fältarbete (illustration: Patrik Bohman, SLU).

Använd statistiska metoder

För att optimera ditt upplägg, och därigenom minska både tid och kostnader inom projektet, behöver du även använda dig av vissa statistiska metoder. Det är speciellt viktigt att anpassa din provtagningsdesign statistiskt för att dina resultat senare ska kunna valideras objektivt, med så låg bias som möjligt (Goldberg et al. 2016; Ficetola et al. 2016; Deiner et al. 2017a; Taberlet et al. 2018):

- Kan du dra slutsatser om en population från ditt provurval (dvs. har din studie en godtagbar interferens)?
- Kan du jämföra med tidigare data? För att göra säkrare bedömningar av dina resultat, samt kunna svara på frågor om trender och variationer i data är det viktigt att jämföra med resultat från andra eDNA-studier eller traditionell miljöövervakning (provfisken, dykobobservationer, räkningar etc).
- Finns det tillräcklig statistisk ”styrka” i ditt val av provtagningspunkter och replikat, dvs. har antalet provpunkter anpassats till områdets storlek och slumpmässiga variationer?

Öka möjligheten att finna målarter

Det kan vara svårt att i ett större område peka ut provtagningsplatser för arter som förekommer mycket sparsamt i vattenmiljön. Det finns därmed en överhängande risk att du genomför provtagningar på platser där målarterna egentligen inte förekommer, speciellt vid undersökningar av större områden. Detta kan i sin tur leda till fler ”onödiga” provtagningar, dyrare projekt och därmed minskad kostnadseffektivitet. Därför behöver du metoder som hjälper dig att optimera dina eDNA-provtagningar. Ett sätt att komma förbi detta problem är att använda statistiska metoder som beräknar sannolikheten för var en art påträffas och därmed sannolikheten att finna målarts-DNA (Peterman et al. 2013; Schmidt et al. 2013). Metoderna kallas ofta för *artdistributions-modeller* eller SOM (från engelskans ”species occupancy models”). De använder resultat från tidigare provtagningar eller provfisken, och tolkar dessa som mönster över var arterna upptäckts respektive inte upptäckts. Därefter beräknas sannolikheten för artens detekterbarhet. Baserat på denna sannolikhet blir det möjligt att uppskatta den verkliga andelen platser där arten förekommer. Modellerna togs fram för att försöka lösa problemen med ofullständig upptäcksgrad (MacKenzie et al. 2006). Modellerna kan bidra till att beräkna antalet eDNA-prover som behövs för att komma till en sammanlagd detekteringsgrad (sannolikhet för upptäckt) på 95 % eller mer. För att uppnå detta finns rekommendationer om att minst 20 provpunkter bör användas, men detta varierar beroende på frågeställning och provtagningsområde (Pillipod et al. 2013b; Schmelze et al. 2016).

Tack vare resultatet från dessa modelleringar kan du hitta provtagningspunkter som är mer anpassade för de målarter du är ute efter, istället för att i blindo göra en mängd olika provtagningar som i slutändan ändå inte ger något (se HUR provtar du?). Du kan därmed undvika felaktiga slutsatser pga. ”falsk frånvaro” av målarter, vilket annars kan uppkomma pga. många olika orsaker (Jerde & Mahon 2015; Taberlet et al. 2018). För många ekologiska frågor kan denna typ av modellering också vara användbar för att övervaka en trend i artfördelning med ett successivt minskat

antal provtagningar. Nackdelen med dem är dock att de bara beräknar *andelen* lokaler och inte de *specifika platser* där målorganismer verkligen finns.

Om du ska distributionsmodellera för *flera* arter så måste du istället konstruera en responsvariabel som motsvarar det du vill förutsäga, dvs. genom att kombinera observerade förekomster av arterna. Det kan t.ex. vara en god idé att använda sig av multivariat analys med regressionsträd. Är det få arter det är frågan om (max 3-4) skulle man kunna upprepa analysen ett antal gånger. Det innebär att man istället för ”presence/absence” eller ”presence only” av en art utför analysen med ”presence/absence” alternativt ”presence only” av en given kombination av arter (finns bara art 1, 2 eller 3, finns art 1+2, art 2+3, art 1+3 och finns art 1+2+3 = sju olika analyser om det är tre arter). Sedan behöver du överlagra dessa på något smart sätt. En annan liknande variant är att skapa ett nytt lager som baseras på prediktionerna av förekomsten av de enskilda arterna där du skattar vilken artkombination som är mest sannolik. Prediktioner för hela samhällen är komplicerat och används inte i någon högre utsträckning inom eDNA-metodiken (se dock D’Amen et al. 2017; Kelly et al. 2017).

Det finns många bra och grundläggande böcker om hur du lägger upp en studie, t.ex. *Experimental design for the life sciences* av Graeme Ruxton (Ruxton & Colegrave 2002). Frågeställningar som är av mer vetenskaplig grund och statistisk karaktär måste så klart också ställas, men för detta rekommenderas lite mer djuplodande litteratur (se t.ex. Quinn & Keough 2002). Ytterligare faktorer som kommer att påverka din undersökning diskuteras senare i texten, och har att göra med var, när och hur du bör provta. Idag används eDNA ofta inom olika diversitetsstudier, och en användbar bok är *Biological diversity: frontiers in measurement and assessment* av Anne Magurran (Magurran & McGill 2011).

8.2 Genomför en pilotstudie

Ofta används pilotstudier innan ett större eDNA-projekt körs igång (Goldberg et al. 2016). Pilotstudier kan också genomföras parallellt med huvudprojektet. Fördelen med detta är att du då får tillfälle att testa ut specifika delar i eDNA-processen, i minde omfattning och till en rimlig kostnad. Pilotstudier kan utföras både i mer kontrollerad miljö (mesokosmos) eller ute i naturliga sjöar och vattendrag, men det är viktigt att de är tydligt avgränsade. Om testet faller väl ut så kan man börja tillämpa metoden i mer genomgripande studier. Ett vanligt upplägg är alltså att först testa en särskild metod (t.ex. direktfiltrering med en ny apparat) i en kontrollerad akvariemiljö, och sedan efter utvärdering applicera metoden i naturvatten. Många eDNA-studier som har lyckats detektera arter i akvarier har ibland haft svårigheter att detektera samma arter i naturvatten. Eftersom många av dessa mindre lyckade

studier sällan publiceras, så måste man diskutera direkt med berörd utförare. Lancaster (2002) ger följande generella rekommendationer för pilotstudier:

- Pilotstudier ska ha väldefinierade mål och syften för att säkerställa robust metodik och vetenskaplig validitet
- Analysen av en pilotstudie bör huvudsakligen vara beskrivande eller fokusera på uppskattning av konfidensintervall
- Resultat från hypotesprövning ska behandlas som preliminär och tolkas med försiktighet, eftersom inga formella effektberäkningar (poweranalyser) har utförts
- Man bör fortsätta med huvudstudien även om betydande skillnader upptäcks i pilotstudien

8.3 Utrustningslista för fältprovtagning

Det är viktigt att planera utrustningen i detalj, så att ingenting glöms bort eller missas. Då minskas onödiga förseningar som i sämsta fall kan leda till utebliven provtagning. Utrustningen kan generellt delas in i tre delar:

1) *Specifik utrustning för eDNA-provtagning.* Detta inkluderar utrustning för att överhuvudtaget kunna genomföra en eDNA-provtagning.

- Filtreringsutrustning beroende på uppdragets beskaffenhet, vilket inkluderar peristaltisk pump, filterhållare och filter (se Filtrering)
- Vattenhämtare för ytprovtagning (vattenflaskor) och för djupare provtagning (t.ex. Hydro-Bios ”kontaminationsfria” vattenflaskor; se Hur provtar du?)
- Extra flaskor och slangar till hämtarna (engångsslangar eller desinficerade slangar)
- En kylväska samt buffertlösningar för att transportera filtrat (se Hantering av prover och filtrat)

2) *Utrustning för att minska kontamination.* Det är bra att lägga desinficerad utrustning i plastpåsar för att separera detta från övrig utrustning. Ett alternativ är att använda engångsutrustning.

- Skyddshandskar (1 paket med engångshandskar)
- Desinfektionslösning (t.ex. klorin)
- Natriumtiosulfat (färdigblandat)
- Destillerat vatten
- Mätkärl
- 70 % alkohol
- Kärl att rengöra utrustning i (10 liters hinkar)

- Pincett-kit
- Plastpåsar i olika storlekar

3) *Kringutrustning för att genomföra provtagning.* Detta inkluderar all den utrustning som behövs för att utföra själva fältarbetet, utan att vara särskilt specifik inriktad på just eDNA.

- Det är bra att ha flera kärl och väskor att lägga utrustning i.
- Protokoll för provtagning och metadata över t.ex. vattnets egenskaper
- Karta och GPS för exakt lokalisering av provtagningsplatser
- Utrustning att mäta vattnets egenskaper (pH-mätare, termometer, liter-bägare för färg och grumlighet).
- Gummibåt (inklusive luftpump och lagningsutrustning) med elmotor och bilbatteri är perfekt för mindre sjöar eller lite större vattendrag (Fig. 18)
- Båttillbehör i form av ankare, linor, åror
- Säkerhetsutrustning (flytväst och första hjälpen)
- Gummistövlar/vadarbyxor/regnkläder
- Kniv och multiverktyg
- Guide och manual för utförandet



Figur 18. Gummibåt med elmotor är bra då sjöar och större, lugnflytande vattendrag provtas (foto: Patrik Bohman, SLU).

9 Hantering av förorening och felkällor i fält

En absolut central del vid eDNA-provtagning är att förorening (kontamination) och felkällor hanteras på ett tillförlitligt sätt. Detta är visserligen något som gäller många biologiska dicipliner, inte minst inom ekologin. Men du måste tänka på att detta är molekylärbiologiska metoder som appliceras på ekologiska frågeställningar, vilket påverkar sättet för hur felkällor bör hanteras (Yoccoz 2012; Port et al. 2016; Deiner et al. 2017a). Kontamination sker pga. att det kommer externt DNA i proverna, vilket ger felaktiga resultat. Därför behöver risken för kontamination minimeras, vilket bl.a. görs genom desinficering av utrustning. För att få kontroll över var i metodik-kedjan som en eventuell kontamination uppkommer behövs så kallade negativa och positiva kontroller (Darling & Mahon 2011; Dejean et al. 2012). Det kan också vara bra att göra någon typ av statistisk kontroll av detektionsgraden av eDNA, men detta kräver ofta tillgång till tidigare mätdata (Jerde & Mahon 2015). För att minska eventuella slumpmässiga felaktigheter vid provtagningen är det också viktigt att du tar flera stickprov (Prosser 2010; Ficetola et al. 2015).

9.1 Minimera risken för kontamination

Kontamination kan förekomma i många former. Mestadels handlar det om att vattenprover förorenas med externt DNA från andra provtagningsplatser. Anledningen kan vara att utrustningen inte blivit tillräckligt desinficerad. Man upptäcker denna typ av förorening med olika kontroller (se nedan). I vissa fall upptäcks inte kontamination förrän vid PCR. Både Wilcox (2016) och Agersnap (2017) upptäckte på detta sätt att deras klorinrengöring av utrustningen inte var tillräckligt effektiv. Wilcox var till slut tvungen att använda engångsutrustning.

Gör upp ett flödesschema

Ibland är det svårt att i förväg veta varifrån en eventuell kontamination kommer. Det kan t.ex. ha att göra med att du inte ”tänker dig för” eller använder rutiner som

känns som självklara för denna typ av provtagning. Därför är det viktigt att du försöker rita upp ett flödesschema över hur provtagning, filtrering etc. går till, och var i denna kedja som proverna kan tänkas kontamineras. När du har ett färdigt flödesschema är det också lättare att få en helhetsbild över hur du praktiskt tar itu med olika typer av föroreningar. Du kommer kanske att inse att en viss typ av hantering av material eller metodik måste ske lite annorlunda än vad du är van vid.

Förorena inte provtagningsplatsen

Då du kommer till en provtagningsplats gäller det att minimera möjligheterna till kontaminering (Fig. 19). Genom att t.ex. undvika att gå i vattendraget eller i dammen som ska provtas, minskas risken att kontaminera platsen. Om du är tvungen att gå i vattnet, t.ex. vid realtidsfiltrering, så bör prov samlas in genom att gå mot strömmen. Själva provtagningen görs alltid uppströms från den plats du själv står. Då du provtar flera punkter i ett och samma vattendrag så börja nedströms och gå uppströms! Tänk också på att inte röra upp sediment, i vilket det kan ligga gammalt DNA.

Ha kontroll på oförutsedda utsläpp av DNA

Kontamination av provtagningar kan också äga rum om det finns ”utsläpp” av DNA vid provtagningsplatsen. Detta kan ske om t.ex. nätfiske pågår i sjön och provtagningspunkten sker i närheten av själva nätfisket. Eftersom fiskarna i näten avger en större mängd DNA än vad du normalt får i dina vattenprov, kan du få felaktiga resultat. Tänk då på att separera, och helst tidigarelägga, eDNA-provtagningen i förhållande till annan typ av provtagning (t.ex. nät-, ryssje- eller burfiske) inom provtagningsområdet. Det kan tyckas självklart att man inte ska hantera samma material som tidigare använts vid provfiske då man genomför eDNA-provtagningar i vattnet. Det har också visat sig att fiskar avger betydligt mer DNA då de äter (Klymus et al. 2014). Vid en eDNA-studie av fisksamhällen i den japanska Maizuribukten upptäckte forskarna stora avvikelser i både artrikedom och DNA-halt i sina prover (Yamamoto et al. 2016). Det visade sig att det slängdes stora mängder fisk från en lokal fiskmarknad i bukten, vilket påverkade resultatet. Det finns även risk att vattnet du provtar förorenas av andra arter, t.ex. fåglars fekalier eller döda kadaver (Dunker et al. 2016).

Skölj inte med sjövatten mellan provtagningar

Anledningen är att vattnet kan tillföra extern DNA. Klorin används för desinficering (se nedan). SLU Aqua testade att skölja Rambergsrör (Fig. 29) med enbart sjövatten mellan olika provtagningar i Öre sjö i Västra Götaland. Det visade sig att röret inte blev helt rengjort, utan förde med sig små mängder av flodkräft-DNA mellan provplatserna, vilket upptäcktes vid qPCR-analys (Bohman 2016).



Figur 19. Det är viktigt att inte kontaminera prover med DNA från andra provplatser. Använd därför alltid engångshandskar och desinficerad utrustning (foto: Patrik Bohman, SLU).

Desinficera din utrustning med klorin

Det är viktigt att effektivt rengöra din utrustning, hittills har detta ofta skett med hjälp av utspädning av klorinkoncentrat (Prince & Andrus 1992; Kemp & Smith 2005; Fig. 20). All typ av provtagningsutrustning som flaskor, vattenhämtare, slangar etc. desinficeras innan användning. Det är viktigt att rengöra utrustningen mellan olika provtagningar och lokaler. Generellt används 10 % klorinlösning för desinficering, men vid svåra fall av kontamination har upp till 50 % klorinlösning använts (Wilcox et al. 2017). På senare tid har det upptäckts att kommersiellt klorin inte ger tillförlitlig utspädningsprocent vid tillblandning (Van Rooij et al. 2017). Eftersom klorin kan variera i koncentration beroende på tillverkare och tillverkningsland, kan ibland en lägre % lösning erhållas vid tillblandning. För att neutralisera klorin, och ta bort dess avdödande effekt, används 5 % natriumtiosulfat-lösning. Du desinficerar på följande sätt:

- *Provtagning, replikat och platser.* Du desinficerar oftast din utrustning innan du förflyttar dig till nästa plats. Du kan också behöva desinficera utrustningen *innan* första provtagningen i fält, speciellt om du inte har förslutit den väl efter tidigare rengöring. Beroende på din frågeställning kan du även rengöra mellan de olika replikaten, som då utförs vid samma plats. Rengöring mellan varje replikat tar givetvis längre tid i fält, och ska studien svara på mer kvalitativa frågor (finns/finns inte) kanske detta inte behövs.
- *Desinficering.* Rengör med 10 % klorinlösning. För rätt tillblandning se tillverkarens rekommendationer, men en grov uppskattning kan göras enligt tabell 1.

Utrustning läggs i ett desinficeringsbad och utsidor besprutas med desinficeringslösning. Låt delarna ligga i en hink med desinficeringslösning 10-15 minuter. Filterslangar kopplas till en peristaltisk pump som pumpar desinficeringslösning genom slangarna (Fig. 20). När koncentrerad klorin späds ut är det bra att skriva datum och tid, eftersom lösningens hållbarhet är 24 timmar.



Figur 20. Vänster: desinficering av utrustning i ett hinkbad. Höger: besprutning med desinficeringslösning (foto: Patrik Bohman, SLU).

- *Natriumtiosulfat*. Natriumtiosulfat neutraliserar det klor som finns kvar, som annars skulle kunna avdöda DNA i dina prover. Skölj därför all klorinbehandlad utrustning med 5 % natriumtiosulfat-lösning (tabell 1). Utsidor på t.ex. filterhållare sprutas med natriumtiosulfat-lösning. Filterslangar kopplas till en peristaltisk pump som pumpar natriumtiosulfat-lösningen genom slangarna.
- *Etanol*. Skölj med 70 % alkohol; låt torka/dunsta. I fält hoppar man ibland över detta steg för att spara tid.

Tabell 1. Spädningstabell för 5 % natriumtiosulfat och 10 % klorin. Tillblandning för rätt % beror på tillverkare och tillverkningsland. Kontrollera därför alltid tillverkarens rekommendationer vid inköp.

| Slutlig volym (liter) | 5 % natriumtiosulfat (gram) | Vatten (liter) för blandning av klorin | 10 % Klorin (liter) |
|-----------------------|-----------------------------|--|---------------------|
| 1 | 50 | 0,9 | 0,1 |
| 5 | 250 | 4,5 | 0,5 |
| 10 | 500 | 9 | 1 |
| 20 | 1000 | 18 | 2 |

Desinficeringsalternativ till klorin

Ofta används etanol tillsammans med klorin för att desinficera utrustning i fält (Shaw et al. 2016), men i vissa studier har enbart etanol använts med gott resultat (Harper et al. 2018b). Istället för klorin har forskare föreslagit användning av Virkon® Aquatic (från företaget DuPont i USA). Virkon® Aquatic används idag vid vissa fiskodlingar i USA. De verksamma substanserna (samma som i Virkon S) är mindre hälsovådligt än klorin och ger dessutom en mer tillförlitlig tillblandning från koncentrat (Van Rooij et al. 2017). Även den fasta substansen natriumhypoklorit, som ingår i klorin, kan användas (10 % lösning) för att desinficera utrustning (Yamamoto et al. 2016; Ushio et al. 2017). Eftersom verkningsgraden för kommersiellt klorin kan variera, ger detta tillvägagångssätt en mer tillförlitlig tillblandning. Det klassiska sättet att autoklavera utrustning (värma till ca 121 grader Celsius i 45 minuter) används ofta för mindre utrustning på labb (Tucker et al. 2016), men kan inte helt ta bort spår av DNA (Van Rooij et al. 2017). Autoklivering är inte heller användbart för större utrustning eller i fält.

Engångsutrustning

Ibland är risken för kontamination så pass stor att du är tvungen att använda engångsutrustning, t.ex. silikonslangar (Bergman et al. 2016). Detta blir så klart mer omständligt i fält, med bl.a. mer utrustning att ha kontroll över. Men eftersom det fortfarande finns kontaminationsrisk efter desinficering (Agersnap et al. 2016; Wilcox et al. 2016), och beroende på undersökningens noggrannhet, så kan det vara aktuellt att använda engångsutrustning (Wilcox et al. 2016).

9.2 Använd olika typer av kontroller

När vattenprover analyseras så är risken stor att några av proverna inte visar på någon ”träff”, trots att arterna egentligen förekommer på platsen. Detta kallas för falska negativa, eller typ II fel. Det kan antingen bero på att du misslyckas med att fånga upp målartens DNA vid provtagningen, eller att det DNA som fångas upp av någon anledning inte registreras vid analyserna. Det finns också risk att du får träff på arter som egentligen inte förekommer i vattnet du undersöker, s.k. falska positiva eller typ I fel. Falska positiva uppkommer när dina vattenprover har kontaminerats med DNA utanför det system du analyserar eller om felaktigheter uppkommer vid senare labbanalyser. För att få en översikt över var eventuella föroreningar eller avvikelser sker i ditt flödesschema, så är det bra att genomföra olika typer av kontroller. Idag finns det inga egentliga riktlinjer för hur många kontroller som bör användas. Ofta är det en kompromiss mellan hur noggrann du vill vara och hur mycket det hela får kosta. Olika forskare ger lite olika rekommendationer (Darling & Mahon 2011; Goldberg et al. 2016; Ficetola et al. 2016; Taberlet et al. 2018). Du kan öka

antalet kontroller och använda kontroller i olika steg under arbetets gång för att mer i detalj upptäcka var en eventuell kontamination uppträder. Då en kontamination har upptäckts måste du stega tillbaka i flödesschemat och åtgärda detta. Sedan genomförs nya prover med kontroller för att säkerställa att kontaminationen inte har skett vid samtliga provtagningar. Detta tar tid och kostar pengar, vilket innebär att du redan från början måste genomföra dekontaminering och använda rekommendationerna ovan.

Negativa kontroller

Negativa kontroller (kallas även 0-prov eller blankprov) används för att kontrollera kontamination vid fält- och laboratoriearbete. Rent praktiskt innebär detta att du använder prov som inte innehåller något målarts-DNA alls. Helst vill du använda vatten från en sjö eller ett vattendrag i närområdet där du vet att målarterna inte förekommer. Om du är osäker på detta så går det också att använda destillerat vatten för detta ändamål. De negativa kontrollerna får sedan genomgå exakt samma procedurer som dina andra prover (filtrering, provhantering, extraktion, PCR etc.). Resultatet ska sedan inte påvisa något målarts-DNA överhuvudtaget. Gör det detta så har du kontaminerat ditt prov.

Positiva kontroller

Positiva kontroller liknar de negativa, men är dess egentliga motsats. Det innebär att du tillsätter en känd mängd halt av målarts-DNA i dina positiva kontroller. Ofta kommer detta DNA från en exotisk art som absolut inte kan förekomma i det system som du provtar. Du måste dock kunna använda samma typ av markörer och primers för detta externa DNA (som för övriga arter i din undersökning). Du måste vara mycket noggrann med hur du handskas med positiva kontroller, så att de inte sker onödig kontamination av andra prover eller i olika delar av processen. Positiva kontroller får, på samma sätt som de negativa, genomgå exakt samma procedurer som dina andra prover. De kan upptäcka om det finns problem med:

- att få filter att fungera (och fånga upp målarts-DNA)
- DNA-extraktionen (du får inte ut tillräcklig mängd DNA från dina prover)
- specificiteten vid markörval eller primerframställning
- PCR-amplifieringen (PCR kopierar inte tillräckligt med ursprungs-DNA)

Statistiska kontroller

För att öka träffbilden kan du använda dig av flera olika statistiska verktyg. En vanlig metod är att först genomföra specifika pilotexperiment i naturvatten och sedan använda dessa experimentella data i statistiska modeller, t.ex. för att beräkna detektionsgraden av eDNA (Wilcox et al. 2016). Olika typer av binomiala regressionsmodeller har ofta använts för att reda ut förhållandet mellan positiva och negativa

provsvar av eDNA (Song et al. 2017). Mängder av andra statistiska modeller har använts för att mäta hur olika parametrar i naturen påverkar upptäckten av DNA. En statistisk metod som har blivit alltmer populär inom eDNA-studier på senare tid är art-distributions modellering (SOM) som tidigare diskuterats (se Planera projektets arbetsflöde). SOM-modellerna kan användas för att optimera provtagningsdesign och för att beräkna sannolikheten för falska negativa (Schmidt et al. 2013; Schmelze et al. 2016). För att säkerställa dina data och förbättra dina statistiska modeller kan även olika osäkerhetsanalyser användas, vilka ger en uppskattning på modellernas prediktionsosäkerhet för respektive ingående parameter (Burman et al. 2015). Osäkerheten kan även uppskattas med enklare statistik i form av standardavvikelse/varians eller ett konfidensintervall, utifrån studiens samlade data. Om fördelningen av osäkerheten inte sker symmetriskt över värdena, eller är multimodal (dvs. har flera ”toppar” och inte är normalfördelad), är standardavvikelsen dock ett trubbigt mått och hela sannolikhetsfördelningen bör istället ritas upp.

Använd fler replikat

Genom att använda flera replikat (delprov) vid varje provpunkt så ökas möjligheterna att kvantifiera resultaten. Detta ökar möjligheterna att uppskatta sannolikheten för målartsdetektion samt att beräkna osäkerheten av t.ex. falska negativa. Det hela beror på frågeställning, hur stor noggrannhet som behövs och hur mycket det hela får kosta. Inte heller här finns det några specifika riktlinjer.

Mät metodens effektivitet

Effektivitet och mätosäkerhet kan bedömas genom att jämföra med provtagningsmetoder som använts tidigare i området. Dock är det ju så att eDNA-metodiken ofta är betydligt mer känslig när det gäller arter som förekommer sporadiskt eller sällsynt på platsen. Dessa arters förekomst är mycket svåra att spåra med hjälp av annan typ av provtagning. Det kan därför vara svårt att verifiera en eDNA-provtagning med mer traditionella provtagningsmetoder, eftersom du riskerar att inte alls få tag på målarterna. Det är ändå bra att utföra eDNA-provtagningen inom områden som tidigare har utvärderats med avseende på arter och biodiversitet. Många studier har utfört traditionell provtagning (elfiske, nätprovfiske, burfiske etc) samtidigt som eDNA-provtagning har skett för att på detta sätt utvärdera metodens effektiva fångstbarhet (Thomsen et al. 2016; Wilcox et al. 2016).

10 Provtagning i fält

Under fältarbetet samlas prover in och filtreras. Filtraten transporteras sedan i provrör till ett laboratorium. Detta kapitel förklarar var, när och hur du tar vattenprover med eDNA från fisk, kräftor och musslor (Fig. 21). Möjligheten att finna det du söker kommer att variera och beror på en mängd olika faktorer, bl.a. på mål-arternas ekologi/habitatval, hur många individer som passerat lokalen, vattnets egenskaper och säsongsmässiga variationer, samt vilka metoder som används vid insamling och analys.



Figur 21. Det är viktigt att projektgruppen noggrant planerar VAR och NÄR provtagningen ska ske, samt HUR det hela ska utföras. På bilden planerar länsstyrelsen i Värmland provtagning av kräftpest-sporer i Billan 2017 tillsammans med SLU Aqua, Kräftmannen AB och Veterinärinstitutet från Norge (foto: Patrik Bohman, SLU).

10.1 VAR provtar du?

Oberoende på om du vill studera enskilda arter eller artsamhällen inom ett enskilt, mindre vatten eller i ett större avrinningsområde måste du utgå från vattnets morfologi och rörelse.

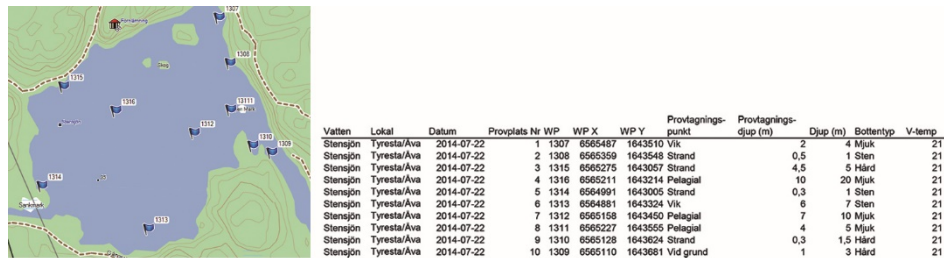
Dammar, kärr och våtmarker

I mindre dammar, kärr eller våtmarker där vattnet är relativt avsnört och stillastående behöver du inte göra lika omfattande provtagning som i sjöar och vattendrag. DNA finns ofta i större koncentrationer till skillnad från sjöar eller vattendrag som har större vattenvolymer, snabbare omsättningstid och större utspädningseffekt. Trots detta kan det vara svårt att göra en representativ provtagning och öka detektionen av eDNA (Harper et al. 2018a). Flera av de studier som gjorts i dammar har använt mindre provvolymer, baserat på Ficetolas fällningsexperiment från 2008 (Ficetola et al. 2008; Tréguier et al. 2014; Sigsgaard et al. 2015; Buxton et al. 2018; Mauvisseau et al. 2018; se Fällning av vattenprover). Vissa organismer, som kräftor, kan ibland ge varierande resultat ofta helt beroende på insamlingsmetodik och primerval (Trégier et al. 2014; Geerts et al. 2018; se Artidentifiering med markörer och primers).

Sjöar

I en sjö kan mängden DNA variera stort, beroende på om provet tagits i ytan, mitt ute i sjön, nära botten, vid vassbälten eller i strandkanten (Eichmiller et al. 2014). Därför är det bra att föra protokoll över exakt var provpunkterna läggs (Fig. 22). Variationen beror dels på målarternas inbördes ekologi och levnadsmönster i själva provtagningsområdet, men även på strömförhållanden och DNA-partiklarnas rörelser (Barnes & Turner 2016). Hur DNA rör sig i sjöar är fortfarande ganska okänt. Om en sjö ska provtas med avseende på eDNA, så är det därför viktigt att du täcker in många olika typer av miljöer (Fig. 22). Samtidigt beror det också på vilka arter du är ute efter, t.ex. musslor eller kräftor som rör sig nära botten eller fisk i vattenmassan (se Målarternas ekologi bestämmer). Var du provtar beror också på sjöns storlek, omsättningstid och flikighet (hur många isolerade vikar den har). Det kan därför vara en god idé att studera vattnets flöde genom sjön, för att få en bild över hur partikelbundet DNA rör sig med vattnets strömningar (Song et al. 2017). Flera eDNA-studier använder provtagning utmed transekter för att göra metodiska mätningar (Civade et al. 2016; Hänfling et al. 2016). Hänfling (2016) visade då att det är möjligt att använda vattenprovtagning på olika djupnivåer (1-20 meter) för att beskriva hela fisksamhällen i större sjöar. Arternas relativa abundans från eDNA-analyserna visade sig också stämma väl överens med tidsserier från tidigare nätprovfisken i sjöarna. I andra studier har provtagningarna slumpats ut över hela sjön

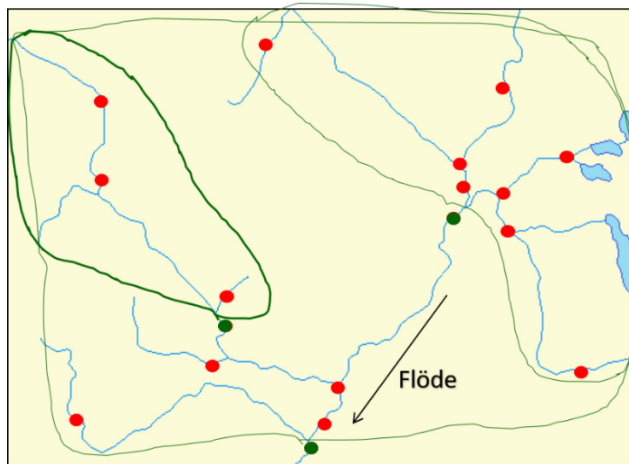
(Keskin et al. 2016; Lacoursiere-Roussel et al. 2016b). Keskin (2016) använde provtagningar i övre vattenskiktet (1-5 meters djup) i en större sjö i Turkiet och påvisade fler arter än vad som tidigare varit känt. Ytterligare studier har följt strandlinjen och tagit regelbundna provtagningar (Dunker et al. 2016; Stoeckle 2017b).



Figur 22. Exempel på olika provtagningspunkter och djup från SLU Aquas eDNA-projekt i Stensjön, Tyresta nationalpark 2014 (Bohman 2016).

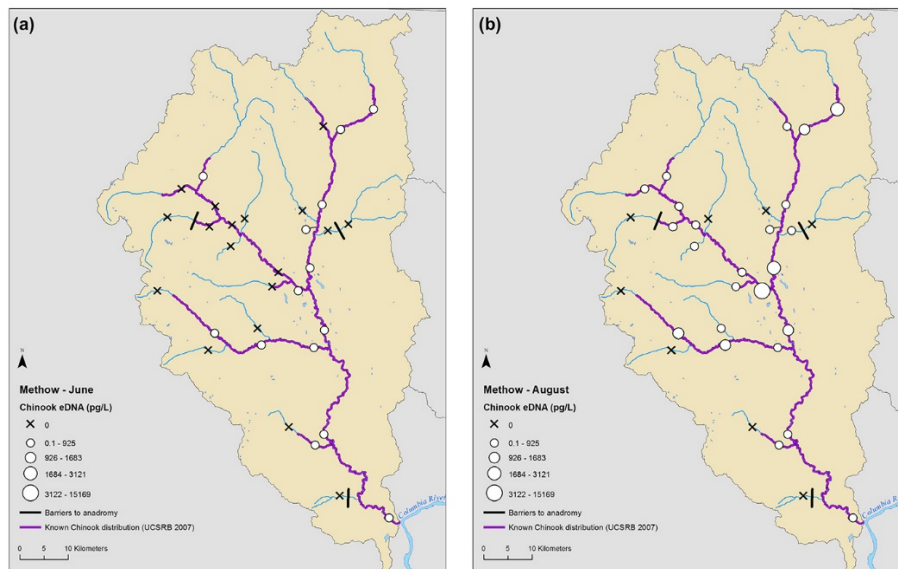
Vattendrag

Även i vattendrag kan mängden DNA variera, beroende på var proverna tas (Phillipod et al. 2013b; Macher & Leese 2017). Denna variation är dock inte lika stor som i lentiska system (Harper et al. 2018a). Transporten av DNA är beroende på vattendragets storlek, och i större vattendrag kan DNA detekteras från ett par till flera hundra kilometer nedströms ursprungskällan (Deiner & Altermatt 2014; Pont et al. 2018). Detta medför stora möjligheter när det gäller t.ex. biodiversitetsundersökningar i delavrinningsområden. Ju längre ner i avrinningsområdet du provtar desto större yta uppströms täcker du teoretiskt in (Fig. 23). Samtidigt minskar dock möjligheten att upptäcka var målarter finns eftersom du riskerar att komma allt längre ifrån själva DNA-källan. Även om DNA kan transporteras långt nedströms innan det inte längre kan detekteras, så visar flera studier på betydligt kortare transportsträckor då detektionsgraden minskar redan från ett 10-tal meter (Stoeckle et al. 2015) till ett par hundra meter nedströms källan (Jane et al. 2015). Det innebär också att du måste fundera på vattnets strömningar för att kunna ta reda på var källan till ditt målarts-DNA kan finnas. Lokaliseringen av DNA:s ursprung kan försvåras om vattendraget har flera förgreningar uppströms, samt om det finns dammar/sjöar i flödet, eller kraftverk/oppdämningar. Det innebär att du måste fundera på en väl avvägd provtagningsdesign och kanske provta minst i varje nod/delning av vattendragen (Fig. 23).



Figur 23. Provtagning inom delavrinningsområden. Röda punkter markerar noder som bör täckas in vid provtagningen. Gröna punkter anger lägsta provtagningspunkt för delavrinningsområdet (markerat med grön linje). Illustration: Patrik Bohman, SLU.

För att spara in på ekonomin, så utförs ibland alltför få mätningar, vilket minskar upplösningen då du ska tolka dina resultat. Det blir t.ex. svårt att dra slutsatser för hela avrinningsområdet endast utifrån ett fåtal mätpunkter längst ner i



Figur 24. Undersökningsområde för Laramie-studien. Cirklarnas storlek visar mängd DNA per prov mellan olika årstider (ju större cirkel, desto mer DNA). Kryss betyder att inget DNA återfanns. Vänstra kartan visar provtagningar under juni och högra kartan under augusti. Källa: Laramie et al. 2015a.

avrinningsområdet (gröna punkter i Fig. 23). Även om du får träff på DNA, så talar inte resultatet om VAR fisken finns, eller hur många/hur stora fiskarna är. Det är alltså svårt att svara på om fisken finns i stora mängder längst upp i källsjöarna eller om de förekommer i mindre mängd, men mer stabilt, i hela systemet. Laramie följde kungslax (*Oncorhynchus tshawytscha*) i några vattensystem i Kanada (Fig. 24; Laramie et al. 2015a). Laramie och hans kollegor visade att det mycket väl går att följa mängden DNA och då även uppskatta mängden fisk med hjälp av vattenprover. För att kunna dra slutsatser från resultaten var de tvungna att använda ganska många provpunkter. Dessutom visar undersökningen (då provtagningar genomfördes både i juni och augusti) att fisken byter habitat under säsongen. Undersökningen visar på möjligheter att använda eDNA inom större avrinningsområden, men att det är viktigt att anpassa antalet provpunkter till sin frågeställning.

Trots vissa svårigheter att dra slutsatser utifrån enstaka provpunkter, så visar flera studier att större avrinningsområden kan täckas in vid eDNA-provtagningar (McKelvey et al. 2016; Shaw et al. 2016). En studie har dessutom visat att det går att provta ett avrinningsområde och täcka in både organismer från land och vatten samtidigt (Deiner et al. 2016). Deiner och hennes forskarlag visade att vattendrag (som ingår i floden Glatts avrinningsområde) är som ”transportband av bioinformation”. DNA från olika organismer (de undersökte insekter) i närliggande områden spolas ut i vattnet och kan sedan provtas och artbestämmas. Deiner bestämde många fler familjer och arter via DNA-teknik än vad som gjordes genom manuell artbestämning. Dock har denna studie senare kritiserats för stora brister i metodiken, bl.a. för att både biologiska och tekniska replikat saknas, att alltför långa markörer har använts, samt att det förekommit brister både vid skapandet av sekvensbiobliotek och vid tolkningen av resultaten (Taberlet et al. 2018).

Ytsediment

Mycket av organismers DNA faller ner till botten och ”försvinner” från vattensystemet. I sediment kan DNA bevaras under mycket lång tid, speciellt under syrefria förhållanden (Thomsen & Willerslev 2015; Turner et al. 2015). Om du vill veta vilka arter som finns i sjön/vattendraget just nu så bör du därför inte beröra sedimenten vid vattenprovtagningen (Tréguier et al. 2014). Beroende på din frågeställning kan det visserligen vara intressant att undersöka sedimenten för att studera vilka arter som funnits i systemet tidigare. Sedimentprovtagning av det *översta skiktet* har dock visat sig fungera för sötvattenfauna, genom att påvisa höga koncentrationer DNA från fisk (Turner et al. 2015). Organismer som är stationära på botten och vars DNA av olika anledning har svårighet att detekteras i den övre vattenmassan (t.ex. kräftor och musslor), bör därför kunna studeras med ytsediment. Flera studier har dock visat att provtagning av ytsediment ger sämre resultat än vid prov-

tagning i själva vattenmassan, åtminstone då det gäller fisk (Shaw et al. 2016; Buxton et al. 2018). Metodiken för att provta sediment skiljer sig en del från provtagning av vatten. Ofta används en annan provtagningsteknik, homogenisering av prover och andra typer av extraktionskit (Turner et al. 2015; se DNA-extraktion). Sedimentprovtagningar har dessutom, likt jordprover, stora slumpmässiga skillnader beroende på var provet tas, med större variation än vid vattenprovtagning. Resultaten kan därför variera stort även mellan närliggande provtagningar (Clemmensen et al. 2016), vilket därför bör inkludera fler replikat.

10.2 NÄR provtar du?

Vattnets strömningar och arternas levnadsätt är säsongsb beroende. Möjligheten att fånga upp eDNA har därför visat sig påverkas av målarternas säsongsakтивitet (Fig. 24; de Souza et al. 2016; Erickson et al. 2017; Smith 2017; Stoeckle et al. 2017b; Buxton et al. 2018), födobeteende (Klymus et al. 2015) och parningstid (Strobel et al. 2017; Tillotson et al. 2018). När det gäller fisk och kräftor så är deras rörelsemönster och födobeteende till stor del temperaturberoende. Under vintern är många akvatiska organismer relativt inaktiva, men då temperaturen ökar under våren blir de alltmer aktiva. Under de säsonger då fiskens tillväxt och födobehov ökar, bör även mängden DNA i vattnet öka. Det mesta DNA som utsöndras från karpfisk sker i t.ex. form av fekalier då de äter (Klymus et al. 2015). Även leken alstrar mycket DNA i vattnet (Byleman et al. 2017; Tillotson et al. 2018).

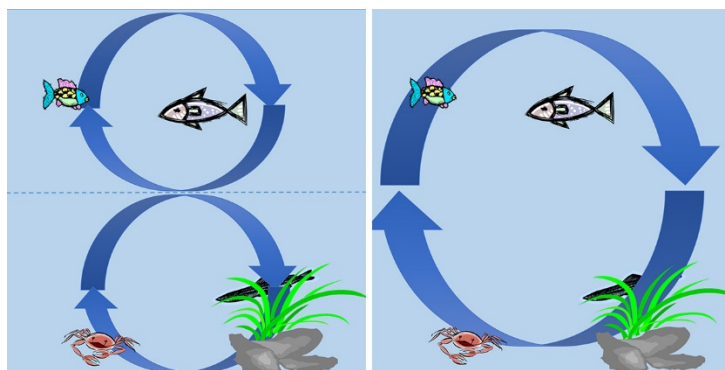
Beroende på frågeställningen så är de varmaste månaderna under sommaren inte alltid de bästa för eDNA-provtagning, bl.a. för att djupare sjöar skiktas, många fiskars födobeteende minskar och mängden alger, bakterier och organiska föreningar ökar. Det innebär att vi kanske förväntar oss mer DNA i vattnet under vår/försommar och höst än under sommar och vinter, men detta kan växla beroende på arternas beteende. Vissa arter som rör sig i vattendragen (t.ex. laxartad fisk) kan öka sin aktivitet under vår och höst, eftersom migrerande arter är beroende av optimala vattenflöden, temperaturer och ljus (Jonsson 1991; Yamanaka & Minamoto 2016). eDNA-provtagningar på vintern kan vara sämre för att spåra arter, pga. att många varmvattenarter blir inaktiva (Buxton et al. 2018). Detta gäller dock inte för de kallvattenarter som är aktiva under vintern. Vintervattnen har ofta en betydligt lägre mängd störande element av alger, bakterier och organiska föreningar, och dess kallare temperatur (samt minskad solinstrålning) bevarar DNA bättre. För att reda ut när optimala provtagningsförhållanden råder är det viktigt att studera olika arter under olika säsonger i både vattendrag och sjöar.

Inhibitorer är molekyler och jonföreningar (t.ex. humus och organiska föreningar, metalljoner och salter) som minskar möjligheten att finna målararter genom

att hämma PCR-amplifieringen. Inhibitorer förekommer rikligt i svenska vatten, främst i form av humus (Tumdedo et al. 2010), och mängden varierar med årstiden (Heikkinen 1990). Vid ökad nederbörd ökar ofta halten organiskt material i vattnet (Matheson et al. 2010). Under sommaren då temperaturen höjs i både sjöar och vattendrag ökar ofta vattenfärgen, vilket innebär större koncentration av organiska föreningar. Detta minskar generellt under våren och vinterhalvåret, men ökar igen under hösten då många vattendrag har högflöden (Tumdedo et al. 2010). Små vattendrag har även visat sig innehålla höga koncentrationer av organiska ämnen under hösten då lövfällning påverkar vattenkvaliteten (Jane et al. 2015).

Sjöar

Under sommar och vinter är många medeldjupa sjöar i Sverige skiktade, vilket innebär att hela vattenmassan inte rörs om på samma sätt som under våren och hösten (Fig. 25). Vill du minimera antalet provtagningspunkter för att ta reda på vilka fiskarter som finns i en sjö kan det därför vara värt att invänta vår eller höst. Enliters prover tagna under våren på 0-5 meters djup har t.ex. kunnat avslöja sjöars fiskfauna med relativt få provtagningar (Lacoursiere-Roussel et al. 2016b). Våren valdes ut som provtagningsperiod eftersom sjöns vattenmassa (och därmed även eDNA) då blandas om mer homogent, vilket även har bekräftats i andra studier (Fossoy et al. 2017). I grundare sjöar (medeldjup < 3 meter) sker dock ingen nämnvärd skiktning under sommar/vinter. Beroende på fiskars födobeteende och rörelser kan det också vara en god idé att provta under våren eller försommaren. Många arter leker dessutom under februari-april eller maj-juni, vilket ökar sannolikheten att finna mer DNA i vattnet under dessa perioder. Vill du däremot uppskatta arters abundans mellan olika habitat, så kan provtagning ske vid flera olika säsonger under året. Dessutom skiljer sig varm- och kallvattenarters rörelsemönster åt, vilket innebär att den säsong som du väljer att provta i slutändan är helt beroende på din frågeställning.



Figur 25. Vänster: under sommar/vinter skiktas medeldjupa sjöar, vilket medför en sämre genomströmning i hela vattenmassan. Höger: under vår och höst, då termoklinen försvinner, rörs vattnet om i hela sjön (illustration: Patrik Bohman, SLU).

Vattendrag

När det gäller provtagning i vattendrag, så kan det kännas logiskt att genomföra dessa under lågvattensåsongen eftersom högvattenflöden (under vår och höst) spädder ut koncentrationen DNA i vattnet. Men riktigt så enkelt är det inte. Jane och hans kollegor studerade möjligheten att upptäcka eDNA i två vattendrag i USA (Jane et al. 2015). Vid låga flöden var detektionsgraden som högst närmast eDNA-källan och minskade sedan snabbt nedströms. Vid de högsta flödena var detektionsgraden låg både vid källan och långt nedströms. Smith visade (2017) att höga flöden och turbulenta vattendrag påverkar möjligheterna att identifiera målarter negativt (Fig. 26). Samtidigt har studier (Deiner et al. 2016) visat att fler organismer sköljs ut i vattendragen vid ökade regnmängder, vilket också ökar mängden arter du kan upptäcka i dina prover. Detta kan vara en fördel då du t.ex. studerar biodiversitet för ett flertal organismer inom ett område. Lokala förutsättningar skiljer sig åt mellan olika vattendrag, vilket gör att mängden eDNA kommer att variera beroende på biologiska och abiotiska förhållanden på platsen (Barnes & Turner 2016). Mestadels beror detta troligen på en kombination av vattendragets storlek, vattenturbulens, samt sedimentering och utspädning av eDNA (Jane et al. 2015; Pont et al. 2018).



Figur 26. Höga flöden och turbulenta vattendrag kan påverka dina chanser att finna målarter (foto: Patrik Bohman, SLU).

eDNA har visat sig vara en bra metod för att påvisa hur arter rör sig i vattendrag under olika årstider. I en japansk studie av säsongsmigrerande fiskarter hittade forskarna intressanta samband som visade att flodbarriärer inte stoppade fiskar från att ta sig upp i flodsystemet från kusten, vilket man tidigare trott (Yamanaka & Minamoto 2016). Forskarna kunde härigenom använda eDNA för att påvisa sammanhängande kopplingar mellan olika fragmenterade habitat.

10.3 HUR provtar du?

Provtagningen kan delas in efter hur den utförs, t.ex. genom:

- Punktinsamling
- Kontinuerlig provtagning
- Fjärrstyrd provtagning

Hur du provtar har också att göra med vilken typ av utrustning som används. Provtagning av eDNA ställer betydligt högre krav på själva utrustningen än vid traditionell miljöövervakning. Det främsta skälet är risken för kontamination. När du väljer utrustning för eDNA-provtagning i vatten är det därför viktigt att den är lätt att rengöra, förutom att den är enkel att hantera i fält. Tillvägagångssättet för vattenprovtagning är antingen att endast hämta vatten eller att samtidigt filtrera (se Filtrering).

Punktinsamling vid ytan

Då du provtar ytvatten håller du en vattenflaska en dm under vattenytan och öppnar locket under ytan. Låt vattnet rinna in och slut återigen flaskan. Använd vinylhandskar eller liknande (Fig. 27). Detta är en mycket enkel metod som även kan utföras av utbildad personal, men med tydliga instruktioner för att inte kontaminera provet (Biggs et al. 2015; Larson et al. 2017). I vattendrag används denna metod i flera studier (Carim et al. 2015), samt även som standard för eDNA-provtagningar utförda av US Geological Survey (Laramie et al. 2015b).

Du kan också använda en teleskopförlängd stav där du sätter fast en flaska i ena ändan (Fig. 27). På det sättet når du långt ut över ett vattendrag eller förbi vegetation i en sjö. Du kan dock inte manipulera locket med staven, vilket innebär att flaskan är helt öppen under provtagningen.



Figur 27. Vänster: punktinsamling i vattenytan med enliters plastflaska. Flaskan ska hållas en dm under vattenytan (foto: Patrik Bohman, SLU). Höger: teleskopförlängd punktinsamling av ytvatten. Källa: www.unoson.se.

Plastflaskor är lätta att rengöra och är mycket tåliga för fältarbete. Plasten verkar inte heller påverka analyserna nämnvärt, vilket gör dem idealiska för fältinsamling. Det går därför bra att ta ytvattenprover i både sjöar (Larson et al. 2017) och vattendrag (Carim et al. 2017), och så även i kärr, våtmarker, dammar och hållkar (Ficetola et al. 2008). Även i vattendrag är chansen stor att du kan använda dig av ytvattenprover, men det beror lite på vad du är ute efter, samt NÄR du provtar. Musslor och kräftor kan vara svåra att upptäcka med ytvattenprover eftersom de släpper relativt lite DNA i förhållande till andra arter (Tréguier et al. 2014; Stoeckle et al. 2015). Punktinsamling kan även utföras med en peristaltisk pump (se Filtrering).

Punktinsamling på djupare vatten

Flera olika företag har utvecklat så kallat ”kontaminationsfria” vattenhämtare. SLU Aqua har testat modellen ”Limnos” från företaget Hydro-Bios (Fig. 28; <https://www.hydrobios.de>). Det består av två enliters flaskor som sänks ner på en lina. I locket finns två slangar som viks in då flaskorna sänks till önskat djup (Fig. 28). Då de ska fyllas med vatten så öppnas slangarna upp genom ett lod som skickas ner på linan. Bubblorna på vattenytan talar om då flaskorna har fyllts (det slutar då att bubbla). Fördelen med denna teknik är att du endast tar upp vatten på det djup du vill provta, till skillnad från t.ex. Ruttnerhämtare (som är öppen från yta till provtagningspunkt).

Ett annat alternativ är att du använder en specialkonstruerad metallstav som du fäster en flaska i. Stavens uppgift är dels att förlänga din egen arm med 1-2 meter, men även att öppna och sluta flaskan. Du sänker flaskan till önskat djup, och drar i handtaget som öppnar och sedan sluter flaskans lock. Detta verktyg är dock enbart användbart ner till maximalt två meters djup.

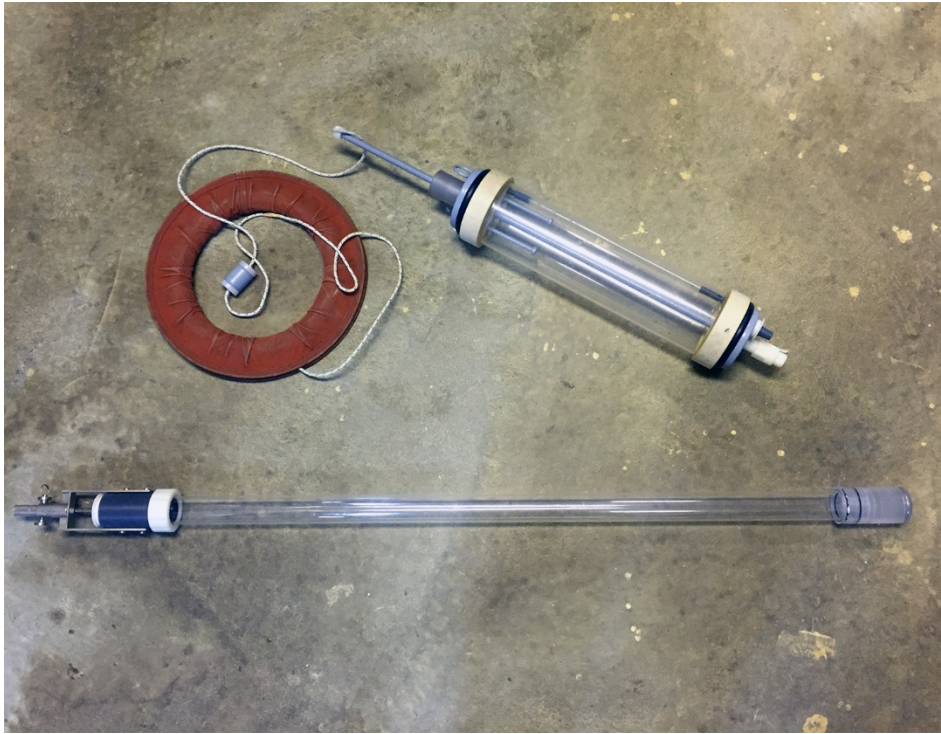


Figur 28. En del vattenhämtare kallas för ”kontaminationsfria”. ”Limnos”-modellen från Hydrobios har två slangar i locket som öppnas upp då hämtaren kommit till önskat djup (foto: Patrik Bohman, SLU).

De mer traditionella vattenhämtarna, t.ex. Ruttnerhämtare och Rambergör (Fig. 29), är inte alltid helt optimala för eDNA-provtagning:

- Hämtarna måste öppnas upp i båda ändar för att sjunka ner i vattenmassan. Om du vill jämföra förekomst över och under språngskiktet i en temperaturskiktad sjö kan du inte låta arters DNA i de högre vattenmassorna blandas med DNA under språngskiktet. Men vill du enbart ha svar på vilka arter som finns i sjön så är ju detta inget problem.
- Det kan vara svårt att plocka isär och rengöra Ruttnerhämtaren, vilket gör den mindre lämplig för eDNA-provtagning (pga. risk för kontamination).
- Rambergör är inte optimala eftersom de inte är helt pålitliga vid djupare provtagning (då de t.ex. hänger snett i vattenpelaren).

Det finns ytterligare vattenhämtare, som t.ex. Van Dorn hämtare eller Kemmerer hämtare. Dessa vattenhämtare användas ofta i temperaturskiktade sjöar eller nära botten, då de ligger horisontellt i vattnet. Van Dorn hämtare kan, likt Ruttnerhämtare, vara svår att rengöra pga. många lösa delar, men den har använts i flera lyckade eDNA-studier (Tucker et al. 2016; Harper et al 2018b).



Figur 29. Rambergör (underst) och Ruttnerhämtare (foto: Patrik Bohman, SLU).

Kontinuerlig provtagning

Detta innebär att du rör dig framåt i vattnet samtidigt som provtagning utförs. Denna metod samlar in vatten från ett större område än vid punktinsamling. För att genomföra en kontinuerlig provtagning används oftast en peristaltisk pump och direktfiltrering. Vill du filtrera stora mängder vatten (hundra liter) kan det göras från en åkande båt. Detta har visat sig vara en framgångsrik metod i flera projekt, bl.a. då kräftpest övervakas i större sjöar i Norge (Strand 2014). Du kan också provta kontinuerligt samtidigt som du går i vattnet, t.ex. med ryggsäckspumpen "ANDe" (Thomas et al. 2018; Fig. 42). Då du befinner dig i vattnet samtidigt som du provtar måste du iakttä försiktighet så att du inte kontaminerar dina prover (se USFWS 2017 för rekommendationer).

Fjärrstyrda farkoster & autonoma punktstationer

Framtidens miljöövervakning kommer säkerligen bestå till viss del av obemannade farkoster, eller provtagningsrobotar som kan samla in miljödata automatiskt. Robo-

tar kan antingen styras direkt från land (t.ex. med en handkonsoll), eller programmeras så att de följer givna rutter. Detta innebär att du kan använda fjärrstyrda övervakningsmoduler som provtar sjöar på ett både tids- och kostnadseffektivt sätt. Det finns flera exempel på robotar när det gäller insamling av eDNA. Fjärrstyrda farkoster (så kallade ROV, efter engelskans ” Remote Operated Vehicles”) kan antingen utföra enbart vattenprovtagningar eller kontinuerlig filtrering av eDNA (Fig. 43). SLU Aqua har varit med och testat självgående segelfarkoster för marin vattenmiljö (Fig. 30). I framtiden kan dessa komma att inkludera avancerande ”flytbrädor” som automatiskt kan ta kontaminationsfria vattenprov av eDNA. Även flygande farkoster, i form av fjärrstyrda helikoptrar kan hjälpa till att ta vattenprover (Ore et al. 2015). Det måste dock utvecklas system för att de ska vara tidseffektiva (bl.a. bör de kunna ta flera prover samtidigt) och billiga i drift, samt att proverna inte får bli kontaminerade (Doi et al. 2017b). Autonoma punktstationer kan i framtiden få en mer framträdande roll. Dessa stationer skulle t.ex. kunna kontrolleras via ett webbgränssnitt från annan plats och automatiskt mäta eDNA-halten i vattenprover, t.ex. vid fiskpassager. Det går också att utrusta dem med varningssystem då t.ex. utvalda invasiva arter passerar stationen.



Figur 30. Obemannade farkoster kan mäta olika variabler ute till havs. I framtiden blir det även aktuellt för bl.a. eDNA (foto: Jonas Hentati Sundberg, SLU).

Provtagningsvolym: hur mycket vatten bör samlas in?

Provvolymer vatten har i olika studier varierat alltifrån 15 ml (Ficetola et al. 2008; Sigsgaard et al. 2015) och upp till 100 liter (Valentini et al. 2016) per provpunkt. Upptäckten av arter i relation till provvolym beror så klart på vad du vill ha svar på och hur provtagningsmiljön ser ut. Generellt verkar 1-5 liter/provpunkt fungera bra för att provta eDNA i olika miljöer (Rees et al. 2014; Mächler et al. 2016). I dammar och våtmarker kan provvolymen vara betydligt mindre, 0,5 – 1,0 liter per provpunkt (Tréguier et al. 2014; Sigsgaard et al. 2015). En till två liter har visat sig vara tillräckligt när det gäller vissa sjöar (Hänfling et al. 2016; Keskin et al. 2016), och en liter fungerar bra för normalstora vattendrag (Carim et al. 2015; Mächler et al. 2016). Är volymen mindre riskerar du att få alldeles för lite målarts-DNA i dina vattenprover, även om flera studier har visat att det fungerar med mindre provvolym (Ficetola et al. 2008, Thompsen et al. 2012a). SLU Aqua har med gott resultat använt 5 liter per provpunkt för att direktfiltrera kräftpestsporer i vattendrag (Edsman et al. 2018). Är volymen större än 5 liter per provpunkt så kan det bli svårt att tids- och planeringsmässigt utföra fältarbetet, speciellt om du har många provtagningar och replikat. Dessutom riskerar filtren att sättas igen av partiklar i vattnet (se Filtrering).

SLU Aqua har arbetat med flera typer av provtagningsvolymmer inom FOMA-projektet "Fisk, musslor och kräftor som eDNA" (Bohman 2016). Syftet med projektet var att försöka hitta enkla och effektiva eDNA-metoder anpassade till miljöövervakningen. För att åstadkomma detta så anpassades bl.a. vattenvolymer kontinuerligt under projektets gång.

- 2014 genomfördes vattenprovtagning i några olika mellansvenska sjöar och vattendrag. Vattendunkar på 5 liter samlades då in från 10 platser inom en lokal (Fig. 31). Efter att negativa och positiva kontroller lades till blev den totala vattenvolymer per sjö ca 70 liter, dvs. 14 stycken 5-liters dunkar per lokal. Dessa prover transporterades sedan till laboratoriet för att vakuumfiltreras. Det blev svårt att använda replikat, då mängden vatten att transportera var så stor.
- Den tunga hanteringen av 70 liter vatten från varje provtagningslokal var inte optimal, vilket innebar att vi 2015 gick över till betydligt mindre vattenvolymer. 2015 minskades därför provvolymen till en liter/provpunkt (inklusive fyra kontroller) per lokal. Vi ökade också antalet replikat till två.
- En liter/provpunkt var överkomligt, men 2016 ändrade vi vår strategi ytterligare och övergick helt till direktfiltrering i fält (men behöll 1-5 liter/provpunkt). Vi ökade också antalet replikat till tre. Fördelen med direktfiltrering var främst att vi slapp hantera stora vattenvolymer, vars DNA-innehåll riskerade att brytas ner

pga. förlängda transporttider och undermålig kylning (se Hantering av prover och filtrat).



Figur 31. Efter insamling av 5 liter vatten/provpunkt i en sjö blev gummibåten ganska full efter en dags provtagning 2014 (foto: Patrik Bohman, SLU).

Hur många prover behöver du ta?

Lämpligt antal prover beror på frågeställning och behov av noggrannhet, provtagnings- och analysmetodik, samt vattendragets/sjöns storlek, morfologi och egenskaper. Det kan därför vara svårt att ge generella rekommendationer för antalet prov, vilket varierar stort mellan studier.

Det optimala antalet stickprov kan uppskattas genom att beräkna statistisk styrka innan data har samlats in (*a priori poweranalys*). Poweranalysen ger svar på hur många prov du bör använda för din undersökning, dvs. hur starkt ditt test blir vid en angiven signifikansnivå och standardavvikelse. Ju färre prov desto större osäkerhet och lägre statistisk styrka. I en studie sker därför en avvägning mellan statistisk styrka (i form av antal stickprov) och ekonomisk rimlighet. Flera eDNA-studier har

visat att det går att ta många eDNA-prover inom ett större område under relativ kort tid, och till en skälig kostnad (Biggs et al. 2015; McKelvey et al. 2016).

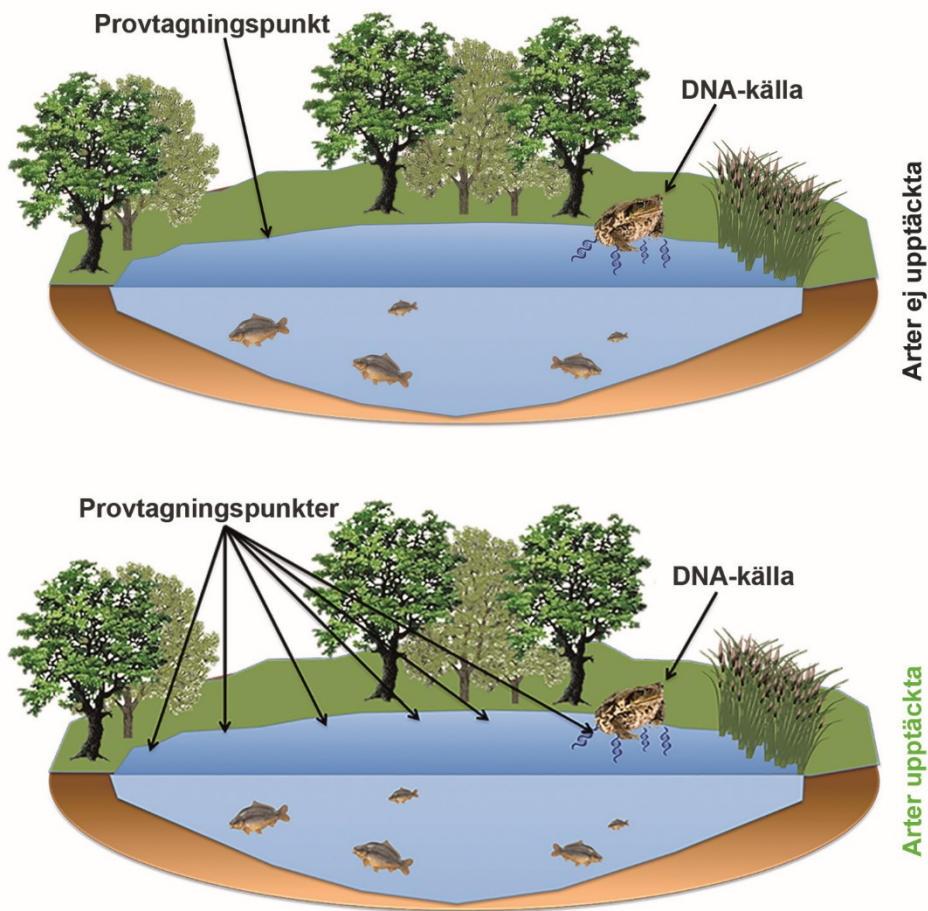
Ju mindre volym vatten du tar desto fler provtagningar måste du i regel göra i området

Ta många delprover (replikat)

Fler delprov (replikat) från samma provtagningsplats ökar möjligheten att finna målarter. Replikat ger ett mått på variationen inom och mellan olika provpunkter, samtidigt som risken för falsk frånvaro av målarter minskar i proverna (Jerde & Mahon 2015; Ficetola et al. 2016; se Hantering av förorening och felkällor i fält). Tas inga replikat försvinner dessa möjligheter helt, och det kan bli få svårt att utvärdera resultaten. Många prover kan då sakna vissa arters DNA, bl.a. pga. stokastiska effekter (Ficetola et al. 2015; Valentini et al. 2016).

Generellt rekommenderas 3-5 replikat per provpunkt (Balasingham et al. 2018), men detta varierar stort mellan olika studier (Adrian-Kalchhauser & Burkhardt-Holm 2016). Shaw visade (2016) att två replikat (1,0 liter/replikat) var för få för att påvisa mindre vanliga arter i flodsystem, men då replikaten utökades till fem upptäcktes samtliga arter. Enstaka replikat fungerar bättre i mindre dammar och kärr (Ficetola et al. 2008; Valentini et al. 2016). Men det finns en stor stokastisk variation i dessa vatten (Harper et al. 2018a). I vattendrag kan i regel färre replikat tas än i sjöar (Harper et al. 2018a). I större och mer komplexa provtagningsområden behövs generellt fler replikat (Prosser 2010). Men antal replikat är också en kostnadsfråga, eftersom tiden ute i fält ökar ju fler replikat som används. Detta kan i och för sig lösas med att engagera intresserade samhällsmedborgare, t.ex. i citizen science projekt (Biggs et al. 2015; Larson et al. 2017). Rekommendationer för exakt hur många replikat som ska tas per prov blir därför en kompromiss mellan frågeställning, kvantifieringsnivå, samt vad det hela får kosta.

Idag när flerartsanalyser börjar bli populära finns risken att storskaliga eDNA-studier blir mindre måna om att använda många provtagningar och/eller replikat. Även om detta är ett sätt att minska kostnader, så riskerar dessa typer av undersökningar att bli lite väl grovt tillyxade och risken är att värdefull information förloras. Det innebär också att möjligheten att kvantifiera resultaten helt kan utebli (Fig. 32).



Figur 32. Samplingsstrategin påverkar dina möjligheter att finna målarts-DNA, speciellt om arten är ovanlig. Flera provtagningspunkter ökar dina möjligheter att finna målarter. Källa: Herder et al. 2014, ©SPYGEN.

Pooling av prover

Sammanblandning av prover, pooling, kan effektivisera tiden i fält. Men metoden minskar noggrannheten och möjligheten att räkna på proverna (Prosser 2010; Ficetola et al. 2016). Om proverna inte behöver kvantifieras, utan bara kvalitativt utvärdera vilka arter som finns (ja/nej) kan pooling användas på följande sätt:

- Ta ett flertal prover (alltifrån 10 och uppåt) i olika delar av provtagningsområdet. Från varje provpunkt tas en liter vatten. Blanda sedan samman dina separata prover i en större desinficerad plastbalja. Från denna balja direktfiltreras sedan 1-5 liter provvolym.

- Ytterligare ett effektivt sätt att poola prover är att ta upp till 60 stickprover på olika ställen i vattnet med filterkapseln Envirochek, som rymmer upp till 60 liter vatten (se Filtrering).

Teoretiskt sett bör dessa metoder fungera bra, men det finns dock kritik mot detta upplägg. Både studier av mikrobiologiska samhällen i jord och fisksamhällen i sötvatten har visat att poolning (till skillnad från separata punktprovtagningar) kan minska upptäcksgraden av DNA från arter som förekommer mer sällan. I en japansk studie från 2017 kom forskarlaget fram till att poolning av vattenprover inte alltid kunde rekommenderas vid uppskattningar av fiskars artdiversitet (Sato et al. 2017). Anledningen var att poolning av proverna spädde ut DNA-halten från de mer ovanliga arterna, vilket ledde till att dessa sedan inte kunde detekteras vid sekvensering. Generellt visade studien att de poolade proverna hade en lägre upptäcksgrad än de enskilda stickproven.

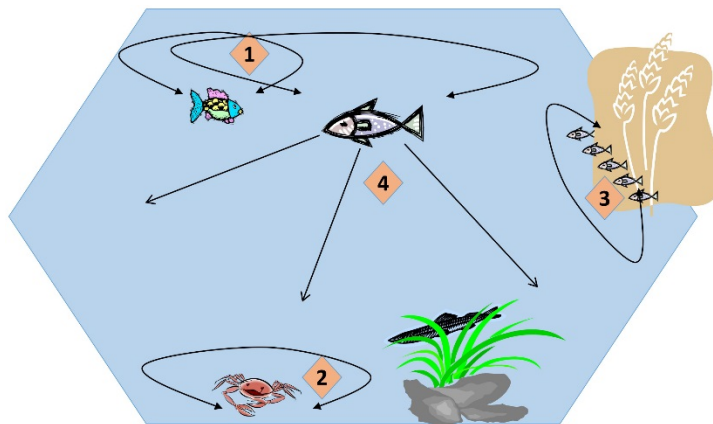


Figur 33. Det kan ibland vara nog så knepigt att komma ut i vissa slättlandsjöar för att ta sina vattenprover och replikat (foto: Patrik Bohman, SLU).

10.4 Målarternas ekologi bestämmer

Tid och plats för provtagning är väldigt beroende av målarternas ekologi och specifika preferenser (Diaz-Ferguson & Moyer 2014; Fig. 34). Olika arter har olika rörelsemönster och uppehåller sig på olika platser i vattnet, vilket gör att koncentrationen DNA fördelas olika under säsongerna (Erickson et al. 2017). Därför bör du (inför varje eDNA-undersökning) ställa dig frågan NÄR & VAR dina målarter kan tänkas avge mest DNA under året. Det kan ju vara tveksamt att hitta gädd-spår ute i fria vattenmassan, men mer sannolikt att finna spår från dem i littoralen, speciellt under lektid (feb-mars). Om du med hjälp av eDNA ändå finner spår av gädda på osannolika ställen så innebär det troligen att DNA förts dit med vattenströmningar. *Eller finns det andra förklaringar?* Resultat från eDNA-analyser måste alltså tolkas på ett kritiskt sätt. Fortfarande är det mycket vi inte vet om de arter som studeras, vilket gör spårning med hjälp av eDNA-koncentrationer än mer intressant.

Många akvatiska organismer är t.ex. ganska inaktiva under de kallare årstiderna. Deras aktivitet och födosökande ökar först då temperaturen stiger på våren, vilket påbörjar lek för fisk (feb-maj), romsläpp för kräftor (april-maj) och glochidiesläpp för musslor (maj-juni). Även hösten kan vara en aktiv period, t.ex. för migrerande eller höstlekande fiskarter eller kräftor, vilka parar sig i september-oktober. Ju mer aktiva organismerna är vid provtagningsplatserna, desto större är chanserna att detektera målarter i proverna.



Figur 34. Eftersom organismens ekologi delvis bestämmer var DNA-spår lämnas, kommer olika målarternas DNA att detekteras i olika mängd vid yta (1), botten (2), littoral (3), samt pelagial (4). Illustration: Patrik Bohman, SLU.

Fisk

Det är svårt att vara generell när det gäller hur fiskarter rör sig i vattenmassan och var de lämnar DNA-spår. En del arter som trivs i stim rör sig ofta över större områ-

den, medan vissa solitärer kan vara ganska stationära. Gädda betraktas som en stationär fisk som sällan rör sig större sträckor i sjöar och utmed kusten. Andra stationära arter, som smörbult och stubb, håller sig ofta inom samma område under större delen av sitt liv. Stimarter, som t.ex. strömming vid kusten eller nors och sik i större sjöar, kan röra sig över stora områden. Detta gäller även vissa karpfiskar, som braxen. Vissa arter, som öring, lax och sik, migrerar utmed kust och i vattendrag. Vegetationsnära provtagning, t.ex. invid vass, kan vara bra om du är ute efter yngel från olika arter, men även för att detektera olika arter under sommar/höst. Arter som förekommer sporadiskt eller inte alls i traditionellt provfiske (t.ex. sällsynta eller vissa invasiva arter) kan vara intressanta att studera med eDNA-metoder. eDNA kan dock inte spåra de olika livsstadierna hos en fisk, vilket innebär att det blir svårt att avgöra om provet innehåller DNA från unga eller äldre individer.

Eftersom fiskars beteende ändras beroende på säsong, närhet till predatorer, tillgång till föda och i relation till leken etc., så vet vi inte alltid hur olika arter rör sig eller exakt var de förekommer. Det är möjligt att eDNA kan ge lite mer klarhet i detta, speciellt eftersom man idag kan jämföra olika DNA-koncentrationer i vattnet. Forskare i Alaska har t.ex. kunnat koppla mängden eDNA till förekomst av lekande individer av indianlax (*Oncorhynchus nerka*; Tillotson et al. 2018). Forskare har även kunnat särskilja olika laxfiskars bohålor genom att enbart jämföra koncentrationen eDNA på lekbotten (Strobel et al. 2017). En intressant studie av flodabborre (*Macquaria australasica*) i Australien lyckades spåra fiskarnas lekområden genom att jämföra förhållandet mellan olika typer av eDNA (kärnDNA och mtDNA) som fiskarna släppte (Byleman et al. 2017). Om forskarna lyckas genomföra detta för fler arter så kan intressanta samband mellan arternas livscykel och habitatval upptäckas. Dessutom genomförde en dansk forskargrupp en studie av valhajar (Sigsgaard et al. 2016), där data från valhajarnas haplotyper (utifrån eDNA-provtagning i vattnet) kunde ge mer genetisk information om populationen.

Kräftor

Kräftor avger relativt lite DNA i förhållande till fisk. I de akvarieförsök med blandade arter från fisk, kräftor och musslor som SLU Aqua genomförde 2015, så var kräftor den organismgrupp som gav sämst utslag vid DNA-analysen (Bohman 2016). Det innebär att många negativa ”träffar” kommer erhållas, trots att arten finns i vattnet, s.k. falska negativa. Lösningen på detta är t.ex. att ta fler prover eller öka provvolymen. Trots att det går att detektera flod- och signalkräftor i naturvatten, visar en del studier på vissa svårigheter att upptäcka kräftor, speciellt vid låga tätheter (Tréguier et al. 2014; Agersnap et al. 2017; Larson et al. 2017). Mängden DNA ökar under en begränsad tidsperiod (skalömsning) och då också mycket lokalt nära botten (Harper et al. 2018b). En möjlighet är att provta nära steniga stränder, dvs. du väljer specifikt ut en plats med lämplig kräftbotten som är enkel att provta. Det

kan rekommenderas att provta under juli-september, då kräftor är mer aktiva och ömsar skal oftare än under de kalla årstiderna. Harper (2018b) detekterade t.ex. inga signalkräftor överhuvudtaget på vintern. Även om senare studier har lyckats bättre med att detektera kräftor i naturvatten (Dougherty et al. 2016; Mauvisseau et al. 2018), så finns det behov för ytterligare forskning. Forskningen behöver bl.a. verifiera resultat från olika typer av vatten och jämföra abundansuppskattningar med traditionell övervakning (Agersnap et al. 2017).

Kräftpest

En indirekt detektion av signalkräfta kan göras genom att analysera vattenprover med avseende på kräftpest (*Aphanomyces astaci*). Detta är möjligt eftersom signalkräftan är bärare av pesten, och i de flesta fall där pestsporer hittats har även signalkräfta påträffats i närheten. Vid detektion av kräftpestsporer fångas hela sporen in, vilket gör metoden mer lik ett vävnadsprov än ett vattenprov. Det innebär bl.a. att det behövs mycket få sporer per liter vatten, då varje spor innehåller mycket DNA. Livsmedelsinstitutet i Oslo har visat att det går bättre att detektera kräftsporer i vattendrag än i sjöar (Strand et al. 2014). Wittwer (2017) upptäckte kräftsporer i vattendrag under hela året, men visade att de högsta DNA-koncentrationerna korrelerade positivt med högre vattentemperaturer från maj till oktober. SLU Aqua har under 2017 och 2018, tillsammans med bl.a. länsstyrelsen i Värmland, arbetat med att detektera kräftpestsporer i vattendrag där flodkräftan plötsligt försvunnit (Edsman et al. 2018).

Musslor

Det verkar som om musslor släpper relativt lite DNA i jämförelse med många fiskarter. I de akvarieförsök med blandade arter från fisk, kräftor och musslor som SLU Aqua genomförde 2015, gav musslor näst sämst utslag vid DNA-analysen (Bohman 2016). Det sker visserligen en ökning av mussel-DNA i vattnen under parningssäsongen och då larverna (glochidierna) släpps fria under vår-försommar. Det kan dock vara svårt att passa in provtagningen till dessa tidpunkter, som både är temperatur- och artberoende. Detektionsgraden för musslor varierar stort mellan olika studier. I en studie som använde eDNA för att upptäcka flodpärlmusslor (*Margaritifera margaritifera*) i vattendrag, fanns svårigheter att detektera DNA längre än 25m nedströms ursprungsbestånden (Stoeckle et al. 2015). Detektionsgraden minskade med minskad beståndsstorlek. Ett svenskt forskarlag¹ lyckades dock spåra flodpärlmussla 1,4 km nedströms levande populationer. Deiner och hennes forskarlag kunde

¹ Per Sundberg; professor vid institutionen för marina vetenskaper, Göteborg Universitet. Telefonmöte 2018-06-01

detektera spetsig målarmussla (*Unio tumidus*) 12 km nedströms i en alpbäck (Deiner & Altermatt 2014). Självklart har detektionsmöjligheterna för musslor att göra med hur stora ursprungs-populationerna är uppströms provtagningsplatsen. Ju fler individer desto mer DNA släpps i vattnet, vilket leder till större möjligheter att upptäcka dem nedströms.

Ett sätt att öka detektionsgraden för musslor som släpper sina larver i vattnet, är att analysera eDNA i djurplanktonprover. Ardura kunde spåra vandarmusslors (*Dreissena polymorpha*) eDNA genom att analysera djurplanktonprover (Ardura et al. 2016). Detta öppnar upp för nya möjligheter att spåra mussellarvers rörelsemönster inom miljöövervakningen. Flera andra studier på musslor och snäckor visar att forskarna successivt försöker hitta allt bättre och mer specifika markörer och primers (Ardura et al. 2015; Clusa et al. 2016; Devloo-Delva et al. 2016).

10.5 Vattnets egenskaper påverkar

Vattnets egenskaper spelar stor roll för hur DNA både bryts ned och transporteras vidare. Fysiokemiska egenskaper kan snabbt förändras i tid och rum, vilket sker i vattendrag (Macher & Leese 2017). Detta påverkar också analysmetodernas verkningssgrad (Jane et al. 2015). Vid höga halter av alger, humus eller partiklar i vattnet så minskar chanserna att upptäcka målarts-DNA i våra prover (Stoeckle et al. 2017a). Rent generellt är detta ett område som är relativt lite studerat, men som alltså har stor påverkan på våra slutliga resultat (Barnes & Turner 2016).

Då olika typer av vatten provtas så kan det vara viktigt att kunna jämföra provpunkter och lokaler med varandra. Detta blir extra viktigt då t.ex. biodiversitet eller någon form av abundans studeras (via mängden DNA i proverna). För att kunna jämföra provtagningsresultat bör du därför mäta och protokollföra vattnets olika variabler. Om resultatet blir negativt kan du studera dessa metadata och ev. konstatera att det vid provtagningar med dålig målartsdetektion också förekom höga temperaturer, låga pH-värden och kraftigt färgat vatten. Följande metadata är viktigt att notera:

Vattnets hastighet

Hastigheten påverkar hur och var DNA-molekylerna transporteras i vattendragen (Macher & Leese 2017; Song et al. 2017). Det påverkar var i vattendraget du har möjlighet att provta och om det t.ex. är möjligt att gå ut med gummibåt och provta vissa djup. Vattnets flödes hastighet mäts enklast genom att kasta en pinne eller liknande i vattnet och ta tid på hur snabbt den flyter 10 meter nedströms.

Vattnets färg

Färg ger ett kvalitativt mått på hur mycket organiska föreningar som finns i vattnet (t.ex. humus). Humus påverkar PCR-processen negativt, vilket minskar möjligheten att finna målarts-DNA (Sidstedt et al. 2015). Värdet för färg anges med en tre-gradig skala (klart, färgat, kraftigt färgat). Ju starkare färgat desto högre halter av organiska föreningar. Genom att jämföra dina prover med den kvalitativa skalan för vattnets färg kan du snabbt uppskatta eventuella risker för inhibering (ju brunare/gulare vattnet är desto större är risken).

Vattnets grumlighet

Grumlighet ger ett mått på partikelhalten i vattnet, vilket påverkar hur stor mängd DNA som kan adsorberas till partiklar. Det visar också om det är algblooming i vattnet, vilket kan påverka PCR-analysen negativt. Du kan bedöma vattnets grumlighet genom att ta upp vatten med ett genomskinligt litermått och hålla ett vitt papper bakom. Du anger grumligheten med en enkel tre-gradig värdeskala (klart, grumligt, mycket grumligt). Partikelhalten påverkar också hur mycket vatten som kan filtreras vid provtagningen, eftersom filtren ibland sätts igen av partiklar (beroende partikelhalt och filtrets porstorlek).

Övriga variabler

Vattentemperatur, alkalinitet, pH, och syrehalt kan vara viktigt att mäta, eftersom det påverkar nedbrytningshastigheten hos DNA (Strickler et al. 2015; Seymour et al. 2018). Mängden mikrobiologiska processer är svår att mäta, men ett visst mått kan användas utifrån vattnets eutrofieringsgrad.

Fotografera platsen som provtas

Det är svårt att minnas specifika provplatser och en bild kan avslöja viktiga detaljer som är avgörande då resultat tolkas. Dessutom blir det lättare att återkomma till provplatsen om samma provpunkt ska användas senare (t.ex. vid säsongjämförelser eller om provtagningen måste göras om).

11 Filtrering

Efter att vattenprover samlats in måste partikelbundet DNA separeras från vattnet. Ofta sker denna filtrering direkt i fält. De största fördelarna med att direktfiltrera i fält är att nedbrytningen stoppas redan vid provtagningen, samt att proverna enkelt kan transporteras i en mindre kylväska. Detta kapitel beskriver vilka filtertyper som bör användas och hur de bäst brukas i fält.

Tänk på att det är lätt att kontaminera filtraten då de hanteras öppet i fält:

- Tänk på att inte förorena proverna mellan de lokaler som provtas (om du inte väljer att poola samtliga prover som en enda provtagning).
- Använd alltid skyddshandskar och desinficerad pincett (Fig. 35).
- Risken att det kommer förorenat DNA på dina filter ökar ju längre tid dessa hanteras (istället för att proverna direkt försluts).
- Rulla filtret med pincetten och stoppa direkt i ett provrör och förslut (Fig. 46).
- Ett bra och mer kontaminationsfritt alternativ är filterkapslar.

11.1 Vilken typ av filter bör användas?

Många olika typer av filter, både vad gäller porstorlek och material, används i eDNA-studier (Rees et al. 2014; Adrian-Kalchhauser & Burkhardt-Holm 2016). Det kan därför kännas svårt att välja ut optimala filter trots att du har en tydlig frågeställning. Här följer några rekommendationer.

Porstorlek

Eftersom DNA fäster på laddade partiklar, behövs filter som har tillräckligt små porer för att fånga upp dessa partiklar. Filterstorlekar mellan 0,22 µm och 5 µm har använts i eDNA-studier, som alla har lyckats artbestämma målarter (Rees et al. 2014; Adrian-Kalchhauser & Burkhardt-Holm 2016). En rekommendation är därför att använda filter med så liten porstorlek som är praktiskt möjligt. Det innebär följande då du väljer filter:

- Filterporerna bör inte vara så små att filtret snabbt täpps till efter bara några deciliter. För små provvolymen vatten ger alltför små mängder DNA och risk att missa målarter.
- Filtret får heller inte vara för grovt så att det släpper igenom alltför mycket målarts-DNA, vilket innebär att arter inte upptäcks.

Turners studie (2014) om karp i sjöar kom fram till att det mesta partikelbundna DNA:t låg i storleksklassen 1-10 µm. Något som också har visat sig stämma för bäckröding (*Salvelinus fontinalis*) i rinnande vatten (Wilcox et al. 2016). Det kan innebära att många arters DNA skulle kunna fångas in av filter med en porstorlek mellan 1,0 och 2,0 µm, lite beroende på frågeställning. Resultaten behöver dock kompletteras med studier av andra arter. Flera studier visar också att porstorleken inte behöver vara mindre än 1,0 µm (Eichmiller et al. 2016; Wilcox et al. 2016). Ett forskarlag som testade eDNA-ryggsäcken ANDe tillsammans med tillverkarna, kom till och med fram till att filter med 5 µm porstorlek fångade upp betydligt mer DNA från nyzeeländsk tusensnäcka (*Potamopyrgus antipodarum*) än filter på 1 µm (Thomas et al. 2018; Fig. 42). Trots det har flera eDNA-studier av fisk framgångsrikt använt 0,22 µm (Rees et al. 2014; Adrian-Kalchhauser & Burkhardt-Holm 2016; Eichmiller et al. 2016), och det finns idag rekommendationer från olika forskare om att inte använda filter som är större än 0,45 µm vid flerartsanalyser för fisk (Spens et al. 2016). SLU Aquas erfarenhet är dock att porstorlekar mindre än 1 µm får svårt att samla tillräckligt med vattenvolym, då de ofta sätts igen (se nedan). Även säsongen kan påverka vilken porstorlek du väljer: om prover tas på vintern kan filter med mindre porstorlek (< 0,45 µm) ofta användas utan större problem i svenska vatten. Under sommarsäsonger kan dock små porstorlekar vara problematiska.

När det t.ex. gäller provtagning av kräftpestsporer (*Aphanomyces astaci*) så har Veterinärinstitutet i Norge använt Millipore glasfiberfilter (AP 2504700) med 2,0 µm porstorlek med tillfredsställande resultat (Vrålstad et al. 2018). Porstorleken motiveras av att pestsporer har en diameter på ca 10 µm, samt att mer volym vatten kan pumpas genom filtret.

Igensättning av filter

Detta inträffar ofta i vatten som är väldigt grumliga, pga. alger, humus eller lerpartiklar). Du kan då välja att:

- Dela upp varje prov i flera delfiltreringar. Yamanakas forskargrupp delade t.ex. upp varje filtrering i tre delfiltreringar för få ut tillräckligt med eDNA (Yamanaka & Minamoto 2016).
- Förfiltrera. Vid förfiltrering filtreras den största ”störande massan” av alger eller annat material bort. Generellt kan porstorleken vid förfiltrering variera mellan 5 - 60 μm , beroende på hur grumligt vattnet är. Humus och organiska molekyler är ofta mycket små och variabla i sin storlek, och kan därför vara svåra att filtrera bort. Flera studier har visat att förfiltrering filtrerar bort stora mängder målarts-DNA, då DNA även adsorberats på större partiklar (Turner et al. 2014; Majaneva et al. 2018). Om du beslutar dig för att använda förfiltrering *måste* även detta filtrat tas om hand och extraheras, vilket kan ge oförutsedda kostnader. Detta filtrat bör då behandlas (förberedas och homogeniseras) som ett jord- eller dietprov (se DNA-extraktion).
- Välj filter med större porstorlek. Tänk då på att du förlorar det DNA som går rakt igenom filtret. Du måste därför kompensera detta genom att filtrera en större mängd vatten.



Figur 35. Hantering av filter ska alltid göras med skyddshandskar för att minimera kontamination. Från SLU Aquas eDNA-försök med flodkräftor 2018 (foto: Patrik Bohman, SLU).

Filtermaterial

En mängd olika typer av filtermaterial har använts vid eDNA-studier, t.ex. glasfiber, cellulosa-nitrat, nylon, polykarbonat (PCTE), Durapore och Sterivex-GP (Rees et

al. 2014; Adrian-Kalchhauser & Burkhardt-Holm 2016). Vilket material ska man då välja? Påverkar verkligen filtermaterialet resultatet? Några studier har jämfört insamlings- och extraktionsmetoder med slutlig mängd målarts-DNA (Deiner et al. 2015; Eichmiller et al. 2016; Majaneva et al. 2018). Flera författare rekommenderar *glasfiberfilter* (Wilcox et al. 2013; Eichmiller et al. 2016; Majaneva et al. 2018; Vrålstad et al. 2018). En fördel med dessa filter är att de varierar något i porstorlek och därmed kan fånga in partiklar i flera storleksklasser. Det innebär att om du använder ett filter med porstorlek 2,0 μm så fångar filtret även upp en del mindre partiklar. Ytterligare en typ av filter som har blivit populära är *filterkapslar*. Om du ska genomföra *förfiltrering* av mycket förorenat vatten (partiklar och alger), kan t.ex. Millipores glasfiberfilter användas upp till 10 μm . Dessa filter passar till en 47 mm filterhållare (Fig.41). För större porstorlekar kan nylonnät, anpassat för nanoplankton (5-60 μm), användas.

Filterkapslar

Filterkapslar som används för att samla in bakterier och mikrobiella föroreningar från dricksvatten har visat sig lämpliga även för provtagning av eDNA. Det finns stora fördelar med att använda inkapslade filter i fält, t.ex. att provet inte kontamineras så lätt. Andra fördelar är att man kan filtrera större mängder vatten utan att man behöver byta filter (gäller t.ex. Envirochek). SLU Aqua har testat två typer av filter i fält, Sterivex och Envirochek (Fig. 36). Eftersom filterkapslar är engångsartiklar kan de utgöra en viss miljöbelastning vid mer omfattande undersökningar, då många filter används. En nackdel är att Sterivex-filter ibland "sätts igen" vid hög grumlighet eller humushalt.

Sterivex tillverkas av Merck Millipore i USA (porstorlek: 0,22 μm eller 0,45 μm), och finns i två varianter: ett durapore (PVDF) membran (filtrerar max 1 liter) och ett Millipore Express (PES) membran (filtrerar max 2 liter). Inom eDNA används mest varianten med durapore membran. *Sterivex* fungerar bäst för mindre volymer vatten, eller om provtagning utförs i vatten med få partiklar. Eftersom filtret är relativt billigt att köpa (tabell 4) så går det bra att använda vid många provtagningar. Flera studier har också använt *sterivex* med positivt resultat (Kirshtein et al. 2007; Schmidt et al. 2013; Keskin et al. 2014; Spens et al. 2016). När SLU Aqua testade filtren i fält (juni – augusti, samt oktober 2016) så täpptes de dock igen efter att bara ha filtrerat 0,2-0,3 liter med en batteridriven skruvdragare och en peristaltisk pump. Detta gällde för samtliga lokaler som hade relativt höga halter organiskt material i vattnet (humus) eller över medel för grumlighet (Bohman 2016). I ett projekt att spåra solabborre (*Lepomis gibbosus*) kunde de flesta vattenprover filtreras med *Sterivex*, förutom de med hög grumlighet (Bohman 2018). Kirshtein hade också problem med vissa vattenprover, som endast kunde filtreras till 0,05 liter (Kirshtein et

al. 2007). Bergman (2016) filtrerade dock 2 liter till synes utan problem från Sakramentofloden i juni, men använde då troligen Sterivex Millipore Express (PES) membran. Sammanfattningsvis innebär detta att Sterivex inte alltid är optimalt för att filtrera prover från svenska naturvatten. Normalt tar det ca 10 minuter att filtrera en liter vatten genom en Sterivex-kapsel.

Envirochek tillverkas av amerikanska Pall Life Sciences (material: polyethersulfone; porstorlek: 1 μm), och kan med lätthet användas för stora provtagningsvolymer. Filterkapsel är gjord för att upptäcka *Cryptosporidium* och *Giardia* från dricksvatten, men fungerar utmärkt i eDNA-sammanhang (Bellemain et al. 2016; Civade et al. 2016; Valentini et al. 2016). Filtret räcker enligt tillverkarna till att filtrera ca 60 liter vatten. Det går därför att använda för poolning av prover från en sjö eller ett vattendrag. Filtret är dock dyrt (tabell 4).



Figur 36. Vänster: Sterivexfilter kopplat med buntband till en slang för filtrering med peristaltisk pump och skruvdragare. Höger: Envirochekfilter är betydligt större och filtrerar mer vatten än Sterivex (foto: Patrik Bohman, SLU).

11.2 Hur direktfiltrerar du i fält?

Fram till ca 2015 filtrerades de flesta eDNA-studiens prover på laboratorium (Adrian-Kalchhauser & Burkhardt-Holm2016). Idag väljer många istället att filtrera direkt i fält. Anledningen är att det finns flera fördelar med direktfiltrering:

- *Nedbrytningen* av DNA bromsas direkt efter provtagning. Du ökar därmed dina möjligheter att få både större mängd och mer intakt (bättre kvalitet) målarts-DNA i proverna. För att detta ska ske optimalt behöver du så klart också hantera och förvara/transportera filtren på rätt sätt efter genomförd filtrering (se Hantering av prover och filtrat).
- Du *slipper hantera och transportera stora vattenvolymer* till en frys. Det är betydligt lättare att förvara (kylt och mörkt) och transportera några provrör som

innehåller hopvikta filter (Fig. 35), än plastflaskor eller dunkar på mellan 1-5 liter vatten.

Vid filtrering i fält används ofta någon typ av peristaltisk pump, eftersom pumpens delar inte får ha kontakt med vattnet pga. föroreningsrisk. Vattnet pumpas istället genom en slang direkt till filtret där provets innehåll fastnar. Beroende på dina behov och studiens förutsättningar så finns det flera olika sätt att utföra direktfiltrering:

1. Handdriven vakuumpump eller injektionsspruta (Fig. 37)
2. Skruvdragare och peristaltisk pump (Fig. 38)
3. Masterflex portable sampler 12V (Fig. 39)
4. Ryggsäckspump (Fig. 42)
5. Fjärrstyrd farkost (Fig. 43)

Då du använder *peristaltiska pumpar* behöver du tänka på följande för att få kontroll över din filtrering:

- *Filtrets porstorlek.* Ju större porstorlek som används desto mer vatten kan pumpas igenom, med generellt något högre flödes hastighet och filtreringstryck.
- *Vattenvolym.* För att uppskatta mängden DNA är det viktigt att veta hur mycket vatten som pumpas genom filtret. Anslut t.ex. ett 5 liters-kärl efter filterhållaren för att mäta volymen som passerar pumpen (Fig. 40).
- *Flödes hastighet.* Mät flödes hastigheten vid filtreringen för att få jämnhet mellan provfiltreringar. Du beräknar flödes hastigheten genom att kontrollera hur lång tid det tar att filtrera en viss volym vatten. Filtreringshastigheten kan variera beroende på vattenkvalitet och filtrets porstorlek. Det finns rekommendationer för flödes hastighet (Valentini et al. 2016; Thomas et al. 2018). Thomas (2018) rekommenderar en flödes hastighet på 1,0 liter/minut för filter med porstorlek 1,0 μm .
- *Filtreringstryck.* Det är inte så lätt att beräkna trycket, men vissa pumpar har kontroll för detta (Thomas et al. 2018). För att optimera eDNA-filtreringen och standardisera provtagningen kan det vara viktigt att hålla filtreringstrycket på en jämn nivå. Ett alltför hårt tryck kan påverka cellers stabilitet och lösgöra mer DNA om de lyseras (går sönder).



Figur 37. Vänster: Handpump med vakuumfiltrering (källa: Laramie et al. 2015b). Höger: Injektions-sprutor (20 respektive 50 ml) och filterkapseln Sterivex (foto: Per Sundberg, ©SeAnalytics).

Handdriven vakuumpump eller injektionsspruta

I otillgängliga områden är det bra att vara oberoende av eldriven och skrymmande utrustning. En handdriven vakuumpump (Fig. 37) kan användas utan el, samt håller låg vikt och liten storlek. För mindre provvolymmer kan man även använda en injektionsspruta (20 eller 50 ml). Dessa är speciellt anpassade till filterkapslar, t.ex. Sterivex (Millipore), och tar ca 10 minuter för filtrering av 1,0 liter vatten.

Skruvdragare och peristaltisk pump

Flera studier har framgångsrikt använt en handhållen skruvdragare som filtreringspump (Laramie et al. 2015b; Bergman et al. 2016). För att tillverka en enkel handhållen filtreringsutrustning behövs en peristaltisk pump, en skruvdragare och ett fäste för skruvdragaren till pumpen (Woessner 2007; Fig. 38). Sedan kan du välja att fästa olika typer av filter med hjälp av silikonslangar. Batteriet i skruvdragaren håller ca 30-40 minuter vid konstant pumpning och det tar 5-10 minuter att pumpa en liter vatten med handhållen skruvdragare. Det kan i värsta fall vara värt att transportera vattenproverna tillbaka till laboratoriet och fortsätta filtreringen där. SLU Aqua testade denna teknik 2016 direkt i fält tillsammans med filterkapslar. Metoden tog lite väl lång tid om du har många vattenprover att filtrera. Skruvdragarens batteritid beror också på vilket kapacitet (mAh) batteriet har. Med en skruvdragare är det svårt att kontrollera flödes hastighet och behålla ett jämnt tryck på filtren. DNA-halten i proverna kan därför variera, vilket kan försvåra beräkningen av resultat.



Figur 38. En snabbt tillverkad filtreringsutrustning med batteridrivna skruvdragare och peristaltisk pump, från SLU Aquas eDNA-projekt i Stensjön 2016 (foto: Patrik Bohman, SLU).

Masterflex portabel pump

Cole-Parmer har tagit fram en robust batteridrivna pump för direktfiltrering av eDNA (Fig. 39). Den liknar en kabinväska, och kallas Masterflex E/S portable sampler (eller det längre namnet Masterflex Priority Pollutant E/S Sampler, PTFE model, 220 VAC). Den använder samma typ av pumphuvud som används tillsammans med skruvdragaren i figur 38 (Cole-Parmers Masterflex Easy-Load). Denna pump drivs av ett återuppladdningsbart 12 V litiumbatteri, och är betydligt kraftfullare än skruvdragaren som beskrivits ovan. Med denna anordning kan provvattnet pumpas direkt från vattendraget. Batteriet håller i 2-3 timmar. Det går även att koppla ett externt bilbatteri till pumpen, vilket kan vara bra om litiumbatteriet skulle ladda ur.



Figur 39. Cole-Parmers Masterflex E/S portable sampler (115 VAC) uppkopplat till ett externt batteri (foto: Patrik Bohman, SLU).

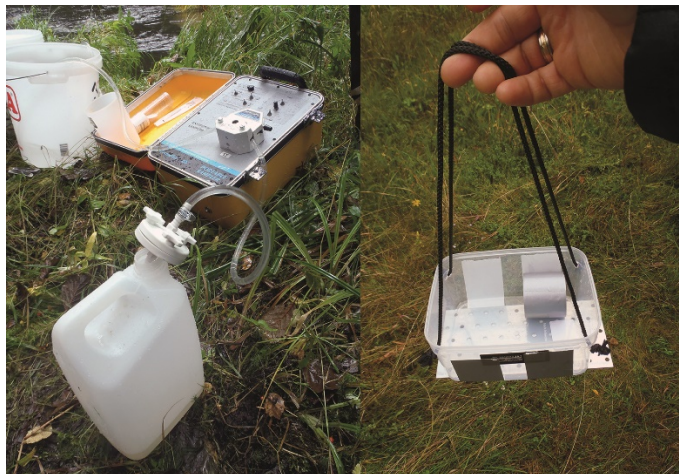
Vid intensiva fältarbeten, då många prover ska filtreras, kan det vara bra att använda ett pumphuvud med flera kanaler (t.ex. Masterflex L/S Easy-Load® II Pump Head, SS Rotor; 2-Channel från Cole-Parmer). Då kan två replikat filtreras samtidigt i fält. Det finns dock inga färdiga filtreringssamplare för detta i dagsläget.

För att kunna använda pumpen behöver du:

- Masterflex E/S portable sampler (Fig. 39)
- En ca 5 meter lång silikonslang
- Egentillverkad ”vattenhämtare” att fästa intagsslangen på (Fig. 40)
- Uppladdat 12V batteri, och eventuellt ett extra bilbatteri (Fig. 39)
- Filterhållare, t.ex. Millipore XX4304700 In-Line Filter Holder (Fig. 41)
- Filter (diameter: 47 mm), pincett och vinylhandskar
- 5 liter-dunk för spillvatten för att mäta hur mycket vatten som filtrerats (Fig. 40)

För att använda Masterflex E/S portable sampler gör du på följande sätt:

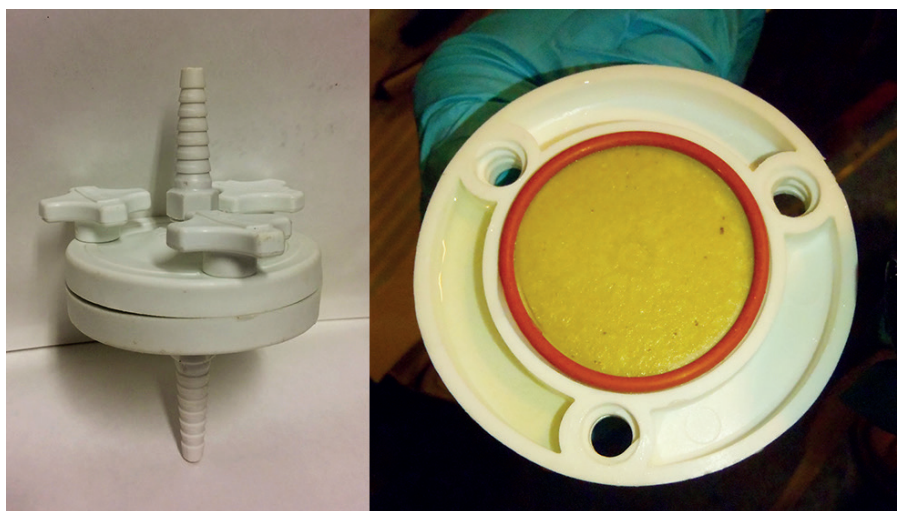
1) Koppla ihop de desinficerade delarna. Fäst ena änden av silikonslangen i en vattenuppsamlare med silvertejp (Fig. 40). Vattenuppsamlaren utgörs av en vanlig plastbalja med tyngd i botten, så att den sjunker. Sedan leds slangen igenom den peristaltiska pumpen på Masterflex E/S. Fäst den andra slangändan i filterhållaren, som leder ner filtratet i en dunk på 5 liter (Fig. 40).



Figur 40. Vänster: pumpen kopplas via silikonslang till filterhållaren. Höger: en vattenhämtare används för att kunna suga upp vatten på provtagningsplatsen (i denna fästs också silikonslangen). Från eDNA-projekt i Billan, Värmland 2017. Foto: Patrik Bohman, SLU.

2) Kasta vattenuppsamlaren i vattnet på lämpligt ställe, och pumpa igenom några liter vatten i slangen. Detta rensar slangen från eventuella rester av klorin och natriumtiosulfats som använts vid desinficeringen.

3) Sätt i ett nytt filter i filterhållaren (47 mm diameter; Fig. 41) med pincett och vinylhandskar, för att inte kontaminera filtret. Själva filtret kan blötas (med destillerat vatten) för att fästa bättre och kläms sedan fast mellan filterhållarens över- och underdel. Skruva sedan försiktigt åt plastskruvarna. Sätt filterhållaren i en 5 liter dunk för att mäta hur stor volym som passerar filtret (Fig. 40). Då pumpen sätts igång skapas ett vakuumsug som ytterligare klämmer ihop filterhållarens båda sidor.



Figur 41. Vänster: Filterhållare "Millipore XX4304700 In-Line Filter Holder" i plast (foto: Jenny Monsén, Länsstyrelsen i Värmland). Höger: öppnad filterhållare med filtrat från ett akvarium med flodkräftor 2018 (foto: Patrik Bohman, SLU).

4) Pumpa ca 5 liter provvatten genom filterhållaren, vilket tar ca 6 minuter. Notera hur mycket vatten som kommit igenom till plastdunken. Ibland sätts filtret igen av partiklar i vattnet innan den avsedda volymen har filtrerats. Kontrollera även tiden för att beräkna flödes hastighet.

5) Då filtreringen är färdig viks filtret ihop och läggs i ett provrör. Filter med porstorlek över $2,0 \mu\text{m}$ kan lätt gå sönder då de tas bort från filterhållaren. Ett lite större provrör (än eppendorf) är då bättre att använda, t.ex. 50 ml Falconrör (Fig. 46).

Ryggsäckspump

Flera företag (t.ex. Smith-root) har börjat utveckla mindre ryggsäckar för eDNA-provtagning (Fig. 42; Thomas et al. 2018). Ryggsäcken innebär att du kan provta kontinuerligt över lite större sträckor (eller poola prover från flera platser). Då den peristaltiska pumpen sitter på ryggen kan det vara svårt att kontrollera hur stor volym vatten du pumpar igenom filtret. Smith-roots pump kan därför skötas med en fjärrkontroll, med möjlighet att ställa in den maxvolym som pumpen ska filtrera, samt ställa in tröskelvärdet för pumptryck och flödes hastighet. Pumpen suger in vatten i stavens topp, där ett utbytbart filter sitter, och ut i andra änden. Optimal flödes hastighet är 1,0 liter/minut för vattenvolymer på upp till 3 liter (Thomas et al. 2018). Mer målar-DNA fångades upp då volymen ökade och flödes hastigheten minskade något (0,8 liter/minut för volymer större än 3 liter). Det innebär att 5 liter vatten tar mellan 5-6 minuter att filtrera.



Figur 42. Smith-root i USA har utvecklat en eDNA-ryggsäck, kallad ANDe, för både punktinsamling och kontinuerlig insamling av eDNA. Källa: <https://www.smith-root.com>.

Fjärrstyrda robotar

Det finns olika exempel på fjärrstyrda farkoster som hjälper till vid kontinuerlig filtrering och provtagning av eDNA (Ore et al. 2015; Doi et al. 2017b; Fig. 30 & 43). Dessa farkoster har olika akronymer beroende på deras funktion, t.ex. AUV, ASV, UAV och ROV (från engelskans "Autonomous Underwater Vehicle", "Autonomous Surface Vehicle", "Unmanned Aerial Vehicle" eller "Remote Operated Vehicle"). Norsk institutt for naturforskning (NINA) har t.ex. tagit fram en fjärrstyrd eldriven båt för att kunna samla in eDNA (Fig. 43). I båten finns en pump kopplad

till ett filter. Det återstår att testa båten när det gäller flera på varandra följande provtagningar som inte korskontaminerar mellan olika platser.

Utvecklingen inom detta område är i sin linda, men framtidens miljöövervakning kommer troligen att delvis bestå av självgående robotar. Provtagningsrobotar skulle kunna cirkulera i otillgängliga sjöar (Ore et al. 2015) för att kontinuerligt samla in eDNA under årets alla säsonger. En annan möjlighet är att eDNA-anpassa de självgående segelfarkoster som SLU Aqua har varit med att testa inför havsprovtagningar (Fig. 30). Ytterligare en möjlighet är att placera autonoma provtagningsstationer vid t.ex. fiskvägar för att mäta halten DNA från förbipasserande fiskar. En av fördelarna med autonoma robotar eller stationer är att de kan bli mer kostnadseffektiva än ett mänskligt provtagningssteam. Det finns många olösta detaljer när det gäller robotar inom miljöövervakningen, t.ex. håller forskare på att effektivisera precisionen i provtagning och samtidigt minska kontaminering mellan replikat och lokaler (Doi et al. 2017b).



Figur 43. Vänster: Norsk institutt for naturforskning (NINA) visar upp en fjärrstyrd farkost (ROV) som kan provta eDNA kontinuerligt över större ytor i en sjö. Källa: <https://vimeo.com/ninaforskning>. Höger: en flygande farkost som suger upp vatten med en pump. Källa: Ore et al. 2015.

11.3 Transportera prover och filtrera på laboratorium

Det finns många fördelar med att filtrera vattenprover på ett eDNA-laboratorium:

- Den totala tidsåtgången i fält minskar, vilket även minskar risken för kontamination.
- Effektivare och fler filtreringsmetoder finns på labb, med bl.a. flerfiltreringssystem och vakuumfiltrering, som förkortar tidsåtgången och rationaliserar processen.
- Ett ackrediterat eDNA-laboratorium är fritt från extern kontamination.

Men innan proverna filtreras på ett laboratorium måste de transporteras dit. Då finns en överhängande risk att DNA:t blir alltmer sönderdelat och svåranalyserat (Goldberg et al. 2016). Trots det kan du ibland vara tvungen att transportera vatten till laboratoriet för filtrering. Kanske beror det på tidsbrist, undermålig utrustning eller risk för kontamination i fält.

Följande punkter är viktiga att beakta vid transport av ofiltrerade vattenprover till laboratoriet:

- Du måste kunna hantera stora volymer vatten (proverna måste t.ex. kunna bäras till bil) vilket både tar tid och är otydligt. Det kan gälla allt ifrån 1-5 liters provflaskor.
- Det är svårt att stabilisera proverna och få sönderdelning av DNA att stanna upp i ofiltrerade vattenprov. Det går visserligen att fälla ut DNA med kemiska tillsatser, men detta rekommenderas endast för mindre volymer (se Fällning av vattenprover).
- Du behöver hålla proverna mörkt och svalt till dess att du kan lagra dem mer varaktigt. SLU Aquas erfarenhet är att provernas temperatur höjs något innan de kommer till laboratoriet, vilket ökar risken för sönderfall av DNA.
- Väl i laboratoriet så är det bra att filtrera proverna så snabbt som möjligt (inom 24 timmar). Alternativet är annars att frysa vattenproverna, vilket kräver stora frysar. Studier har visat att repeterad nedfrysning och upptining av vattenprover kan påverka DNA-kedjornas hållbarhet, och eventuellt bryta sönder dessa, vilket gör dem svårare att senare analysera (Anchordoquy & Molina 2007; Shao et al. 2012).

Som exempel på hur hantering av vattenprover, samt filtrering kan påverka resultatet, så tar vi upp några erfarenheter från SLU Aquas egna eDNA-projekt 2014-2016 (Bohman 2016):

Sommaren 2014 valde vi att transportera allt vatten till Sötvattenslaboratoriet vid Drottningholm för filtrering, pga. dåliga filtreringsrutiner i fält. Vi använde 5-liters dunkar för varje provtagningspunkt, vilket innebar ca 70L vatten per lokal (Fig. 44). Det var en ansenlig mängd vatten, speciellt då vi ibland provtog flera lokaler per dag. Vi var tvungna att använda bärsläde och bil för att inte trötta ut oss, då vissa lokaler låg otillgängligt till. Vid transporten lades proverna i stora svarta plastsäckar tillsammans med pet-flaskor med fryst vatten, för att hållas mörkt och svalt. Men sommaren var varm och allt vatten i pet-flaskorna hann i stort sett tina, vilket skapade problem med vattenläckage och värme. Vi filtrerade en del prover på vårt eget laboratorium, men fick problem med korskontamination från andra utrymmen. Det

är högst troligt att transporten och hanteringen av proverna påverkade resultatet negativt.

Sommaren 2015 använde vi mer lätthanterliga 1-liters flaskor för varje provpunkt (ca 14 liter per lokal, inklusive 0-prov). Vi transporterade först proverna till vårt eget laboratorium och frös flaskorna. Sedan transporterades provflaskorna frysta till ett ackrediterat laboratorium (Centrum för genetisk identifiering vid Naturhistoriska museet) för filtrering och analys. Anledningen till detta var att vi ville minska kontaminationen.

Sommaren 2016 förbättrade vi provhanteringen, då direktfiltrering genomfördes med filterkapslar. Resultaten (som analyserades på Centrum för genetisk identifiering vid Naturhistoriska museet) visade sig vara betydligt bättre med minskad kontamination och ökad mängd DNA i proverna. Rationaliseringen från 2014 var att vi successivt gick från laborativ filtrering till direktfiltrering i fält.

Tänk på att filtrera dina vattenprover så fort som möjligt, och inom 24 timmar.



Figur 44. Hantering av större provtagningsvolym (5 liter) vid eDNA-provtagning av Norasjön 2014 (foto: Patrik Bohman, SLU).

12 Fällning av vattenprover

Flera studier har använt etanol och natriumacetat för utfällning av DNA i vattenprover (Thomsen et al. 2012b; Tréguier et al. 2014; Turner et al. 2014; Biggs et al. 2015; Harper et al. 2018b), efter en metod som gjordes populär av Ficetola (2008). I alla dessa studier var provtagningsvolymerna mycket små (ofta ca 15mL; Fig. 45). Metoden kan därför rekommenderas endast för studier av mindre vatten, som dammar och kärr (Dejean et al. 2012; Sigsgaard et al. 2014; Biggs et al. 2015). Men metoden har trots detta visat sig fungera även i mellanstora sjöar (Thomsen et al. 2012b; Harper et al. 2018b).

Utfällning sker genom en tillsats av en lösning på 3M (3 mol) av natriumacetat (NaOAc) direkt i vattenprovet och sedan tillsätts 95 % etanol. Fördelen med att fälla proverna är att:

- DNA bevaras direkt i provet (snabb och enkel process).
- Etanolen stoppar nedbrytningen av DNA och provet kan sedan förvaras fram till DNA-extraktionen.

Valentini (2016) använde en variant av denna metod för att fälla DNA från filterkapslar (Envirochek), som de tidigare filtrerat 100 liter vatten med. De använde dock en modifierad metod där de först extraherade allt DNA från kapslarna och sedan fällde proverna. Då blev vattenvolymen inte så stor, kanske 250 ml. Detta är ytterligare ett bevis på att metoderna för eDNA-analys kan kombineras, ibland med förträffligt resultat. Några saker som gör att det inte är effektivt att fälla prover i fält är:

- Stora provtagningsvolymerna kräver stora mängder av NaOAc och etanol. Då bör den metod som modifierats av Valentini användas, dvs. att du först använder en Envirochek-filterkapsel och sedan fäller ut DNA från extraktionen (Valentini et al. 2016). Men denna metod fungerar bäst vid semikvantitativ bestämning av arters abundans (ja/nej).

- Risken med att fälla i större mängder är att mycket salt blir kvar som kan hämma amplifieringen av DNA i senare analyser (PCR). Det går dock att avsalta lösningen.
- I SLU Aquas akvarieexperimentet 2015 fick vi inte ut lika mycket DNA vid fällning som vid extraktion (Gyllenstrand 2016). Våra resultat ligger i linje med flera andra eDNA-studier, vilka också fick sämre DNA-extraktioner via fällning (Eichmiller et al. 2016; Piggott 2016; Hinlo et al. 2017).

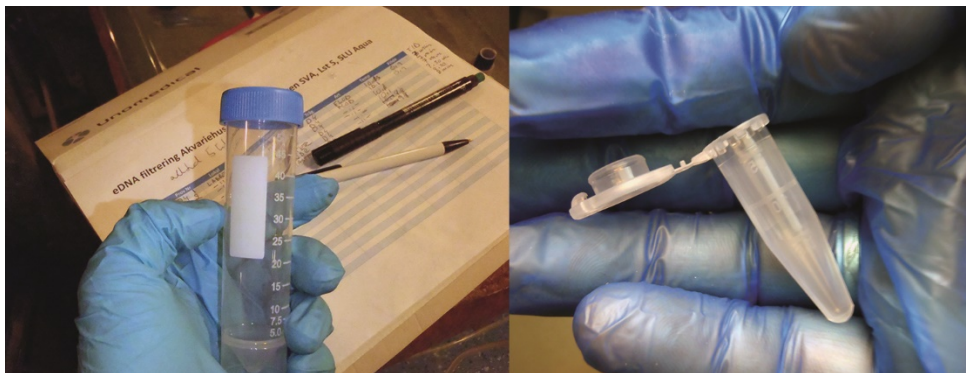


Figur 45. Fällning av eDNA används för relativt små provmängder, eller för redan extraherat DNA i buffertlösning. Foto: Creative Common-licens.

13 Hantering av prover och filtrat

För all provhantering (inklusive filtrat) i fält gäller att försöka minska nedbrytningen av DNA så snabb och effektiv som möjligt. Det är därför bra att tänka på följande vid hantering av filterprover:

- Hantera all utrustning kontaminationsfritt, och använd alltid engångshandskar, samt en steriliserad pincett då du hanterar filtret i filterhållaren (Fig. 35).
- Stoppa filter i en plastpåse eller i ett provrör (Eppendorf- eller Falconrör; Fig. 46) och förslut. Använder du filterkapslar så förslut ändarna med parafilm.
- Använd buffertlösning (t.ex. Longmires lösning) eller etanol för att bevara DNA mer intakt.
- Förvara kallt och mörkt. Det är bra att ha med en kylväska i fält.
- Märk noga upp dina prover med provplats och datum (Fig. 47).



Figur 46. Ett 50 ml Falconrör (vänster) kan ibland vara ett bättre alternativ än små 15 ml eppendorfrör (höger), för att snabbt få ner lite grövre filter (foto: Patrik Bohman, SLU).

Filterprover kan antingen hanteras torrt (silikagel eller frysning) eller i lösning (CTAB, Longmire eller etanol). Alla dessa metoder har visat sig fungera i en mängd olika eDNA-studier (Renshaw et al. 2014; Spens et al. 2016; Majaneva et al. 2018). Filterkapslar (Sterivex och Envirochek) som tillsluts i båda ändar, kan med fördel förvaras kallt och mörkt tills de extraheras (Valentini et al. 2016). Ofta används en stabiliserande buffert som hålls direkt i kapslarna (Spens et al. 2016).

Torrläggning på silika-gel är ett mycket effektivt och enkelt sätt att bevara eDNA-filtrat i fält. I små plastpåsar läggs både filtrat och torrkuddar av silikagel (Wilcox et al. 2016; Majaneva et al. 2018).

Olika typer av buffrar (CTAB, Longmire's och Qiagen ATL) har visat sig fungera mycket bra (Renshaw et al. 2014; Spens et al. 2016; Agersnap et al. 2017; Majaneva et al. 2018). Renshaw (2014) visade att CTAB och Longmire's buffertlösningar (som båda innehåller EDTA) bevarade filterprover i rumstemperatur i upp till två veckor. Buffring av filterproverna är därför lämpligt när det är svårt att hålla proverna kalla i fält. För tillblandning av Longmire's buffert se Longmire et al. 1997. Många molekylärbiologiska laboratorier använder EDTA för att bevara DNA mellan provhantering och extraktion. EDTA, som är en akronym av ett långt namn på en molekyl, hindrar bl.a. enzymet DNase från att sönderdela DNA.



Figur 47. Det är viktigt att märka upp sina prover. Här visas ett provrör från Stensjön insamlat 22/7 2014 (foto: Patrik Bohman, SLU).

Etanol är ett klassiskt sätt att bevara hela exemplar av upphittade arter, och det går med fördel att spara DNA-extrakt i etanol. För ett effektivt bevarande av filterprover bör etanolens alkoholhalt vara 96-98 %. Det kan vara bra att avsalta proverna efter etanolbehandlingen, eftersom salterna kan påverka PCR negativt (Majaneva et al. 2018).

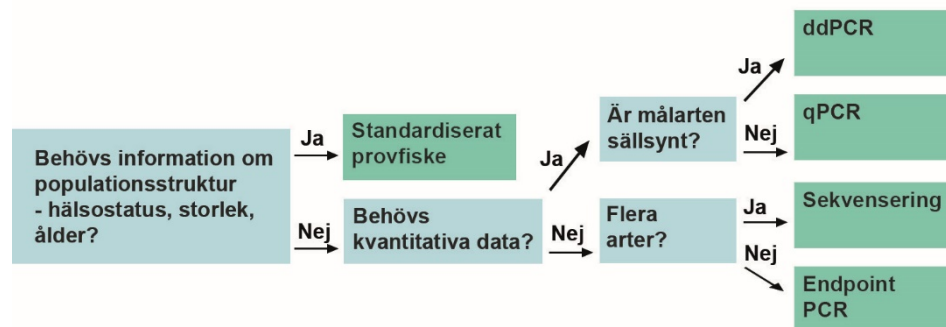
Frysning. Många eDNA-studier fram till 2015 frös sina filterextrakt (-20 grader). Frysningen kan relateras till att filtreringarna mestadels genomfördes på laboratorium och inte i fält (Rees et al. 2014; Adrian-Kalchhauser & Burkhardt-Holm 2016). DNA-kedjorna verkar bli mer labila och kan gå sönder då de fryses mellan -4 till -19 grader Celsius (Anchordoquy & Molina 2007; Shao et al. 2012). DNA-kvaliteten minskar om proverna fryses och tinas en eller flera gånger i följd (Shao et al. 2012; Takahara et al. 2015; Spens et al. 2016). Spens (2016) visade även att frysning var ett sämre alternativ än etanol eller Longmire's buffert när det gäller möjligheten att senare upptäcka målarts-DNA. Takahara (2015) upptäckte att frysta och tinade prover av karp-DNA gav sämre artdetektion trots att DNA-halten var densamma som för prover som inte hade frysts. Helst ska proverna frysas till -20 eller -80 grader Celsius (Goldberg et al. 2016).

14.1 Arbetsflöde för labbanalyser

För en person som är van vid traditionell provtagning inom miljöövervakningen, men ovan vid molekylära metoder, så innefattar eDNA-metodiken många nya steg. Fig. 48 visar ett enkelt flödesschema från provtagning till färdig analys. Enligt figuren (baserad på artbestämning) är det stor skillnad på antal steg inom eDNA-metodik (6 steg) respektive traditionell provtagning (3 steg). Även om detta är en mycket generell uppskattning av de olika arbetsstegen så visar figuren en intressant jämförelse mellan molekylär (eDNA) och ekologisk (traditionell) metodik.

Frågeställning

Din ursprungliga frågeställning avgör vilka metoder du kan eller bör använda på labb. Detta bestämmer i sin tur vad det hela kommer att kosta. Generellt kan man säga att det rör sig om enartsanalyser eller flerartsanalyser (metabarcoding). Dessutom kan olika nivåer av kvantifiering och noggrannhet läggas till, vilket förlänger analystiden något. Figur 49 visar hur svaren i ett beslutsträd ger dig olika möjligheter för analys. Den enklaste enartsanalysen är konventionell PCR (endpoint PCR), medan sekvensering används vid flerartsanalyser eller för analys av okända arter. Vill du genomföra en förbättrad kvantifiering så används olika PCR-metoder (qPCR eller ddPCR; se PCR). Framsteg inom PCR-tekniken har gjort att det nu är möjligt att använda PCR för upp till 12 kända arter samtidigt. Vid sekvensering behöver du dock inte i förväg känna till vilka arter som finns i vattnet.



Figur 49. Exempel på ett beslutsträd för att genomföra eDNA-analyser (illustration: Patrik Bohman, SLU, efter en idé av Evans & Lamberti 2018).

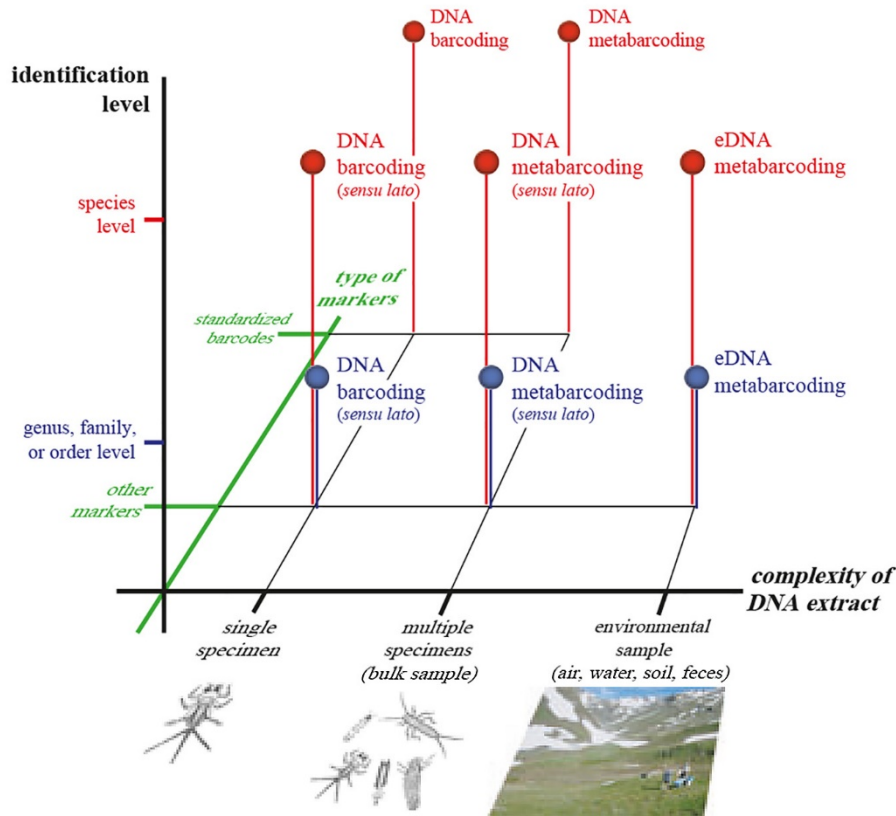
Vanliga frågeställningar för att ta reda på vilken labbanalys som bör användas (Fig. 16-17 och 49) är t.ex.:

- *Finns ett fåtal specifika arter på lokalen (ja/nej)?* Med denna kvalitativa frågeställning räcker det med att arbeta fram till och med PCR-analys.
- *Vad är detta för art (okänd)?* Du vet t.ex. att det finns en invasiv eller sällsynt art i området, men inte vilken art det rör sig om. Det är fortfarande frågan om en enstaka art, men du måste då sekvensera innehållet i dina eDNA-prover och jämföra varje sekvens mot en databas som innehåller arts specifika sekvenser från många olika arter. Slutligen kommer målarten att identifieras, genom att rätt sekvens från databasen matchas positivt mot provets DNA-innehåll. En förutsättning för en positiv matchning är förstås att målartens sekvens redan finns i databasen.
- *Vilka fiskarter finns i vattnet?* Ibland finns det behov att försöka identifiera samtliga fiskarter i ett vatten eller provtagningsområde. Då måste du genomföra alla steg i eDNA-metodikkedjan, fram till och med sekvensering (Fig. 52). Du använder samma typ av markör och universella primers för att identifiera alla fiskarter (benfiskar) vid sekvenseringen. Sedan matchar du resultatet av sekvenseringen mot referenssekvenser i en databas.
- *Vilka arter finns det totalt (av fisk, kräftor och musslor) i vattnet?* Är du intresserad av analyser på samhällsnivå, dvs. av samtliga arter av fisk, musslor och kräftor inom en sjö så krävs det också att du sekvenserar dina prover. Dessutom måste flera olika markörer ofta användas då det rör sig om olika organismgrupper (tabell 3). Visserligen kan det räcka det med PCR för kräftor och stormusslor, eftersom grupperna innefattar så få arter, medan du måste genomföra sekvensering för identifieringen av fisksamhället.
- *Hur mycket av en viss art finns på lokalen?* Idag finns det stora behov att kvantifiera eDNA-provtagningen för en viss art, eller för flera arter. För kvantifiering används idag qPCR och ddPCR.

Provets karaktär

Flera samverkande faktorer bestämmer vilken typ av analys som senare kommer att användas. Figur 50 utgår först och främst från vilket typ av prov du har (x-axel). Det kan röra sig om ett vävnadsprov från en individ, ett bulkprov (t.ex. från sediment) med flera arter eller ett eDNA-prov från en sjö. Provets komplexitet baseras på dess innehåll och bestäms bl.a. av DNA-mängd/kvalitet och antal kända eller okända organismer. Det mest komplexa provet utgörs av ett eDNA-prov (t.ex. från vatten), då det består av många okända arter med delvis nedbrutet DNA. Provets komplexitet och vår egen frågeställning avgör vilken typ av markör som används för att identifiera våra arter (z-axel), samt vilken typ av analys som kan utföras.

Valet av markör är viktigt eftersom det avgör hur noggrant du kan bestämma taxonomin hos organismen/-erna (y-axel), dvs. om det sker på släkt-, familj- eller artnivå (se Artidentifiering med markörer och primers).



Figur 50. Beroende på vad du vill veta, vilken typ av prover du tar och frågans komplexitet så finns möjligheter att använda DNA-teknikens olika barcoding-analyser. Figuren är 3-dimensionell där axlarna visar: provets komplexitet (x-axel), typ av markör (z-axel) och taxonomisk identifieringsnivå (y-axel). Källa: Taberlet et al. 2012.

Kontaminationskontroll

Det kan inte nog poängteras att det alltid finns en risk att kontaminera prover. Därför är det viktigt att laboriet som anlitas använder separata rum för olika analyser och kontaminationsfri utrustning, samt att olika kontroller och tekniska replikat används (se Hantering av förorening och felkällor på labb; Fig. 51).



Figur 51. Kontakta ett pålitligt laboratorium som kan utföra eDNA-analyser med bra rutiner och god kontaminationskontroll (foto: Mark Harris, SLU).

Flödesschema för labbanalyser

Fig. 52 visar vilka steg som behöver tas för att genomföra en eDNA-analys från vattenprov, oberoende av din frågeställning.



Figur 52. Flödesschema över de olika momenten vid analys av eDNA på ett laboratorium (illustration: Patrik Bohman, SLU).

Om flödesschemat i figur 52 följs så kan de olika stegen på labb förklaras enligt följande:

- *Provberedning.* För att labbet ska kunna analysera dina prover, måste dessa noggrant märkas upp. Om proverna innehåller sediment eller kommer från förfiltrering, måste de dessutom homogeniseras och sedan märkas (se DNA-extraktion).
- *Extraktion och kontroll av DNA.* Efter beredningen av prover måste DNA isoleras och renas. Filtraten innehåller ju allt möjligt som du inte vill ha med i en analys, t.ex. olika organiska molekyler som kan påverka PCR. Efter genomförd extraktion kontrolleras hur mycket DNA som finns kvar och om det är av god kvalitet. Laboratoriet beslutar därefter om det är möjligt att fortsätta med analyserna (se DNA-extraktion; Kontrollera och kvantifiera DNA).
- *Markörval och primerdesign.* Beroende på organismgrupp, typ av prov (vatten, sediment etc.) och analysmetod (PCR eller sekvensering) så väljs en markör ut. Dessa markörer används sedan för att tillverka de primers som hjälper till att kopiera upp DNA vid PCR-analysen (se Artidentifiering med markörer och primers).
- *PCR och kontroll av DNA.* Det är ofta mycket lite målarts-DNA i vattenprover. Det innebär att labbet måste använda PCR för att mångfaldiga DNA-fragmenten så att det kan analyseras vidare. Efter avslutad PCR renas DNA från restprodukter. Kontroller görs även för att säkerställa att tillräckligt med DNA har producerats för att kunna gå vidare till sekvensering (se Förberedelser inför PCR; PCR).
- *Förberedelser inför sekvensering.* Innan labbet låter en sekvenseringsmaskin läsa sekvenser, måste proverna förberedas. Så kallade "bibliotek" skapas genom att först späda, sedan märka upp och slutligen blanda samman (poola) samtliga prover (se Förberedelser inför sekvensering).
- *Sekvensering.* Vid sekvensering läses ordningsföljden av de olika nukleotiderna i de undersökta fragmenten. Flera prover behandlas samtidigt, men tack vare att proverna tidigare har märkts så ser maskinen skillnad på dem. Flera miljoner läsningar görs, beroende på hur djupt maskinen tillåts läsa. Detta tar tid, betydligt längre tid än vid en PCR-analys, och genererar hundratals gigabytes (GB) av information (se Sekvensering).
- *Bioinformatik, artbestämning och statistisk bearbetning.* När sekvenseringen är klar så behöver all sekvenseringsdata tolkas av datorprogram. Detta görs med hjälp av bioinformatik. De olika sekvenserna matchas därefter mot en databas som innehåller sekvensinformation från samtliga arter som kan finnas i dina vattenprover (se Bioinformatik: att tolka data). Du behöver därefter gå igenom och

verifiera dina sekvenserade arter och göra statistiska analyser för att se hur rimliga resultaten är (se Slutlig utvärdering av resultat).

- *Lagring.* Slutligen samlas DNA-extrakt och sekvenseringsdata på stabila lagringsplatser. För miljöövervakning så är det viktigt att DNA-extrakt sparas och görs tillgängliga så att kompletterande analyser kan göras vid senare tillfällen (se Lagring av prover och data).

14.2 Kontakta ett laboratorium

Idag ökar antalet laboratorier som utför eDNA-analyser av vattenprover, i Sverige, inom EU och ännu längre bort (USA, Korea och Indien). De är dock inte så många som man kan tro, eftersom eDNA-analys ännu inte används så särskilt frekvent. Marknaden kommer dock att växa, och inom några år beräknas allt fler eDNA-laboratorier utvecklas.

Kommersiella laboratorier erbjuder tjänster i form av artidentifiering/ biodiversitetsanalys (med hjälp av PCR och sekvensering), samt teoretisk/analytisk experthjälp. Det kan gälla allt ifrån provtagning, filtrering och extraktioner till färdiga analyser. *Forskningslaboratorierna* är ofta direkt knutna till olika universitet, och kan erbjuda samma typ av tjänster som de kommersiella, men utför för det mesta inte rena rutinuppdrag. Många labb vill gärna arbeta med utvecklingsprojekt som leder till vetenskapligt publicerbara resultat. De kommersiella laboratorierna investerar ofta stora summor i att t.ex. förbättra detaljer i labb-protokoll eller utveckla artspecifika eller universella primers. Eftersom det handlar om privatinvesteringar, så väljer dessa laboratorier att inte avslöja detaljer kring sitt utvecklingsarbete. Du kan följaktligen stöta på problem med att publicera dina resultat om t.ex. de primers du använt inte tidigare har publicerats. Laboratorier som är knutna till universitet eller statliga museum finansierar större delen av sin verksamhet med skattemedel, vilket innebär att det finns en skyldighet att mer öppet redovisa sin metodik, sitt arbetssätt, samt vilka primers de använder.

Vissa labb utför inte provberedning (från filtrat) eller DNA-extraktion, ofta pga. att detta tar lång tid. Du kan då välja att anlita ett specifikt labb för provberedning och DNA-extraktion och ett annat labb för PCR och sekvensering. Mindre labb skickar ofta iväg prover för sekvensering till större kommersiella labb, vilket innebär att fler labb involveras i analyskedjan av proverna. Det bör inte spela någon roll om olika labb utför olika arbeten. Du kan även skicka prover utomlands för att minska kostnader. Det kan vara en fördel att teckna flera avtal om flera labb hanterar dina prover, då olika laboratorier har olika rutiner. Det kan också vara bra att veta att det är långt ifrån alla labb som specialiserar sig på eDNA-analyser. De labb som

är intresserade och har jobbat med barcoding från vävnadsprover kanske inte tidigare har arbetat med just vattenprover, dvs. prover där DNA-halten är mycket låg eller där dina målarter är mycket sällsynta. De eDNA-labb som precis har börjat arbeta med vattenprover kan ha flera år kvar att utvecklas. Risken med att anlita sådana labb är att det tar längre tid att utveckla fungerande rutiner eftersom många metoder då måste finslipas för att fungera optimalt. Resultatet kan då bli att projektet försenas, fördras eller att laboratoriet helt misslyckas med att analysera arterna i dina prover.

Tabell 2. Exempel på laboratorier som utför analyser i anknytning till eDNA, i Sverige och utomlands. Det finns betydligt fler laboratorier som genomför eDNA-analyser än vad som redovisas här.

| Namn | Tillhörighet | Forskning | Uppdrag | Hemsida |
|-------------------|--|-----------|---------|--|
| UMBLA | SLU | Ja | Nej | www.slu.se |
| CGI | Naturhistoriska museet | Ja | Ja | www.nrm.se |
| SciLife Lab | KI, KTH, SU, UU | Ja | Nej | www.scilifelab.se |
| SeAnalytics | Kommersiellt företag | Ja | Ja | www.seanalytics.se |
| AquaBiota | Kommersiellt företag | Ja | Ja | www.aquabiota.se |
| LECA | Grenoble Universitet, Fr | Ja | Nej | www.leca.ujf-grenoble-fr |
| SpyGen | Kommersiellt företag; Fr | Ja | Ja | www.spygen.com |
| INRA | French Institute for Agricultural Research, Fr | Ja | Nej | www.institut.inra.fr |
| Eurofins Genomics | Kommersiellt företag, Ty | Nej | Ja | www.eurofinsgenomics.com |
| Nature Metrics | Kommersiellt företag, UK | Ja | Ja | www.naturemetrics.co.uk |
| Macrogen | Kommersiellt företag, globalt | Ja | Ja | www.foreign.macrogen.co.kr |

Kontakta ett molekylärbiologiskt barcoding-labb med gott anseende

Olika labb erbjuder olika tjänster, och har därigenom olika prisbilder. Tänk igenom vilka analyser som verkligen behöver göras i projektet. Det finns stora prisskillnader om du enbart använder qPCR, eller om du istället väljer att sekvensera samtliga arter. En del labb kommer också att föreslå helhetslösningar, dvs. att de själva utför allt ifrån provtagning till färdig analys, inklusive tolkning av resultat och rapport-skrivning. Vill du ha bättre kontroll över processen (vilket är att rekommendera), ta då själv ställning till vilka delar du behöver hjälp med i ditt projekt.



Figur 53. Det är viktigt att skapa god kontakt med personal på ett pålitligt laboratorium (foto: Mattias Pettersson, SLU).

Skapa en god relation med personal vid laboratoriet

Det är alltid bra att kunna diskutera basala frågor, som t.ex. vilka analyser som labbet utför, hur felkällor hanteras och vilka laborativa delar som kan kvantifieras (Fig. 53). Det är också viktigt att labbet hjälper dig att tolka data från PCR eller sekvensering. Om det uppkommer problem, och provtagningar behöver upprepas, bör provtagningsdesign och hantering av felkällor diskuteras med laboratoriet. Vissa laboratorier (t.ex. Scilife lab) erbjuder hjälp med projektplanering, vilket t.ex. alltid bör involvera en bioinformatiker.

Gör upp avtal och ställ krav

En tydlig kravspecifikation anger vad som ska utföras och när det ska vara klart. Bestäm vilka analyser och tjänster som laboratoriet och övriga inblandade ska bistå med, och vad det hela kommer att kosta. Eftersom avtalet beskriver samtliga parter rättigheter/skyldigheter så är det viktigt att upprätta ett skrivet avtal i ett så tidigt skede som möjligt. Följande delar kan vara viktiga att tänka på då ett avtal upprättas:

- Kräv transparens i hela processen. Labbet bör i detalj redovisa vad som görs och hur det görs. Det underlättar då andra experter senare tolkar resultatredovisningen i rapporten. Om du själv utför delar av eDNA-undersökningen (t.ex. insamling av vattenprover) så måste du få god vägledning om hur detta ska ske. Begär att labbet i detalj förklarar hur de har tolkat resultaten. Det kan vara knepigt att som icke-genetiker/bioinformatiker förstå hur resultat från qPCR (som ger en viss kvantifiering) eller sekvensering ska tolkas. Alternativt kan resultaten lämnas till en extern expert. Vissa metoder i labben är optimerade och kan vara hemliga (i alla fall i detalj). Andra knepiga delar är möjligheten att använda primers som är patenterade (se Stora utmaningar för eDNA).

- Acceptera inte förseningar. Sätt en absolut deadline för när analys och rapport ska vara klara, så att labbet prioriterar att utföra även mindre uppdrag på ca 50 tSEK enligt plan. Om projektet är ett utvecklingsprojekt kan olika deadlines specificeras för optimeringsåtgärder och för de slutliga analysresultaten.
- Det ska tydligt framgå vem som äger data. Det är bättre att du lägger in det i avtalet från början än att förhandla om det under projektets gång. Det är viktigt att alla resultat finns tillgängliga efter avslutat projekt (så att de lätt kan återfinnas och säkerhetskopieras; se Lagring av prover och data). Ibland vill vissa labb vara med på publicerade artiklar. Då får du själv fundera på om laboratoriet ska anses vara en samarbetspartner eller anlitas enbart som konsult. Ofta ställs andra krav på samarbetspartners, och projektkostnaderna brukar då också sökas gemensamt via olika utlysningar.
- Övriga krav. För att laboratoriet ska kunna utföra rättvisande analyser av dina prover bör du ställa krav på restriktioner kring kontamination. En del labb kan vara nystartade eller vana att arbeta med andra typer av genetiska analyser och därför inte riktigt når upp till kraven (se Hantering av förorening och felkällor på labb). Det är inte heller säkert att laboratorier som anlitas är ackrediterade för detta arbete, eftersom ackrediteringen är en dyr process.

Kritiskt tänkande

Tänk kritiskt under hela processens gång och försök ha kontroll på eventuella problem (t.ex. kontamination). Du behöver förstå de olika delarna i metodikkedjan för att genomföra eventuella förbättringsåtgärder. Fundera t.ex. på varför du fick så lite målarts-DNA i dina prover (om det nu blir så) fast du tyckte att du genomförde provtagning och filtrering på ett genomtänkt sätt. Saknas det kanske replikat? Ofta kan detta analyseras i sin helhet först då alla resultat är levererade. Trots detta är det alltid viktigt att fundera på vad du kan förbättra inför nästa eDNA-projekt.

Kvalitetskontroll & feedback

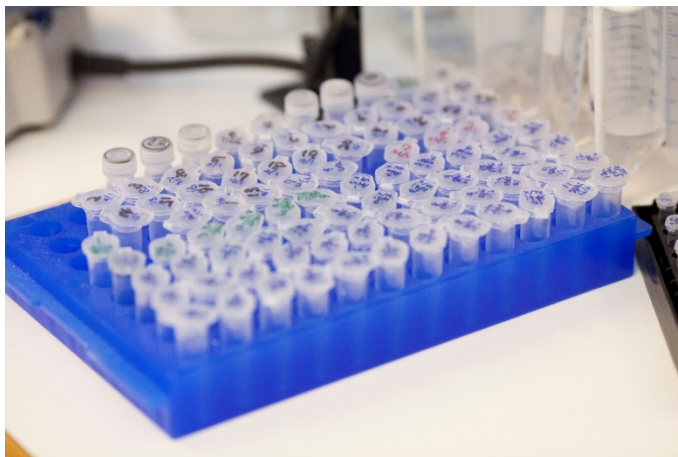
De flesta laboratorier genomför och redovisar någon form av kvalitetskontroll. Föreslå ett slumpmässigt urval av dina färdigextraherade prover och begär feedback, gällande DNA-kvalitet, spårbar mängd DNA och PCR-framgång (success rate) från dina prover. Ta ställning till om det är värt att gå vidare med sekvensering. En sådan utvärdering kan med fördel göras tillsammans med personal från sekvenseringslaboratoriet eller andra experter.

Skicka iväg prover

Ibland finns inte möjlighet att själv besöka det laboratorium som ska analysera prover. Vissa labb utomlands kan dessutom vara mer kostnadseffektiva än i Sverige eller Europa. Då kan proverna skickas med post direkt till labbet. Proverna behöver

då förberedas för att laboratoriet ska kunna ta hand om dem på rätt sätt. Här följer några allmänna riktlinjer om förberedelser innan de skickas iväg:

- *Krav på dina prover.* Olika labb har olika krav för hur prover ska ”paketeras”, märkas och kvalitetssäkras. Större labb tar för det mesta endast hand om färdig-extraherat material.
- *Behöver du tillstånd?* Du behöver inga särskilda tillstånd då du skickar prover från vatten, eftersom det inte rör sig om animaliska biprodukter, utan vattenprover. Om dina prover däremot ska skickas utanför Sverige, så måste du kontrollera eventuella regler vid förtullning av DNA-prover. Se även *Nagoyaprotokollet*, angående hur genetiskt material ska hanteras utanför Sverige (regleras av EU-förordning 511/2014). Vissa länder, som Australien och Canada, har ganska restriktiva bestämmelser för hur genetiska prover skickas över landets gränser. Rekommendationer för hur paketets innehåll bör deklarerars finns på <https://genohub.com/dna-rna-shipping-for-ngs/>.
- *Proverna skickas som filtrat eller färdig-extraherade.* Ofta kan du komma överens med laboratoriet att de utför allt från DNA-extraktion till färdig analys. Då skickar du filtraten i en specifik buffertlösning som håller proverna friska under några veckor (se Hantering av prover och filtrat).



Figur 54. Tänk på hur många tekniska replikat som behövs på labb. Ett ökat antal ger ofta bättre upplösning, medan alltför många förlänger analystiden och ökar kostnaderna (Foto: Julio Gonzalez, SLU).

15 Hantering av förorening och felkällor på labb

Föroreningar och felkällor (bias) kan påverka hela kedjan från provberedning och DNA-extraktion till sekvensering och bearbetning av resultat. Dessutom är det betydligt fler steg som måste beaktas vid analyser av eDNA till skillnad från traditionell provtagning, som t.ex. elfiske eller nätprovfiske (Fig. 55; Valentini et al. 2016; Alberdi et al. 2017). Därför är det viktigt att ständigt förbättra och vara medveten om risker för kontamination i labbmiljön.

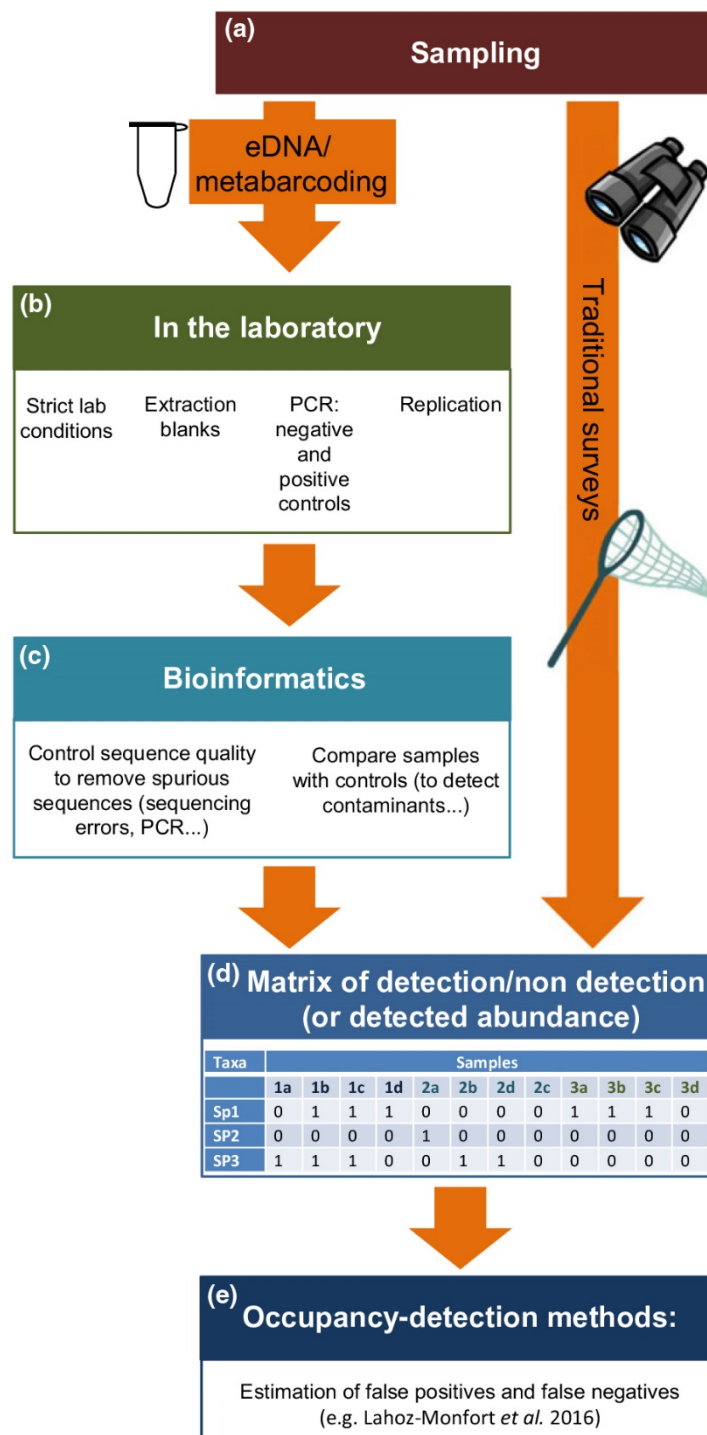
Kontamination och bias övervakas på liknande sätt i ett labb som det gör vid provtagning i fält (se Hantering av förorening och felkällor i fält). Det är dels avgörande att minska kontaminationen i ett laboratorium och dels viktigt att använda kontroller för att spåra felkällor.

15.1 Hantering av kontamination

Innan du skriver på ett avtal med ett externt eDNA-laboratorium är det bra att veta vilka krav som bör ställas när det gäller åtgärder att minska kontamination på labbet.

DNA-fria utrymmen

Det går inte att genomföra provhantering, filtrering eller extraktion i vilka utrymmen som helst (Fig. 56). Istället behövs kontaminationsfria och separata labbutrymmen speciellt vid provhantering och extraktion då DNA-mängden i proverna är mycket mindre än efter PCR-stegen. Kontakta därför ett pålitligt laboratorium med ett bra säkerhetstänk. Labbrummen delas in i två typer beroende på var i processen du arbetar – innan (pre) eller under/efter (post) PCR. En del benämner dessa som våtlabb (extraktion) respektive torrlabb (PCR).



Figur 55. eDNA-analys kräver fler steg än traditionella undersökningar. Varje steg kan utgöra en potentiell källa för bias och kontamination (Ficetola *et al.* 2016).

United States Fisheries and Wildlife Services föreslår en noggrannare uppdelning av skilda rum för att kontaminationsfritt kunna arbeta med eDNA under de olika förloppen (USFWS 2017):

- DNA-fritt labb. Här förbereds fältproverna för analyser på labb, t.ex. förbehandling eller homogenisering av prover.
- Labb med låghaltigt DNA. Här utförs DNA-extraktioner från vattenprover.
- Klassiskt DNA-labb. Här utförs DNA-extraktioner från vävnadsprover (för att skapa genetiska referensdatabaser), samt positiva kontroller före själva amplifieringssteget (PCR).
- Labb för amplifierat DNA. Här genomförs amplifiering (PCR) av DNA.

Mycket restriktiva regler måste gälla då personal rör sig mellan låg- och höghaltiga DNA-rum (Valentini et al. 2016; Agersnap et al. 2017; USFWS 2017; Taberlet et al. 2018):

- Rummet utrustas med positivt lufttryck. På det sättet kan inte luft (som bär med sig DNA) tränga in i rummet.
- Specifika regler gäller angående personal, klädsel och utrustning.
 - Labbpersonalen ska normalt använda full skyddsutrustning (engångsskydd, huva, ansiktsmask, specifika labbskor, skoskydd, dubbla handskar).
 - Kläder sätts på i en luftluss innan personalen går in i det DNA-fria rummet.
 - Ingen utrustning får lämna rummen, förutom då det kasseras.

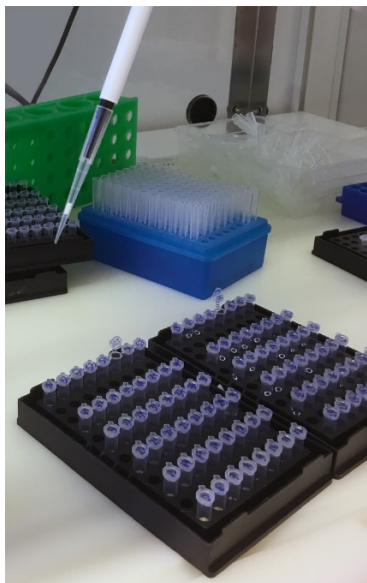


Figur 56. Hantering av förorening är fundamentalt inom eDNA-provtagningar. Det går inte att sätta upp ett filtreringslabb i vilka utrymmen som helst. Bilden är från en test av eDNA-metodiken i ett "orent" rum vid SLU Aqua 2014. Det visade sig (som väntat) att korskontamineringen var stor (foto: Patrik Bohman).

Lite mer allmänna regler för arbete med eDNA på labb är följande:

Kontaminationsfri utrustning

Välj i första hand utrustning som så långt som möjligt går att rengöra. Anpassa din utrustning så att den blir mindre ”kontaminationskänslig”. En möjlig föroreningskälla är t.ex. vid pipettering eftersom detta sker så många gånger under labbanalyserna. Använd t.ex. pipettspetsar med filter (Fig. 57). Det minskar risken att aerosol (inne i spetsen) förs vidare till andra pipettrör.



Figur 57. Pipettering med filterpipett som förhindrar förorening mellan prover, från SLU:s Metabarcoding Laboratorium, UMBLA (foto: Patrik Bohman, SLU).

Rengöring och specifika arbetsrutiner

Regelbunden rengöring av laboratoriet och dess utrustning ska göras. Bland annat ska dragskåp och sidorum behandlas med UV-ljus för att bryta ner DNA flera timmar (gärna 24 timmar) innan själva extraktionen genomförs (Agersnap et al. 2017; USFWS 2017). Bordsytor och instrument ska dessutom rengöras med 10 % klorinlösning och 70 % etanol både före och efter laboratoriearbeten. Extraktionen bör genomföras minst en dag innan någon form av PCR utförs. Då minskas risken att externt DNA kontaminerar PCR-processen.

Automatisering

Användning av automatiserade rutiner inom eDNA-labbarbetet ökar både effektiviteten och minskar felkällor. En fördel med automatisering är t.ex. att risken för fel-pipetteringar (och därmed förväxling av prover) elimineras.

15.2 Kontroller ger spårbarhet

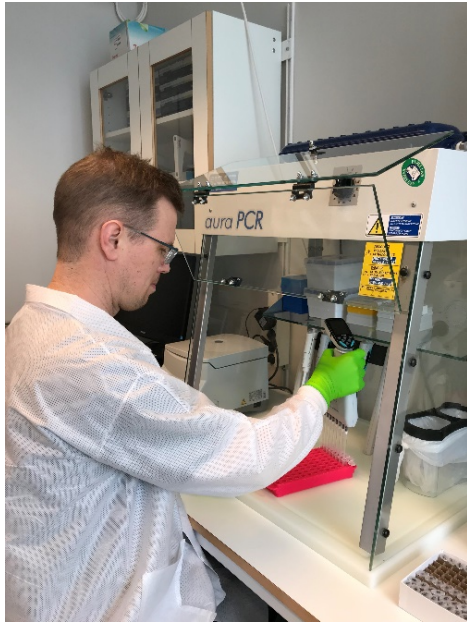
Kontroller är själva grundvalen i god vetenskaplig praxis och bör inte ignoreras för att minska kostnader eller spara tid. De är nödvändiga för att rapportera korrekta vetenskapliga undersökningar. Olika typer av kontroller ger möjlighet att validera metoden, samt spåra källan för felaktigheter. Detta är speciellt viktigt då många prover hanteras. Labbanalyser använder till viss del samma typ av kontroller som vid fältarbetet, dvs. negativa och positiva kontroller, samt replikat (se Hantering av förorening och felkällor i fält). Vid laboratoriekontroller tillkommer även märkningskontroller och interna kontroller. Vid ett normalt experimentupplägg rekommenderas 10-20 % kontroller utifrån samtliga körningar (Taberlet et al. 2018).

Negativa kontroller (extraktion & PCR)

Negativa kontroller kan kontrollera om en förorening inträffat i en viss analys. Dessa kontroller innehåller alla reagenser som behövs förutom något DNA (därför kallas de även "blank"-prover). En negativ kontroll körs samtidigt med aktuell analys. Eftersom inget DNA tillförs i reaktionen, så ska heller inte några DNA-fragment hittas efter avslutad analys. Negativa kontroller bör användas vid både extraktion och PCR (Taberlet et al. 2018). Om DNA, mot förmodan, upptäcks i en den negativa kontrollen så har provet förorenats. Du måste då lista ut vad detta kan bero på, och om detta innefattar flera prover.

Positiva kontroller (PCR)

Många gånger negligeras positiva kontroller vid metabarcoding-studier, trots att de kan förbättra tolkningen av resultat (De Barba et al. 2014; Taberlet et al. 2018). Positiva kontroller innehåller alla reagenter som tillförs vid PCR, förutom målarts-DNA, samtidigt som det "spetsas" med ett mycket specifikt DNA från en art som inte kan förekomma i dina vattenprover, t.ex. en exotisk fiskart (eller musgenen HemT). Positiva kontroller kan kontrollera för inhibering av prover. Om du t.ex. uppmäter mindre DNA efter PCR än vad du bör ha (med tanke på ditt DNA-spetsade prov), kan du räkna med att du har amplifieringsproblem.



Figur 58. Om många replikat ska utföras så är det en fördel att använda en fler-pipett. Bilden är från CGI:s DNA-laboratorium vid Naturhistoriska riksmuseet (foto: Niclas Gyllenstrand, CGI).

Interna kontroller (extraktion & PCR)

Vid en intern kontroll tillsätts en mycket liten mängd DNA (från dina egna prover) till PCR-reaktionen. Detta är för att ge ett litet positivt utslag i den färdiga PCR-produkten, som då blir en positiv kontroll. Alternativt kan detta DNA tillsättas innan extraktionen (Taberlet et al. 2018).

Tekniska replikat (extraktion & PCR)

Delprov (tekniska replikat) från samma biologiska prov görs för att minska olika stokastiska effekter vid extraktion och PCR, vilket hjälper till att kontrollera metodens validitet. PCR kan t.ex. misslyckas om primers inte fäster vid utvalda sekvenser pga. att koncentrationen målararts-DNA är alltför låg. Mängden replikat kan variera beroende på kvantifieringsbehov, men det finns rekommendationer på tre (triplikat) vid extraktion och upp till 8 vid PCR (Ficetola et al. 2015; Fig. 58). Speciellt när PCR används vid flerarts-studier (då sannolikheten att upptäcka arter varierar) bör man använda replikat. Resultat visar att det är vanligt att endast 1 av 12 replikat är positivt, vilket indikerar att eDNA-koncentrationen av målararten i proverna är mycket låg. Detta rättfärdigar den höga mängden replikat för att få mer pålitliga resultat (Herder et al. 2014). Vid en flerartsstudie ökade antalet bestämda arter med 30 % när antalet PCR-replikat ökade från ett till tre (Alberdi et al. 2017). ddPCR kan med fördel användas om många tekniska replikat behövs (se PCR). Det finns en risk att falska positiva ökar vid ökat antal replikat, dvs. att man finner en art som inte förekommer på platsen (Ficetola et al. 2016).

Sätt ett tröskelvärde

Data från PCR och sekvensering måste använda detektionsgränser för att tolkas korrekt. Idag saknas tyvärr tydliga riktlinjer för detektionsgränser vid qPCR av prover med lite DNA-innehåll (Agersnap et al. 2017; Hunter et al. 2017). Nuvarande strategier är antingen för hårt dragna eller rent subjektiva, vilket resulterar i bias vid tolkning av om arten finns i provet eller inte (Hunter et al. 2017). En dansk och norsk studie av eDNA från kräftor beskriver dock en robust metodik för att utvärdera resultat från qPCR på eDNA-prover (Agersnap et al. 2017). För att minimera risken för falska positiva bör man t.ex. inte köra för många PCR-cykler (över 41) eller sekvensera alltför djupt. Anledningen är att det då tenderar att dyka upp falska positiva, vilket är ett resultat av att bakgrunds-”bruset” förstärks (Ficetola et al. 2016; Alberdi et al. 2017; Taberlet et al. 2018). Tröskelvärdena för både PCR och sekvensering har då passerat rimliga gränser. *Positiva kontroller* används ofta för att finjustera filtreringen (tröskelvärdet) för läsning av antal sekvenser. Det baseras på att sekvenser med endast ett fåtal läsningar ofta anses vara artefakter, vilket innebär att arterna (som matchas till dessa sekvensläsningar) egentligen inte finns i proverna. Därför måste alltid tröskelvärden och filtreringar av resultat anpassas till själva studien (Agersnap et al. 2017; se PCR; se Bioinformatik: att tolka resultat).

Märkningskontroller

Vid många prover vid flerartsstudier behövs ett system för att särskilja proverna från varandra. Varje prov får då en specifik ”tagg” som består av en specifik kombination av nukleotider. Denna tagg sätts ofta till proverna vid PCR (Clemmensen et al. 2016). Om flera prover skulle få samma taggning (s.k. ”tag jumps”), måste detta kontrolleras med några oanvända taggnings-kombinationer. Detta kan sedan utvärderas i sekvenseringssteget (Taberlet et al. 2018; se Sekvensering).

16 Artidentifiering med markörer och primers

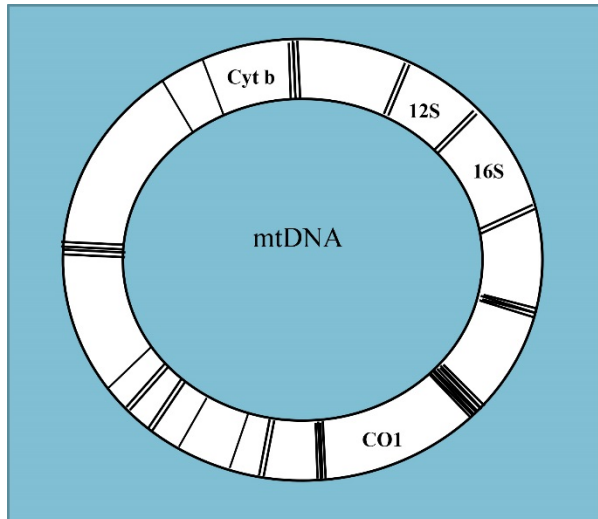
Innan all analys av vattenprover kan påbörjas måste ett verktyg, som kan identifiera provernas målarter, väljas ut. Detta kapitel förklarar hur det går till.

Det mest exakta identifieringsverktyget baseras på arternas egna ”genetiska fingeravtryck”. Det kallas så eftersom varje art har en unik genetisk uppbyggnad. Det går alltså att identifiera specifika arter enbart med hjälp av deras sekvensordning av kvävebaser i arvsmassan. För att kunna göra detta måste området som ska användas för att matcha ”fingeravtrycken” först väljas ut. Dessa områden kallas genetiska ”markörer”, dvs. en specifik DNA-sekvens, och kan bestå av en gen eller icke-kodande DNA. Hos djur sitter de antingen i cellernas kärn-DNA eller inne i mitokondriernas DNA (mtDNA). mtDNA används mest frekvent för fisk och kräftor, och därför fokuserar texten på mtDNA. Efter markörvalet tillverkas s.k. ”primers”. De fungerar som startsekvens och hjälper till att kopiera utvalda DNA-sekvenser för målarter under PCR-processen (se PCR).

16.1 Att välja genetisk markör

Beroende på frågeställning och målorganismer väljs en passande markör. *Är du ute efter några få arter, eller samtliga arter i en sjö? Gäller det enbart fisk, eller vill du även inkludera kräftor och musslor i undersökningen?* Även däggdjur och fåglar som besöker lokalen kan analyseras. De områden som används för fisk och kräftor sitter alltså i mtDNA. Mitokondrier är cellernas energifabriker eftersom de tillverkar ATP (se Att försöka förstå eDNA). mtDNA innehåller 37 gener som kodar för tillverkning av enzymer och proteiner, viktiga för att mitokondrierna ska fungera (Fig. 59).

mtDNA-markören CO1 har sedan 2003 varit ett standardiserat område för att identifiera vävnadsprover från eukaryoter (Fig. 59; Hebert et al. 2003). Eftersom vävnad för det mesta är intakt och inte nedbrutet, så innehåller dessa prover betydligt längre DNA-fragment (antal baspar = ca 650) än t.ex. vattenprover som består



Figur 59. Generell bild av mtDNA med markörer som ofta används för att identifiera fisk och kräftor (illustration: Patrik Bohman, SLU).

av nedbrutet DNA (antal baspar = 80-180). Därför går det inte alltid att använda en markör (t.ex. CO1) som identifierar långa DNA-fragment för att spåra halvt ned brutet fisk-DNA i vattenprover (Ivanova et al. 2007; Deagle et al. 2014). Fram till 2016 användes ofta mtDNA-markören CO1 för att identifiera fisk. En del fiskarter kan dock vara svåra att särskilja från andra inom CO1, och det verkar som om dessa markörer kan "maskera" vissa arter från att upptäckas vid flerartsanalyser (Lundström et al. In press). Detta gäller t.ex. sik och siklöja, men även vissa karpfiskar och andra närbesläktade arter är svåra att särskilja från varandra.

I naturvatten är DNA delvis nedbrutet, vilket ställer höga krav på de markörer som väljs ut för att identifiera DNA från vattenprover:

- De ska vara tillräckligt korta (antal baspar = 80-150) för att kunna identifiera delvis nedbrutet DNA i dina vattenprover
- De ska vara tillräckligt lika (uppvisa liten variation) för att kunna identifiera en specifik art
- De ska variera tillräckligt mycket för att man ska kunna skilja mellan arter
- De ska kunna amplifieras specifikt med universella PCR-primers för många olika taxa
- De ska innehålla tillräckligt med fylogenetisk information

Nya forskningsrön talar dock för att dessa punkter kan komma att ändras, då hela genomet sekvenseras och primerdesignen blir mer flexibel (Deiner et al. 2017b).

Flera olika markörer används idag inom eDNA-studier (tabell 3). De olika markörerna har olika variabilitet och taxonomisk täckningsgrad, vilket innebär att de används för olika ändamål inom genetiken. Ofta används olika markörer beroende på frågeställning, organismgrupp, och på vilken typ av prov som ska analyseras (Fig. 50). Valet av markörer handlar därför om kompromisser, då det idag saknas en enda ”gyllene” idealmarkör för alla typer av studier och organismer (Kelly et al. 2017).

Tabell 3. Olika markörer används idag för att identifiera olika organismgrupper. Markörerna har också olika antal baspar, ju färre desto bättre överensstämmande med delvis nedbruten DNA (som förekommer i vattenprover).

| Organismgrupp | Markörnamn | Plats | Kommentarer |
|---------------|------------|---------|---|
| Fisk | 12S | mtDNA | Stabil struktur och används ofta för studier av fylum och subfyla. Inom eDNA används 12S ofta för att tillsammans med universella primers sekvensera flera arter. |
| Fisk | 16S | mtDNA | Mycket stabil struktur och används i fylogenetiska studier av familjer och släkten. |
| Fisk, kräftor | Cyt b | mtDNA | Används ofta för att upptäcka fylogenetiska förhållanden mellan närbesläktade arter. Har god täckning på artnivå. |
| Fisk, kräftor | CO1 | mtDNA | Var tidigare den markör som standardiserades enligt Barcode of life. Den är lite lång (650 bp) men fungerar bra i vissa barcoding-studier, speciellt då vävnad kan tas. |
| Musslor | ITS | kärnDNA | För att vara kärnDNA så förekommer ITS-regionen många gånger på kromosomerna (upp till 200 gånger per cell). |

Många *enartsanalyser* av fisk har t.ex. använt markörerna CO1, 16S och Cyt b, som alla har visat på god träffbild då endpoint PCR eller qPCR använts (Tucker et al. 2016; Baldigo et al. 2017; Davison et al. 2017; Doi et al. 2017). Flera senare studier (från 2016 och framåt) använder 12S som markör i samband med *flerartsanalyser* och sekvensering med lyckade resultat (Shaw et al. 2016; Thomsen et al. 2016; Sato et al. 2017; Stoeckle et al. 2017b). En annan intressant studie visade att 16S och Cyt b var mer effektiva än 12S vid flerartsanalyser när det gällde att upptäcka antal arter (Evans et al. 2017). Olika markörer kan därmed användas i samma studie för att förbättra den taxonomiska täckningsgraden vid flerartsanalyser (Hänfling et al. 2016; Evans et al. 2017).

Hämta genetiska sekvenser från en referensdatabas

I referensdatabasen GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/) eller EMBL (www.ebi.ac.uk/embl) finns sekvenser som tidigare har använts i publicerade artiklar. Dessa sekvenser används för att upptäcka målarter i nya undersökningar. GenBank innehåller väldigt heterogen data med stor variation i kvalitet. En del data är svåra att tolka och vissa data saknar detaljerad information. Dessutom finns det en hel del rena felaktigheter i databasen (Valentini et al. 2009; Taberlet et al. 2018). Därför används även andra databaser (t.ex. BOLD eller mer lokala databaser), som innehåller mer kvalitetssäkrade sekvenser och samtidigt mer metadata kring själva sekvenserna (Hovmöller et al. 2017). De är dock inte helt felfria och innehåller inte heller lika mycket data som GenBank. Både BOLD och GenBank är mycket stora databaser. Det kan bli trögt att göra avancerade sökningar, men sökningarna kan avgränsas. Kvaliteten på databaserna är inte alltid så tydlig och beror lite på vad du söker. Det finns inga direkta riktvärden för att avgöra om databasen är bra eller dåligt, men ibland finns ”kvalitetsvärden”, dvs. då data uppfyller vissa kriterier (Taberlet et al. 2018).

Justera valda sekvenser

Utvalda sekvenser för respektive art från GenBank behöver justera, så att de blir mer optimala för projektets behov. Det innebär att DNA-sekvenserna justeras och snarlika regioner, som kan vara funktionellt, strukturellt eller evolutionärt relaterade, identifieras. Bra markörer uppvisar små skillnader inom arten men stora skillnader mellan arter. Graden av likhet mellan nukleotider på en viss plats i genomet ger ett grovt mått på hur konserverad denna del är inom arten. För att skilja på bra justeringar från dåliga finns några regler som ger högre poäng för bättre justering. Väldigt korta eller lika sekvenser kan justeras för hand, men för mer komplexa eller variabla sekvenserna används idag olika dataprogram, t.ex. gratis-programmet BioEdit (www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html). Trots alla hjälpmedel så är det fortfarande svårt att hitta passande sekvenser för hybridiserande arter, som t.ex. björkna och braxen, eller mört och sarv. Hybrider kan inte detekteras med mtDNA, eftersom det nedärvs från moderns sida. Även närbesläktade arter som flodnejonöga och bäcknejonöga kan vara svåra att hitta specifika markörer för (Ostberg et al. 2018). Vissa forskare hävdar att nejonögonen tillhör samma art, trots att de måste särskiljas enligt EU:s habitatdirektiv (Maitland 2003).

16.2 Primerdesign: att finna rätt arter

För att kunna köra PCR behövs s.k. ”primers”. Primers är korta DNA-fragment (18-30bp långa) som känner igen en specifik DNA-sekvens vid PCR och sekvensering (Apte & Daniel 2009; Mahon et al. 2013). De fäster vid den utvalda DNA-sekvens

som tidigare letats fram via databaser. Vid PCR ges primern en startpunkt från vilken en ny syntes av DNA kan ske. Den sekvens som ska amplifieras (kopieras upp) ”ramas in” med två kompletterande primers, en uppströms (5'-primer) och en nedströms (3'-primer) som tillsammans kallas för ett *primerpar* (Fig. 65). Primers tillverkas (designa) eller beställs färdiga. Ibland är tillgängliga sekvenser och deras komplementära primerpar inte helt optimala för din egen undersökning. Anledningen är att de sekvenser som finns i olika databaser är anpassade till andra undersökningar med helt andra typer av frågeställningar. Därför behöver primerparen optimeras eller nytillverkas. Primers kan antingen vara artspecifika (för fåartsanalyser) eller universella (för flerartsanalyser).

- *Artspecifika primers* fäster specifikt på en viss arts DNA-sekvens. De används vid enartsanalyser eller analyser av relativt få arter (upp till 12). Primerpar fäster bara på målarterns DNA-sekvenser. En primer blir mer sekvensspecifik ju närmare dess smältpunkt man lägger annealingsteget i PCR (se PCR). Smältpunkten kan beräknas med olika modeller, men det kan ändå vara svårt att förutse hur en primer fungerar i praktiken. Det är därför viktigt att testa primers så de inte fäster på sekvenser från närstående arter (Hovmöller 2012).
- *Universella primers* fäster vid en sekvens som är gemensam för en grupp av arter, t.ex. benfiskar eller ryggradsdjur. De används vid flerartsanalyser, då uppgiften är att amplifiera en hel grupp av målararter, t.ex. ryggradsdjur som har 12S som gemensam markör. För fisk kan t.ex. universella primers för 12S utvecklas för att amplifiera hela målarartsgruppen och mycket få andra organismer (Hering et al. 2018).

Valet av primers påverkar specificiteten, och rätt designade primerpar är helt avgörande för att finna målarterns-DNA i proverna (Wilcox et al. 2013; Freeland et al. 2017; Taberlet et al. 2018). Primerparet måste vara ”pålitliga, robusta och specifika” för den utvalda markören. För att uppnå detta designas primers med avseende på bl.a. hur många baspar de innehåller, vid vilken temperatur de smälter, samt deras G/C-innehåll (guanin/cytosin). Tack vare att vissa primers nu har en så pass god taxonomisk täckning håller man på att utveckla ett sekvensbibliotek för fisk baserat på 12S (Valentini et al. 2016). En mycket god *taxonomisk täckningsgrad* innebär att primerparet fäster vid ca 87 % av utsedda målararter och inte på andra arter (Taberlet et al. 2018). För andra markörer som COI och 16S finns redan barcodingbibliotek för fisk i publika databaser.

En genomarbetad design och validering av primers är avgörande för att du ska kunna upptäcka målararter i vattenprover.

Nya primers designas och optimeras enligt följande tre steg:

- In silico. Primers söks fram och justeras med hjälp av olika datorprogram
- In vitro. Primerparet testas på vävnad från målarter
- In situ. Primerparets effektivitet valideras på målarts-DNA i vattenprover

Vid varje steg utvärderas dina primers och vid felaktigheter stegar man tillbaka för att justera primer designen (Fig. 60). Samma steg gäller också om du ska skapa en prob för kvantitativ PCR (qPCR) eller ddPCR (se PCR).

In silico

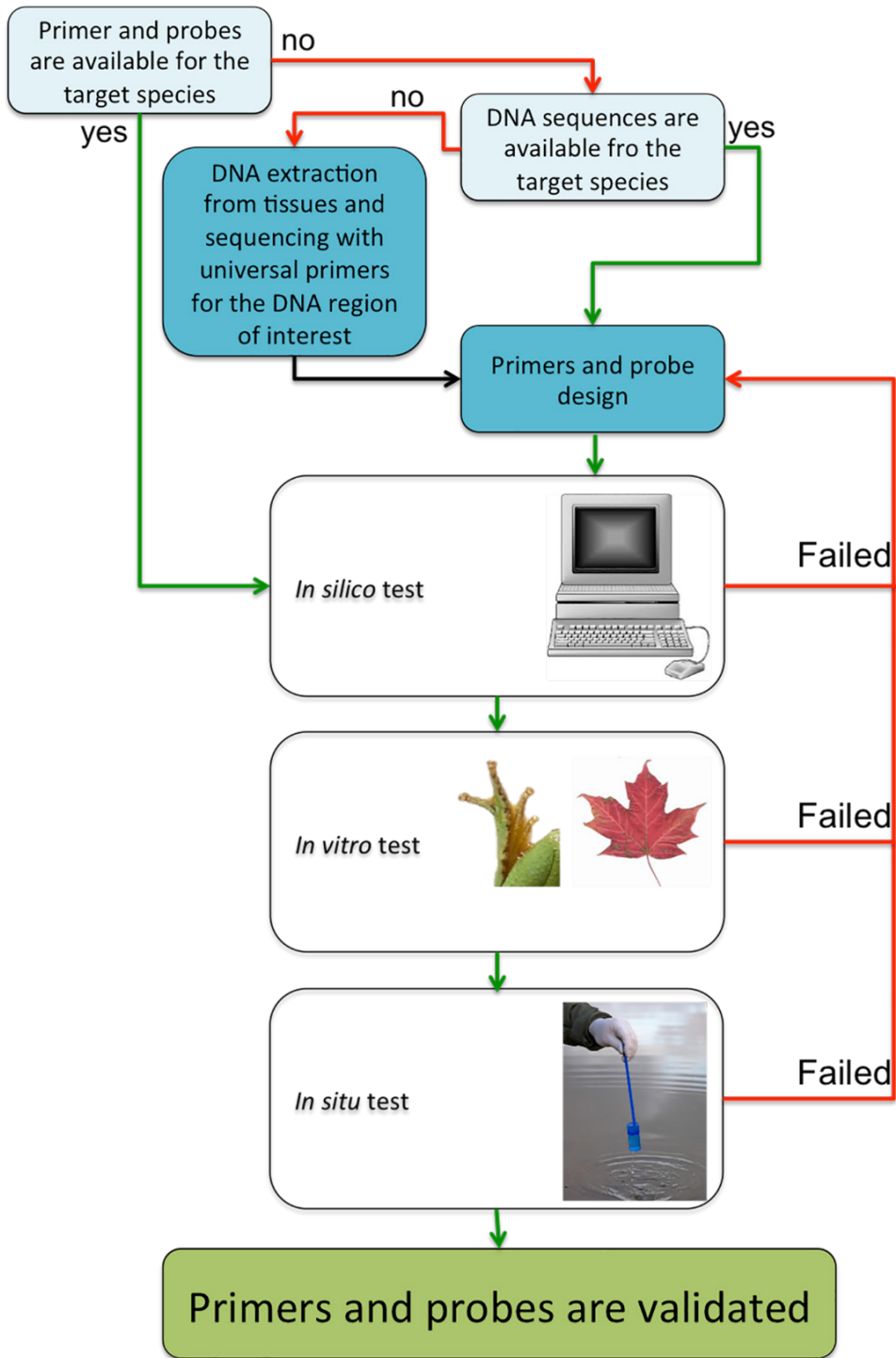
Sök information i referensdatabaser (t.ex. GenBank) om den sekvens du vill amplifiera från olika målarter. Denna databassökning ger en ledtråd till hur du sedan ska tillverka dina primers (hur primerparets sekvenser ska se ut). Primer-BLAST funktionen i Genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/) kan användas för att skapa ett antal uppsättningar primers som sannolikt är artspecifika. Det finns också specifika programvaror för att utveckla primers för eDNA, t.ex. Primer3 eller eco-Primer (Rozen & Skaletsky 2000; Riaz et al. 2011). Du kan också använda justerade primers direkt från olika publicerade artiklar (dock måste dessa optimeras för din egen studie). I boken "Environmental DNA for biodiversity research and monitoring" redovisas utförligt in silico-processen (Taberlet et al. 2018).

In vitro

De första primerparen behöver testas i en kontrollerad miljö. Det är lättast att arbeta med vävnad från de arter du vill amplifiera, och på arter som är närbesläktade men som dina primers *inte* ska fästa vid. Det kan vara en fördel att även täcka in geografisk genetisk variation för målarterna, med vävnad från geografiskt skilda populationer. Under detta steg sätts också en *minsta nivå* för att upptäcka målarts-DNA, en s.k. "limit of detection" eller LOD. Om qPCR kommer att användas bör du även skapa en nivå för *minsta kvantifierbara mängd DNA*, s.k. "limit of quantification" eller LOQ (Herder et al. 2014). Detta värde kan sedan användas vid senare PCR-analyser och testas ut med hjälp av spädningsserier.

In situ

Efter vävnadskontroll är det dags att testa primerspecificiteten på vattenprover. Initialt kan mesokosmförsök användas, där känd mängd/storlek på fisken lättare kan manipuleras. Efter mesokosmförsöken måste dock primers testas även i naturvatten. Idealt samlas vattenprover in från minst tre lokaler där det finns rikligt med de arter som ska artbestämmas, samt från tre platser där dessa arter saknas.



Figur 60. Flödesschema över test av primers tillförlitlighet, robusthet och specificitet. Källa: Herder et al. 2014, ©SPYGEN.

Primerpar som inte klarar testerna i de tre olika stegen (Fig. 60) måste justeras eller göras om. Felaktig primerdesign eller ospecifika primers kan kraftigt påverka specificiteten vid PCR (Freeland et al. 2017). Många eDNA-studier har därför poängterat vikten av att använda specifika primers (Wilcox et al. 2013). Primers måste t.ex. täcka in målarternas genetiska variation, för att undvika *falska negativa*, dvs. att PCR kopierar upp icke målarts-DNA. Dessutom måste de kunna särskilja närbesläktade arter så att *falska positiva* utesluts. Vid felaktigt designade primers finns även risk för att oönskade artefakter uppkommer vid PCR. Datorsimuleringar av teoretiska resultat (elektronisk PCR) kan utföras för att underlätta utformningen av primrar (Wilcox et al. 2013).

Då eDNA-metodik används inom miljöövervakning i framtiden så är det viktigt att förstå den bias som kan kopplas till primers. Beroende på hur väl primerparet fäster vid målarts-DNA uppstår sedan eventuell bias vid själva artbestämningen. Det finns alltid en viss bias i resultatet oavsett om du fångar dina målarter med traditionella metoder, som provfischen, eller analyserar eDNA med hjälp av specifika primerpar (Kelly et al. 2017).

17 DNA-extraktion

Efter filtrering och fixering av filtraten måste DNA utvinnas (extraheras) ur proverna. Det är nu allt fältarbete sätts på prov eftersom kombinationen av provtagningsmetodik, provvolym, filtreringsmetod, hantering av filtrat, samt extraktionsmetod bestämmer hur mycket DNA som kan detekteras i vattenproverna (Hinlo et al. 2017). Eftersom extraktionen är en så pass viktig del av eDNA-analysen så utförs detta vid ett ackrediterat laboratorium. Vid extraktionen utvinns så mycket DNA som möjligt, och av så god kvalitet som möjligt. Är DNA:t av låg kvalitet eller i för liten mängd så blir det svårt att senare bestämma vilka arter som finns i proverna. En optimal extraktion beror bl.a. på vilka arters DNA som ska extraheras, vilket substrat proverna kommer ifrån, och hur förorenat provet är (Deiner et al. 2015; Clemmensen et al. 2016). Men det finns många olika metoder och vissa är mer framgångsrika än andra. Det finns också avsevärda skillnader i hur olika forskare behandlar sina vattenprover innan extraktionen. Små justeringar av metodiken kan ibland vara avgörande för en lyckad extraktion. Detta kapitel förklarar vad som behövs för att genomföra en extraktion, och hur det hela går till.

17.1 Homogenisering av prover?

Filtrat från vattenprovtagning behöver normalt inte homogeniseras, eftersom det innehåller så pass lite fast material. Istället extraheras hela filtratet (inklusive filtret). Om dina prover däremot innehåller sediment, eller kommer från förfiltreringar, med många och oregelbundna fasta partiklar, bör proverna homogeniseras. Homogeniseringen innebär att provet mals till ett fint mjöl, genom t.ex. frystorkning eller slungning. Därmed försvinner ojämnheter i provet och hela provet blir mer enhetligt. En sekundär provtagning sker sedan direkt i ”mjölet” och efter det påbörjas extraktion av DNA. Se Lindahl et al. 2013 eller Clemmensen et al. 2016 för en mer utförlig beskrivning av homogenisering.

17.2 Färdiga extraktionskit

SLU Aqua testade 2015 några av de vanligaste kommersiella paketlösningar för extraktion (så kallade ”extraktionskit”). Ett sådant kit innehåller olika buffertar och utrustning som i slutändan utvinnet så mycket högkvalitativt DNA som möjligt från miljöprover. Olika kit har specifika egenskaper. En del är specialiserade för provtagning av dricksvatten och vissa kit används för förorenade jordprover. Svenska vatten innehåller ofta partiklar och organiskt material som både binder DNA-molekyler och inhiberar PCR-processen. Välj därför ett extraktionskit som effektivt kan exkludera dessa ”föroreningar”.

DNeasy Blood & tissue kit

Vid SLU Aquas test 2015 fungerade DNeasy Blood & tissue kit (Qiagen, USA) bäst (Gyllenstrand 2016). Vi erhöll mest målarts-DNA i prover som extraherats med detta kit, i likhet med många andra eDNA-studier (Minamoto et al. 2012; Goldberg et al. 2013; Pillipod et al. 2013b; Yamamoto et al. 2016; Buxton et al. 2018; Lear et al. 2018; Mauvisseau et al. 2018). Extraktionskitet, har s.k. spinkolonner (Fig. 61), och extraherar DNA från prover även om det var mycket sediment eller humus i vattnet. Det tar drygt en timme att extrahera 96 prover på en platta (efter lysning) enligt DNeasy Blood & Tissue handbok (Qiagen 2006).

Onestep PCR Inhibitor Removal kit med spinkolonner (Zymo Research, USA)

Detta kit har fått stor uppmärksamhet på senare tid. Denna metod har visat sig fungera direkt efter den egentliga extraktionen för att effektivt ta bort inhibitorer (McKee et al. 2015; Sato et al. 2017). SLU Aqua testade detta med viss framgång 2015 (Gyllenstrand 2016), men då inte i samband med andra extraktioner.



Figur 61. Spinkolonner är provrör med ett extra kolonnrör inuti. Källa: <https://www.qiagen.com>.

Extraktion av filterkapslar

Det finns extraktionsmetoder för både Sterivex- och Envirochek-kapslar. De olika stegen för extraktion av Sterivex-filter finns beskrivet i flera artiklar (Kirshtein et al. 2007; Schmidt et al. 2013; Keskin et al. 2014; Bergman et al. 2016, Spens et al. 2016). Extraktionsstegen för Envirochek finns beskrivet i Bellemain et al. 2016, Civade et al. 2016 och Valentini et al. 2016. Generellt tillförs en buffert och sedan skakas kapslarna under 5 minuter. Bufferten löser då ut DNA och DNA-lösningen kan senare lösas ut med olika metoder, bl.a. med etanol och natriumacetat (Valentini et al. 2016). Qiagen har dessutom utvecklat ett eget extraktions-kit för Sterivex-kapslarna (DNeasy PowerWater Sterivex kit). Detta kit har bl.a. använts för att spåra flodpärlmusslor med gott resultat¹. Tillverkaren för Sterivex (Merck Millipore) har tagit fram ett specifikt extraktionskit för sina filterkapslar. Även tillverkaren för Envirochek (Pall Life Science) har tagit fram specifika extraktionskit för Envirochek, med tillhörande skakmaskin. Tidigare studier som använt Envirochek har använt handskakning och specifika buffertlösningar för DNA-extraktion med gott resultat (Bellemain et al. 2016; Civade et al. 2016; Valentini et al. 2016). Det franska laboratoriet Spygen har t.ex. arbetat mycket med Envirochek-kapslar (www.spygen.com).

Phenol–chloroform–isoamyl alcohol (PCI)

PCI har fungerat bra i en del tidigare eDNA-studier (Renshaw et al. 2014; Deiner et al. 2016; Yamanaka & Minamoto 2016). Metoden innefattar fas-separering och fällning, vilket ger mer DNA än ovan beskrivna kolonn-metoder (Goldberg et al. 2016). Hanteringen av kloroform innebär dock vissa hälsorisker, som troligen leder till att kloroform successivt kommer att fasas ut och överges när det gäller eDNA-extraktioner. Metoden har använts flera gånger då andra metoder har misslyckats².

DNeasy PowerSoil kit (MoBio Laboratories, USA)

Kitet renar provet effektivt från humus, men använder inte spinkolonner. Mykologerna vid SLU använder t.ex. detta kit med gott resultat för sina jordprover. IVM vid SLU använder kitet för att utvinna DNA från algprovtagningar och bottensediment med gott resultat. Flera andra eDNA-studier har använt detta kit (Pawlowski et al. 2011; Liang & Keeley 2013; Shaw et al. 2016), men inte så många som genomför vattenprovtagning med avseende på fisk, kräftor eller musslor (se dock Baldigo et al. 2017).

134

¹ Per Sundberg; professor vid institutionen för marina vetenskaper, Göteborgs Universitet. Telefonmöte 2018-06-01

² Åke Olson; Docent vid Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi, SLU. Intervju 2018-05-21

Powerwater extraction kit (MoBio Laboratories, USA)

Detta kit använder inte spinkolonner, och fungerar betydligt sämre för svenska förhållanden enligt SLU Aquas tester (Gyllenstrand 2016). Är vattnet förorenat av olika inhibitorer så fungerar detta kit sämre än Blood & Tissue (Goldberg et al. 2016). Däremot finns det flera amerikanska eDNA-studier som har använt detta kit lyckosamt för vattenprover (Jerde et al. 2011; Olson et al. 2012; Wilcox et al. 2013).

Spinkolonner

Ibland används spinkolonner som en sekundär extraktion direkt efter den huvudsakliga extraktionen (McKee et al. 2015; Sato et al. 2017). Detta är ett sätt att ytterligare minska påverkan av inhibitorer, vilket har visat sig vara mycket effektivt (McKee et al. 2015). Normalt rekommenderas att använda Onestep PCR Inhibitor Removal kit (Zymo Research) med spinkolonner, som är en extraktion i endast ett steg. Företagets (Zymo Research) egen reklam visar hur stark amplifieringen av målar-DNA är efter en spinkolon-behandling, till skillnad mot ett prov som inte behandlas (Fig. 64).

Optimering av extraktionsmetodiken

Ibland används inte enbart en enda typ av extraktionsmetod (som i fallet med spinkolonner), utan ibland kan upp till tre eller fyra olika metoder användas i följd. Yamanakas forskarlag använde t.ex. först phenol-kloroform extraktion, efter det följde utfällning med natriumacetat, vilket i sin tur följdes av extraktion med DNeasy Blood & Tissue (Yamanaka & Minamoto 2016). Utmaningen är i dessa fall att behålla så mycket målar-DNA som möjligt efter varje genomförd extraktion (Goldberg et al. 2016). Ofta finjusterar (optimerar) olika laboratorier extraktionsmetoderna, dvs. de anpassar metoderna bättre till sin egen verksamhet eller till studiens specifika förutsättningar.

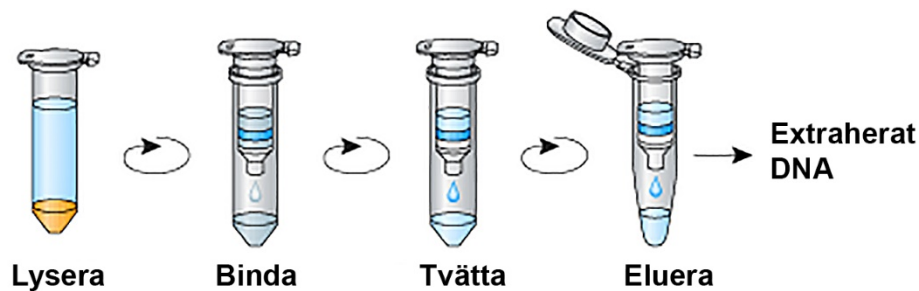
17.3 Hur genomförs en extraktion?

En extraktion av DNA utförs i flera steg för att utvinna så mycket DNA som möjligt. En del labb har optimerat extraktionen med justeringar som avviker från tillverkarnas rekommendationer. De olika stegen brukar varva tillsättning av olika buffertlösningar med skakning, inkubering (hålla provet under en viss tid/temperatur i en inkubator) och centrifugering (Fig. 62). Generellt utförs DNA-extraktionen på följande sätt:

- *Lysering.* En alkalisk lösning tillförs (med specialdesignat rengöringsmedel och enzymet proteinas K) som löser upp membran och frisläpper DNA. Efter detta värms ofta provet (inkubering) för att frisläppa mer DNA.

- *Bindning*. Först neutraliseras lösningen, sedan tillförs en buffert för att underlätta bindning av DNA. Denna lösning överförs till ett kolonnrör och centrifugeras. Vid centrifugeringen tvingas lösningen ner genom kolonnens filter där DNA binds upp.
- *Tvättning*. Sköljning i vatten tar bort småpartiklar från provet som är icke-specifikt bundna till saltlösningen.
- *Eluering (extrahering av DNA)*. Vid elueringen används en buffert med låg jonstyrka som lösgör DNA från saltlösningen (matrixen).

Skakningen blandar buffertlösningarna mer effektivt, inkubering hjälper till att lösa ut DNA, och centrifugeringen separerar utfällningar från proverna. Humösa ämnen (som stör analyser) kan lösas eller fällas ut i basiska eller sura lösningar, vilket är anledningen till att pH ändras under extraktionen. Det finns dock humösa ämnen som varken löser sig eller fälls ut beroende på pH (Zipper et al. 2003).



Figur 62. Förenklat flödesschema av extraktion med ett kommersiellt extraktionskit med spinkolonn (DNeasy Blood & Tissue). Källa: <https://www.qiagen.com>.

18 Kontrollera och kvantifiera DNA

Efter DNA-extraktionen kontrolleras mängden och kvaliteten på extraherat DNA, ofta med en maskin som kallas "Nanodrop" (Fig. 63). Externa labb kräver att in-skickade prover har genomfört en kvalitetskontroll och kan uppvisa god DNA-kvalitet för att fortsätta utföra PCR och sekvensering. Följande kontroll ska därför ske efter extraktion:

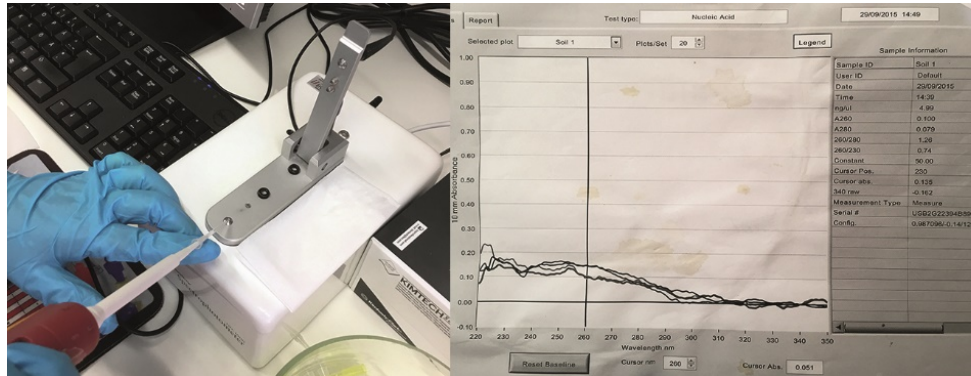
- DNA är i tillräcklig mängd
- DNA upprätthåller god kvalitet
- Provet innehåller målarts-DNA

Kontroll av tillräcklig mängd

För att kunna gå vidare med labbanalyser är det viktigt att veta om extraktionen överhuvudtaget har fungerat. Direkt efter extraktionen kan mängd DNA kontrolleras snabbt och relativt noggrant med en s.k. "Nanodrop". Först späds det färdig-extraherade DNA-provet till ett Eppendorfrör. En droppe pipetteras sedan till en spektrofotometer (Fig. 63). Ett spektrum tas på DNA-lösningen och den ungefärliga koncentrationen beräknas med utgångspunkt från absorbansen vid 260nm och 280nm, med hjälp av Lambert-Beer's Lag (Fig. 63). DNA-koncentration bör vara högre än 5 ng/μl och volymen bör övergå 20 μL per prov, vilket ibland kan vara svårt att uppnå för DNA i vattenprover. En högre DNA-koncentration förbättrar förutsättningarna för kommande PCR-amplifiering¹.

¹Åke Olson; Docent vid Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi, SLU. Intervju 2018-05-21

Nanodrop är egentligen inte idealt för vattenprover med generellt låga DNA-koncentrationer (under 40 ng/μL), åtminstone inte om mer precis kvantifiering ska göras. I figur 63 så är det t.ex. väldigt svårt att skilja den uppmätta DNA-mängden från standardkurvan. Allt fler laboratorier övergår därför till maskiner som QuBit som bättre läser av låga DNA-koncentrationer, samt prover som innehåller humus.



Figur 63. Vänster: Applicering av den s.k. ”nanodroppen” i en Nanodrop-spektrofotometer. Från SLU:s metabarcoding-labb, UMBLA. Höger: Kurvorna visar låg halt av DNA vid mätning med Nanodrop. De följer i stort sett kontrollkurvan. DNA-extraktion gjordes med två extraktionskit (DNeasy PowerSoil kit och DNeasy Blood and Tissue) på ett vattenprov från en öppen damm med fisk 2015 (foto: Patrik Bohman, SLU).

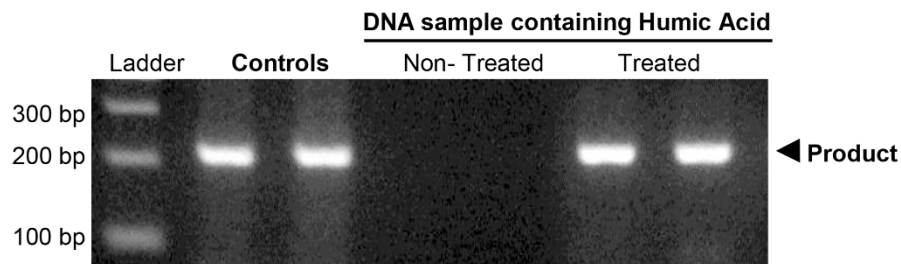
Kontroll av kvalitet och målarts-DNA

Efter uppskattning av DNA-mängd behöver du veta om DNA erhållits från dina målarter. Detta uppskattas enklast med PCR. Den traditionella metoden att uppskatta mängd och kvalitet är sedan att låta PCR-produkten ”vandra” i en gel under elektrisk spänning. Metoden kallas för gel elektrofores. Vid förfarandet, som är enkelt och snabbt, används agaros-gel som fylls i en liten låda med buffertlösning. En strömkälla ansluts till lådan, vilket skapar elektrisk spänning i gelen. När DNA-produkten sedan appliceras direkt i gelen så vandrar DNA-molekylerna mot plus-polen. DNA-molekyler som är olika långa (beroende på antalet baspar) vandrar olika långt. De minsta molekylerna vandrar längst (uppifrån och nedåt i Fig. 64). Tydliga vita band brukar normalt indikera att du har en god amplifiering. Detta innebär att:

- Målarts-DNA är av god kvalitet (efter extraktionen)
- PCR fungerar genom att kopiera upp det utvalda DNA:t från dina prover

Figur 64 visar t.ex. en tydlig amplifiering för DNA-fragment i storleksklassen 200 baspar. Om detta stämmer överens med ditt målarts-DNA, så kan du gå vidare.

Blir resultatet däremot negativt (inga synliga spår alls på gelen, eller DNA med felaktig storlek) så behöver du stega tillbaka och undersöka vad som gått snett. Tänk på att PCR i detta fall endast används som kontroll och inte som ett separat analyssteg, det kommer senare (se PCR). Med utökat användande av mer moderna och precisa tekniker som t.ex. droplet digital PCR (ddPCR) så kommer behovet av konventionell PCR och elektrofores att minska (Robin et al. 2016).



Figur 64. Exempel över ett färdigpreparerat DNA-prov som innehåller humus och som behandlats respektive inte behandlats med inhiberings-borttagare (Onestep PCR Inhibitor Removal Kit). "Treated" betyder att inhiberings-borttagare har använts, vilket ger ett tydligt band på gelen som bevisar att ampliferingen lyckats. "Non-treated" betyder att provet har genomgått PCR utan att använda spinkolner och extraktionskit, vilket inte gav någon amplifering alls. Källa: Zymo Research 2018.

19 Förberedelser inför PCR

Även om provet innehåller DNA av rätt mängd och god kvalitet, så kan olika amplifieringsfel inträffa. Det kan t.ex. bero på olika typer av PCR-inhibering (Rådström et al. 2004) eller att de primers som används inte är tillräckligt specifika (Wilcox et al. 2013; Ardura et al. 2015). Risken är då att PCR överhuvudtaget inte amplifierar målarts-DNA, eller gör detta i alltför liten mängd. Detta kapitel beskriver hur störningar kan bedömas och minimeras i DNA-prov, inför och under PCR.

Inhibering vid PCR

Färdigextraherat DNA kan fortfarande innehålla ämnen som ökar risken för PCR-inhibering (Matheson et al. 2010; Turner et al. 2014; Sidstedt et al. 2015). Inhiberande ämnen är t.ex. metalljoner, salter, organiska föreningar (t.ex. humusämnen, pigment eller blod), urea och icke-målarts DNA (Schrader et al. 2012). Olika inhibitorer påverkar PCR-processen på olika sätt (Opel et al. 2010). Många gånger stör inhibering PCR-reaktionen genom att interagera direkt med DNA och blockera aktiviteten hos polymeras (enzymet som bygger upp nytt DNA), eller andra PCR-komponenter (t.ex. MgCl₂). Konsekvenserna av inhibering kan vara allvarliga. Det kan t.ex. ge upphov till falska negativa fel. Det kan också försvåra koncentrationsberäkningar då sekvenseringsbibliotek skapas (se Förberedelser inför sekvensering).

Interna kontroller

Omfattningen av inhibering kan bedömas med en intern positiv kontroll genom att tillsätta DNA från en art som inte kan förekomma i dina prover (Goldberg et al. 2016). Ofta används musgenen HemT som standard-markör, eller DNA från en exotisk art. Genom att tillsätta en känd mängd DNA i reaktionslösningen, kan den förväntade mängden efter PCR-amplifieringen beräknas. En mindre mängd DNA än förväntat efter PCR styrker t.ex. amplifieringsproblem (Schrader et al. 2012; Taberlet et al. 2018). DNA-koncentration efter PCR kan mätas med en bioanalysator (Fig. 67).

Här följer exempel på åtgärder för att minska störningar från inhibitorer och undermålig PCR-amplifiering:

- *Alternativa buffertar och enzymer.* Genom att använda alternativa buffertkomponenter eller polymerasenzymmer direkt i PCR-reaktionen (vilket är tidseffektivt) kan amplifieringen av långa eller på annat sätt problematiska DNA-regioner potentiellt förbättras (Takahara et al. 2015; Goldberg et al. 2016). SLU Aqua testade 2015 olika lösningar för att minska inhibering. Vi kan t.ex. rekommendera tillsats av *BSA (Bovine Serum Albumine)* för prover med humusämnen. Det är dock viktigt att vara uppmärksam på att kvaliteten av BSA kan variera stort beroende på tillverkare (Deiner et al. 2015; Gyllenstrand 2016). Ytterligare en möjlighet att minska störningarna i prover är att tillsätta *TaqMan Environmental Master Mix 2.0* (från Applied Biosystems) vid PCR-reaktionen. Enligt flera eDNA-studier förbättrar Environmental Master Mix effektivt amplifieringen av DNA, speciellt för prover med mycket humus (Lacoursiere-Roussel et al. 2016b).
- *Blockerande primers.* Om den totala halten DNA är mycket stor i förhållande till målartern-DNA i vattenprover, kan amplifieringen misslyckas eller ge falska positiva fel (s.k. ”falsk priming”). Du får då inget eller för lite uppkopierat målartern-DNA, och istället kan icke målartern-DNA amplifieras. Om proverna innehåller mycket DNA från andra organismer så kan du använda blockerings-primers, så att mer rättvisande analyser kan göras (Wilcox et al. 2014). Ibland används t.ex. blockerande primers mot mänskligt DNA. Blockerande primers har också använts flitigt inom diet-studier (Deagle et al. 2010).
- *Spädningsserier.* Alltför koncentrerat DNA ger inte något bra PCR-resultat (Altshuler 2006). Om det ursprungliga DNA-koncentratet istället späds ut med destillerat vatten innan PCR-körningen, kan inhiberingen minskas väsentligt (Goldberg et al. 2013; McKee et al. 2015). Studier har visat att 10-faldiga spädningar ökar amplifieringen för vattenprover med mycket humus (McKee et al. 2015). Var dock noga med att inte späda så pass mycket att den redan mycket låga halten DNA resulterar i att dina målartern inte upptäcks alls (Goldberg et al. 2016).

Tänk tvärtom: Späd dina prover om du vill öka amplifieringen!

20 PCR

Efter extraktion, kontroll och rening innehåller den koncentrerade DNA-lösningen:

- målarts-DNA (som du vill kunna artbestämma)
- icke målarts-DNA (övrigt DNA som du inte är intresserad av)

PCR används för att välja ut rätt målarts-DNA och masskopiera det. PCR är en förkortning för ”Polymerase Chain Reaction”. Detta kapitel beskriver översiktligt vad PCR är och hur PCR kan användas inom eDNA-metodiken.

20.1 Hur går PCR till?

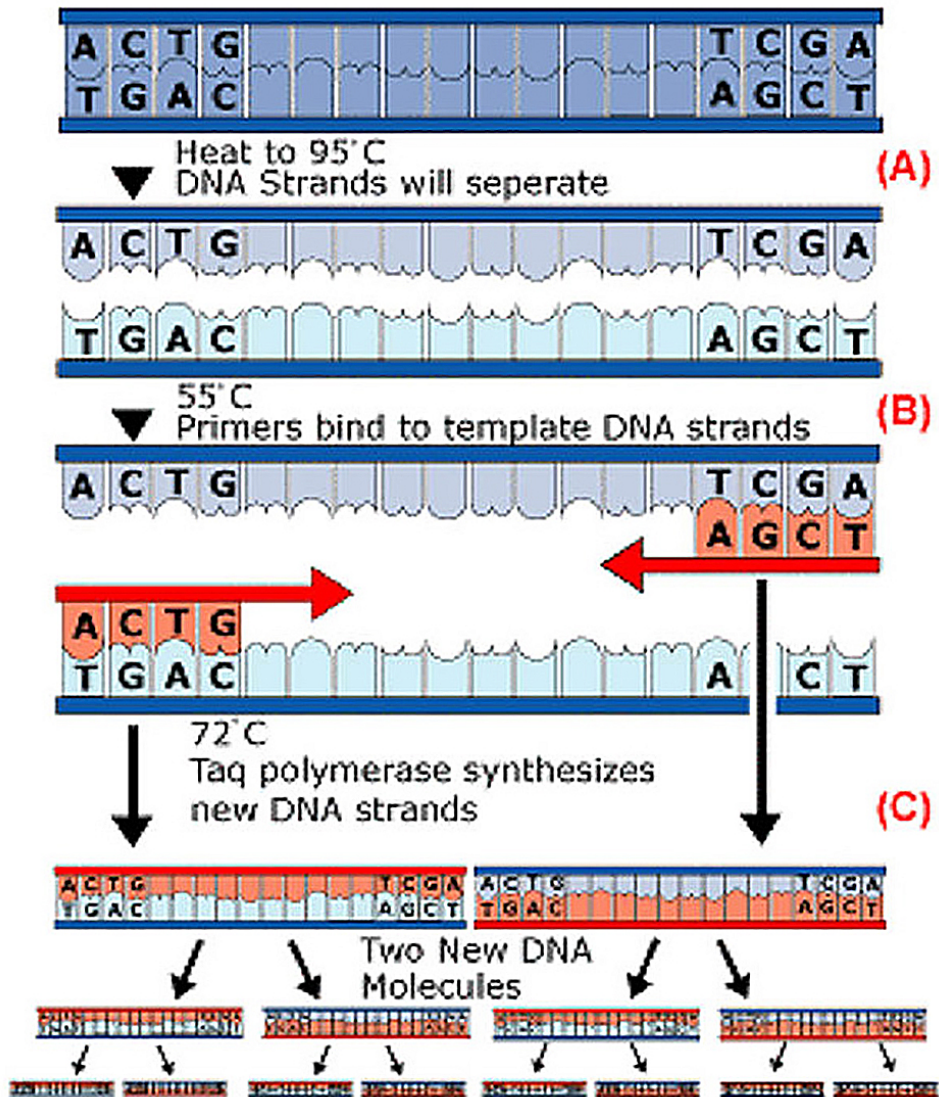
PCR används inom ett stort antal applikationer, från isolering av nya gener till klinisk diagnostik (Saiki et al. 1988). Metoden gör det möjligt att amplifiera (mångfaldiga) DNA med utgångspunkt från enstaka DNA-molekyler. Det finns flera typer av PCR som används vid eDNA-analyser. Konventionell PCR (endpoint PCR) används ofta för att snabbt kontrollera om extraktionen har lyckats eller om primers fäster till rätt DNA-sekvenser (se Kontrollera och kvantifiera DNA). Metoden kan endast användas semikvantitativt. Vill du förbättra specificiteten och kvantifieringen av analysen, så används kvantitativ PCR (qPCR) eller droplet digital PCR (ddPCR).

Vid PCR hittar syntetiskt tillverkade primers sina komplementära målarts-sekvenser bland miljarder baspar i DNA-extrakten, och tillsammans med enzymet polymeras tillverkas miljontals DNA-kopior (replikering). För att påbörja en PCR blandas följande ingredienser ihop i en buffertlösning:

- En utspädd lösning av extraherat DNA (s.k. templat)
- Två kompletterande primers (se Artidentifiering med markörer och primers)
- De fyra olika nukleotiderna som används som byggstenar (A, T, G, C)

- Ett temperaturstabil enzym (DNA-polymeras)

En PCR-körning (cykel) kan delas in i tre faser (separering, hybridisering och förlängning). PCR:en upprepar sedan dessa cykler tills tillräcklig mängd DNA erhålls. För eDNA från vattenprover används ofta 40 cykler (Valentini et al. 2016; Taberlet et al. 2018), vilket tar ca 2 timmar. De olika faserna beskrivs på följande sätt (Fig. 65):



Figur 65. PCR-processens olika faser. Vid separeringen (A) delas DNA i två enkelsträngar. Vid hybridiseringen (B) fäster primers tillsammans med enzymet polymeras vid ändarna av enkelsträngarna och börjar bilda nytt DNA (C). Under elongeringen byggs de båda enkelsträngarna på med nukleotider, så att ny DNA skapas. Källa: <https://oceanexplorer.noaa.gov>.

1) *Separering (denaturering)*. Detta är det första steget i PCR-cykeln och innefattar upphettning av reaktionsblandningen. Värmen gör att DNA-strängarna i ursprungslösningen (templatet) separerar till enkelsträngade DNA-molekyler.

2) *Hybridisering (annealing)*. Vid nästa steg sänks temperaturen, vilket gör att primerparet kan binda (hybridisera) till de enkelsträngade DNA-templatet (dels i 5'-ändan och dels i 3'-ändan). Temperaturen är viktig för att primrarna ska fästa specifikt till DNA:s olika ändar. Polymeras binder sedan till primer-templatet och börjar bilda nytt DNA genom att bygga in nukleotiderna adenin (A), tymin (T), guanin (G) och cytosin (C) från reaktionslösningen.

3) *Förlängning (elongering)*. DNA-polymeraset tillverkar en ny DNA-sträng som är komplementär till templatet i riktning från 5'-ändan till 3'-ändan. När PCR fortskrider används även nytillverkade DNA-sekvenser som templat för nästa cykel och en kedjereaktion inleds. Optimalt kommer antalet utvalda DNA-sekvenser att fördubblas vid varje förlängningssteg (Fig. 66). Detta leder till en exponentiell amplifiering av den specifika DNA-sekvensen. Den slutliga mängden kopierat DNA begränsas av mängden tillgängliga substrat i reaktionslösningen.

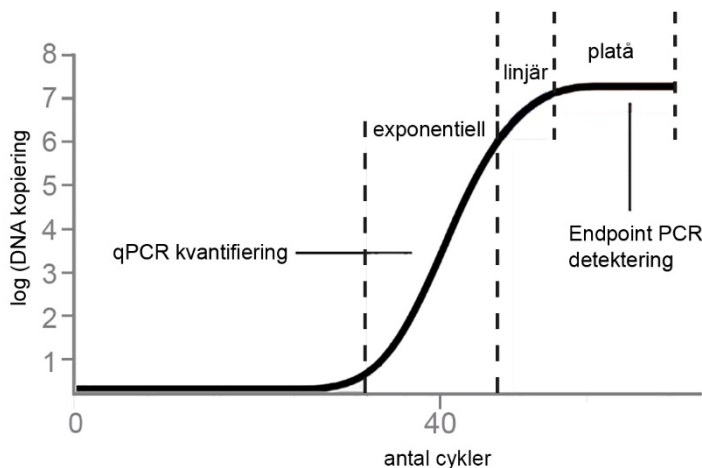
Det går att rita upp en kurva för PCR-reaktionen där mängd DNA kan relateras till tid (Fig. 66). På så sätt kan reaktionen lättare visualiseras. Även här delas PCR upp i tre separata faser:

1) **Exponentiell amplifiering:** Under PCR så växer mängden DNA först exponentiellt, vilket man kan räkna på vid kvantitativ PCR (qPCR). Vid varje cykel fördubblas mängden produkt (förutsatt att reaktionseffektiviteten är 100 %).

2) **Linjär utjämning:** Efter den exponentiella fasen slackar kurvan av och blir till slut stationär (inget mer DNA amplifieras). Reaktionen bromsas upp när DNA-polymeraset förlorar sin aktivitet och när konsumtionen av reagens, t.ex. nukleotider och primers, gör att den blir begränsande.

3) **Platå:** Ingen produkt ackumuleras längre på grund av förbrukning av reagens och enzym. Vid endpoint PCR beräknas producerad mängd först då DNA-amplikon tillsätts i en agarogel efter avslutad PCR (se Kontrollera och kvantifiera DNA).

För att validera PCR-metoden och för att veta när tillräckligt med DNA har kopierats används ett tröskelvärde vid kvantitativ PCR (qPCR), s.k. Ct-värde efter "cycle threshold". Ct beskriver hur många cykler som PCR:en måste köra för att ge tillräckligt med DNA. Ct-värdet beräknas från den exponentiellt växande fasen, dvs. där kurvan i figur 66 är som rakast. Man strävar alltid efter att låta PCR:en köra så få cykler som möjligt, eftersom alltför många cykler kan ge felaktigheter. qPCR bör inte upprepas mer än 41 cykler (Ct = 41), då högre Ct-värden ökar sannolikheten att upptäcka falska positiva (Kozubíková et al. 2011, Agersnap et al. 2016).



Figur 66. PCR kan delas in i tre olika faser: exponentiell, linjär och plata. Den exponentiella fasen går att kvantifiera, vilket görs för att beräkna tröskelvärdet Ct vid qPCR (illustration Teresa Soler, SLU).

Optimerade protokoll

Efter PCR eftersträvas en så ren DNA-produkt som möjligt. Om PCR-protokollet inte kontinuerligt testas och förbättras är risken istället att processen blir ineffektiv, med fler artefakter som följd. Dessa artefakter kan uppkomma i form av primer dimers (då primers felaktigt fäster på varandra), felaktiga amplikon eller ineffektiv amplifiering (SantaLucia 2007). Varje ny PCR kommer sannolikt att kräva en viss optimering vid eDNA-analys. En justering av PCR innebär alltid en kompromiss mellan specificitet och effektivitet (Taberlet et al. 2018). Ett exempel på optimerade protokoll är touchdown-protokollet. PCR initieras med temperaturer lite över smält-punkten, sedan minskas successivt temperaturen i hybridiseringssteget under PCR-cykeln. De högre temperaturerna minskar bildandet av icke-specifika PCR-produkter samtidigt som amplifieringen av specifika sekvenser ökar (Roux 2009). Flera eDNA-studier visar att touchdown i kombination med störningshämmande lösningar (t.ex. BSA) och olika enzysystem ytterligare ökar mängden amplifierat DNA (Adrian-Kalchhauser & Burkhardt-Holm 2016; Gyllenstrand 2016). Det finns även andra optimerade PCR-protokoll som används för vattenprover, t.ex. hot-start PCR och nested PCR.

Konventionell PCR börjar överges

Vid tidiga studier av eDNA i vattenprover (2008-2012) användes konventionell PCR (endpoint PCR) för att upptäcka närvaro/frånvaro av DNA från enstaka målarter (Ficetola et al. 2008; Jerde et al. 2011). Metoden har dock en hel del brister (Taberlet et al. 2018). Andra varianter av PCR, som qPCR och ddPCR, både ökar precisionen och förbättrar kvantifieringen av eDNA från vattenprover (Nathan et al. 2014). Nathan och hans kollegor jämförde endpoint PCR med qPCR och ddPCR.

De kom bl.a. fram till att alla tre plattformar upptäckte närvaro av DNA, även vid mycket låg koncentration av målarts-DNA. De kvantitativa metoderna (qPCR och ddPCR) uppvisade liknande DNA-koncentrationer. Däremot var ddPCR betydligt snabbare och hälften så dyr i jämförelse med qPCR.

Användning av RNA

RNA används mycket sällan vid eDNA-analyser. Den största anledningen till detta är att det är betydligt mer instabilt än DNA. Trots det finns det vissa omständigheter då RNA kan användas (Pochon et al. 2017). En metod som kallas rtDNA-reverse transkriptas PCR används då. Mycket kortfattat utgår metoden från RNA-templatt som görs om till komplementärt DNA (cDNA). cDNA kopieras sedan upp under PCR och kvantifieras på liknande sätt som vid vanlig PCR.

Att helt hoppa över PCR

Möjligheten att helt lämna PCR-steget har diskuterats flitigt inom eDNA-metodik, pga. alla fel som kan uppkomma (Pavan-Kumar et al. 2015). ”Environmental Shotgun”-sekvensering (EES) har t.ex. föreslagits som en metod som skulle kunna ersätta PCR-steget vid eDNA-analyser i framtiden (Taberlet et al. 2018). EES är en komplex sekvenseringsmetod som slumpmässigt hackar upp DNA-sekvenser i mindre bitar och sedan läser dem. Efter sekvensering pusslas sekvenserna ihop med hjälp av datorprogram. EES används ofta för att läsa organismers hela genom (metagenomics). Än så länge är metoden dock mycket kostsam och har dessutom svårt att upptäcka sällsynta arter. Shotgun-sekvensering är inte helt optimal för analys av eDNA från vattenprover eftersom metoden behöver större mängder DNA för att ge rättvisande resultat (Valentini et al. 2016).

20.2 qPCR: kvantifierar och ökar specificiteten

Kvantitativ PCR (qPCR) är både mer specifik och känsligare än endpoint PCR. Vid endpoint PCR mäts den amplifierade DNA-produkten (amplikon) först då PCR är helt klar och produkten har fått vandra i en gel, efter ca 2 timmar. Vid qPCR mäts istället mängden amplikon *under tiden* som PCR-reaktionen går vidare (Fig. 66). Någon agarosgel behövs därför inte. Efter varje cykel kvantifieras mängden DNA genom att ett fluorescerande ämne, som avger ljus, binds in vid varje reaktion. Eftersom mängden av det fluorescerande ämnet ökar exponentiellt i takt med att DNA tillverkas så kan man kvantifiera DNA genom att mäta färgintensiteten. Detta kan göras med SybrGreen eller TaqMan-prober. Dessa två metoder skiljer sig ganska mycket från varandra men båda ökar specificiteten då eDNA analyseras, vilket är

att föredra framför endpoint PCR (Takahara et al. 2012; Thomsen et al. 2012b; Pillipod et al. 2013a; Wilcox et al. 2013; Tréguier et al. 2014; Wilcox et al. 2015; Agersnap et al. 2017; Mauvisseau et al. 2017).

- *SybrGreen* fäster ospecificerat på allt dubbelsträngat DNA. Det innebär att även icke-målarts-DNA och felaktigheter (t.ex. primer dimers) färgas in och kvantifieras. SybrGreen kan endast användas för ett primerpar i taget (enarts-analyser), och inte vid multiplexing.
- *TaqMan* är både ett fluorescerande och probbaserat system. Genom hydrolys (OH-binding) fästs en specifik prob till målartssekvensen, vilket sker samtidigt med primerparen. Proben är en kort oligonukleotidkedja som kan avge ljus och därmed kvantifieras. Endast de prober som binder till målarts-DNA:t avger ljus, vilket ger stora fördelar: hög specificitet, hög signal/brus-kvot och möjlighet att genomföra PCR för flera arter samtidigt (multiplexing).

Tillsammans kan DNA-extraktion och qPCR utföras inom några timmar. Det innebär att man snabbt kan detektera närvaron av eventuella målarter. Idag är det till och med möjligt att direkt i fält använda en handhållen qPCR (och få analys svar inom en timme; se <https://biomeme.com>). Med multiplexing kan analyser dessutom utföras på flera arter samtidigt (se nedan).

20.3 ddPCR: förbättrad precision

ddPCR är en relativt nyutvecklad PCR-metod som skapar tusentals små droppar (ca 20 000 droppar per prov). Genom att sedan köra PCR på varje droppe jämnas eventuella felaktigheter ut. ddPCR ger en betydligt mer precis kvantifiering av PCR-produkten än vid analog beräkning, som sker vid vanlig endpoint PCR. ddPCR (droplet digital PCR) är en både snabbare och billigare metod än qPCR, vilket innebär att analyser av flera kända arter kan avslutas på några få timmar (Nathan et al. 2014). Dessutom är ddPCR en känsligare metode med högre precision, trots att båda metoder använder samma typ av prob och primers (Robin et al. 2016). Tack vare att metoden är digital så har den flera fördelar jämfört mot qPCR (Nakagaki et al. 2018):

- Absolut kvantifiering sker utan behov av standardanalys (standardkurvor)
- Inhibitorer påverkar inte analysen lika mycket
- Förbättrad reproducerbarhet av analyserna

Det går också att ytterligare öka sannolikheten att hitta DNA, samt att förbättra skattningen av mängden DNA, genom att öka antalet tekniska replikat. Detta görs med hjälp av flera parallella "brunnar", där varje brunn utgörs av 20 000 droppar.

20.4 PCR multiplexing analyserar fler arter

För några år sedan tog det lång tid då flera arter analyserades med qPCR eller ddPCR, eftersom det innebar flera PCR-körningar i följd. Idag kan flera olika primers användas samtidigt, s.k. multiplexing. Metoden går ut på att flera primerpar och prober blandas samman i reaktionslösningen med ett templat. Det finns stora fördelar med att kunna analysera upp till 12 arter samtidigt:

- Du sparar tid, reagenser och prov
- Precisionen med en extra prob gör att primers fäster mer noggrant vid rätt sekvens
- Du kan vid samma tillfälle göra jämförelser mellan flera olika amplikon

Men multiplexing tar också extra tid att utföra eftersom det ställer högre krav på utveckling av flera artspecifika primerpar. Samtliga primerpar i reaktionslösningen måste t.ex. ha liknande annealingtemperatur, och primers med komplementär 3' nukleotider måste undvikas (Apte & Daniel 2009). För att optimera processen testas först separata primerpar ut och sedan blandas kombinationer av flera primerpar successivt. Om multiplexing valideras kontinuerligt så ökar tidsvinsten vilket möjliggör stora fördelar då en snabb artidentifiering kan ske (Goldberg et al. 2016). En variant av multiplexing är Combinatorial PCR, där *flera* templat används samtidigt (Apte & Daniel 2009).

21 Förberedelser inför sekvensering

Sekvensering kan ske på många olika sätt, och beroende på vilken plattform som används bereds dina prover olika (Goodwin et al. 2016). I detta kapitel beskrivs i generella drag hur proverna förbereds för Illumina MiSeq-sekvensering, den plattform som är vanligast för eDNA-analyser av vattenprover (Deiner et al. 2017). Det är framförallt fyra steg som PCR:ade prover måste genomgå:

- Märkning
- Kvantifiering
- Spädning
- Sammanblandning

Dessa steg kallas gemensamt för att ”skapa bibliotek” inför sekvenseringen. Likt en bibliotekarie så måste sekvenseringsmaskinen sortera provernas olika sekvenser, för att sedan kunna läsa dem. Ett bibliotek innehåller alla sekvenser från ett prov och alla sekvenser i ett prov märks upp på samma sätt.

Märkning av prover (taggning)

Själva märkningen av eDNA-proverna görs med en specifik uppsättning av mycket korta nukleotider (adaptorer). Adaptorerna kopplas ofta på DNA-sekvenserna som ”svansar” och påverkar inte analyserna. Genom att märka upp samtliga prover vid en extra tillagd PCR får alla sekvenser från ett visst prov samma typ av märkning. På detta sätt kan sekvenseringsmaskinen hålla reda på alla dina olika prover, trots att de blandas samman i sista steget innan sekvensering.

Kvantifiering av DNA-innehåll (koncentrationsmätning)

Efter utförd PCR-amplifiering innehåller proverna olika mängd DNA. Detta måste jämnas ut innan sekvensering. I annat fall uppkommer alltför stora skillnader i antal läsningar mellan de olika proverna, vilket gör dem svåra att jämföra. DNA-koncentrationen mäts med en bioanalysator (Fig. 67). Denna maskin mäter mängden DNA

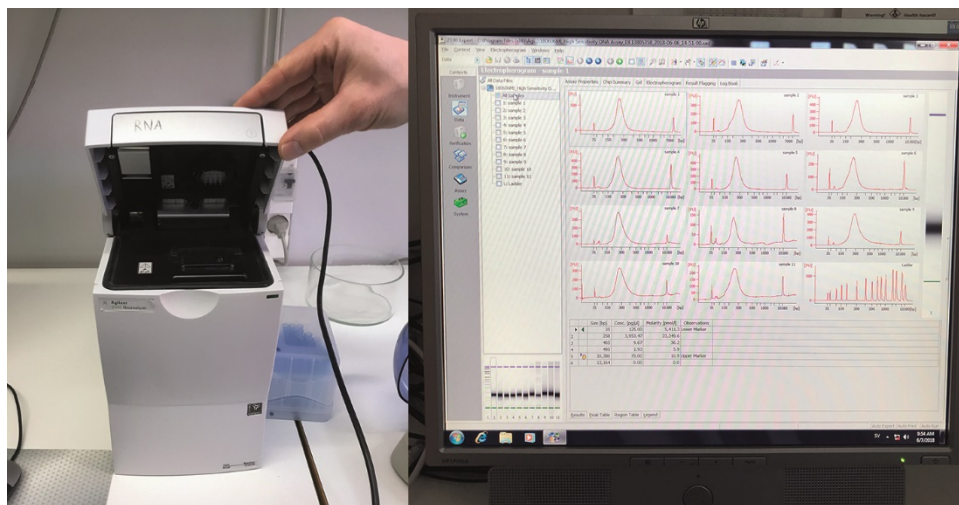
mycket noggrant och ger ett mått på DNA:s storlek (längd). En bioanalytator levererar kurvor som passar för en noggrann beräkning av utspädning (Fig. 67). Idag används ofta QuBit tillsammans med qPCR eller ddPCR för att kvantifiera dina DNA-bibliotek, vilket ger en ännu mer exakt beräkning av DNA-koncentration. Ett problem är dock att det ofta behövs lite större mängder DNA för att spädningsprocessen ska bli helt tillförlitlig (Robin et al. 2016).

Spädning av prover (koncentrationsutjämning)

Efter att de olika provernas DNA-koncentration uppmätts så beräknas hur mycket var och ett behöver spädas för att erhålla lika koncentration (molaritet) inför sekvenseringen. Detta steg är kritiskt och vid en slarvig (ojämn) utjämning av provernas DNA-koncentration blir de slutliga sekvenseringsbiblioteken felaktigt lästa. Detta påverkar tolkningen av dina data. Eftersom poolningen av biblioteken kräver *exakt* pipettering av mycket små volymer, går det inte att arbeta med prover som varierar alltför kraftigt i DNA-koncentration.

Pooling (sammanblandning)

Innan sekvensering så poolas alla prover. Ofta blandas upp till 100 prover i samma pool. Poolningen effektiviserar sekvenseringsprocessen, vilket gör den både billigare och snabbare.



Figur 67. Vänster: En bioanalytator (Bioanalyzer) mäter DNA-koncentration mycket noggrant (foto: Patrik Bohman, SLU). Höger: Bioanalytatorn ritar upp kurvor över DNA-koncentrationer som är lätt att läsa av med koncentration på y-axeln och storlek på x-axeln (foto: Niclas Gyllenstrand, CGI).

22 Sekvensering

Med sekvensering, som även kallas NGS (next-generation sequencing) eller HTS (high-throughput sequencing), kan många arter i ett vattenprov identifieras. Sekvensering av flera arter (metabarcoding) har radikalt förbättrats och blivit allt billigare de senaste åren. Vid sekvensering sorteras och räknas de olika arternas specifika DNA-sekvenser. Sekvenseringen tar dock längre tid att genomföra än enklare analyser som PCR, och den kräver dyr utrustning och specialutbildad personal, vilket ökar kostnaderna. Detta kapitel beskriver översiktligt vad sekvensering är och hur det går till.

Sekvensering består egentligen av flera olika typer av metoder och plattformar (Goodwin et al. 2016). De som idag används mest vid flerartsanalyser av eDNA från vattenprover kommer från det amerikanska företaget Illumina (Shokralla et al. 2012; Lear et al. 2018). Företaget har utvecklat analysmaskiner med mycket låga kostnaden per sekvensläsning, snabbare läsningar, samt möjlighet att djupsekvensera (dvs. läsa väldigt många sekvenser) och samtidigt tolka mycket korta DNA-sekvenser (Creer et al. 2016).

En Illumina-maskin som ofta används för flerartsanalyser av eDNA från vattenprover är *MiSeq* (Fig. 68). *MiSeq* introducerades 2011 och är liten som en dator och läser relativt korta DNA-sekvenser (maximalt 300 baspar långa). Plattformen består av både hård- och mjukvara, och den kan generera data på upp till 15 GB, från ca 25 miljoner sekvensläsningar (van Dijk et al. 2014). En än mer avancerad maskin är *NextSeq*, som kom ut på marknaden 2014 och producerar läsningar på över 120 GB. Den maximala läslängden på sekvenserna är ännu kortare än för *MiSeq*, vilket därför kan passa bättre för nedbrutet eDNA i vattenprover (Reuter et al. 2015).

Illumina använder ”syntes-sekvensering”, vilket innebär att *MiSeq*-maskinen amplifierar varje DNA-sekvens på en specifik yta inne i maskinen (s.k. ”bridge”-amplifiering). Amplifieringen skapar kluster av DNA-sekvenser. De inbundna adaptorerna (märkningsnukleotiderna) ger upphov till en ljusreaktion. Ljuset mäts av en fotometer inne i *MiSeq*-maskinen och visas på en kurva. Ljusreaktionens intensitet är proportionerlig mot antalet inbundna adaptorer och eftersom endast ”rätt”

nukleotid kan binda in vid ett givet tillfälle kan man utläsa ordningsföljden. Det är på detta sätt som sekvenseringsmaskinen ”läser” sekvenserna från alla DNA-sekvenser som finns i ditt vattenprov. 100 miljoner sekvenser sekvenseras samtidigt, vilket leder till många läsningar och stora mängder data.



Figur 68. Illuminas MiSeq-maskin används ofta vid flerartsanalyser av eDNA-prover från vatten. Källa: <https://www.illumina.com>.

Genom att sekvenseringsteknologin utvecklas så pass snabbt och att marknaden kan vara ganska ombytlig är det svårt att standardisera sekvenserings-metodiken. Det amerikanska företaget 454 Life Sciences slutade att 2013 tillverka den första revolutionerande sekvenserings-plattformen, Roche 454. En kommande generation sekvenseringsmaskiner använder sekvenseringsmetoden ”single molecule”. Det kommer troligen att revolutionera läsningar av organismers *hela* genom. Men metoden är idag alltför dyr och långsam för att kunna fungera för eDNA-projekt (Creer et al. 2016).

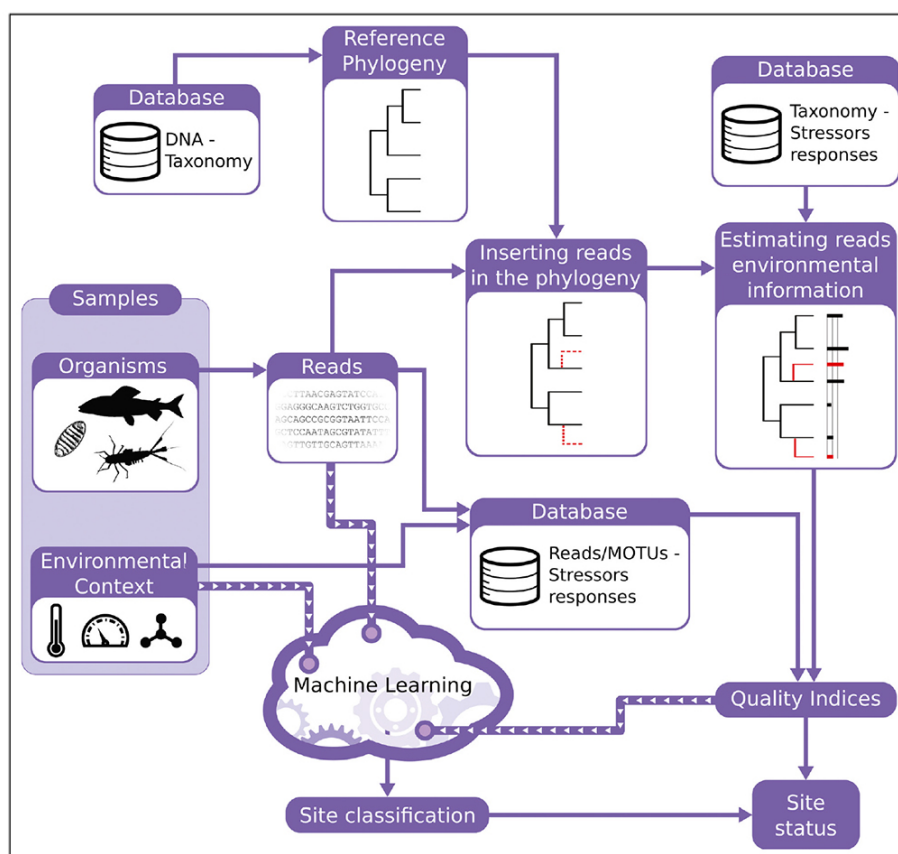
Utifrån sekvenseringsläsningar som görs på Illumina MiSeq är det idag knepigt att utföra kvantitativa uppskattningar av biodiversitet. Anledningen är att det dels är svårt att kvantifiera eDNA överhuvudtaget, och dels att antalet läsningar via en Illumina MiSeq inte är ett kvantitativt mått på eDNA. Istället erhålls ofta ett semikvantitativt mått på artabundans (Balasingham et al. 2018). Forskarteam runt om i världen försöker idag att utveckla olika former av metodik för att mer exakt kunna kvantifiera sekvenseringsläsningar (Ushio et al. 2018).

23 Bioinformatik: att tolka resultat

Efter laboratoriets analys av vattenproverna måste resultatet tolkas. Ofta anlitas en expert (bioinformatiker) för att hjälpa till att filtrera och analysera slutresultatet. Detta kapitel förklarar vad bioinformatik är och hur det kan användas för att tolka eDNA-analyser.

Inom bioinformatiken utvecklas olika metodik och programvaror för att *analysera och tolka biologiska data*. Det är idag en alltmer växande disciplin inom biologin. Bioinformatiken kombinerar biologi, matematik och statistik med datavetenskap för att hantera stora mängder av biologiska data. Bioinformatik används bl.a. inom genetik- och eDNA-studier eftersom det utan datorkraft skulle vara omöjligt (eller ta mycket lång tid) att designa primers, tolka sekvenseringsläsningar eller matcha DNA-sekvenser mot en referensdatabas med artspecifika sekvenser. Bioinformatiken hjälper oss att tolka felkällor och bias, hitta tröskelvärden vid filtrering av resultat och utvärdera abundanssekvenser för morfologiskt svårbestämda arter. Arbetet sker ofta med statistiska modeller och sannolikhet istället för med ”konkret” okulärbesiktning av biologiska organismer.

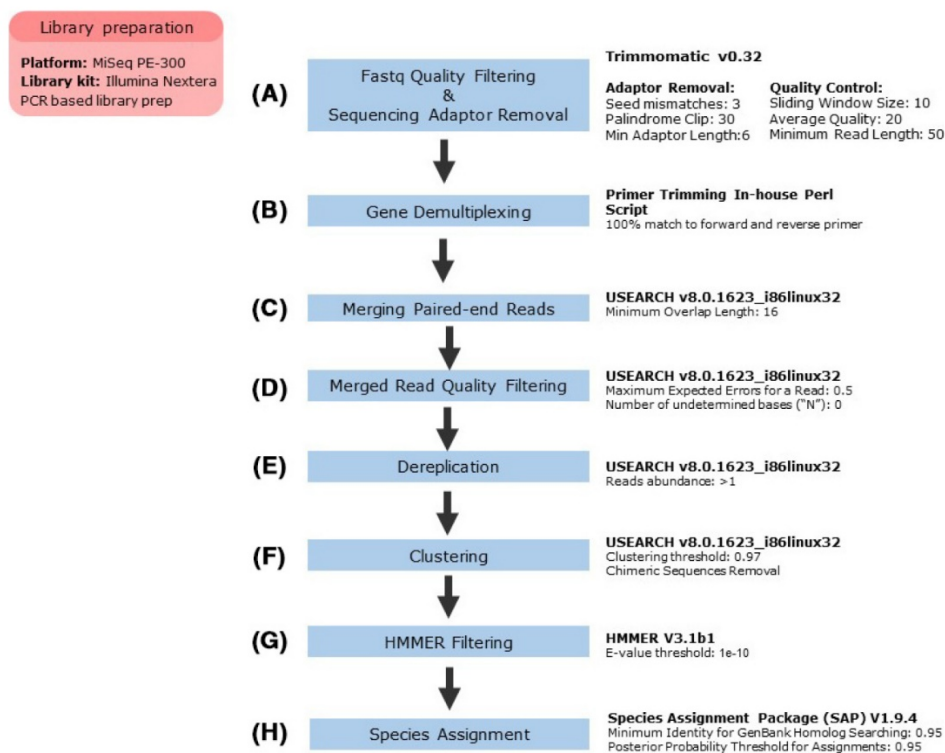
Bioinformatisk analys av sekvenseringar från eDNA-prov innebär en komplex och snabbt föränderlig värld bestående av olika datorprogram med specificerade algoritmer (Keck et al. 2017; Fig. 69). Idag finns det en djungel av olika programvaror för tolkning och analys (Edgar & Flyvbjerg 2015). Det gör att det finns en uppsjö av olika typer av metoder för att behandla dina data beroende på vilka programvaror och dataplattform (s.k. ”pipelines”) som väljs. Många program och algoritmer har utvecklats av olika forskargrupper och används väldigt lokalt av personer som är vana vid dem. Någon forskare kan t.ex. vara missnöjd med ett program och börjar anpassa algoritmen till en specifik frågeställning, och därmed blir programvaran väldigt lokalt förankrad (Mendoza et al. 2015). Vissa mjukvaror är mer robusta och genomarbetade än andra, t.ex. *OBITools*, *QIIME* och *R* (Boyer et al. 2016; Taberlet et al. 2018), och används därför av betydligt fler. Till dessa mjukvaror utvecklas mindre gratisprogram för att ta itu med specifika statistiska frågeställningar, t.ex.



Figur 69. Flödesschema för bioinformatik vid flerartsanalyser där artbegreppet börjar luckras upp. Källa: Keck et al. 2017.

cooccur för R (Griffith et al. 2016), för att räkna ut sannolikheten för två arters förekomst.

Ett analysområde inom eDNA där bioinformatik används frekvent är efter en utförd sekvensering. Ibland kan ett enkelt semikvantitativt mått på artabundans beräknas genom att dela antalet sekvensläsningar för en viss målart med samtliga eDNA-sekvenser på provplatsen (Balasingham et al. 2018). Men det är många steg som behöver säkerställas för att erhålla rimliga resultat från sekvensläsningar. Fig. 70 visar ett flödesschema över de bioinformativa steg som ofta används för att analysera data från flerartsanalyser på Illuminas MiSeq (Olds et al. 2016):



Figur 70. Flödesschema över de olika bioinformatiska steg som behöver utföras efter en flerartsanalys av Illumina MiSeq, en maskin som ofta används vid metabarcoding av fisk. Källa: Olds et al. 2016.

A) Vid *quality filtering* sätts tröskelvärden som raderar lågkvalitativa sekvenseringsläsningar från fortsatta analyser. Det kan t.ex. vara sekvenser med få läsningar eller sekvenser som är kortare än ett visst antal baspar (t.ex. 90bp för 12S eller 100 bp för Cyt b). I detta steg filtreras även fel som själva maskinen gör.

B) Vid *demultiplexing* separeras de individuella prover som poolades inför sekvenseringen.

C) Vid *merging* kombineras överlappande läsningar till en enda läsning.

D) Vid *merged read quality filtering* läggs ett extra filtreringssteg till (se punkt A).

E) Vid *dereplication* elimineras dubblettläsningar.

F) Vid *clustering* grupperas liknande unika läsningar till s.k. "OTU:s" (Operational Taxonomic Units). Dessa unika enheter betraktas ofta som separata arter då avståndet till andra kluster är tillräckligt stort. Men det är inte alla pipelines som använder sig av OTU clustering. Vissa går direkt till matchning, vilket är mycket datorkrävande.

G) Vid *HMMer* (*hidden Markov model*) detekteras och elimineras OTU:s som inte är målarter.

H) Vid *SAP* (*species assignment package*) matchas de räknade sekvenserna till olika arter genom en databas som innehåller information om de olika artsekvenserna.

På grund av mängden programvaror och deras komplexitet så är det viktigt att söka hjälp från en bioinformatiker för att tolka sekvenseringsresultat. I annat fall finns det stor risk för förvrängning av t.ex. metodologisk bias, de genetiska markörernas möjligheter/begränsningar och eventuella inskränkningar när det gäller själva sekvenseringsmetodiken. Detta kan i värsta fall utsätta storskaliga sekvenseringsprojekt för onödiga risker, samt leda till konstlade resultat och felaktiga slutsatser. Flera laboratorier, bl.a. SciLife lab, erbjuder idag obligatorisk projektplanering som alltid inkluderar en bioinformatiker. Detta är i vissa fall gratis för forskare när det gäller olika typer av utvecklingsprojekt inom eDNA.

Det är viktigt att använda ett *tröskelvärde* då du tolkar antalet sekvenser (copy number). Hur djupt du bör sekvensera (om du ställer detta tröskelvärde lågt eller högt) beror på din frågeställning och provernas beskaffenhet. En djupare sekvensering (lågt tröskelvärde) ökar ofta diversiteten vid metabarcoding-studier (Alberdi et al. 2017), men kan förvränga resultatet genom att öka antalet positiva fel (Taberlet et al. 2018). Det saknas också riktlinjer för behandling av biologiska data vid eDNA-analyser, s.k. *brusreducing* eller ”de-noising” (Cristescu 2014). Detta innefattar bl.a. möjligheten att processa ”råa” läsningar (t.ex. avlägsnande av primers, sekvenserings-adaptrar och barcoding-taggar), utföra analyser (i form av klusteranalyser och BLASTing), samt att tolka data mot biodiversitetsindex (Bik et al. 2012; Coissac et al. 2012; Bonder et al. 2012). Flera osäkerheter uppkommer när det gäller *utvärdering av biodiversitet* vid flerartsanalyser, eftersom estimeringarna varierar så mycket beroende på följande (Cristescu 2014):

- Upplösningen hos använda markörer och primers
- Kvaliteten på sekvenserade bibliotek
- Bioinformatiska pipelines, dvs. hård- och mjukvaror som hjälper oss att tolka resultaten

Felaktig tolkning av diversitet kan t.ex. uppkomma då många enstaka sekvenser (s.k. ”singletons”) erhålls vid sekvenseringsläsningen. Ofta sorteras dessa bort från slutresultatet, eftersom enstaka sekvensläsningar kan innehålla felaktigheter (t.ex. chimärer). Bortsållningen av sekvenser påverkar direkt tolkningen av diversitet i proverna eftersom färre arter då upptäcks (Bjørnsgaard et al. 2016). Det är också viktigt att påpeka att även själva sekvenseringsmaskinerna ibland gör fel, vilka då måste korrigeras. Det gäller inte bara chimärer utan en mängd andra felaktigheter,

t.ex. att den bygger in fel bas mm. I en metabarcoding-studie upptäckte forskarna att vissa *databehandlingsmetoder* förvrängde deras sekvensbaserade mätningar av biologiskt mångfald och ökade de negativa felen (Hatzenbuhler et al. 2017). Studien visade alltså att beroende på vald metod för att tolka sekvenseringarna så ökade eller minskade mängden falsk frånvaro av arter.

I framtiden kommer flerartsanalyser (metabarcoding) och analys av organismers hela genom (metagenomics) att användas mer frekvent (Mendoza et al. 2015). Det är då viktigt att särskilja metodernas olikheter för att kunna utveckla passande programvaror för framtidens bioinformatik. I framtidens eDNA-analyser kommer vi också att få se mer av datorer som successivt lär sig tolka biologiska data genom *maskininlärning* (Keck et al. 2017; Fig. 69). Detta fokuserar på att vi är öppna med de scripts och algoritmer vi utvecklar. En ökad transparens leder till att fler kan testa och utveckla script och programvaror för en allt mer sofistikerad och precis användning.

24 Slutlig utvärdering av resultat

Då tolkningar utifrån bioinformatiken är klara, så måste rimligheten i dessa resultat säkerställas (Shaw et al. 2016). Det görs lättast genom att väl känna till de miljöer som undersökts, samt målarternas ekologi och preferenser (Fig. 71). I detta steg finns det risk att upptäcka felaktigheter som inträffat under tidigare analyssteg. Frågor du kan ställa dig är t.ex. *Är det rimligt att denna art finns just här?* eller *Varför saknas min målart i vissa prover?* Statistisk inferens (urvalsanalys), variansanalyser, samt resultat från tidigare undersökningar (t.ex. provfisken) används för att säkerställa sannolikheten att finna vissa arter och deras relativa tätheter inom det undersökta området. Även eventuell bias och negativa/positiva fel behöver utvärderas, både för insamling och laboratorieanalys. Ofta görs denna utvärdering tillsammans med laboratoriet eller de som utfört provtagningarna. Du kan dock inte helt förlita dig på det anlitate företaget/laboratoriet utan måste själv dra slutsatser som verkar troliga för just din undersökning. Många gånger involveras inte kommersiella laboratorier i den slutliga analysen, innan rapportskrivandet påbörjas.



Figur 71. Genom att jämföra slutresultat med provtagna miljöer och målarter, måste varje enskild projektledare/forskare utvärdera resultatens rimlighet. Bilden kommer från ett eDNA-projekt med sollabborre (*Lepomis gibbosus*) i Halland 2018 (foto: Per Sundberg, ©SeAnalytics).

25 Lagring av prover och data

Det finns stora behov av att lagra data både från biologiska prover och digitala resultat (från PCR och sekvensering). Inom DNA-tekniken ersätts snabbt äldre metodik med nyare som kan ge bättre precision. Extraherat DNA från vattenprover kan därför vara bra att spara för att kunna utföra nya analyser på samma prover med modern teknik. Dessutom kan tidigare provtagningsresultat jämföras med senare. Genom lagring av prover erhålls möjlighet att skapa långa tidsserier från prover vid specifika lokaler, och därmed studera hur arter och biologiska samhällen förändras över tid. Visserligen blir man tvungen att interkalibrera moderna metoder med äldre, eftersom de skiljer sig åt vad gäller både känslighet och precision. Men interkalibrering måste även utföras vid förbättringar av traditionella metoder som provfiske eller åldersläsning av fisk, och utvecklas därmed kontinuerligt inom miljöövervakningen (Holmgren 2013).

De *biologiska proverna* lagras (i form av extraherat DNA) ofta i frysar och kan ev. bli utrymmeskrävande beroende på mängden prov. Det finns inga allmängiltiga regler för vilka prover som ska sparas, utan det är ofta upp till den enskilde forskaren/projektledaren att avgöra provernas öde.

Resultat från sekvenseringar utmanar våra möjligheter att lagra data digitalt. En flerartsstudie kan generera data på över 120 GB (t.ex. via Illumina NextSeq), vilket inkluderar miljontals läsningar av DNA-sekvenser. Resultat från PCR kräver inte lika mycket datautrymme. Idag saknas specifika regler för hur digital data bör lagras. Många laboratorier som utför sekvenseringsanalyser lagrar data under 6 månader, sedan raderas det från deras servrar. Företagen har inte utrymme för dessa data under en längre tid, då ny data hela tiden måste sparas.

Vi behöver reda ut detaljer kring *vilka prover och data* som ska lagras och hur detta bör ske. I framtiden kanske allt fler dataföretag specialiserar sig på lagring av mycket stora datamängder. Detta sker redan idag, men behoven kommer troligen att öka. Ett **nationellt datavärdskap** skulle kunna vara ett steg i rätt riktning, eftersom det då kommer att behöva diskuteras *vad som ska lagras, samt hur och var lagringen ska ske*. Tillgängligheten av data är också något som kommer att behöva diskuteras.

Ett sätt att tillgängliggöra eDNA-data är att använda delade plattformar via webbgränssnitt, t.ex. som Artportalen (www.artportalen.se). Ett annat intressant projekt är Aquatic eDNAAtlas Project, som startats upp av Rocky mountains forskningsstation inom U.S. Forest Service (www.fs.fed.us/rm/boise/AWAE/projects/the-aquatic-eDNAAtlas-project.html). Här gör forskare bioinformation åtkomlig för allmänheten, i form av kartor med metadata kring eDNA-undersökningar i vatten. Dessa nya webbaserade plattformar bör kunna hantera både rådata och processad data, samt metadata. Rådata kan återanvändas med nya bioinformatiska metoder och arbetsflöden medan processad data är viktigt för icke-specialister och hjälper till att informera allmänheten om eDNA-undersökningar (Soranno et al. 2015; Keck et al. 2017).

26 Barcodingbibliotek

Barcodingbibliotek innehåller information om organismers olika sekvenser, eller ”streckkoder”. Biblioteken används både då primers designas och då matchning ska göra mot sekvenseringsresultat från t.ex. en Illumina MiSeq-körning.

Idag ser forskarna en möjlighet att använda eDNA inom miljöövervakningen (Hering et al. 2018; Pawlowski et al. 2018). Det ger nya utmaningar när det gäller kvalitetssäkring av referensbiblioteken, uppbyggnad av metadatabibliotek och behov av taxonomisk kunskap (Hovmöller et al. 2017). Forskare, myndigheter, privata aktörer och utförare behöver få tillgång till kvalitetssäkrade och uppdaterade barcodingbibliotek, samt lagrade data och prover från tidigare studier (Taberlet et al. 2018).

Sedan 2003 har Barcode of Life (www.ibol.org) sekvenserat mängder av arter enligt den standardiserade mtDNA-markören CO1. Idag vet vi att denna markör inte alltid är den bästa för vattenprover med eDNA (Deagle et al. 2014). Detta leder till behov att sekvensera nya markörer för fisk och kräftor (12S, Cyt b, 16S etc.). Dessutom bör inomartsvariationen dokumenteras (Sundberg et al. 2018b). Det skulle t.ex. vara användbart att ta fram sekvenser från flera geografiska områden för samma art. Referensdatabaserna behöver alltså fyllas med mer användbara sekvenser för framtidens eDNA-undersökningar. Om några år kan behoven komma att förändras ytterligare, vilket kan leda till att organismers *hela* genom behöver sekvenseras. I framtiden kan det till och med bli billigare att sekvensera samtliga europeiska fiskarters hela mtDNA. Det skulle kunna ge oss en alltmer dynamisk referensdatabas som mer genomgripande kan användas av eDNA-analytiker inom hela Europa och omvärlden.

Idag har större delen av alla fiskars CO1-markörer sekvenserats (www.fishbol.org). Dessutom är andra typer av genetiska markörer sekvenserade för många av Europas fiskarters, t.ex. 12S som används vid flerartsanalyser (Valentini et al. 2016; Hering et al. 2018). En utmaning är att många organismgrupper är långt ifrån sekvenserade. Fisk, kräftor och musslor har betydligt färre arter att sekvensera, till

skillnad från bakterier, svampar eller nematoder. För de senare grupperna finns därför stora svårigheter att hitta arter i referensbiblioteken, helt enkelt för att de inte finns sekvenserade. Kostnaden för att sekvensera alla dessa organismer är mycket stor. Dessutom saknas det idag fortfarande flera invasiva arter i referensbiblioteken (Sundberg et al. 2018b).

Sekvenseringen av allt fler evertebrater, svampar, växter och bakterier leder också till en ny diskussion om arter och OTU:s. Det finns stora olikheter mellan taxonomiska tolkningar och genetiska analyser mellan organismer inom olika djurgrupper. Artbegreppet kommer inte att kunna användas på samma sätt som tidigare eftersom sekvenseringen sorterar in organismer i nya grupperingar, baserade på genetiska, istället för morfologiska, skillnader (Fig. 69).

27 Med eDNA in i framtiden

Ny teknik revolutionerar just nu sättet vi ser på naturen. Genetiska metoder att upptäcka och kvantifiera arter i sötvatten utvecklas kontinuerligt. Både noggrannheten och känsligheten inom dessa metoder förbättras och priserna minskar (Shokralla et al. 2012). Tack vare den snabba tekniska utvecklingen inom bl.a. flerartsanalyser för PCR (multiplexing) och shotgun-sekvensering, kommer eDNA kunna användas inom många nya områden. Det finns också stora behov av kunskapsutbyte, en utvecklad strategi för eDNA inom miljöövervakningen, samt en väl planerad finansiering.

Kunskapsutbyte

Genom att utveckla samarbetsprojekt med genetiker och ekologer kan parallell och kompletterande information länkas samman och ge svar på fler detaljer kring en eDNA-undersökning.

Biodiversitet

eDNA används redan idag för att ”skanna” av ett områdes artdiversitet med hjälp av metabarcoding. eDNA erbjuder precisa och relativt kostnadseffektiva metoder (se Kostnader för eDNA-undersökningar). Jämförande index håller på att utvecklas för t.ex. fisk, med hjälp av eDNA, för att kunna bedöma ekologisk status av olika miljöer (Hering et al. 2018). Biodiversitetsstudier med eDNA kommer fortsätta att utvecklas med hjälp av studier av funktionella gener etc (Taberlet et al. 2018).

Populationsgenetik

eDNA ger inte svar på populationsgenetiska frågor som genetisk variation eller genetisk drift. Studierna behöver därför kompletteras med andra typer av genetisk provtagning, så att sambanden mellan individer, populationer och biologiska samhällen kan fördjupas (Hughes et al. 2009). I framtiden kan eventuellt mer detaljerade slutsatser dras om individers och populationers strukturer, trots att DNA-underlaget är begränsat. Flera eDNA-studier har visat att man kan dra vissa populationsgenetiska slutsatser med hjälp av haplotyper, (Sigsgaard et al. 2016; Sousa-Santos et al.

2016) och även jämföra haplotyper med prover av kärn-DNA under parningstider (Byleman et al. 2017). Tack vare en snabb utveckling inom området "metagenomics" (där organismers hela arvs massa studeras med enkel miljöprovtagning) kommer eDNA-metodiken att kunna vinna alltmer terräng (Deiner et al. 2017b).

Födovävs- och dietanalyser

Ytterligare utveckling av DNA-metodiken kommer att sammanfoga studier av födovävar med eDNA, stabila isotoper, dietanalyser och genetisk information.

Invasiva arter och parasiter

Med eDNA kan framtidens miljöövervakning inkludera fler studier av patogener/parasiter, som kan följa med invasiva arter och slå ut hotade arter eller viktiga resursarter.

28 Kostnader för eDNA-undersökningar

Beräknade kostnader för eDNA-undersökningar beror på frågeställning, provtagningsdesign, metod- och analysval. De största utgifterna inom ett eDNA-projekt är antalet arbetstimmar, ofta beroende på hur många prover som behövs, vilket påverkar både tid i fält och på labb. Därefter kommer utgifter för viss utrustning och typ av analys (tabell 4). En stor skillnad mot traditionell provtagning är att eDNA-undersökningar har fler analyssteg (Fig. 55). eDNA-metoder kan inte artbestämma förrän vid *sista* analyssteget, till skillnad från olika typer av provfisken där artbestämning sker samtidigt med utförandet.

Få studier har mer ingående försökt att beräkna kostnader för eDNA-undersökningar. Dejean (2012) räknade dock ut en 2,5-faldig kostnadsminskning i jämfört med traditionella undersökningar av amerikansk oxgroda (*Lithobates catesbeianus*). Biggs (2014) räknade på en 10-faldig minskning av kostnader vid eDNA-citizen science projekt av större vattensalamander (*Triturus cristatus*). De flesta eDNA-studier har konstaterat att kostnaderna för dessa undersökningar är betydligt lägre än för traditionell miljöövervakning, åtminstone när det gäller fältprovtagning (Pedersen et al. 2014). Trots denna allmängiltiga uppfattning kan det ibland vara tvärtom (Smart et al. 2016; Evans et al. 2017). Evans (2017) jämförde t.ex. eDNA-metodik med elfiske, och kom fram till att det var *dyrare* att använda eDNA-metodik vid enartsanalyser. eDNA-undersökningen fick dessutom en lägre informationsupplösning, eftersom data om längder, kön, skador etc. uteblev. I detta kapitel redovisas de olika kostnaderna och vad man bör tänka på när det gäller utgifter (tabell 4).

Denna rapport har inte möjlighet att i detalj beräkna kostnaden för ett eDNA-projekt. Anledningen är att det finns så många olika variabler som inverkar vid en sådan kostnadsanalys. Detta kapitel kommer därför endast att mycket översiktligt, men metodiskt, redovisa olika kostnader vid ett eDNA-projekt. Kapitlet fungerar då mer som en påminnelse om vad man bör tänka på gällande olika utgiftsdelar inom projektet.

Tabell 4. *Kostnader för olika typer av utrustning och analys. Kostnad beräknas i SEK för 2018.*

| Typ av material/analys | Antal | Företag/Säljare | Kostnad (inköp) | Kostnad per prov |
|---|------------|----------------------|-----------------|------------------|
| Limnos "kontaminationsfria" vattenhämtare | 1 st | Hydro-bios/Swedac | 12 000 | |
| Van Dorn vattenhämtare | 1 st | Alpha/Wildco | 5000 | |
| Filter (47mm glasfiber 1,0 µm) | 100 st | Advantec/Cole-Parmer | 800 | 8 |
| Filterhållare för 47mm filter | 1 st | Merck Millipore | 2 000 | |
| Sterivex filterkapsel (0,22-0,45 µm) | 50 st | Merck Millipore | 3 100 | 62 |
| Envirochek filterkapsel (1,0 µm) | 1 st | Pall Life Sciences | 1 500 | 1500 |
| Masterflex portable sampler 12V | 1 st | Cole-Parmer | 20 000 | |
| ANDe ryggsäckspump | 1 st | Smith-root | 60 000 | |
| DNeasy Blood & Tissue extraktion | 250 kit | Qiagen | 6 380 | 26 |
| Extraktion på lab* | 100 prover | Uppskattat | 10-20 000 | 150 |
| Extra replikat under extraction* | 100 prover | Uppskattat | 10-20 000 | 150 |
| Kontroll av DNA efter extraktion* | 100 prover | Uppskattat | 8-10 000 | 90 |
| Primerpar (färdigbeställda) | 100 prover | Uppskattat | 10-20 000 | 150 |
| Handhållen fältPCR | 1 st | Biomeme | 37 000 | |
| Biomeme primer-kit (en art) | 30 prover | Biomeme | 30 000 | 300 |
| qPCR och utvärdering (en art) på labb* | 100 prover | Uppskattat | 15-25 000 | 200 |
| ddPCR och utvärdering (en art) på labb* | 100 prover | Uppskattat | 10 000 | 100 |
| PCR och skapa bibliotek* | 100 prover | Uppskattat | 10-50 000 | 300 |
| Sekvensering*. ¹⁾ | 100 prover | Uppskattat | 100 000 | 800 |
| Bioinformatik och optimering av protokoll (per månad) | 1 månad | Uppskattat | 100 000 | |

* kostnad enbart för specifik analys, exklusive arbetstid

¹⁾ varje "körning" innehåller mellan 15-25 prover

Då kostnaden för fältarbete slås ihop med laborativa utgifter så kan kostnaderna per prov beräknas. Denna kostnad kan sedan användas vid jämförelser för att avgöra hur många prover det är värt att inkludera i studien, t.ex. gällande provpunkter, replikat och kontroller. *Tänk dock på följande:* för att erhålla rättvisande kostnader *måste* ett laboratorium kontaktas. Olika labb har olika prisbilder. Det kan bero på vilken typ av analys de är specialiserade på, hur stort labbet är, i vilket land det ligger, vilka analyser som är automatiserade, samt om laboratoriet är vinstdrivande eller inte. De olika kostnaderna för ett eDNA-projekt kan delas upp i följande delar:

Planering, projektledning och administration

Timmar för planering, projektledning och administration är viktiga att ta med. I detta ingår att ha en genomtänkt vetenskaplig frågeställning och hypotes, att planera fält- och labbarbetet och att administrera projektet.

Pilotförsök och optimering

Eftersom eDNA fortfarande är under utveckling så är det vanligt att vissa delar av metodiken måste testas på laboratorium eller som mindre pilotförsök. Resultaten ligger sedan till grund för den fortsatta studien. Planera därför även kostnader för eventuella pilotförsök. Optimering av specifika protokoll kan ta alltifrån några dagar till några arbetsveckor.

Fältarbete: Antal prov, replikat och kontroller

Beroende på frågeställning (omfattning, antal arter, kvantifierbarhet), områdets storlek och tillgänglighet etc. så varierar kostnaderna i en studie. Antalet prov som tas i ett vattensystem kan direkt kopplas till antal persontimmar i fält. Fundera därför på hur många prov, inklusive replikat och kontroller, som är möjligt att hantera per timme (inberäknat insamling, filtring och decinficering av utrustning, se nedan). Säkerhetsmässigt bör man vara minst två personer i fält, speciellt om sjöar ska provtas, vilket fördubblar kostnaderna.

Fältarbete: Provtagningsvolym och filtrering

Volym vatten som ska filtreras i fält kan direkt kopplas till antal persontimmar. Filtreras 1 liter vatten med Sterivex och spruta tar detta t.ex. ca 10 minuter per prov. Om 5 liter vatten direktfiltreras (med 1-2 μ m filterporer) tar detta 5-6 minuter med en maskindriven pump, t.ex. Cole-Palmer Masterflex portabla samplare. Läger man på tillgänglighet för provtagningen (res- och gångtid), tid för rengöring och filterhantering så kan kanske man hinner filtrera 4 prov på en timme. Pumpens batteri håller i 2-3 timmar och sedan måste batteriet bytas. Det innebär att man kan filtrera ca 30 prover under en arbetsdag (ca 8 timmar) och med en utrustning. Kan man då välja ett *pumphuvud med två kanaler* så är det att rekommendera (vilket filtrerar två replikat samtidigt).

Fältarbete: Utrustning

Vanlig förbrukningsutrustning som flaskor, filter, slangar etc. är låg, vilket även kostnad för kontaminationsutrustning är. Kostnader för specifik utrustning kan däremot vara hög (tabell 4).

Lab: Primers och prober

Ofta vill laboratorier använda färdiga primers och prober, som de kan beställa färdiga. Det kostar mellan 15-20 000 SEK att köpa färdiga primers för 100 prover (tabell 4). Dessa primers kan behöva optimeras för att fungera bra för målarterna i projektet. Att utveckla helt nya primers är ofta tidsödande, men ibland nödvändigt.

Labb: Antal biologiska prover, tekniska replikat och kontroller

Ofta innebär fler prover lite mer kostnadsutlägg totalt, men det kan ibland bli billigare att analysera flera prover om kostnaden slås ut per prov. Ett ökat antal kontroller och replikat kostar vanligtvis mer men underlättar möjligheten till kvantifiering. Används ddPCR kan du öka upplösningen utan större kostnad med hjälp av tekniska replikat. Ökad automatisering med fler automatiserade delsteg innebär t.ex. att kostnaderna för eDNA-analyser (som ofta kräver många replikat) kommer att minska framöver.

Labb: Extraktion

Tyvärr utför många av de större laboratorierna sällan DNA-extraktion. Därför kan du bli tvungen att anlita ett specifikt eDNA-labb för att utföra dessa våtarbeten, vilket riskerar att öka kostnaderna. Extraktion är tidskrävande och utgör ofta en tidsmässig ”flaskhals” hos många laboratorier. Själva extraktionskiten är inte så dyra (tabell 4), jämfört med själva extraktionstiden. Det är viktigt att kunna genomföra flera parallella extraktioner samtidigt för att minska kostnaderna. Ibland används flera tekniska replikat vid extraktionen, vilket ökar arbetstiden.

Labb: Enartsanalys vs flerartsanalys

Enartsanalyser av kända arter avslutas med PCR. Det kostar därför mindre att göra enartsanalyser, till skillnad från flerartsanalyser. Att besvara frågan ”finns arten *XX* i vattnet?” kan kosta mellan 300-550 SEK/prov. Det går även att utföra hela processen (från extraktion fram till färdigt qPCR-resultat) med en handhållen PCR direkt i fält (tabell 4), vilket ger en kostnad på ca 300 SEK/prov (förutom kostnaden för maskinen).

Flerartsanalyser är dyrare men svarar på frågor som enartsanalyser inte kan, t.ex. vilka arter (inklusive okända) finns i vattnet. Det är dyrare att besvara detta eftersom fler analyser måste utföras (PCR och sekvensering), och bioinformatiken är mer komplex. Vid sekvensering måste också noggranna bibliotek skapas, vilket ökar kostnaderna. Då själva sekvenseringen utförs så väljs ofta ett mindre antal prover (mellan 15-25) som körs samtidigt. Vilket också ökar kostnaderna, eftersom varje sekvenskörning kostar pengar. I slutändan kan kostnaderna för flerartsanalyser (inklusive tolkning av resultat) därför bli upp till tio gånger dyrare än för enartsanalyser.

Bioinformatik och rådgivning

Du kan köpa tjänster i form av ”bioinformatik”, vilket innebär att du kan få hjälp av en genetiker/statistiker att analysera dina slutresultat. Bioinformatikern ”hyrs” då under en viss tid för att gå igenom och säkerställa resultatet. Det tar längre tid att analysera data från flerartsanalyser (via sekvensering) än data från enartsanalyser.

Dessutom kan du behöva hjälp med att statistiskt bearbeta dina data, t.ex. för att kontrollera rimligheten att finna vissa arter, eller för att kontrollera felmarginaler.

Efterbehandling (rapportskrivning och dataläggning)

Det tillkommer alltid kostnader i arbetstid för att rapportera och datalägga/lagra data.

Referenslista

- Adrian-Kalchhauser, I. & Burkhardt-Holm, P. (2016) An eDNA Assay to Monitor a Globally Invasive Fish Species (inkl supplementary). *PLoS ONE*, doi: 10.1371/journal.pone.0147558.
- Agersnap, S. et al (2017) Monitoring of noble, signal and narrowclawed crayfish using environmental DNA from freshwater samples. *PlosOne*, doi: 10.1371/journal.pone.0179261.
- Alberdi, et al (2017) Scrutinizing key steps for reliable metabarcoding of environmental samples. *Methods Ecol Evol.* 9(1):134–147, doi: 10.1111/2041-210X.12849.
- Altshuler, M.L. (2006) *PCR troubleshooting: The essential guide*. Caister Academic Press, 80 s. ISBN: 978-1-904455-07-3.
- Anchordoquy, T.J. & Molina, M.C. (2007) Preservation of DNA. *Cell Preservation Technology.* 5(4): 180-188, doi: 10.1089/cpt.2007.0511.
- Andruszkiewicz, E. et al (2017) Persistence of marine fish environmental DNA and the influence of sunlight. *PLoS One* 12(9): e0185043, doi: 10.1371/journal.pone.0185043.
- Ardura, A. et al (2015) eDNA and specific primers for early detection of invasive species - a case study on the bivalve *Rangia cuneata*, currently spread-ing in Europe. *Mar Environ Res.* 112:48-55, doi: 10.1016/j.marenvres.2015.09.013.
- Ardura, A. et al (2016) Novel tools for early detection of a global aquatic invasive, the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Conserv: Mar. Freshw. Ecosyst.* 27: 165–176.
- Balasingham, K. et al (2018) Environmental DNA detection of rare and invasive fish species in two Great Lakes tributaries. *Molecular Ecology* 27:112–127, doi: 10.1111/mec.14395.
- Bellemain, E. et al (2016) Trails of river monsters: Detecting critically en-dangered Mekong giant catfish *Pangasianodon gigas* using environmental DNA. *Global Ecology and Conservation* 7: 148–156, doi: 10.1016/j.gecco.2016.06.007.
- Barnes, MA. et al (2014) Environmental Conditions Influence eDNA Persistence in Aquatic Systems. *Environ Sci Technol.* 48(3):1819-27, doi: 10.1021/es404734p.
- Barnes, MA. & Turner, CR. (2016) The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conserv Genet.* 17: 1-17, doi: 10.1007/s10592-015-0775-4.
- Bergman, PS. et al (2016) Detection of Adult Green Sturgeon Using environmental DNA analysis. *PLoS ONE*, doi:10.1371/journal.pone.0153500.
- Biggs J. et al (2014) Analytical and methodological development for improved surveillance of the great crested newt. *Defra Project WC1067*. Freshwater Habitats Trust: Oxford.
- Biggs, J. et al (2015) Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Biological Conservation* 183: 19–28, doi: 10.1016/j.biocon.2014.11.029

- Bik, H.M. et al (2012) Sequencing our way towards understanding global eukaryotic biodiversity. *Trends Ecol. Evol.* 27, 233–243, doi: 10.1016/j.tree.2011.11.010.
- Björnsgaard, A. et al (2016). ITS all right mama: Investigating the formation of chimeric sequences in the ITS2 region by DNA metabarcoding analyses of fungal mock communities of different complexities. *Molecular Ecology Resources* 17: 730–741, doi: 10.1111/1755-0998.12622.
- Bohman, P. & Edsman, L. (2013) Marmorkräftan i Märstaån – riskanalys och åtgärdsförslag, *Aqua reports* 2013:17, 114 s.
- Bohman, P. (2016) eDNA från fisk, kräftor och musslor 2014-2016 (FOMA-projekt). <http://www.slu.se/fisk-krافتor-musslor-eDNA>
- Bohman, P. (2018). Jakten på solabborren (*Lepomis gibbosus*). eDNA-projekt finansierat av Havs- och vattenmyndigheten. <http://www.slu.se/fisk-krافتor-musslor-eDNA>
- Bohmann, E. et al (2014) Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends Ecol. Evol.* 29, 358–367.
- Bonder, M.J. et al (2012) Comparing clustering and pre-processing in taxonomy analysis. *Bioinformatics* 28, 2891–2897, doi: 10.1093/bioinformatics/bts552.
- Boyer, F. et al (2016) OBITools: a unix-inspired software package for DNA metabarcoding. *Mol Ecol Resour.* 16(1): 176-182, doi: 10.1111/1755-0998.12428.
- Bustin, S.A. et al (2009) The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments. *Clinical Chemistry* 55(4): 611–622.
- Buxton, A. et al (2018) Seasonal variation in environmental DNA detection in sediment and water samples. *PLoS ONE* 13(1): e0191737, doi: 10.1371/journal.pone.0191737.
- Byleman, J. et al (2017) An environmental DNA-based method for monitoring spawning activity: a case study, using the endangered Macquarie perch (*Macquaria australasica*). *Methods in Ecology and Evolution* 2017, 8, 646–655, doi: 10.1111/2041-210X.12709.
- Carim, K. et al (2015). Protocol for Collecting eDNA Samples from Streams. U.S.D.A. Forest Service, Rocky Mountain Research Station V2.1. <http://www.fs.fed.us/research/genomics-center/docs/edna/edna-protocol.pdf/>
- CEN (2018) CEN/TC 230/WORKING GROUP 2 – Proposal for a new Working Group WG28 “DNA and eDNA methods” A plan to fulfil the DNA and eDNA standardization needs of EU legislation in Water Policy (Proposal following decisions of the 2017 Berlin Meeting of CEN/TC 230, its Working Groups and eDNA COST representatives)
- Civade, R. et al (2016) Spatial representativeness of environmental DNA metabarcoding signal for fish biodiversity assessment in a natural freshwater system. *PLoS ONE*, 11, e0157366.
- Clemmensen, K.E. et al (2016) Sample Preparation for Fungal Community Analysis by HTS of Barcode Amplicons. Från Francis Martin and Stéphane Uroz (eds.), *Microbial Environmental Genomics (MEG)*, *Methods in Molecular Biology*, vol. 1399, kap 4, doi: 10.1007/978-1-4939-3369-3_4, Springer Science & Business Media, New York.
- Clusa, L. et al (2016) An Easy Phylogenetically Informative Method to Trace the Globally Invasive Potamopyrgus Mud Snail from River's eDNA. *PLoS One.* 11(10): e0162899, doi: 10.1371/journal.pone.0162899.
- Coissac, E. et al (2012) Bioinformatic challenges for DNA metabarcoding of plants and animals. *Mol. Ecol.* 21, 1834–1847, doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05550.x.
- Cowart, D.A. et al (2015) Metabarcoding Is Powerful yet Still Blind: A Comparative Analysis of Morphological and Molecular Surveys of Seagrass Communities. *PLoS ONE* 10(2): e0117562, doi: 10.1371/journal.pone.0117562.
- Cramond, F. et al (2016) Protocol for a retrospective, controlled cohort study of the impact of a change in Nature journals' editorial policy for life sciences research on the completeness of reporting study design and execution. *Scientometrics*, doi: 10.1007/s11192-016-1964-8.

- Creer, S. et al (2016) The ecologist's field guide to sequence-based identification of biodiversity. *Methods in ecology and evolution* 7(9): 1008–1018, doi: 10.1111/2041-210X.12574.
- Cristescu, M. E. (2014) From barcoding single individuals to metabarcoding biological communities: towards an integrative approach to the study of global biodiversity. *Trends in Ecology & Evolution*, 29(10): 566-571, doi: 10.1016/j.tree.2014.08.001.
- Darling, J.A. & Blum, M.J. (2007) DNA-based methods for monitoring invasive species: a review and prospectus. *Biol Invasions* (2007) 9:751–765, doi: 10.1007/s10530-006-9079-4.
- Darling, J.A. & Mahon, A.R. (2011) From molecules to management: Adopting DNA-based methods for monitoring biological invasions in aquatic environments. *Environmental Research* 111(7): 978-988, doi: 10.1016/j.envres.2011.02.001.
- D'Amen, M. et al (2017) Spatial predictions at the community level: from current approaches to future frameworks. *Biological reviews* 92(1): 169-187, doi: 10.1111/brv.12222.
- Davison, F. et al (2017) Application of environmental DNA analysis to inform invasive fish eradication operations. *Sci Nat* 104: 35, doi: 10.1007/s00114-017-1453-9.
- Deagle, B.E. et al (2010) Pyrosequencing faecal DNA to determine diet of little penguins: is what goes in what comes out? *Conserv. Genet.* 11:2039–2048. doi:10.1007/s10592-010-0096-6.
- Deagle, B.E. et al (2014) DNA metabarcoding and the cytochrome c oxidase subunit I marker: not a perfect match. *Biol. Lett.* 10: 20140562, doi: 10.1098/rsbl.2014.0562.
- De Barba, M. et al (2014) DNA metabarcoding multiplexing for omnivorous diet analysis and validation of data accuracy. *Molecular Ecology Resources* 14(2): 306-323, doi: 10.1111/1755-0998.12188.
- Deiner, K. & Altermatt, F. (2014) Transport Distance of Invertebrate Environmental DNA in a Natural River. *PLoS ONE* 9(2): e88786. doi:10.1371/journal.pone.0088786
- Deiner, K. et al (2015) Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biological Conservation* 183: 53–63, doi: 10.1016/j.biocon.2014.11.018.
- Deiner, K. et al (2016) Environmental DNA reveals that rivers are conveyor belts of biodiversity information. *Nature Communications* 7:12544, doi: 10.1038/ncomms12544.
- Deiner, K. et al (2017a) Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology* 26(21): 5872–5895, doi: 10.1111/mec.14350
- Deiner, K. et al (2017b) Long-range PCR allows sequencing of mitochondrial genomes from environmental DNA. *Methods in Ecology and Evolution* 8(12): 1888-1898, doi: 10.1111/2041-210X.12836.
- Dejean, T. et al (2011) Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. *PLoS ONE*, 6, e23398, doi:10.1371/journal.pone.0023398.
- Dejean, T. et al (2012) Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *J. Appl. Ecol.* 49: 953–959, doi: 10.1111/j.1365-2664.2012.02171.x.
- De Souza, L.S. et al (2016) Environmental DNA (eDNA) Detection Probability Is Influenced by Seasonal Activity of Organisms. *PLoS ONE* 11(10): e0165273, doi:10.1371/journal.pone.0165273.
- Devloo-Delva, F. et al (2016) Detection and characterization of the biopollutant *Xenostrobus securis* (Lamarck 1819) Asturian population from DNA Barcoding and eBarcoding. *Mar Pollut Bull.* 105(1): 23-29, doi: 10.1016/j.marpolbul.2016.03.008.
- Diaz-Ferguson, E. & Moyer, G. (2014) History, applications, methodological issues and perspectives for the use of environmental DNA (eDNA) in marine and freshwater environments. *Rev. Biol. Trop.* 62 (4): 1273-1284.
- Doi, H. et al (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.

- Doi, H. et al (2017a) Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish. *Freshwater Biology* 62: 30–39, doi:10.1111/fwb.12846.
- Doi, H. et al (2017b) Water sampling for environmental DNA surveys by using an unmanned aerial vehicle. *Limnology and Oceanography Methods* 15(11): 939–944, doi: 10.1002/lom3.10214.
- Dunker, K.J. et al (2016) Potential of environmental DNA to evaluate northern pike (*Esox lucius*) eradication efforts: an experimental test and case study. *Plos One* 11: e0162277, doi: 10.1371/journal.pone.0162277.
- Dougherty, M. M. et al (2016) Environmental DNA (eDNA) detects the invasive rusty crayfish *Orconectes rusticus* at low abundances. *Journal of Applied Ecology* 53: 722–732.
- Edgar, R.C. & Flyvbjerg, H. (2015) Error filtering, pair assembly and error correction for next-generation sequencing reads. *Bioinformatics* 33(21): 3476–3482, doi:10.1093/bioinformatics/btv401.
- Edsman et al (2018) Hunting crayfish plague with eDNA – and making use of the results. *IAA 22 by annual symposium*, abstract. <https://www.astacology.org>.
- Egan, SP. et al (2015) Rapid Molecular Detection of Invasive Species in Ballast and Harbor Water by Integrating Environmental DNA and Light Transmission Spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.* 49 (7): 4113–4121, doi: 10.1021/es5058659.
- Eichmiller, J. et al (2014) The Relationship between the Distribution of Common Carp and Their eDNA in a Small Lake. *PLoS ONE* 9(11): e112611. doi:10.1371/journal.pone.0112611.
- Eichmiller, J. et al (2016) Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish. *Molecular Ecology Resources* 16: 56–68, doi: 10.1111/1755-0998.12421.
- Elbrecht, V. & Leese, F. (2015) Can DNA-Based Ecosystem Assessments Quantify Species Abundance? Testing Primer Bias and Biomass—Sequence Relationships with an Innovative Metabarcoding Protocol. *PLoS ONE* 10(7): e0130324, doi:10.1371/journal.pone.0130324.
- Elbrecht, V. et al (2018) Estimating intraspecific genetic diversity from community DNA metabarcoding data. *PeerJ*, 6, e4644, doi: 10.7717/peerj.4644.
- Erickson, R.A. et al (2017) Seasonal trends in eDNA detection and occupancy of bigheaded carps. *Journal of Great Lakes Research* 43: 762–770, doi: 10.1016/j.jglr.2017.06.003.
- Evans, NT. et al (2016) Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources* 16: 29–41, doi: 10.1111/1755-0998.12433
- Evans, NT. et al (2017) Comparative Cost and Effort of Fish Distribution Detection via Environmental DNA Analysis and Electrofishing. *Fisheries* 42(2), doi: 10.1080/03632415.2017.1276329.
- Evans, NT. & Lamberti, T.A. (2018) Freshwater fisheries assessment using environmental DNA: A primer on the method, its potential, and shortcomings as a conservation tool. *Fisheries Research* 197: 60–66, doi: 10.1016/j.fishres.2017.09.013.
- Ficetola, GF. et al (2008) Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol. Lett.* 4: 423–425, doi: 10.1098/rsbl.2008.0118.
- Ficetola, GF. et al (2015) Replication levels, false presences and the estimation of the presence/absence from eDNA metabarcoding data. *Molecular Ecology Resources* 15(3): 543–556, doi: 10.1111/1755-0998.12338.
- Ficetola, GF. et al (2016) How to limit false positives in environmental DNA and metabarcoding? *Mol. Ecol. Resour.* 16: 604–607.
- Fossoy, F. et al (2017) Bruk av miljø-DNA for overvåking av fremmede fiskearter – utvikling av artspesifikke markører for gjedde, mort og orekyt. *NINA-rapport 2099*, 38 s.
- Freeland, JR. et al (2017) The importance of molecular markers and primer design when characterizing biodiversity from environmental DNA. *Genome* 60(4): 358–374, doi: 10.1139/gen-2016-0100.

- Geerts, A. et al (2018) A search for standardized protocols to detect alien invasive crayfish based on environmental DNA (eDNA): A lab and field evaluation. *Ecological Indicators* 84: 564–572, doi: 10.1016/j.ecolind.2017.08.068.
- Giles, R.E. et al (1980) Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 77: 6715–6719.
- Goldberg C.S. et al (2013) Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). *Freshwater Science*, 32, 792–800, doi: 10.1899/13-046.1.
- Goldberg, C.S. et al (2015) Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. *Biological Conservation* 183: 1–3, doi: 10.1016/j.biocon.2014.11.040.
- Goldberg, C.S. et al (2016) Critical considerations for the application of eDNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution* 7:1299–1307, doi: 10.1111/2041-210X.12595.
- Goodwin, S. et al (2016) Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics* 17: 333–351, doi: 10.1038/nrg.2016.49.
- Griffith, D. M., Veech, J. A., & Marsh, C. J. (2016). cooccur: Probabilistic species co-occurrence analysis in R. *Journal of Statistical Software*, 69, 1–17, doi: 10.18637/jss.v069.c02.
- Gyllenstrand, N. (2016) Fisk, kräftor och musslor som eDNA – metod och fältprover. Centrum för genetisk identifiering, Naturhistoriska riksmuseet. *SLU Aqua. Rapport 2016-12-31, /4.1-33-2015, 4.1-728-2015 (NRM). SLU.aqua.2015.5.1-188 (SLU)*. 11 s.
- Handley, L.L. (2015) How will the ‘molecular revolution’ contribute to biological recording? *Biological Journal of the Linnean Society*, 115: 750–766.
- Hansen, B.K. et al (2018) The sceptical optimist: challenges and perspectives for the application of environmental DNA in marine fisheries. *Fish and Fisheries* 19:751–768, doi: 10.1111/faf.12286.
- Harper, L. et al (2018a) Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. *Hydrobiologia*, doi: 10.1007/s10750-018-3750-5
- Harper, K. et al (2018b) Searching for a signal: Environmental DNA (eDNA) for the detection of invasive signal crayfish, *Pacifastacus leniusculus* (Dana, 1852). *Management of Biological Invasions* 9(2): 137–148, doi: 10.3391/mbi.2018.9.2.07.
- Hatzenbuehler, C. et al (2017) Sensitivity and accuracy of high-throughput metabarcoding methods for early detection of invasive fish species. *Scientific Reports* 7:46393, doi: 10.1038/srep46393.
- Hebert, P. et al (2003). "Biological identifications through DNA barcodes". *Proceedings of the Royal Society B*. 270: 313–321. doi:10.1098/rspb.2002.2218.
- Hebert, P. & Gregory, T.R. (2005) The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Syst. Biol.* 54, 852–859, doi: 10.1080/10635150500354886.
- Hedman, J. & Rådström, P. (2013) *Overcoming inhibition in real-time diagnostic PCR. PCR Detection of Microbial Pathogens*, 2nd edn (ed.M.Wilks), pp. 17–48. Springer, New York, NY.
- Heikkinen, K. (1990) Seasonal changes in iron transport and nature of dissolved organic matter in a humic river in northern Finland. *Earth Surface Processes and Landforms* 15(7): 583–596, doi: 10.1002/esp.3290150702.
- Hellström, M. & Spens, J. (2017) eDNA - Fiskförekomst i 10 kustmynnande vattendrag, Norrbottens län. *AquaBiota Rapport 2017:10*, 30 s.
- Herder, J. et al (2014) *Environmental DNA - a review of the possible applications for the detection of (invasive) species*. Nijmegen: Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority. 111 s.
- Hering, D. et al (2018) Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive, *Water Research* (2018), doi: 10.1016/j.watres.2018.03.003.

- Hinlo, R. et al (2017) Methods to maximise recovery of environmental DNA from water samples. *PLoS ONE* 12(6): e0179251, doi: 10.1371/journal.pone.0179251.
- Hobbs, J. & Bright, D. (2016) Environmental DNA : implementation for resource development projects in BC and beyond. *British Columbia Mine Reclamation Symposium, Open collections*, doi: 10.14288/1.0354681.
- Holmgren, K. (2013). Betydelse av fiskens ålder vid bedömning av fisk-faunans status. *Aqua reports 2013:5*. Sveriges lantbruksuniversitet, Drottningholm. 66 s.
- Hovmöller, R. (2012) *Den gäckande aspen*. Rapport från Naturhistoriska riksmuseet. 9 s.
- Hovmöller, R. et al (2017) Streckkodning av svenska floran och faunan – förutsättningar och utmaningar. *PM från Naturhistoriska riksmuseet 2017:1. Naturhistoriska riksmuseets småskriftserie*.
- Hughes, J. et al (2009) Genes in Streams: Using DNA to Understand the Movement of Freshwater Fauna and Their Riverine Habitat. *BioScience* 59(7): 573–583, doi: 10.1525/bio.2009.59.7.8.
- Hunter, M.E. et al (2017) Detection limits of quantitative and digital PCR assays and their influence in presence–absence surveys of environmental DNA. *Molecular Ecology Resources* 17: 221–229, doi: 10.1111/1755-0998.12619.
- Hytterød, S. et al (2017) Mapping the occurrence of *Gyrodactylus salaris* upstream of the natural anadromous region of the Drammenselva catchment. Från *Surveillance programmes in Norway – Gyrodactylus salaris-Drammenselva catchment – Annual Report 2016*, Norwegian Veterinary Institute 2017. ISSN: 1894-5678, 8 s.
- Hänfling, B. et al (2016) Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Molecular Ecology* 25: 3101–3119, doi: 10.1111/mec.13660.
- Ingman, M. & Gyllensten, U. (2006) Vertebrate Mitochondrial DNA. Från boken ”*Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine*” Meyers, R.A (ed). Wiley-Blackwell, doi: 10.1002/3527600906.mcb.200500057.
- Ivanova, I. et al (2007) Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Mol. Ecol. Notes* 7, 544–548, doi: 10.1111/j.1471-8286.2007.01748.x.
- Iversen, L. et al (2015) Monitoring of animal abundance by environmental DNA — An increasingly obscure perspective: A reply to Klymus et al., 2015. *Biological Conservation* 192: 479–480, doi: 10.1016/j.biocon.2015.09.024.
- Jane, SF. et al (2015) Distance, flow and PCR inhibition: eDNA dynamics in two headwater streams. *Molecular Ecology Resources* 15: 216–227, doi: 10.1111/1755-0998.12285.
- Jerde, C.L. et al (2011) “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Cons. Lett.* 4: 150–157.
- Jerde, C.L. & Mahon, A.R. (2015) Improving confidence in environmental DNA species detection. *Molecular Ecology Resources* 15: 461–463, doi: 10.1111/1755-0998.12377.
- Jerde, C.L. et al (2016) Influence of stream bottom substrate on retention and transport of vertebrate environmental DNA. *Environ. Sci. Technol.* 50, 8770–8779.
- Jo, T. et al (2017) Rapid degradation of longer DNA fragments enables the improved estimation of distribution and biomass using environmental DNA. *Mol Ecol Resour.* 17:e25–e33, doi: 10.1111/1755-0998.12685.
- Jonsson, N. (1991) Influence of Water Flow, Water Temperature and Light on Fish Migration in Rivers. *Nordic. Freshw. Res.* 66:20-35.
- Kayaci, A. et al (2015) Genetic Impact Determination of Farmed Fish on Native Fish by mtDNA Markers. *KSU J. Nat. Sci.*, 18(1).
- Keck, F. et al (2017) Freshwater biomonitoring in the Information Age. *Frontiers in Ecology and the Environment* *Front. Ecol. Environ.* 15(5): 266-274, doi: 10.1002/fee.1490.

- Kelly, R. (2014) Will More, Better, Cheaper, and Faster Monitoring Improve Environmental Management? *Environmental Law*. http://works.bepress.com/ryan_kelly/8/
- Kelly, R. (2016) Making environmental DNA count. *Mol Ecol Resour* 16(1): 10-12, doi: 10.1111/1755-0998.12455.
- Kelly, R. et al (2017) Genetic and Manual Survey Methods Yield Different and Complementary Views of an Ecosystem. *Front. Mar. Sci.* 3:283, doi: 10.3389/fmars.2016.00283.
- Kemp, B.M. & Smith, D.G. (2005) Use of bleach to eliminate contaminating DNA from the surface of bones and teeth. *Forensic Science International*, 154: 53–61.
- Keskin, E. et al (2014) Detection of invasive freshwater fish species using environmental DNA survey. *Biochemical Systematics and Ecology* 56: 68e74, doi 10.1016/j.bse.2014.05.003.
- Keskin, E. et al (2016) Detection of rare and invasive freshwater fish species using eDNA pyrosequencing: Lake Iznik ichthyofauna revised. *Biochemical Systematics and Ecology* 67: 29-36, doi: 10.1016/j.bse.2016.05.020.
- Kirshtein, J.D. et al (2007) Quantitative PCR detection of *Batrachochytrium dendrobatidis* DNA from sediments and water. *Dis Aquat Org* 77: 11–15, 2007, doi: 10.3354/dao01831.
- Klymus, K. et al (2015) Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Biological Conservation* 183: 77-84, doi: 10.1016/j.biocon.2014.11.020.
- Kozubíková, E. et al (2011) Re-examination of the prevalence of *Aphanomyces astaci* in North American crayfish populations in Central Europe by TaqMan MGB real-time PCR. *Diseases of aquatic organisms*. 97:113-125, doi: 10.3354/dao02411.
- Lacoursiere-Roussel, A. et al (2016a) Estimating fish abundance and biomass from eDNA concentrations: variability among capture methods and environmental conditions. *Molecular Ecology Resources* 16: 1401–1414, doi: 10.1111/1755-0998.12522.
- Lacoursiere-Roussel, A. et al (2016b) Quantifying relative fish abundance with eDNA: a promising tool for fisheries management. *Journal of Applied Ecology* 53(4): 1148-1157, doi: 10.1111/1365-2664.12598.
- Lahoz-Monfort, J.J. et al (2015) Statistical approaches to account for false positive errors in environmental DNA samples. *Mol. Ecol. Resour.* 16: 673–685, doi: 10.1111/1755-0998.12486.
- Lancaster, G.A. et al (2004) Design and analysis of pilot studies: recommendations for good practice. *Journal of Evaluation in Clinical Practice* 10(2): 307-312, doi: 10.1111/j..2002.384.doc.x.
- Laramie, M.B. (2014) eDNA - A new tool for monitoring imperiled species. Great Northern Landscape Conservation Cooperative. Webinar: <https://www.youtube.com/watch?v=LlcAIUXXEcl> (2018-09-10).
- Laramie, M.B. et al (2015a) Characterizing the distribution of an endangered salmonid using environmental DNA analysis. *Biological Conservation* 183 (2015) 29–37, doi: 10.1016/j.biocon.2014.11.025.
- Laramie, M.B. et al (2015b) Environmental DNA sampling protocol - Filtering water to capture DNA from aquatic organisms: *U.S. Geological Survey Techniques and Methods*, book 2, chap. A13, 15 p., doi: 10.3133/tm2A13.
- Larson, E.R. et al (2017) Environmental DNA (eDNA) detects the invasive crayfishes *Orconectes rusticus* and *Pacifastacus leniusculus* in large lakes in North America. *Hydrobiologia* May, doi: 10.1007/s10750-017-3210-7.
- Lear, G. et al (2018) Methods for the extraction, storage, amplification and sequencing of DNA from environmental samples. *New Zealand Journal of Ecology* 42(1): 10-62, doi: 10.20417/nzjecol.42.9.

- Leese, F. et al (2016) DNAqua-Net: developing new genetic tools for bio-assessment and monitoring of aquatic ecosystems in Europe. *Research Ideas and Outcomes*. 2: 1-24, doi: 10.3897/rio.2.e11321.
- Leese, F. et al (2018) Chapter Two - Why We Need Sustainable Networks Bridging Countries, Disciplines, Cultures and Generations for Aquatic Biomonitoring 2.0: A Perspective Derived From the DNAqua-Net COST Action. *Advances in Ecological Research* 58: 63-99, doi: 10.1016/bs.aecr.2018.01.001.
- Liang, Z. & Keeley, A. (2013) Filtration recovery of extracellular DNA from environmental water samples. *Environ Sci Technol*. 47(16):9324-31, doi: 10.1021/es401342b.
- Lindahl, B. et al (2013) Fungal community analysis by high-throughput sequencing of amplified markers – a user’s guide. *New Phytologist*, 199: 288–299, doi: 10.1111/nph.12243.
- Longmire, J. et al (1997) Use of “lysis buffer” in DNA isolation and its implication for museum collections. *Museum of Texas Tech University, No 163*: 1-3, doi: 10.5962/bhl.title.143318.
- Lugg W. et al (2017) Optimal survey designs for environmental DNA sampling. *Methods Ecol Evol*. 2018;9: 1049–1059, doi: 10.1111/2041-210X.12951.
- Lundström, K. et al (in press) eDNA i dietprover. DNA-baserad dietanalys av skarv, torsk, abborre och svartmunnad smörbult från Karlskrona skärgård - en pilotstudie. Institutionen för akvatiska resurser, SLU.
- Lyrholm, T. (2009) DNA-baserade metoder för taxonomisk bestämning (‘DNA barcoding’): Potentiella tillämpningar för effektivare miljöövervakning. *Naturhistoriska riskmuseets småskriftserie 2009.2*.
- Macher, J-N. & Leese, F. (2017) Environmental DNA metabarcoding of rivers: Not all eDNA is everywhere, and not all the time. *bioRxiv* 164046, doi: 10.1101/164046.
- MacKenzie, D.L. et al (2006) *Occupancy Estimation and Modeling: Inferring Patterns and Dynamics of Species Occurrence*. Elsevier, Oxford, UK. ISBN: 9780124071971, 648 s.
- Magurran, A. & McGill, B. (2011) *Biological diversity: frontiers in measurement and assessment*. Oxford university press, NY, ISBN: 978-0-19-958066-8, 359 s.
- Mahon, A.R. et al (2013) Validation of eDNA Surveillance Sensitivity for Detection of Asian Carps in Controlled and Field Experiments. *PLoS ONE* 8(3): e58316. doi:10.1371/journal.pone.0058316.
- Maitland P.S. (2003) Ecology of the River, Brook and Sea Lamprey. *Conserving Natura 2000 Rivers Ecology Series* No. 5. English Nature. <http://publications.naturalengland.org.uk/publication/75042>
- Majaneva, M. et al (2018) Environmental DNA filtration techniques affect recovered biodiversity. *Scientific reports* 8:4682, doi: 10.1038/s41598-018-23052-8.
- Maruyama, A. et al (2014) The Release Rate of Environmental DNA from juvenile and adult fish. *PLOS ONE* 10(3): e0118727, doi: 10.1371/journal.pone.0114639.
- Matheson C.D., et al (2010) Assessing PCR inhibition from humic substances. *The Open Enzyme Inhibition Journal*. 3(1): 38-45, doi: 10.2174/1874940201003010038.
- Matsui, M. et al (2001) Estimation of the fate of dissolved DNA in thermally stratified lake water from the stability of exogenous plasmid DNA. *Aquat. Microb. Ecol.* 26, 95–102.
- Mauvisseau, Q. et al (2018) Environmental DNA as an efficient tool for detecting invasive crayfishes in freshwater ponds. *Hydrobiologia* (2018) 805:163–175, doi: 10.1007/s10750-017-3288-y.
- McKee, A.M. et al (2015) The effect of dilution and the use of a post-extraction nucleic acid purification column on the accuracy, precision, and inhibition of environmental {DNA} samples. *Biological Conservation*. 183:70-76.

- McKelvey, K.S. et al (2016) Sampling large geographic areas for rare species using environmental DNA: a study of bull trout *Salvelinus confluentus* occupancy in western Montana. *Journal of Fish Biology*, doi: 10.1111/jfb.12863
- Mehta, S. (2015) Patentability of Genes, Gene Sequencing & DNA based Primers. <https://iiprd.wordpress.com/2015/10/09/patentability-of-genes-gene-sequencing-dna-based-primers/>
- Mendoza, M.L.Z. et al (2015) Environmental genes and genomes: understanding the differences and challenges in the approaches and software for their analyses. *Briefings in Bioinformatics*, 16(5): 745–758, doi: 10.1093/bib/bbv001.
- Minamoto, T. et al (2012) Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology*, 13, 193–197, doi: 10.1007/s10201-011-0362-4.
- Mächler, E. et al (2016) Fishing in the Water: Effect of Sampled Water Volume on Environmental DNA-Based Detection of Macroinvertebrates. *Environ. Sci. Technol.* 50: 305–312, doi: 10.1021/acs.est.5b04188.
- Nakagaki, A. et al (2018) Application of droplet digital PCR in the analysis of genome integration and organization of the transgene in BAC transgenic mice. *Scientific Reports* 8:6638, doi: 10.1038/s41598-018-25001-x.
- Nevers, M. et al (2018) Environmental DNA (eDNA): A tool for quantifying the abundant but elusive round goby (*Neogobius melanostomus*). *PLOS ONE* 13(1): e0191720, doi: 10.1371/journal.pone.0191720.
- NORS (2018) *Nationellt Register över Sjöprovfisken*. Sveriges lantbruksuniversitet (SLU), Institutionen för akvatiska resurser. <http://www.slu.se/sjoprovfiskedatabasen>.
- Olds, B. P. et al (2016) Estimating species richness using environmental DNA. *Ecology and Evolution* 6(12): 4214–4226, doi: 10.1002/ece3.2186.
- Olson, Z. et al (2012) An eDNA approach to detect eastern hellbenders (*Cryptobranchus a. alleganiensis*) using samples of water. *Wildlife Research* 39: 629–636, doi: 10.1071/WR12114.
- Opel, K. et al (2010) A Study of PCR Inhibition Mechanisms Using Real Time PCR. *J. Forensic. Sci.* 55(1): 25–33, doi: 10.1111/j.1556-4029.2009.01245.x.
- Ore, J. P. et al (2015) Autonomous aerial water sampling. *J. Field Robot.* 32(8): 1095–1113, doi:10.1002/rob.21591.
- Ostberg, C.O. et al (2018) Distribution and seasonal differences in Pacific Lamprey and Lampetra spp eDNA across 18 Puget Sound watersheds. *PeerJ* 6:e4496, doi 10.7717/peerj.4496.
- Pavan-Kumar, A. et al (2015) DNA Metabarcoding: A New Approach for Rapid Biodiversity Assessment. *J Cell Sci Molecul* 02 Biol. 2(1): 111.
- Pawlowski, J. et al (2011) Novel lineages of Southern Ocean deep-sea foraminifera revealed by environmental DNA sequencing. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography* 58(19–20): 1996–2003, doi: 10.1016/j.dsr2.2011.01.009.
- Pawlowski, J. et al (2018) The future of biotic indices in the ecogenomic era: Integrating (e)DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems. *Science of The Total Environment*, 637–638: 1295–1310, doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.05.002.
- Pedersen M.W. et al. (2015) Ancient and modern environmental DNA. *Phil. Trans. R. Soc. B* 370: 20130383, doi: 10.1098/rstb.2013.0383.
- Perez, C: et al (2017) Comparison of American Fisheries Society (AFS) Standard Fish Sampling Techniques and Environmental DNA for Characterizing Fish Communities in a Large Reservoir, *North American Journal of Fisheries Management*, 37:5, 1010-1027, doi: 10.1080/02755947.2017.1342721.
- Peterman, W. et al (2013) Using species distribution and occupancy modeling to guide survey efforts and assess species status. *Journal for Nature Conservation* 21(2): 114-121, doi: 10.1016/j.jnc.2012.11.005.

- Piggott, MP. (2016) Evaluating the effects of laboratory protocols on eDNA detection probability for an endangered freshwater fish. *Ecology and evolution*. 6(9): 2739-2750, doi: 10.1002/ece3.2083.
- Pillipod, D. et al (2013a) *Application of Environmental DNA for Inventory and Monitoring of Aquatic Species*. USGS Fact sheet 2012-3146, 4 s.
- Pillipod, D. et al (2013b) Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 70: 1123–1130, doi: 10.1139/cjfas-2013-0047.
- Pillipod, D. et al (2014) Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources* 14(1): 109-116, doi: 10.1111/1755-0998.12159.
- Pochon, X. et al (2017) Wanted dead or alive? Using metabarcoding of environmental DNA and RNA to distinguish living assemblages for biosecurity applications. *PLoS One* 2;12(11):e0187636, doi: 10.1371/journal.pone.0187636.
- Pont, D. et al (2018) Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. *Scientific Reports* 8(1):10361, doi: 10.1038/s41598-018-28424-8.
- Port, J. A. et al (2016) Assessing vertebrate biodiversity in a kelp forest ecosystem using environmental DNA. *Mol.Ecol.* 25: 527–541, doi:10.1111/mec.13481.
- Poté, J. et al (2009) Plant leaf mass loss and DNA release in freshwater sediments. *Ecotoxicol Environ Saf* 72:1378–1383. doi:10.1016/j.ecoenv.2009.04.010.
- Prince, A.M. & Andrus, L. (1992) PCR: how to kill unwanted DNA. *Bio-techniques* 12, 358–360.
- Price, A.L. et al (2010) Estimation and modeling of electrofishing capture efficiency for fishes in Wadeable warm water streams. *North American Journal of Fisheries Management* 30, 481–498, doi: 10.1577/M09-122.1.
- Prosser, J. (2010) Replicate or lie. *Environmental Microbiology* 12(7), 1806–1810, doi: 10.1111/j.1462-2920.2010.02201.x.
- Qiagen (2006) DNeasy Blood & Tissue Handbook. 07/2006, 62 s. <http://www.qiagen.com>.
- Quinn, G. & Keough, M. (2002) *Experimental design and data analysis for biologists*. Cambridge University Press, ISBN: 978-0-521-81128-6, 557 s.
- Rees, H.C. et al (2014) The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology* 51(5): 1365-2664.
- Rees, H.C. et al (2015) Applications and limitations of measuring environmental DNA as indicators of the presence of aquatic animals. *Journal of Applied Ecology*. 52(4): 827-831, doi: 10.1111/1365-2664.12467.
- Renshaw, M.A. et al (2014) The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol–chloroform–isoamyl alcohol DNA extraction. *Molecular Ecology Resources*, 15, 168–176.
- Reuter, J.A. et al (2015) High-throughput sequencing technologies. *Molecular Cell* 58: 586–597, doi: 10.1016/j.molcel.2015.05.004.
- Riaz, T. et al (2011) ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic Acids Res.* 39, e145–e145, doi: 10.1093/nar/gkr732.
- Robin, J. et al (2016) Comparison of DNA quantification methods for Next Generation Sequencing. *Scientific Reports* 6: 24067, doi: 10.1038/srep24067.
- Roussel, J-M. et al (2015) The downside of eDNA as a survey tool in water bodies. *Journal of Applied Ecology* 52(4): 823-826, doi: 10.1111/1365-2664.12428.
- Roux, K. (2009) Optimization and troubleshooting in PCR. *Cold Spring Harb Protoc* 4(4): 1-6, doi: 10.1101/pdb.ip66.

- Rozen, S. och Skaletsky, H. (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 365-386.
- Ruxton, G. & Colegrave, N. (2002) *Experimental design for the life sciences*. Oxford University Press, ISBN: 0-19-925232-7, 114 s.
- Rådström, P. et al (2004) Pre-PCR Processing: Strategies to Generate PCR-Compatible Samples. *Molecular Biotechnology*, 26: 133-146.
- Saiki, R.K. et al (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239(4839): 487-49.
- SantaLucia, J (2007) Physical principles and visual-OMP software for optimal PCR design. *Methods Mol Biol.*; 402:3-34, doi: 10.1007/978-1-59745-528-2_1.
- Sato, H. et al (2017) Usefulness and limitations of sample pooling for environmental DNA metabarcoding of freshwater fish communities. *Scientific Reports* 7: 14860, doi: 10.1038/s41598-017-14978-6.
- Schmelze, M. et al (2016) Using occupancy modelling to compare environmental DNA to traditional field methods for regional-scale monitoring of an endangered aquatic species. *Molecular Ecology Resources*, doi: 10.1111/1755-0998.12501.
- Schmidt, B. R. et al (2013). Site occupancy models in the analysis of environmental DNA presence/absence surveys: A case study of an emerging amphibian pathogen. *Methods in Ecology and Evolution*, 4, 646–653, doi: 10.1111/2041-210X.12052
- Schrader, C. et al (2012) PCR inhibitors – occurrence, properties and removals. *Journal of Applied Microbiology* 113: 1014–1026, doi:10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x.
- SERS (2018) *Svenskt ElfiskeRegiSter*. Sveriges lantbruksuniversitet (SLU), Institutionen för akvatiska resurser. <http://www.slu.se/elfiskeregistret>.
- Seymour, M. et al (2018) Acidity promotes degradation of multi-species environmental DNA in lotic mesocosms. *Communications Biology* 1(4), doi:10.1038/s42003-017-0005-3.
- Shao, W. et al (2012) Characterization of effect of repeated freeze and thaw cycles on stability of genomic DNA using pulsed field gel electrophoresis. *Biopreservation and Biobanking*. 10(1): 4-11.
- Shaw, J. et al (2016) Comparison of environmental DNA metabarcoding and conventional fish survey methods in a river system. *Biological Conservation* 197: 131–138, doi: 10.1016/j.biocon.2016.03.010.
- Shelton, A.O. et al (2016) A framework for inferring biological communities from environmental DNA. *Ecol. Appl.* 26: 1645–1659, doi: 10.1890/15-1733.1.
- Shokralla, S. et al (2012) Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research. *Mol Ecol* 21:1794–1805. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05538.x.
- Sidstedt, M. et al (2015) Humic substances cause fluorescence inhibition in real-time PCR. *Analytical Biochemistry* 487: 30–37, doi: 10.1016/j.ab.2015.07.002.
- Sigsgaard, E.E. et al (2015) Monitoring the near-extinct European weather loach in Denmark based on environmental DNA from water samples. *Biological Conservation* 183: 46-52, doi: 10.1016/j.biocon.2014.11.023.
- Sigsgaard, E.E. et al (2016) Population characteristics of a large whale shark aggregation inferred from seawater environmental DNA. *Nature Ecology & Evolution* 1, 0004, doi: 10.1038/s41559-016-0004.
- Smart, A. et al (2015) eDNA sampling is more sensitive than a traditional survey technique for detecting an aquatic invader. *Ecol Appl.* 25(7): 1944-52.
- Smith, L. (2017) Seasonal comparison of environmental DNA and traditional sampling techniques for detecting coastal tailed frogs (*Ascaphus truei*) in Northern California. Theses and projects. 42. Humboldt University, <https://digitalcommons.humboldt.edu/etd/42>.

- Song, J. et al (2017) Making sense of the noise: The effect of hydrology on silver carp eDNA detection in the Chicago area waterway system. *Science of the Total Environment* 605–606: 713–720, doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.06.255.
- Soranno, P.A. et al (2015) It's good to share: why environmental scientists' ethics are out of date. *BioScience* 65: 69–73, doi: 10.1093/biosci/biu169.
- Sousa-Santos, C. et al (2016) Broad-scale sampling of primary freshwater fish populations reveals the role of intrinsic traits, inter-basin connectivity, drainage area and latitude on shaping contemporary patterns of genetic diversity. *PeerJ*. 4: e1694, doi: 10.7717/peerj.1694.
- Spens, J. et al (2016) Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution* 2016, doi: 10.1111/2041-210X.12683.
- Stoeckle, BC. et al (2015) Environmental DNA as a monitoring tool for the endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera L.*): a substitute for classical monitoring approaches? *Aquatic Conserv. Mar. Freshw. Ecosyst.* 26(6): 1120–1129, doi: 10.1002/aqc.2611.
- Stoeckle, BC. et al (2017a) A systematic approach to evaluate the influence of environmental conditions on eDNA detection success in aquatic ecosystems. *PLoS ONE* 12(12): e0189119, doi: 10.1371/journal.pone.0189119.
- Stoeckle, M. et al (2017b) Aquatic environmental DNA detects seasonal fish abundance and habitat preference in an urban estuary. *PLoS ONE* 12(4): e0175186, doi: 10.1371/journal.pone.0175186.
- Strand, D. et al (2014) Detection of crayfish plague spores in large freshwater systems. *Journal of Applied Ecology* 51: 544–553, doi: 10.1111/1365-2664.12218.
- Strickler, K. et al (2015) Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation* 183: 85–92, doi: 10.1016/j.biocon.2014.11.038.
- Strobel, B. et al (2017) Exploring the Use of Environmental DNA to Determine the Species of Salmon Redds. *North American Journal of Fisheries Management* 37:943–950, doi: 10.1080/02755947.2017.1335254.
- Sundberg, P. et al (2018a) *Test av eDNA och ddPCR som metod för att upptäcka/övervaka invasiva främmande arter (IAS): svartmunnad smörbult och blåskrabba*. Göteborgs universitet, på uppdrag från Havs och vattenmyndigheten (Dnr 3574-16).
- Sundberg, P. et al (2018b) *Utvärdering av DNA-streckkodning och referensbibliotek för övervakning av invasiva främmande arter*. SeAnalytics. Uppdrag från Havs- och vattenmyndigheten (dnr 2440-15). 23 s.
- Sutherland, WJ. et al (2013) A horizon scan of global conservation issues for 2013. *Trends in Ecology & Evolution* 28:16–22.
- Taberlet, P. et al (2007) Power and limitations of the chloroplast trnL (UAA) intron for plant DNA barcoding. *Nucleic Acids Res.* 35, e14.
- Taberlet, P. et al (2012) Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21: 1789–1793.
- Taberlet, P. et al (2018) *Environmental DNA for biodiversity and monitoring*. Oxford university press ISBN: 978-0-19-876722-0. 253 s.
- Takahara, T. et al (2012) Estimation of Fish Biomass Using Environmental DNA. *PLoS ONE* 7(4): e35868, doi:10.1371/journal.pone.0035868
- Takahara, T. et al (2013) Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PLoS One* 8, e56584, doi: 10.1371/journal.pone.0056584.
- Takahara, T. et al (2015) Effects of sample processing on the detection rate of environmental DNA from the Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Biol. Conserv.* 183, 64–69.
- The Academy of Medical Sciences (2015) *Reproducibility and reliability of biomedical research: improving research practice* Symposium report, October 2015, 80 s. <https://acmedsci.ac.uk/file-download/38190-56314fa158e14.pdf>

- Thomas, A. et al (2016) Quantitative DNA metabarcoding: improved estimates of species proportional biomass using correction factors derived from control material. *Molecular Ecology Resources* 16: 714–726, doi: 10.1111/1755-0998.12490.
- Thomas, A. et al (2018) ANDe - A fully integrated environmental DNA sampling system. *Methods Ecol Evol.* 2018; 1–7, doi: 10.1111/2041-210X.12994.
- Thomsen, P.F. et al (2012a). Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS ONE* 7, e41732. doi: 10.1371/journal.pone.0041732.
- Thomsen, P.F. et al (2012b). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Mol. Ecol.* 21: 2565–2573, doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x.
- Thomsen, P.F. & Willerslev, E. (2015) Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity, *Biological Conservation*. 183: 4-18, doi: 10.1016/j.biocon.2014.11.019.
- Thomsen P.F. et al (2016) Environmental DNA from Seawater Samples Correlate with Trawl Catches of Subarctic, Deepwater Fishes. *PLoS ONE* 11(11), doi:10.1371/journal.pone.0165252.
- Tillotson MD. et al (2018) Concentrations of environmental DNA (eDNA) reflect spawning salmon abundance at fine spatial and temporal scales. *Biological Conservation* 220: 1–11, doi: 10.1016/j.biocon.2018.01.030.
- Trebitz, A.S. et al (2017) Optimizing surveillance, incorporating advanced technologies, and identifying research needs. *Journal of Environmental Management* 202: 299e310, doi: 10.1016/j.jenvman.2017.07.045.
- Tréguier, A. et al (2014) Environmental DNA surveillance for invertebrate species: advantages and technical limitations to detect invasive crayfish *Procambarus clarkii* in freshwater ponds. *Journal of Applied Ecology* 51: 871–879, doi: 10.1111/1365-2664.12262.
- Tucker, A.J. et al (2016) A sensitive environmental DNA (eDNA) assay leads to new insights on Ruffe (*Gymnocephalus cernua*) spread in North America. *Biol Invasions* 18:3205–3222, doi: 10.1007/s10530-016-1209-z.
- Tumdedo, M. E. et al (2010) Dynamics of Humic Substance in Bolmen Lake, Sweden. *Master project TVVR 10/5015*, 69 s.
- Turner, C.R. et al (2012) *Evaluating environmental DNA detection along-side standard fish sampling in Great Lakes coastal wetland monitoring* (Seed Project). Final technical report.
- Turner, C.R. et al (2014) Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods in Ecology and Evolution* 5: 676–684, doi: 10.1111/2041-210X.12206.
- Turner, C.R. et al (2015) Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biological Conservation* 183: 93–102, doi: 10.1016/j.biocon.2014.11.017.
- Ulibarri, R. et al (2017) Comparing Efficiency of American Fisheries Society Standard Snorkeling Techniques to Environmental DNA Sampling Techniques, *North American Journal of Fisheries Management*, 37:3, 644–651, doi: 10.1080/02755947.2017.1306005.
- USFWS, United States Fisheries and Wildlife Services (2017) *Quality assurance project plan – eDNA monitoring of bighead and silver carps*, 183 s. <https://www.fws.gov/midwest/fisheries/eDNA/documents/QAPP.pdf>.
- Ushio, M. et al (2018) Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing. *Metabarcoding and Metagenomics* 2: e23297, doi: 10.3897/mbmg.2.23297.
- Valentini, A. et al (2009) DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution* 24(2): 110–117, doi: 10.1016/j.tree.2008.09.011.
- Valentini, A. et al (2016) Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology* 25: 929–942, doi: 10.1111/mec.13428.

- Van Dijk, E.L. et al (2014) Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends in Genetics* 30: 418–426, doi: 10.1016/j.tig.2014.07.00.
- Van Rooij, P. et al (2017) Efficacy of chemical disinfectants for the containment of the salamander chytrid fungus *Batrachochytrium salamandrivorans*. *PLoS One* 12(10):e0186269, doi: 10.1371/journal.pone.0186269.
- Wittwer, C. et al (2017) eDNA-based crayfish plague monitoring is superior to conventional trap-based assessments in year-round detection probability. *Hydrobiologia* 807(1): 87–97, doi: 10.1007/s10750-017-3408-8.
- Vrålstad, T. et al (2018) The surveillance programme for *Aphanomyces astaci* in Norway 2017. Norwegian *Veterinary Institute annual report*, 18 s.
- Weigand, A. et al (2017) DNAqua-Net: Advancing Methods, Connecting Communities and Envisaging Standards. *Biodiversity Information Science and Standards* 1, e20310, doi: 10.3897/tdwgproceedings.1.20310.
- Wilcox, T.M. et al (2013) Robust Detection of Rare Species Using Environmental DNA: The Importance of Primer Specificity. *PLoS ONE* 8(3): e59520, doi:10.1371/journal.pone.0059520
- Wilcox, T.M. et al (2014) A blocking primer increases specificity in environmental DNA detection of bull trout (*Salvelinus confluentus*). *Conservation Genet. Resour.* 6:283–284, doi: 10.1007/s12686-013-0113-4.
- Wilcox, T.M. et al (2016) Understanding eDNA detection probabilities: A case study using a stream-dwelling char *Salvelinus fontinalis*. *Biological Conservation* 194: 209–216.
- Wilcox, T.M. et al (2018) Comment: The Importance of Sound Methodology in Environmental DNA Sampling. *North American Journal of Fisheries Management*, Februari, doi: 10.1002/nafm.10055.
- Willerslev, E. et al (2003) Diverse plant and animal genetic records from holocene and pleistocene sediments. *Science* 300(5620): 791–795, doi: 10.1126/science.1084114
- Woessner, W. (2007) Building a compact, low-cost, and portable peristaltic sampling pump. *Ground Water* 45(6): 795–797, doi: 10.1111/j.1745-6584.2007.00346.x.
- Yamamoto, S. et al (2016) Environmental DNA as a ‘Snapshot’ of Fish Distribution: A Case Study of Japanese Jack Mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan. *PLoS ONE* 11(3): e0149786, doi: 10.1371/journal.pone.
- Yamanaka, H. & Minamoto, T. (2016) The use of environmental DNA of fishes as an efficient method of determining habitat connectivity. *Ecological Indicators* 62: 147–153, doi: 10.1016/j.ecolind.2015.11.022.
- Yoccoz, N. (2012) The future of environmental DNA in ecology. *Molecular Ecology* 21(8): 2031–2038, doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05505.x.
- Zipper, H. et al (2003) Mechanisms underlying the impact of humic acids on DNA quantification by SYBR Green I and consequences for the analysis of soils and aquatic sediments. *Nucleic Acids Research*, 31:7 e39, doi: 10.1093/nar/gng039.
- Zymo research (2018) *OneStep™ PCR Inhibitor Removal Kit. Product information*. Cat. No. D6030 (50 spin columns/purifications).

Tack

Tack till granskarna Ann-Britt Florin och Kerstin Holmgren, SLU Aqua. Tack även Karl Lundström (SLU Aqua), Åke Olson (UMBLA), Maria Kahlert (IVM/SLU), Per Sundberg (SeAnalytics/Göteborgs universitet) och Niclas Gyllenstrand (CGI) för diskussioner och värdefulla kommentarer. Tack alla på SLU Aqua, IVM, Art-DataBanken och Institutionen för skoglig mykologi och växtpatologi som har varit rådgivande i arbetet (Malin Strand, Hanna Friberg, Stina Drakare, Erik Degerman, Erik Petersson, Linda Söderbäck). Tack till personalen på CGI/NRM och speciellt till Niclas Gyllenstrand och Rodrigo Esparza-Salas för allt laborativt arbete, samt diskussioner om (och tester av) förbättrade protokoll. Tack till markvattenägarna som underlättat fältarbetet och till Tyresta naturvårdare för deras hjälpsamhet i fält (2014-2016). Tack till Forska utan djurförsök som bidrog med medel under 2016. Tack Pierre Taberlet, (CNRS & University of Grenoble-Alpes) för konstruktiva diskussioner. Tack Olga Vinnere Pettersson på SciLife Lab för diskussioner om analysprocesser. Tack Jürgen Geist (Technische Universitaet i München), Florian Leese (University of Duisburg-Essen) och Jelger Herder (RAVON i Holland) om strategier för att hantera studier med låg vetenskaplig kvalitet. Tack Robert Hanner (Guelph University i Canada) för barcoding-diskussioner.

