



Uppföljning av vattendragsåtgärder med eDNA

Förekomst av fisk och flodpärlmussla i Jämtland

Juli 2025



Författarna har hela ansvaret för innehållet i denna rapport. Innehållet ska inte tolkas som Europeiska unionens eller EU-kommissionens officiella ståndpunkt.

The authors have full responsibility for the content of this report. The content should not be interpreted as the official view of the European Commission or the European Union.

ISBN

978-91-990395-2-7

GRIP on LIFE's rapportserie

2025.02

Författare

Micaela Hellström, Viktor Birgersson,
Patrick Hernvall, Håkan Söderberg, Martin Österling

Beställare

Länsstyrelsen i Jämtlands län

Projektledare

Micaela Hellström, Martin Österling

Projektgrupp

Micaela Hellström, Martin Österling,
Håkan Söderberg, Elin Götzmann

Omslag

Vattenfiltrering i fält.
Foto: Elin Götzmann

Diarienummer hos Länsstyrelsen i Jämtlands län

2233-2025



Med bidrag från Europeiska unionens LIFE-program

Innehåll

Uppföljning av vattendragsåtgärder med eDNA	1
Förord	5
Sammanfattning	6
Summary	8
Inledning	10
Deluppdrag 1 – Uppföljning av restaureringsåtgärder med eDNA	12
Bakgrund	12
Metoder	12
Fältarbete	12
Laboratoriearbete	14
Resultat	15
Diskussion	17
Deluppdrag 2 – Avstånd och populationsstorlekens påverkan på eDNA-signal från flodpärlmussla i rinnande vatten	19
Bakgrund	19
Metoder	19
Fältarbete och experimentdesign	19
Laboratoriearbete	21
Resultat	21
Diskussion	22
Deluppdrag 3 – Detektion av olika flodpärlmusselpopulationer med eDNA-metoder	24
Bakgrund	24
Metoder	24
Slutsats och rekommendation	26
Tack	27
Litteratur/källförteckning	28
Bilaga 1. Vad menas med en- och flerartsanalyser?	30
Enartsanalyser – qPCR	30
Flerartsstudier – metastreckkodning	30
Bilaga 2. Laboratorieanalyser	31
Extraktion	31

Enartsanalys – qPCR	31
Flerartsanalyser	31
Bioinformatik och verifiering	31
Referenser	32
Bilaga 3. Kvalitetssäkring av DNA-kontroller	33
Positiva och negativa kontrollprov	33
Referenser	33
Bilaga 4. Kvalitetskontroller som redovisas	35
Bilaga 5. Fältprotokoll, flodpärlmussla detektionsavstånd	36
Bilaga 6. qPCR-resultat, flodpärlmussla detektionsavstånd	37

Förord

eDNA GRIP är ett samverkans- och utvecklingsprojekt inom Grip on Life IP och involverade Länsstyrelsen i Jämtland, Länsstyrelsen i Västernorrland, Karlstads universitet och MIX Research Sweden AB.

Projektet inkluderade uppföljning av restaurerings- och utsättningsåtgärder med fokus på öring och flodpärlmussla som utförts av Länsstyrelsen i Jämtland och av det EU-finansierade projektet Life Triple Lakes som pågick 2016–2019.

Förekomst av fisk-, däggdjurs- och groddjursarter inventerades med eDNA flerartsanalyser och förekomst av flodpärlmussla med enartsanalyser.

Projektet undersökte även hur långt eDNA-signalen från flodpärlmussla kan detekteras då musslor förekommer i olika mängder.

Forskningsdelen i detta projekt som i skrivande stund fortfarande pågår (augusti 2025) syftar till att ta reda på, inte bara om flodpärlmusslor (FPM) är närvarande, men också om det är möjligt att från vattenprover med eDNA-analyser avgöra hur de är besläktade med varandra.

Fältarbetet utfördes under sommaren 2022 och 2023.

Syftet var att utveckla och använda praktiskt tillämpbara eDNA-metoder för myndigheternas förvaltnings- och åtgärdsarbete av fisk, däggdjur, groddjur, musslor och annan bottenfauna, särskilt inom de naturtyper som definieras som *Mindre vattendrag* (3260) och *Större vattendrag* (3210) enligt EU:s habitatdirektiv.

Uppsala, juli 2025

Micaela Hellström
VD, MIX Research Sweden AB

Sammanfattning

Miljö-DNA (environmental DNA, eDNA) är en metod för att identifiera genetiska spår som organismer lämnar efter sig i sin omgivning genom avföring, sekret, hudceller och andra biologiska rester. Så länge en art är närvarande i ett ekosystem avger den DNA i miljön. Genom att samla in och filtrera ett fåtal liter vatten kan celler och genetiskt material från fiskar, groddjur, musslor och andra akvatiska organismer isoleras och analyseras. Denna metod möjliggör artbestämning genom genetiska analyser och används alltmer inom miljöövervakning för att identifiera biodiversitet i sjöar, vattendrag och andra akvatiska miljöer. En fördel med eDNA-baserad övervakning är att den är icke-skadlig eller dödlig, då ingen fysisk hantering av organismer krävs för identifiering.

Projektet eDNA GRIP genomfördes som ett samverkans- och utvecklingsprojekt inom Grip on Life IP och involverade Länsstyrelsen i Jämtland, Länsstyrelsen i Västernorrland, Karlstads universitet och MIX Research Sweden AB. Syftet var att utveckla praktiskt tillämpbara metoder för myndigheternas förvaltnings- och åtgärdsarbete av fisk, däggdjur, groddjur, musslor och annan bottenfauna, särskilt inom de naturtyper som definieras som *Mindre vattendrag (3260)* och *Större vattendrag (3210)* enligt EU:s habitatdirektiv.

Projektet inkluderade även uppföljning av genomförda åtgärder inom det EU-finansierade projektet Life Triple Lakes (2016–2019) som syftade till att restaurera vattendrag och förbättra livsmiljöer för öring (*Salmo trutta*) och den starkt hotade flodpärlmusslan (*Margaritifera margaritifera*).

Deluppdrag 1 följde upp de åtgärder som omfattades av projektet Life Triple Lakes. Uppföljningen bestod av eDNA-analyser av fisk, groddjur, däggdjur, flodpärlmusslor och andra bottenlevande organismer vid tolv lokaler kring sjöarna Locknesjön, Näkten och Revsundssjön. Totalt detekterades tolv fiskarter, två groddjursarter och fem däggdjursarter genom flerartsanalyser. Öring och flodpärlmussla detekterades på elva respektive nio lokaler. Analyserna för bottenlevande ryggradslösa djur pågår och väntas vara klara senast november 2025.

Deluppdrag 2 syftade till att undersöka hur långt nedströms från en musselpopulation som eDNA från flodpärlmussla kan detekteras och hur populationsstorleken påverkar signalstyrkan. För att studera detta placerades musslor ut i olika antal i en å utan tidigare förekomst. Resultaten visade att fem musslor registrerades på gränsen till detektion på 30 meters avstånd, 50 musslor kunde detekteras över en kilometer nedströms och att 500 musslor kunde detekteras nära två kilometer nedströms. Dessa resultat visar att eDNA-metoden är känslig och kan användas för att detektera flodpärlmusslor även vid låga populationstätheter.

Deluppdrag 3, pågår och väntas vara avslutat i november 2025. Deluppdrag 3 undersöker möjligheten att inte bara fastställa närvaro av flodpärlmusslor genom eDNA, utan även analysera deras genetiska släktskap. Detta genomförs med samma metoder som används vid faderskapsanalyser, där specifika genetiska markörer används för att identifiera släktskapsförhållanden mellan individer. Om metoden visar sig fungera väl kan den bli ett värdefullt verktyg för framtida bevarandeåtgärder

och populationsförvaltning av flodpärlmusslor. Deluppdrag 3 avslutas i november 2025.

Projektet bekräftar att eDNA kan utgöra en praktiskt tillämpbar metod i myndigheternas förvaltnings- och åtgärdsarbete inom EU:s habitatdirektiv. Metoden möjliggör effektiv kartläggning av biodiversitet i dessa ekosystem och har särskilt visat sig värdefull för att detektera hotade arter såsom flodpärlmussla, även vid låga populationstätheter.

Resultaten erbjuder riktlinjer för hur eDNA kan integreras i miljöövervakning och stärker därmed underlaget för myndigheternas fortsatta arbete med bevarande och restaurering av akvatiska ekosystem. Projektet har även fungerat som en viktig uppföljning av Life Triple Lakes och har bidragit med ny kunskap om restaureringsinsatsernas effekt på biologisk mångfald, särskilt för öring och flodpärlmusslor i de undersökta vattendragen i Jämtlands län. Resultaten från projektet kan således bidra till att förbättra framtida restaureringsstrategier och stärka arbetet med att bevara akvatiska arter och deras livsmiljöer på både lokal och regional nivå.

Summary

Environmental DNA (eDNA) is a method for identifying genetic traces that organisms leave behind in their environment by feces, secretions, skin cells, and other biological residues. If a species is present in an ecosystem, it releases DNA into the environment. By collecting and filtering a few liters of water, cells and genetic material from fish, amphibians, mussels, and other aquatic organisms can be isolated and analyzed. This method enables species identification through genetic analyses and is increasingly used in environmental monitoring to assess biodiversity in lakes, streams, and other aquatic environments. An advantage of eDNA-based monitoring is that it is non-intrusive and non-lethal, as no physical handling of organisms is required for identification.

The eDNA GRIP project is a collaborative species inventory and research project within Grip on Life IP. The partners involved were the County Administrative Board of Jämtland, the County Administrative Board of Västernorrland, Karlstad University, and MIX Research Sweden AB. The aim was to develop applicable eDNA methods for governmental conservation and management efforts targeting fish, mammals, amphibians, mussels, and other benthic fauna, particularly within the habitat types defined as *Small Watercourses* (3260) and *Large Watercourses* (3210) under the EU Habitats Directive.

The project also included follow-up monitoring of watercourse restoration measures implemented within the EU-funded project Life Triple Lakes, to improve habitats for brown trout (*Salmo trutta*) and the critically endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*).

The project was divided into three work packages (WP 1, WP 2 and WP 3)

WP1 was a follow-up project assessing the success of measures implemented within the Life Triple Lakes project and similar measures on additional localities by the County Administrative Board of Jämtland. The follow-up included multispecies eDNA analyses of fish, amphibians and mammals, and single species analyses of freshwater pearl mussels at twelve sites around the lakes Locknesjön, Näkten, and Revsundssjön. A total of twelve fish species, two amphibian species, and five mammal species were detected using multi-species analyses. Brown trout and freshwater pearl mussel were detected at eleven and nine sites, respectively. Analyses of the benthic communities are ongoing and will be completed in November 2025.

WP 2 aimed to investigate how far downstream eDNA signals from freshwater pearl mussels travel in the water from the source population. The survey also examined how population size (number of mussels) affects signal strength. Pearl mussels were introduced into a stream with no previous occurrence of the species. The results showed that 5 mussels were on the limit of detection 30 m from the source. 50 mussels were detected from the source and up to one kilometer downstream from the population, while 500 mussels were detected close to two kilometers downstream. These results indicate that the eDNA method is sensitive and can be used to detect freshwater pearl mussels even at low population densities.

WP 3, which is still ongoing, explores the possibility of not only determining the presence of freshwater pearl mussels using eDNA, but also analyzing their genetic relationships. The methods used are similar as the ones for paternity analyses where specific genetic markers are used to identify kinship between individuals. If the method proves effective, it could become a valuable tool for future conservation efforts and population management of freshwater pearl mussels.

The project confirms that eDNA can be an applicable method in governmental conservation and management efforts within the EU Habitats and EU Water Directives. The method enables efficient biodiversity assessments in these ecosystems and has proven particularly valuable for detecting endangered species such as the freshwater pearl mussel, even at low population densities.

The results provide guidelines for how eDNA can continue to be integrated into environmental monitoring and thereby strengthen the foundation for continued governmental efforts in the conservation and restoration of aquatic ecosystems. The project also served as an important follow-up to Life Triple Lakes and has contributed new knowledge about the effects of restoration efforts on biodiversity, particularly for trout and freshwater pearl mussels in the studied watercourses in Jämtland County.

The results from the project will contribute to improved and more efficient follow-up on restoration strategies on a geographical scale that has previously not been possible. The results from the project confirm strengthening efforts to preserve aquatic species and their habitats at both local and regional levels.

Inledning

Miljö-DNA eller eDNA (environmental DNA) är samlingsnamnet för de genetiska spår som alla levande organismer lämnar efter sig i miljön i form av bland annat avföring, sekret och hudceller (Taberlet m.fl. 2012, Pedersen m.fl. 2015). Då genetiska analyser har utvecklats mycket under de senaste decennierna är det fullt möjligt att genom miljöprover analysera dessa spår och med precisa metoder identifiera de arter som finns i en given miljö. Metoden är välutvecklad i vattenmiljöer och har visat sig vara användbar som ett verktyg inom miljöövervakning (Leese m.fl. 2016, Bruce m.fl. 2023, Hellström m.fl. 2023). Då eDNA är relativt kortlivat i vattenmassan (maximalt cirka två veckor beroende på yttre faktorer) erhålls en bild av arters förekomst i nutid (Brys m.fl. 2021). Vidare är metoden icke-destruktiv, vilket gör den idealisk för undersökningar av biologisk mångfald, och hotade arter i synnerhet.

För att skapa en större konsensus kring metoder mellan forskargrupper och säkerställa att data från olika undersökningar är jämförbara bildades EU-konsortiet DNAqua-Net 2016 (Leese m.fl. 2016). Konsortiet fokuserade på att utveckla standardiserade metoder för inventering av sjöar och vattendrag i enlighet med EU:s Ramdirektiv för vatten (WFD, 2000/60/EC) och Ramdirektiv om en marin strategi (MSFD, 2008/56/EC). Detta arbete bidrog till att standardiserade provtagningsprotokoll godkändes 2023 (CEN 2023) och till att en handbok för eDNA inom miljöövervakning publicerades 2021 (Bruce m.fl. 2021).

Användningen av eDNA som ett verktyg inom miljöövervakning, i kombination med traditionella metoder, skapar nya möjligheter att samla in prover över stora geografiska områden på kort tid. Detta är särskilt relevant i ett land som Sverige, med över 100 000 sjöar och korta provtagningssäsonger. Metoden möjliggör effektiv kartläggning av biologisk mångfald samt identifiering av både sällsynta och potentiellt skadliga arter. Samtidigt är det avgörande att förstå både metodens styrkor och dess begränsningar för att säkerställa korrekta och tillförlitliga resultat.

eDNA GRIP genomfördes som ett samverkans- och utvecklingsprojekt inom GRIP on Life IP och involverade Länsstyrelsen i Jämtland, Länsstyrelsen i Västernorrland, Karlstads universitet och MIX Research Sweden AB. Syftet var att utveckla praktiskt tillämpbara metoder för myndigheternas förvaltnings- och åtgärdsarbete av fisk, däggdjur, groddjur, musslor och annan bottenfauna, särskilt inom de naturtyper som definieras som *Mindre vattendrag* (3260) och *Större vattendrag* (3210) enligt EU:s habitatdirektiv. Inom projektet inkluderades även uppföljning av det EU-finansierade projektet Life Triple Lakes (2016 – 2019) hade som syfte att restaurera vattendrag och förbättra livsmiljöer för öring och flodpärlmussla i tre vattenområden i Jämtlands län.

Inom **deluppdrag 1**, som utgör en del av uppföljningen av de åtgärder som genomförts av länsstyrelsen i Jämtlands län och därtill åtgärder som genomfördes inom projekt Life Triple Lakes. Närvaro av fisk-, groddjurs- och däggdjurssamhällen, flodpärlmusslor och andra bottenlevande arter analyserades med eDNA från vattenprover.

Deluppgdrag 2 syftade till att undersöka hur långt nedströms från en musselpopulation eDNA-sigener kan detekteras och hur populationsstorleken påverkar signalstyrkan. För att studera detta placerades flodpärlmusslor ut i olika antal i en å utan tidigare förekomst.

Deluppgdrag 3 förväntas ge resultat i november 2025. Uppdraget undersöker, möjligheten att inte bara fastställa närvaro av flodpärlmusslor genom eDNA, utan även analysera deras genetiska släktskap. Detta genomförs med samma metoder som används vid faderskapsanalyser, där specifika genetiska markörer används för att identifiera släktskapsförhållanden mellan individer. Om metoden visar sig fungera väl kan den bli ett värdefullt verktyg för framtida bevarandeåtgärder och populationsförvaltning.

Deluppdrag 1 – Uppföljning av restaureringsåtgärder med eDNA

Bakgrund

Det EU-finansierade projektet EU Life Triple Lakes pågick mellan 2014 och 2019 och omfattade ett flertal vattenrestaureringsåtgärder inom vattenområdena Näkten, Locknesjön och Revsundssjön. Syftet var förbättra livsmiljöerna, med särskilt fokus på öring och flodpärlmussla. Parallellt har Länsstyrelsen i Jämtland genomfört flera restaureringsåtgärder för att skapa gynnsamma förhållanden för fisk med fokus på öring, samt för att återetablera flodpärlmussla i områden där den har försvunnit (Tabell 1).

Inom ramen för detta uppdrag undersöktes förekomsten av fisk, flodpärlmussla, groddjur, och däggdjur vid tolv lokaler i Jämtlands län med hjälp av eDNA-baserad provtagning. Uppföljning av vattenrestaureringsåtgärderna genomfördes genom flerartsanalyser av fisk, groddjur och däggdjur, medan specifika enartsanalyser användes för flodpärlmussla.

Tabell 1. Vattenrestaureringsåtgärder samt utsättning av öring och flodpärlmussla (FPM).
Art = målart, # Uts = antal utsatta individer, Uts år = årtal för utsättning, Inv år = inventeringsårtal,
Källa = moderpopulation.

Vattensystem	Namn	Art	# Uts	Uts år	Källa	Åtgärder
Näkten	Råssjöån	FPM				Vattendragsrestaurering och dammutrivning, 2019.
Näkten	Strulån	FPM	>1000	Troligen 2008	Råssjöån	Vattendragsrestaurering, 2015. Lekgrusutläggning, 2016.
Näkten	Mellansjöån	FPM	1000	2017	Råssjöån	Vattendragsrestaurering och lekgrusutläggning, 2016.
Näkten	Bjännviksbäcken	Öring/FPM	100, 0+	2018	FPM/Råssjöån	2018, öring fångades in, infekterades i Råssjöån och återintroducerades.
Gimån	Sösjöbäcken	FPM	800	2017	Räggån	Konnektivitetsåtgärder vid trumma, 2015.
Gimån	Märlån	FPM	500	2017	Räggån	Manuellt restaurerad, 2017.
Gimån	Lönningån	FPM	1000	2017	Räggån	Manuellt restaurerad uppströms FPM förekomst, 2017.

Metoder

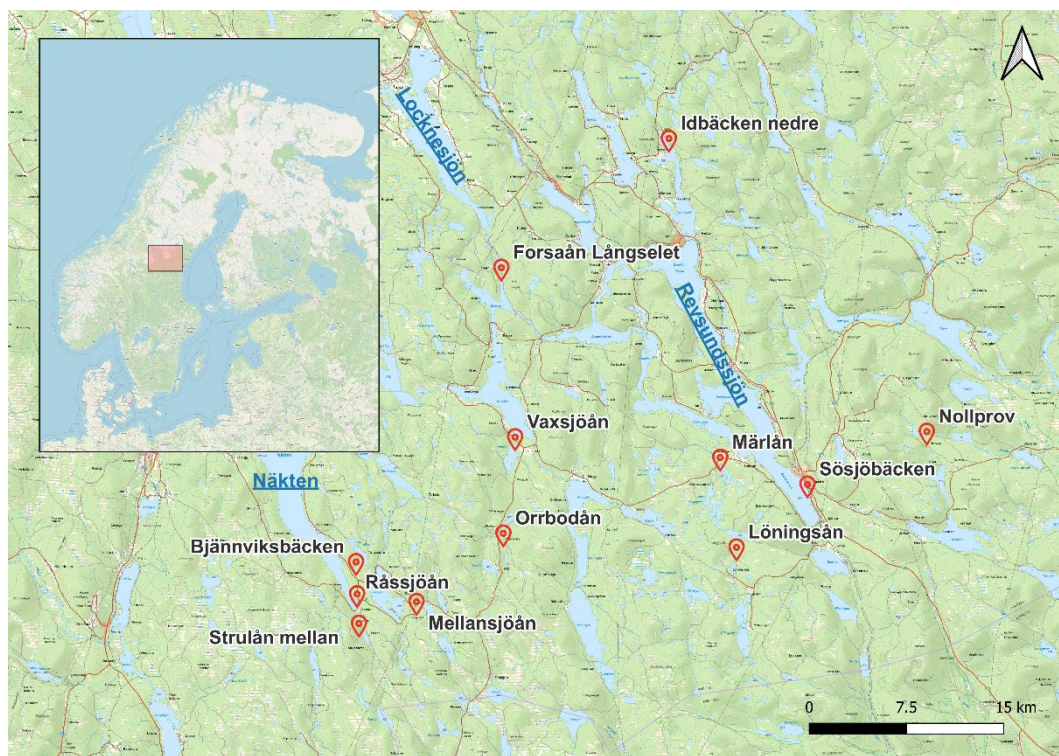
Fältharbete

Fältharbetet utfördes 6–9 juni 2023 på lokalerna som beskrivs Figur 1 och Tabell 2. Innan eDNA-provtagningen och mellan lokalerna steriliserades provtagningsutrustning med Virkon R (Virkon, UK). Filtreringsutrustning köptes in

som sterila och DNA-fria produkter. För varje prov samlades fem liter vatten in i form av tio delprover längs 100–500 meter långa transekter som slogs ihop till ett samlingsprov för ett representativt resultat (Harper m.fl. 2018 a; b, Bruce m.fl. 2021, Hellström m.fl. 2023). Provtagningen följde CEN-standarden för insamling av vatten för eDNA analyser (CEN 2023).

För varje prov filtrerades 2 500 ml vatten med en peristaltisk fältpump (Burkle GMBH) genom 4 µm GF/0,8 µm PES-inkapslade filterenheter (Sterlitech, US). Filtren tömdes på vatten och fixerades i fält med 96 % Molekylär Grad 200 proof etanol (ThermoFisher Scientific, UK) innan de transporterades till MIX Research Swedens (MIX) laboratorier för vidare analyser. Volym av insamlat vatten, vatten- och lufttemperatur, samt GPS-koordinater registrerades.

Positiva och negativa laboratoriekontroller, samt negativa filterkontroller i fält beskrivs i Bilaga 3.



Figur 1. Lokaler som inkluderades i den uppföljande eDNA-provtagningen.

Tabell 2. Provtagna lokaler och fältdata.

Lokal	Prov ID	Datum	Tid	Volym (ml)	Luft °C	Vatten °C	Djup	SWEREF 99 N	SWEREF 99 E
Nollprov, Angelån	GR1_00	2023-06-06	16:20	2500	15	13	0-0,4 m	6961073	531399
Råssjöån	GR1_01	2023-06-06	11:30	2500	17	11	0-0,2 m	6948656	486983
Bjännviksbäcken	GR1_02	2023-06-07	12:40	2500	17	13	0-0,2 m	6951173	486915
Strulån mellan	GR1_03	2023-06-07	13:20	2100	17	13	0-0,2 m	6946431	487102
Mellansjöån	GR1_04	2023-06-07	13:45	2500	17	13	0-0,3 m	6948069	491587
Sösjöbäcken	GR1_05	2023-06-07	15:15	2500	15	13	0-0,3 m	6957117	521717
Märlån	GR1_06	2023-06-07	17:00	2500	16	13	0-0,5 m	6959246	514965
Löningsån	GR1_07	2023-06-07	16:30	2500	16	13	0-0,5 m	6952455	516236
Ildbäcken nedre	GrS_04	2023-06-08	10:40	2500	16	12	0-0,5 m	6983819	511053
Vaxsjöån	GrS_05	2023-06-07	15:30	2500	16	12	0-0,5 m	6960716	499273
Orrbodån	GrS_06	2023-06-07	14:40	2000	17	13	0-0,3 m	6953341	498281
Forsaån Långselet	GrS_08	2023-06-08	12:00	2000	15	13	0-0,3 m	6973888	498098

Laboratoriearbete

Enartsanalyser

Förekomst av flodpärlmussla undersöktes genom qPCR-analys. Varje prov analyserades i sex tekniska replikat för att öka tillförlitligheten av detektionsresultaten.

För att säkerställa specifik detektion och undvika förväxling med närbesläktade arter användes en artspecifik TaqMan-probe (sökfragment) som designades för att hybridisera mot en unik sekvens inom målregionen. Användning av TaqMan-sökfragment undviker i detta fall förväxling med allmän dammussla (*Anodonta anatina*). Bilaga 2 beskriver TaqMan metoden.

För kvantifiering och verifiering av amplifikationen konstruerades standardkurvor genom successiv spädning av vävnads-DNA, med spädningsfaktorer från 1:1 till 1:100 000. DNA-koncentrationen av spädningarna kvantifierades kort före analys och analyserades i tre replikat, tillsammans med positiva och negativa kontroller. Standardkurvan anger även gränsvärden för detektion. Metodbeskrivning för PCR anges i Bilaga 1 och Bilaga 2. Positiva och negativa kontroller beskrivs i Bilaga 3.

Flerartsanalyser

Insamlat eDNA extraherades enligt protokoll från Spens m.fl. (2017) i MIX-laboratorier specifikt utformade för analyser av eDNA. Fiskar, däggdjur och groddjur analyserades med två olika markörgrupper (fyra markörer för fisk och en markör för vertebrater). Metodbeskrivning för PCR och genetiska bibliotek anges i Bilaga 1 och Bilaga 2. Bilaga 3 och 4 anger nödvändiga kontroller och skallkrav.

Analys av bentiska organismer pågår och förväntas avslutas i november 2025.

Resultat

Enartsanalyser av flodpärlmussla visade förekomst på nio av tolv lokaler (Tabell 3). Råssjöån, Strulån och Sösjöbäcken gav positivt utslag för 6/6 replikat. Bjännaviksbacken, Mellansjöån, Märån, Löningsån, Idbäcken nedre samt Forsaån-Långelet visade positiv detektion i 1/6 replikat. Angelån, Vaxsjöån och Orrbodaån visade ingen detektion. Alla positiva fält och laboratoriekontroller var positiva och negativa kontroller negativa.

Tabell 3. qPCR resultat. Tabellen visar antal positiva replikat av 6 (n/6). # FPM uts. = antal utsatta flodpärlmusslor.

Lokalnamn	qPCR positiva n/6	# FPM uts	Utsättning år
Nollprov, Angelån	0/6		
Råssjöån	6/6		
Bjännaviksbacken	1/6	100 st infekterade 0+ öring	2018
Strulån mellan	6/6	>1000	Troligen 2008
Mellansjöån	1/6	1000	2017
Sösjöbäcken	6/6	800	2017
Märån	1/6	500	2017
Löningsån	1/6	1000	2017
Idbäcken nedre	1/6		
Vaxsjöån	0/6		
Orrbodaån	0/6		
Forsaån Långelet	1/6		

Flerartsanalyserna detekterade totalt tolv fiskarter, två groddjursarter och fem däggdjursarter (Tabell 4).

Fiskarter som identifierades var öring (*Salmo trutta*), harr (*Thymallus thymallus*), abborre (*Perca fluviatilis*), elritsa (*Phoxinus phoxinus*), gädda (*Esox lucius*), mört (*Rutilus rutilus*), lake (*Lota lota*), benlöja (*Alburnus alburnus*), bergsimpa (*Cottus poecilopus*), stensimpa (*Cottus gobio*) och id (*Leuciscus idus*). Id och stäm (*Leuciscus leuciscus*) som har snarlika sekvenser kunde differentieras genom analys med vertebratmarkören.

Groddjur som förekom i undersökningen var vanlig padda (*Bufo bufo*) och vanlig groda (*Rana temporaria*). Däggdjur som vistats i anslutning till de provtagna lokalerna var bland annat uter (*Lutra lutra*), bäver (*Castor fiber*), kronhjort (*Cervus elaphus*) och älg (*Alces alces*).

Tabell 4. Arternas förekomst över lokalerna.

Lokalnamn	0 Angelån	Råssjön	Bjännviksbäcken	Strulån	Mellansjön	Sösjöbäcken	Märlån	Löningsån	Idbäcken nedre	Vaxsjön	Orrbodån	Forsaån Långelet
Flodpärlmussla		X	X	X	X	X	X	X	X			X
Benlöja								X				
Id										X	X	
Mört	X			X			X	X	X	X	X	X
Elritsa	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Gädda	X	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X
Lake	X	X	X	X			X	X	X		X	
Abborre	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Sik	X	X			X		X	X				X
Öring	X	X	X	X	X	X	X	X		X	X	X
Harr	X	X		X		X				X		
Stensimpa	X		X	X		X		X		X		
Bergsimpa						X			X	X		
Vanlig padda	X		X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Vanlig groda	X	X	X		X	X	X	X	X		X	
Kronhjort	X											
Utter					X							
Bäver	X					X		X	X		X	X
Vattensork											X	
Älg	X											

Fiskarternas förekomster stämmer väl med historiska provfiske- och fiskförekomstdata (Länsstyrelsen Jämtlands Län 2019, Limnordic Databas 1898 till 1996, Nationellt Register över Sjöprovfisken – NORS 2025.) från sjöar nära provtagningspunkterna. Dessa sjöar är Råsjön, Nækten, Sösjön, Märlån, Revundssjön, Vaxsjön, Bodsjön, Hungsjön och Locknesjön. Benlöja och bergsimpa har inte rapporterats i historiska provfiskedata, men har konstaterats i området.

Sett till arternas relativa biomassa så utgjorde elritsa och öring dominanta arter på lokalerna (Tabell 5). En annan noterbar detektion var bergsimpa som är rödlistad och klassad som nära hotad (SLU Artdatabanken, 2020).

Tabell 5. Fiskarternas relativa biomassa angivna i % inom lokalerna baserat på antal eDNA läsningar.

Lokalnamn	Nollprov	Råssjöån	Bjännviksbäcken	Strulån	Mellansjöån	Sösjö-bäcken	Märlån	Löningsån	Idbäcken nedre	Vaxsjöån	Orrbodån	Forsaån Långelet
Art												
Benlöja								0,7				
Id										3,62	0,50	
Mört	<0,1			1,2			52,3	1,8	22,6	1,5	4,2	<0,1
Elritsa	72,1	25,5	84,1	41,2	18,8	26,3	1,4	80,9	1,9	19,5	89,3	92,5
Gädda	2,6	2,2		1,7	35,2	2,1	15,0	0,1	62,7	0,7	2,5	4,1
Lake	0,1	0,8	0,3	0,4			0,0	0,4	0,2		0,6	
Abborre	1,2	1,9	5,0	2,6	36,7	6,3	25,5	2,3	12,0	15,4	2,3	0,6
Sik	1,4	2,6			0,8		0,5	0,9				0,6
Öring	21,0	67,0	10,2	22,2	8,4	15,6	4,9	9,8		25,5	0,6	2,2
Harr				30,7		40,4				16,4		
Stensimpa	1,6		0,2	0,1		4,8		1,6		4,7		
Bergsimpa						4,6			0,5	12,1		

Diskussion

Råssjöån, som hyser ett moderbestånd av flodpärlmusslor för utsättning i andra bäckar och sjöar, uppvisade positiva resultat i samtliga qPCR-analyser (6/6). Även Strulån och Sösjöbäcken visade positiva utslag i samtliga analyserade replikat (6/6). DNA-analyser från dessa tre lokaler indikerade en tidig detektion av flodpärlmusselspecifikt DNA, vilket tyder på höga koncentrationer av arten i vattendragen.

I Strulån genomförde Länsstyrelsen en utsättning av flodpärlmusslor under åren 2007–2008. Ån restaurerades inom ramen för Life Triple lakes, och ytterligare utsättningar genomfördes 2016. Länsstyrelsen har även dokumenterat att musslorna i Strulån sannolikt förökar sig naturligt, vilket stöds av resultaten från qPCR-analyserna. Sösjöbäcken hyser flodpärlmusslor som härstammar från moderbeståndet i Raggån.

Öring påträffades i 11 av 12 undersökta lokaler och uppvisade näst högst läsvärden i analysen. Arten genomför födovandringar i den övre delen av Gimån under försommaren och återvänder till ån under sensommar och tidig höst för lek (Carlsson m.fl., 2004). Inga öringsekvenser detekterades i Idbäcken nedre för någon av de använda markörerna.

De höga detektionsvärdena av elritsa kan sannolikt förklaras av att provtagningen sammanföll med artens reproduktionsperiod.

Stensimpa påträffades vid sex lokaler. Arten klassas som livskraftig men är listad i EU:s habitatdirektiv, Annex II (Naturvårdsverket, 2011). Vidare detekterades bergsimpa, som fram till 2020 var klassad som livskraftig men numera är listad som nära hotad (NT) enligt den svenska rödlistan.

Resultaten visar att eDNA kan vara ett effektivt verktyg för att detektera fisk-, groddjurs-, däggdjurs- och flodpärlmusselförekomster i vattendrag. Totalt identifierades tolv fiskarter, två groddjursarter och fem däggdjursarter, vilket ger en omfattande bild av den biologiska mångfalden i de undersökta områdena. De specifika enartsanalyserna av flodpärlmussla påvisade förekomst i flera av de restaurerade vattendragen, vilket indikerar att genomförda åtgärder har skapat förutsättningar som gynnar artens etablering och överlevnad. I Strulån, där tidigare utsättningar skett och där musslor sannolikt förökar sig naturligt, stödjer qPCR-resultaten förekomsten av en livskraftig population. På samma sätt kan de höga detektionsvärdena av elritsa vara en indikator på artens reproduktionsaktivitet, vilket understryker eDNA-teknikens potential för att övervaka biologiska processer på ett icke-destruktivt sätt.

Undersökningen demonstrerar vidare hur eDNA kan utgöra en praktiskt tillämpbar metod för att utvärdera effekterna av vattenrestaureringsåtgärder och användas för att identifiera både målarter och andra organismer som påverkas av ekosystemförändringar. Dessa resultat understryker vikten av fortsatt miljöövervakning och adaptiv förvaltning för att säkerställa långsiktiga bevarandeffekter av restaureringsinsatser.

Deluppdrag 2 – Avstånd och populationsstorlekens påverkan på eDNA-signal från flodpärlmussla i rinnande vatten

Bakgrund

Flodpärlmusslan är en hotad art (EN) som är starkt beroende av välfungerande vattendrag med hög vattenkvalitet och stabila habitatförhållanden. Förvaltning och bevarande av arten kräver effektiva metoder för att kartlägga populationstäthet och utbredning. Traditionella inventeringsmetoder, såsom standardmetod för inventering med vattenkikare, kan vara tidskrävande, påverka musslornas livsmiljö och vara begränsade till klara vattenmiljöer. eDNA-teknik erbjuder en icke-destruktiv och känslig metod för att identifiera arten i rinnande vatten utan direkt observation.

En av utmaningarna vid användning av eDNA i strömmande vatten är att förstå hur långt genetiskt material transporteras nedströms från en population och hur populationsstorleken påverkar signalens styrka. Det är avgörande att fastställa dessa faktorer för att optimera provtagningsstrategier och tolkningen av eDNA-resultat.

Mot denna bakgrund genomfördes en studie för att undersöka hur långt nedströms från en musselpopulation som eDNA kan detekteras och hur populationsstorleken påverkar signalstyrkan i ett vattendrag utan tidigare förekomst av flodpärlmusslor.

Metoder

Fältarbete och experimentdesign

Studien genomfördes i Angelån – ett vattendrag utan förekomst av flodpärlmusslor vid projektstart. För att verifiera frånvaro av flodpärlmussla samlade Länsstyrelsen i Jämtlands län in nollprover från sex lokaler längs ån. Från varje lokal samlades en liter vatten, som därefter frystes för vidare analys. qPCR-analyser utfördes för att bekräfta att ån saknade förekomst av flodpärlmusslor.

En av lokalerna valdes som utsättningspunkt för flodpärlmusslor (Utsättning). En lokal belägen uppströms utsättningsplatsen användes som musselfri kontroll - nollprov (GRP0) för att säkerställa att eventuellt påvisat eDNA nedströms härrördes från de utsatta musslorna. Fem provtagningslokaler (GRP1–GRP5) placerades nedströms utsättningspunkten på olika avstånd (30–1700 meter) (Figur 2).



Figur 2. Provtagningslokaler och deras respektive avstånd till utsättningspunkten.

Länsstyrelsen genomförde successiva utsättningar av flodpärlmusslor vid utsättningspunkten, där 5, 50 och 500 individer successivt placerades ut på samma ställe vid tre olika tidpunkter. Detta resulterade i tre provtagningstillfällen, där vattenprover samlades in en vecka efter varje utsättning vid samtliga sex provtagningslokaler, vilket möjliggjorde analys av eDNA-spridning i relation till varierande populationsstorlek och avstånd (Tabell 6).

Tabell 6. Provtagningsdesign för utsättning av flodpärlmussla.

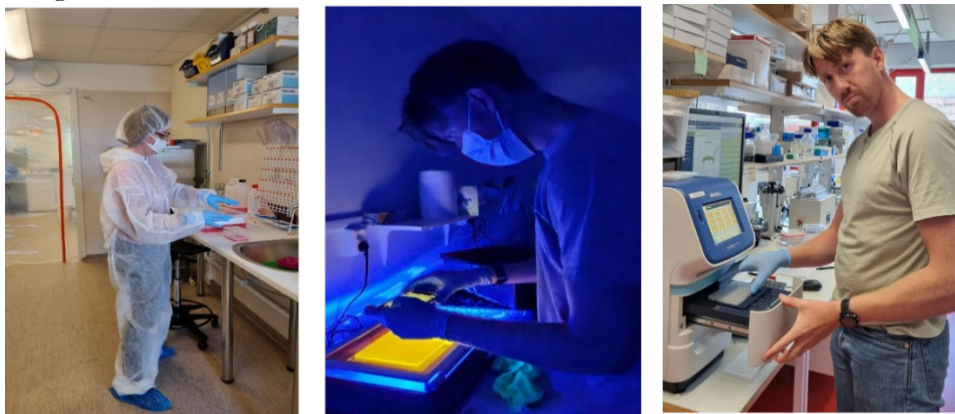
Datum	Planering eDNA-provtagning FPM eDNA
20 september	Nollprov vid alla punkter utom "Utsättning". Utsättning av 5 musslor vid punkt "Utsättning" efter provtagning.
29 september	Uppföljningsprovtagning nr 1 vid alla uppföljningsplatser GRP 1-GRP 5. Provta nollprov. Utsättning av 50 musslor från punkt "Utsättning" och uppströms.
2 oktober	Uppföljningsprovtagning nr 2 vid alla uppföljningsplatser GRP 1-GRP 5. Provta nollprov. Utsättning av 500 musslor från punkt "Utsättning" och uppströms.
9 oktober	Uppföljningsprovtagning nr 3 vid alla uppföljningsplatser GRP 1-GRP 5. Provta nollprov.

För varje fem liter insamlat vattenprov filtrerades 1200 ml vatten för att erhålla jämförbara data mellan provtagningslokaler och tidpunkter. Två separata prover samlades in som samlingsprov från varje provpunkt. Noter att proverna vid tidpunkt 0 insamlade av länsstyrelsen innehöll 1000 ml vatten per filter. Insamlings- och provtagningsmetodik följde beskrivning i **Deluppdrag 1**.

Laboratoriearbete

Förekomst av flodpärlmussla undersöktes genom qPCR-analys av 48 filterprover som analyserades i sex tekniska replikat för att öka tillförlitligheten av detektionsresultaten. Sammanlagt analyserades 324 qPCR-rektioner av vilka 288 var replikat från insamlade prover och 36 reaktioner utgjorde positiva och negativa kontroller.

Laboratoriearbetet följde beskrivning i **Deluppdrag 1** och beskrivs i Bilaga 1 samt Bilaga 2.



Figur 3. Laboratoriearbete. Förberedelser av prov (t.v.), DNA-kontroll (mitten), Proverna analyseras med qPCR-maskin (t.h.).

Resultat

Resultat redovisas som detektion/ingen detektion av flodpärlmussla på de olika lokalerna över tid (Tabell 7, Bilaga 6. qPCR-resultat, flodpärlmussla detektionsavstånd). Sammanlagt 28 replikat och 14 prover visade positiva signaler. Alla negativa laboratoriekontroller var negativa och positiva kontroller positiva. Provpunkten ovan utsättning var negativ för alla prover.

Tabell 7. eDNA-detektion av flodpärlmussla i förhållande till antal musslor och vattenprovets avstånd från populationen nedströms. Uts. m = avstånd i meter nedströms från utsättning, # = antal utsatta flodpärlmusslor (0,5, 50 och 500), *nära gränsvärdet för detektion, ** över gränsvärdet för detektion. Notera att alla prover analyserades och att tomma celler indikerar 0 detektion.

		Tid 0	Tid 01	Tid 02	Tid 03
Lokal	Uts. m	# 0	# 5	# 50	# 500
GRP_0	ovan				
GRP_1	30 m		X**	X	X
GRP_2	270 m			X*	X
GRP_3	720 m			X	X
GRP_4	1160 m			X	X
GRP_5	1660 m				X*

En vecka efter utsättning av 50 musslor detekterades FPM på lokalerna mellan 30 och 1160 meter nedströms utsättningen. Utsättning av 500 musslor visade detektion på alla fem lokaler nedströms utsättningen. På lokalen 1660 meter nedströms utsättningen gav 1/12 prover positivt utslag nära detektionsgränsen. Detektion av fem musslor 30 meter nedströms utsättningen gav signaler ovan detektionsgränsen, och registrerades precis vid detektionsgränsen med dPCR i ett annat projekt där prov GRP_01 (fem musslor 30 meter från utsättningen).

Diskussion

Resultaten från denna studie visar på att eDNA-teknik är en känslig och effektiv metod för att detektera flodpärlmusslans förekomst i rinnande vatten. Samtliga negativa kontroller var negativa, vilket indikerar att de positiva resultaten speglar verklig förekomst av arten. Detektion av eDNA nedströms utsättningspunkten visade ett tydligt samband mellan populationsstorlek och signalstyrka, där en större mängd utsatta musslor resulterade i längre transportavstånd och fler positiva prov. När 50 musslor placerades ut kunde eDNA påvisas upp till 1160 meter nedströms, medan utsättning av 500 individer resulterade i detektion vid samtliga provtagningslokaler, inklusive vid 1 660 meter, även om detektionsnivån vid den mest avlägsna lokalen var nära gränsvärdet. Däremot kunde eDNA från fem individer inte detekteras under detektionsgränsen i någon av provpunkterna, och gav utslaget 3/24 000 i ett dPCR test vilket tyder på att en så liten population genererar signaler under detektionsgränsen eller att eDNA bryts ned eller späds ut snabbt. Resultaten i denna rapport visar detektion, men inte nödvändigtvis all förekomst. Flera jämförande studier mellan eDNA och traditionella metoder har visat att eDNA är en känslig metod som kan användas både som komplement och i vissa fall istället för traditionella metoder (Beng & Corlett 2022, Hellström m.fl. 2023, Cangelosi m.fl. 2024).

Dessa fynd har viktiga implikationer för framtida övervakning och förvaltning av flodpärlmusslan. De visar att eDNA kan vara ett användbart verktyg för att identifiera populationer, men att signalens spridning påverkas av både populationsstorlek och hydrologiska faktorer. Studien bekräftar också tidigare forskning som indikerar att eDNA kan transporteras över betydande avstånd i

strömmande vatten, men att detekterbarheten minskar med ökande avstånd och minskande populationsstorlek.

Trots dessa lovande resultat finns det utmaningar att adressera. En viktig faktor är att eDNA-signalens nedbrytning och transport varierar mellan vattendrag beroende på hydrologiska och kemiska förhållanden. Detta innebär att kalibrering och lokal specifika valideringar är nödvändiga för att säkerställa en korrekt tolkning av eDNA-data. Dessutom är det viktigt att kombinera eDNA-analyser med traditionella inventeringsmetoder för att säkerställa en heltäckande bedömning av populationernas status.

Sammanfattningsvis visar studien att eDNA-teknik kan vara ett effektivt komplement eller alternativ (beroende på frågeställning) till traditionella inventeringsmetoder vid övervakning av flodpärlmusslor och andra akvatiska arter. Resultaten bidrar till en ökad förståelse för hur populationsstorlek och transportavstånd påverkar detektionsmöjligheter och ger värdefull kunskap för framtida förvaltning och restaureringsinsatser i vattendrag med hotade arter.

Deluppdrag 3 – Detektion av olika flodpärlmusselpopulationer med eDNA-metoder

Bakgrund

Den genetiska mångfalden hos flodpärlmusslan har visat sig vara låg i Europa, med undantag av Sverige, där mikrosatellitanalyser har påvisat en högre genetisk variation i populationerna jämfört med övriga Europa (Geist m.fl., 2010, 2018; Farrington m.fl., 2020; Österling m.fl., 2020b). För att förbättra förståelsen av den genetiska hälsan hos arten och dess långsiktiga överlevnad krävs vidare utveckling av populationsanalysmetoder baserade på eDNA. Genom att analysera genetiskt material från eDNA kan populationsstrukturer kartläggas, genetisk variation uppskattas och potentiella störningsfaktorer, såsom genetisk drift eller habitatförändringar, identifieras.

Detta delprojekt syftar huvudsakligen till att identifiera flodpärlmusselpopulationer i Sverige samt att generera jämförbar och utökad information i förhållande till tidigare populationsstudier. Målet är att etablera en metodik som möjliggör genetisk populationsanalys baserad på eDNA, vilket skulle kunna revolutionera övervakningen av artens genetiska status och bevarandearbete.

Hittills har populationsanalyser för fisk och musslor inte genomförts med hjälp av eDNA, och metoden har ännu inte använts för att undersöka släktskap, genetisk hälsa eller förekomst av inavel och genetisk obalans inom populationer. Att utveckla och validera en sådan metod skulle därför utgöra ett viktigt framsteg inom genetisk övervakning och bevarandebiologi.

Metoder

Fälтарbetet genomfördes den 21 och 22 september 2022 i samarbete med samtliga projektpartners (Figur 4). Vid varje lokal samlades tre flodpärlmusslor in och provtogs genom topsning för efterföljande vävnadsanalys. För att samla in vatten innehållande eDNA från kända individer placerades musslorna, med tillstånd från Länsstyrelsen, i hinkar under 30 minuter. Därefter återfördes samtliga individer till sitt ursprungliga habitat.

Ett fjärde samlingsprov filterades från vattnet i de tre hinkarna, och ytterligare ett vattenprov togs direkt från ån för att möjliggöra jämförelse mellan källspecifikt och omgivande eDNA. Fälтарbetet genomfördes i Råggån och Hökvattensån i Jämtland. Dessutom transporterades musslor från Brånsån i Västernorrland, samt musslor från två vattendrag i södra Sverige för provtagning genom topsning. Insamlingslokaler fastställdes i samråd med Länsstyrelsen samt professor Martin Österling vid Karlstads universitet.

Projektet är pågående fram till november 2025.

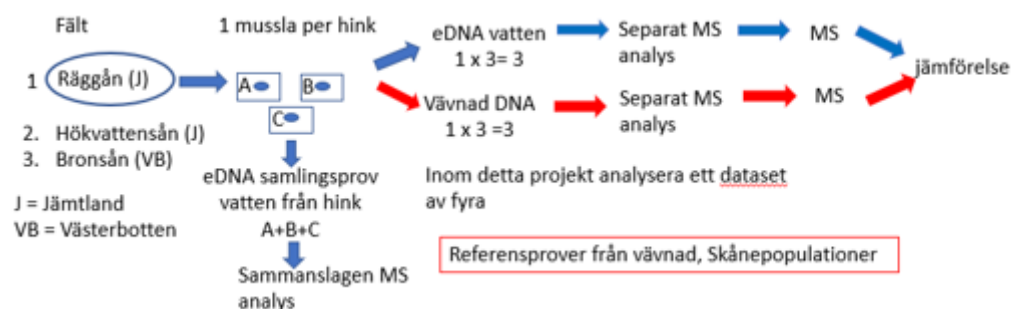


Figur 4. Fältarbete. A: Elin Götzmann och Håkan Söderberg redo att samla in musslor. B: Flodpärlmusslor (F. H. Söderberg). C: Elin studerar musslor i Raggån. D: Håkan Söderberg och Micaela Hellström gör en genomgång av filtreringsutrustning. E: Martin Österling inspekterar insamlade musslor. F: Filtrering i fält.

Foto: M. Hellström (A, C, E). Håkan Söderberg €. E. Götzmann (D, F)

DNA från de musslor som topsades extraherades i konventionella DNA-laboratorier, medan eDNA-extraktion från vattenprover utfördes i MIX-laboratorier specialiserade på eDNA för att minimera risken för kontaminering. Samtliga prover har nu insamlats och extraherats, och populationsgenetiska analyser genomförs med mikrosatelliter enligt tidigare etablerade markörer (Österling m.fl., 2020).

Arbetsprocessen illustreras i Figur 5.



Figur 5. Schema över insamlingsprocessen för individanalyser från mussel- och vattenprover.

Slutsats och rekommendation

Projektet eDNA GRIP har visat att eDNA kan utgöra ett effektivt verktyg för myndigheters miljöövervakning och åtgärdsarbete i akvatiska ekosystem. Genom uppföljning av restaureringsinsatser inom Life Triple Lakes och utveckling av eDNA-baserade analysmetoder har viktiga insikter vunnits om artförekomst, biologiska processer och populationsförvaltning. Nedan sammanfattas de viktigaste slutsatserna och rekommendationerna för framtida arbete:

- eDNA är en praktiskt tillämpbar metod för myndigheters miljöövervakning och skulle kunna vara en effektiv metod för att övervaka fisk, däggdjur, groddjur, musslor och annan bottenfauna i vattendrag inom de naturtyper som omfattas av EU:s habitatdirektiv (3260 och 3210).
- Artinventeringarna med eDNA visar på att de arter som förväntas förekomma i vattendragen efter restaureringsåtgärder och åtgärder för flodpärlmussla utförda inom Life Triple Lakes också återfinns.
- Flodpärlmusslans eDNA kan transporteras och detekteras på långa avstånd, vilket ger viktiga insikter för framtida provtagningsstrategier och tolkning av eDNA-data inom miljöövervakning och populationsförvaltning.
- eDNA kan användas för att analysera biologiska processer, såsom lekvandring och reproduktion, vilket kan göra det till ett kraftfullt verktyg för att följa upp effekterna av åtgärder i vattendrag.
- Genetiska analyser har potential att stärka bevarandearbetet, då tekniken kan utvecklas vidare för att identifiera släktskapsförhållanden och genetisk mångfald i hotade populationer.

Rekommendationer och förslag på uppföljning:

- Vidareutveckla eDNA-metoder för att förbättra förståelsen av artutbredning och populationers genetiska hälsa, vilket kan ge bättre beslutsunderlag för riktade restaureringsåtgärder.
- Långsiktig uppföljning av restaurerade vattendrag för att säkerställa att åtgärder ger varaktig ekologisk effekt och att populationerna fortsätter att utvecklas.
- Optimera provtagningsstrategier genom att studera eDNA-transport och nedbrytning i olika vattendragstyper, vilket kan förbättra datakvaliteten och säkerställa korrekta tolkningar av resultat.
- Kombinera eDNA med traditionella inventeringsmetoder för att erhålla en mer heltäckande och kostnadseffektiv övervakning av akvatiska ekosystem.

Tack

Tack till Professor Bernt Hänflings laboratorium vid University of Highlands and Islands (UHI) i Inverness, Storbritannien för sekvensering och diskussioner om laboratoriemetoder. Speciellt tack till Victoria Pritchard vid UHI för att du delade dina insikter om FPM genetik. Rafael Augusto extraherade DNA. Gert-Jan Jeunen utförde bioinformatik för flerartsanalyser. Tack till Johan Spens för tillgång till Limnordic AB databas över historiska provfischen. Ingemar Näslund vid Länsstyrelsen i Jämtland deltog i intressanta diskussioner om metoder för fisk- och musselinventeringar. Tack till Life-projekten Grip on Life, Life Connects, Rivers of Life och Life Ecostream för inbjudan att hålla föredrag om eDNA Grip-projektet i en Life-seminarieserie i september 2022.

Litteratur/källförteckning

Beng, K. C., & Corlett, R. T. (2020). Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and conservation: opportunities, challenges and prospects. *Biodiversity and conservation*, 29(7), 2089-2121.

Bruce, K. Bourlat, S. Blackmann, R., Hellström, M., m.fl. & Deiner, K. (2021). A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment". PenSoft Publishers Bulgaria 2021. ISBN 978-619-248-052-3 (paperback), ISBN 978-619-248-053-0 (e-book) DOI: 10.3897/ab.e68634

Brys, R., Haegeman, A., Halfmaerten, D., Neyrinck, S., Staelens, A., Auwerx, J., & Ruttink, T. (2021). Monitoring of spatiotemporal occupancy patterns of fish and amphibian species in a lentic aquatic system using environmental DNA. *Molecular ecology*, 30(13), 3097-3110.

Cangelosi, A., Balcer, M., Prihoda, K., Gruwell, M., TenEyck, M., Aicher, R., ... & Grey, E. K. (2024). Evaluation of eDNA qPCR monitoring as an early detection tool for a non-native mysid in Great Lakes Waters. *Journal of Great Lakes Research*, 50(4), 102377.

CEN. 2023. Standard: Water quality — Collecting and preserving water samples for capture of environmental DNA in aquatic environments (2023). N12 CEN-TC230-WG28. Publicerad 15 mars 2023.

<https://www.sis.se/api/document/preview/80041747/>

Farrington, S. J., King, R. W., Baker, J. A., & Gibbons, J. G. (2020). Population genetics of freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera*) in central Massachusetts and implications for conservation. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 30(10), 1945-1958

Carlsson, J., Aarestrup, K., Nordwall, F., Näslund, I., Eriksson, T., & Carlsson, J. E. L. (2004). Migration of landlocked brown trout in two Scandinavian streams as revealed from trap data. *Ecology of Freshwater Fish*, 13(3), 161-167.

Geist, J., Moorkens, E., Killeen, I., Feind, S., Stoeckle, B. C., Connor, A. O., & Keuhn, R. (2018). Genetic structure of Irish freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera* and *Margaritifera durrovensis*): Validity of subspecies, roles of host fish, and conservation implications. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 28, 923–933.

Geist, J., Soderberg, H., Karlberg, A., & Kuehn, R. (2010). Drainage independent genetic structure and high genetic diversity of endangered freshwater pearl mussels (*Margaritifera margaritifera*) in northern Europe. *Conservation Genetics*, 11, 1339–1350.

Harper, L. R., Lawson Handley, L., Hahn, C., Boonham, N., Rees, H. C., Gough, K. C., ... & Hänfling, B. 2018 b. Needle in a haystack? A comparison of eDNA metabarcoding and targeted qPCR for detection of the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Ecology and evolution*, 8(12), 6330-6341.

Hellström M, Andersson-Li M, Birgersson V, Brys R, Halfmarten D, Hernvall P, Hänfling B, Näslund J, Sjöstedt J, Spens J, Tang C, Tjärnström M, Öhman M, Bruce K (2023). LifeDNAquatic: Riktlinjer för optimal hantering och analys av akvatiskt

eDNA som verktyg inom svensk miljöövervakning. Naturvårdsverket Rapport 7106 maj 2023.

Leese, F., Altermatt, F., Hellström M. + 103 authors & Stenke, D (2016). DNAqua-Net: Developing new genetic tools for bioassessment and monitoring of aquatic ecosystems in Europe. Research Ideas and Outcomes (Rio), 2, e11321.

Limnordic AB. Databas över historiska provfiskeri i norra Sverige.

Länsstyrelsen Jämtlands Län. 2019. Tre Sjöar. Ett magasin om vattenvård i Näkten, Locknesjön och Revsundssjön. Länsstyrelsen 2019:5 Diarienummer: 7851:2014 www.lansstyrelsen.se/jamtland samt triplelakes.se

Nationellt Register över Sjöprovfisken – NORS. 2025. Sveriges lantbruksuniversitet (SLU), Institutionen för akvatiska resurser. <http://www.slu.se/sjoprovfiskedatabasen> [2025-02-12].

Naturvårdsverket 2011. Vägledning för svenska arter i habitatdirektivets bilaga 2 NV-01162-10 Beslutad: 20 januari 2011

Pedersen, M. W., S. Overballe-Petersen, L. Ermini, C. D. Sarkissian, J. Haile, M. Hellstrom, J. Spens, m.fl. (2015). Ancient and modern environmental DNA. Philosophical Transactions of the Royal Society B 370:20130383

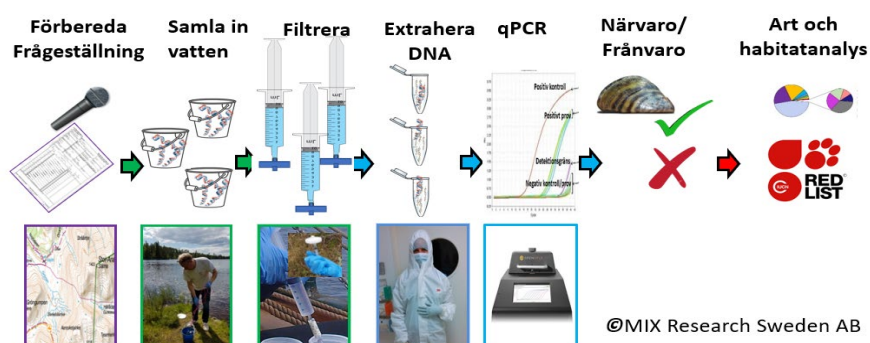
Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L.H. (2012). Environmental DNA. Molecular Ecology 21, 1789-1793

Österling M, Lopes-Lima M, Froufe E, Hadzihalilovic AH, Arvidsson B (2020). The genetic diversity and differentiation of mussels with complex life cycles and relations to host fish migratory traits and densities. Scientific reports 10, 17435.

Bilaga 1. Vad menas med en- och flerartsanalyser?

Enartsanalyser – qPCR

Frågeställningen för dessa studier är: Finns art X här? Varje art analyseras med en markör som är specifik för precis den arten. Provsvaren anger närvaro/frånvaro. (Figur B1-1) Inventering av förekomst av en art med eDNA görs med så kallad qPCR. Då flera arter undersöks med enartsanalyser kan data över relativa abundansen mellan art A och art B inte jämföras med varandra däremot kan i vissa mängdskillnader inom arten uppskattas. Analystiden för enartsanalyser är kortare än den för flerartsanalyser.

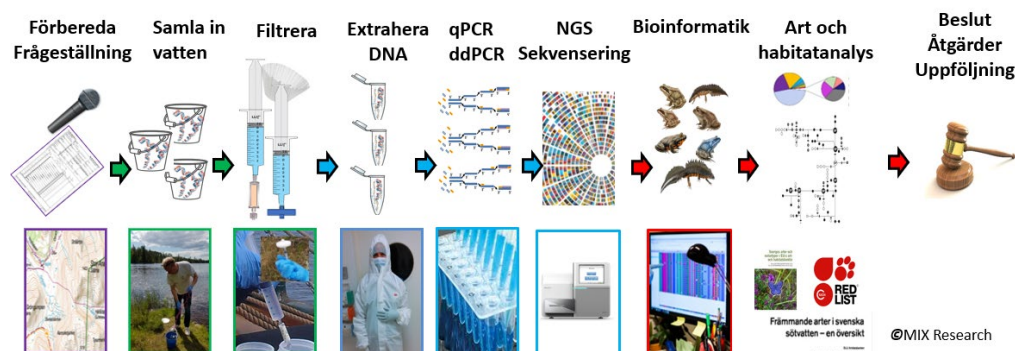


Figur B1-1. Flödesdiagram som visar de olika stegen för enartsanalyser från fältplanering till beslut och åtgärder (laboratoriearbete och bioinformatik beskrivs i Bilaga 2).

Flerartsstudier – metastreckkodning

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

Invasiva och skygga arter kan identifieras och antalet arter som detekteras i en analys är obegränsat. Om man inventerar tre eller fler arter är denna metod att föredra och blir snabbt mer kostnadseffektiv än enartsanalyser. Analystiden för flerartsanalyser är längre än analystiden för enartsanalyser men mängden av data och information är så pass stor att inventeringarna kan producera ”stort data” som inte har varit möjligt före eDNA-metastreckkodning (Figur B1-2).



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

Bilaga 2. Laboratorieanalyser

Extraktion

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

Enartsanalys – qPCR

Förekomst av flodpärlmussla analyserades med qPCR på en med en QuantStudio 1 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) och på en StepOne Plus qPCR apparat (Applied Biosystems). Primer/probe markörerna var noggrant testade för att undvika detektion av närbesläktade arter till flodpärlmussla och beskrivs i Mauvisseau m.fl. (2021). En standardkurva användes. För varje vattenprov utfördes 6 tekniska qPCR replikat, för utsättningsprojektet togs filter vid varje tidpunkt vilket resulterade i 12 qPCR replikat. För kvantifiering och verifiering av amplifikationen konstruerades standardkurvor genom successiv spädning av vävnads-DNA, med spädningsfaktorer från 1:1 till 1:100 000. DNA-koncentrationen av spädningsarna kvantifierades kort före analys och analyserades i tre replikat, tillsammans med positiva och negativa kontroller.

Flerartsanalyser

Flerartsanalyser för fisk, groddjur och däggdjur analyserades med fem markörer på 12S-genen. Fyra fiskmarkörer analyserades som multiplex för fisk (Miya m.fl. 2020). Vi använde en separat markör för analys av ryggradsdjur (Kelly m.fl. 2015). Varje PCR-prov utfördes i fyra replikat. Som positiv laboratoriekontroll används ett prov med känd artsammansättning av tropiska arter som standard för jämförelse. Negativa kontroller analyseras för att säkerställa kvaliteten och tillförlitligheten av resultatet. Protokollen för de olika markörerna är publicerade i Miya m.fl. 2020 och Kelly m.fl. 2015.

Bioinformatik och verifiering

Varje enskild art har en unik streckkod eller DNA-sekvens. De unika sekvenserna jämfördes med en internationell databas (tillgänglig för allmänheten, som grundar sig på GenBank och upprätthålls av National Center for Biotechnology Information, NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) där sekvenser på närmare 504 000 kända arter finns tillgängliga med 3,7 miljarder sekvenser och 25 triljoner baspar enligt GenBank och NCBI hemsida (Sayers m.fl. 2024). Bioinformatiken följde Jeunen m.fl. (2024 a,b). De olika sekvenserna matchades i första hand mot NCBI databasen och fick på så sätt fram arternas identitet. Vidare används en verifierad (vilket betyder att arterna som används för referens-DNA är verifierade av en auktoriserad taxonom) intern databas. Tack vare nya framsteg inom metastreckkodning för vertebrater och evertrebrater är det möjligt att få träffar på artnivå istället för enbart familje- eller genusnivå. Antalet läsningar per art ger en relativ uppskattning (relativ biomassa) av hur mycket eller litet arten förekommer i ett prov.

Referenser

Jeunen, G. J., ... & Gemmell, N. (2024). tombRaider-improved species and haplotype recovery from metabarcoding data through artefact and pseudogene exclusion. *bioRxiv*, 2024-08.

Jeunen, G. J., ... & Lamare, M. (2024). Streamlining large-scale oceanic biomonitoring using passive eDNA samplers integrated into vessel's continuous pump underway seawater systems. *Science of the Total Environment*, 946, 174354.

Mauvisseau, Q., Halfmaerten, D., ... & Brys, R. (2021). Effects of preservation strategies on environmental DNA detection and quantification using ddPCR. *Environmental DNA*, 3(4), 815-822.

Miya, M., Gotoh, R.O. & Sado, T. (2020). MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples. *Fish Sci* 86, 939–970.

NCBI webbsida <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Sayers, E. W., m.fl. (2024). GenBank 2024 update. *Nucleic Acids Research*, 52(D1), D134-D137.

Spens, J., A. R. Evans, ... M. Hellström. 2017. Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(5), 635–645.

Bilaga 3. Kvalitetssäkring av DNA-kontroller

Positiva och negativa kontrollprov

För tillförlitliga resultat vid eDNA-provtagning är positiva och negativa kontroller nödvändiga för att utesluta kontamineringar eller andra felkällor. Detta gäller alla DNA-undersökningar och innefattar alla utövare. Om en utförare avviker från denna praxis är resultaten inte tillförlitliga och därmed oanvändbara.

Utöver generella huvudprinciper för DNA-undersökningar (Goldberg, m.fl. 2016, Griffiths, m.fl. 2016) finns speciella regelverk för kriminaltekniska (Hedman, m.fl. 2017) och medicinska (SFMG, 2011) undersökningar. Strikta riktlinjer för ett standardiserat utövande av eDNA-undersökningar tas just nu fram inom EU under COST-aktionen DNAquaNet.

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

Konsekvenserna av en kontaminerad negativ kontroll kan i praktiken innebära att arter som inte finns i en miljö detekteras (falsk positiv).

Positiv kontroll: En positiv kontroll innebär att ett prov som innehåller ett känt DNA testas för att verifiera att den använda metodiken fungerar som den skall. Om DNA-signalerna inte hittas i en positiv kontroll innebär det att metodiken måste justeras och analysen eller undersökningen måste göras om.

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

Referenser

Goldberg, Caren S., m.fl. 2016. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*, 7.11: 1299-1307.

Griffiths Anthony et al. 2016. *An Introduction to Genetic Analysis*. 11th edition. WH Freeman. New York. ISBN-13: 978-1464109485.

Hedman, Johannes m.fl.. 2017. Pre-PCR processing-projektet, P4 Stärkt beredskapskapacitet via rationell laboratoriediagnostik samt förenklad

provberedning. -Nationellt Forensiskt Centrum, NFC 2017-05-07. NFC Rapport
Avdelningskansliet 2017:04.

SFMG, Svensk Förening för Medicinsk Genetik. 2011. Riktlinjer för kvalitetssäkring i
klinisk genetisk verksamhet.

[http://sfmg.se/download/riktlinjer/Kvalitetsriktlinjer/sfmg_riktlinjer-for-
kvalitetssakring_rev101228.pdf](http://sfmg.se/download/riktlinjer/Kvalitetsriktlinjer/sfmg_riktlinjer-for-kvalitetssakring_rev101228.pdf)

Bilaga 4. Kvalitetskontroller som redovisas

- Mängden insamlat/filtrerat vatten dokumenteras för att kunna avgöra hur mycket prov som samlats in totalt. Alla eDNA-mätningar ställs i relation till hur mycket vatten som filterats.
- Total eDNA-koncentration för samtliga prov (inkl. negativa) anges. Koncentrationen varierar avsevärt naturligt men ger ändå en första indikation om hur eDNA-extraktionen lyckats.
- Inhibitionskontroll dokumenteras och redovisas. Inhibition betyder risk för att arter som finns i proverna inte detekteras därför att DNA inhiberas av humus etc. Detta går att åtgärda så länge inhibitionstest utförs. Resultatet av antiinhibering före och efter utförandet redovisas så att resultatens tillförlitlighet kan bedömas.
- Band på gel efter målinriktad PCR dokumenteras (närvaro/frånvaro) inklusive negativa kontroller. Detta visar att PCR har fungerat och kontroll av vilka prover som har spår av målarter, eller riskerar att vara kontaminerade, kan utföras.
- Negativa kontroller indelade i a) fält-negativa (filter-negativa) b) extraktions-negativa samt c) PCR-negativa utförs. Detta möjliggör en kontroll av vilka prover som riskerar att vara kontaminerade och vid vilket steg detta i så fall skett.
- Positiva kontroller (används inte alltid): a) Fält-positiva där ett område känt för artförekomst provtas för kontroll att arten detekteras i fält. b) PCR-positiva för enartsanalyser (gäller qPCR och ddPCR) där DNA från målartern testas. c) Positiv flerartskontroll, där prov från ett artificiellt sammansatt samhälle ("mock community") används som positiv kontroll vid PCR och sekvensering. Falska positiva prover redovisas. De positiva proverna försäkrar att PCR och bioinformatiken fungerar som avsett.
- För enartsanalyser anges närvaro och frånvaro av arten, för flerartsanalyser anges andel (%) av målarterna i ett givet prov. Detta ger en bild av hur väl sekvenseringen av målarterna lyckats.
- Andel sekvenser (%) av människa, ko och gris (vildsvin) och bakterier som förekommer som bakgrundssekvenser redovisas. Detta möjliggör en kontroll av att tillräckligt många läsningar täcker målarterna.
- Minst 4st. PCR-replikater per art/artgrupp och eDNA-prov utförs. Dessa sammanslås i sekvenseringen. Färre replikater minskar analys säkerheten avsevärt. För enartsanalyser rekommenderas 6 replikater.
- Antal prover för en specifik MiSeq-körning (sekvensering) överstiger inte 180 stycken exklusive sekvenseringskontroller. Detta säkerställer att antalet läsningar per prov inte ska bli alltför lågt för att kunna detektera ovanligare arter.

Bilaga 5. Fältprotokoll, flodpärlmussla detektionsavstånd

Tabell B5_1. Fältprotokoll. Flodpärlmussla och detektionsavstånd. Provnamn filter a, Provnamn filter b, koordinater (Sweref 99), Dist. Uts. m= Avstånd till utsättningspopulationen i m, datum för provtagning, # FPM uts. = antal utsatta provpärlmusslor, vattentemperatur, provets djup, antal filter och volym filterat vatten per filter. Notera att en mindevolym filterades för nollproverna, vattenflödes hastighet vid ytan och vid botten.

Provnamn a	Provnamn b	Sweref99N	Sweref99E	Dist m	Datum	# FPM	T°C H2O	Djup prov m	Volym H2O ml	Flöde yta (m/s)	Djup yta (cm)	Flöde botten (m/s)	Djup botten (cm)
0 GRP 0a	0 GRP 0b	6961206	530932		2023-09-20	0	12	0,3-0,5	2x 1000	0,4	10	0,2	40
Utsättning	Utsättning	6961110	531181		2023-09-20	0	12	0,3-0,5	2x 1000	-	-	-	
0 GRP1a	0 GRP1b	6961115	531210	30	2023-09-20	0	12	0,3-0,5	2x 1000	0,18	10	0,17	56
0 GRP2a	0 GRP2b	6961065	531389	200	2023-09-20	0	12	0,3-0,5	2x 1000	0,22	10	0,098	58
0 GRP3a	0 GRP3b	6961074	531703	720	2023-09-20	0	12	0,3-0,5	2x 1000	0,1	10	0,015	50
0 GRP4a	0 GRP4b	6960960	532125	1160	2023-09-20	0	12	0,3-0,5	2x 1000	0,55	10	0,17	20
0 GRP5a	0 GRP5b	6960847	532607	1660	2023-09-20	0	12	0,3-0,5	2x 1000	0,49	15	0,14	50
1 GRP 0a	1 GRP 0b	6961206	530932		2023-09-29	5	10,5	0,3-0,5	2 x 1200	0,45	10	0,3	40
1 GRP1a	1 GRP1b	6961115	531210	30	2023-09-29	5	10,3	0,3-0,5	2x 1200	0,31	10	0,3	36
1 GRP2a	1 GRP2b	6961065	531389	200	2023-09-29	5	10,5	0,3-0,5	2x 1200	0,29	10	0,19	34
1 GRP3a	1 GRP3b	6961074	531703	720	2023-09-29	5	10,2	0,3-0,5	2x 1200	0,18	10	0,18	60
1 GRP4a	1 GRP4b	6960960	532125	1160	2023-09-29	5	10,1	0,3-0,5	2x 1200	0,45	10	0,25	18
1 GRP5a	1 GRP5b	6960847	532607	1660	2023-09-29	5	10,5	0,3-0,5	2x 1200	0,38	14	0,17	52
2 GRP 0a	2 GRP 0b	6961206	530932		2023-10-02	50	8,5	0,3-0,5	2 x 1200	0,61	10	0,32	25
2 GRP1a	2 GRP1b	6961115	531210	30	2023-10-02	50	8,3	0,3-0,5	2x 1200	-	-	-	-
2 GRP2a	2 GRP2b	6961065	531389	200	2023-10-02	50	8,2	0,3-0,5	2x 1200	0,23	10	0,25	42
2 GRP3a	2 GRP3b	6961074	531703	720	2023-10-02	50	8,2	0,3-0,5	2x 1200	0,31	10	0,3	36
2 GRP4a	2 GRP4b	6960960	532125	1160	2023-10-02	50	8	0,3-0,5	2x 1200	0,74	10	0,23	20
2 GRP5a	2 GRP5b	6960847	532607	1660	2023-10-02	50	8	0,3-0,5	2x 1200	0,9	10	0,21	52
3 GRP 0a	3 GRP 0b	6961206	530932		2023-10-09	500	3,8	0,3-0,5	2 x 1200	0,72	10	0,34	41
3 GRP1a	3 GRP1b	6961115	531210	30	2023-10-09	500	4	0,3-0,5	2x 1200	-	-	-	-
3 GRP2a	3 GRP2b	6961065	531389	200	2023-10-09	500	5,3	0,3-0,5	2x 1200	0,27	10	0,13	55
3 GRP3a	3 GRP3b	6961074	531703	720	2023-10-09	500	5,5	0,3-0,5	2x 1200	0,15	10	0,07	55
3 GRP4a	3 GRP4b	6960960	532125	1160	2023-10-09	500	5,2	0,3-0,5	2x 1200	0,51	10	0,16	24
3 GRP5a	3 GRP5b	6960847	532607	1660	2023-10-09	500	5,5	0,3-0,5	2x 1200	0,61	10	0,22	51

Bilaga 6. qPCR-resultat, flodpärlmussla detektionsavstånd

Resultat från qPCR flodpärlmussla (FPM) visas i Tabell B6_1. Tabellen visar antal PCR replikat (n/6) som visade positiv FPM detektion i 48 prover. Sammanlagt analyserades 324 qPCR reaktioner av vilka 288 var replikat från insamlade prover och 36 reaktioner utgjorde positiva och negativa kontroller. Detektion per prov anges n/6. Parenteserna anger antal PCR cykler som krävs för detektion (låg värde betyder att prover detekterar mer DNA än högt värde). Ekvationen för standardkurvan var $y = -3,3973 + 26,896x$. Notera att prov GRP 01 är taget 30 meter nedströms var över gränsen för detektion, men noterades positivt i en annan studie för dPCR vid gränsvärdet (3/24 000).

Tabell B6_1. Resultat från qPCR. Tabellen visar detektion av flodpärlmussla i 48 extraherade DNA-filter. Uts. m = meter avstånd från utsättningspunkten. Tid 0 provtagningstid innan utsättning. Tid 01 – Tid 03 anger provtagning en vecka efter utsättning av respektive 5, 50 och 500 flodpärlmusslor.

Uts m	Lokal	Tid 0 0 FPM	Tid 01 5 FPM	Tid 02 50 FPM	Tid 03 500 FPM
ovan	GRP 0a	0/6	0/6	0/6	0/6
ovan	GRP 0b	0/6	0/6	0/6	0/6
30 m	GRP 01a	0/6	1/9 (39*)	1/6 (37,2)	2/6 (36,9)
30 m	GRP 01b	0/6	0/6	4/6 (37,5)	3/6 (37,1)
270 m	GRP 02a	0/6	0/6	1/6 (38,3)	0/6
270 m	GRP 02b	0/6	0/6	0/6	2 /6 (36,8)
720 m	GRP 03a	0/6	0/6	1/6 (37,8)	1/6 (36,6)
720 m	GRP 03b	0/6	0/6	0/6	2/6 (36,1)
1160 m	GRP 04a	0/6	0/6	3/6 (37,2)	4/6 (36,7)
1160 m	GRP 04b	0/6	0/6	2/6 (37,5)	1/6 (36,5)
1660 m	GRP 05a	0/6	0/6	0/6	1/6 (38,2)
1660 m	GRP 05b	0/6	0/6	0/6	0/6



Havs
och Vatten
myndigheten



Länsstyrelsen
Jämtlands län



Länsstyrelsen
Västernorrland



Med bidrag från Europeiska unionens LIFE-program