

Kartering av främmande marina arter med eDNA i norra Bohuslän

2025



SEANALYTICS AB
Species and Ecosystem Analyses 



**Länsstyrelsen
Västra Götaland**

eDNA i hamnar 2025

Titel: Kartering av främmande marina arter med eDNA i södra Bohuslän 2025
Författare: Matthias Obst, Marty Breidenbach & Per Sundberg SeAnalytics AB
Provtagare: Anna-Karin Eriksson & Tim Dorup

ISSN: 1403-168X
Rapportnummer: 2026:9
Diarienummer: 50279-2025
Utgivningsår: 2026

Innehåll

KARTERING AV FRÄMMANDE MARINA ARTER MED EDNA I NORRA BOHUSLÄN 2025	1
SAMMANFATTNING	4
PROVTAGNING, FILTRERING, DNA EXTRAKTION	5
Fältrapporter, provtagning och insamlingsdata.....	6
Molekylärbiologiskt arbete och bioinformatisk analys.....	6
RESULTAT	7
Identifierade främmande arter	7
Taxonomisk fördelning.....	9
Geografisk utbredning.....	9
Arter av särskilt intresse.....	9
SLUTSATSER OCH REKOMMENDATIONER	14
Övervakning av kända främmande arter	14
Upptäckt av nya främmande arter.....	14
Geografisk utbredningen av främmande arter	15
Japansk venusmussla, <i>Ruditapes philippinarum</i>	15
Uppföljning av intressanta observationer.....	15
REFERENSER	16
BILAGA 1	19
Fältrapporter, provtagning och insamlingsdata	19
Försommar provtagning.....	19
Höst provtagning	21
BILAGA 2	24
Molekylärbiologisk arbete och bioinformatisk analys	24
Screening för främmande arter.....	27
Datahantering.....	27

Sammanfattning

Vattenprover och plankton för eDNA-analyser togs i två hamnar, Göteborg och Stenungsund, vid två tillfällen (vår och höst) under 2025. Sammanlagt togs 56 prover och vi fann 246 arter där genetiska data med säkerhet kunde matchas med $\geq 98\%$ sekvenslikhet mot artnamn i referensbibliotek. Bland dessa prover återfanns sammanlagt 431 observationer av 40 arter som kan bedömas som främmande eller invasiva. Dessa arter är antingen marina djur (evertebrater) eller tillhör olika grupper av alger och protister (Ochrophyta, Haptophyta, Chlorophyta, Rhodophyta, Bacillariophyta). SeAnalytics AB identifierade 14 arter som är kända sedan tidigare, dvs registrerad som bofasta och reproducerande i våra vatten. Av dessa finns 9 arter som är riskklassificerade för invasivitet varav 8 arter bedömda att vara potentiellt, mycket eller hög invasionspotential samt en art med låg risk. Ingen förändring i utbredningsområde av dessa 14 arter har fastställts. De resterande 26 främmande arter som identifierades kan anses som förmodade observationer som tolkas med försiktighet. Vi genomförde en initial konsultation med taxonomiska experter och kan konkludera att det finns inget behov att registrera dessa arter eller genomföra några vidare åtgärder i nuläget. Alla data publiceras i form av tre dataprodukter (i) rå sekvensdata, (ii) genetiska observationer för alla arter, och (iii) genetiska observationer för de identifierade främmande och invasiva arter.

Provtagning, filtrering, DNA extraktion

Plankton samlades med en Hydro-Bios Apstein 90 μ m håv, diameter 40 cm öppning. Prover drogs nedifrån botten uppåt och utmed bryggan, två drag per plats. Proverna samlades i en 1-litersburk och fixerades med 96% etanol i en mängd som försäkrade att slutliga koncentrationen inte understeg 70%. Sammanlagt tre prover per hamnområde och tillfälle.



Figur 1. Provtagning med plankton-håv (vänster) och Ruttner vattenhämtare (höger). Bilden visar också den typ av 2-liters engångskärl som användes vid provtagningen. Bilder är tagna vid andra tillfällen. Foto Jens Kosterhed (vänster) Lise-Lotte Sundberg (höger).

Vattenprover togs med Ruttner-hämtare: 1 liter vid ytan och 1 liter på 3–6 meters djup på varje lokal. Dessa prover slogs samman i ett 2-liters engångskärl och förvarades i kylväskor med kylklampar fram till filtrering. Sammanlagt togs 10 prover från varje hamnområde och tillfälle. Vattenproverna filtrerades (Sterivex 0.45 μ l) tidsmässigt i nära anslutning till provtagningen (max 5 timmar) med peristaltisk pump kopplad till en elektrisk borrh och fixerades med 95% etanol och förslöts med proppar. Mellan lokaler pumpades igenom 10% klorinlösning som därefter sköljdes noga. Det gjordes också inför det blankprov (0,5 liter avjoniserat vatten) som togs vid varje tillfälle för kontaminationskontroll.

Fixerade filter förvarades i -20° C frys fram till extraktion.

DNA extraherades från filtren med Nucleospin eDNA water kit (Macherey-Nagel) med den teknik och standard som utvecklats i laboratoriet. Koncentration av DNA i extrakten mättes med Qubit® fluorometer. Notera att detta mäter koncentrationen av all DNA i provet och inte specifikt DNA från målarten.

DNA från planktonproverna extraherades så som beskrivet i Sundberg et al. 2022.

Figur 2. Kartan visar provtagningslokaler i två hamnområden Göteborg och Stenungsund.

Fältrapporter, provtagning och insamlingsdata

Se bilaga 1

Molekylärbiologiskt arbete och bioinformatisk analys

Se bilaga 2

Resultat

Identifierade främmande arter

Den rensade sekvensdata innehöll sammanlagt 1 921 723 avläsningar som resulterade i totalt 732 unika sekvenser (dvs amplicon sequence variants eller "ASVs") för 246 identifierade arter.

Analysen av de 56 insamlade proverna resulterade i sammanlagt 431 observationer av 40 främmande arter som kan delas upp i två grupper:

- i) **14 arter som är kända främmande för Sverige**, d.v.s. registrerad som "bofast och reproducerande", och
- ii) **26 arter som är av okänt ursprung eller kryptogenisk**, d.v.s. registrerad som "okänt om reproducerande", "osäkert om påträffad", eller "ej påträffad"

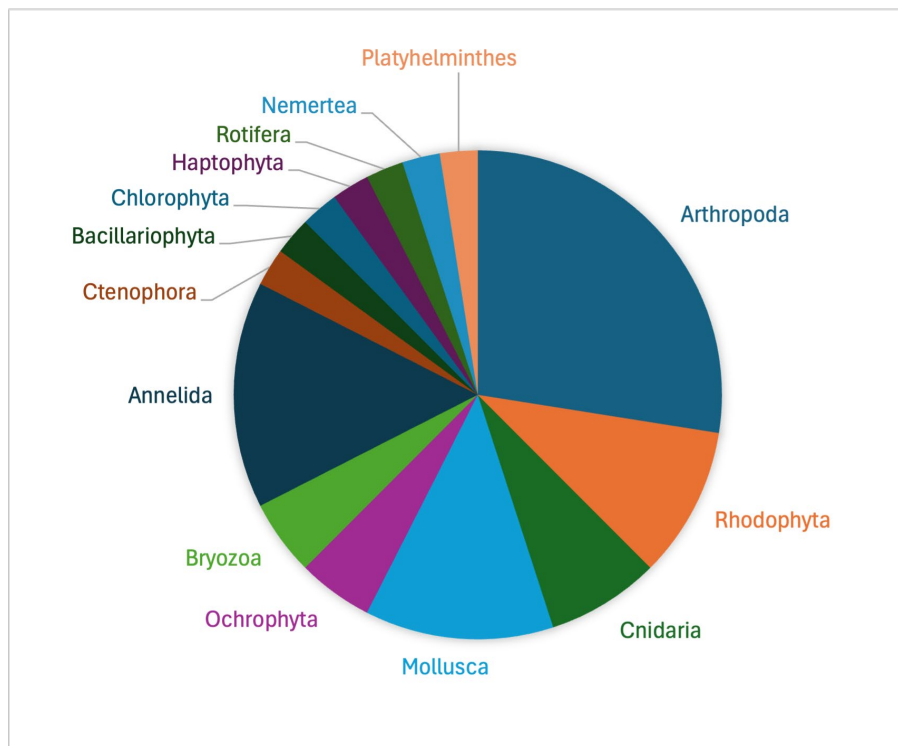
Tabell 1 på nästa sida visar en lista med de 40 främmande arter som identifierades under 2025. Kända främmande arter visas i blå medan förmodade nya arter visas i beige. Abundans visas som antal positiva proverna för varje art. Likhet visas som % mellan de den genetiska signal som upptäcktes och referenssekvenser. Av de 40 identifierade arterna är minst 9 arter riskbedömd, och 8 rankas som "hög risk", "Potentiellt hög risk", eller "mycket hög risk" arter.

eDNA i hamnar 2025

Art	Djurgrupp	Likhet (%)	Svensk förekomst enligt Artfakta	Risiklassificering	Abundans
<i>Acartia tonsa</i>	Arthropoda	100	Bofast och reproducerande	Ej bedömd	51
<i>Amphibalanus improvisus</i>	Arthropoda	100	Bofast och reproducerande	Potentiellt hög risk 4AB,1	56
<i>Bonnemaisonia hamifera</i>	Rhodophyta	99,68	Bofast och reproducerande	Mycket hög risk 4C,3DG	1
<i>Cordylophora caspia</i>	Cnidaria	100	Bofast och reproducerande	Ej bedömd	11
<i>Dasysiphonia japonica</i>	Rhodophyta	100	Bofast och reproducerande	Mycket hög risk 4AB,4F	5
<i>Ensis leei</i>	Mollusca	100	Bofast och reproducerande	Potentiellt hög risk 4A,1	2
<i>Fibrocapsa japonica</i>	Ochrophyta	98,722	Bofast och reproducerande	Ej bedömd	16
<i>Gracilaria vermiculophylla</i>	Rhodophyta	99,68	Bofast och reproducerande	Hög risk 2AC,3D	1
<i>Juxtacribrilina mutabilis</i>	Bryozoa	100	Bofast och reproducerande	Ej bedömd	2
<i>Marenzelleria neglecta</i>	Annelida	100	Bofast och reproducerande	Mycket hög risk 4ABC,3FG	3
<i>Mnemiopsis leidyi</i>	Ctenophora	100	Bofast och reproducerande	Mycket hög risk 4AB,4D	12
<i>Rhithropanopeus harrisii</i>	Arthropoda	100	Bofast och reproducerande	Potentiellt hög risk 4AB,1	1
<i>Sargassum muticum</i>	Ochrophyta	100	Bofast och reproducerande	Hög risk 4A,2DF	1
<i>Thalassiosira punctigera</i>	Bacillariophyta	98,697	Bofast och reproducerande	Låg risk 2AC,1	5
<i>Alcyonidium polyoum</i>	Bryozoa	99,36	Osäkert om påträffad	Ej bedömd	1
<i>Bathycoccus prasinus</i>	Chlorophyta	100	Osäkert om påträffad	Ej bedömd	55
<i>Cyclopina norvegica</i>	Arthropoda	100	Osäkert om påträffad	Ej bedömd	15
<i>Ditrichocorycaeus anglicus</i>	Arthropoda	100	Osäkert om påträffad	Ej bedömd	3
<i>Hydra oligactis</i>	Cnidaria	100	Osäkert om påträffad	Ej bedömd	3
<i>Isochrysis galbana</i>	Haptophyta	99,361	Osäkert om påträffad	Ej bedömd	20
<i>Mesocyclops leuckarti</i>	Arthropoda	100	Osäkert om påträffad	Ej bedömd	1
<i>Oithona similis</i>	Arthropoda	100	Osäkert om påträffad	Ej bedömd	40
<i>Pseudocalanus acuspes</i>	Arthropoda	100	Osäkert om påträffad	Ej bedömd	11
<i>Synchaeta grimpei</i>	Rotifera	99,34	Osäkert om påträffad	Ej bedömd	13
<i>Polydora onagawaensis</i>	Annelida	100	Paträftad, okänt om reprod.	Ej bedömd	13
<i>Laomedea angulata</i>	Cnidaria	99,32	Ej paträftad	Ej bedömd	12
<i>Melinna palmata</i>	Annelida	99,68	Ej paträftad	Ej bedömd	1
<i>Scolecopsis cantabra</i>	Annelida	98,083	Ej paträftad	Ej bedömd	1
<i>Acanthocardia paucicostata</i>	Mollusca	100	inte registrerad	Ej bedömd	1
<i>Acartia hudsonica</i>	Arthropoda	100	inte registrerad	Ej bedömd	45
<i>Amphiporus allucens</i>	Nemertea	99,04	inte registrerad	Ej bedömd	1
<i>Dasya pedicellata</i>	Rhodophyta	98,058	inte registrerad	Ej bedömd	1
<i>Melanochlamys diomedea</i>	Mollusca	100	inte registrerad	Ej bedömd	2
<i>Pilumnus villosissimus</i>	Arthropoda	99,041	inte registrerad	Ej bedömd	3
<i>Pleonexes helleri</i>	Arthropoda	98,722	inte registrerad	Ej bedömd	2
<i>Spio symphyta</i>	Annelida	99,041	inte registrerad	Ej bedömd	2
<i>Stylochus ellipticus</i>	Platyhelminthes	100	inte registrerad	Ej bedömd	1
<i>Tharyx acutus</i>	Annelida	100	inte registrerad	Ej bedömd	15
<i>Theora lubrica</i>	Mollusca	99,358	inte registrerad	Ej bedömd	1
<i>Turbonilla jeffreysii</i>	Mollusca	99,361	inte registrerad	Ej bedömd	1

Taxonomisk fördelning

Under 2025 års provtagningar identifierades främmande arter från sex storgrupper, inklusive Metazoa, Ochrophyta, Haptophyta, Chlorophyta, Rhodophyta, Bacillariophyta. Detta indikerar att de primers som används kan upptäcka ett brett taxonomiska spektrum av främmande och invasiva arter.

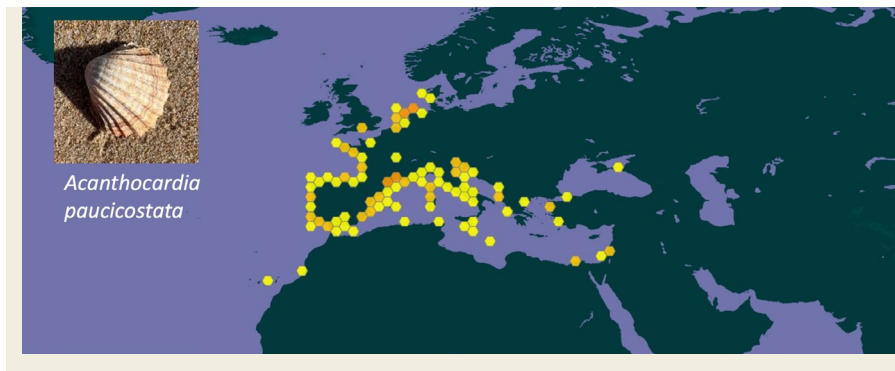


Geografisk utbredning

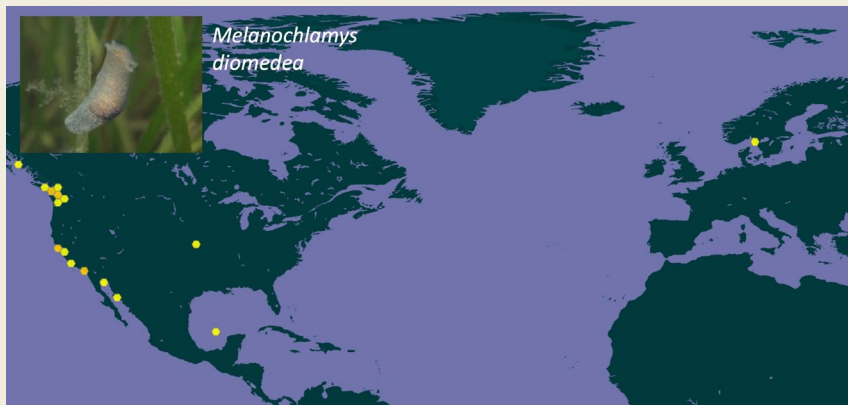
Bland de 431 observationer från provtagningen under 2025 kan vi inte se en förändring i utbredningsområden för de 14 främmande arter som redan är bofasta och reproducerande i Sverige.

Arter av särskilt intresse

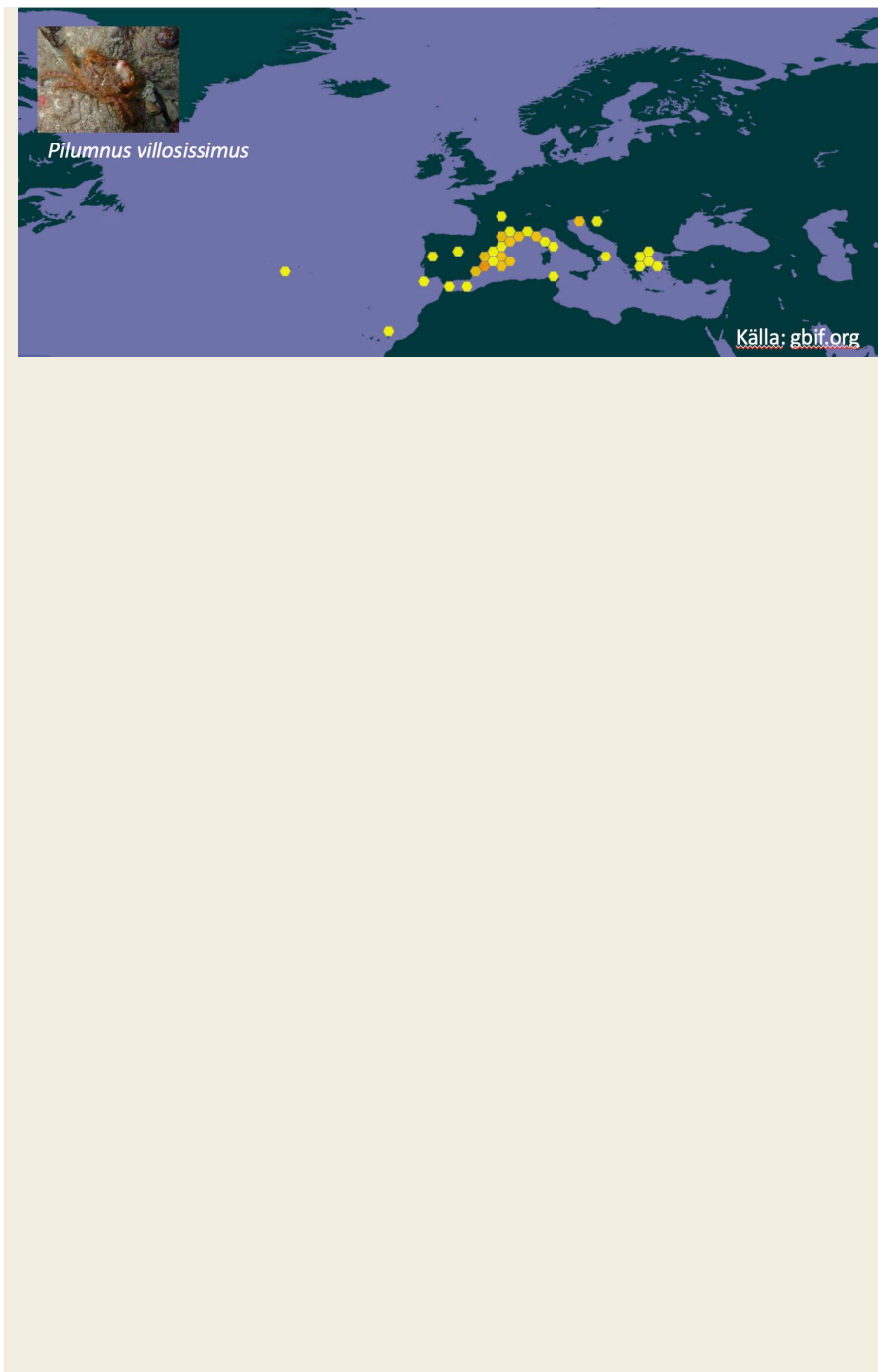
***Acanthocardia paucicostata* (Mollusca, Bivalvia).** Hittades i Stenungsund i ett vårprov. Arten finns i närheten och sekvenserna är 100% lik med referenssekvenser från Nederländerna. Signalen är svag (4 reads). Det skulle kunna vara larvstadier.



Melanochlamys diomedea (Mollusca, Gastropoda). Hittades i Göteborg. Ursprunget vid USA's västkust. Tidigare observerad med genetiska metoder. Borde följas up med taxonomisk expert. Personligt korrespondans med Kennet Lundin, Göteborgs Naturhistoriska Museum: "Melanochlamys diomedea är intressant för att jag har fått in en mystisk, helt mörk philinid snäcka från Öresund som jag skickat vävnadsprov för DNA till riksmuseet och väntar på svar. Det skulle kunna vara den."



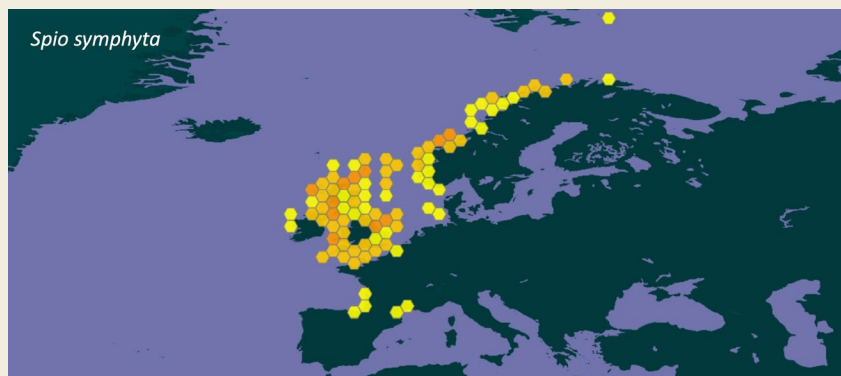
Pilumnus villosissimus (Arthropoda, Decapoda). Endast känd från medelhavsområde. Hittades i tre vattenprover i hötsprovtagning i Stenungssund med en haplotyp (ASV1187_NIS2025) och låg antal läsningar (27 reads i tre prover) och 99,04% likhet med två referenssekvenser. Detta betyder en svag signal, men kräftdjur släpper inte mycket DNA. Släktrådet är dock intressant för den visar ett långt genetiskt avstånd till den inhemska arten *P. hirtellus*. Sammanlagt finns det inget argument att avfärda denna observation som artefakt och det är möjligt att det är en ny art. Borde följas upp med taxonomisk expert.



***Pleonexes helleri* (Arthropoda, Amphipoda).** Arten är känd från regionen men inte rapporterats från Sverige. Signal hittades i 2 höstprover från Stenungssund och Göteborg. Likhet med 4 referenssekvenser är 98,72%.



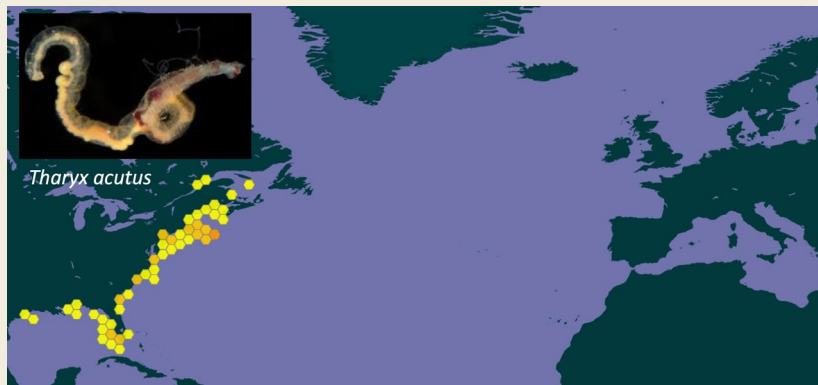
***Spio symphyta* (Annelida, Polychaeta).** Havsborstmask från nordost atlanten. Hittades i båda hamnar. Inte registrerad hos Artfakta, men tidigare rapporterad från Västkusten.



***Stylochus ellipticus* (Platyhelminthes).** Hittades endast i ett prov från Göteborg, men återfanns 2024 från provtagning i Stenungsund och Helsingborg. Känt utbredningsområde är Nordamerikas ostkust men arten har rapporterats nyligen från Tyskland. Antagligen pågående etablering.



***Tharyx acutus* (Annelida, Polychaeta).** Havsborstmask från Amerikas ostkust. Hittas ofta i både hamnar och även i tidigare provtagningar. Detta indikerar att arten möjligen är lokalt etablerad. En nära släkting *Tharyx killariensis* finns i Sverige och två nya arter av *Tharyx* har nyligen beskrivits från området (Blake and James 2015). Det är möjligt att *T. setigera* är missidentifierad på grund av saknande referenssekvenser för dessa arter i BOLD. Fynden bör därför bekräftas genom en molekylärsystematisk undersökning för dessa arter.



***Theora lubrica* (Mollusca, Bivalvia).** Verkar etablerad jorden runt med ursprung i Asien. Fynd rapporterats nyligen från UK och Belgien.



***Turbonilla jeffreysii* (Mollusca, Gastropoda).** Påträffades i Göteborg. Svenska referensfynd kommer från Kennet Lundin. Från Kennet L: "Det giltiga namnet för *Turbonilla* (*Pyrgiscus*) *jeffreysii* är nu *Pyrgisculus jeffreysii* (Jeffreys, 1848) enligt Molluscabase.", men i Artfakta finns arten som *Pyrgiscus jeffreysii* (Jeffreys, 1848) utan observationsrapporter.



Slutsatser och rekommendationer

Övervakning av kända främmande arter

Man kan konstatera att den genetiska metoden fungerar bra och den återfinner många kända främmande arter samt en rad förmodade nya arter. Observationer av de kända arterna är särskilt användbar för uppskattning av både populationsstorlek och geografisk utbredning av främmande arter i regionen.

Det nuvarande protokollet är lämpligt med hänsyn till provtagningens fördelning över vår och höst samt fördelning mellan vattenprover och planktonprover.

Resultaten ger en bred taxonomisk täckning men vissa grupper som är viktigt att övervaka (tex fisk) är inte representerad för denna metabarkodning. Det kan vara lämplig att komplettera övervakningsprogram med specifika molekyllära markörer för till exempel fiskarter.

Upptäckt av nya främmande arter

Observationer av nya arter skall tolkas med försiktighet på grund av risk för falska positiva resultat. Felaktiga observationer kan uppstå i den bioinformatiska processen, genom kontaminering, eller genom felaktig identifikation av nära besläktade arter. Dessutom kan många sällsynta arter observeras som nya i ett område som aldrig undersökts med

känsliga genetiska metoder. Observationerna av nya arter kan användas som en tidig signal och i vissa fall vara värt att följa upp, dvs. om det finns en invasiv risk med ekologiska negativa konsekvenser. Alla observationer av nya arter borde ingå i en regelbunden revision av potentiella "dörrknackare arter" som befinner sig i närområdet och har upptäckts i grannländerna.

Geografisk utbredningen av främmande arter

Analysen av förändringar i den geografiska utbredningen av de identifierade arterna är begränsad på grund av begränsat antal lokaler. Metoden och upplägget av denna regionala undersökning är dock kompatibel med det kommande nationella övervakningsprogrammet för främmande arter och resultaten från hamnarna längs Västra Götaland kommer inkluderas i en större biogeografiska analys under 2026.

Japanisk venusmussla, *Ruditapes philippinarum*

Vi observerade den japanska venusmusslan *Ruditapes philippinarum* i ett av vattenproverna från Stenungsund (med 99,7% likhet till referenssekvenser). En djupare analys visade dock att signalen var mycket svag (>3 reads) och dessutom fanns i en av de negativa kontrollerna och därför exkluderades denna observation. Men i efterhand fick vi veta att denna art rapporterades i Strömstad i februari 2025 samt att en inventering är gjord som visar att den redan är etablerad i norra Bohuslän. Flera metoder har även testats för eventuell bekämpning framöver (Youk et al 2025).

Uppföljning av intressanta observationer

Vi rekommendera att försöka verifiera observationerna av de särskilt intressanta arter genom att göra genetiska jämförelse med nära släktingar som finns i närområdet, samt konsultation med taxonomiska experter för dessa grupper. För de arter där fynden visar sig inte vara felbestämning rekommenderas det att göra en riskbedömning med experter, ansöka hos artdatabanken för att skapa en TaxonID, och försöka vidare kartlägga artens utbredning i svenskt vatten.

Referenser

- Blake, J. A., Göransson, P. (2015) Redescription of *Tharyx killariensis* (Southern) from Ireland and description of two new species of *Tharyx* from the Kattegat, Sweden (Polychaeta, Cirratulidae). *Zootaxa* 4039 4 (2015): 501-15. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.4039.4.1>
- Buchner, D., & Leese, F. (2020). BOLDigger - a Python package to identify and organise sequences with the Barcode of Life Data systems. *Metabarcoding and Metagenomics*, 4, 19–21. <https://doi.org/10.3897/mbmg.4.53535>
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP (2016) DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* 13(7):581–583. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>
- Charif, D., & Lobry, J. R. (2007). Seqin{R} 1.0-2: a contributed package to the {R} project for statistical computing devoted to biological sequences retrieval and analysis. In U. Bastolla, M. Porto, H. E. Roman, & M. Vendruscolo (Eds.), *Structural approaches to sequence evolution: Molecules, networks, populations* (pp. 207–232). Springer Verlag.
- Costello, M. J., Ahyong, S., Bieler, R., Boudouresque, C., Desiderato, A., Downey, R., Galil, B. S., Gollasch, S., Hutchings, P., Kamburska, L., Katsanevakis, S., Kupriyanova, E., Lejeune, C., Ma, K. C. K., Marchini, A., Occhipinti, A., Pagad, S., Panov, V. E., Poore, G. C. B., ... Zhan, A. (2024). World Register of Introduced Marine Species (WRiMS). WoRMS Editorial Board. <https://www.marinespecies.org/introduced>
- Daraghmeh, N. (2024). ARMS-MBON 18S rRNA and COI gene metabarcoding: scanning for non-indigenous species. *protocols.io* <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.n92ldmmml5b/v1>
- Daraghmeh N, Exter K, Pagnier J, Balazy P, Cancio I, Chatzigeorgiou G, Chatzinikolaou E, Chelchowski M, Christmas NAM, Comtet T, Dailianis T, Deneudt K, Diaz De Cerio O, Digenis M, Gerovasileiou V, Gonzalez J, Kauppi L, Kristoffersen JB, Kuklinski P, Obst M (2024) A long-term ecological research data set from the marine genetic monitoring programme ARMS-MBON 2018–2020. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.14073>
- Davis, N., Proctor, D., Holmes, S., Relman, D., Callahan, B. (2018). Simple statistical identification and removal of contaminant sequences in marker-gene and metagenomics data. *Microbiome*. 6. 10.1186/s40168-018-0605-2.
- Dragulescu, A., & Arendt, C. (2020). *xlsx: Read, Write, Format Excel 2007*

and Excel 97/2000/XP/2003 Files. <https://cran.r-project.org/package=xlsx>

Geller, J., Meyer, C., Parker, M., and Hawk, H (2013) Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. *Molecular Ecology Resources* 13 (5): 851–61. doi:10.1111/1755-0998.12138.

Leray, M., Yang, J.Y., Meyer, C.P., Mills, S.C., Agudelo, N., Ranwez, V., Boehm, J.T., and Machida, R.J (2013). A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Front. Zool.* 10 (1): 34. *Frontiers in Zoology*. doi:10.1186/1742-9994-10-34.

Malani, N. V. (2021). hiReadsProcessor: Functions to process LM-PCR reads from 454/Illumina data.

Martin, M. (2011) Cutadapt Removes Adapter Sequences from High-Throughput Sequencing Reads. *EMBnet Journal*, 17, 10-12.

Morgan, M., Anders, S., Lawrence, M., Aboyoun, P., Pagès, H., & Gentleman, R. (2009). {ShortRead}: a {B}ioconductor package for input, quality assessment and exploration of high-throughput sequence data. *Bioinformatics*, 25, 2607–2608.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp450>

Pagès, H., Aboyoun, P., Gentleman, R., & DebRoy, S. (2020). Biostrings: Efficient manipulation of biological strings.
<https://bioconductor.org/packages/Biostrings>

Panova M, Breidenbach M, Sundberg (2024) eDNA-analys av främmande invasiva fiskar och musslor i Jönköpings län 2022. Länsstyrelsen i Jönköpings län. Rapport 2024:16. ISSN 1101-9425.
<https://www.lansstyrelsen.se/publikation?entry=381&context=25>

Ranwez, V., Douzery, E. J. P., Cambon, C., Chantret, N., & Delsuc, F. (2018). MACSE v2: Toolkit for the alignment of coding sequences accounting for frameshifts and stop codons. *Molecular Biology and Evolution*, 35(10), 2582–2584. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy159>

Ratnasingham, S., & Hebert, P. D. N. (2007). bold: The Barcode of Life Data System

R Core Team. (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org>

Schultz, J. A., & Hebert, P. D. N. (2022). Do pseudogenes pose a problem for metabarcoding marine animal communities? *Molecular Ecology*

Resources. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13667>

Sundberg, P., Axberg, A., Daragmeh, N., Panova, M. & Obst, M. (2022). Genetic methods in environmental monitoring. Early detection and monitoring of non-indigenous species based on DNA. Havs- och vattenmyndigheten Rapport 2022:4, ISBN: 978-91-89329-32-4

Sundberg P, Axberg A, Wocken Y (2021) Övervakning av flodpärlmussla (Margaritifera margaritifera) i vattenförekomst Fulan baserat på eDNA och dPCR. Rapport till Sälens kommun, Malung. Rapport nr. 2021:11.

Wickham, H. (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York. <https://ggplot2.tidyverse.org>

Wickham, H., François, R., Henry, L., & Müller, K. (2023). dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R package version 1.1.2. <https://cran.r-project.org/package=dplyr>

Wocken Y, Axberg A, Panova M, Obst M, Sundberg P (2021) eDNA och flodpärlmussla (Margaritifera margaritifera) i Tallån, Skellefteå Kommun - en pilotstudie baserad på dPCR analys. Intern rapport 2021:06.

Youk Greeve, Mats Lindegarh, Marina Panova, Åsa Strand (2025) Länsstyrelsen rapport 2025:46. Skydd av kustmiljöer genom övervakning av japansk venusmussla.

Bilaga 1

Fältrapporter, provtagning och insamlingsdata

Försommar provtagning

Stenungsund (STE1)

Provtagning: Anna-Karin Eriksson och Tim Dorup: 2025-06-07

På yttre bryggan utanför Ellen Yachting nära Talludden: Position N 58.07529, E 11.81445. Salthalt 13‰, vattentemp. 23,9°C, NE vind 5 m/s.

I tabellerna nedan anges totalkoncentration av DNA i varje prov

eDNA

prov	filtrerad volym (liter)	koncentration DNA (ng/µl per prov)	kommentar
STE1_1_S_WA	1	6.8	
STE1_2_S_WA	1	9.12	
STE1_3_S_WA	1	9.4	
STE1_4_S_WA	1	9.52	
STE1_5_S_WA	1	11	
STE1_6_S_WA	1	8.32	
STE1_7_S_WA	1	4.52	
STE1_8_S_WA	1	14.5	
STE1_9_S_WA	1	10.4	
STE1_10_S_WA	1	9.16	
blank	0,5	"Too Low"	

Plankton

eDNA i hamnar 2025

prov	koncentration DNA (ng/µl per prov)	kommentar
STE1_1_S_PL	32.9	
STE1_2_S_PL	64.8	
STE1_3_S_PL	78	

Göteborg, Krossholmen (KRO1)

Provtagning: Anna-Karin Eriksson och Tim Dorup: 2025-06-07

Småbåtshamnen Krossholmen på yttre brygga.: Position N 57,69279. E 11.76892. Salthalt 15‰, vattentemp. 15,2 °C, NE 3 m/s.

I tabellerna nedan anges totalkoncentration av DNA i varje prov

eDNA

prov	filtrerad volym (liter)	koncentration DNA (ng/µl per prov)	kommentar
KRO1_1_S_WA	1	11.1	
KRO1_2_S_WA	1	14.8	
KRO1_3_S_WA	1	20.9	
KRO1_4_S_WA	1	22.8	
KRO1_5_S_WA	1	19.1	
KRO1_6_S_WA	1	18.1	
KRO1_7_S_WA	1	22.2	
KRO1_8_S_WA	1	18.8	
KRO1_9_S_WA	1	12.5	
KRO1_10_S_WA	1	13.2	
Blank	0,5	"Too Low"	

Plankton

eDNA i hamnar 2025

prov	koncentration DNA (ng/µl per prov)	kommentar
KRO1_1_S_PL	"Too High"	
KRO1_2_S_PL	166	
KRO1_3_S_PL	38.6	

Höst provtagning

Stenungsund (STE1)

Provtagning: Anna-Karin Eriksson och Tim Dorup: 2025-08-30

På yttre bryggan utanför Ellen Yachting nära Talludden: Position N 58.07529, E 11.81471. Salthalt 17‰, vattentemp. 18,5 °C, SE vind 2 m/s.

I tabellerna nedan anges totalkoncentration av DNA i varje prov

eDNA

prov	filtrerad volym (liter)	koncentration DNA (ng/µl per prov)	kommentar
STE1_1_A_WA	1,0	16.9	
STE1_2_A_WA	0,8	35.8	
STE1_3_A_WA	1,0	22.2	
STE1_4_A_WA	0,8	14.2	
STE1_5_A_WA	1,0	25.9	
STE1_6_A_WA	0,8	9.96	
STE1_7_A_WA	0,8	18.8	
STE1_8_A_WA	0,5	34.9	
STE1_9_A_WA	0,8	4.84	
STE1_10_A_WA	0,8	18.7	
blank	1,0	"Too Low"	

Plankton

eDNA i hamnar 2025

prov	koncentration DNA (ng/µl per prov)	kommentar
STE1_1_A_PL	1.26	
STE1_2_A_PL	1.43	
STE1_3_A_PL	"Too Low"	

Göteborg, Krossholmen (KRO1)

Provtagning: Anna-Karin Eriksson och Tim Dorup: 2025-08-31

Småbåtshamnen Krossholmen på yttre brygga.: Position N 57,69279. E 11.76843. Salthalt 10‰, vattentemp. 18,3 °C, S 4 m/s.

I tabellerna nedan anges totalkoncentration av DNA i varje prov

eDNA

prov	filtrerad volym (liter)	koncentration DNA (ng/µl per prov)	kommentar
KRO1_1_A_WA	0,6	12.2	
KRO1_2_A_WA	0,6	9.32	
KRO1_3_A_WA	0,8	12.3	
KRO1_4_A_WA	0,9	11.2	
KRO1_5_A_WA	0,8	7	
KRO1_6_A_WA	0,8	8.48	
KRO1_7_A_WA	0,9	25	
KRO1_8_A_WA	0,8	17.6	
KRO1_9_A_WA	0,9	11.6	
KRO1_10_A_WA	1,0	17	
Blank	1,0	"Too Low"	

Plankton

eDNA i hamnar 2025

prov	koncentration DNA (ng/ μ l per prov)	kommentar
KRO1_1_A_PL	"Too Low"	
KRO1_2_A_PL	"Too Low"	
KRO1_3_A_PL	2.56	

Bilaga 2

Molekylärbiologisk arbete och bioinformatisk analys

Extraktion av DNA

DNA från prover från filtren extraherades med Nucleospin eDNA Water (Machery-Nagel) och DNA från plankton prover extraherades med DNeasy Power Soil kit (Qiagen). Totala mängden DNA mättes med Qubit fluorometer för att säkerställa att extraktionerna har fungerat. DNA koncentrationer från vattenprover varierade mellan 0,6 – 96 ng/μl (genomsnitt 27 ng/μl); fåtal prover hade för låga DNA koncentrationer för att mäta. DNA koncentrationer från planktonprover varierade mellan 0,4 – 59 ng/μl (genomsnitt 8 ng/μl); fåtal prover hade för låga DNA koncentrationer för att mäta. Ingen DNA kunde mätas i negativa kontroller.

Metabarkoding bibliotekpreparation och sekvensering

Metabarkoding fragment av COI genen (313 bp) amplifierades med mlCOIintF (GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC; Leray et al. 2013) och dgHCOI2198 (TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA, Geller et al. 2013) primrar enligt protokollet utvecklad av den europeiska övervakningsprogram ARMS MBON (<http://arms-mbon.github.io>).

PCR reaktioner utfördes i 30 ul volym innehållande 3 ul KaPa Buffer A 10x, 0.6 ul MgCl₂ 25 mM, 0.8 ul dNTP 10 mM each, 0.6 ul BSA 20 mg/ml, 0.9 ul KaPa Taq 5 U/ul, 1.8 ul forward och revers primrar 10 uM, 2 ul DNA och 18,5 ul vatten. PCR cykling var 95 °C för 5 min; 16 cykler med 95 °C för 10 s, 62 °C -1°C /per cykel för 30s, 72 °C för 1 min; 24 cykler med 95 °C för 10 s, 46°C för 30s, 72 °C för 1 min och sista steg 72 °C för 7 min. Fem ul från varje PCR reaktion analyserades med hjälp av gel elektrofores för att säkerställa att PCR fungerade. Två PCR reaktioner gjordes för varje prov och poolades för att minimera slumpmässig variation i amplifieringen. PCR produkter rengjordes från rester av primer osv. med hjälp av magnetiska beads AMPure XP beads (Beckman Coulter) enligt Illumina protokoll (https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf).

Rensade PCR produkter amplifierades i nästa PCR för att fästa barkoder (korta DNA sekvenser olika för varje prov) och primrar för sekvenseringen i en Illumina maskin. PCRen gjordes i 50 ul volym innehållande 25 ul KaPa HiFi HotStart ReadyMix 2x (Roche), 5 ul av Illumina Nextera XT i5 och i7 barkoder, 10 ul rensade PCR produkten och 10 ul vatten. PCR cykling var 95 °C för 2 min; 10 cykler med 95 °C för 30 s, 55 °C för 30s, 72 °C för 30 s min; och sista steg 72 °C för 5 min. PCR produkter (nu kallade "bibliotek") rensades igen med magnetiska beads och bibliotekkoncentrationer mättes med Qubit. Inför sekvenseringen poolades lika mängder DNA från varje bibliotek.

Varje PCR innehöll en negativ kontroll (vatten istället för DNA) tillsammans med negativa kontroller från fält och negativa kontroller från DNA extraktioner för att kontrollera kontaminering under provtagning, DNA extraktion och PCR. Analyserna inkluderade också en positiv kontroll - ett blandat DNA från 8 kända evertebratarter för att kontrollera att PCR fungerar tillfredställande.

Sekvensering utfördes av Core Facility at Sahlgrenska universitetssjukhus på Illumina MiSeq plattformen med 500 cykler (2 x 250 bp).

Bioinformatisk protokoll

Ett beräkningsprotokoll med detaljerade beskrivningar av bioinformatisk bearbetning av sekvenseringsdata och efterföljande identifiering av främmande arter har publicerats (Daraghme 2024). Vi beskriver kort proceduren samt parameterinställningar nedanför och hänvisar till det publicerade protokollet av Daraghme (2024) för all kod och programvara som används.

Råavläsningar (raw reads) behandlades i R v4.3.1 (R Core Team, 2021). Primersekvenser togs bort med cutadapt v4.5 (Martin, 2011) med en maximal mismatchning på 1 och 2 baspar (bp) (dvs. en maximal felfrekvens på 1,01 och = 0,5S och 0,5S). Därefter bearbetades läsningar med R-paketet DADA2 v1.28.0 (Callahan et al., 2016). Eftersom varje sekvenseringskörning uppvisar en distinkt felprofil, utfördes bearbetningen separat för de råa läsningarna av varje körning. Efter visuell observation av kvalitetsprofiler för varje körning, utfördes avläsningstrimning för att markören skulle behålla avläsningar med ett ungefärligt lägsta kvalitetspoäng på 30. Framåtläsningar trimmades till en längd av 200 bp och omvända avläsningar till 130 bp. Avläsningar som var kortare än detta förkastades. Därefter genererades en felmodell för de trimmade och filtrerade läsningarna. Pseudopooling användes för att tillåta både högre känslighet för ASV-anrop och rimlig beräkningstid.

Framåt- och bakåtläsningar av parade ändrar slogs samman med en

minsta överlappning på 10 bp, vilket medgav en maximal mismatch på 1 bp och kasserade läsningar som inte kunde slås samman. Därefter slogs ASV-tabeller för varje körning samman. Chimära sekvenser som identifierats av DADA2:s `removeBimeraDenovo`-funktion togs bort, liksom singletons, dvs sekvenser med en total läsmängd på 1 över hela datamängden. Läsnummer som återstår i varje prov spårades genom varje steg i pipelinen och visas i Appendix 2.

Eftersom mitokondriella pseudogener (NUMT) utgör en utmaning för DNA-metabarcoding-studier som bygger på nukleotidskillnader i mitokondriella amplikoner (Andújar et al., 2021; Schultz et al., 2022) togs förmodade NUMTs bort från vår COI's ASV-dataset. See Ranwez et al. (2018) och Daraghmeh (2024) för detaljer.

Dekontaminering (blank correction) genomfördes genom att förkasta potentiella kontamineringssekvenser med R paketet `decontam` v1.20.0 (Davis et al. 2018). Sekvenser som identifierades av `decontam` med flera läsningar i negativa kontroll prover eller som blev klassifierad som kontaminant taxa (e.g., *Insecta*, *Homo sapiens*, etc.) kasserades.

Ytterligare R-paket som används under alla tidigare beskrivna steg inkluderar `ggplot2` v3.4.3 (Wickham, 2016), `Biostrings` v2.68.1 (Pagès et al., 2020), `ShortRead` v1.58.0 (Morgan et al., 2009), `hiReadsProcessor` v1.29.1 (Malani, 2021), `dplyr` (Wickham et al., 2023) och `seqinr` v4.2.30 (Charif & Lobry, 2007).

Taxonomy tilldelades för ASV:erna med hjälp av två referensdatabaser via två klassificeringsverktyg. Barcode of Life Data System (BOLD) (Ratnasingham & Hebert, 2007) nåddes med `BOLDigger-commandline` v2.2.1 (Buchner & Leese, 2020) och toppträffen valdes med `BOLDigger`-metoden. Tröskkeln för indentifiering sattes till över 98% på artsnivå.

Screening för främmande arter

För att hitta främmande arter jämfördes de identifierade arterna med tre artlistor (referensbibliotek).

1. Artdatabankens checklist med 4.119 introducerade arter.
2. Artdatabankens checklist med 14.919 temporära/icke observerade arter.
3. Artdatabankens checklist med 59.133 bofasta & reproducerande) där matchande arter filtrerats bort. Därefter granskades resterade observationer manuellt för arter som är varken registrerad som bofast, temporärt, eller introducerad.

Alla individuella listor slogs sedan samman i R med paket som nämns ovan och xlsx v0.6.5-paketet (Dragulescu & Arendt, 2020) för att generera en slutlig lista som innehåller unika taxa som finns i Artdatabanken eller GBIF.

Datahantering

All råsekvensdata är offentligt tillgängliga i European Nucleotide Archive (ENA) under projektnummer PRJEB106315 (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/view/PRJEB106315>).

Artsobservation tillsammans med de genetiska sekvenserna är tillgängliga och sökbart via SBDI portalen (<http://asv-portal.biodiversitydata.se>) och GBIF (<http://gbif.org>) från Mars 2026.

De 431 observationer av främmande arter har rapporterats till SLU Artdatabanken och granskats av samordnaren för främmande arter (Rahmat Naddafi). Alla observationer av arter som är registrerat i Dyntaxa som "bofast och reproducerande" kommer publiceras i Artportalen från februari 2026.



Länstyrelsen
Västra Götaland

lansstyrelsen.se/vastragotaland