GRIP on LIFE

Inventering av flodpärlmusslor

Med eDNA teknik i Hallands län 2022

2023-03-29

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

Författare
Marie Andersson, Calluna AB

Beställare
Helena Westberg, Länsstyrelsen Halland

Omslag
Bild på provtagningsflaskor vid Tvååkersån, foto av Marie Andersson, Calluna AB

Diarienummer hos Länsstyrelsen i Hallands län: 3138-2023
Meddelandeserien: 2023:07
ISSN:nr 1101-1084
ISRN:nr LSTY-N-M—2023/07--SE

Med bidrag från Europeiska unionens LIFE-program

Innehåll

Förord 4

Sammanfattning 5

Inledning 6

Allmänt om eDNA 7

Allmänt om flodpärlmussla 8

Metod och material 9

Resultat 15

Diskussion 16

Referenser 17

Bilaga 1. Fältprotokoll

Bilaga 2. DNA-anakys av vattentprover Centrum för genetisk Identifiering

Förord

Population av flodpärlmusslan har gått kraftigt tillbaka under de senaste 100 åren i hela sitt utbredningsområde. Arten är hotad internationellt och bedöms som starkt hotad i den svenska rödlistan. Sedan början av 1900-talet har flodpärlmusslan försvunnit från mer en än tredjedel av vattendragen. Den kraftiga tillbakagången orsakas av olika faktorer såsom föroreningar, försämrad vattenkvalitet, habitatförsämring, pärlfiske, vattennära markanvändning, brist på värdfiskar, vattenkraft och dammar. En stor andel av de kända populationerna av flodpärlmusslor finns i Sverige. Detta gör att vi har ett internationellt ansvar för att bevara och förstärka beståndet.

Under 2022 har Länsstyrelsen i Hallands län genomförd en inventering av flodpärlmusslor med eDNA-teknik för att öka kunskapen om förekomst av arten i länet. Genom att genomföra övervakningen med eDNA-teknik, som ett komplement till den traditionella metoden, kan vi öka vår kunskap om flodpärlmusslans utbredning i länet. Syfte med inventeringen var att förbättra kartläggningen av flodpärlmusslornas bestånd i Hallands län. Arbetet kommer även att ge ytterligare underlag för planering av eventuella åtgärder.

Rapporten har tagits fram av Calluna AB på uppdrag av Länsstyrelsen i Hallands län. Uppdraget har genomförts i samverkan med Centrum för Genetisk Identifiering, Naturhistoriska riksmuseet.

Kristianstad, mars 2023.

Marie Andersson
Miljökonsult, Calluna AB.

Sammanfattning

Inventeringar av flodpärlmussla (*Margaritifera margaritifera*) har genomförts regelbundet i Hallands vattendrag under det senaste decenniet. Situationen för arten är oroväckande och inventeringarna visar att flodpärlmusslornas bestånd har minskat kraftigt. Inventeringar av flodpärlmusslorna sker framför allt med den traditionella metoden som innebär att undersöka vattendragen och leta efter flodpärlmusslor med vattenkikare. Även om den traditionella metoden har många fördelar kan den vara tidskrävande och även omöjligt att utföra i vissa områden.

Under den senaste tioårsperioden har övervakningen i vattenmiljöer med hjälp av molekylära metoder som eDNA utvecklas och visat sig lovande. Uttrycket eDNA (environmental DNA) betyder miljö-DNA och innebär att analysera organismers genetiska avtryck i miljön. Metoden är mer känslig och noggrann än den traditionella metoden och kan med fördel användas för att inventera flodpärlmusslor.

Syftet med projektet var att inventera flodpärlmusslor med eDNA-teknik i olika områden i Halland, från Fylleån i söder till Torpaån i norr. Genom att öka kunskapen om flodpärlmusslornas bestånd i de halländska vattendragen kan Länsstyrelsen och andra aktörer planera effektiva åtgärder och på sikt förstärka beståndet i länet.

I rapporten presenteras resultat från inventeringen för fem olika områden: Torpaån, Tvååker, Mostorpsån, Nissan och Fylleån. Totalt 68 vattenprover fördelade på 30 stationer analyserades för DNA-spår från flodpärlmussla under augusti 2022.

Resultaten gav att endast 2 vattenprover vid Munkhättan (i Mostorpsån) visade positivt DNA-spår av flodpärlmussla. Vid den här lokalen finns också ett bekräftat bestånd av flodpärlmusslor sedan tidigare (Ingvarsson 2007)[1]. Därigenom kan inventeringsmetoden med eDNA-teknik vara en användbar metod för att spåra förekomst av flodpärlmusslor i vattendrag. Övriga vattenprover gav negativt resultat vilket kan tolkas som att flodpärlmusslorna inte finns vid de lokalerna. Samtidigt är det viktigt att förstå de begränsningar som finns med eDNA-tekniken för att tolka resultaten rätt. Chansen att träffa på målartens DNA är beroende på många olika faktorer och trots att arten kan finnas i miljön kan vissa prover ändå visa sig negativt. Därför kan vi inte dra slutsatsen att arten saknas i de områdena.

Att fortsätta övervaka flodpärlmusslor i Hallands län med hjälp av eDNA-teknik, som ett komplement till den traditionella metoden, bör ge en detaljerad kartläggning av beståndet. En fördjupad kunskap om flodpärlmusslornas bestånd är ett viktigt underlag för att planera effektiva åtgärder och förstärka beståndet i Hallands län.

Ingvarsson, P. 2007. *Flodpärlmussla i Hallands län 2005 – en fördjupad undersökning.* Länsstyrelsen i Hallands län. Meddelande 2007:6.

Inledning

Inventeringar av flodpärlmusslor sker regelbundet i Hallands län med den traditionella metoden, som innebär att undersöka vattendragen och leta efter musslor med vattenkikare. Inventeringarna visar att flodpärlmusslors bestånd har minskat kraftigt i Hallands län och att arten riskera att försvinna.

Under det senaste decenniet har övervakningen av akvatisk miljö med hjälp av molekylära metoder som eDNA visat sig lovande. Uttrycket eDNA (environmental DNA) betyder miljö-DNA och innebär att analysera organismers genetiska avtryck i miljön (Bohman 2018)[2]. Den här metoden har redan använts för att inventera flodpärlmusslor med positiva resultat.

Syfte med detta projekt var att undersöka förekomsten av flodpärlmussla med eDNA-teknik i fem olika områden i Hallands län: Torpaån, Tvååker, Mostorpsån, Nissan och Fylleån. Fältarbetet utfördes under augusti 2022. Genom att integrera eDNA-metoden i miljöövervakningsprogrammet kan kunskap av flodpärlmusslornas bestånd i Hallands län förbättras och effektiva åtgärder kan därmed planeras.

[2] Bohman, P. (2018). *eDNA i en droppe vatten. Vattenprovtagning av DNA från fisk, kräftor och musslor – en kunskapssammanställning.* Aqua reports 2018:18. Institutionen för akvatiska resurser, Sveriges lantbruksuniversitet, Drottningholm Lysekil Öregrund. 184 s.

Allmänt om eDNA

Alla organismer lämnar spår efter sig i form av DNA-fragment i luft, vatten och mark (Bohman 2018)[2]. Dessa fragment kan vara till exempel ägg, spermier, slem, fjäll, avföring, urin eller annat. Från vattenprover i vattendrag och sjöar kan man extrahera och analysera dessa DNA-fragment. Olika arter har specifika DNA-uppsättningar vilket ger möjlighet att identifiera vilka arter som befinner sig i omgivningen.

Metoden har öppnat upp möjligheterna inom miljöövervakning och ständig utveckling sker med billigare och effektivare processer. Metoden med eDNA-analys har många fördelar jämför med en traditionell inventeringsmetod. Metodiken för eDNA är enkel, snabb och noggrann och kan upptäcka DNA-fragment från endast få individer vilket lämpar sig för undersökning av just flodpärlmusslor. En annan fördel med metoden är att den är icke-förstörande och även lämplig i svårinventerade eller känsliga områden.

Däremot har metoden sina begränsningar. Den ger inte information om beståndets biomassa, antalet individer eller om individerna är levande eller döda (Bohman 2018)[2]. Dessutom är det komplicerad att lokalisera beståndets ursprung vid positiv utslag. Vattnets hastighet i vattendrag är varierande och DNA-fragmenten har kunnat transporteras i olika utsträckningar.

Allmänt om flodpärlmussla

Flodpärlmusslan (*Margaritifera margaritifera*) är en av Sveriges mest långlivade djurarter med en ålder upp till 280 år. Flodpärlmusslan är en njurformad svartbrun mussla som lever i näringsfattiga, välbuffrade rinnande vatten av god kvalitet och med sten-, grus- eller sandbottnar. Vattnet ska ha tillräckligt hög strömhastighet för att igenslamning inte skall ske. Musslan är en bra indikator för vattenkvalitet och är en paraplyart, det vill säga skyddar man dess miljöer så skyddas många andra arter automatiskt.

Flodpärlmusslor når könsmognad vid 15–20 års ålder och förökar sig sexuellt. Mellan juni och juli släpper hanarna sina spermier i vattenmassan. Honorna suger in vatten och spermier genom inströmningsröret och äggen befruktas. Under flera veckor utvecklas äggen på honornas gälar och kallas för glochidia. Mellan juli och september släpper honmusslorna sina larver i den fria vatten.

Glochidierna är beroende av lax eller öring för att överleva. Larverna hakar sig fast på fiskarnas gälar och stannar där under 9 till 10 månader. På våren släpper larverna taget om fiskarna och ramlar ned på botten av vattendragen. De små musslorna lever sedan helt nedgrävda i bottensediment under flera år.

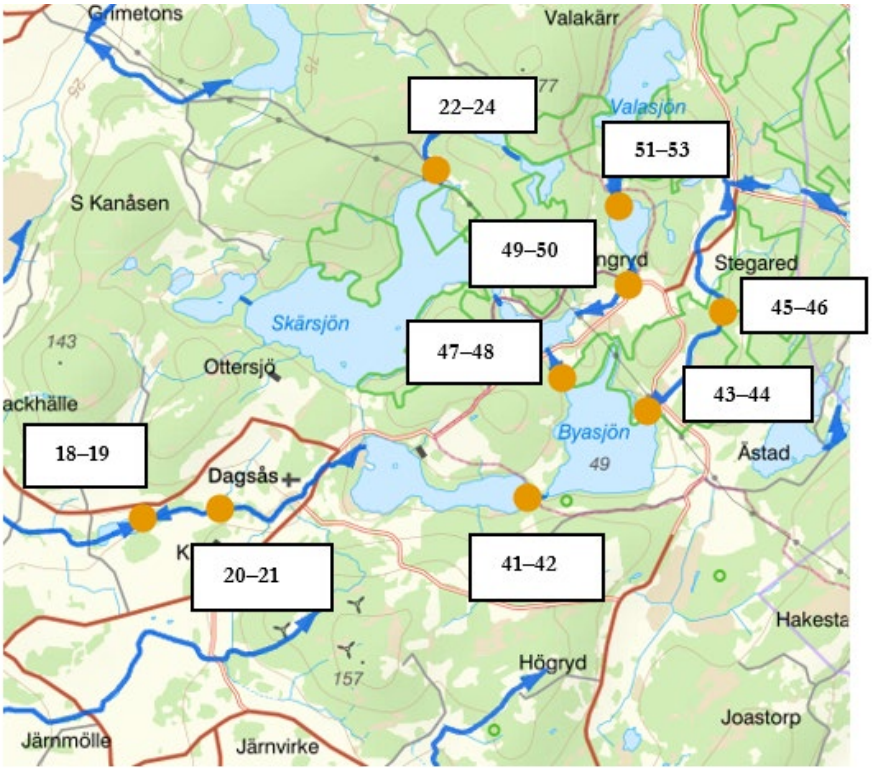
Metod och material

Provtagningarna utfördes mellan den 9 och 17 augusti 2022 i fem olika områden: Torpaån, Tvååker, Mostorpsån/Munkhättan, Nissan och Fylleån (figur 1). Sammanlagt analyserades 68 stycken vattenprover från totalt 30 stationer (figur 2–6) för DNA-spår från flodpärlmussla. Fältprotokollen med koordinater och andra parametrar finns i bilaga 1.

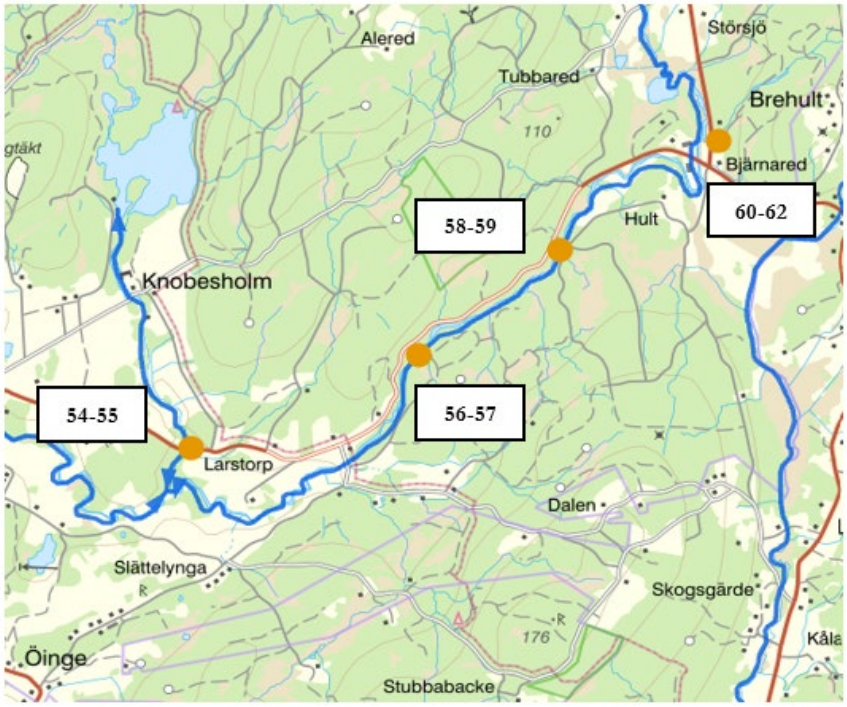
Vid Munkhättan finns ett bekräftat bestånd av flodpärlmusslor. Antalet musslor i beståndet har minskat kraftigt från 3 400 till 1 400 individer mellan inventeringarna från 1980-talet och 2005 (Ingvarsson 2007)[1]. Vid en senare inventering av Länsstyrelsen år 2021 upptäcktes cirka 60 individer vid Brösjön på en 100–200 meter lång sträcka uppströms i samma system. Inga kända bestånd har rapporterats vid de andra provtagningsområdena.

Figur 1. Översiktskarta med de fem provtagningsområdena.

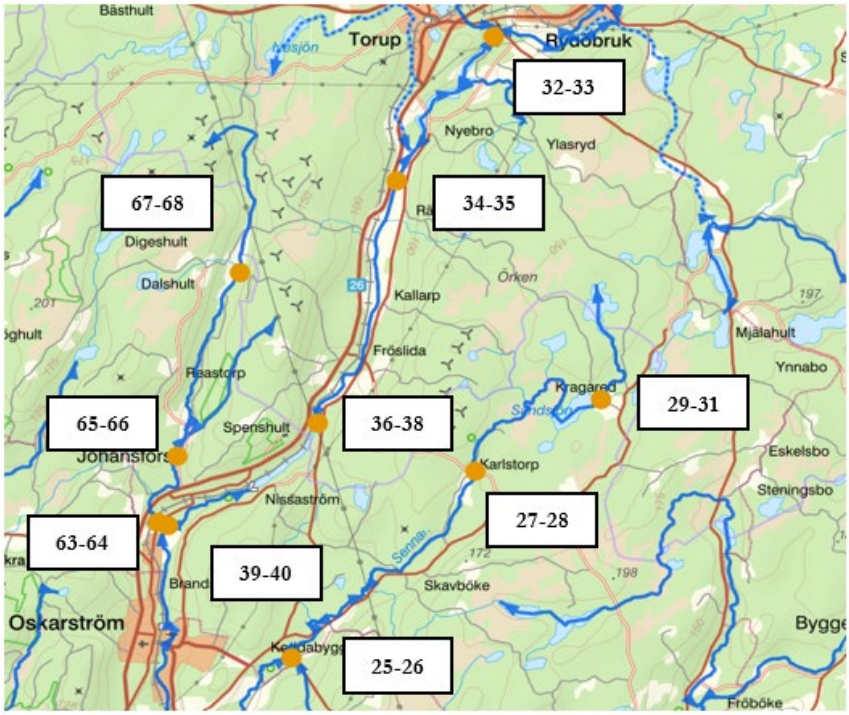
Figur 2. Karta med provtagningsstationer och vattenprov i Torpaån. Kartunderlag ArcGisPro.



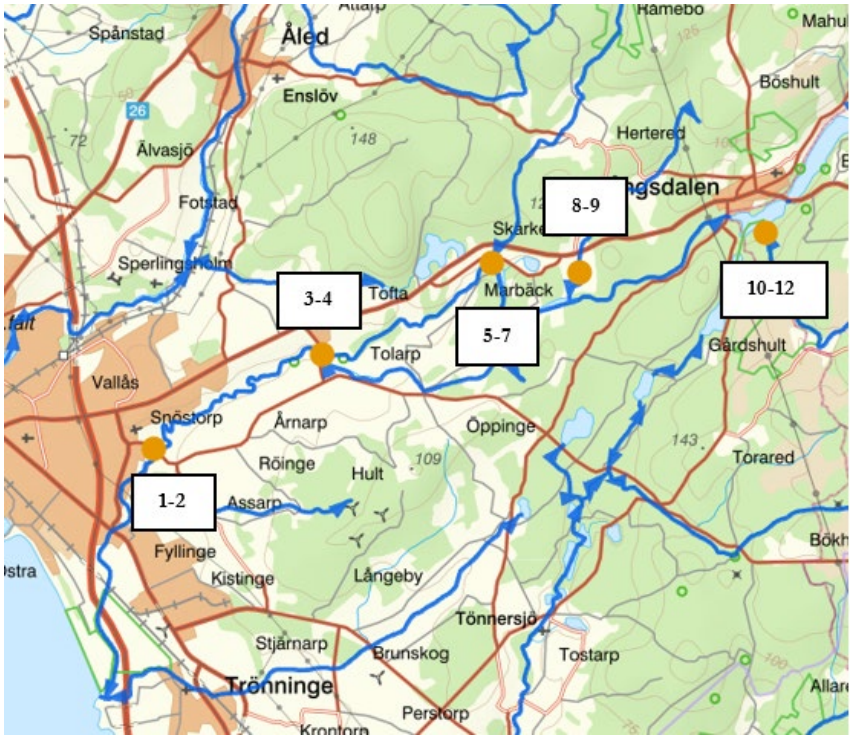
Figur 3. Karta med provtagningsstationer och vattenprov i Tvååker. Kartunderlag ArcGisPro.



Figur 4. Karta med provtagningsstationer och vattenprov i Mostorpsån och Munkhättan. Kartunderlag ArcGisPro.



Figur 5. Karta med provtagningsstationer och vattenprov i Nissan. Kartunderlag ArcGisPro.



Figur 6. Karta med provtagningsstationer och vattenprov i Fylleån. Kartunderlag ArcGisPro.

Vid varje station togs två vattenprover i 500 millilitersflaskor med en teleskopisk stav. För att minimera risken för kontamination mellan provtagningarna användes engångsuppsättningar av provtagnings-kit från Centrum för Genetisk identifiering (Naturhistoriska Riksmuseet) med 500 millilitersflaskor, inkapslat Sylphium-filter med porstorleken 0,8 mikrometer och buffertlösning. Vattnet filtrerades med en peristaltisk pump från Unoson (figur 7). Nya slangar användes mellan varje station. Filtreringen skedde i fält direkt efter provtagningen.

Det inkapslade Sylphium-filtret användes för att fånga upp DNA-partiklar från vattenproverna. Eftersom filtret är inneslutet i en kapsel minskas risken för kontamination. Efter filtreringen tömdes kapseln på vatten och fylldes med 3 milliliter buffertlösning för att avsluta nedbrytningsprocessen och bevara DNA (figur 8).

Figur 7. Peristaltisk Pump från Unoson. Foto Marie Andersson

Figur 8. Injektion av buffert i Sylphium- filtret. Foto Marie Andersson.

Vid var tredje till femte station skapades även ett blankt kontrollprov med kommunalt kranvatten. Detta gjordes för att laboratoriet skulle kunna detektera eventuella kontaminationer. Alla prover förvarades kylda. Allt material desinfekterades med klorin (10% blandning) efter varje station. I samband med provtagningarna togs koordinater, vattentemperatur och bilder.

Alla prover skickades till CGI Centrum för Genetisk identifiering vid Naturhistoriska riksmuseet. Extraktion av DNA genomfördes med Kingfisher™ Cell, Tissue DNA Kit och Kingfisher extraktions-robot enligt tillverkarens instruktioner. Detektion av målorganism-DNA gjordes enligt metodik som Thomsen med flera (2012)[3] fram med ett speciellt instrument (Bio-Rad CFX96).

[3] Thomsen, P.F. et al., 2012. *Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA.* Molecular Ecology, 21(11), pp.2565–2573.

För varje prov gjordes tre tekniska replikat och för att upptäcka förekomst av flodpärlmussla användes primrar från DOI 10.1002/aqc.2788. Samtliga prover gick att analysera.

Arternas levnadsätt och reproduktion påverkar mängden av eDNA i vattendrag. För att öka chansen att fånga upp eDNA från flodpärlmusslor utfördes provtagningar i augusti när flodpärlmusslor släpper sina larver. Vid ståndorten i Mostorpsån/ Munkhättan undersöktes cirka 15 musslor för att se i vilket stadium av förökningsprocessen de befann sig (figur 9 och 10). Musslorna öppnades försiktigt med en speciell tång och gälarna undersöktes för glochidier. Inga glochidier syntes vid undersökningen.

Figur 9. Ståndort Mostorpsån / Munkhättan. Foto Marie Andersson.

Figur 10. Flodpärlmussla ca 6 cm lång. Foto Marie Andersson.

Resultat

Samtliga 68 vattenprover från de 30 stationerna analyserades för DNA-spår från flodpärlmussla av Centrum för Genetisk identifiering. Ingen kontamination detekterades vid kontrollproverna. Resultaten visade att endast 2 vattenprov innehöll DNA-spår av flodpärlmussla (tabell 1). De positiva vattenproverna togs i punkt 60 och 61 vid Mostorpsån/ Munkhättan (figur 4). Detta är samma lokal som man sedan tidigare känner till att flodpärlmusslor finns. Alla andra vattenprover analyserades negativt, det vill säga de visade inga spår av flodpärlmusslor. Detaljerade resultat från Centrum av Genetisk identifiering finns i bilaga 2.

Tabell 1. Provnummer och provplats med eDNA-spår från flodpärlmussla. Koordinater anges i Sweref 99 TM. Volym anger mängden provvatten som filtrerades.

Prov	***Plats***	***Koordinat N***	***Koordinat E***	***Datum***	***Volym***	***Resultat***
60	Mostorpsån Munkhättan	6305809	365345	2022-08-17	500 ml	Positiv
61	Mostorpsån Munkhättan	6305809	365345	2022-08-17	500 ml	Positiv

Diskussion

Vid vår undersökning under 2022 analyserades vattenproverna positivt vid Mostorpsån/Munkhättan, där en population av flodpärlmussla är bekräftad sedan tidigare (Ingvarsson 2007)[1]. Resultaten visar därmed att inventeringsmetoden med eDNA-teknik kan användas för att spåra förekomst av flodpärlmusslor i vattendrag. Att alla andra vattenprover analyserades negativt kan bero på många faktorer. Detta kan naturligtvis betyda att flodpärlmusslorna inte finns vid de andra undersökta lokalerna. Men eDNA-teknik har begränsningar och resultaten måste därför tolkas med försiktighet. Chansen att träffa på målartens DNA är beroende på många olika faktorer och trots att arten kan finnas i miljön kan vissa prover ändå visa negativt vid analys. Dessutom är DNA relativt kortlivat i vattenmiljön och försvinner efter några dagar upp till två veckor, vilket minskar chansen för att få positiv eDNA-analys.

Det är även viktigt att påpeka att eDNA-analys endast ger resultat om arten finns eller inte i området, men ingen information om till exempel beståndets storlek, könsfördelning och hälsostatus. Samtidigt har metoden med eDNA utvecklat snabbt de senaste åren och har visat sig lovande inom miljöövervakning tack vare sina fördelar. Metodiken är mer känslig och noggrann än de andra traditionella metoderna och kan därmed upptäcka arter i ett vatten med enbart några fåtal individer. Detta gör metoden anpassad för sällsynta arter såsom flodpärlmussla. En annan fördel med metoden är att den är kostnadseffektiv och anpassad för svårinventerade och känsliga miljöer.

Den traditionella metoden har också sina fördelar och begränsningar. Att inventera musslor med den traditionella metoden har visat sig tidskrävande och även omöjligt i vissa områden, men metoden kan däremot ger detaljerad och värdefull information om till exempel beståndets ursprung och storlek, könsfördelning och hälsostatus.

Även om en majoritet av de proverna var negativa kan vi inte med säkerhet dra slutsatsen att arten saknas i de undersökta områdena. Både den traditionella metoden och eDNA-tekniken har fördelar och begränsningar för att inventera flodpärlmusslor. Att fortsätta övervaka flodpärlmusslorna i Hallands län med hjälp av eDNA-teknik tillsammans med den traditionella inventeringsmetoden bör ge en detaljerad kartläggning av beståndet och bidra till ökad kunskap. En fördjupad kunskap om flodpärlmusslornas bestånd ger underlag för att planera effektiva åtgärder och förstärka beståndet i Hallands län.

Referenser

Bohman, P. (2018). *eDNA i en droppe vatten. Vattenprovtagning av DNA från fisk, kräftor och musslor – en kunskapssammanställning.* Aqua reports 2018:18. Institutionen för akvatiska resurser, Sveriges lantbruksuniversitet, Drottningholm Lysekil Öregrund. 184 s.

Ingvarsson, P. 2007. *Flodpärlmussla i Hallands län 2005 – en fördjupad undersökning.* Länsstyrelsen i Hallands län. Meddelande 2007:6.

Thomsen, P.F. et al., 2012. *Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA.* Molecular Ecology, 21(11), pp.2565–2573.

Bilaga 1. Fältprotokoll

Tabell 2. Provnummer och provplats för samtliga 68 prover. Koordinater anges i Sweref 99 TM. Temperatur anger vattentemperatur vid provtagningstillfället. Volym anger hur många milliliter provvatten som filtrerades.

Provnummer	Namn lokal Datum	Koordinater N Sweref 99	Koordinater E Sweref 99	Vattentemp	Foto	Analys Typ	Annat
1	Snöstorp Fylleån 08/08/2022	6282365	372683	16,8	ja	edna	500
2	Snöstorp Fylleån 08/08/2022	6282365	372683	16,8	ja	edna	500
3	Åsnarp Fylleån 08/08/2022	6284384	376335	12,4	ja	edna	500
4	Åsnarp Fylleån 08/08/2022	6284384	376335	12,4	ja	edna	500
5	Marbäck Fylleån 08/08/2022	6286401	379938	20,1	ja	edna	500
6	Marbäck Fylleån 08/08/2022	6286401	379938	20,1	ja	edna	500
7	Kontrol Marbäck 08/08/2022	-	-	-	-	kontroll	500
8	Skärkered Fylleån 08/08/2022	6286197	381862	15,3	ja	edna	500
9	Skärkered Fylleån 08/08/2022	6286197	381862	15,3	ja	edna	500
10	Assman Fylleån 09/08/2022	6286987	385852	18,3	ja	edna	500
11	Assman Fylleån 09/08/2022	6286987	385852	18,3	ja	edna	500
12	Kontrol Assman 09/08/2022	-	-	-	-	kontroll	500
13	Torpa Mynning 10/08/2022	6365546	326731	20,5	ja	edna	500
14	Torpa Mynning 10/08/2022	6365546	326731	20,5	ja	edna	500
15	Torpa uppström 10/08/2022	6366618	328832	-	ja	edna	500

16	Torpa uppström 10/08/2022	6366618	328832		ja	edna	500
17	Kontrol Torpa 10/08/2022					Kontroll	500
18	Tvåkersån Rör 10/08/2022	6326817	345267	22,5	ja	edna	500
19	Tvåkersån Rör 10/08/2022	6326817	345267	22,5	ja	edna	500
20	Tvåkersån Rör uppströms 10/08/2022	6326924	346256	20,1	ja	edna	500
21	Tvåkersån Rör uppströms 10/08/2022	6326924	346256	20,1	ja	edna	500
22	Tvåkersån Linnarp 10/08/2022	6330994	348858	17,1	ja	edna	500
23	Tvåkersån Linnarp 10/08/2022	6330994	348858	17,1	ja	edna	500
24	Kontrol Linnarp 10/08/2022					kontroll	500
25	Nissan Oskarström 11/08/2022	6296847	379495	14,8	ja	edna	500
26	Nissan Oskarström 11/08/2022	6296847	379495	14,8	ja	edna	500
27	Nissan Ryaberg 11/08/2022	6301961	384218	15,5	ja	edna	500
28	Nissan Ryaberg 11/08/2022	6301961	384218	15,5	ja	edna	500
29	Nissan Kragared 11/08/2022	6304028	387361	15,1	ja	edna	500
30	Nissan Kragared 11/08/2022	6304028	387361	15,1	ja	edna	500

31	Kontroll Kragared 11/08/2022					kontroll	500
32	Nissan Spångbron 11/08/2022	6313835	384697	20,1	ja	edna	500
33	Nissan Spångbron 11/08/2022	6313835	384697	20,1	ja	edna	500
34	Nissan Rävsbro 11/08/2022	6309979	382210		ja	edna	500
35	Nissan Rävsbro 11/08/2022	6309979	382210		ja	edna	500
36	Nissan Boås 11/08/2022	6303330	380221	20,5	ja	edna	500
37	Nissan Boås 11/08/2022	6303330	380221	20,5	ja	edna	500
38	Kontrol Boås 11/08/2022					kontrol	500
39	Nissan Johansförs	6300479	376459	20,5	ja	edna	500
40	Nissan Johansförs 11/08/2022	6300479	376459	20,5	ja	edna	500
41	Tvååker Långanskogen 16/08/2022	6327096	349916	22,8	ja	edna	500
42	Tvååker Långanskogen 16/08/2022	6327096	349916	22,8	ja	edna	500
43	Tvååker Holma ö 16/08/2022	6328050	351347	18,3	ja	edna	500
44	Tvååker Holma ö 16/08/2022	6328050	351347	18,3	ja	edna	500
45	Tvååker Skogsbo NR 16/08/2022	6329328	352317	18,7	ja	edna	500

46	Tvåker Skogsbo NR 16/08/2022	6329328	352317	18,7	ja	edna	500
47	Tvåker Humsjön/ Byasjön 16/08/2022	6328571	350314		ja	edna	500
48	Tvåker Humsjön/ Byasjön 16/08/2022	6328571	350314		ja	edna	500
49	Tvåker nedstr. Kalvsjön 16/08/2022	6329672	351199		ja	edna	500
50	Tvåker nedstr. Kalvsjön 16/08/2022	6329672	351199		ja	edna	500
51	Tvåker Uppstr. Kalvsön 16/08/2022	6330739	350978	19,1	ja	edna	500
52	Tvåker Uppstr. Kalvsön 16/08/2022	6330739	350978	19,1	ja	edna	500
53	Kontroll 16/08/2022					Kontroll	500
54	Mostorpsån Bjärnared 17/08/2022	6308547	369764	19	ja	edna	500
55	Mostorpsån Bjärnared 17/08/2022	6308547	369764	19	ja	edna	500
56	Mostorpsån Gräsås 17/08/2022	6307580	368421		ja	edna	500
57	Mostorpsån Gräsås 17/08/2022	6307580	368421		ja	edna	500
58	Mostorpsån Bäckafors 17/08/2022	6306649	367249	21,3	ja	edna	500
59	Mostorpsån Bäckafors 17/08/2022	6306649	367249	21,3	ja	edna	500
60	Mostorpsån Munkhättan 17/08/2022	6305809	365345		ja	edna	500
61	Mostorpsån Munkhättan 17/08/2022	6305809	365345		ja	edna	500
62	Kontroll					Kontroll	500
63	Johansförs Nissan Maa 17/08/2022	6300585	376091		ja	edna	500
64	Johansförs Nissan Maa 17/08/2022	6300585	376091		ja	edna	500

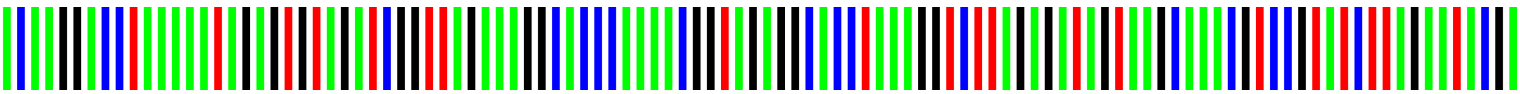
65	Nissan Maa 17/08/2022	6302371	376562		ja	edna	500
66	Nissan Maa 17/08/2022	6302371	376562		ja	edna	500
67	Övre Maa Nissan 17/08/2022	6307456	378211		ja	edna	500
68	Övre Maa Nissan 17/08/2022	6307456	378211		ja	edna	500

Bilaga 2. DNA-analys av vattenprover Centrum för Genetisk Identifiering

Naturhistoriska riksmuseet

RAPPORT

Datum	Dnr	1(6)
2022-10-2 1	4.1-314-2022	



Centrum för genetisk identifiering

DNA-analys av vattenprover

Naturhistoriska riksmuseet

Postadress:
Box 50007
104 05 Stockholm

Besöksadress:
Frescativägen 40
114 18 Stockholm

Telefon: 08-519 540 00
Telefax. 08-519 540 85
registrator@nrm.se

Centrum för genetisk identifiering vid Naturhistoriska riksmuseet är en uppdragsfinansierad verksamhet som erbjuder myndigheter och organisationer hjälp med genetiska analyser av biologiskt material.

Uppdraget

Centrum för genetisk identifiering (CGI) har 2022 fått i uppdrag av Hallands länsstyrelse att DNA-analysera 68 st vattenprov för DNA-spår från flodpärlmussla (*Margaritifera margaritifera*). Proverna var märkta enligt tabell 1 (bil. 1).

Redovisning av arbetsmetod

Vattenprover har filtrerats genom Sylphium-filter. Extraktion av DNA har gjorts med Kingfisher™ Cell and Tissue DNA Kit och Kingfisher extraktions-robot enlig tillverkarens instruktioner. Detektion av målorganism-DNA har gjorts enligt (Thomsen et al. 2012) med ett Bio-Rad CFX96 instrument. För varje prov har tre tekniska replikat gjorts.

Ekonomisk redovisning

Materialkostnad: 21874 kr
Arbetskostnad: 28800 kr
Kostnad totalt: 50674 kr (exklusive moms)

Resultatredovisning

Provet testades för inhibering av PCR. Provet gick att analysera. Resultat från detektion av målorganismer-DNA i vattenprover finns i tabell 1. Positiv detektion av DNA-spår från målorganismer innebär att dessa fanns på lokalen vid provtillfället eller har besökt lokalen i närtid. DNA i vatten bryts ned på kort tid (mindre än tre veckor).

Data och DNA-extrakt lagras hos NRM/MFÖ och är open access.

Niclas Gyllenstrand
Intendent

Tabell 1. Resultat DNA-analys. För varje prov har tre tekniska replikat gjorts (inom parentes ges antal positiva/antal replikat). Alla positiva prover innehåller DNA-spår. När ett eller två replikat är positiva kan det bero på mindre DNA-mängder i provet. NA betyder inga analyser.

Prov	*Margaritifera margaritifera*
1 Snöstorp Fylleån	Negativ (0/3)
2 Snöstorp Fylleån	Negativ (0/3)
3 Åsnarp Fylleån	Negativ (0/3)
4 Åsnarp Fylleån	Negativ (0/3)
5 Marbäck Fylleån	Negativ (0/3)
6 Marbäck Fylleån	Negativ (0/3)
7 Marbäck Fylleån Kontroll	Negativ (0/3)
8 Skärkered Fylleån	Negativ (0/3)
9 Skärkered Fylleån	Negativ (0/3)
10 Assman Fylleån	Negativ (0/3)
11Assman Fylleån	Negativ (0/3)
12 Assman Kontroll Fylleån	Negativ (0/3)
13 Torpa mynning	Negativ (0/3)
14 Torpa mynning	Negativ (0/3)
15 Torpa uppströms	Negativ (0/3)
16 Torpa uppströms	Negativ (0/3)
17 Torpa kontroll	Negativ (0/3)
18 Tvååkersån rör	Negativ (0/3)
19 Tvååkersån rör	Negativ (0/3)
20 Tvååkersån rör upp	Negativ (0/3)
21 Tvååkersån rör upp	Negativ (0/3)

Prov	*Margaritifera margaritifera*
35 Revsbo	Negativ (0/3)
36 Nissan Boås	Negativ (0/3)
37 Nissan Boås	Negativ (0/3)
38 Kontroll Boås	Negativ (0/3)
39 Nissan Johansfors	Negativ (0/3)
40 Nissan Johansfors	Negativ (0/3)
41 Långaskogen	Negativ (0/3)
42 Långaskogen	Negativ (0/3)
43 Holma ö	Negativ (0/3)
44 Holma ö	Negativ (0/3)
45 Skogsbo NR	Negativ (0/3)
46 Skogsbo NR	Negativ (0/3)
47 Humsjö - Byasjön	Negativ (0/3)
48 Humsjö – Byasjön	Negativ (0/3)
49 Nedström Kalvsjön	Negativ (0/3)
50 Nedström Kalvsjön	Negativ (0/3)
51 Upp Kalvsjö	Negativ (0/3)
52 Upp Kalvsjö	Negativ (0/3)
53 Kontroll Upp Kalvsjö	Negativ (0/3)
54 Mosstorpsån Björnared	Negativ (0/3)
55 Mosstorpsån Björnared	Negativ (0/3)

Prov	*Margaritifera margaritifera*
22 Tvåkersån Linnarp	Negativ (0/3)
23 Tvåkersån Linnarp	Negativ (0/3)
24 Kontroll	Negativ (0/3)
25Oskarsström Nissan	Negativ (0/3)
26 Oskarsström Nissan	Negativ (0/3)
27 Nissan Ryaberg	Negativ (0/3)
28 Nissan Ryaberg	Negativ (0/3)
29 Nissan Kragered	Negativ (0/3)
30 Nissan Kragered	Negativ (0/3)
31 Kragered Kontroll	Negativ (0/3)
32 Nissan spångbron	Negativ (0/3)
33 Nissan spångbron	Negativ (0/3)
34 Revsbo	Negativ (0/3)

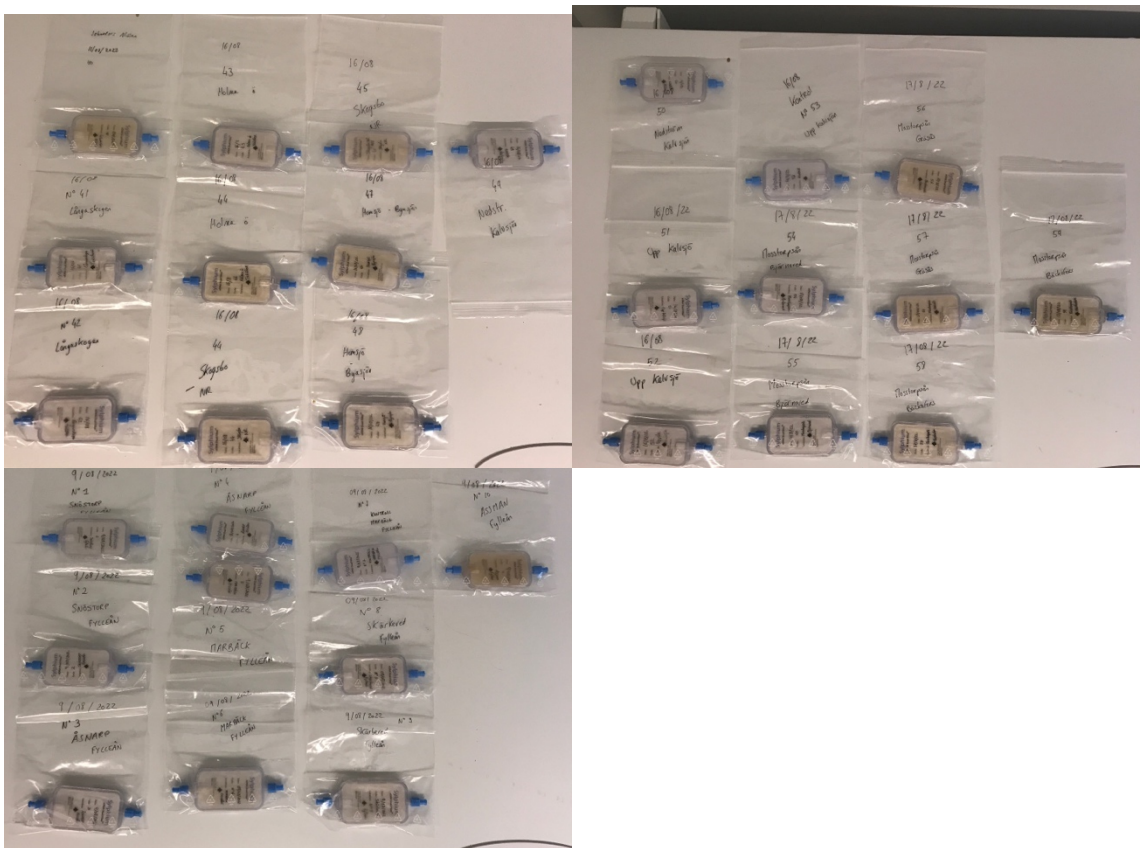
Prov	*Margaritifera margaritifera*
56 Mosstorpsån Gräsås	Negativ (0/3)
57 Mosstorpsån Gräsås	Negativ (0/3)
58 Mosstorpsån Bäckafors	Negativ (0/3)
59 Mosstorpsån Bäckafors	Negativ (0/3)
60 Munkhättan	Positiv (3/3)
61 Munkhättan	Positiv (3/3)
62 Kontroll	Negativ (0/3)
63 Johanförs Nissan Maa	Negativ (0/3)
64 Johanförs Nissan Maa	Negativ (0/3)
65 Maa Nissan	Negativ (0/3)
66 Maa Nissan	Negativ (0/3)
67 Övre Maa Nissan	Negativ (0/3)
68 Övre Maa Nissan	Negativ (0/3)

Referenser

Thomsen, P.F. et al., 2012. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21(11), pp.2565–2573.

Bilaga 1.

Figur 1. De mottagna proverna.



Figur 1. De mottagna proverna.

GRIP on LIFE

NATUR VÅRDS VERKET

Havs och Vatten myndigheten

SKOGSSTYRELSEN

CALLUNA

Naturhistoriska riksmuseet

Life

NATURA 2000