



eDNA-analys av svamp

Jämförande studie av skogskontinuitet och artsammansättning

Norrbottens län



MIX Rapport 2024:04

MIX Research Sweden AB

Författare: Viktor Birgersson, Patrick Hernvall, Micaela Hellström



MIX Research
Sweden

eDNA-analys av svamp – jämförande studie av skogskontinuitet och artsammansättning, Norrbottens län

Uppdragsgivare:	Länsstyrelsen i Norrbottens län
Författare:	Viktor Birgersson, Patrick Hernvall, Micaela Hellström
Granskare:	Författarna samt uppdragsgivarna
Omslagsbild:	MIX Research Sweden AB
Foton:	Viktor Birgersson, Patrick Hernvall
Fältarbete:	Viktor Birgersson, Patrick Hernvall
Uppdraget utfördes av:	MIX Research Sweden AB Uppsala Science Park, Dag Hammarskjölds väg 34A, 75237 Uppsala +46 70 782 03 10
Rapporten citeras som:	Birgersson V, Hernvall P, Hellström, M. 2024. eDNA-analys av – jämförande studie av skogskontinuitet och artsammansättning, Norrbottens län. MIX Rapport 2024:04.



MIX Research
Sweden

SAMMANFATTNING

Länsstyrelsen i Norrbottens län har tillsammans med MIX Research Sweden utforskat användningen av eDNA från jordprover i tidigare projekt, bland annat inom arbetet med arter med åtgärdsprogram (ÅGP). I detta projekt har tre skogslokaler med olika grad av kontinuitet undersökts med fokus på svamp – en värdekärna (VK), en utvecklingsskog (US) samt ett kalhygge (KH). Syftet var att undersöka skillnader i artdiversitet och sammansättning mellan lokalerna samt erhålla information om ÅGP-och rödlistade arter.

Totalt identifierades 587 artspecifika sekvenser. Artdiversiteten var relativt likartad mellan lokalerna, däremot kunde en signifikant skillnad i artsammansättning observeras. Basidiomycetes var det dominerande fylat i VK och US, medan Ascomycycetes dominerade på KH. Totalt 19 rödlistade arter detekterades, 18 från VK och US, samt fyra från KH. Noterbart var att citronsporing som är klassad som akut hotad observerades på KH. Blåfotad taggsvamp var den enda ÅGP-arten som detekterades. Resultatet visar på tydliga skillnader i artsammansättning mellan lokalerna som delvis kan härledas till varierande grad av kontinuitet. Att rika förekomster av svamparter som associeras till skogar med lång kontinuitet även detekterades i den betydligt yngre skogen visar på komplexiteten i begreppet kontinuitet och att trädålder inte är den enda faktorn att ta i beaktande.

Vidare visar resultaten att eDNA är en effektiv metod för en kostnadseffektiv inventering av svampsamhällen på stor geografisk skala. För långsiktiga övervakningsprogram och förvaltningsåtgärder kan eDNA utgöra en framgångsrik strategi för att identifiera skogsområden med höga naturvärden samt ett viktigt underlag för inrättande av naturskydd.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	3
INLEDNING.....	5
METODER	6
Fältarbete	6
Laboratoriearbete.....	7
eDNA-flerartsanalyser	8
RESULTAT	9
Svamp	9
DISKUSSION.....	11
REFERENSER.....	12
Bilaga 1. Vad menas med enarts- och flerartsanalyser?	13
Bilaga 2. Laboratoriearbete flerartsanalyser.....	14
Bilaga 3. Kvalitetssäkring av DNA - kontroller	16
Bilaga 4: Kvalitetskontroller som redovisas	17

INLEDNING

Miljö-DNA eller eDNA (från engelskans environmental DNA) är samlingsnamnet på de genetiska avtryck som alla levande varelser lämnar efter sig i sin omgivning i form av till exempel fotspår, svett, slem och fingeravtryck (Pedersen m. fl. 2015). Taberlet m. fl. (2012) definierar eDNA som ”det DNA som kan studeras från efterlämnade spår i miljön utan att målorganismen är närvarande i provet”. Eftersom genetiska analyser har utvecklats mycket under det senaste decenniet är det fullt möjligt att genom jord- eller vattenprov fånga upp dessa avtryck och med känsliga metoder identifiera de arter eller artgrupper som finns i en given miljö. eDNA kan utvinnas från några få milliliter jord för att ange vilka arter eller artgrupper som är närvarande. eDNA är välutvecklat i vattenmiljöer och har visat sig vara användbart för miljöövervakningen (Harper m. fl. 2015, 2018, Leese m. fl. 2016, Deiner m. fl. 2017, Ruppert m. fl. 2019, Bruce m. fl. 2021). Jordanalyser genom DNA-undersökningar visar en stor potential för att jämföra artmångfald i olika habitat genom att registrera bakterier (Nuñez m.fl. 2021, Liddicoat m. fl 2022), svampar och markfauna (Nuñez m. fl. 2021). Eftersom dessa artgrupper är relativt okända och inte ännu är registrerade med fullständiga genetiska referenser klassas de ofta på högre nivå. Trots det har de visat sig vara goda indikatorer inom skogsområden med höga skyddsvärden.

Eftersom eDNA-metoden är en icke-dödande metod är den idealisk för kartläggning av biologisk mångfald. En korrekt analys och tolkning av eDNA-resultat kräver kontinuerlig uppdatering av traditionell och genetisk taxonomi, molekylära metoder samt ekologiska kunskaper och information på hur fysiska samt kemiska faktorer påverkar arters utbredning.

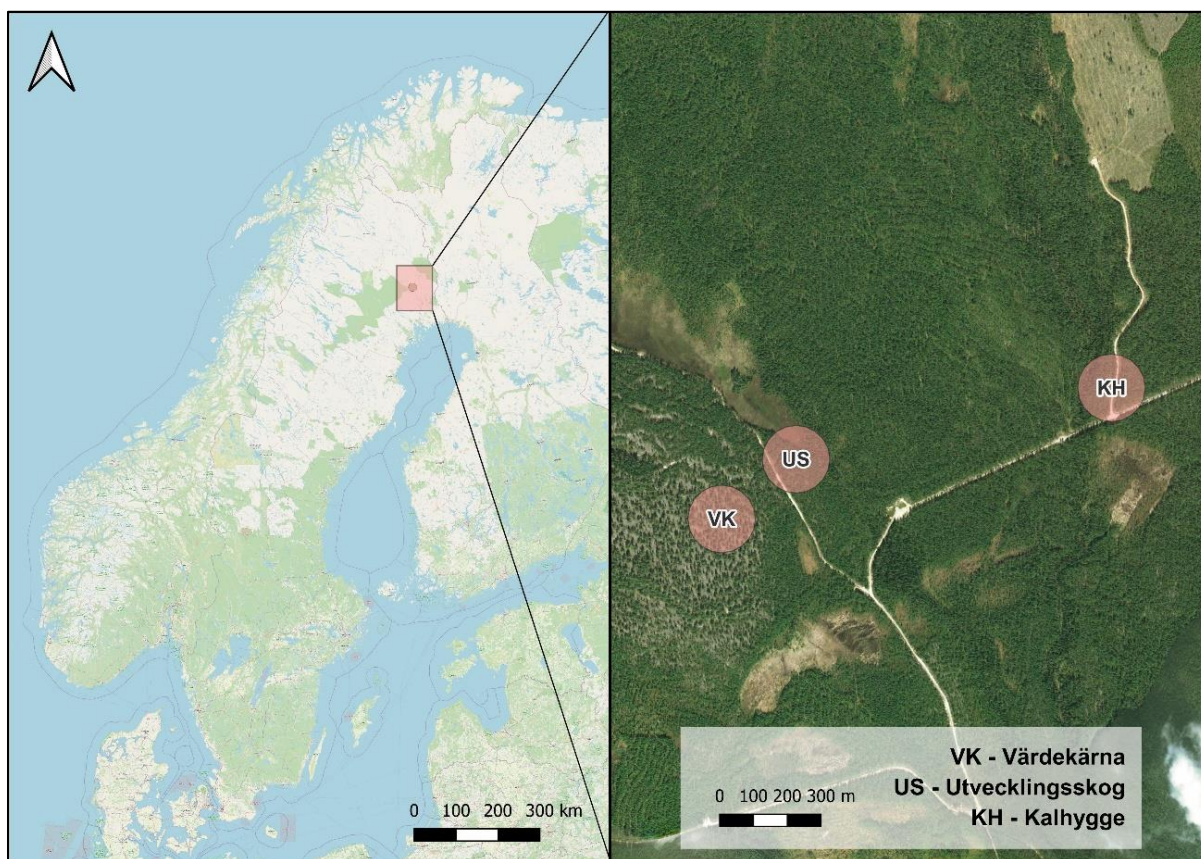
Detta projekt utfördes av MIX Research Sweden AB på uppdrag av Länsstyrelsen i Norrbottens län. Samlingsprover från totalt tre skogsområden inom Norrbottens län samlades in under hösten 2023. Undersökningen syftar till att identifiera skillnader i artdiversitet samt sammansättning av mellan skogsområden med varierande grad av kontinuitet, samt erhålla information om arter med åtgärdsprogram.

METODER

FÄLTARBETE

Fältarbetet utfördes den 30 augusti 2023 på tre skogslokaler i Överkalix kommun, Norrbottens län. Lokalerna valdes av Länsstyrelsen och hade olika grader av kontinuitet (Figur 1).

Innan eDNA-provtagningen genomfördes i fält, steriliserades all provtagningsutrustning. Provtagningsutrustning köptes in som sterila enheter som lades ihop till DNA-fria kit. För varje lokal samlades två prover in om 100 – 150 ml jord från cirka 2–5 cm jorddjup. Varje enskilt prov utgörs av flertalet underprover som blandades väl och frystes in med hjälp av en portabel fältfrys. Provtagarna bar sterila handskar och munskydd för att förhindra att proverna kontamineras. Proverna bevarades i -20 °C tills de analyserades genetiskt i laboratorier enbart avsedda för eDNA och markprover.



Figur 1. Översiktskarta över provtagningsområdena. Notera att KH-området var avverkat vid tillfället för provtagning.

Provtagningsområdena utgjordes av skog med varierande grad av kontinuitet enligt följande; en värdekärna (VK) av urskogsartad sandtallskog med stort inslag av tallar på mellan 300–500 år, en utvecklingsskog (US) bestående av 60-årig, självföryngrad tallskog (ej planterad) på skarp sandhed, samt ett kalhygge (KH) (Tabell 1).

Tabell 1. Information om provtagningslokalerna.

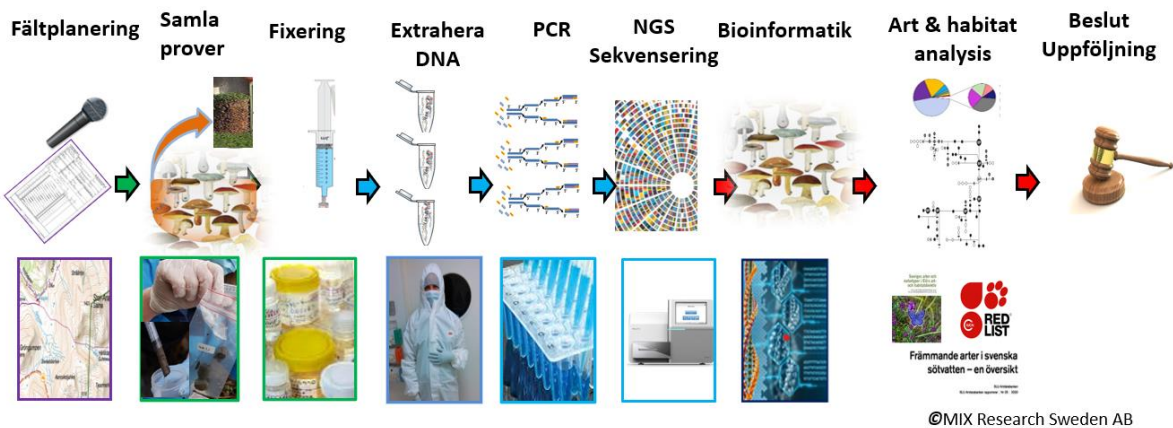
Lokal	Provnamn	Datum	SWEREF 99 TM		Trädålder
			Nord	Öst	
Värdekärna	VK_a-b	2023-08-30	7410101	832212	~300-500
Utvecklingsskog	US_a-b	2023-08-30	7410305	832331	~60
Kalhygge	KH_a-b	2023-08-30	7410526	833355	0



Figur 2. Gammal sandtallskog med få tecken på mänsklig påverkan (värdekärnan).

LABORATORIEARBETE

Flödesschema för fält- och laboratoriearbete sammanfattas i Figur 3 och beskrivs i detalj i Bilaga 1–4. Bakgrund för enarts- och flerartsanalyser beskrivs i Bilaga 1. Markörer, laboratoriearbete, dataanalys för flerartsanalyser och kontroller använda i denna undersökning finns i Bilaga 2–5.



Figur 3. Flödesdiagram som visar de olika stegen för flerartsanalyser från fältplanering till beslut och åtgärder (laboratoriearbete och bioinformatik beskrivs i Bilaga 2).

EDNA-FLERARTSANALYSER

I denna undersökning utfördes flerartsanalyser av svamp genom analys av ITS-genen (se Bilaga 2). Eftersom dessa stora huvudgrupper är så artrika och enbart en fraktion har referenssekvenser analyserades data på flera olika klassificeringsnivåer. Rådatat anges som unika korta sekvenser, även kallade "Operational Taxonomic Units" (OTUs). En OTU kan därmed hänvisa till en unik art, släkte eller familj. Den taxonomiska nivån avgörs av hur väl arten finns representerad i referensdatabasen.

Varje enskild art har en unik DNA-sekvens i den gen som analyseras. Antalet läsningar per unik sekvens ger en relativ uppskattning av hur mycket eller litet arten förekommer i ett prov (relativ biomassa från mest till minst dominerande art). Bioinformatiken beskrivs i Bilaga B.2.3.

RESULTAT

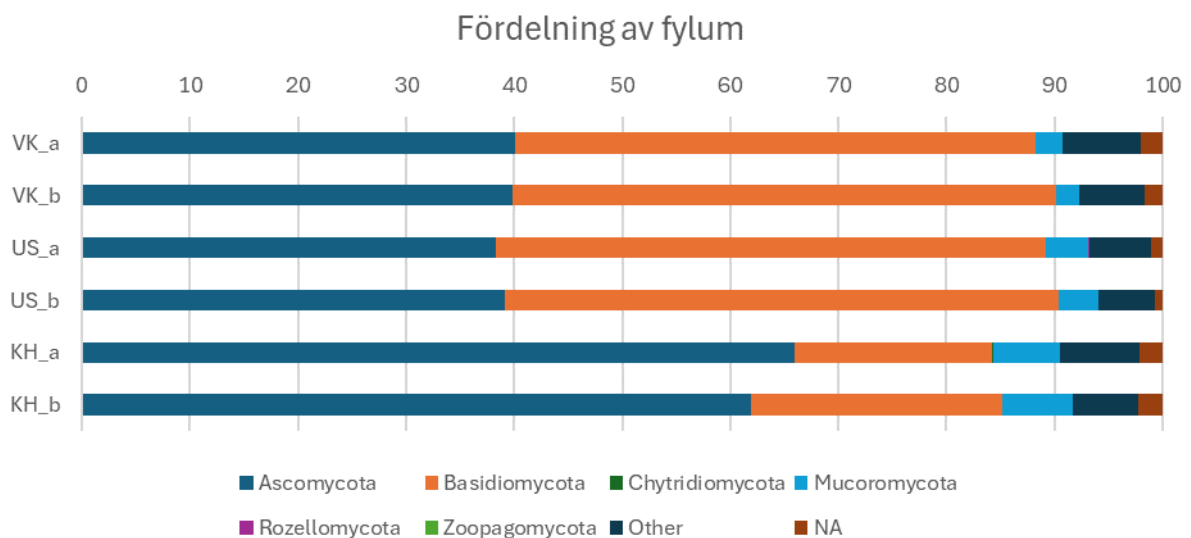
SVAMP

Sekvenseringsresultaten avläste 4 995 636 miljoner sekvenser fördelat på 587 OTUs, av vilka 382 kunde identifieras till art (Tabell 2). Det totala antalet läsningar per lokal och fullständiga artlistor beskrivs i Appendix 1.

Tabell 2. Sammanfattning av detekterade OTUs samt andel av dessa som kunde identifieras till respektive taxonomisk nivå.

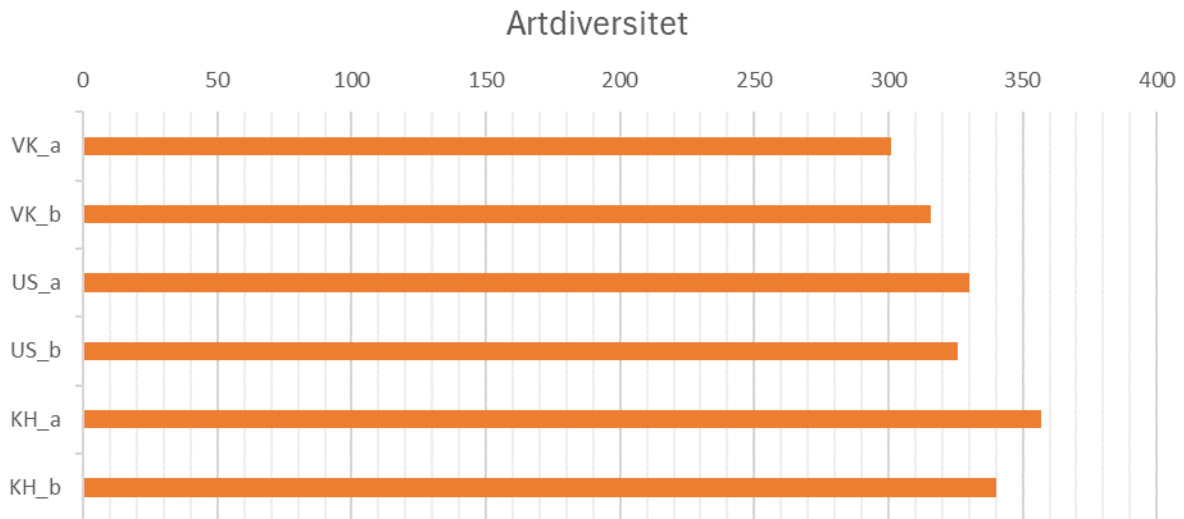
Fylum	Klass	Order	Familj	Släkte	Art
587 (100 %)	576 (94 %)	542 (92 %)	500 (85 %)	501 (85 %)	382 (65 %)

Totalt sex fylum detekterades varav Basidiomycetes var dominerande och utgjorde cirka 50 % av detektionerna i utvecklingsskogen samt värdekärnan, medan Ascomycetes dominerande på kalhygget med cirka 60 % av detektionerna (Figur 4).



Figur 4. Procentuell fördelningen av detekterade fylum inom respektive lokal.

Den genomsnittliga artdiversiteten var 328,3 och varierade från 301 unika OTUs i VK_a till 357 i KH_a (Figur 5). Den genomsnittliga artdiversiteten per lokal var 308,5 i värdekärnan, 328 i utvecklingsskogen samt 348,5 på kalhygget.



Figur 5. Artdiversitet på lokalerna.

Totalt noterades 19 rödlistade svampar varav blåfotad taggsvamp (*Sarcodon glaucopus*) är inkluderad inom åtgärdsprogram för hotade arter (Tabell 3). Av dessa detekterades 13 i värdekärnan, 15 i utvecklingskogen och endast fyra på kalhygget. Notera att citronsporing (*Antrodiella citrinella*), som är klassad som akut hotad, enbart återfanns på kalhygget.

Tabell 3. Rödlistade arter detekterade i respektive prov. *Notera att blåfotad taggsvamp även är upptagen i ÅGP.

Rödlistade arter	VK_a	VK_b	US_a	US_b	KH_a	KH_b
Spökspindskivling (EN)		x	x	x		
Vaxspindlingv (NT)			x	x		
Mjölsvärting (NT)			x			
Dynlaxskivling (NT)				x	x	x
Slät knölfoting (VU)		x			x	x
Goliatmusseron (VU)	x	x				
Gult markskinn (VU)	x	x	x	x		
Citronsporing (CR)						x
Tallgråticka (VU)	x	x	x	x		
Grangråticka (VU)			x	x		
Talltaggsvamp (NT)	x	x	x	x		
Svartvit taggsvamp (NT)	x	x	x	x		
Svart taggsvamp (NT)	x	x	x	x		
Tajgataggsvamp (VU)			x	x		
Orange taggsvamp (NT)	x	x	x	x		
Brandtaggsvamp (VU)	x	x				
Blå taggsvamp (NT)	x	x	x	x		
Smalfotad taggsvamp (VU)		x	x	x	x	
*Blåfotad taggsvamp (VU)	x	x	x	x		

DISKUSSION

Analysen av svamp resulterade i 587 unika detektioner där 382 kunde identifieras till art. Totalt 19 av dessa var rödlistade och en ingår i åtgärdsprogrammet. Både värdekärnan och utvecklingskogen hyste flertalet indikatorarter för skogar med lång kontinuitet och därmed höga natur- och skyddsvärden. Förekomsten av dessa arter var betydligt lägre på kalhygget som dessutom dominerades av arter tillhörande fylat Ascomycetes.

Att rika förekomster av mykorrhizabildande svamparter som associeras till torra tallskogar med lång kontinuitet även förekom i den betydligt yngre utvecklingskogen visar på komplexiteten i begreppet kontinuitet. Skogen som avverkats kan ha varit väldigt artrik och haft en lång kontinuitet med stora förekomster av riktigt gamla tallar vilka vid tiden för avverkningen lämnats som fröträd. Artrikedomen har sannolikt också andra bidragande orsaker, som markens beskaffenhet och markfuktigheten en bit under markytan. Närheten till den gamla skogen kan både öka möjligheten till spridning av känsliga arter till det yngre beståndet, och tyda på att den skog som avverkades varit av samma ålder och struktur. Sammanfattningsvis visar det på att trädålder inte är den enda viktiga faktorn att ta i beaktande vid naturvärdesbedömning, samt hur skogsbruket genom att lämna gamla fröträdställningar vid avverkning kan främja den biologiska mångfalden.

Resultaten visar vidare att eDNA är en effektiv metod för kostnadseffektiv inventering av svampsamhällen på stor geografisk skala. Stora och svårtillgängliga områden kan undersökas på kort tid, dessutom är metoden inte begränsad till hösten då fruktkroppar finns synliga eftersom jordprover möjliggör att DNA kan extraheras från svamparnas mycel året om. För långsiktiga övervakningsprogram och förvaltningsåtgärder kan eDNA utgöra en framgångsrik strategi för att identifiera skogsområden med höga naturvärden samt ett viktigt underlag för inrättande av naturskydd. Ett viktigt steg mot att uppnå miljömålen "Levande skogar" och "Biologisk mångfald".

REFERENSER

- 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 i press.
- Deiner, K m.fl. (2017). Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology* 26:5872-5895.
- Euzeby JP. (2017). "Taxa above the rank of class - Acidobacteria". LPSN.
- Ferrari, R., Gautier, V., & Silar, P. (2021). Lignin degradation by ascomycetes. In *Advances in Botanical Research* (Vol. 99, pp. 77-113). Academic Press.
- Harper, L. R., Buxton, A. S., Rees, H. C., Bruce, K., Brys, R., Halfmaerten, D., ... & Priestley, V. (2018). Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. *Hydrobiologia*, 1-17.
- Janssen P. H. (2006). Identifying the dominant soil bacterial taxa in libraries of 16S rRNA and 16S rRNA genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 72 1719–1728
- Kersters, K., De Vos, P., Gillis, M., Swings, J., Vandamme, P., Stackebrandt, E. (2006). Introduction to the Proteobacteria. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, KH., Stackebrandt, E. (eds) *The Prokaryotes*. Springer, New York, NY. Sid 3-37.
- Kielak AM, Cipriano MA, Kuramae EE. (2016) Acidobacteria strains from subdivision 1 act as plant growth-promoting bacteria. *Arch Microbiol.* 2016 Dec;198(10):987-993.
- Kulichevskaya, I. S., Kostina, L. A., Valášková, V., Rijpstra, W. I. C., Damste, J. S. S., de Boer, W., & Dedysh, S. N. (2012). *Acidicapsa borealis* gen. nov., sp. nov. and *Acidicapsa ligni* sp. nov., subdivision 1 Acidobacteria from Sphagnum peat and decaying wood. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(Pt_7), 1512-1520.
- 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.
- Liddicoat, C., Krauss, S. L., Bissett, A., Borrett, R. J., Ducki, L. C., Peddle, S. D., ... & Breed, M. F. (2022). Next generation restoration metrics: Using soil eDNA bacterial community data to measure trajectories towards rehabilitation targets. *Journal of Environmental Management*, 310, 114748.
- Nuñez, N. F., Maggia, L., Stenger, P. L., Lelièvre, M., Letellier, K., Gigante, S., ... & Carriconde, F. (2021). Potential of high-throughput eDNA sequencing of soil fungi and bacteria for monitoring ecological restoration in ultramafic substrates: The case study of the New Caledonian biodiversity hotspot. *Ecological engineering*, 173, 106416
- 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
- Rosling A. & R. Finlay. (2004). Mykorrhizasvampar kan vittra mineraljord. *SLU Forskning, Fakta Skog* 14:2004
- Ruppert, K. M., Kline, R. J., & Rahman, M. S. (2019). Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation*, 17, e00547.
- Tláškal, Vojtěch; Baldrian, Petr (2021). "Deadwood-Inhabiting Bacteria Show Adaptations to Changing Carbon and Nitrogen Availability During Decomposition". *Frontiers in Microbiology*. 12: 685303.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. (2012). Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21, 1789-1793
- Ward NL, Challacombe JF, Janssen PH, Henrissa B, Coutinho PM, Wu M, Xie G, Haft DH, Sait M, Badger J, et al. (2009). Three genomes from the phylum Acidobacteria provide insight into the lifestyles of these microorganisms in soils. *Appl Environ Microbiol.* 75(7):2046–2056
- Quaiser A; Ochsenreiter T; Lanz C; et al. (2003). "Acidobacteria form a coherent but highly diverse group within the bacterial domain: evidence from environmental genomics". *Mol. Microbiol.* 50 (2): 563–75.

BILAGA 1. VAD MENAS MED ENARTS- OCH FLERARTSANALYSER?

Enartsstudier - qPCR eller ddPCR

Inventering av förekomst av en enstaka art med eDNA görs med så kallad qPCR eller ddPCR. 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 av den specifika arten.

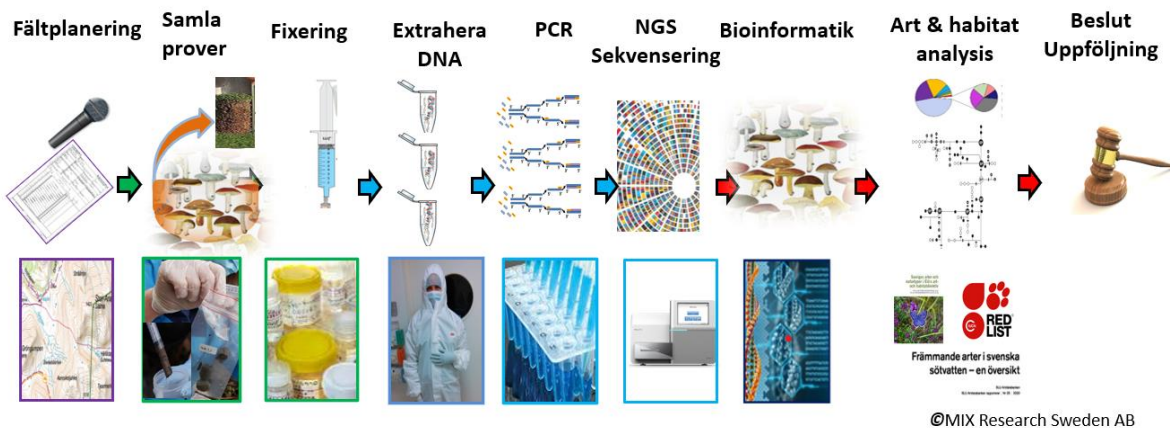
Om flera arter undersöks med enartsanalyser kan data över den relativa abundansen mellan art A och art B inte jämföras med varandra eftersom markörerna för varje art skiljer sig markant från varandra. Analystiden för enartsanalyser är kortare än analystiden för flerartsanalyser.

Flerartsstudier - Metastreckkodning genom NGS (Next Generation Sequencing)

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 B1-1).

Jämförelser mellan data som erhålls genom enarts- och flerartsanalyser visas i figur B1-2.



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

Enartsanalys - Barkodning	CGCCGCGTTATACGAGA	Ja/Nej	Artlista	Dominans
	CGCCGCGTTATACGAGA	OTU 1	Match →	10 %
Flerartsanalys - Metabarkodning	CACCGCGTTATACGAGA	OTU 2	Match →	65 %
	CGCCGCGTTACACCACT	OTU 3	Match →	5 %
	CGCCGCGCTACACCGTG	OTU 4	Match →	20 %

Figur B1-2. Typ av data som fås genom enartsanalyser och flerartsanalyser. Enartsanalysen anger närvaro/frånvaro av en art. Flerartsanalyser ger en artlista samt arternas relativa dominans i förhållande till varandra inom ett prov.

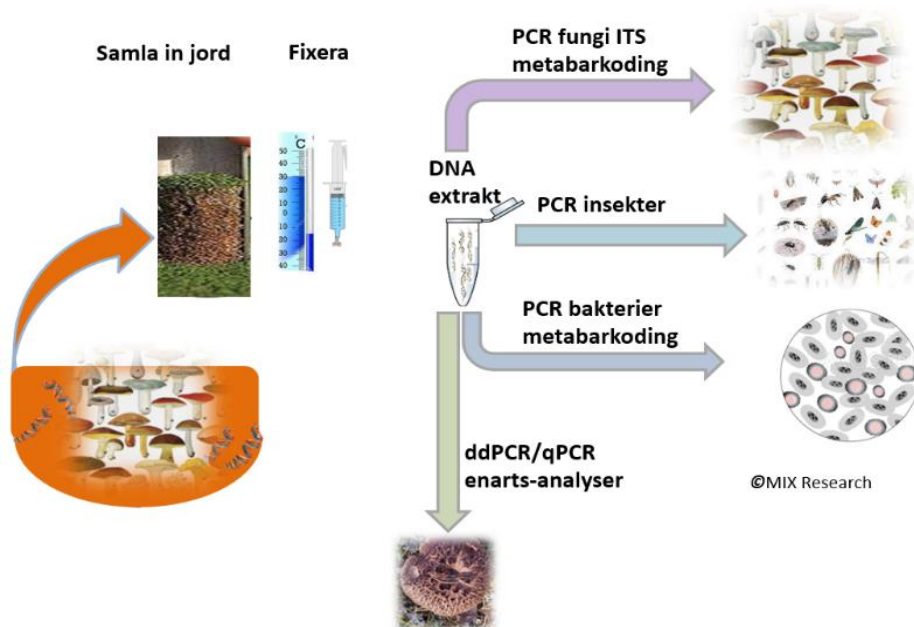
BILAGA 2. LABORATORIEARBETE FLERARTSANALYSER

B.2.1 EXTRAKTION

eDNA utvanns (extraherades) med Qiagen DNeasy Power Soil Pro extraktions kit i sterila laboratorier anpassade för jord och eDNA-prover. DNA-koncentrationen mättes med Qubit Fluorometric Quantification (Fisher Scientific) angivet i ng/μl.

B.2.2. PCR

För alla analyser gäller att; Varje PCR-prov utförs i tre replikat för jordprover, som sammanslås under bioinformatiken. Som positiv laboratoriekontroll används ett prov med känd artsammansättning av arter som inte förekommer i Europa som standard för jämförelse. Negativa kontroller analyseras för att säkerhetsställa kvaliteten och tillförlitlighet av resultat. Från ett och samma eDNA-prov kan flera analyser på olika taxa analyseras parallellt (figur B2_1). Observera att svamp-, bakterie- och markfaunaproverna inte kan sekvenseras samtidigt eftersom PCR-produkterna varierar i längd mellan markörer. Sekvenseringsprotokoll och bioinformatik anges i Nuñez m.fl. (2021).



Figur B2-1. Ett och samma eDNA prov kan analyseras parallellt för flera olika taxa med separata analyser.

B.2.2.1 Fungi.

Flerartsanalyserna för fungi genomfördes med en markör som läser en hypervariabel 115–170 bp region ITS2 på 18S rRNA genen med markörer från Ihrmark m.fl. (2012), White m.fl. (1990) och Caparaaso m.fl. (2011) enligt protokoll i Nuñez m.fl. (2021). Markören anpassades så att ett överhäng tillfogades 5' delen av framåt-primern för att matcha Illumina Nextera Index markörer (för full beskrivning se Nuñez m.fl. 2021).

B.2.3. BIOINFORMATIK OCH VERIFIERING

Varje enskild art har en unik streckkod eller DNA-sekvens. De unika sekvenserna jämfördes med flera internationella databaser (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) där sekvenser på närmare 450 000 kända arter finns tillgängliga med 1 miljard sekvenser och 6,25 triljoner baspar enligt GenBank och NCBI:s hemsida (Sayers, m.fl. 2020). Fungi matchades mot databasen unite.com fungi version 2, samt mot databasen global fungi (Větrovský m.fl. 2020, Tedersoo m.fl. 2021).

De olika sekvenserna matchas mot databaserna och får på så sätt arternas identitet. Antalet läsningar per unik sekvens ger en relativ uppskattning av hur mycket eller litet arten förekommer i ett prov. Bioinformatiken för samtliga taxa finns även beskrivet i Kačergytė m.fl. (2021) där flödesschemat är anpassat för markörerna.

Referenser

- Caporaso, J. G., Lauber, C. L., Walters, W. A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C. A., Turnbaugh, P. J., ... & Knight, R. (2011). Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proceedings of the national academy of sciences*, 108(supplement_1), 4516-4522.
- Ihrmark, K., Bödeker, I., Cruz-Martinez, K., Friberg, H., Kubartova, A., Schenck, J., ... & Lindahl, B. D. (2012). New primers to amplify the fungal ITS2 region—evaluation by 454-sequencing of artificial and natural communities. *FEMS microbiology ecology*, 82(3), 666-677.
- Kačergytė, I., Petersson, E., Arlt, D., Hellström, M., Knape, J., Spens, J., Žmihorski, M. & Pärt, T. (2021). Environmental DNA metabarcoding elucidates patterns of fish colonisation and co-occurrences with amphibians in temperate wetlands created for biodiversity. *Freshwater Biol.* 66, 1915–1929.
- Nuñez, N. F., Maggia, L., Stenger, P. L., Lelièvre, M., Letellier, K., Gigante, S., ... & Carriconde, F. (2021). Potential of high-throughput eDNA sequencing of soil fungi and bacteria for monitoring ecological restoration in ultramafic substrates: The case study of the New Caledonian biodiversity hotspot. *Ecological engineering*, 173, 106416.
- Sayers, E.W., ..., Karsch-Mizrachi, I. (2020). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 48: D84-D86.
- (2021) National Genomics Infrastructure, Illumina 16S. <https://ngisweden.scilifelab.se/methods/illumina-16s-sequencing/>
- Tedersoo, L., Mikryukov, V., Anslan, S., Bahram, M., Khalid, A. N., Corrales, A., ... & Abarenkov, K. (2021). The Global Soil Mycobiome consortium dataset for boosting fungal diversity research. *Fungal Diversity*, 111(1), 573-588.
- Větrovský, T., Morais, D., Kohout, P., Lepinay, C., Algora, C., Awokunle Hollá, S., ... & Baldrian, P. (2020). GlobalFungi, a global database of fungal occurrences from high-throughput-sequencing metabarcoding studies. *Scientific Data*, 7(1), 1-14.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. J. W. T., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*, 18(1), 315-322.

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 (nedsmutsning från DNA som inte hör till provet) 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, Bruce m.fl. 2021) 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: Under hela undersökningen från extraktion 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-signaler av målartsgrupperna hittas i en negativ kontroll innebär det att undersökningen måste göras om ifall källan till DNA som finns i provet inte kan hittas så att konsekvenserna av kontamineringen kan 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-signaler 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

- 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 i press.
- 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://sfgm.se/download/riktlinjer/Kvalitetsriktlinjer/sfgm_riktlinjer-for-kvalitetssakring_rev101228.pdf

BILAGA 4: KVALITETSKONTROLLER SOM REDOVISAS

1. Total eDNA-koncentration för samtliga prov (inkl. negativa) anges. Koncentrationen varierar avsevärt naturligt men ger ändå en första indikation om hur eDNA-extraktionen lyckats.
2. Inhibitionskontroll dokumenteras och redovisas. Inhibition betyder risk för att arter som finns i proverna inte detekteras därför att DNA inhiberats 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.
3. 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.
4. Negativa kontroller indelade i a) extraktions-negativa samt b) PCR-negativa utförs och utfallet redovisas. Detta möjliggör en kontroll av vilka prover som riskerar att vara kontaminerade och vid vilket steg detta i så fall skett.
5. Positiva kontroller (används inte alltid): a) Positiv flerartskontroll, där prov från ett artificiellt sammansatt samhälle ("mock community") används som positiv kontroll vid PCR och sekvensering. Falsa positiva prover redovisas. De positiva proverna försäkrar att PCR och bioinformatiken fungerar som avsett.
6. 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.
7. Minst 3 PCR-replikater per art/artgrupp och eDNA-prov utförs. Dessa sammanslås i sekvenseringen. Färre replikater minskar analys säkerheten avsevärt.
8. Antal prover för en specifik MiSeq-körning (sekvensering) överstiger inte 100 exklusive sekvenseringskontroller. Detta säkerställer att antalet läsningar per prov inte ska bli alltför lågt för att kunna detektera ovanligare arter.