



Aqua reports 2018:21

Jakten på solabborren (*Lepomis gibbosus*)

En eDNA-studie i Kungsbackaån

Patrik Bohman, Per Sundberg, Mårten Klinth, Matthias Obst



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Department of Aquatic Resources

Jakten på solabborren (*Lepomis gibbosus*)
En eDNA-studie i Kungsbackaån

Patrik Bohman¹, Per Sundberg², Mårten Klinth², Matthias Obst²

¹**Sveriges lantbruksuniversitet**, Institutionen för akvatiska resurser,
Stångholmsvägen 2, 178 93 Drottningholm

²SeAnalytics AB

Aqua reports 2018:21
ISBN: 978-91-576-9613-7 (elektronisk version)

E-post till ansvarig författare:
patrik.bohman@slu.se

Rapportens innehåll har granskats av:
Malin Werner, **Sveriges lantbruksuniversitet**, Institutionen för akvatiska resurser
Göran Sundblad, **Sveriges lantbruksuniversitet**, Institutionen för akvatiska resurser

Vid citering uppge:
Bohman, P, Sundberg, P., Klinth, M., Obst, M. (2018). Jakten på solabborren (*Lepomis gibbosus*).
En eDNA-studie i Kungsbackaån. Aqua reports 2018:21. Institutionen för akvatiska resurser,
Sveriges lantbruksuniversitet, Drottningholm Lysekil Öregrund. 44 s.

Nyckelord:
Solabborre, *Lepomis gibbosus*, eDNA, miljö-DNA, ddPCR, AIS

Rapporten kan laddas ned från:
<http://pub.epsilon.slu.se/>

Uppdragsgivare och finansjär:
Havs- och vattenmyndigheten (dnr 2544-18)

Chefredaktör:
Noél Holmgren, prefekt, institutionen för akvatiska resurser, Lysekil

Framsida: Solabborre fångad i dammen vid Anneberg (Kungsbacka) 2018.
Fotograf: Per Sundberg, ©SeAnalytics

Sammanfattning

Den 16e juli 2018 upptäcktes solabborre (*Lepomis gibbosus*) i en grävd damm i närheten av Kungsbacka, Hallands län. Solabborre är en oönskad främmande invasiv art som ursprungligen kommer från Nordamerika. Det visade sig att populationen i dammen bestod av ett stort antal individer med storlekar mellan 2 och 8 cm. Med tanke på mängden solabborrar i dammen, så är det högst sannolikt att solabborre planterades in för flera år sedan. Under försommaren 2018 rapporterades ett stort bestånd av solabborre från en damm vid Gränna i Jönköpings län. Det innebär att vi i Sverige nu har funnit reproducerande bestånd av arten, något som inte tidigare har rapporterats.

För att bättre bedöma en eventuell hotbild, samt artens spridningsgrad, är det viktigt att konstatera om arten finns på andra lokaler i närområdet. Detta görs med två olika metoder, elfiske och eDNA. Elfiske är en lämplig provfiskemetod för arter i grundare vattendrag, dammar och höljor. eDNA är en mycket noggrann metod för att, med endast vattenprover, upptäcka genetiska spår av specifika arter. Genom att isolera artspezifikt DNA (genom filtrering, extraktion och PCR) kan man bedöma om arten finns/inte finns i ett visst vatten. eDNA har visat sig vara en utmärkt metod vid miljöövervakning av främmande eller sällsynta arter. Flera studier har använt eDNA som metodik för att påvisa förekomst av invasiva arter, däribland solabborre i Europa. Detta är dock första gången metoden används på solabborren i Sverige. Projektet i Kungsbacka kan därför definieras som ett pilotprojekt, vars syfte är att spåra solabborre i området kring Kungsbacka, nedströms dammen där den upptäcktes.

Solabborre planterades in i Europa under 1800-talet och har idag spridit sig till norra Europa, där det finns reproducerande bestånd i bl.a. Norge, Danmark, Holland och Polen. Solabborren trivs mestadels i relativt stillastående vatten, som dammar och mindre sjöar, med mycket vegetation och viss eutrofieringsgrad. Men den kan anpassa sig till en mängd olika miljöer, och reproducerar sig även i rinnande vatten. Solabborren har inte visat så tydliga tendenser till negativ påverkan på arter eller miljö, och har därför klassats som en art med "låg ekologisk påverkan". Rapporter talar dock för att den kan bära på icke-endemiska parasiter, har revirhävdande beteende och äter andra fiskars rom. Detta skulle kunna innebära att arten sprider parasiter, konkurrerar med inhemsk fiskfauna om både utrymme och föda, samt eventuellt påverkar interaktionen mellan olika trofiska nivåer.

Resultat från elfisket visade att arten finns nedströms dammen, i åfåran som leder från dammen till Lillån. Dock upptäcktes inte arten, varken med elfiske eller eDNA, i Lillån eller nedströms liggande vattendrag (Kungsbackaån). Med tanke på dessa resultat är det rimligt att anta att solabborren inte har spridits till Lillån eller längre nedströms. Efter eDNA-provtagningen tömdes dammen på vatten, på inrådan från Havs- och vattenmyndigheten, och utfördes med överinseende från länsstyrelsen i Hallands län. Vid elfiske efter tömning fångades dock fyra solabborrar 1,5 km nedströms dammen. Det ska också nämnas att sommaren 2018 var mycket torr, vilket resulterade att delar av flodfåran mellan dammen och Lillån torkade ut. Därför är det fullt möjligt att individer fortfarande finns kvar i isolerade höljor, som vid högvattenflöden riskerar att spridas ytterligare nedströms.

Rekommendationerna från SLU Aqua och SeAnalytics är att följa upp med provtagningar under våren 2019 för att undersöka om arten fortfarande finns kvar i systemet. Beslut om fortsatt provtagning tas av Havs- och vattenmyndigheten.

Nyckelord: Solabborre, *Lepomis gibbosus*, eDNA, miljö-DNA, ddPCR, invasiv art.



Figur 1. Damm vid Kungsbacka där solabborren (*Lepomis gibbosus*) tidigare introducerats och ett reproducerande bestånd etablerats. Foto: Per Sundberg, ©SeAnalytics.

Abstract

The pumpkinseed sunfish (*Lepomis gibbosus*) is an undesirable alien invasive species (AIS) in Europe, endemic only to North America. The 16th of July 2018, the pumpkinseed was discovered in a pond near Kungsbacka in Halland County. The pond consisted of a large number of individuals, with sizes of 2-8 cm. Given the number of individuals in the pond, it is highly probable that this species was introduced several years ago. Earlier in 2018 a similar pond with high numbers of pumpkinseeds was reported near Gränna, in Jönköping County. Thus, in Sweden we have now found reproducing stocks of the species, something not previously reported.

To make a better threat assessment, it is important to determine if the species has spread to other sites in the immediate area. This is done using two different sampling methods, electrofishing and environmental DNA (eDNA). Electrofishing is a standardized method to assess fish population structures in relative shallow rivers and ponds. eDNA use molecular tools to detect species by analyzing genetic material within water samples. By isolating species-specific DNA (through filtration, extraction and PCR), presence/absence of a species can be assessed. The eDNA-methodology has proven to be an excellent tool for environmental monitoring of alien or rare species. Several studies have successfully used eDNA to track AIS, including pumpkinseeds, in Europe. However, it is the first time that eDNA is used to detect the pumpkinseed in Sweden. Therefore, this project can be defined as a pilot project aimed at tracking pumpkinseeds in the area around Kungsbacka.

The pumpkinseed was introduced to Europe during the 19th century and has since spread to northern Europe. Known reproducible stocks close to Sweden has been confirmed in Norway, Denmark, The Netherlands and Poland. The pumpkinseed live in relatively stagnant water, such as dams, ponds and smaller lakes, with a lot of vegetation and some eutrophication. It can adapt to a variety of different environments, and can reproduce in running waters. Studies of the pumpkinseed has not yet shown distinct adverse impact on neither endemic species nor their environments. Therefore, it has been classed as an AIS with “low ecological impact” in Sweden. Scientific reports, however, indicate that the species can contain non-endemic parasites, shows aggressive behavior, and predate on fish eggs. This implies that the pumpkinseed can spread parasites, and compete with domestic fish fauna for both habitat and food, and may even influence trophic interactions between species.

Results from electrofishing showed that the pumpkinseed had spread downstream from the pond. Individuals were found in the river which leads from the pond to river Lillån. No discoveries of the species (either with electrofishing or eDNA) were made in river Lillån or downstream. It is therefore possible that the pumpkinseed has not yet spread to river Lillån and further downstream to river Kungsbackaån. After the eDNA-sampling, which turned out to be negative, the pond was emptied by the landowner and the County Administrative Board of Halland. Notwithstanding, electrofishing in September caught four pumpkinseeds 1.5 km downstream of the pond. It should also be mentioned that the summer of 2018 was very dry,

with several dried out riverbeds. Therefore, it is quite possible that individuals still remain in isolated hollows, which may spread further downstream at high tides.

Recommendations from SLU Aqua and SeAnalytics AB are to do a follow-up sampling and analysis during spring 2019 in order to determine if the species still exists in the system. Final decision of a follow-up is taken by the Swedish Agency for Marine and Water Management (SwAM).

Keywords: Pumpkinseed sunfish, *Lepomis gibbosus*, environmental DNA, ddPCR, alien invasive species.



Figur 2. Solabborrar fångade i Kungsbacka 2018. Foto: Björn Fagerholm, länsstyrelsen i Hallands län.

Innehållsförteckning

1	Uppdrag	7
1.1	Innehåll och struktur	7
1.2	Händelseförlopp	8
2	Solabborre – en invasiv art	9
2.1	Förekomst och utseende	9
2.2	Ekologi	10
2.3	Hotbild	11
	2.3.1 Genomförda åtgärder	12
3	Provtagning: eDNA och elfiske	14
3.1	eDNA-provtagning	15
3.2	Elfiske	15
4	Laboratorieanalys: eDNA	16
4.1	Filtrering	16
4.2	Hantering av filtrat	17
4.3	DNA-extraktion och mängd DNA	17
4.4	Primerdesign	18
4.5	PCR	18
4.6	Kontroller	19
5	Resultat	20
5.1	eDNA	20
5.2	Elfiske	21
6	Diskussion	23
7	Åtgärdsförslag	25
	Referenslista	26
	Tack	28
	Bilaga 1	29
	Metadata från fältprovtagningar (lokal 1-10)	29
	Protokoll för DNA-extraktion	39
	Sammanställning av resultat från ddPCR-analys	44

1 Uppdrag

Efter att levande solabborrar (*Lepomis gibbosus*) hittats vid Kungsbacka (16/7, 2018) bedömde Havs- och vattenmyndigheten (HaV), att det fanns risk att solabborren hade spridit sig till kringliggande områden. Solabborren är en främmande invasiv art och SLU Aqua (Sveriges lantbruksuniversitet, institutionen för akvatiska resurser) fick uppdraget att utforma en plan för att undersöka solabborrens utbredning kring Kungsbacka. I uppdraget ingick att genomföra vattenprovtagningar och analysera innehållet med avseende på eDNA.

Detta är första gången som eDNA-metodik används för att identifiera solabborren (*Lepomis gibbosus*) i Sverige. Projektet i Kungsbacka kan därför definieras som ett pilotprojekt, vars syfte var att spåra solabborre i området kring Kungsbacka, nedströms dammen där den upptäcktes.

1.1 Innehåll och struktur

Rapportens innehåll struktureras enligt följande:

Först presenteras en händelsekedja av det vi vet om fynden i Kungsbacka, samt hittills genomförda och diskuterade åtgärder. Därefter presenteras arten solabborre, dess egenskaper och varför den klassas som främmande och invasiv i Sverige. Provtagning och provfiske, samt eDNA-analys beskrivs i kapitel 2-3, och resultaten presenteras i kapitel 4. Eventuella avvikelser och betänkligheter diskuteras i kapitel 5. Rapporten avslutas med åtgärdsförslag (kapitel 6). I bilaga 1 finns bakgrundsdata från eDNA-provtagningar, protokoll för genomförd DNA-extraktion, samt en sammanfattande tabell över resultat från ddPCR-analyserna. På detta sätt kan rapporten uppvisa god transparens och bedömas av utomstående. Möjligheten att verifiera utförande och resultat är mycket viktigt när det gäller eDNA-studier (Bohman 2018).

1.2 Händelseförlopp

16/7: En boende i området hittar några färgglada, döda fiskar i en uttorkad åfåra vid Heden, nära Kungsbacka (Fig. 3). Samma dag anmäldes fyndet till länsstyrelsen i Hallands län via mail och telefon. Dessutom togs kontakt med massmedia (P4 Halland). Fynden kom ursprungligen från en grävd damm utanför Anneberg som står i förbindelse med Lillån (Fig. 1). Markägaren till dammen var omedveten om utsättningen av arten.

18/7: Länsstyrelsen i Hallands län, tillsammans med Artdatabanken (SLU), konstaterar att det rör sig om solabborre (*Lepomis gibbosus*), en icke önskvärd invasiv främmande art. Länsstyrelsen i Hallands län och Artdatabanken SLU elfiskar på 6 lokaler (blå punkter i Fig. 7). De finner rikligt med solabborrar i och precis utanför dammen (Fig. 2), även rombärande honor. En vuxen individ fångas precis innan utloppet till Lillån, 1,5 km nedströms dammen. Risker bedöms därmed vara stor att solabborren spridit sig till kringliggande vattendrag.

18/7: Havs- och vattenmyndigheten kontakter SLU Aqua angående spårning av solabborre med hjälp av eDNA-teknik.

25/7: En plan för eDNA-kontroll upprättas av SLU Aqua. SLU Aqua anlitar SeAnalytics AB för att utföra eDNA-provtagning på plats, samt ddPCR-analys.

31/7-1/8: Provtagning av eDNA utförs vid 10 lokaler nedströms dammen (numrerade 1-10 i Fig. 7 och Fig. 12-21 i bilaga 1).

3/8: Den grävda dammen börjar tömmas av markägaren på överinseende av länsstyrelsen i Hallands län.

7/9: Elfiske genomförs av Kungsbackaåns fiskevårdsområdesförening vid fyra lokaler i Lillån (IKEU vattendrag). Inga solabborrar fångas.

20/9: Länsstyrelsen i Hallands län elfiskar på två lokaler i åfåran nedströms dammen. Vid båda lokalerna fångas ett flertal solabborrar.

30/11: Efter utvärdering av resultat från eDNA och elfiske rekommenderar SLU Aqua och SeAnalytics att följa upp provtagningar under våren 2019. Beslut tas av Havs- och vattenmyndigheten under 2019.

2 Solabborre – en invasiv art

2.1 Förekomst och utseende

Solabborrens (*Lepomis gibbosus*) ursprungsland är Nordamerika, där den naturligt förekommer uppifrån New Brunswick i Kanada och ner till South Carolina i USA. På engelska kallas arten pumpkinseed sunfish. Arten solabborre är egentligen lite felaktigt benämnd eftersom det inom familjen solabborrar (*Centrarchidae*) finns hela 30 arter. *Lepomis*-släktet består av 12 arter.

Under senare århundraden har solabborren introducerats från sina ursprungsområden till andra delar av USA och Kanada (Scott & Crossman 1975), samt Europa (Holcik 1991). Solabborren sprids med mänsklig hjälp successivt över allt större delar av Europa och Sydamerika under slutet av 1800-talet (Welcomme 1988). Detta har resulterat i att solabborren idag finns i över 28 europeiska länder (Copp & Fox 2007). De närmast liggande reproducerande bestånden finns i Norge, Danmark, Holland och Polen (Sterud & Jorgensen 2006; Copp & Fox 2007). Arten är även introducerad i Turkiet (Özkan 2007).

Solabborren har introducerats till nya vatten för bl.a. sportfiske, då den är en omtyckt matfisk i Nordamerika. Den är också en uppskattad akvarieart. Dessutom har solabborren använts som byte för att förbättra inhemska populationer som reducerats av tidigare introducerade arter som gädda, öringabborre (*Micropterus salmoides*; också en solabborre) och mal (*Silurus glanis*; Elvira & Almodovar 2001). Arten har också visat sig vara en effektiv predator på karplus (*Argulus foliaceus*), vilket föranlett att fisken satts ut i ett antal danska put-and-take-vatten (Artdatabanken 2018). Arten sprids mestadels av människan, men individer har även hittats under gällocken på större fiskar i Storbritannien, vilket visar på alternativa spridningsvägar för arten (Villeneuve et al. 2005).

Eftersom solabborren finns i flera nordeuropeiska länder är det troligtvis bara en tidsfråga innan arten sprids mer frekvent i Sverige. Faktum är att arten redan har hittats i sjön Läen 2012, men eftersom endast en adult individ hittades i denna sjö

så konstaterades ingen reproduktion vid detta tillfälle (Artdatabanken 2018). Däremot så hittades solabborre i en damm vid Gränna i Jönköpings län 2018. I dammen fanns en stor mängd individer i flera storleksklasser, vilket visar på ytterligare ett reproducerande bestånd (Jönköpings-Posten 2018).

Solabborren är vackert färgad med mörka strimmor mot blå botten utmed huvud och sidor (Fig. 3), men detta kan variera beroende på kön, livsmiljö och individens kondition (Mangit et al. 2018). En mörk fläck syns ofta på gällockets förlängning. Honorna är blekare och de mörka strimmorna är mer utmärkande än hos hanarna. Vid lektid får hanarna allt intensivare färger. Juveniler har en mer otydlig färgteckning och bakgrundsfärgen är endast grön/olivgrön (Fig. 4). Det är en ganska liten fisk, normalt endast upp till ca 20 cm i Europa, men i Nordamerika kan den bli upp till 40 cm (Fishbase 2018). Arten tillhör dock en av de mindre inom solabborrefamiljen. Solabborre kan förväxlas med den blågälade solabborren (*Lepomis macrochirus*), som också är en populär sportfisk men mer sparsamt introducerad i Europa och övriga världen.



Figur 3. Solabborre från dammen i Kungsbacka. Hane i lekdräkt. Bilderna visar tydliga färger och mönster, men fisken kan variera stort i utseende och färgintensitet (foto: Björn Fagerholm, länsstyrelsen i Hallands län).

2.2 Ekologi

Solabborren lever i alla typer av sötvatten och föredrar mestadels stillastående eller mycket långsamrinnande, grunda och vegetationsrika vatten. Arten är mindre framgångsrik i vattendrag, där den förekommer mer sparsamt i förhållande till annan lotisk fiskfauna (Clavero et al. 2004). På senare tid har dock allt fler reproducerande

bestånd hittats i rinnande vatten (Stakénas et al. 2013). Födan består främst av kräftdjur, musslor (bl.a. vandarmusslor), insekter (t.ex. fjädermyggor) och maskar, men den äter även småfisk och fiskrom. Arten kan bli över 12 år gammal. Optimal vattentemperatur ligger mellan 4 och 22° C (Fishbase 2018).

I Nordamerika sker leken under vår/försommar i ett bo byggt av hanen, på grunt vatten. Äggen vaktas sedan av hanen en tid efter kläckning (Balon 1959). Hanen börjar sedan förbereda boet för ytterligare lek med samma eller en annan hona. En hona kan producera upp till 1000 ägg. Då denna undersökning genomfördes (juli/augusti 2018) hade flera av hanarna lekdräkt och flera av honorna bar rom. Det är troligt att en senareläggning (eller förlängning) av leken har inducerats av flera okända faktorer.

2.3 Hotbild

En invasiv fiskart har definierats som en ”*inhemsk eller icke-inhemsk art som sprider sig, med eller utan hjälp av människor, i naturliga eller seminaturliga livsmiljöer, och som genererar en betydande förändring i sammansättning, struktur eller ekosystemprocesser, eller som orsakar allvarliga ekonomiska förluster för mänskliga aktiviteter*” (Copp et al. 2005). En fiskart som uppfyller nämnda kriterier och dessutom är främmande för området anses vara en invasiv främmande art, eller AIS (efter engelskans Alien Invasive Species). För att en främmande art ska anses invasiv så måste alltså flera olika kriterier uppfyllas: 1) den transporteras till ett nytt område från sitt ursprungsområde, 2) den etablerar en livskraftig population i det nya området, samt 3) den hotar att sprida sig till nya områden. Dessutom är det viktigt att bedöma artens påverkan på inhemska arter och deras miljö.

Solabborren klassas som en art med *låg påverkansgrad* i Sverige, vilket innebär en låg invasionspotential och låg ekologisk effekt (Artdatabanken 2018). Bedömningen baseras på tidigare studier av solabborre, där dess livshistoriska egenskaper, framförallt ålder vid könsmognad och juvenil tillväxthastighet, har använts för att bedöma artens invasiva förmåga i Europa. Vattentemperatur påverkar solabborrens livshistoriska egenskaper, vilka korrelerar negativt till latitud (Copp & Fox 2007). Cucherousset (2009) visade t.ex. att nordliga populationer (i jämförelse med mer sydliga):

- växte långsammare
- tillväxthastigheten för juveniler var lägre
- individer var äldre vid könsmognad

Tidigare studier av solabborren visar att arten har lätt att anpassa sig till olika miljöer, och därför kan sprida sig till många typer av vatten inom Europa

(Cucherousset et al. 2009). Idag finns solabborren i samtliga av Europas biogeografiska områden (Soes et al. 2011). Artens påverkan på europeisk biodiversitet är ännu inte helt utredd. Arten kan dock uppvisa aggressivt och revirhävdande beteende (Almeida et al. 2014), vilket skulle kunna påverka inhemska fiskpopulationer. Den har också visat sig äta fiskägg (García-Berthou & Moreno-Amich 2000). Arten kan eventuellt konkurrera med andra fiskarter om både utrymme och föda, vilket eventuellt kan förändra interaktionen mellan olika trofiska nivåer (Copp et al. 2010). Få sjukdomar har konstaterats, men arten kan sprida främmande parasiter (Sterud & Jorgensen 2006). Dock finns studier som hävdar att arten inte har någon som helst påverkan på inhemsk fiskfauna (Karakus et al. 2016), något som troligtvis påverkat bedömningen av artens invasiva förmåga.



Figur 4. Vissa individer (speciellt juveniler) uppvisar inte de säregna färger som adulta solabborrar har under leken, och kan därför vara svåra att artbestämma. Foto: Mats Envall, länsstyrelsen i Hallands län.

2.3.1 Genomförda åtgärder

När det gäller oönskade invasiva arter som kommit in i ”fel” miljö kan lämpliga åtgärder hittas genom att utveckla scenarier där hotbild ställs mot åtgärds kostnad. I fallet med dammen i Kungsbacka genomfördes en enkel lösning genom att tömma vattnet genom ett rör som gick direkt ut i den gamla åfåran nedströms dammen. För att hindra att fisk och eventuell rom skulle föras med vattnet fästes ett metallnät (med maskstorlek på 2 mm) på båda sidor om utloppsröret (Fig. 5). Maskstorleken var densamma som tidigare använts vid ett liknande fall med solabborre nära Gränna av länsstyrelsen i Jönköpings län. Ganska snart uppstod dock problem med nätet i Kungsbacka-dammen, eftersom det sattes igen med slam, löv, växter och fisk. För att inte riskera översvämning över vägen var markägaren tvungen att ta bort nätet vid utloppsröret, och istället placera det vid dräneringspumparna ute i sjön. Denna

lösning fungerade enligt markägaren utmärkt. Det tog lång tid tills det mesta av vattnet hade tömmts ur dammen. Slutligen återstod endast ett träsk fyllt med gytta (Fig. 6).



Figur 5. Nät som hindrar fisk från att komma ut vid tömning av dammen. Foto: Mats Envall, länsstyrelsen i Hallands län.

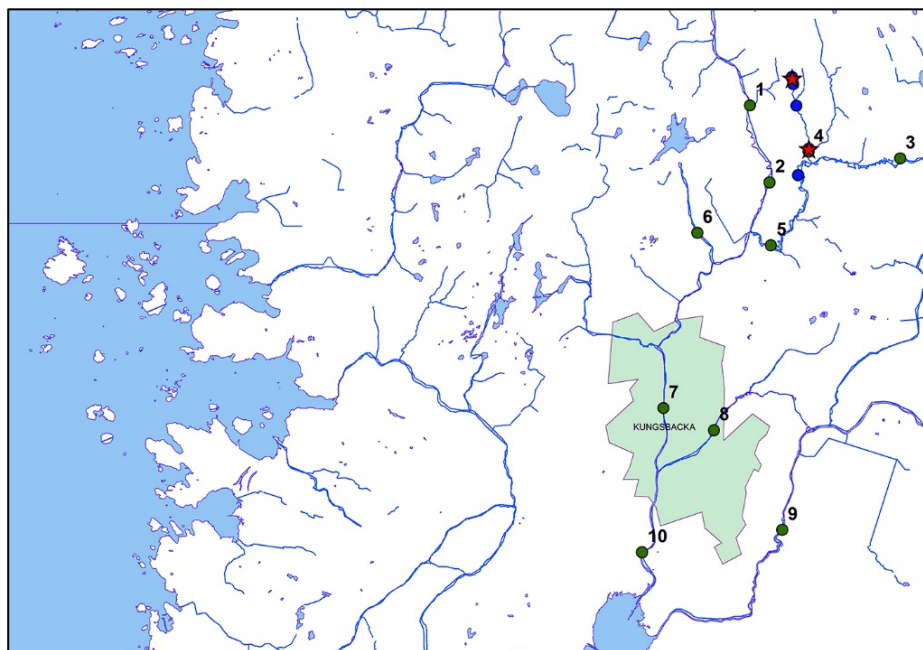
Ytterligare utrotningsåtgärder genom t.ex. rotenon, ammoniak eller kalkning var inte aktuellt eftersom länsstyrelsen bedömde att dessa metoder var ineffektiva i gytjan, där fisken kan undkomma behandlingen. Även om metoderna kan vara effektiva är de dessutom hälsovådliga, relativt dyra och kräver omfattande planering att utföra. Istället planeras mekaniska åtgärder i form av utpumpning av vatten under isen (vinter 2018) samt bottenkrapning med grävmaskin (vår 2019), av markägaren.



Figur 6. Dammen med solabborre före och efter tömning. Foto: Mats Envall, länsstyrelsen i Hallands län.

3 Provtagning: eDNA och elfiske

För att bättre bedöma en eventuell hotbild, samt artens spridningsgrad, är det viktigt att konstatera om arten även finns på andra platser i närområdet. Detta utfördes med två olika metoder, elfiske och eDNA (Fig. 7). *Elfiske* är en lämplig fångstmetod för fisk i lite grundare vattendrag och höljor. *eDNA*, från engelskans ”environmental DNA”, är en mycket noggrann metod för att upptäcka genetiska spår av specifika arter med vattenprover. Genom att isolera artspecifikt DNA (genom filtrering, extraktion och PCR) kan man bedöma om arten finns/inte finns i ett visst vatten. eDNA har visat sig vara en utmärkt metod vid miljöövervakning av både främmande och sällsynta arter. Flera studier har framgångsrikt använt eDNA som metodik för att



Figur 7. Karta över provtagningspunkter för eDNA (gröna) och elfiske (blå). Röda stjärnor visar var solabborre upptäcktes (två platser). Nummerade punkter visar eDNA-provtagningar (lokal 1-10, se bilaga 1). Några av punkterna (eDNA och elfiske) ligger på varandra. Illustration: Patrik Bohman, SLU. © Lantmäteriet.

spåra just invasiva arter, däribland solabborre (Davison et al. 2016; Clusa & Garcia-Vazquez 2018).

3.1 eDNA-provtagning

Vattenprovtagning för analyser av eDNA genomfördes den 31/7-1/8 på 10 lokaler i Kungsbackaån, Lillån och närliggande vattendrag (Skårsjöån, Rolfsån, samt kanal mellan Kungsbackaån och Rolfsån; Fig. 7), samt i dammen. Alla dessa provtagningsplatser (förutom dammen) utgjordes av vattendrag. Vattenproverna togs med 2 liters steril burk (engångs) under ytan (10-20 cm). Två till fyra replikat togs vid varje plats, beroende på vattenkvalitet. Fotografier togs av varje plats och GPS-position, luft- och vattentemperatur, samt övrig metadata noterades (tabell 1-10, bilaga 1). Vattenprov togs också i dammen som en positiv kontroll på att primer/prob fungerade för PCR-analysen (se Analys och resultat).

3.2 Elfiske

Elfiske utfördes i enlighet med standardiserad metodik (Degerman & Sers 2017), och utfördes vid två tillfällen av Mikael Svensson (Artadatabanken SLU), samt Björn Fagerholm och Mats Envall (länsstyrelsen i Hallands län). Vid första provfisket (18/7) elfiskades sex lokaler söder om dammen till utflödet i Lillån (Fig. 7). Efter att markägaren börjat tömma dammen på vatten (i början av augusti) utförde länsstyrelsen i Hallands län elfiske vid två lokaler (20/9). Elfiske utfördes även i Lillån (inom länsstyrelsens miljöövervakningsprogram för IKEU) 10/9.

4 Laboratorieanalys: eDNA

Analys av DNA-spår från vattenprover börjar bli allt vanligare vid miljöundersökningar. Generellt används följande steg vid eDNA-analys av enstaka *kända* arter, s.k. *enartsanalys*:

- Filtrering
- Hantering av filtrat
- DNA-extraktion
- Kontroll av DNA
- PCR

Om många (och delvis okända) arter ska bestämmas, används en annan eDNA-metodik som kallas *metabarcoding* (flerartsanalys), något som inte nyttjades vid denna studie. För att förstå analysprocessens detaljer inom eDNA rekommenderas rapporten ”eDNA i en droppe vatten” (Bohman 2018), där samtliga delsteg från provtagning till färdig analys beskrivs både för enarts- och flerartsanalyser.

4.1 Filtrering

eDNA-undersökningen baseras på att DNA-molekyler fångas upp av filterkapslar. Fördelen med dessa filter är att de är inneslutna i en plastkapsel och att extraktionen kan ske inne i kapseln utan att man behöver ta ut och hantera filtret. Detta minskar risken för kontamination och förenklar hanteringen av prover. Vattenproverna filterades med Millipore Sterivex™ filter (porstorlek 0,22 µm) med hjälp av en 50 ml spruta (Fig. 8). Optimalt filteras en liter vatten genom dessa filterkapslar. Genomsnittligt kunde vi dock endast filtrera 0,5 liter vatten per provtagningsplats, beroende på vattnets färg (humushalt) och grumlighet. På de platser där det var mycket klart vatten filterades upp till 0,9 liter. På platser med mycket grumligt vatten filterades så lite som 0,08 liter (bilaga 1). Vid provlokaler med mycket grumligt vatten (lokal 5-6; bilaga 1) togs därför fyra replikat som sedan poolades (blandades samman) till

ett eller två prov för DNA-extraktion. Det innebar att den totala volymen för dessa svårfiltrerade prover ökade till 0,31 liter (lokal 5) respektive 0,8 liter (lokal 6).

4.2 Hantering av filtrat

Efter filtrering fixerades filterkapseln med 99 % etanol, tillslotts, och lades i ett större märkt Falconrör (Fig. 8). Etanol stoppar effektivt nedbrytning av DNA. Proverna förvarades sedan i frys (-20°C) fram till DNA extraktion. Frysning används för att stabilisera DNA vid längre förvaring.



Figur 8. Vänster: Sterivexfilter och 50 ml spruta som används vid filtreringen. Höger: Sterivexfiltren läggs sedan i ett 50 ml Falconrör för förvaring. Foto: Per Sundberg, ©SeAnalytics AB.

4.3 DNA-extraktion och mängd DNA

Filtrering i kombination med kommersiellt utvecklade ”extraktionskit” och pumpar/hållare gör att själva arbetsgången kan optimeras och tiden hållas nere från provtagning till analys. För att ytterligare minska tidsåtgången extraheras flera prover samtidigt. Extraktionskitet ”DNeasy PowerWater Sterivex Kit” användes vid denna studie och proceduren beskrivs i detalj i bilaga 1 (Fig. 22-26).

Det är viktigt att kontrollera mängd DNA efter extraktion. Då vet man om extraktionen har varit effektiv. Mängden extraherad DNA mättes med Qubit fluorometer (tabell 11 i bilaga 1). Det ska poängteras att det är den *totala* mängden DNA (dvs. även icke-målarts-DNA) som beräknas.

4.4 Primerdesign

För att PCR (Polymerase chain reaction) ska fungera effektivt behövs artspecifika primerpar som hjälper till att kopiera solaborrens DNA från vattenproverna. För generella detaljer om markörval, primerdesign och PCR, se Bohman (2018). Primersekvenserna designas utifrån markören 16S på mitokondrie-DNA:t (mtDNA). Vi använde samma artspecifika primeruppsättning som Clusa & Garcia-Vazquez (2018). Dessa primerpar fäster mer specifikt på kortare DNA-fragment än vad som tidigare publicerats (Davison et al. 2016), vilket anses vara bättre för delvis nedbrutet DNA i vattenprover (Bohman 2018). Det artspecifika primerparet designades i enlighet med primertillverkarens rekommendationer. Dessutom designades en prob-sekvens så att den låg mellan de två primer-sekvenserna (också i enlighet med tillverkarens rekommendationer). Fördelen med att använda en prob i kombination med primerparet är att artspecifiteten ytterligare ökar. Det blir därmed en bättre relation mellan brus och signal, vilket innebär att resultaten blir lättare att tolka. Det blir också möjligt att analysera fler arter i samma prov (något som inte utnyttjades i denna studie).

4.5 PCR

Vid PCR används temperatur och enzymer i repeterbara cykler för att masskopiera specifika delar av DNA. Tack vare det tidigare designade och artspecifika primerparet kopieras nu *endast* solaborrens DNA. Därmed väljs solaborrens DNA-fragment specifikt ut bland miljontals andra DNA-fragment i vattenprovet. För att påvisa solaborrens DNA användes en metod som kallas droplet digital PCR eller ddPCR (©BioRad). ddPCR är en noggrann metod som tillverkar väldigt många tekniska replikat från ett DNA-prov (ca 20 000 droppar). I varje droppe sker sedan en PCR-reaktion. Det innebär en förbättrad noggrannhet, samt att den statistiska sannolikheten att hitta spår av arten förbättras (genom att antalet falska negativa fel minskar). I denna studie delades sedan varje prov upp i fyra s.k. ”brunnar”. Detta medförde att det totala antalet tekniska replikat ökade per biologiskt prov med upp till 80 000 droppar (4 x 20 000).

Optimering av ddPCR: Innan ddPCR-analysen slutgiltigt genomfördes kontrollerades först primerparets specificitet, och PCR:n optimerades. Ett primerpar användes då utan någon prob.

4.6 Kontroller

Kontroller används för att granska validitet, kontamination och bias vid fält- och laboratoriearbete (se Bohman 2018). I denna studie användes två typer av kontroller, negativa och positiva.

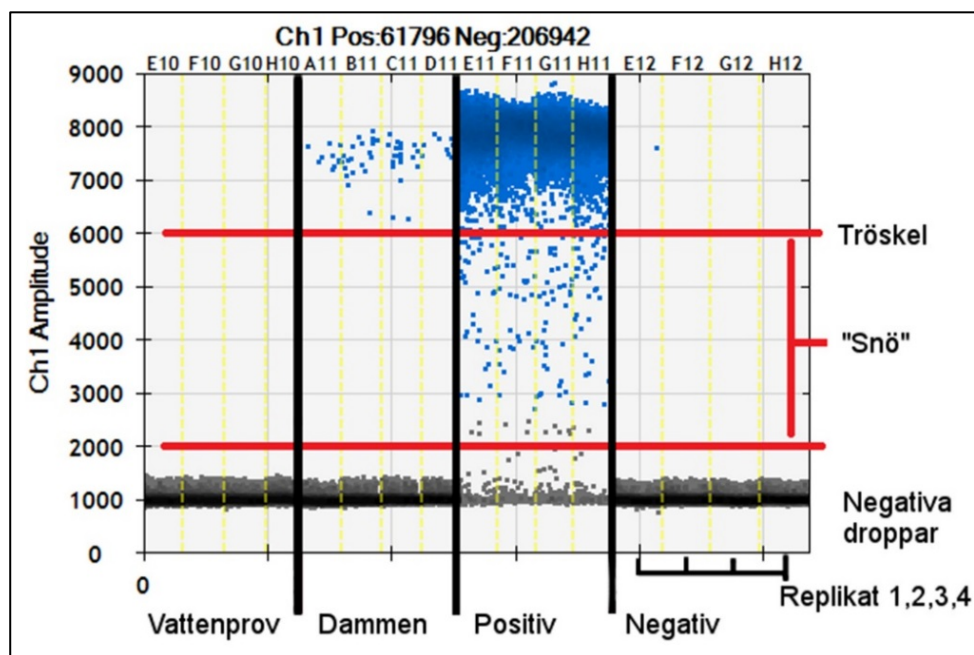
Negativa kontroller utgjordes av garanterat DNA/RNA-fritt vatten (dvs. DNA från solabborre saknas helt i dessa prover). Idealt hade vi tagit prov från vattendrag där vi med säkerhet visste att solabborren inte fanns, men det gick inte att få fram en sådan uppgift.

Som *positiv kontroll* användes vävnad från solabborre. Två fiskar fiskades upp i dammen, rensades och fixerades i 99 % etanol (fisken skars först i småbitar för att fixeringen skulle gå snabbare). Vävnaden användes sedan som en positiv kontroll vid bl.a. designen av primers och prob. Vid DNA-extraktion av den positiva kontrollen filtrerades först alkoholen (som fiskvävnaden var fixerad i) genom ett Sterivex-filter. Sedan behandlades denna kontroll som övriga prover.

5 Resultat

5.1 eDNA

Resultaten av DNA-mätningar och ddPCR finns listade i bilaga 1 (tabell 11). DNA från solaborre återfanns *inte* i vattenprover från lokalerna 1-10 nedströms dammen (Fig. 7; Fig. 12-21 i bilaga 1). Figur 9 visar ett utdrag ur resultatet från ddPCR-analysen för 1) ett av vattenproven, 2) dammen (som vi vet innehöll fisk), 3) en positiv kontroll från etanol med fiskvävnad, samt 4) en negativ kontroll med DNA-fritt vatten.



Figur 9. Diagram från ddPCR-analysen för ett av vattenproven, dammen med solaborre, en positiv kontroll med fiskvävnad, samt en negativ kontroll med DNA-fritt vatten. Illustration: Per Sundberg, ©SeAnalytics AB.

Punkter i diagrammet motsvarar droppar i ddPCR-analysen. I varje droppe sker en PCR-reaktion. Y-axeln visar hur stark signal varje droppe avgett. Ju högre signal desto mer DNA finns i droppen. Med hjälp av den positiva och negativa kontrollen kan ett tröskelvärde (översta röda linjen i Fig. 9) sättas, där alla droppar med starkare signal anses vara positiva. Det som i figur 9 kallas ”snö” hänvisar till droppar där signalen tyder på DNA men är mycket svagare än förväntat.

Den positiva kontrollen visar att primer/prob fungerar och tydligt indikerar artspecifikt DNA från solabborre. Likaså är provet från dammen tydligt, trots att mängden vatten som filtrerades var mycket litet (endast 80 ml). I provet från lokal 1 fanns det en droppe i en av brunnarna, likaså i den negativa kontrollen (DNA fritt vatten). Vi bedömde detta som felläsningar av systemet, utifrån det faktum att det rörde sig om en enstaka signal i enbart en av brunnarna (av fyra/prov) och lågt sannolikhetsvärde (tabell 11, bilaga 1).

5.2 Elfiske

Vid *första provfisketillfället* (18:e juli) genomfördes elfiske vid 6 lokaler. Solabborrar fångades vid 3 lokaler (i dammen, i en hölja nedströms dammen och vid kyrkan 1,5 km nedströms dammen; röda stjärnor i Fig. 7). Risken att solabborren spridit sig även till kringliggande vattendrag bedömdes därför vara stor. Eftersom dammen innehöll ett större reproducerbart bestånd är det även möjligt att spridning har skett under tidigare år.

- I dammen fångades rikligt med solabborrar. Längderna varierade mellan 5 och 7 cm och där fanns båda kön, inklusive hanar i lekdräkt och honor med rom.
- Vid höljorna precis nedanför dammen på andra sidan vägen (Fig. 11) fångades många (>20) solabborrar från 7 cm ner till 2,5 cm (troligen årsyngel), grodyngel, samt signalkräftor. Denna sträcka är början på den lilla bäcken ner till kyrkan (Fig. 7).
- I skogen nedströms dammen var bäcken i stort sett helt uttorkad med sten och berg i botten. En hölja hittades men ingen fisk fångades.
- Bäcken nedströms skogen bestod av sand och stenbotten och når ut på betad hagmark. Här elfiskades två höljar med endast lite vatten (ca 10 cm djupt), med smal bredd och mycket gräs. Ingen fisk fångades, dock några signalkräftor.
- Vid kyrkan gick bäcken längs gravplatserna med sand- och dybotten, mycket gräs och rinnande vatten (0,2-0,6 m djupt). Här fångades mycket öring (4-25 cm stora), flodnejonöga samt gulål. I ett vegetationsrikt område fångades en solabborre (4,5 cm).

- Lillån är ett större vattendrag (bredd: 3 m), med relativt lugnt flytande partier. Lokalen som fiskades bestod av sandig till dyig botten med inslag av lera och med kallare vatten (djup: ca 1-1,5 m). Området skuggades av skog. Endast flodnejonöga fångades vid elfisket.

Det *andra elfisketillfället* (20:e september) utfördes efter att dammen tömts på vatten.

- Alldeles nedströms dammen, i höljan på andra sidan vägen fångades 15 solabborrar (80 mm, 75 mm och 67 mm, samt 12 individer mellan 47 och 52 mm).
- Vid kyrkan strax innan Lillån fångades 4 solabborrar (35 mm, 51 mm, 52 mm och 54 mm).

Vid *IKEU-elfisket* som utfördes enbart i Lillån (10:e september) fångades inga solabborrar.



Figur 10. Solabborre fångas vid länsstyrelsens elfiske efter solabborre vid Kungsbacka. Foto: Mikael Svensson, Artdatabanken, SLU.

6 Diskussion

Sommaren 2018 var väldigt torr, vilket innebar att många mindre bäckar torkade ut vid Kungsbacka. Detta gällde t.ex. bäcken från solabborre-dammen till Lillån (vattendraget mellan stjärnorna i Fig. 7). Detta påverkade provtagningen både positivt och negativt. *Fördelen* var att fisk från dammen inte riskerade att simma nedströms och ”kontaminera” provtagningsområdena under tiden för provtagning. Det fanns därmed en möjlighet att kontrollera om individer tidigare hade etablerats i vattendragen nedströms dammen. eDNA bryts generellt ner inom några veckor i sötvatten (Thompson 2012). En *nackdel* var dock att det, i de torrlagda vattendragen, endast fanns isolerade höljor att provta (Fig. 11). Detta innebar att elfiske och eDNA-provtagning inte genomfördes i exakt samma höljor och därmed visade på olika resultat (fältarbetet utfördes vid olika tidpunkt och av olika personer). Lokal 4 gav t.ex. negativ träff vid eDNA-provtagningen men vid elfisket fångades solabborrar. Av denna anledning är det också fullt möjligt att individer fortfarande finns kvar i isolerade höljor nedströms dammen, som vid högvattenflöden riskerar att spridas längre nedströms.

Vid tömningen av dammen pumpades stora mängder vatten ut i den gamla åfåran och vidare nedströms i systemet. Trots goda försök att hindra fisk från att pumpas ut från dammen, är det möjligt att ägg, yngel och även fisk kan ha följt med vattnet ut i åfåran. Hur långt är dock oklart eftersom åfåran i skogen mestadels var torrlagd under sommaren. Vid elfisket fångades solabborrar ända nere vid kyrkan (precis innan utflödet till Lillån) *både* innan *och* efter tömningen. Inga upptäckter av solabborre, varken med elfiske eller eDNA, gjordes dock i Lillån eller längre nedströms (Kungsbackaån). Det är därför rimligt (men inte helt omöjligt) att solabborren ännu inte har spridits till Lillån och nedströms liggande vattendrag.

Då det gäller ddPCR, så kan metoden kvantifiera mängden DNA på ett tydligt och analyserbart sätt, men för att kunna användas som ett mått på populationsstorlek behövs en initial kalibrering med andra metoder (t.ex. elfiske). Det kan vara svårt att jämföra prover tagna på olika platser i systemet. Detta har bl.a. att göra med att den filtrerade mängden vatten varierade pga. skiftande vattenkvalitet. Sannolikheten

att fånga upp DNA molekyler ökar med mängden vatten som passerar igenom filtret. Dessutom kan mängden inhibitorer (kemiska föreningar som påverkar PCR negativt) variera mellan lokalerna. Det innebär att ddPCR-analysen kan ge olika mängd DNA och ska därför tolkas med förbehåll. Det innebär också, trots att ddPCR tekniken är mycket känslig, att det inte kan uteslutas att en del negativa resultat (ingen fisk) kan vara felaktiga, s.k. negativa fel. Det ska noteras att provet från dammen visade en mycket tydlig signal trots att endast 80 ml vatten filtrerades. Normalt filtrerades mellan 500 och 900 ml/lokal i denna undersökning; Fig. 12-21 i bilaga 1).

Ett sätt att öka sannolikheten att hitta solabborren är att öka mängden filtrerat vatten genom att t.ex. använda förfiltrering (filtrering med större porstorlek). Det har inte funnits kostnadsutrymme för detta inom den här undersökningen, eftersom även förfiltratet då måste harmoniseras och DNA-extraheras. Det går också att öka sannolikheten att hitta solabborre genom att ta flera prover (replikater) i varje delområde, eller att poola flera replikat till ett prov (replikater på replikatet). Det finns dock en balans mellan hur mycket en provtagning får kosta, och risken att *inte* hitta bestånd av solaborre. För detaljer kring filtrering, förfiltrering, replikat och pooling vid eDNA-undersökningar, se Bohman (2018).



Figur 11. Hölja nedanför dammen där solabborrar återfanns vid elfiske (Fig. 7). Foto: Björn Fagerholm, länsstyrelsen i Hallands län.

7 Åtgärdsförslag

Den damm som antas vara "käll-populationen" är nu tömd och förhoppningsvis ska alla individer av arten vara utrotade när den till våren naturligt börjar fyllas på igen. Därmed kan dammen fungera som det viltvatten den är tänkt för. Inga specifika kemiska åtgärder har tagits för att utrota solabborren. Istället kommer troligen en kall vinter, samt mekaniska åtgärder (t.ex. bottenskrapning) att ta död på resterande solabborrar. Detta bör dock kontrolleras 2019.

Rekommendationerna från SLU och SeAnalytics är att genomföra nya provtagningar under våren 2019, som en uppföljning för att bedöma om solaborre fortfarande finns kvar i systemet. Även om vi inte har påvisat att solaborre har spridit sig till omkringliggande vatten längre ner än till kyrkan (Fig. 7), så kan vi inte helt utesluta att så är fallet. Det var en väldigt torr sommar och det går inte att utesluta att det har funnits fickor av vattenansamlingar där fisk har funnits, men som inte har haft någon kontakt med de lokaler som provtogs med avseende på eDNA eller elfiske (Fig. 10). Provtagningen bör därför föregås av en ordentlig rekognosering för att utreda hur avrinningen från dammen ser ut. Det är en fördel om det finns möjlighet att synkronisera elfisket med eDNA-provtagning i området vid en kommande undersökning, så att exakt samma höljor elfiskas och provtas. Dessutom rekommenderas att ta fler replikat (3-4/plats) för att säkerställa eDNA-resultat.

Beslut om fortsatt provtagning tas av Havs- och vattenmyndigheten.

Referenslista

- Almeida, D., Merino-Aguirre, R., Vilizzi, L., Copp, G.H. (2014) Interspecific Aggressive Behaviour of Invasive Pumpkinseed *Lepomis gibbosus* in Iberian Fresh Waters. *PLoS ONE* 9(2): e88038. doi:10.1371/journal.pone.0088038.
- Artdatabanken (2018) Artdatabankens arbete med riskklassning av främmande arter – *Lepomis gibbosus*. 2018-11-29: https://www.artdatabanken.se/globalassets/ew/subw/artd/1-om-arter-och-natur/om-biologisk-mangfald/om-frammande-arter/pdf_animalia_lista_prel_resultat_utfall.pdf
- Balon, E.K. (1959) Spawning of *Lepomis gibbosus* (Linne 1758) acclimatised in the back waters of the Danube and its development during the embryonic period. *Acta Soc. Zool. Boh* 13:1-22.
- Bohman, P. & Edsman, L. (2013) Marmorkräftan i Märstaån – riskanalys och åtgärdsförslag, *Aqua reports* 2013:17, 114 sidor. Laddas ner: https://www.slu.se/globalassets/ew/org/inst/aqua/externwebb/sidan-publikationer/aqua-reports-xxxx_xx/aqua-reports-2013_17_e.pdf
- 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 sidor. Laddas ner: https://www.slu.se/globalassets/ew/org/inst/aqua/externwebb/sidan-publikationer/aqua-reports-xxxx_xx/aquarapporter/2018/aqua-reports-2018_18.pdf
- Clavero, M., Blanco-Garrido, F., Prenda, J. (2004) Fish fauna in Iberian Mediterranean river basins: biodiversity, introduced species and damming impacts. *Aquat. Conserv*, 14:575-585, doi: 10.1002/aqc.636.
- Clusa, L. & Garcia-Vazquez, E. (2018) A simple, rapid method for detecting seven common invasive fish species in Europe from environmental DNA. *Aquatic Conserv: Mar Freshw Ecosyst* 28:619–629, doi: 10.1002/aqc.2890.
- Copp, G.H., Bianco, P.G., Bogutskaya, N.G. et al. (2005) To be, or not to be, a non-native freshwater fish? *J Appl Ichthyol* 21:242–262, doi: 10.1111/j.1439-0426.2005.00690.x.
- Copp, G.H. & Fox, M.G. (2007) Growth and life history traits of introduced pumpkinseed (*Lepomis gibbosus*) in Europe, and the relevance to invasiveness potential. In: Gherardi F (ed) *Freshwater bioinvaders: profiles, distribution, and threats*. Springer, Berlin, pp 289–306.
- Copp, G.H., Stakenas, S., Cucherousset, J. (2010) Aliens versus the natives: interactions between introduced *Lepomis gibbosus* and indigenous *Salmo trutta* in small streams of southern England. *Am Fish Soc S* 73: 347–370, doi:
- Cucherousset, J., Copp, G.H., Fox, M.G. et al. (2009) Life-history traits and potential invasiveness of introduced pumpkinseed *Lepomis gibbosus* populations in northwestern Europe. *Biol Invasions* 11:2171–2180, doi: 10.1007/s10530-009-9493-5.

- Davison, P.I., Creach, V., Liang, W.J., Andreou, D., Britton, J.R., Copp, G.H. (2016) Laboratory and field validation of a simple method for detecting four species of non-native freshwater fish using eDNA. *Journal of Fish Biology* 89(3):1782-93. doi: 10.1111/jfb.
- Degerman, E. & Sers, B. (2017) Undersökningstyp – Elfiske i rinnande vatten. Version 1:8 2017-04-25 (17 s). Laddas ner: <https://www.slu.se/globalassets/ew/org/inst/aqua/externwebb/databaser/el-provfiskedatabasen/undersokningstyp-fisk-i-rinnande-vatten-vadningselfiske.pdf>
- Elvira, B. & Almodovar, A. (2001). Freshwater fish introduction in Spain: facts and figures at the beginning of the 21st century. *Journal of Fish Biology* 59: 323-331, doi: 10.1006/jfbi.2001.175.
- Fishbase (2018) <http://www.fishbase.org/summary/3372>. 2018-11-27.
- García-Berthou, E., Moreno-Amich, R. (2000) Food of introduced pumpkinseed sunfish: ontogenetic diet shift and seasonal variation. *Journal of Fish Biology* 57: 29-40, doi: 10.1111/j.1095-8649.2000.tb00773.x.
- Holcik, J. (1991). Fish introductions in Europe with particular reference to its central and eastern part. *Can J Fish Aquat Sci* 48: 13-23, doi: 10.1139/f91-300.
- Jönköpings-Posten (2018) Ovanlig abborre upptäckt efter flera år – nu måste hela dammen tömmas: "Vi har aldrig gjort det här" 2018-07-13: <https://www.jp.se/article/over-1-000-solabborrar-har-fatt-faste-i-dammen/>
- Karakus, N.T., Tarkhan, A.S., Vilizzi, L., Karakus, U. (2016) Microhabitat interactions of non-native pumpkinseed *Lepomis gibbosus* in a Mediterranean-type stream suggest no evidence for impact on endemic fishes. *Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems* 417(36):1-7, doi: 10.1051/kmae/2016023.
- Mangit, F., Korkmaz, M., Yerli, S.V. (2018) Morphological variation of pumpkinseed (*Lepomis gibbosus*) with emphasis on allometry. *Turkish Journal of Zoology* 42: 53-61, doi: 10.3906/zoo-1703-45.
- Scott, W.B. & Crossman, E.J. (1975). *Freshwater fishes of Canada*. Andra upplaga, publicerad av Fisheries Research Board of Canada, Ottawa, Kanada, 966 sidor.
- Soes, D.M., Cooke, S.J., van Kleef, H.H., Broeckx, P.B., Veenvliet, P. (2011). *A risk analysis of sunfishes (Centrarchidae) and pygmy sunfishes (Elassomatidae) in The Netherlands*. Netherlands: Bureau Waardenburg Bv, 110 sidor.
- Stakénas S, Vilizzi L, Copp GH (2013) Habitat use, home range, movements and interactions of introduced *Lepomis gibbosus* and native *Salmo trutta* in a small stream of Southern England. *Ecol Freshw Fish* 22: 202–215, doi: 10.1111/eff.12015.
- Sterud, E. & Jørgensen, A. (2006) Pumpkinseed *Lepomis gibbosus* (Linnaeus, 1758) (Centrarchidae) and associated parasites introduced to Norway. *Aquatic Invasions* 1(4): 278-280, doi: 10.3391/ai.2006.1.4.10.
- Thomsen, P.F. et al (2012). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Mol. Ecol.* 21: 2565–2573, doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x.
- Villeneuve, F., Copp, G.H., Fox, M.G., Stakénas, S. (2005) Interpopulation variation in the growth and life history traits of the introduced sunfish, pumpkinseed *Lepomis gibbosus*, in Southern England. *J. Appl. Ichthyol.* 21: 275–281, doi: 10.1111/j.1439-0426.2005.00679.x.
- Welcomme, R.L. (1988). International Introductions of Inland Aquatic Species: *FAO Fisheries Technical Paper No. 294*. Rome, Italy: FAO.
- Özkan, G. (2007) Distribution of the non-native fish species, pumpkinseed *Lepomis gibbosus* (Linnaeus, 1758), in Turkey. *Aquatic Invasions* 2(2): 146-148, doi: 10.3391/ai.2007.2.2.10.

Tack

Tack till granskarna Malin Werner och Göran Sundblad (SLU Aqua). Tack till Björn Fagerholm och Mats Envall (länsstyrelsen i Hallands län) för hjälpsamma kommentarer och bildmaterial. Tack till Mikael Svensson (Artdatabanken, SLU). Tack till markägaren Mikael Tholin för snabba åtgärdsinsatser och hjälpsamhet vid provtagning. Tack till alla som hjälpt till vid inventering och provtagning.

Bilaga 1

Metadata från fältprovtagningar (lokal 1-10)

Tabell 1. Lokal 1 (Kungsbackaån)

Datum	2018-08-01
Position (lat/long)	57.5500 / 12.0990
Position (SWEREF 99 TM)	6382322 / 326410
Lufttemperatur	22,9
Vattentemperatur	20,4
Storleksklassning av vattendrag	8-12 m bred
Flöde (lugnt, strömt, stråkande-fors)	lugnt
Färg (klart, svagt färgat, starkt färgat)	klart
Grumlighet (klart, liten grumlighet, mycket grumlighet)	klart
Vattennivå (låg, medel, hög)	lågt (Fig. 12)
Mängd filtrerat vatten	Replikat 1:1 0,8 l; replikat 1:2 0,70 l



Figur 12. Lokal 1 (Kungsbackaån). Foto: Per Sundberg, ©SeAnalytics.

Tabell 2. Lokal 2 (Kungsbackaån)

Datum	2018-08-01
Position (lat/long)	57.5366 / 12.1066
Position (SWEREF 99 TM)	6380811 / 326801
Lufttemperatur	23,3
Vattentemperatur	20,8
Storleksklassning av vattendrag	växlande 5-8, liten sjö
Flöde (lugnt, strömt, stråkande-fors)	lugnt
Färg (klart, svagt färgat, starkt färgat)	klart, svagt färgat
Grumlighet (klart, liten grumlighet, mycket grumlighet)	klart
Vattennivå (låg, medel, hög)	lågt
Mängd filtrerat vatten	Replikat 2:1 0,87 l; replikat 1:2 0,9 l



Figur 13. Lokal 2 (Kungsbackaån). Foto: Per Sundberg, ©SeAnalytics.

Tabell 3. Lokal 3 (Lillån)

Datum	2018-08-01
Position (lat/long)	57.5418 / 12.1491
Position (SWEREF 99 TM)	6381282 / 329368
Lufttemperatur	22,2
Vattentemperatur	19,2
Storleksklassning av vattendrag	2-4 m bred
Flöde (lugnt, strömt, stråkande-fors)	lätt strömmande
Färg (klart, svagt färgat, starkt färgat)	klart
Grumlighet (klart, liten grumlighet, mycket grumlighet)	klart
Vattennivå (låg, medel, hög)	lågt (Fig. 14)
Mängd filtrerat vatten	Replikat 3:1 0,60 l; replikat 3:2 0,55 l



Figur 14. Lokal 3 (Lillån). Foto: Per Sundberg, ©SeAnalytics.

Tabell 4. Lokal 4 (Bäck, flöde från dammen)

Datum	2018-08-01
Position (lat/long)	57.5423 / 12.1189
Position (SWEREF 99 TM)	6381414 / 327564
Lufttemperatur	23,0
Vattentemperatur	16,2
Storleksklassning av vattendrag	0,5 m bred
Flöde (lugnt, strömt, stråkande-fors)	lätt strömmande
Färg (klart, svagt färgat, starkt färgat)	klart
Grumlighet (klart, liten grumlighet, mycket grumlighet)	klart
Vattennivå (låg, medel, hög)	lågt
Mängd filtrerat vatten	Replikat 4:1 0,55 l; replikat 4:2 0,60 l



Figur 15. Lokal 4 (Bäck, flöde från dammen). Foto: Per Sundberg, ©SeAnalytics.

Tabell 5. Lokal 5 (Lillån)

Datum	2018-07-31
Position (lat/long)	57.5255 / 12.1079
Position (SWEREF 99 TM)	6379573 / 326826
Lufttemperatur	33,4
Vattentemperatur	21,0
Storleksklassning av vattendrag	3 m bred
Flöde (lugnt, strömt, stråkande-fors)	lugnt
Färg (klart, svagt färgat, starkt färgat)	svagt färgat/mjölkgigt
Grumlighet (klart, liten grumlighet, mycket grumlighet)	liten grumlighet
Vattennivå (låg, medel, hög)	Lågt (Fig. 16)
Mängd filtrerat vatten	Replikat 5:1 50 ml; replikat 5:2 100 ml; replikat 5:3 80 ml; replikat 5:4 80 ml.

Svårt att filtrera!



Figur 16. Lokal 5 (Lillån). Foto: Per Sundberg, ©SeAnalytics.

Tabell 6. Lokal 6 (liten bäck ner mot Kungsbackaån)

Datum	2018-07-31
Position (lat/long)	57.5271 / 12.0835
Position (SWEREF 99 TM)	6379814 / 325373
Lufttemperatur	31,8
Vattentemperatur	19,6
Storleksklassning av vattendrag	0,3 m bred
Flöde (lugnt, strömt, stråkande-fors)	lugnt
Färg (klart, svagt färgat, starkt färgat)	svagt brunfärgat
Grumlighet (klart, liten grumlighet, mycket grumlighet)	liten grumlighet
Vattennivå (låg, medel, hög)	Lågt (nästan inget vatten; Fig. 17)
Mängd filtrerat vatten	Replikat 6:1 175 ml; replikat 6:2 195 ml; replikat 6:3 200 ml; replikat 6:4 230 ml. Svårt att filtrera!



Figur 17. Lokal 6 (liten bäck ner mot Kungsbackaån). Foto: Per Sundberg, ©SeAnalytics.

Tabell 7. Lokal 7 (Kungsbackaån)

Datum	2018-07-31
Position (lat/long)	57.4959 /12.0749
Position (SWEREF 99 TM)	6376364 / 324709
Lufttemperatur	30,7
Vattentemperatur	22,6
Storleksklassning av vattendrag	8-10 m bred
Flöde (lugnt, strömt, stråkande-fors)	Lugnt
Färg (klart, svagt färgat, starkt färgat)	svagt gulfärgat
Grumlighet (klart, liten grumlighet, mycket grumlighet)	klart
Vattennivå (låg, medel, hög)	medel
Mängd filtrerat vatten	Replikat 7:1 575 ml; replikat 7:2 550 ml



Figur 18. Lokal 7 (Kungsbackaån). Foto: Per Sundberg, ©SeAnalytics.

Tabell 8. Lokal 8 (Söderån (mellan Rolfsån och Kungsbackaån))

Datum	2018-07-31
Position (lat/long)	57.4924 / 12.09176
Position (SWEREF 99 TM)	6375931 / 325702
Lufttemperatur	28,6
Vattentemperatur	22,4
Storleksklassning av vattendrag	6-10 m bred
Flöde (lugnt, strömt, stråkande-fors)	Lugnt
Färg (klart, svagt färgat, starkt färgat)	svagt gulfärgat
Grumlighet (klart, liten grumlighet, mycket grumlighet)	klart
Vattennivå (låg, medel, hög)	medel
Mängd filtrerat vatten	Replikat 8:1 0,35 l; replikat 8:2 0,40 l



Figur 19. Lokal 8 (Söderån (mellan Rolfsån och Kungsbackaån)). Foto: Per Sundberg, ©SeAnalytics.

Tabell 9. Lokal 9 (Rolfsån)

Datum	2018-07-31
Position (lat/long)	57.4753 / 12.1156
Position (SWEREF 99 TM)	6373968 / 327050
Lufttemperatur	27,4
Vattentemperatur	22,7
Storleksklassning av vattendrag	30 m bred
Flöde (lugnt, strömt, stråkande-fors)	strömt
Färg (klart, svagt färgat, starkt färgat)	svagt gulfärgat
Grumlighet (klart, liten grumlighet, mycket grumlighet)	klart
Vattennivå (låg, medel, hög)	lågt
Mängd filtrerat vatten	Replikat 9:1 0,55 l; replikat 9:2 0,55 l



Figur 20. Lokal 9 (Rolfsån). Foto: Per Sundberg, ©SeAnalytics.

Tabell 10. Lokal 10 (Kungsbackaån, nära utloppet).

Datum	2018-07-31
Position (lat/long)	57.4703 / 12.0699
Position (SWEREF 99 TM)	6373529 / 324286
Lufttemperatur	25,7
Vattentemperatur	22,0
Storleksklassning av vattendrag	15 m bred
Flöde (lugnt, strömt, stråkande-fors)	Lugnt
Färg (klart, svagt färgat, starkt färgat)	svagt gulfärgat
Grumlighet (klart, liten grumlighet, mycket grumlighet)	klart – liten grumlighet
Vattennivå (låg, medel, hög)	medel
Mängd filtrerat vatten	Replikat 10:1 0,30 l; replikat 10:2 0,30 l



Figur 21. Lokal 10 (Kungsbackaån, nära utloppet). Foto: Per Sundberg, ©SeAnalytics.

Protokoll för DNA-extraktion

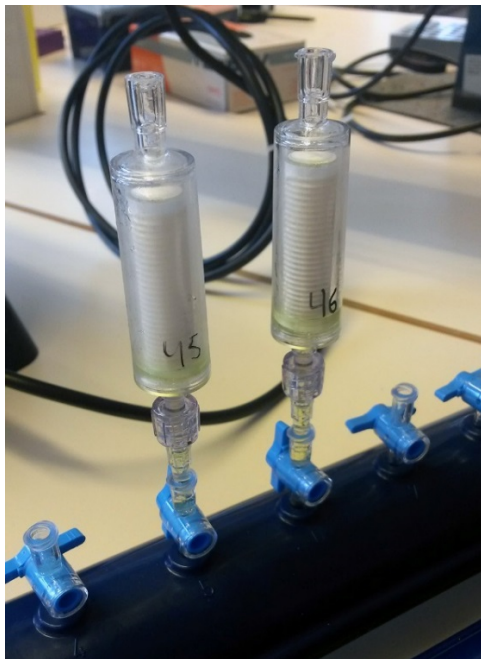
Detta protokoll beskriver DNA-extraktion från Sterivex-filter med DNeasy Power-Water Sterivex Kit (i enlighet med tillverkarens rekommendationer). Protokollet är på engelska.

Protocol: Experienced user

- We recommend you to use Sterivex filter units (Millipore cat. No. SVGPL10RC). If you have non-Luer style Sterivex filters, please refer to the troubleshooting guide or contact technical services for recommendations.
- Solution ST1A must be added to the bottle labeled “solution ST1B“ and mixed well.
- Solution MBL and MR must be warmed at 65° C for 5-10 min to dissolve precipitates prior to use. Solution MBL and MR must be used while still warm.
- Shake to mix solution PW before use.

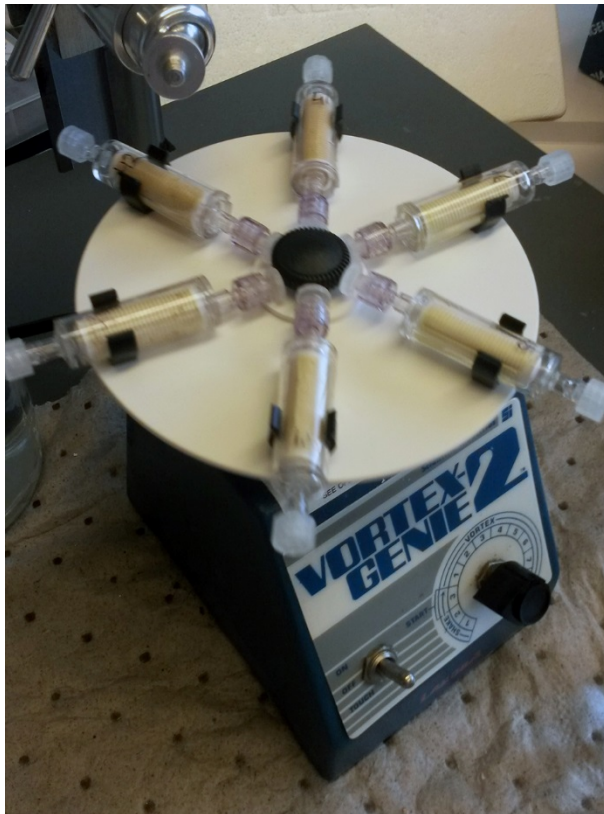
Procedure

1. Filter water sample through a Sterivex filter unit. Remove as much of the remaining liquid as possible using a syringe containing air. Cap both ends with the inlet and outlet caps. If ethanol is used to conserve the samples this need to be removed before the following steps (Fig. 22).



Figur 22. Ethanol was added to the filters before they were stored in a freezer. The manifold was used to suck out the ethanol before the extraction procedure (step 2). Foto: Per Sundberg, ©SeAnalytics.

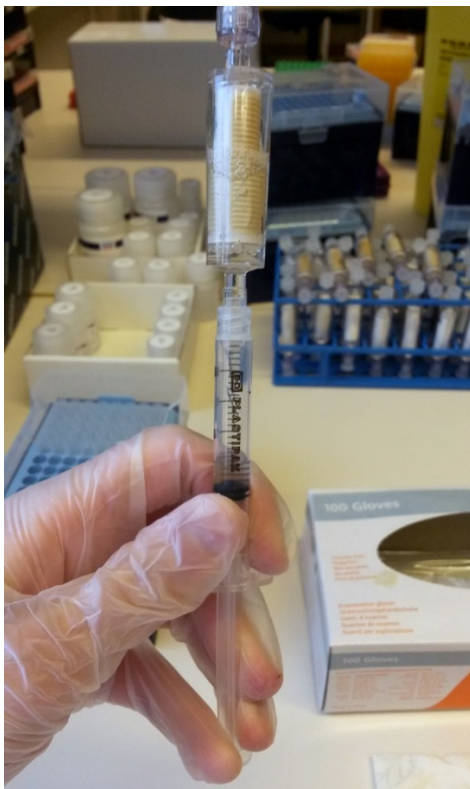
2. Remove the inlet cap and add 0.9 ml of solution ST1B using a pipette tip. Insert the pipette completely into the inlet so that the pipette tip is visible inside the unit just above the membrane.
3. Re-cap the inlet and secure the Sterivex filter unit horizontally to a Vortex adapter, with the inlet facing out, to a Vortex adapter (cat. No. 13000-V1-5 or 13000-V1-15; Fig. 23).



Figur 23. Step 3: Secure the Sterivex filter unit horizontally to a Vortex adapter. Foto: Per Sundberg, ©SeAnalytics.

4. Vortex at minimum speed for 5 min.
5. While still attached to the Vortex adapter, rotate the Sterivex filter unit 180 degrees from the original position. Vortex at minimum speed for an additional 5 min.
6. Set the Sterivex filter unit with the inlet facing up and remove the inlet cap. Add 0.9 ml of solution MBL using a pipette tip. Insert the pipette completely into the inlet so that the pipette tip is visible inside the unit just above the membrane. Re-cap the inlet.
7. **This step was skipped:** Incubate the Sterivex filter unit at 90° C for 5 min. Ensure heat is evenly distributed. Note: Do not heat at higher temperatures or for longer than 5 min.

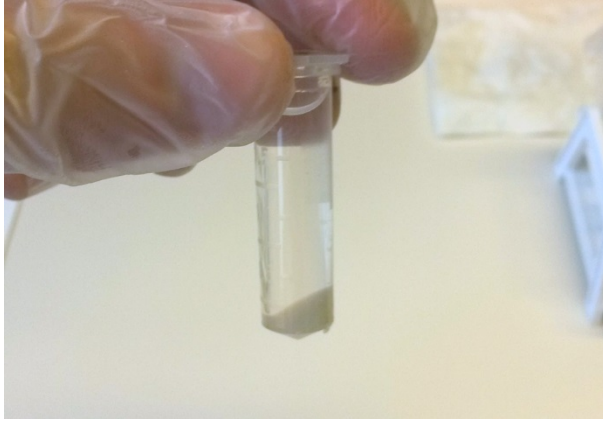
8. **This step was skipped:** Cool the unit at room temperature for 2 min. Ensure that the caps are on tightly.
9. Secure the Sterivex filter unit horizontally, with the inlet facing out, to vortex adapter.
10. Vortex at maximum speed for 5 min. set the Sterivex filter unit with the inlet facing up and remove the inlet cap.
11. Pull back the plunger of a 3 ml syringe to fill the barrel with 1 ml of air and attach it to the inlet of the Sterivex filter unit (Fig. 24). Push air into the unit until there is resistance and release the plunger. Continue to pull back on the plunger to remove as much of the lysate as possible. Detach the syringe from the Sterivex filter unit.



Figur 24. Step 11: Fill a syringe with 1 ml of air and attach it to the inlet of the Sterivex filter unit.

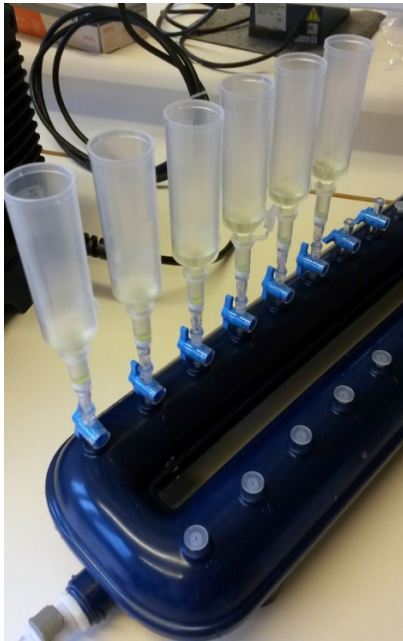
12. **This step was skipped:** add the lysates to 5 ml glass PowerBead tubes. Secure the PowerBead tubes horizontally to a Vortex adapter (cat. No. 13000-V1-5 or 13000-V1-15).
13. **This step was skipped:** vortex at maximum speed for 5 min. Centrifuge at 4000 x g for 1 min.
14. Transfer all the supernatant to a clean 2.2 ml collection tube.

15. Add 300 μ l of solution IRS and vortex briefly to mix. Incubate at 1-8° C for 5 min.
16. Centrifuge the tube at 13,000 x g for 1 min. Avoiding the pellet, transfer the supernatant to a clean 5 ml collection tube (Fig 25).



Figur 25. Step 16: transfer the supernatant to a clean 5 ml collection tube. Foto: Per Sundberg, ©SeAnalytics.

17. Place a tube extender firmly into an MB spin column.
18. Attach the tube extender/MB spin column unit to a VacConnector and VacValve on the QIAvac 24 Plus Manifold (cat. No 19413; Fig 26).



Figur 26. Step 18: Attach the tube extender/MB spin column unit to a Vac-Connector and VacValve on the QIAvac 24 Plus Manifold. Foto: Per Sundberg, ©SeAnalytics.

19. Add 3 ml of solution MR to the collection tube containing supernatant. Vortex to mix.
20. Load the entire 4.5 ml of supernatant into the tube extender/MB spin column.
21. Turn on the vacuum source and open the VacValve of the port. Allow the lysate to pass through. After the lysate had passed through completely, close the VacValve of that port.
22. While keeping the MB spin column attached to the VacValve, remove the tube extender and discard.
23. Add 0.8 ml of ethanol of the MB spin column. Open the VacValve. Allow the ethanol to pass through the column completely. Close the VacValve.
24. Add 0.8 ml of solution PW to the MB spin column. Open the VacValve and allow solution PW to pass through the column completely. Continue to pull a vacuum for another minute to dry the membrane. Close the VacValve.
25. Add 0.8 ml of ethanol to the MB spin column. Open the VacValve and apply a vacuum until the ethanol has passed through the MB spin column completely. Continue to pull a vacuum for another minute to dry the membrane. Close the VacValve.
26. Turn off the vacuum source and open an unused port to vent the manifold. If all 20 ports are in use, break the vacuum at the source.
27. Remove the MB spin column and place in a 2.2 ml collection tube. Centrifuge the tube at 13000 x g for 2 min to completely dry the membrane.
28. Transfer the MB spin column to a new 2.2 ml collection tube and add 100 µl of solution EB or sterile DNA-free PCR-grade water to the center of the white filter membrane.
29. Centrifuge at 13000 x g for 1 min at room temperature. Discard the MB spin column. **The DNA is now ready for any downstream application.**

Sammanställning av resultat från ddPCR-analys

Tabell 11. Variabler och resultat från ddPCR och DNA-koncentration.

Lokal	Volym (L)	Qubit DNA konc. (ng/µl)	DNA-kopior*	Standardavvikelse**
1:1	0,80	0,538	0	0
1:2	0,70	1,855	0,35	0,70
2:1	0,87	5,600	0	0
2:2	0,90	0,292	0	0
3:1	0,60	0,233	0	0
3:2	0,55	0,176	0	0
4:1	0,55	0,324	0	0
4:2	0,60	För låg för att uppskattas	0	0
5:1-5:4	0,31	0,860	0	0
6:1-6:2	0,37	0,730	0	0
6:3-6:4	0,43	0,659	0	0
7:1	0,58	4,210	0	0
7:2	0,55	4,745	0	0
8:1	0,35	2,005	0	0
8:2	0,40	För låg för att uppskattas	0	0
9:1	0,55	0,636	0	0
9:2	0,55	1,590	0	0
10:1	0,30	0,352	0	0
10:2	0,30	0,204	0	0
Damm	0,10	0,999	23,80	8,58
Pos. kontroll	0	0,681	103 050	3 984,55
Pos. kontroll	0	För låg för att uppskattas	3 285	107,55
Neg. kontroll	0	0	0,15	0,42

* Resultatet från ddPCR analysen visas här som medelvärdet (från 4 brunnar per prov) av antalet DNA kopior per 20 µl brunn

** Standardavvikelse (från ddPCR). Endast dammen och etanolen som innehöll fiskvävnad gav positiva resultat. De mycket låga värden som uppmättes för prov 1:2 och den negativa kontrollen motsvarar en positiv droppe i ett av fyra replikat och kan inte tolkas som positivt.

