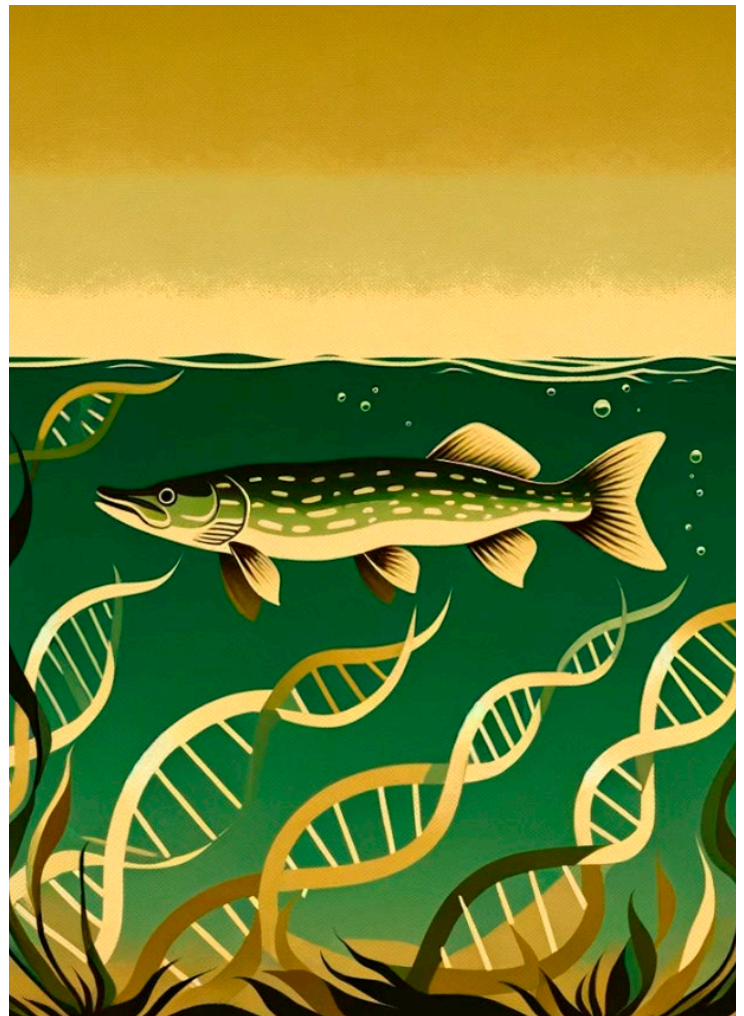


Utveckling av eDNA som metod för övervakning av gädda

Anti Vasemägi, Erik Karlsson,
Martin Ogonowski, Göran Sundblad,
Josefin Sundin, Patrik Bohman

RAPPORT 7154 | JUNI 2024



Utveckling av eDNA som metod för övervakning av gädda

av Anti Vasemägi, Erik Karlsson, Martin Ogonowski,
Göran Sundblad, Josefin Sundin och Patrik Bohman

Beställningar

Ordertel: 08-505 933 40

E-post: natur@cm.se

Postadress: Arkitektkopia AB, Box 110 93, 161 11 Bromma

Internet: www.naturvardsverket.se/publikationer

Naturvårdsverket

Tel: 010-698 10 00

E-post: registrator@naturvardsverket.se

Postadress: Naturvårdsverket, SE-106 48 Stockholm

Internet: www.naturvardsverket.se

ISBN 978-91-620-7154-7

ISSN 0282-7298

© Naturvårdsverket 2024

Tryck: Arkitektkopia AB, Bromma 2024

Omslagsbild: AI-genererad



Förord

Här presenteras resultaten från forskningsprojektet ”*Utveckling av eDNA som metod för övervakning av gädda*”. Projektet är ett av åtta projekt som genomförts inom forskningssatsningen DNA-metoder inom miljöövervakning.

Med forskningsområdet ville Naturvårdsverket och Havs- och vattenmyndigheten stödja forskning som kan bidra till en bättre och effektivare miljöövervakning genom införande av DNA-baserad analysteknologi.

Projektet har finansierats med medel från Naturvårdsverkets miljöforskningsanslag.

Rapporten har skrivits av Anti Vasemägi, Erik Karlsson, Martin Ogonowski, Göran Sundblad, Josefin Sundin och Patrik Bohman (Sveriges lantbruksuniversitet).

Rapporten har granskats för vetenskaplig kvalitet av Anette Engesmo (NIVA, Norge) och för praktisk relevans av Fredrik Ljunghager (Havs- och vattenmyndigheten).

Författarna svarar för rapportens innehåll.

Stockholm i april 2024

Marie Uhrwing
Avdelningschef, Hållbarhetsavdelningen

Innehåll

Förord	3
Sammanfattning	6
Summary	8
1. Inledning	10
2. Metoder	12
2.1 Optimering av metodik för insamling och extraktion	12
2.1.1 Test av olika filterkombinationer	13
2.1.2 Jämförelse av extraktionskit	13
2.1.3 Hantering av inhiberade prover	14
2.2 Optimering av qPCR-assay för gädda	14
2.2.1 Utveckling av assay baserad på amplifiering av en multi-kopierad nukleär markör	14
2.2.2 eDNA för att spåra aktiv lek hos gädda	16
2.3 Samband eDNA och gädda i kontrollerad laboratoriemiljö	16
2.3.1 Experimentell design	16
2.3.2 DNA-extraktion och qPCR-analys	17
2.4 Samband eDNA och gädda under semi-naturliga förhållanden	18
2.4.1 Experimentell design	18
2.4.2 DNA-extraktion och qPCR-analys	19
2.5 Samband eDNA och gädda i naturlig kustmiljö – rumslig variation	20
2.5.1 Skattning av relativ gäddtäthet med spöprovfiske	20
2.5.2 eDNA-provtagning och qPCR-analys	21
2.5.3 Modellering av eDNA-biomassaförhållandet	23
2.6 Samband eDNA och gädda i en naturlig våtmark – temporal variation	24
2.6.1 Fiskräknare för skattning av gäddabundans	24
2.6.2 Beskrivning av studieområde	26
2.6.3 Experimentell design	27
3. Resultat	28
3.1 Optimering av metodik för insamling och extraktion	28
3.1.1 Optimala filterkombinationer	28
3.1.2 Chelex är ett kostnadseffektivt alternativ för extraktion	28
3.2 Nukleära markörer kan öka detektionskänslighet	30
3.2.1 Nukleärt DNA ger högre känslighet än mitokondriellt DNA	31
3.2.2 Nukleär:mitokondriell kvot kan användas för att spåra aktiv lek	31
3.3 Samband eDNA och gädda i kontrollerad laboratoriemiljö	31
3.4 Samband eDNA och gädda under semi-naturliga förhållanden	33
3.5 Samband eDNA och gädda i naturlig kustmiljö – rumslig variation	34
3.5.1 qPCR-data och kvalitetskontroll	34
3.5.2 Rumslig och temporal eDNA dynamik	34
3.5.3 Standardisering av spöprovfiske	35
3.5.4 Vattentemperatur har stor betydelse för sambandet mellan eDNA och gädda	36

3.6	Samband eDNA och gädda i en naturlig våtmark – temporal variation	38
3.6.1	eDNA kan beskriva migrationsmönster	38
3.6.2	Nukleär:mitokondriell kvot under naturliga förhållanden indikerar lek	39
4.	Diskussion	41
4.1	Metodologiska framsteg för uppföljning av gäddbestånd med eDNA	41
4.2	Inverkan av yttre faktorer på eDNA-signalen	42
4.3	Behov av provtagning i tid och rum	43
4.3.1	Teoretisk bakgrund	43
4.3.2	Praktisk kunskap och återstående frågor	44
4.4	eDNA kan användas för övervakning av gädda	45
5.	Tack	47
	Källhänvisning	48
	Bilaga	54

Sammanfattning

Tillförlitlig information om beståndens utveckling är grunden för förvaltningen av akvatiska resurser. Arter med låg fångstbarhet med traditionella miljöövervakningsmetoder förbises dock ofta vilket leder till att data som krävs för att fatta välgrundade förvaltningsbeslut saknas. Även om de senaste framstegen indikerar att miljö-DNA (eDNA) kan användas för övervakning av biologisk mångfald, är dess potentiella användning för uppskattning av mängd (antal och biomassa) fortfarande delvis okänd. Flera studier indikerar att eDNA kan ge kvantitativa uppskattningar av mängden fisk, men precisionen varierar med art och system. Det är därför troligen nödvändigt att utvärdera möjligheterna från fall till fall. Även om linjära samband har erhållits i kontrollerade experiment varierar förklaringsgraden i naturliga system, där eDNA i genomsnitt förklarar 57 % av variationen jämfört med 81 % i kontrollerade experiment i mesokosmer. Variabiliteten i dessa uppskattningar kan hänföras till skillnader i metoder som jämförs, hydrologiska förhållanden, DNA-extraktionsmetoder, förekomst av humus- och garvsyror som hämmar polymeraskedjereaktion (PCR), sedimentpartiklar i vattnet, fiskbeståndets storleksstruktur och vattnets temperatur.

Gädda (*Esox lucius*) är en populär art inom fritidsfisket och en viktig rovfisk i sötvattens- och kustekosystem. I Östersjön tyder flera studier på att gäddbestånden på Sveriges ostkust har minskat drastiskt. Orsakerna är antagligen flera men sannolikt en konsekvens av ökad predation på vuxna individer från gråsäl och skarv, predation på juvenila stadier av storspigg, försämrade rekryteringshabitat och även en period med hög dödlighet inom fritidsfisket i början av 1990-talet. Gäddan samlas i grunda vegetationsklädda områden för att leka under våren och har en stark hemortstroghet vilket innebär att beståndet består av flera lokala delpopulationer. För stationära arter som bildar genetiskt stabila och distinkta populationer över ganska små geografiska områden bör förvaltningen ta regional hänsyn. Det innebär att övervakningen behöver ha en god geografisk täckning och det finns ett behov av övervakningsmetoder som gör det möjligt att bedöma gäddpopulationernas status på lokal nivå. På grund av gäddans stillastående beteende och låga fångstbarhet i traditionella, passiva och dödliga övervakningsmetoder så som standardiserade provfiskenet, var syftet med detta projekt att utveckla en skonsam men effektiv metod för övervakning av gädda med hjälp av eDNA.

För att utvärdera hur mängden gädda relaterar till eDNA-koncentrationer under kontrollerade förhållanden utförde vi akvarie- och mesokosmexperiment med både juvenila och vuxna individer riktade mot cytokromoxidas I-genen (COI). Vi utvärderade prestandan hos olika extraktionsmetoder (DNeasy Blood & Tissue kit, DNeasy PowerWater kit, and Chelex 100) och filter (enkelt vs dubbelmembranfilter). Resultaten från båda försöken visade ett starkt positivt linjärt samband mellan eDNA-koncentration och gäddbiomassa ($R^2 = 0,74-0,87$). Nivåerna av eDNA sjönk drastiskt inom de första 24 timmarna efter att årsyngel avlägsnats från akvarierna och låga nivåer kunde detekteras i upp till 308 timmar. Av extraktionsmetoderna gav Chelex 100 den högsta DNA-koncentrationen, vilket erbjuder ett snabbt och kostnadseffektivt alternativ jämfört med befintliga, allmänt använda extraktionsmetoder. Att använda dubbla membranfilter av olika material visade ingen ökning av DNA, oavsett extraktionsmetod, men det gjorde att mer vatten kunde filtreras.

Vi har också utvecklat en ny repetitiv markör baserad på nukleärt DNA för eDNA-analyser av gädda. Analys av eDNA-prover från tidigare mesokosmexperiment visade att den nukleära markören amplifierade ca 2,4 Cq tidigare än den mitokondriella, vilket indikerar högre känslighet hos den nyutvecklade markören.

För att utvärdera eDNA som metod och studera dess rumsliga och tidsmässiga variation genomfördes fältförsök i 22 vikar i Östersjön. Erhållna eDNA-koncentrationer jämfördes med tidsmässigt matchade fångster från ett standardiserat spöprovfiske. Vi fann att variationen i eDNA-koncentrationer mellan transekter var måttlig (21 %) men fortfarande betydligt lägre än mellan vikar och återkommande besök i samma vikar (52 %), vilket tyder på att rumsliga skillnader inom vik är av mindre betydelse under våren när gäddan leker. Standardiserade spöprovfiskefångster, vik och vattentemperatur förklarade tillsammans 48 % av variansen i uppmätta eDNA-koncentrationer. DNA-koncentrationerna minskade med ökad storlek på viken, vilket tyder på en utspädningseffekt. Noterbart är att förhållandet mellan eDNA och standardiserade spöprovfiskefångster var positivt, men varierade med temperaturen. Det kommer därför vara avgörande att välja lämpliga provtagningstider för att göra longitudinella data jämförbara.

För att testa huruvida eDNA kan användas för att övervaka tidsmässiga förändringar gjorde vi ett fältförsök under lekvandringen i Hemmesta våtmark. Uppmätta eDNA-koncentrationer jämfördes med mängden gädda som vandrat upp i våtmarken, vilket mättes med en fiskräknare kopplad till en videokamera. Uppmätta eDNA-koncentrationer uppvisade konsekventa mönster med fiskräknaren för både nukleära (nDNA) och mitokondriella (mtDNA) analyser. Tvärt emot vad som förväntades var den uppskattade eDNA-koncentrationen i vattnet som strömmade ut från våtmarken inte relaterad till den kumulativa mängden gädda som samlats i våtmarken för att leka. Istället återspeglade eDNA-koncentrationerna kortvarig migrationsaktivitet under en 48-timmarsperiod, vilket visar att hög tidsupplösning är möjlig.

Vårt projekt stöder den växande mängden forskning som visar ett positivt samband mellan mängden fisk (antal och biomassa) och eDNA-koncentrationer under naturliga förhållanden. Genom att optimera provtagning och laboratorietekniker har vi tagit viktiga steg mot att utveckla eDNA som metod för övervakning av gädda. Återstående steg inkluderar en bättre förståelse av osäkerheter när det gäller tolkningen av eDNA-signalen över varierande spatiotemporala skalor, särskilt mellan år, och standardisering av delar av metoden för att bibehålla jämförbara tidsserier i takt med att eDNA-metoder fortsätter utvecklas. Kvarstående frågeställningar föreslås lösas inom ett pilotprogram som under ett antal år (3–5) löper parallellt med andra övervakningsmetoder för gädda, såsom standardiserat spöprovfiske. Ett sådant pilotprogram skulle öka den befintliga kunskapen och bidra med de återstående pusselbitarna för att utveckla en nationell övervakningsmetod för gädda.

Summary

Reliable abundance information is the foundation for managing aquatic resources. Species with low catchability are, however, often overlooked in monitoring programs and governing bodies lack the data necessary to make well-informed management decisions. While recent advances suggest that environmental DNA (eDNA) can be successfully used in biodiversity monitoring based on presence/absence data, its potential use for biomass estimation is still unresolved. Several studies have suggested that eDNA can produce quantitative estimates of fish abundances, but the precision varies greatly depending on the species and system. It is, therefore, necessary to evaluate its performance and investigate how fish biomass and density affects eDNA dynamics on a case-by-case basis. Although linear relationships have been obtained in controlled experiments, the precision of these estimates varies greatly in natural systems where eDNA on average explains 57 % of the variance compared with 81 % in controlled mesocosm experiments. The variability in these estimates can be attributed to differences in ground truthing methods, hydrologic conditions, DNA extraction methods, presence of polymerase chain reaction (PCR) inhibiting humic and tannic acids, sediment particles in the water, size distribution of the local population and ambient temperature.

The northern pike (*Esox lucius*) is a popular focal species for the recreational fishery and a keystone predatory fish in freshwater and coastal ecosystems. In the Baltic Sea, large-scale patterns indicate that the pike populations on the east coast of Sweden have drastically declined. The reasons are multifaceted but likely a consequence of increased predation on adults from gray seals and cormorants, predation on juvenile stages by three-spined stickleback, loss of recruitment habitats, and also a period of high recreational fishing mortality during the early 1990s. For stationary species which form genetically stable distinct populations over rather small geographical areas management needs to be regional and there is a need for monitoring methods which can accurately assess the status of pike populations on a local scale. Northern pike aggregates in shallow areas to spawn during spring and have a strong homing behavior. This requires monitoring with a high level of spatial coverage, which poses challenges to the management of this species. Since traditional, passive, and lethal monitoring methods have proven ineffective, the aim of this project was to develop and evaluate the performance of a non-invasive monitoring protocol for northern pike using eDNA.

To evaluate how biomass and density of northern pike relate to eDNA concentrations in controlled conditions, we carried out aquarium and mesocosm experiments using both juvenile and adult individuals targeting the cytochrome oxidase I gene. We also evaluated the performance of multiple extraction methods (DNeasy Blood & Tissue kit, DNeasy PowerWater kit, and Chelex 100), and filtering systems (single- vs. double-membrane filters). The results from both pike experiments showed a strong positive linear relationship between eDNA concentration and pike biomass ($R^2 = 0.74-0.87$). Levels of eDNA dropped drastically within the initial 24 h of juvenile pike being removed from the aquaria, and low levels were detectable for up to 308 h. Of the extraction methods, Chelex 100 yielded the highest DNA concentration, offering a quick and cost-effective alternative compared with existing widely used extraction methods. Using double membrane filters of different material showed

no increase in DNA yield regardless of the extraction method but it allowed more water to be processed. We also developed a new highly repetitive nuclear DNA-based marker for eDNA analyses of northern pike. Analysis of eDNA samples from earlier mesocosm experiment showed that the nuclear assay amplified ca 2.4 Cq earlier than the mitochondrial assay indicating higher sensitivity of the newly developed marker.

To assess the spatiotemporal variability and predictive power of quantitative eDNA analysis, we studied 22 coastal bays in the Baltic Sea and linked the obtained eDNA concentrations to temporally matched catches from standardized angling. We found the variability in eDNA concentrations between transects to be moderate (21 %) but still considerably lower than across bays and visits (52 %), suggesting small-scale spatial differences are of less importance during spring when pike spawn. Standardized angling catches, bay area, and water temperature together explained 48 % of the variance in eDNA concentrations. DNA concentrations decreased with the increasing bay area, likely indicating a dilution effect. Notably, the relationship between eDNA and standardized catches was positive but varied with temperature. Therefore, choosing appropriate sampling times will be crucial in order to make longitudinal data comparable.

To evaluate the usefulness of eDNA to monitor temporal changes in pike abundance during the spawning migration, we studied eDNA dynamics in Hemmesta wetland and compared the results with recorded video camera data. Temporal analyses of pike eDNA concentrations revealed highly consistent patterns for both nuclear (nDNA) and mitochondrial (mtDNA) assays. Contrary to expectations, estimated eDNA concentration in the water flowing out from the wetland was not related to the cumulative number of pike that aggregated in the wetland to spawn. Instead, pike eDNA concentrations reflected short term migration activity over a 48h time frame, highlighting that high temporal resolution is possible.

Our project supports the growing body of evidence showing a positive relationship between fish abundance/biomass and eDNA concentrations in the wild. By optimising sampling procedures and eDNA methods we have taken important steps towards operationalizing monitoring for pike. Remaining steps include a better understanding of uncertainties regarding the representability of the eDNA signal over varying spatio-temporal scales, especially between years, and standardising parts of the methodology to allow longitudinal monitoring as eDNA methods continue to be developed. Outstanding issues are suggested to be solved within a pilot program that for a number of years (3–5) runs in parallel with other monitoring methods for pike, such as standardized angling. Such a pilot programme would increase existing knowledge and contribute the remaining pieces of the puzzle to develop a national monitoring method for pike.

1. Inledning

Förvaltning och bevarande av våra fiskpopulationer kräver robust och kontinuerlig övervakning över både tid och rum. Övervakning med traditionella metoder som nät och andra passiva redskap har producerat långa, värdefulla tidsserier för de flesta arter. Dessa metoder lider dock av problem med fångstbarhet genom att vara selektiva när det gäller storlek och art, vilket leder till brist på information för vissa arter, även sådana av särskilt kommersiellt och socioekonomiskt intresse. Traditionella metoder leder också till betydande fiskdödlighet vilket gör att de inte lämpar sig för övervakning av sällsynta eller känsliga arter. Ur etisk synvinkel är det önskvärt att minimera fiskdödlighet till följd av övervakning för alla arter.

Miljö-DNA, eDNA, har uppmärksammats som en lovande metod för att komplettera den traditionella fiskövervakningen. Metoden har visat sig vara ett kostnads-effektivt och icke-dödligt verktyg för övervakning av biodiversitet och invasiva och hotade arter, men även för arter och områden där konventionell övervakning inte är funktionell. Två huvudsakliga metoder används för att detektera DNA från organismer i vattenmiljöer; flerartsanalys (metabarcoding) och enartsanalys (kvantitativ PCR, qPCR, eller digital PCR, dPCR). Genom flerartsanalys observeras förekomst av arter från en specificerad taxonomisk grupp genom sekvensering av DNA-fragment (Miya 2022). Tekniken ger information om förekomst av en mängd fiskarter samtidigt, vilket gör den relevant för undersökning av biodiversitet (Valentini et al. 2016; Goutte et al. 2020). De kvantitativa aspekterna av denna metod har dock inte ännu kunnat ge tillförlitliga kvantitativa mängdmått, nödvändigt för implementering inom övervakning och förvaltning av fiskbestånd. Enartsanalys görs genom arts specifika analyser baserat på kvantitativ PCR (qPCR) eller digital PCR (dPCR). Tekniken med kvantitativ PCR är mer lovande för kvantitativa skattningar då eDNA-koncentrationer har visat sig korrelera med mängd (biomassa och abundans) av flera olika organismer i både laboratorie- och fältförhållanden (Rourke et al. 2022). Styrkan och formen på förhållandet mellan DNA och mängden fisk påverkas dock av biotiska och abiotiska faktorer och har visat sig variera med art (Rourke et al. 2022). Därför är det viktigt att etablera och validera förhållanden mellan eDNA och mängd fisk på artnivå. Hur förhållanden mellan mängd fisk och eDNA varierar med storlek av fisk är heller inte klarlagt och forskning på hur beteende av fisk påverkar sambandet är begränsad. Säsongsbetonade fluktuationer kan också introducera tidsmässig variabilitet i eDNA-mätningar vilket gör det viktigt att utvärdera och identifiera när denna variation är som lägst. Hur eDNA-signalen varierar vid olika rumsliga skalor, till exempel inom och mellan olika grunda vikar och hur reproducerbara dessa mätningar är över tid, är avgörande för att fastställa lämpligt antal prover, provtagningsperiod och rumslig fördelning av prover att samla in för en effektiv övervakning.

En viktig men ännu relativt ostuderad aspekt av eDNA är effekten av storleksstrukturen hos fiskpopulationen på mängden eDNA. Till exempel förväntas kvantitativa eDNA-uppskattningar variera mellan vuxna fiskar och en yngelaggregation av samma totala vikt på grund av storleksspecifika skillnader i metabolism och utsöndring av eDNA. Eftersom nuvarande eDNA-metoder inte kan skilja på

ursprunget av DNA-molekylerna innebär det att kvantitativa eDNA-mått potentiellt kan underskattas eller överskattas beroende på om populationens storleksstruktur är starkt lutat mot liten eller stor fisk. Det relativa bidraget av eDNA från både juveniler och adulter behöver därför utredas. Även val av metoder för isolering, extrahering och kvantifiering av eDNA kan påverka sambanden. Sammantaget finns därför ett stort behov av utveckling och standardisering innan teknikerna kan tillämpas för övervakning av fiskarter som i dag lider av kunskapsbrist inom förvaltningen.

Gädda (*Esox lucius* L.) är en nyckelart i svenska sjöar och längs Östersjöns kuster. Den utgör en av de viktigaste arterna för svenskt fritidsfiske och spelar en viktig roll i att bevara ekosystemens hälsa och funktion (Craig 2008; HaV 2022). Hälsosamma bestånd av gädda hjälper till att hålla nere populationer av mesopredatorer, som storspigg, och därmed epifytiska alger, vilket gynnar habitatbildande vegetation och motverkar effekter av eutrofiering (Östman et al. 2016; Donadi et al. 2017; Eklöf et al. 2020). Kunskapen om gäddbeståndens utveckling är dock begränsad. En låg fångstbarhet i traditionella provfiskemetoder försvårar arbetet med att bedöma status för bestånden och deras betydelse för ekosystemen, vilket leder till bristfälliga underlag för förvaltningen.

Det finns dock indikationer på att många av Östersjöns gäddbestånd har minskat dramatiskt sedan 90-talet vilket har väckt oro hos både allmänheten och forskare (Bergström et al. 2022; Olsson et al. 2023). Förlust och försämring av lekhabitat, predation på ägg och yngel från storspigg, ökande populationer av skarv och säl och fiske har alla troligen bidragit till nedgången av gäddbestånd längs Sveriges östersjökust (Sundblad & Bergström 2014; Hansson et al. 2017; Hansen et al. 2019; Eklöf et al. 2020; Olsson et al. 2023). För att minska problemen har flera olika åtgärder genomförts, inklusive återställning av lekområden (Tibblin et al. 2023), begränsningar av fisket genom införandet av nya fiskeregler (år 2010 infördes ett storleksfönster, 40–75 cm, och en maximal landad fångst om 3 gäddor per person och dag), samt lekfredningsområden, där allt fiske förbjuds i utvalda lekvikar under våren (1 april – 15 juni).

En utmaning för uppföljningen av åtgärdernas effektivitet har varit avsaknaden av tillförlitliga och kostnadseffektiva inventeringsmetoder. Länsstyrelsen i Stockholms län har därför utvecklat en metod med spöprovfiske, vilket innebär att de områden som ska inventeras fiskas systematiskt med standardiserade sportfiskemetoder (se tex Eklöf et al. 2023). Metoden har också testats i Vänern (Sundblad 2023). Där har motsvarande negativa utvecklingar som setts på kusten inte noterats, men behoven av uppföljning av beståndsstatus i de fem stora sjöarna i Sverige där staten ansvarar för fiskförvaltningen är ändå stora (Fiskbarometern.se).

Projektet ePIKE har haft som målsättning att utveckla en skonsam eDNA-metod som kan användas för kvantitativ uppföljning av mängden gädda. För att nå dit har vi genomfört experiment i laboratoriemiljö, utomhus i stora kar (mesoskosmer) under semi-naturliga förhållanden, samt utfört undersökningar i gäddans naturliga livsmiljö för att undersöka rumslig och temporal aspekt. För att optimera provtagningsmetoden har vi parallellt testat och utvecklat tekniker för att filtrera, extrahera och amplifiera eDNA. I denna rapport redovisar vi projektets metoder och resultat.

2. Metoder

Projektet har utgått från tre övergripande delar som syftade till att i) utveckla eDNA som övervakningsmetod för gädda, ii) etablera samband mellan eDNA och gädda av olika storlek, antal och biomassa via experiment i först laboriemiljö och sedan semi-naturliga förhållanden och slutligen iii) använda erhållen erfarenhet för att undersöka möjligheterna under naturliga förutsättningar.

För att utveckla eDNA som en metod har vi jämfört olika sätt att samla in, extrahera och amplifiera eDNA. Det innebär att vi har testat olika filter och filterkombinationer, olika kommersiella extraktionskit och hur inhiberade prover kan hanteras. För att optimera amplifieringen har vi utvecklat en qPCR-assay som baseras på nukleärt DNA, vilket skiljer sig från andra assayer som baseras på mitokondriellt DNA. Genom att jämföra relativa frekvenser av nukleärt och mitokondriellt DNA ville vi se om det går att spåra aktiv lek hos gädda.

För att etablera samband mellan eDNA och mängden gädda i vattnet har vi använt en successivt stigande komplexitet i våra försök. Vi inledde med experiment med årsyngel av gädda i kontrollerade miljöer på laboratorium. Därefter genomförde vi försök med adulta gäddor under semi-naturliga förhållanden i stora kar (mesokosmer) i experimentanläggningen vid SLU:s sötvattenslaboratorium i Drottningholm. Slutligen genomförde vi också två större fältstudier. Den första fokuserade på rumsliga skillnader genom provtagning av ett drygt tjugotal vikar i Stockholms skärgård, vid två tillfällen under leken på våren. Den andra fokuserade på temporal utveckling genom att följa lekmigrationen och ansamlingen av gädda i en stor våtmark utanför Stockholm; Hemmesta sjöäng i Värmdö kommun.

2.1 Optimering av metodik för insamling och extraktion

För att optimera insamlingen av eDNA och extraktionsmetodik genomförde vi flera olika typer av försök i en kontrollerad laboriemiljö vid SLU:s sötvattenslaboratorium i Drottningholm. Vid dessa experiment maximerade vi därmed isoleringen av målarts-DNA genom att utesluta vissa variabler som annars kan uppkomma vid experiment i naturliga vatten och som kan påverka resultaten. I de första akvarieexperimenten (med årsyngel av gädda, se avsnitt 2.3) tog vi 500 mL vattenprover vid olika tidpunkter (22, 48 och 70 timmar efter att gäddorna introducerades) för att säkerställa att eDNA-nivåerna hade nått jämvikt ("steady state") i akvarierna. För att undersöka skillnaden mellan minskningen i eDNA-koncentration utan gädda och retentionstiden för eDNA i akvariet togs ytterligare prover (27, 74, 121 och 238 timmar efter att gäddorna avlägsnats). Vid detta första experiment vakuumfiltrerades vattenproverna med ett cellulosanitratmembranfilter (diameter: 47 mm och porstorlek: 1,2 µm). Filtren förvarades vid -20 °C (ett filter per akvarium och tillfälle) fram till extraktion. Vid DNA-extraktionerna användes DNeasy PowerWater kit (Qiagen), med mindre förändringar av standardprotokollet (se Karlsson et al. 2022). Extraktionerna utfördes vid Institute of Technology, University of Tartu i Estland. Totalt extraherade vi DNA från 86 filter med ytterligare fem negativa kontroller för att testa för kontaminering under extraktion.

Baserat på erfarenheterna från våra första experiment justerade och förbättrade vi successivt vår provtagnings- och analysmetodik. För att ytterligare optimera våra metoder utförde vi en metodjämförelse där vi utvärderade tre olika extraktionsmetoder och två filterkombinationer. Vid denna provtagning tog vi ett stort vattenprov (ca 30 L) från två mesokosmer (utomhuskar) från experimentet utfört under semi-naturliga förhållanden (se avsnitt 2.4). Ett poolat vattenprov på 1 L filtrerades sedan med hjälp av en plastspruta (300 mL) genom en Swinnex filterhållare laddad med ett eller två kombinerade lösa filter (diameter: 47 mm). Vi använde fyra replikat för varje filterkombination, extraktionsmetod och mesokosm. Filtren frystes omedelbart vid $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ med hjälp av en bärbar frys och förvarades sedan vid $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fram till extraktion. Extraktionerna genomfördes vid SLU:s sötvattenslaboratorium i Drottningholm.

I ett sista experiment med adulta gäddor togs 1 L vattenprover under fyra separata tillfällen (innan försöket och sedan vid 48, 120 och 168 timmar efter introduktion av gäddor) för att säkerställa att jämvikt hade uppnåtts och för att undersöka hur förhållandet mellan eDNA-koncentration och gäddbiomassa utvecklades över tid. Vattenprover togs strax under vattenytan, utan föregående omrörning, för att simulera en provtagning under naturliga förhållanden. Vi filtrerade vattenproverna omedelbart efter insamling. En plastspruta (300 mL) användes för att filtrera vatten genom en Swinnex-filterhållare laddad med ett cellulosanitratfilter (porstorlek: $0,8\text{ }\mu\text{m}$) och ett glasmikrofiberfilter (GFFA, porstorlek: ca $1,6\text{ }\mu\text{m}$). Glasmikrofiberfiltret fungerade som ett förfilter (och hade testats ut vid tidigare metodförsök) vilket lät en större volym vatten passera. På detta sätt kunde vi öka mängden vatten från det första försöket till 1 L. Efter filtreringen frystes filtren omedelbart till $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ med hjälp av en bärbar frys och förvarades sedan i $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ fram till extraktion. Baserat på resultat från tidigare experiment (inklusive extraktionsutvärderingen) extraherades DNA från båda filtren med ett modifierat Chelex 100-protokoll (Karlsson et al. 2022) vid SLU:s sötvattenslaboratorium i Drottningholm.

2.1.1 Test av olika filterkombinationer

Vi jämförde olika filter genom att filtrera 1 L vatten genom antingen ett enkelt cellulosanitratfilter (porstorlek: $0,8\text{ }\mu\text{m}$) eller en kombination av ett cellulosanitratfilter (porstorlek: $0,8\text{ }\mu\text{m}$) och ett glasmikrofiberfilter (GFFA, porstorlek: ca $1,6\text{ }\mu\text{m}$).

2.1.2 Jämförelse av extraktionskit

För att extrahera eDNA från filter är det vanligt att använda kommersiella extraktionskit. Sådana kit innehåller olika buffertar och utrustning som i slutändan utviner så mycket högkvalitativt DNA som möjligt från provet. Olika kit har specifika egenskaper. En del är specialiserade för provtagning av dricksvatten och vissa kit används för förorenade jordprover. I projektet utvärderade vi tre olika metoder för att extrahera DNA: (1) DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen), (2) DNeasy PowerWater kit (Qiagen) och (3) Chelex 100 harts (Bio-Rad laboratories). För varje extraktionsmetod användes 16 replikat (fyra replikat per densitet och filterkombination). Extraktion med DNeasy Blood & Tissue följde tillverkarens protokoll med mindre modifieringar (Karlsson et al. 2022). Extraktion med DNeasy PowerWater följde samma protokoll som beskrivits för experimentet med årsyngel av gädda i akvarier (avsnitt 2.3 samt

Karlsson et al. 2022). Extraktion med Chelex 100 utfördes baserat på ett modifierat Chelex 100-protokoll (Walsh et al. 1991). Alla extraktioner genomfördes vid SLU:s sötvattenslaboratorium i Drottningholm.

2.1.3 Hantering av inhiberade prover

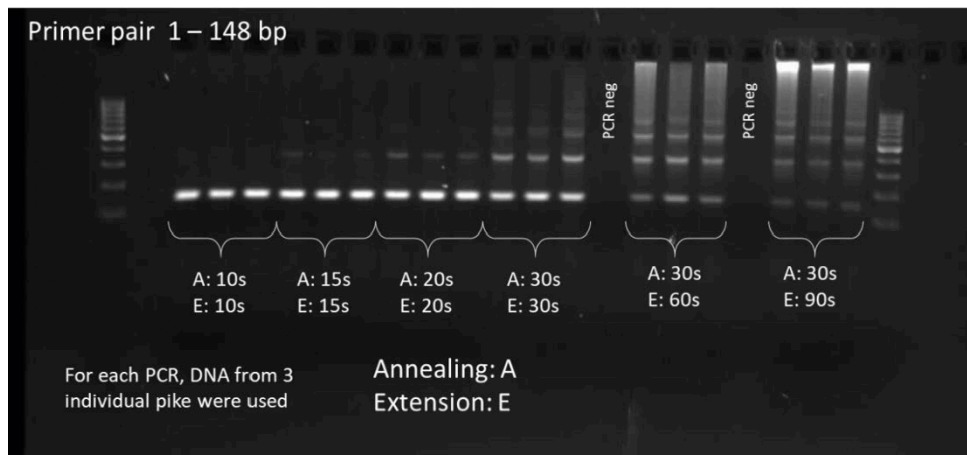
Prover som extraherades med DNeasy Blood & Tissue och Chelex späddes båda i ett 1:8-förhållande innan qPCR för att minska den variation mellan tekniska replikat som troligen uppkommer på grund av inhibition. Nivåer av potentiell inhibition av qPCR-reaktioner testades inte explicit vid våra akvarie- eller mesokosm-experiment. I de rumsliga fältförsöken (Ogonowski et al. 2023) användes dock ett kit för intern positiv kontroll (IPC, Cy⁵-QXL[®]670 Probe; EuroGentec). Detta kit kördes i duplex-reaktioner för att kontrollera potentiell inhibition. En mix av 0,3 µL 10 × IPC-blandning och 0,2 µL av IPC-templat-DNA adderades till varje reaktion. Inhibition i eDNA-primerna baserades på avvikande IPC C_q-värden. IPC:s förväntade C_q-värde (över standardkurvan) var i genomsnitt 27,3 C_q med genomsnittliga minimum- och maximumvärden mellan 26,5–28,5 C_q. Därför klassificerade vi prover >28,5 C_q som oacceptabla. Sådana ”smutsiga” prover renades med ett Zymo OneStep PCR Inhibitor Removal Kit (Zymo Research Corp.) och analyseras återigen i qPCR. Om reningen av provet inte förbättrade värdet förkastades provet.

2.2 Optimering av qPCR-assay för gädda

Inför projektets start hade en publicerad qPCR-assay för gädda identifierats som passande och som vi sedan använde med goda resultat under projektets första experiment (med årsyngel i akvarier och adulter i mesokosmer). Med målet att öka känslighet och precision med eDNA undersöktes alternativa genetiska markörer. eDNA studier använder sig traditionellt av markörer från mitokondriellt DNA, baserat på mitokondriens höga antal i celler samt tillgängligheten av sekvenserade gener. Gener från nukleärt DNA uppträder normalt endast i en kopia per cell och kan därför förväntas förekomma i lägre mängd än gener från mitokondriellt DNA. Nyligen publicerad forskning har dock visat att markörer från nukleärt DNA kan utgöra likvärdiga alternativ med högre precision och känslighet (Jo et al. 2022).

2.2.1 Utveckling av assay baserad på amplifiering av en multi-kopierad nukleär markör

Gener som kodar för ribosomalt DNA har visat sig uppträda i extremt höga antal repetitioner i gäddans genom (över 20 000 repetitioner). Detta skulle innebära att eDNA markörer på dessa regioner kan utgöra ett alternativ till mitokondriella markörer med likvärdig eller till och med högre känslighet (Symonová et al. 2017). Baserat på Symonová et al. (2017) identifierades fem lämpliga markörer för initiala tester med hjälp av Primer3 (Untergasser et al. 2012). Eftersom dessa markörer uppträder i så många repetitioner testades de med PCR på vävnad från gädda med varierande temperatur och längd av annealing och elongering stegen (Figur 1).



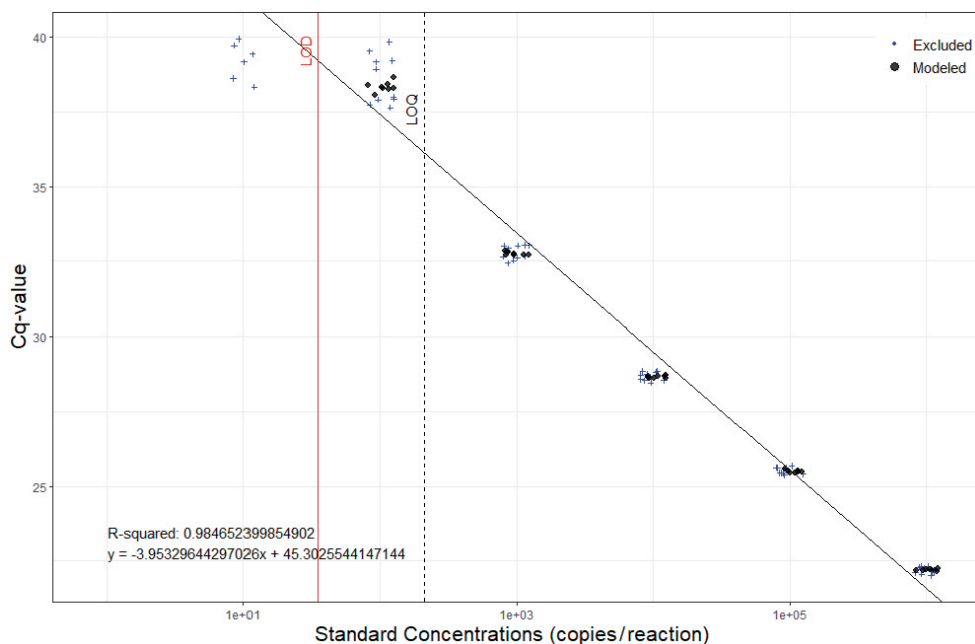
Figur 1. Gelelektrofores från PCR för optimering av tid för annealing och extension steg i PCR för att säkerställa PCR produkt av enskild storlek.

Artspecificitet för vardera markörer kontrollerades genom PCR och analys av gelelektrofores på produkt. Av dessa bedömdes en markör vara tillfredsställande (Figur 2) och valdes ut för vidare utvärdering genom qPCR.



Figur 2. Gelelektrofores från PCR för test av artspecificitet av markör på DNA från gädda (*E. lucius*), siklöja (*C. albula*), nors (*O. eperlanus*), öring (*S. trutta*), harr (*T. thymallus*), gräspickerell (*E. americanus*) samt lax (*S. salar*) i tre PCR replikat.

Minsta koncentration för detektion (LOD) och minsta koncentration för kvantifiering (LOQ) fastställdes enligt Klymus et al. (2020, Figur 3). För att undersöka markörens artspecificitet närmare testades den på DNA från 36 olika fiskarter som är vanligt förekommande i nordiska vatten.



Figur 3. Standardkurva för uträkning av detektions- (LOD) och kvantifieringsgräns (LOQ) för nukleär markör. Standarden är baserad på syntetiskt framtagna kopior av markören.

2.2.2 eDNA för att spåra aktiv lek hos gädda

Möjligheten att kunna spåra aktiv lek hos gädda med eDNA undersöktes genom kombinerad analys av den mitokondriella och den nukleära markören på DNA, utvunnit från ett fenklipp och mjölke från en och samma individ. Vår hypotes var att mjölke innehåller högre andel nukleärt DNA i förhållande till mitokondriellt DNA än vad fenklipp och andra vävnader gör. Lek skulle därför kunna observeras i form av en förhöjd kvot nukleärt mot mitokondriellt DNA.

2.3 Samband eDNA och gädda i kontrollerad laboratoriemiljö

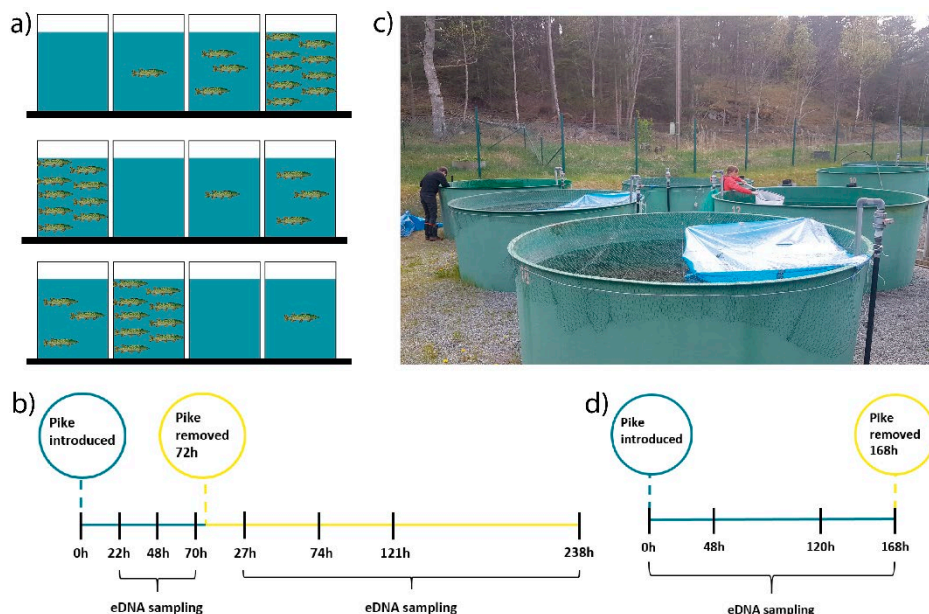
Det första försöket med gädda i projektet var att undersöka om det går att påvisa ett positivt samband mellan eDNA och gäddbiomassa i experiment utförda i en kontrollerad laboratoriemiljö. Detta försök utfördes år 2019 vid SLU:s sötvattenslaboratorium i Drottningholm.

2.3.1 Experimentell design

Juvenil gädda (årsyngel) samlades in genom elfiske i Långsjöns våtmark (58°38'8" N, 16°58'40" E). Insamlingen skedde i samarbete med Sportfiskarna den 26 juni 2019 och gäddorna vägde mellan 1,2–6,9 g (våtvikt). Gäddorna transporterades till laboratoriet och hölls där i förvaringskar (200 × 82 × 29 cm) med sandfiltrerat genomflödande vatten från Mälaren. Vattentemperaturen under förvaringstiden följde naturliga förhållanden och ljus:mörker cykeln var anpassad efter naturliga förhållanden (17 h ljus : 7 h mörkt). Gäddorna (totalt 125 stycken) hölls i grupper om max

18 stycken och sorterade efter storlek för att undvika kannibalism. Gäddorna hölls i sex dagar utan föda för aklimatisering och standardisering så att exkrementer inte skulle påverka eDNA signalen i experimentet.

Efter aklimatiseringsperioden flyttades gäddorna till syresatta akvarier (40 × 20 × 25 cm) fyllda med 14 L sandfiltrerat vatten från Mälaren. Fyra olika densiteter av gädda testades, 1, 3 eller 9 gäddor per akvarium (Figur 4). Varje densitet replikerades tre gånger, vilket resulterade i totalt 12 akvarier och 39 gäddor. Individuer placerades randomiserat och individuellt i plastburar (Withlock-Vibert, 14 × 9 × 6 cm) i akvarierna för att undvika kannibalism. Akvarierna var placerade i ett termokonstantrum i 19 °C med en dygns-cykel på 12 h ljus, 12 h mörkt. För att kontrollera för eventuella hylleffekter fanns varje densitet representerad på varje hyllplan (Figur 4). Akvariernas sidor täcktes för att förhindra visuell störning. Vattenprover (500 ml) för DNA kvantifiering samlades in efter jämvikt vid 22 h, 48 h och 70 h. Efter tre dagar avlivades gäddorna med en överdos av bensokain och vägdes. För att undersöka nedgångshastigheten i eDNA-koncentration togs vattenprover efter 27 h, 74 h, 121 h och 238 h efter att gäddorna avlivats (Figur 4).



Figur 4. a) Schematisk illustration över experimentet med årsyngel av gädda i en kontrollerad laboriemiljö (avsnitt 2.3). b) Tidslinje för provtagning av akvarierna. c) Bild på ett urval av utomhuskaren från experimentet under semi-naturliga förhållanden (avsnitt 2.4). d) Tidslinje för provtagning av utomhuskaren. Figur från (Karlsson et al. 2022).

2.3.2 DNA-extraktion och qPCR-analys

Vattenproverna vakuumfiltrerades genom ett cellulosanitratmembranfilter (47 mm i diameter, porstorlek: 1,2 µm, MFS, Membrane Filtration Systems, Dublin, Kalifornien) och förvarades i -20 °C. Mellan varje DNA extrahering tvättades och steriliserades filteringsutrustningen genom att blötlägga den i fem minuter i 50 % klorin och därefter noggrant sköljas med kranvatten. DNA extrahering utfördes vid Tartu universitet, Estland, genom att använda DNeasy PowerWater kit (Qiagen) med några mindre modifikationer till standardprotokollet (vortex-tiden ökades till 10 minuter

och den slutgiltiga volymen reducerades till 70 µl). Totalt extraherades DNA från 86 filter och fem negativa kontroller (för att kontrollera att ingen kontaminering skett under extraktionen). För att kvantifiera mängd DNA användes qPCR. Kombinationen av primer och probe utvecklades ursprungligen av Olsen et al. (2015, 2016) och har använts för att detektera DNA från gädda i vattenprover (Dunker et al. 2016, F-primer: 5'-CCTTCCCCCGCATAAATAATATAA-3', R-primer: 5'-GTACCAGCACCAGCTTCAACAC-3' och probe: 5'-FAM-CTTCTG ACTTCTCCCC-BHQ-1-3' Microsynth AG). Analysens mål är ett 94-baspar långt fragment av genen Cytochrome oxidase I (COI). qPCR utfördes med ett Applied Biosystems 7500 Real-time PCR system med 20 µl reaktion volym. Reaktionskoncentrationen av forward primer, reverse primer och probe var 200 nM vardera, med 1× HOT FIREPol Probe Universal qPCR Mix (Solis Biodyne) i varje brunn, laddad med 4 µl av provtemplate. Följande qPCR program användes för alla reaktioner: 2 min vid 60 °C och 10 min vid 95 °C följt av 40 cykler á 15 sek vid 95 °C och 60 sec vid 60 °C. eDNA kvantifiering uppnåddes genom att använda en standardkurva som bestod av en 8-steps 10-faldig utspädningsserie av DNA från gädda (0.01–100 000 pg µl⁻¹). DNA från gädda extraherades från gädd-lever med ett DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen). Prover och standardkurvor kördes i kvadrupel, med fyra negativa kontroller (No Template Control, NTC) på varje platta. Effektiviteten per platta varierade mellan 95,8 % och 101,3 %, med R2 värden mellan 0,995 och 0,999.

2.4 Samband eDNA och gädda under semi-naturliga förhållanden

Som en naturlig fortsättning på försöket i en kontrollerad laboratoriemiljö undersökte vi om det går att påvisa ett positivt samband mellan eDNA och gäddbiomassa i experiment utförda under semi-naturliga förhållanden. Detta försök utfördes i mesokosmer, stora vattenkar, som var placerade utomhus. Denna experimentdesign gav oss möjligheten att återskapa naturliga förhållanden i form av solljus, väder och vind, medan flera andra parametrar kunde hållas konstanta och kontrollerade. Experimentet utfördes år 2020 vid SLU:s sötvattenslaboratorium, Drottningholm.

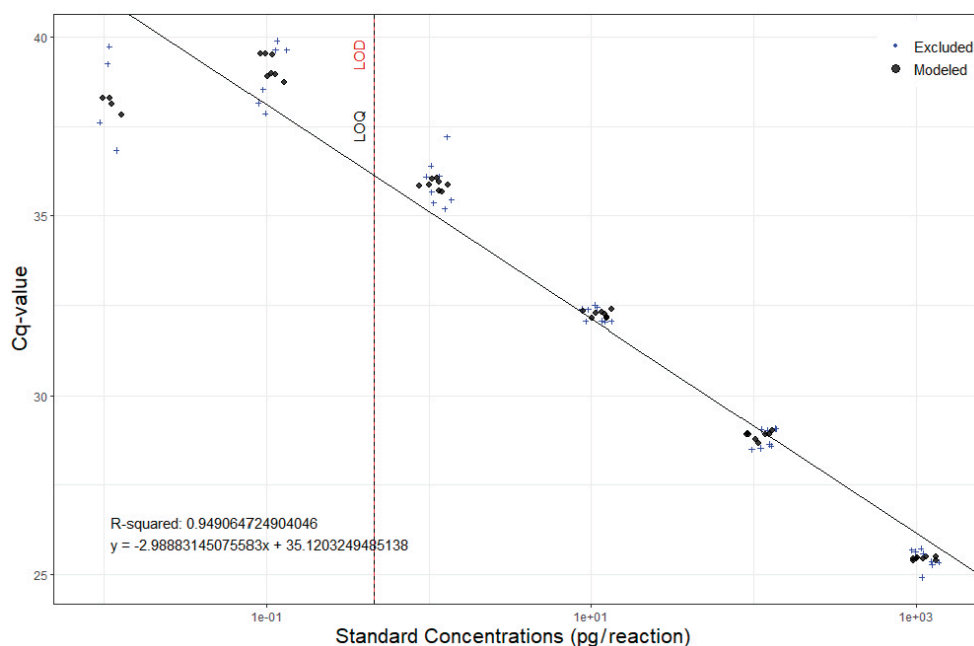
2.4.1 Experimentell design

Adult gädda (n = 48, 758–8150 g) samlades in från Mälaren med ryssjor av en lokal yrkesfiskare i maj 2020. För att aklimatisera gäddorna till experimentmiljön hölls de under 21 dagar i cylindriska utomhuskar (mesokosmer) innehållandes 7 000 L ofiltrerat vatten från Mälaren. Acklimatiseringen standardiserar stressnivåer och minskar risken att exkrementer påverkar experimentet (Seaburg & Moyle 1964). Efter aklimatiseringen placerades gäddorna individuellt i nya cylindriska utomhuskar av samma typ som under aklimatiseringen, återigen innehållandes 7 000 L ofiltrerat vatten från Mälaren (Figur 4). Antalet kar var 13 stycken med tillägg av en negativ kontroll utan gädda. Vattentemperaturen i varje kar mättes kontinuerligt med temperatur-loggers (HOBO TidbiT v2 temperatur logger, Adelaide, Australien). Syrenivåerna

i karen mättes vid experimentets slut (Rinko ASTD-102 profiler, JFE Advantech Co., Ltd.). Syremätningarna visade att nivåerna varierade mellan 11,8 och 12,8 mg L⁻¹, vilket är långt över de kritiska nivåerna för gädda (Inskip 1982). Efter sju dagar avslutades experimentet och avlivade gäddor förvarades en dag i kylrum varefter längd (mm) och vikt (g) mättes.

2.4.2 DNA-extraktion och qPCR-analys

Baserat på erfarenhet från experimentet i kontrollerad laboratoriemiljö förbättrades provtagnings- och analysmetoderna. Vattenprover (1 L) togs vid fyra tillfällen under experiments gång; innan gäddorna introducerats, samt efter 48, 120 och 168 timmar efter att gäddorna introducerats (Figur 4). Vattenproverna samlades in strax under vattenytan, utan omrörning för att simulera provtagning under naturliga förhållanden. Vattenproverna filtrerades direkt (via en stor spruta i plast) genom Swinnex filterhållare med ett cellulosanitratfilter (0,8 µm) och ett glasmikrofiberfilter (ca 1,6 µm). Glasmikrofiberfiltret fungerar som ett förfilter vilket gör att en större mängd vatten kan filtreras (Capo et al. 2020). Filtren frystes direkt i -20 °C och lagrades i -80 °C till extraktion. Mellan varje DNA-extrahering tvättades och steriliserades filtreringsutrustningen genom att blötlägga den i minst 10 minuter i 10–20 % klorin och noggrant sköljas med kranvatten. DNA-extraheringen utfördes vid SLU:s sötvattenslaboratorium, Drottningholm.. Baserat på resultaten från försöket med att optimera insamling av eDNA och extraktionsmetodik användes ett modifierat Chelex 100 protokoll för att extrahera DNA från båda filtren. För att kvantifiera mängd DNA kördes qPCR på en CFX384 real-time PCR system (Bio-Rad Laboratories). Samma primer och probe-protokoll användes som i avsnitt 2.1. Mätningar av DNA-koncentration uppnåddes genom en standardkurva som bestod av en 6-steps 10-faldig utspädningsserie av DNA från gädda (0,0028–280 pg µl⁻¹). DNA från gädda extraherades från muskelvävnad med ett DNeasy Blood & Tissue kit (Qiagen). Fyra negativa kontroller kördes på varje platta. LOD och LOQ fastslogs genom att köra en 10-faldig utspädningsserie (som används för standardkurvan) med DNA nivåer mellan 0,00275 och 275 pg µl⁻¹ vardera i 16 tekniska replikat (Figur 5). LOD definierades som den lägsta koncentrationen där 95 % av de tekniska replikaten amplifierades. LOQ definierades som den lägsta koncentrationen av DNA med en variationskoefficient (coefficient of variation, CV) under 35 % (Klymus et al. 2020). Den estimerade qPCR effektiviteten varierade mellan 98,5 % och 100,8 %, med R² värden mellan 0,998 och 0,996. LOD och LOQ fastslogs båda till att vara 0,275 pg µl⁻¹. Analyser i kvadruplikat gav en effektiv LOD på 0,00325 pg µl⁻¹. Alla prover från mesokosmer som innehöll gädda låg över denna nivå.



Figur 5. Standardkurva för uträkning av detektions- (LOD) och kvantifieringsgräns (LOQ) för mitokondriell markör. Standarden är baserad på DNA från gädda som späts i en serie.

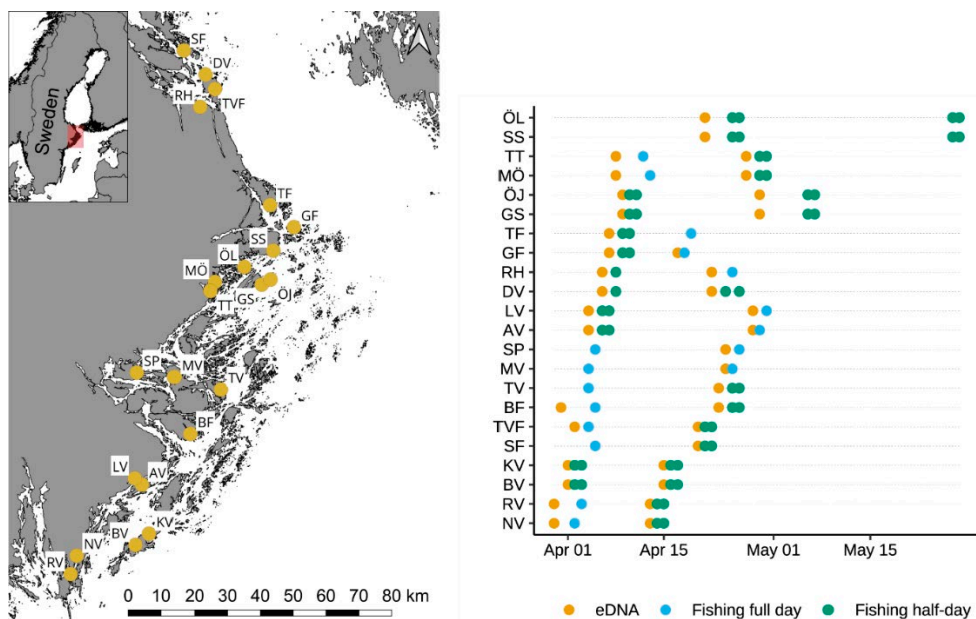
2.5 Samband eDNA och gädda i naturlig kustmiljö – rumslig variation

Vi har under projektets gång lyckats påvisa starka positiva samband mellan eDNA och gäddbiomassa i både laboratorieexperiment och i försök i mesokosmer utomhus. I detta skede av projektet ville vi undersöka hur väl mängden gädda skulle kunna skattas i en naturlig kustmiljö genom att jämföra eDNA med traditionella fångstmetoder. I detta avsnitt testar vi hypotesen att relativa populationsstorlekar av gädda kan uppskattas med hjälp av eDNA-analys under våren då gäddan aggregerar i grunda vikar för lek. Våra mål var även att undersöka den rumsliga variationen i eDNA-signalen och hur eDNA-signalen kan påverkas av olika faktorer så som vattentemperatur, fiskens storlek (kopplat till eDNA-utsöndring) och havsvikarnas storlek (utspädningseffekter).

2.5.1 Skattning av relativ gäddtätthet med spöprovfiske

Totalt provfiskades 24 kustvikar vid två tillfällen (besök) med 8–20 dagars mellanrum under våren 2020 (Figur 6). Två av dessa vikar provtogs inte för eDNA (Villinge, N 59° 5.7789', E 18° 36.7948', Jungfruskär, N 59° 8.4618', E 18° 40.9969'). Vid varje besök delades fisket upp på två på varandra följande halvdagar à 4 timmars aktivt fiske vardera, omväxlande morgon (08:00–12:00) och eftermiddag (13:00–17:00). I vissa fall utfördes dock fisket i stället under en hel dag (8 timmar, Figur 6). Fisket utfördes av sex fiskelag där varje lag bestod av två mycket erfarna gäddfiskare. Syftet var att fiska effektivt och fånga så mycket fisk som möjligt genom att välja vad provfiskarna ansåg vara den lämpligaste metoden och betet. Provtagningsansträngningen kvantifierades som spötimmars, det vill säga fiskad tid per person. För varje

besök registrerade fiskelagen ytvattentemperatur, antal sälar, skarvar, antal sportfiskare (dvs. en båt med tre sportfiskare räknades som tre) och stationära fiskeredskap på platsen (som indikeras av bojar). Varje fångad gädda mättes och vägdes. Könstillämning skedde utifrån yttre morfologiska karaktärer (Casselmann 1974). Lekstatus utvärderades visuellt enligt expertbedömning och klassificerades som antingen köns mogen men olekt (stor buk omkrets som indikerar utvecklade gonader men ingen löpande rom eller mjölke), lekande (rinnande rom eller mjölke), efterleksfisk (utarmad buk, ingen löpande rom eller mjölke) eller odefinierad (vanligen liten fisk utan yttre egenskaper som indikerar sexuell mognad).



Figur 6. Översiktskarta över kustvikar provtagna för eDNA och gädda m.h.a. spöprovfiske (vänster panel) och provtagningschema (höger panel) som visar provtagningsdatum för eDNA och fiske år 2020. Vikarna är sorterade per vikpar. Fisket var antingen uppdelat på två halvdagar inom ett vikpar och fiskades under två på varandra följande dagar, omväxlande morgon och eftermiddag, eller som ett heldagsfiske i en specifik vik: AV = Askviken, BF = Björnöfjärden/Torpe Infjärd, BV = Byviken/Ryssundet, DV = Dalviken, GF = Gisslingöfladen, GS = Granösundet, KV = Kyrkviken/Utö, LV = Lännåkersviken, MV = Myttingeviken, MÖ = Mulö/Löglå, NV = Nynäsvisken, RH = Rotholmaviken, RV = Rassa vikar, SF = Söderöfjärden/Sladdarön, SP = Slåpan/Ekefjärd, SS = Södersundet, TF = Toftladen/Gropaviken, TT = Tomtviken/Urö, TV = Tranvik/Djurövisken, TVF = Tranviksfjärden, ÖJ = Öjaren/Söderöra/Norröra, ÖL = Östra Lemaren. Figur från (Ogonowski et al. 2023).

2.5.2 eDNA-provtagning och qPCR-analys

eDNA-provtagningen utfördes i 22 av de 24 fiskade vikarna några dagar före varje spöprovfiske för att inte riskera att eDNA-signalen skulle påverkas av fiskeaktiviteten samt för att inte störa fisket genom att samtidigt provta eDNA (Figur 6).

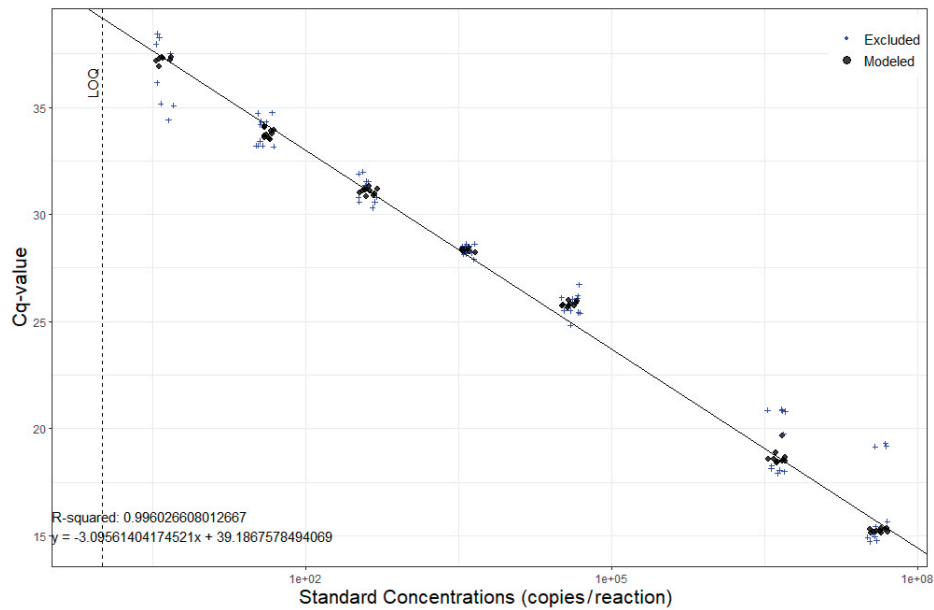
Inom varje vik och besök samlade vi vatten längs fyra transekter: tre grunda längs med strandlinjen (A, B och C) samt en djupare transekt (D) ungefär i mitten av viken (Figur 7). Inom varje transekt samlades en liter ytvatten var 50:e meter. Avståndet mellan enskilda delprov baserades på det rapporterade eDNA-detektionsavståndet för avlivade gäddor i bur (Dunker et al. 2016) och levande *Pseudocaranx dentex* (Murakami et al. 2019). Den totala mängden vatten som insamlades per vik

och transekt var proportionell mot vikens area. Vattnet samlades i en stor plast-behållare och den totala volymen poolat vatten varierade mellan 4 och 26 liter beroende på transektlängd. Från denna vattenpool filtrerades dubbla prover på en liter vardera i fält. Filterkonfigurationen, DNA-extrahering och qPCR följde tidigare utvecklad metodik (Karlsson et al. 2022). Inhibering av PCR-reaktionen undersöktes genom att tillsätta en intern positiv kontroll (IPC) vilken består av en känd mängd syntetiskt DNA till provet. IPC analyserades i en duplexreaktion tillsammans med eDNA-provet. Ett prov ansågs vara inhiberat om det tydligt amplifierade senare än förväntat. Inhiberade prover exkluderades från vidare kvantitativ analys. LOD och LOQ beräknades enligt Klymus et al. (2020, Figur 8).

Miljödata samlades in i samband med varje eDNA-provtagning med hjälp av en Rinko ASTD-102 profiler (JFE Advantech Co., Ltd.). Djup, temperatur, salthalt, löst syre, turbiditet och klorofyll-A-nivåer mättes från ytan till botten i början och slutet av varje transekt. Medianvärdet beräknades per djupprofil och över transekter för att generera ett medianvärde per vik och besök.



Figur 7. Schematisk bild som visar provtagningsdesignen för eDNA i kustvikar år 2020. Vattenprover samlades in med 50 m intervall längs med fyra transekter (A-D) som sedan slogs samman inom varje transekt innan filtrering. Transekterna A-C täckte normalt de grundaste delarna av viken medan transekt D sammanföll med vikens djupaste del. Figur från (Ogonowski et al. 2023).



Figur 8. Standardkurva för uträkning av detektions- (LOD) och kvantifieringsgräns (LOQ) för mitokondriell markör. Standarden är baserad på syntetiskt framtagna kopior av markören.

2.5.3 Modellering av eDNA-biomassaförhållandet

Förhållandet mellan eDNA koncentrationen och mängden gädda skattades genom att modellera eDNA koncentrationen som en funktion av olika variabler kända för att kunna påverka DNA-halterna i vattnet. Som förklaringsvariabler i modellen använde vi fångst per ansträngning i spöprovfisket (den korrigerade mängden gädda i en vik), vattentemperatur, eftersom den är intimt kopplat till fysiologiska processer (Woods et al. 2003), DNA utsöndring/nedbrytning (Jo et al. 2019) och vikstorlek, eftersom eDNA-koncentrationen bör vara ungefär proportionell mot arean och volymen av en viss vik, förutsatt fullständig blandning av vattnet – dvs. en utspädningseffekt (Yates et al. 2021b). Dessutom, då eDNA-koncentrationer har visat sig skala allometriskt med fiskstorlek (Yates et al. 2021a; c; Zhang et al. 2022), dvs. att utsöndringen av DNA inte är direkt proportionell mot fiskens storlek, beräknade vi också den allometriskt skalade genomsnittliga fiskvikten per vik och besök i populationen som allometriskt skalad massa (ASM):

$$ASM = \sum (M)^\beta / N$$

där M är lika med den individuella vikten (g), β är lika med en skalningskoefficient (0,7) och N det totala antalet fångade fiskar per vik och besök (Yates et al. 2022).

En ytterligare bakomliggande faktor till variation i eDNA koncentrationer är andelen fisk som leker. Under leken lägger fisken både mjölke och rom som innehåller stora mängder DNA vilket gör att DNA-koncentrationen i vattnet under en kortare period blir förhöjd. Vi kunde dock inte inkludera andel lekande fisk som en förklaringsvariabel i modellen eftersom korrelationen med temperatur var för hög. Därmed gick det inte att särskilja en eventuell effekt av temperatur från andelen lekande fisk.

2.6 Samband eDNA och gädda i en naturlig våtmark – temporal variation

I de tidigare delarna av projektet har vi kunnat visa att eDNA kan användas för att beskriva rumsliga skillnader i relativa populationsstorlekar. I denna del av projektet ville vi bättre förstå temporal variation runt sambandet mellan eDNA och biomassa. Hypotesen var att eDNA kan kvantifiera den migration och ackumulering av lekbiomassa som sker i en naturlig våtmark under en leksäsong. Vårt mål var inte bara att undersöka hur eDNA-signalen påverkas av den adulta lekbiomassan utan också av själva leken, det vill säga frisättande av gameter i vattnet, samt hur utvecklingen av larver och yngel påverkar mängden eDNA i det vatten som rinner ut ur våtmarken.

2.6.1 Fiskräknare för skattning av gäddabundans

För att samla in data på både antal och storlek på de gäddor som vandrar upp i våtmarken användes en elektronisk fiskräknare (VAKI Aquaculture Systems Ltd, Island). Fiskräknaren består av en tunnel med teknik som gör det möjligt att i detalj undersöka allt som passerar igenom (Figur 9). Tekniken inkluderar IR-ljus, scannerplattor, temperaturmätare och en 3D-kamera som tillsammans med en AI och mänsklig kvalitetskontroll kan artbestämma och mäta storleken på de fiskar som passerar med en hög noggrannhet (± 2 cm). Varje passage sparas också som en filmsekvens vilket möjliggör en säker identifiering samt en exakt tid som en fisk passerar upp eller ner. Genom att placera fiskräknaren med lämpliga ledarmar precis ovan mynningen till våtmarken kunde gäddans migration bevakas i detalj (Figur 10). Även däggdjur, fåglar och groddjur som passerar genom fiskräknaren noterades (Figur 11). Det realtidsdata som samlades in under vandrigen presenterades på två websidor, dels på fiskdata.se och dels live-sändes delar av ”den stora gäddvandringen” på YouTube.



Figur 9. Tunneldelen av fiskräknaren under installation. Delar av mätutrustningen sitter i den kon som på bilden ligger snett bakom tunneln men som i färdigt skick monteras på sidan av tunneln.



Figur 10. Montering och installation av fiskräknare och ledarmar i Hemmesta sjöäng, Värmdö kommun, 2021-03-17.



Figur 11. Förutom fisk som gädda (överst) simmade även bäver (underst), fågel och grodor genom fiskräknaren i Hemmesta sjöäng, Värmdö kommun.

2.6.2 Beskrivning av studieområde

Våtmarken som användes i studien var Hemmesta sjöäng i Värmdö kommun, som också ansvarar för driften av området. Våtmarken är restaurerad och invigdes 2014 av Kung Carl XVI Gustaf (Värmdö kommun 2014). Den är en del av ett populärt rekreationsområde med fågeltorn och utkiksplattformar som används av både naturintresserade och skolor i kommunen. Naturvårdsområdet är 35 hektar och själva sjöängen är 18.5 hektar (Figur 12).

Sedan våtmarken restaurerades har Sportfiskarna och Värmdö kommun bedrivit ett flertal olika projekt i området. Till exempel ingår våtmarken i Sportfiskarnas ungdomsarbete med Skolbäcken, vilket innebär att alla fjärdeklassare i kommunen erbjuds möjlighet att besöka våtmarken och delta i det fiskevårdsarbete som bedrivs där. Under flera år har Sportfiskarna också haft en traditionell nätfälla i det vattendrag som leder till våtmarken, vilket innebär att vi kunde få en uppfattning om hur stor vandrigen brukar vara. Årligen genomförs också våtmarkens dag då det anordnas korvgrillning och flera olika aktiviteter, till exempel via kommunens biblioteksbuss. SLU Aqua och projektet ePIKE har också varit representerade i samband med detta.

Innan våtmarken rinner ut i Torsbyfjärden i Östersjön passerar vattnet först den lilla sjön Hemmesta Träsk, som är en ca 1 km lång och drygt 100 m bred långsmal sjö (0,13 km²). Avståndet mellan våtmarken och sjön är ungefär 500 m och mellan sjön och kusten ungefär 400 m. Det är okänt i vilken omfattning gäddor som ska upp och leka i våtmarken kommer hela vägen från kustvattnet eller om de kommer från det förväntat stationära beståndet av gädda i sjön.



Figur 12. Schematisk bild över provtagningsområdet i Hemmesta sjöäng, Värmdö kommun, Stockholm.

2.6.3 Experimentell design

Fiskräknaren monterades och installerades den 17 mars 2021 (Figur 10). Provtagning av eDNA genomfördes vid två olika lokaler. Den primära lokalen var i anslutning till fiskräknaren vid utloppet från våtmarken. Den sekundära lokalen var nära utloppet från sjön Hemmesta Träsk. Vid varje lokal placerades en temperaturlogger som mätte vattentemperatur under hela undersökningsperioden. Provtagning av eDNA genomfördes under mars (17, 22, 26, 29, 31), april (1, 8, 20, 29) och maj (5, 12, 20, 26 och 31). En mätsticka monterad i närheten av fiskräknaren användes för att mäta vattenstånd. Nederbördsdata från SMHI:s närmsta station (Djurö D) användes för att beräkna relativ mängd inkommande vatten till våtmarken.

Filtrering och extrahering av DNA följde Ogonwski et al. (2023) med mindre modifieringar av extrahering. qPCR utfördes med de två assays som har beskrivits tidigare i rapporten.

3. Resultat

3.1 Optimering av metodik för insamling och extraktion

3.1.1 Optimala filterkombinationer

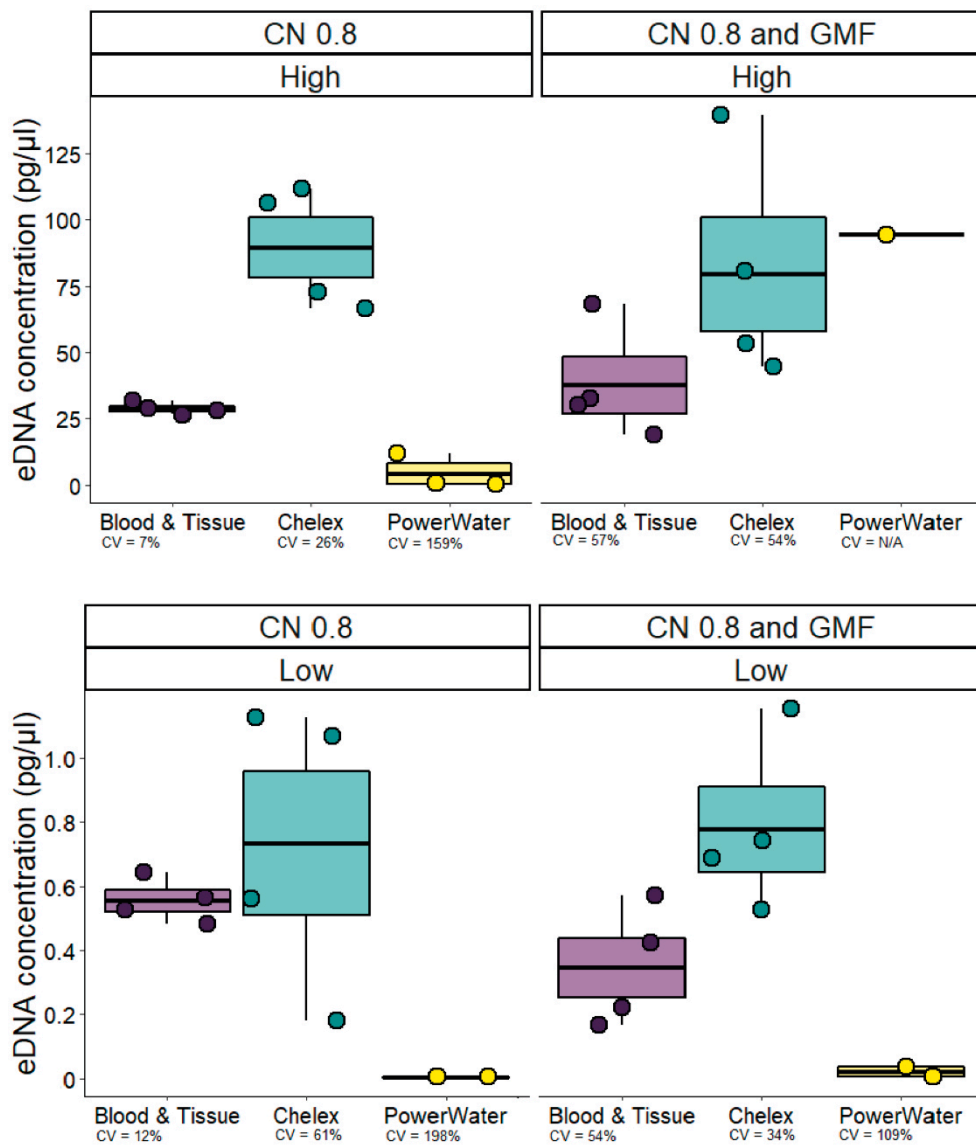
I motsats till vår hypotes ökade inte DNA-koncentrationen vid filtrering genom dubbla filter jämfört med att använda ett filter. I vårt experiment med en hög gäddtäthet hade varken filterkombinationen ($F_{(1,12)} = 0,01$, $p = 0,92$, Figur 13) eller den kombinerade effekten av extraktionsmetod och filterkombination ($F_{(1,12)} = 0,80$, $p = 0,39$) någon effekt på eDNA-koncentrationen. I behandlingen med låg gäddtäthet fann vi inte heller någon skillnad mellan filterkombinationer ($F_{(1,12)} = 0,41$, $p = 0,53$) eller den kombinerade effekten av extraktionsmetoder och filterkombinationer ($F_{(1,12)} = 2,28$, $p = 0,16$).

Vi har i en efterföljande studie observerat att dubbla filter gör att mer vatten kan filtreras innan filtret täpps igen, vilket sannolikt beror på den större porstorleken hos glasfiberfiltret (GFFA) som fungerar som ett förfilter. Eftersom större vattenvolymer förväntas öka eDNA-utbytet förväntar vi oss att användning av dubbla filter kan vara fördelaktigt vid provtagning i naturliga miljöer där igensättning kan vara ett problem eller då stora vattenvolymer behöver filtreras.

3.1.2 Chelex är ett kostnadseffektivt alternativ för extraktion

Resultaten av denna studie tyder på att eDNA-extraktion från filter med Chelex är ett billigt, snabbt och effektivt alternativ till nuvarande filterbaserade extraktionsmetoder. I vårt experiment med en hög gäddtäthet gav Chelex 100 en högre eDNA-koncentration än DNeasy Blood & Tissue ($F_{(1,12)} = 22,8$, $p < 0,001$; Figur 13). I behandlingen med låg gäddtäthet fanns ingen skillnad mellan extraktionsmetoderna ($F_{(1,12)} = 3,1$, $p = 0,10$). På grund av förlorade replikat under DNA-isolering kunde vi tyvärr inte utföra någon statistisk jämförelse mellan PowerWater och de andra extraktionsmetoderna. Visuell inspektion indikerar dock att PowerWater gav lägre eDNA-koncentrationer, förutom ett replikat i behandlingen av hög gäddtäthet med dubbla filter (Figur 13).

Chelex-protokollet som används i denna studie ger också betydligt större provvolymer (~400 μ l jämfört med 100 μ l med DNeasy PowerWater och 200 μ l med DNeasy Blood & Tissue). Dessutom innehåller Chelex-protokollet färre steg vid manipulering av prover vilket minskar risken för kontaminering och hanteringsfel under extraktion. För närvarande använder majoriteten av eDNA-studier på vattenlevande arter kolonn-baserade, kommersiella extraktionskit för att extrahera eDNA från filter. Dessa kit är relativt snabba, enkla att använda och ger höga eDNA-koncentrationer men de kräver också flera manipuleringssteg av proverna och är relativt dyra. Chelex är en kelatbildande polymer som historiskt har använts inom rättsmedicin och populationsgenetik som en snabb, extremt kostnadseffektiv och effektiv teknik för att extrahera DNA för PCR.



Figur 13. eDNA-koncentrationer ($\text{pg } \mu\text{l}^{-1}$) för prover extraherade med DNeasy Blood & Tissue (lila), Chelex 100 (blå) och DNeasy PowerWater (gul) i höga (övre paneler) eller låga (nedre paneler) gäddtätheter, samt användning av enkla cellulosanitratfilter (CN, porstorlek: $0,8 \mu\text{m}$) eller dubbla cellulosanitratfilter (CN, porstorlek: $0,8 \mu\text{m}$) och μm glasmikrofiberfilter (GMF, porstorlek: $1,6 \mu\text{m}$) filter. Varje punkt anger medelvärdet av fyra tekniska replikat tagna från ett prov. Svarta horisontella linjer markerar medelvärdet, medan gränserna för boxen indikerar ± 1 SE med linjer över och under som indikerar min- och maxvärden. CV = variationskoefficienten, vilket är den genomsnittliga normaliserade standardavvikelsen. Figur från (Karlsson et al. 2022).

3.2 Nukleära markörer kan öka detektionskänslighet

Följande resultat från undersökningar av nukleära markörer har ännu inte publicerats vetenskapligt och fullständiga resultat kommer publiceras vid senare tillfälle.

Av de totalt 36 arter som testades med den nukleära markören amplifierade prover från 13 arter (Tabell 1). Hos 5 av dessa 13 arter amplifierade båda replikaten; gädda, abborre, flodnejonöga, groplöja samt elritsa. DNA från gädda visade amplifisering tidigast vid 26 Cq medan närmaste art, elritsa, amplifierade vid 34 Cq. För jämförelse betyder det att 256 kg DNA från elritsa i vattnet ger samma utslag som 1 kg av DNA från gädda.

Tabell 1. Lista över arter som testades mot den nukleära markören. Prover inhämtades från Sverige och Estland där fenklipp alternativt fjällprov togs. Samtliga prover extraherades med DNEasy Blood & Tissue kit och späddes till 1ng μl^{-1} innan de analyserades i två replikat i qPCR. I de prover där båda replikat amplifierade anges medelvärde av Cq.

Vetenskapligt namn	Vävnad	Ursprung	Ampl. replikat	Cq-värde
<i>Anguilla anguilla</i>	Fena	Estland	0/2	0
<i>Barbatula barbatula</i>	Fena	Estland	0/2	0
<i>Blicca bjoerkna</i>	Fena	Estland	0/2	0
<i>Cobitis taenia</i>	Fena	Estland	1/2	38,9
<i>Cottus gobio</i>	Fena	Estland	0/2	0
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	Fena	Estland	0/2	0
<i>Gobio gobio</i>	Fena	Estland	0/2	0
<i>Lampetra fluviatilis</i>	Fena	Estland	2/2	38,7
<i>Leucaspis laveratus</i>	Fena	Estland	2/2	35,2
<i>Leuciscus idus</i>	Fena	Estland	0/2	0
<i>Leuciscus leuciscus</i>	Fena	Estland	0/2	0
<i>Misgurnus fossilis</i>	Fena	Estland	0/2	0
<i>Myoxocephalus quadricornis</i>	Fena	Estland	0/2	0
<i>Neogobius melanstomus</i>	Fena	Estland	0/2	0
<i>Osemerus eperlanus morfa spirinchus</i>	Fena	Estland	1/2	39,9
<i>Pholis gunnellus</i>	Fena	Estland	0/2	0
<i>Phoxinus phoxinus</i>	Fena	Estland	2/2	34,4
<i>Pomatoschistus microps</i>	Fena	Estland	1/2	39,8
<i>Pungitius pungitius</i>	Fena	Estland	0/2	0
<i>Salmo salar</i>	Fena	Estland	1/2	38,9
<i>Tinca tinca</i>	Fena	Estland	0/2	0
<i>Zoarces viviparous</i>	Fena	Estland	1/2	39,9
<i>Alburnus alburnus</i>	Fena	Sverige	0/2	0
<i>Coregonus albula</i>	Fena	Sverige	0/2	0
<i>Gasterosteus aculeatus</i>	Fena	Sverige	0/2	0
<i>Gymnocephalus cernua</i>	Fena	Sverige	0/2	0
<i>Lampetra fluviatilis</i>	Fena	Sverige	1/2	35,8
<i>Osemerus eperlanus</i>	Fena	Sverige	0/2	0
<i>Sander lucioperca</i>	Fena	Sverige	1/2	39,5
<i>Abramis brama</i>	Fjäll	Sverige	0/2	0
<i>Ballerus ballerus</i>	Fjäll	Sverige	0/2	0
<i>Lota lota</i>	Fjäll	Sverige	0/2	0
<i>Perca fluviatilis</i>	Fena	Sverige	2/2	36,6
<i>Rutilus rutilus</i>	Fjäll	Sverige	1/2	38,5
<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	Fjäll	Sverige	0/2	0
<i>Vimba vimba</i>	Fjäll	Sverige	0/2	0
<i>Esox lucius</i>	Fena	Sverige	2/2	26,4

3.2.1 Nukleärt DNA ger högre känslighet än mitokondriellt DNA

Analys av DNA från gädda visade att den nukleära markören producerade amplifiering 8.5 respektive 5.4 Cq tidigare än den mitokondriella markören för DNA från mjölke respektive fenklipp. Analys av tidigare insamlade eDNA-prover från mesokosm-experimentet (avsnitt 2.4) visade att den nukleära markören amplifierade tidigare än den mitokondriella markören i samtliga prover, med en genomsnittlig skillnad på 2.4 Cq. Denna skillnad är mindre än förväntat baserat på analysen av vävnadsprover men indikerar att den nukleära markören har högre känslighet för att detektera DNA i naturliga vattenprover.

3.2.2 Nukleär:mitokondriell kvot kan användas för att spåra aktiv lek

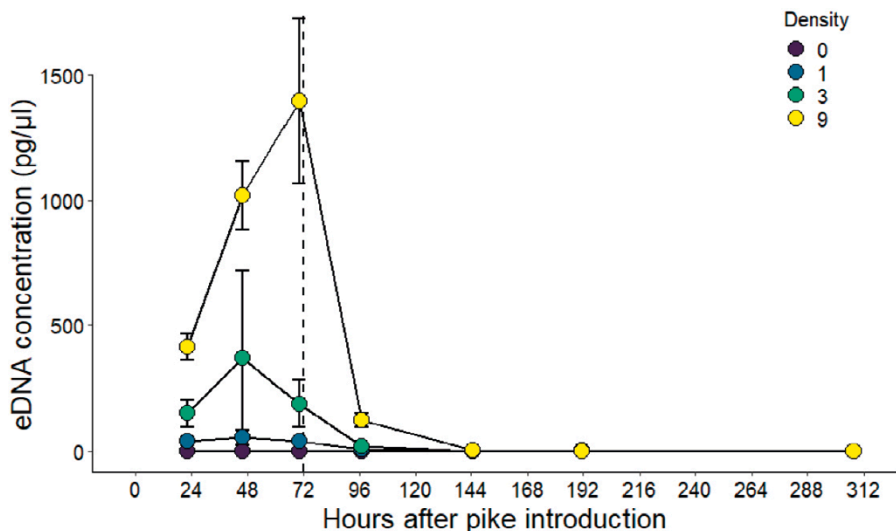
Skillnaden i Cq mellan den nukleära och mitokondriella markören var större för mjölke än det var för fenklipp och indikerar att mjölke innehåller en högre andel nukleärt DNA jämfört med mitokondriellt DNA än fenvävnad. Detta innebär att när mjölke frigörs höjs kvoten av nukleärt mot mitokondriellt DNA i vattnet. Detta faktum skulle kunna appliceras för att detektera pågående lek vilket också har påvisats i försök med andra fiskarter (Bylemans et al. 2017; Wu et al. 2022). Andra faktorer, som att nukleärt DNA kan brytas ner snabbare än mitokondriellt DNA (Marshall et al. 2021), kan komma att påverka detta förhållande och fortsatta studier för att kontrollera hur förhållandet ser ut i praktiken behövs för att bedöma möjligheterna att påvisa lek med denna metod.

3.3 Samband eDNA och gädda i kontrollerad laboriemiljö

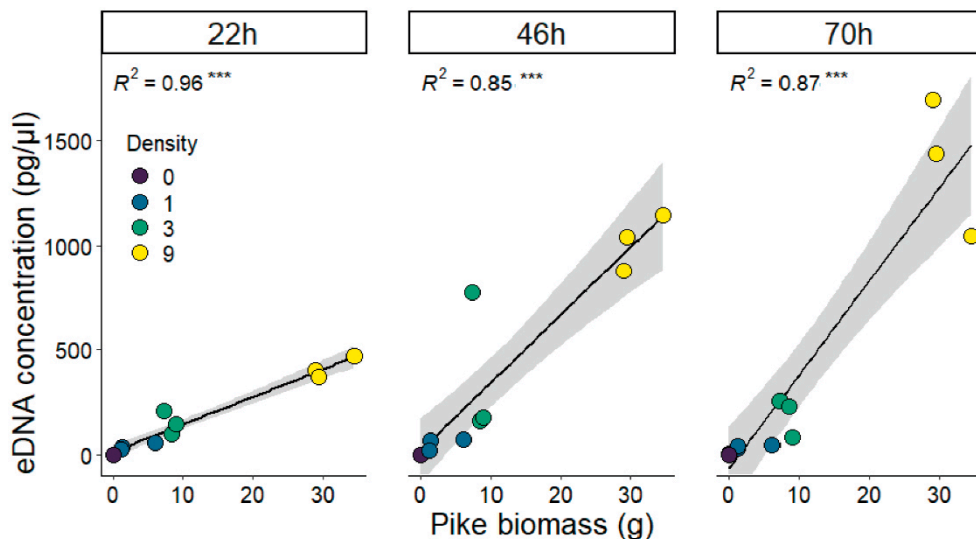
Resultaten visade att efter introduktion av årsynglen till akvarierna var mängden eDNA relativt stabilt över en 72-timmars period, förutom i den högsta densiteten med 9 gäddor, vilken visade en ökande koncentration av eDNA över tid (Figur 14). Efter att gäddorna tagits ut ur akvarierna så sjönk nivåerna av eDNA drastiskt inom de närmsta 27 timmarna (Figur 14). Vid 96 timmar så fanns det fortfarande ett positivt samband mellan eDNA-koncentration och biomassa, om än svagt. Efter 236 timmar (efter att gäddorna plockats bort) så fanns det en mycket svag eDNA signal i 8 av 12 akvarium (Figur 14).

Det fanns ett starkt positivt samband mellan biomassa av årsyngel och eDNA koncentration ($R^2 = 0,87$, Figur 15). Interaktionen mellan biomassa och provtagningstillfälle var statistiskt signifikant ($F_{(2,30)} = 14,24$, $p < 0,001$), vilket visade att sambandet förändrades över tid. Visuellt kontroll av regressionskurvorna för respektive provtagningstillfälle visade att det första provtagningstillfället (vid 22 timmar) skiljde sig från de andra två, som togs vid 46 och 70 timmar (Figur 15). Det första provtagningstillfället exkluderades därför i den nästföljande analysen, som inte visade någon signifikant skillnad mellan kurvorna för de sista två provtagningstillfällena ($F_{1,20} = 2,45$, $p = 0,13$). Densiteten (antalet) årsyngel av gädda visade ett liknande samband med eDNA som biomassa, men hade något högre förklaringsgrad ($R^2 = 0,87-0,97$). De prover som togs från akvarium utan gädda visade en svag amplifieringssignal. Denna signal uppstod

dock först över 10 cykler senare än prover från akvarium med gädda, vilket tyder på att denna svaga bakgrundssignal förmodligen kommer från experimentvattnet, från Mälaren. Inga extraheringskontroller eller NTC:er visade någon amplifiering.



Figur 14. eDNA-koncentration ($\text{pg } \mu\text{l}^{-1}$) över tid (timmar) för fyra olika tätheter (densitet) av årsyngel av gädda i akvarieexperimentet. Punkterna visar medel över tre replikat (baserat på medel från fyra tekniska replikat vardera) och felstaplarna visar en standardavvikelse. Den streckade linjen vid 72 h visar när gäddorna togs ur akvarierna. Figur från Karlsson et al. (2022).

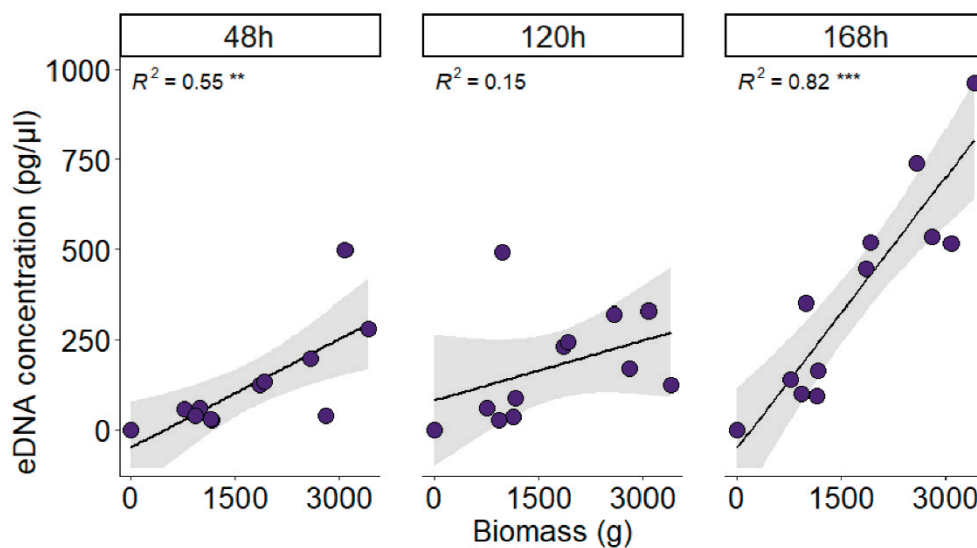


Figur 15. eDNA-koncentration ($\text{pg } \mu\text{l}^{-1}$) som en funktion av biomassa (g) av årsyngel av gädda från akvarier med olika täthet (densitet), vid tre olika provtagningstillfällen (22, 46 och 70 timmar). Punkter visar medelvärden per akvarium, beräknat över fyra tekniska replikat. Linjen och den gråa ytan visar det modellerade regressionssambandet och 95 % konfidensintervall. R^2 är modellens förklarade varians och asterisk indikerar statistisk signifikans (***) $p < 0.001$. Figur från Karlsson et al. (2022).

3.4 Samband eDNA och gädda under semi-naturliga förhållanden

Biomassa av adult gädda hade en positiv effekt på eDNA koncentrationen ($R^2 = 0,74$, Figur 16). Interaktionen mellan biomassa och provtagningstillfälle visade dock att sambandet förändrades över tid på samma sätt som i försöken med årsyngel (avsnitt 3.3, $F_{2,30} = 8,01$, $p = 0,002$). Lutningen för det sista provtagningstillfället (vid 168 timmar) skiljde sig visuellt från de andra två provtagningstillfällena (vid 48 och 120 timmar, Figur 16). Det sista provtagningstillfället exkluderades därför i den nästföljande analysen, som inte visade någon signifikant skillnad mellan kurvorna för de första två provtagningstillfällena ($F_{1,20} = 0,80$, $p = 0,38$). Liknande resultat erhöles om längd användes i stället för biomassa.

Det replikat (mesokosm) som inte innehöll någon gädda (negativ kontroll) visade väldigt låga nivåer av DNA från gädda, med Cq värden mellan 38,8 och 40,0 ($< 0,07$ pg μl^{-1}) jämfört med proverna som innehöll gädda (medel Cq värden på 29,4, som motsvarar en eDNA mängd på 54,13 pg μl^{-1}). En provtagningskontroll (vid 120 timmar) visade amplifiering på 39,0 Cq (motsvarande en eDNA koncentration på 0,06 pg μl^{-1}), inga extraktionskontroller amplifierade. Två NTC amplifierade på en platta (Cq = 38,8 och 38,3, motsvarande 0,07 och 0,10 pg μl^{-1}), plattan exkluderades dock inte från analyserna eftersom den observerade signalen i prover var mycket starkare än förväntad kontaminering baserad på amplifiering i NTC.



Figur 16. eDNA koncentration (pg μl^{-1}) som en funktion av biomassa (g) hos adult gädda i enskilda mesokosmer, vid tre olika provtagningstillfällen (48, 120 och 168 timmar). Punkter visar medelvärden av två replikatprov (baserade på vardera fyra tekniska replikat). Linjen och den gråa ytan visar det modellerade regressionssambandet och 95 % konfidensintervall. R^2 är modellens förklarade varians och asterisk indikerar statistisk signifikans (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). Figur från (Karlsson et al. 2022).

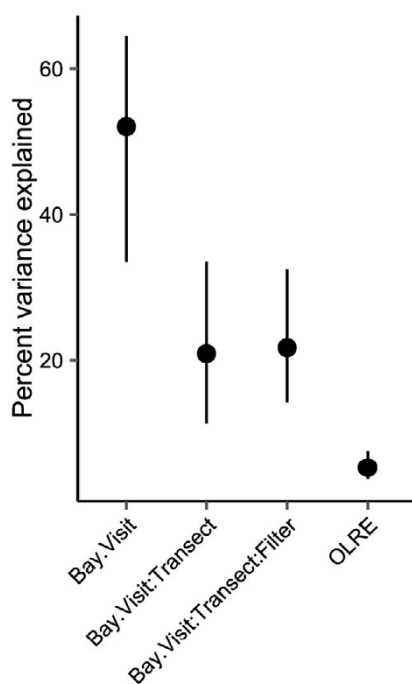
3.5 Samband eDNA och gädda i naturlig kustmiljö – rumslig variation

3.5.1 qPCR-data och kvalitetskontroll

Inhibering av PCR-reaktioner förekom i fem av 22 vikar och dessa prover exkluderades från vidare analyser. Totalt kunde 285 filterprover analyseras (1135 inklusive tekniska replikat). Av dessa prover var 61,9 % över kvantifieringsgränsen LOQ, 12,2 % mellan detektionsgränsen LOD och LOQ, 2,2 % under LOD och 23,6 % producerade ingen signal alls (se Figur S3 i Ogonowski et al. 2023). För att inte överskatta provmedelvärden ersattes 86,6 % av de prov som inte producerade någon signal med nollor. Urvalet baserades på det för havsviken övergripande låga C_q-värdena (se Figur S4 i Ogonowski et al. 2023).

3.5.2 Rumslig och temporal eDNA dynamik

Variationen i eDNA koncentrationer visade sig vara relativt låg mellan transekter inom respektive vik och besök (ca 20 %) och ungefär lika hög mellan filterreplikat inom transekt (Figur 17). Detta indikerar att eDNA koncentrationerna inom en vik var relativt homogena. Den största variationen visade sig i stället uppstå på en högre provtagningsnivå, dvs. mellan vikar och över tid (ca 50 % förklarad varians).



Figur 17. Andel varians som associerades med olika hierarkiska nivåer vid provtagning av eDNA i kustvikar under våren 2020. Den största delen av variansen kunde associeras med skillnader mellan olika vikar och de två olika tillfällena som varje vik provtogs, medan en mindre del av variansen var associerad med skillnader inom vikarna (transekter och filter). OLRE är en så kallad "Observation-level random effect" (Harrison 2014), vilket motsvarar enskilda replikat. Figur från (Ogonowski et al. 2023).

3.5.3 Standardisering av spöprovfiske

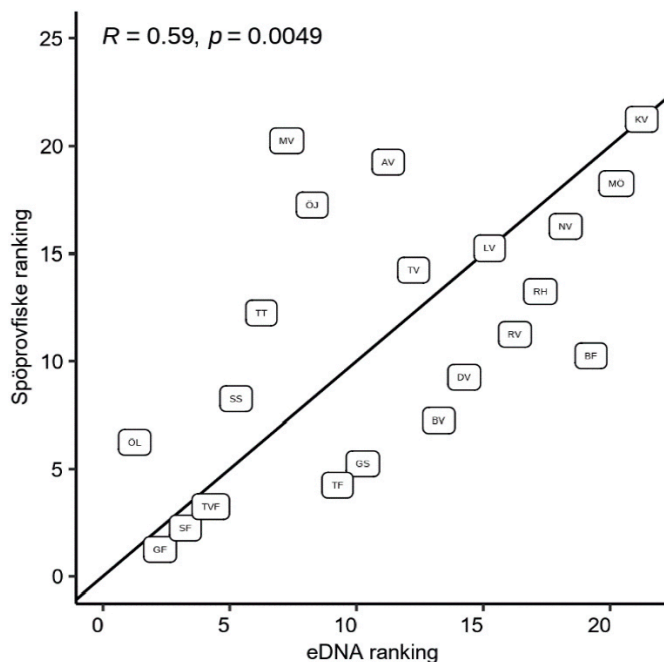
Antalet fångade gäddor per spötimme i spöprovfisket förklarades bäst av den negativa effekten av antalet sportfiskare i viken vid undersökningstillfället (Tabell 2, modell 4). Även om antalet skarvar i viken också hade en negativ effekt på mängden gädda som fångades hade inte denna modell lika starka utvärderingsmått som den föregående modellen och valdes därmed bort. Den bästa modellen (modell 4) användes för att standardisera provfiskeresultatet genom att beräkna den förväntade mängden gädda i frånvaro av andra sportfiskare och en provfiskeansträngning på 16 spötimmor per vik och besök. På så vis kunde den relativa mängden gädda i vikarna göras jämförbar med eDNA-resultaten.

Tabell 2. Modellval för standardisering av spöprovfiske. AICc är Akaikes informationskriterium korrigerat för provstorlek och dAICc är skillnaden i AICc mellan en modell och den bästa modellen. Marginal och villkorlig R² visar andelen varians som endast förklaras av fixa faktorer eller där slumpmässiga effekter är inkluderade. Uppskattningen med tillhörande standardfel och p-värde ges för varje fix effekt. Signifikanta p-värden är markerade med fet stil. Fångst per ansträngning (antal gäddor fångade per spötimme) användes som responsvariabel i mixade modeller med en poisson-fördelning.

Modell	Fix effekt	Random effekt	AICc	dAICc	Villkorlig R ²	Est.	SE	p-värde
1	Ingen (noll-modell)	(1 vik/besök)	340,2	2.7	1.00	-0,99	0,24	< 0,001
2	Temperatur	(1 vik/besök)	342,3	4.8	1.00	0,04	0,06	0,587
3	Skarv	(1 vik:besök)	341,0	3.5	0,91	-0,02	0,01	0,058
4	Sportfiskare	(1 vik/besök)	337,5	0,0	0,91	-0,09	0,01	0,023
5	Skarv	(1 vik/besök)	338,3	0,8	0,85	-0,01	0,01	0,189
	Sportfiskare					-0,07	0,04	0,071
6	Temperatur	(1 vik/besök)	339,7	2.2	0,90	0,03	0,06	0,586
	Sportfiskare					-0,09	0,04	0,023
7	Temperatur	(1 vik:besök)	343,3	5.8	0,91	0,02	0,07	0,751
	Skarv					-0,02	0,01	0,060
8	Temperatur	(1 vik/besök)	340,6	3.1	0,85	0,03	0,06	0,600
	Skarv					-0,01	0,01	0,192
	Sportfiskare					-0,07	0,04	0,070

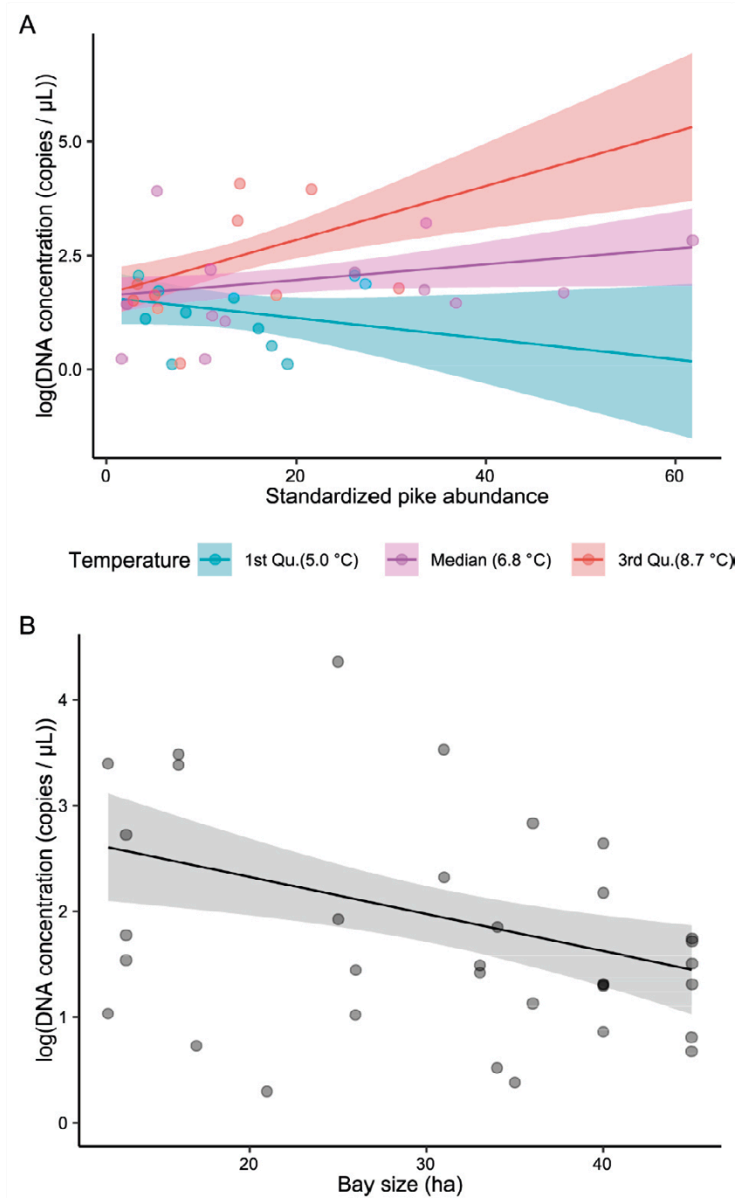
3.5.4 Vattentemperatur har stor betydelse för sambandet mellan eDNA och gädda

Genom att ranka havsvikarna baserat på 1) deras gäddförekomst skattade genom spöprovfiske samt 2) DNA-koncentrationer fann vi ett positivt samband (Figur 18) vilket tyder på att båda metoderna speglar lokala gäddbestånd status.



Figur 18. Sambandet mellan spöprovfiske och eDNA baserat på ranking av populationstätheter i de olika havsvikarna skattade med respektive metodik. Spöprovfiskets ranking baseras på det maximala fångst-per-ansträngning värdet från två besök. eDNA rankingen baseras på den minsta medelkoncentrationen DNA per vik från två besök. R anger korrelationskoefficienten och p det associerade p -värdet. Den diagonala linjen visar ett teoretiskt 1:1 samband. AV = Askviken, BF = Björnöfjärden/Torpe Infjärd, BV = Byviken/Ryssundet, DV = Dalviken, GF = Gisslingöfladen, GS = Granösundet, KV = Kyrkviken/Utö, LV = Lännåkersviken, MV = Myttingeviken, MÖ = Mulö/Löglå, NV = Nynäsviken, RH = Rotholmaviken, RV = Rassa vikar, SF = Söderöfjärden/Sladdarön, SP = Släpan/Ekefjärd, SS = Södersundet, TF = Tofladen/Gropaviken, TT = Tomtviken/Urö, TV = Tranvik/Djurövik, TVF = Tranviksfjärden, ÖJ = Öjaren/Söderöra/Norröra, ÖL = Östra Lemaren.

Sett till enskilda variablers betydelse förklarades eDNA-koncentrationen i vikarna huvudsakligen av temperatur följt av vikstorlek. I motsats till våra förväntningar fann vi ingen signifikant effekt av att ta hänsyn till storlekssammansättningen och dess påverkan på DNA-utsöndringen. Den bästa förklaringen av eDNA-koncentrationen återfanns när flera variabler beaktades samtidigt. Ungefär hälften av variationen i koncentration förklarades av vikens storlek och interaktionen mellan vattentemperatur och standardiserad fångst i spöprovfisket (FpA). Det vill säga, det fanns ett positivt samband mellan de två direkta måtten på mängden gädda, FpA och DNA-koncentration, men det var olika starkt beroende på temperatur. Vid låga temperaturer uppmättes generellt låga halter DNA i vattnet men när temperaturen ökade under säsongen stärktes också sambandet mellan DNA och FpA (Figur 19). Den negativa effekten av vikens storlek på koncentrationen (Figur 19) antas bero på utspädningseffekter.



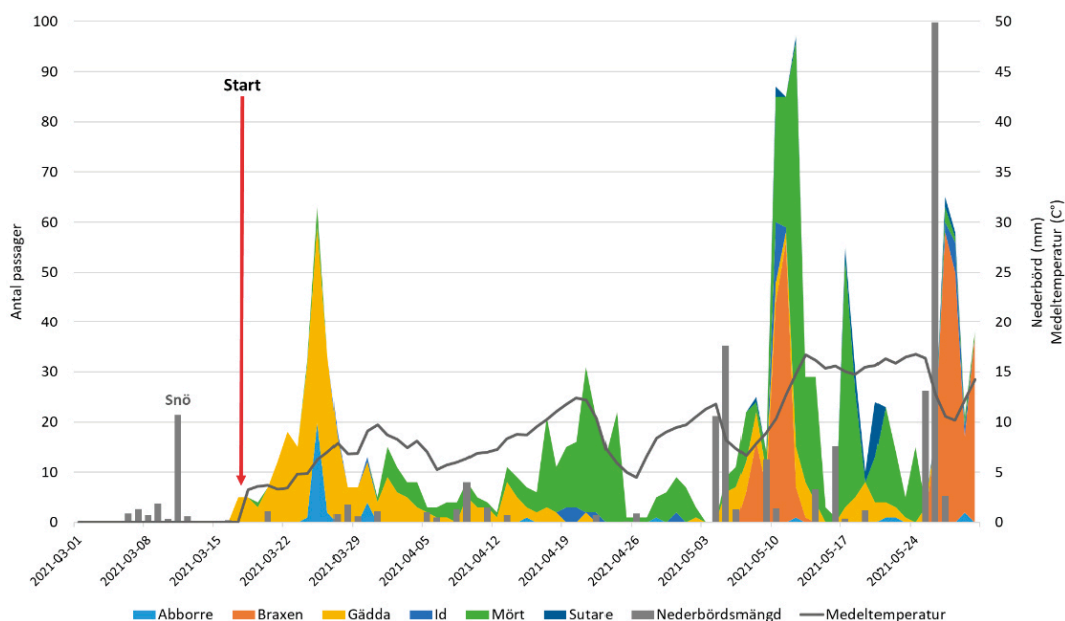
Figur 19. Skattad DNA-koncentration (log-skala, DNA kopior μL^{-1}) som en funktion av A) standardiserad provfiskefångst av gädda vid olika temperaturer och B) vikstorlek (hektar). Modellen förklarade nästan 50 % av den totala variansen i eDNA-koncentration. Figur från Ogonowski et al. (2023).

3.6 Samband eDNA och gädda i en naturlig våtmark – temporal variation

3.6.1 eDNA kan beskriva migrationsmönster

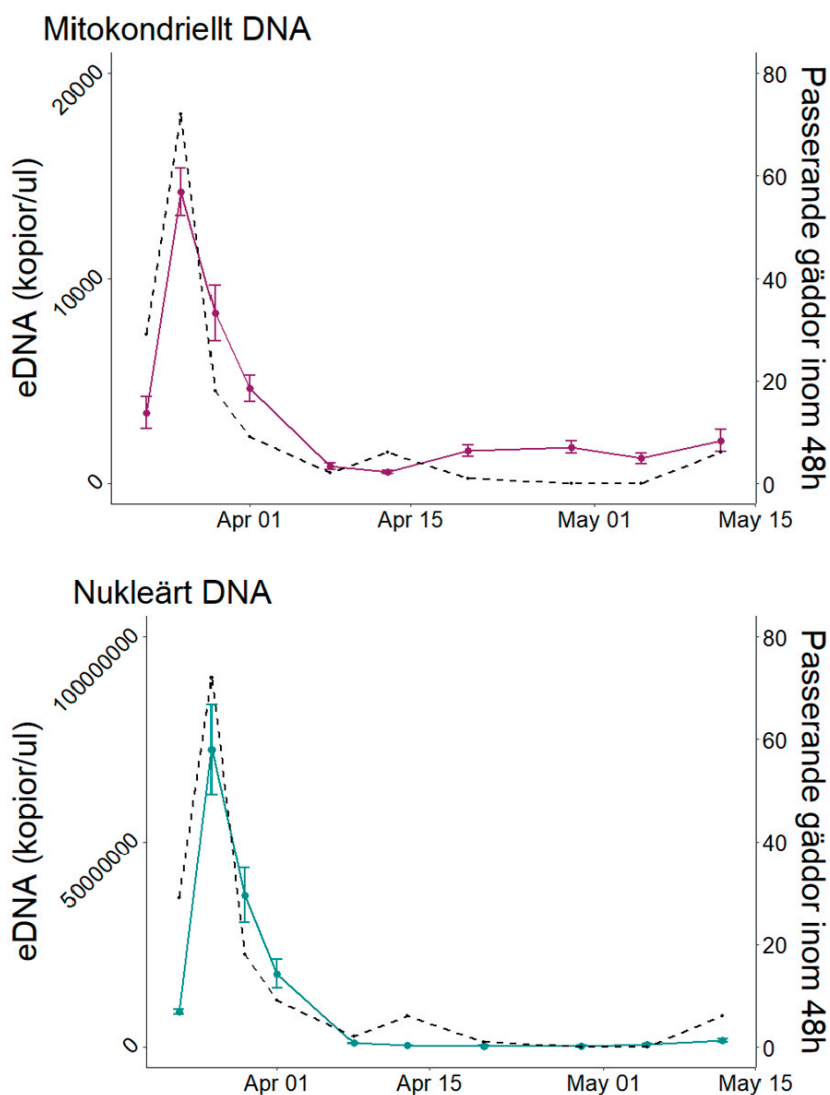
Resultat från genetiska analysen av prover från våtmarken har ännu inte publicerats vetenskapligt, fullständiga resultat kommer publiceras senare.

Redan samma kväll som fiskräknaren i våtmarken startades upp noterades uppvandrande gädda. Antalet gäddor ökade sedan snabbt, vilket också sammanföll med stigande temperatur, för att sedan sjunka. Under undersökningsperioden varierade artsammansättningen i fiskräknaren (Figur 20).



Figur 20. Vandringsmönster hos fisk i förhållande till nederbörd (mm) och vattentemperatur (°C) i Hemmesta Sjöäng, Värmdö kommun, våren 2021. Antal passager (vänster y-axel) inkluderar fisk som passerat både upp- och ner i fiskräknaren. Mängden nederbörd (höger y-axel) är beräknad från SMHI:s station Djurö D och vattentemperatur är från logger-data i våtmarken. Den röda pilen visar startdatum då fiskräknaren installerades. Efter den extremt kraftiga nederbörden i slutet av maj svämmade våtmarken och fiskräknaren (inklusive ledarmar) över varpå experimentet avbröts. Datum för eDNA provtagning var mars 17, 22, 26, 29, 31, april 1, 8, 20, 29, maj 5, 12, 20, 26 och 31.

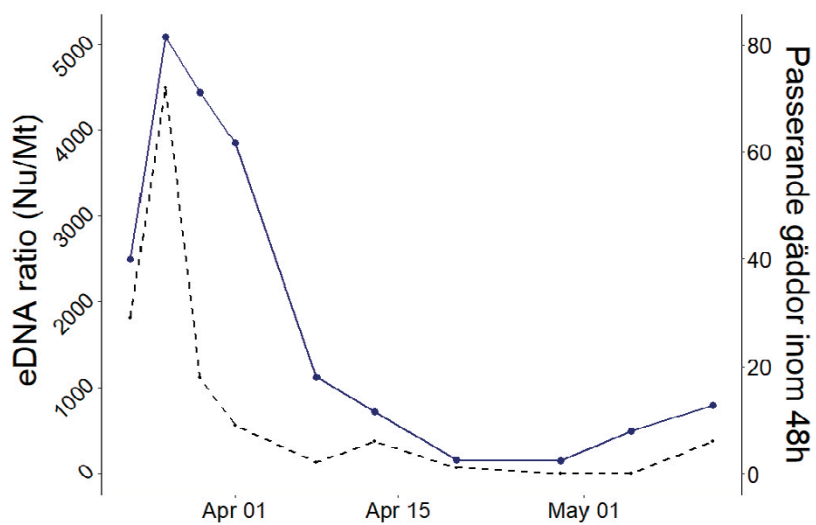
Analys med båda markörerna visade genomgående höga koncentrationer av eDNA från gädda. Den nukleära markören producerade genomgående tidigare amplifiering än den mitokondriella med värden från 20,5 till 32,9 Cq mot 26,8 till 34,2 för den mitokondriella markören. I motsats till vår ursprungliga hypotes om att den kumulativa mängden gädda i våtmarken skulle kunna beskrivas med eDNA lyckades vi inte se detta samband. Istället verkar DNA-koncentrationerna i proverna bättre spegla mängden gädda som har passerat fiskräknaren inom närtid än den kumulativa mängden gädda i våtmarken vid ett enskilt tillfälle (Figur 21).



Figur 21. Mängd gädda som passerat fiskräknaren inom 48h för varje provtagningstillfälle (streckad linje) och uppmätt koncentration av eDNA (heldragen linje med felstaplar) för mitokondriellt DNA (övre panel) respektive nukleärt DNA (nedre panel) över tid. Notera olika skalor på y-axlarna.

3.6.2 Nukleär:mitokondriell kvot under naturliga förhållanden indikerar lek

Analys av kvoten av nukleärt mot mitokondriellt DNA över tid visar att nivåerna var som högst under migrationens högsta intensitet och var fortsatt förhöjda en kort period efter att migrationen trappats av (Figur 22). Vattentemperaturen för den här perioden varierade mellan 7 och 9 °C vilket är inom det optimala spannet för gäddans lek och det är därför troligt att lek pågick. På grund av risken att störa fågellivet kunde observationer eller provtagning inne i våtmarken för verifiering inte genomföras. Översvämning av våtmarken i slutet av maj hindrade därtill insamling av yngel, vilka annars kunde ha använts för att verifiera tidpunkten för lek.



Figur 22. Kvot av nukleärt mot mitokondriellt DNA från gädda över tid (blå heldragen linje) och antal passerande gäddor inom 48h (streckad linje).

4. Diskussion

Gäddans beståndsstatus i svenska vatten är i dagsläget svårbedömd på grund av bristande övervakningsmetodik, vilket medför stora problem för förvaltningen. De negativa förändringar i beståndet av gädda som skett på östersjökusten de senaste 30 åren, samt det ökande sportfisket i våra insjöar kräver en god förvaltning av denna art. Behovet av att kunna övervaka gädda med god precision är därför mycket stort och brådskande.

Med förvaltningens behov i åtanke har vi inom ramen för detta projekt stakat ut vägen för en icke-invasiv och kvantitativ metod för övervakning av gädda som kan vara ett gott komplement till de metoder som används för närvarande.

Vi har genom optimering av provtagnings- och analysmetoder lyckats påvisa ett starkt samband mellan eDNA-koncentrationer och gäddbiodmassa i både kontrollerad laboratoriemiljö samt i semi-naturlig miljö (utomhusmesokosmer). Vi har framgångsrikt applicerat vår utvecklade metodik i fält och visat att eDNA som övervakningsmetod i dagsläget skulle kunna användas för att identifiera skillnader i beståndsstatus. Trots dessa framsteg kvarstår dock en rad frågor kring eDNA-dynamiken i systemen och hur DNA-koncentrationer påverkas av olika yttre faktorer så som temperatur, vattenflöde och volym.

För att eDNA ska etableras som övervakningsmetod för gädda behöver delar av metodiken standardiseras, dess reproducerbarhet testas och kunskapen om variation i tid och rum utökas. Detta görs lämpligen inom ett pilotprogram som under ett antal år (3–5) går parallellt med andra övervakningsmetoder för gädda, så som spöprovfiske. Ett sådant pilotprogram skulle öka befintlig kunskap och bidra med de pusselbitar som återstår för att ta fram en nationell övervakningsmetod för gädda.

4.1 Metodologiska framsteg för uppföljning av gäddbistånd med eDNA

För att öka sannolikheten att detektera sällsynta arter och för att öka möjligheterna att kunna kvantifiera mängden DNA i ett prov är det essentiellt att maximera den mängd DNA man kan utvinna ur varje prov. Detta beror dels på hur stor mängd vatten man filtrerar och dels på effektiviteten i extraktionsmetoden.

Det vanligaste sättet att utvinna DNA ur ett filter är kolumnbaserade extraheringsmetoder, vilka säljs som färdiga kit. Dess kit har fördelar i att de är relativt enkla att använda och ger höga koncentrationer av DNA. Samtidigt är de relativt dyra och innefattar många steg där provet hanteras, vilket leder till risker för kontaminering och misstag. Chelex är en enkel och kostnadseffektiv metod för att utvinna DNA som historiskt har använts i stor utsträckning inom genetisk forskning men som hittills inte har använts i någon större utsträckning inom eDNA-fältet. Vi har visat att Chelex ger högre DNA-koncentrationer än allmänt använda kolumnbaserade kit (Karlsson et al. 2022). Lägre kostnader och enklare hantering gör att fler prover kan processas, vilket är nödvändigt för tillförlitliga mått på mängden DNA i vattnet. Chelex är därför ett reellt alternativ till kommersiella kit som används idag. Chelex minskar även riskerna för kontaminering och misstag från utföraren då det innefattar betydligt

färre hanteringssteg. Chelex-metoden genererar enkelsträngat DNA vilket gör att det kan vara mer känsligt för nedbrytning. I våra experiment har vi dock inte noterat någon form av degradering av DNA-extrakt från Chelex då vi har testat stabilitet på DNA i prover som förvarats 18 månader i $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ utan degradering av DNA (jämför med Simon et al. 2020).

Majoriteten av den forskning som utförts på eDNA har fokuserat på användandet av mitokondriella markörer (Deiner et al. 2017). Det beror på det höga antalet mitokondrier i cellerna tillsammans med den utbredda tillgängligheten av sekvenserade gener i mitokondriellt DNA, primärt genen som kodar för Cytochrome C oxidase I (COI). Ny forskning har dock visat att vissa regioner som kodar för ribosomala gener, vilka är upprepade många gånger i genomet, kan ge likvärdiga eller till och med högre detektionsgrad. Nukleärt DNA har dock visat sig degradera i snabbare takt än mitokondriellt DNA, vilket kan hämma chanserna att detektera medan det samtidigt kan ge en mer aktuell bild av vad som finns i vattnet (Jo et al. 2022).

Baserat på det höga antalet upprepningar av ribosomalt kodande gener som har observerats i gäddans genom (Symonová et al. 2017) undersökte vi möjligheterna att använda genetiska markörer som kodar för upprepat nukleärt DNA som ett alternativ till traditionella mitokondriella markörer. Våra tester visar att markörer på upprepat nukleärt DNA kan ge lika hög eller till och med högre detektionsförmåga än mitokondriella markörer. Detta skulle kunna innebära ökade möjligheter att kvantifiera DNA från prover med låga DNA koncentrationer, vilket kan förekomma relativt ofta i naturliga miljöer (Ogonowski et al. 2023). Våra resultat hittills indikerar att nukleära markörer kan förbättra detektions- och kvantifieringsmöjligheterna av gädda med eDNA, men sambandet mellan nukleärt DNA och biomassa av gädda behöver fastställas innan det kan föreslås som ett bättre alternativ till nuvarande mitokondriella markörer. Att markören som utvärderades här visade viss amplifiering i ett antal andra arter utöver gädda, påvisar även betydelsen av att utvärdera markörer brett på DNA från arter andra än målarten. Exempelvis upptäckte vi amplifiering i abborre men inte i arter som är närmare besläktade med gädda såsom lax och gräspickerel. Det är troligen av ännu större vikt när det gäller markörer på nukleärt DNA då tillgängligheten av sekvenserade genom är lägre än för mitokondriella genom. Beroende av syfte med undersökning eller övervakning behöver detta tas i beaktning vid analys av resultat.

Vi visar även att kvoten av nukleärt DNA:mitokondriellt DNA är högre i mjölke än andra vävnader från gädda. Detta samband skulle potentiellt kunna utnyttjas för att påvisa lek, då mjölke som frisätts ökar den nukleära eDNA signalen, relativt den mitokondriella.

4.2 Inverkan av yttre faktorer på eDNA-signalen

Mängden eDNA i vattnet beror både på hur mycket DNA som tillförs via biologiska processer kopplade till fiskens metabolism, aktivitet och beteende (Kitchell et al. 1977; Bean 2010; Jo et al. 2019) och hur fort det försvinner och fördelas rumsligt, t.ex. via mikrobiell nedbrytning, fysiokemiska och hydrologiska processer (Joseph et al. 2022). Denna dynamik och de faktorer som driver den är viktiga att förstå för att tolka eDNA-signalen och förstå vad den representerar. Vid vår fältundersökning av kustvikar såg vi att DNA-koncentrationerna i vikarna generellt steg i takt med

att vikarna värmdes upp. Denna temperatureffekt är sannolikt kopplad till en generell ökning av fysisk aktivitet, metabolism och en högre andel lekande fisk, som också leder till en frisättning av stora mängder DNA via mjölke och rom (Tillotson et al. 2018; Tsuji & Shibata 2021; Holmes et al. 2022). Temperaturer som ändras snabbt riskerar därför att inducera oönskad varians. Därför kommer det att vara avgörande att välja lämpliga provtagningstider för att göra tidsseriedata jämförbara. Vi rekommenderar att kvantitativa eDNA-undersökningar riktade mot gädda utförs efter leken, vid vattentemperaturer > 10–12 °C. Då antas de flesta gäddor ha lekt men fortfarande ha stor sannolikhet att hålla sig samlade i nära anslutning till sina lekområden.

Förutom en temperatureffekt såg vi också en effekt av vikarnas storlek där eDNA-koncentrationerna tenderade att vara lägre i stora vikar jämfört med små. Även om det är svårt att bedöma om effekten beror på lägre fisktäthet i stora vikar generellt eller en ren utspädningseffekt tyder våra resultat snarare på det senare då korrelationen mellan FpA i spöprovskivet och vikstorlek var relativt lågt medan sambandet med eDNA var betydligt starkare (Ogonowski et al. 2023). Utspädnings-effekter har också observerats i rinnande vatten (Pont et al. 2023) men det behövs mer ingående studier för att förstå hur DNA fördelar sig rumsligt i öppna, lentiska miljöer och hur detta påverkar vår tolkning av mängden gädda på en given plats vid ett givet tillfälle.

Sammantaget har projektet bidragit med en bättre om än inte fullständig förståelse för några av de yttre faktorer som är viktiga för tolkningen av eDNA-signalen och själva designen av ett övervakningsprogram.

4.3 Behov av provtagning i tid och rum

4.3.1 Teoretisk bakgrund

Inom övervakning vill man generellt följa utvecklingen av en variabel över tid. Variabler som följs fungerar som indikatorer för ett tillstånd och i många sammanhang används gränsvärden som indikatorn antingen ska vara över eller under för att indikera det önskvärda tillståndet förvaltningen satt som mål. Huruvida målen går att följa upp eller inte beror på hur exakt indikatorn kan mätas, det vill säga osäkerheten i variabeln. Osäkerheten i mätningen är direkt kopplad till den variation som variabeln uppvisar. Denna variation uppstår från komponenter på olika nivåer och kan beskrivas som hierarkisk (Carstensen & Lindgarth 2016). Variation i rummet kan delas upp i storskalig och småskalig variation, där stor skala i det här sammanhanget kan representeras av olika vattenförekomster eller vikar och liten skala av variation mellan stationer inom respektive vattenförekomst eller vik. Genom att replikera prover per station kan den variation som är associerad med enskilda stationer också mätas. På motsvarande sätt kan tidsmässig variation mätas genom att undersöka skillnader mellan år, månader, veckor och dagar, eller till och med mellan timmar om det är relevant. Rumslig och temporal variation kan också interagera. Till exempel om en storm ett år påverkar mätvariabeln i det ena vattenområdet men inte det andra (Carstensen & Lindgarth 2016).

En del varians uppstår av kända biologiska orsaker och kan förklaras, vilket minskar osäkerheten. Genom att känna till yttre faktorerers betydelse kan mätningar av dem i samband med provtagning bidra till att förklara de DNA-koncentrationer som uppmäts, vilket minskar mängden oförklarad variation i den statistiska modell

som används för uppföljning. Ett exempel kan vara hur vegetationens täckningsgrad minskar med djupet. Genom att inkludera djup i den statistiska modellen förklaras en del av variationen i täckningsgrad, förklaringsgraden i modellen ökar och den totala osäkerheten i uppföljningen minskar.

Variation uppstår också på grund av metodologiska osäkerheter, till exempel beroende av vilket filter som används för att samla in eDNA, vilka kit som används för extrahering och vilka assayer som används för att kvantifiera mängden DNA.

I ett övervakningsssammanhang är den totala osäkerheten i måluppföljningen summan av variansen från alla bidragande komponenter. Kvantitativ kunskap om variationskomponenters betydelse innebär att deras bidrag till totala osäkerheten kan modelleras (Carstensen & Lindegarth 2016). Genom att simulera olika kombinationer av provtagningsstorlekar kan designen av ett övervakningsprogram optimeras. Om den ekonomiska kostnaden för provtagning på olika skalor är känd kan programmet också göras kostnadseffektivt.

4.3.2 Praktisk kunskap och återstående frågor

Inom projektet har vi påbörjat de analyser av varianskomponenter som krävs för att designa ett effektivt övervakningsprogram. När det gäller storskalig variation återvänder gädda till samma lekplats som där de föddes och har ett starkt så kallat homing-beteende (Miller et al. 2001; Larsson et al. 2015). Även under övrig tid på året är gädda förhållandevis stationär och uppvisar korta migrationsavstånd, normalt 3–5 km och ibland upp till 10 km (Karås & Lehtonen 1993; Pauwels et al. 2013; Flink et al. 2023). Längs kusten har man som stöd till detta identifierat genetiskt skilda delpopulationer (Laikre et al. 2005; Diaz-Suarez et al. 2022). Det finns också en genetisk uppdelning på små rumsliga skalor, gäddor i vattendrag som ligger endast någon km från varandra har visat sig skilja sig åt genetiskt (Larsson et al. 2015; Tibblin et al. 2015). Uppdelningen verkar ske just under leken medan gäddorna under resten av tiden på året blandas längs kusten (Wennerström et al. 2016). Ett enkelt sätt att minska den rumsliga variationen är därför att avgränsa provtagningen till kända lekområden under den tid gädda aggregerar.

I fältförsöket med vikar i Stockholms skärgård associerades det mesta av variationen till skillnader mellan vikar och mellan olika besök i samma vik, snarare än till rumsliga skillnader inom vik (Figur 17). Det kan tolkas som att lekvikar är en lämplig avgränsning, men också att tidsmässig variation inom leksäsongen kan vara viktig. Möjligen påverkar också interaktioner mellan vikar och vikbesök, det vill säga att aggregering och lek har kommit olika långt vid en given tidpunkt under våren. Undersökningen i våtmarken i Hemmesta, Värmdö kommun, syftade bland annat till att undersöka detta. Då resultaten inte ännu är vetenskapligt publicerade är en preliminär slutsats att även migrationen i samband med leken kan ha en betydande påverkan på eDNA-signalen. Det finns således behov av att ytterligare undersöka temporal variation under leksäsongen.

Den finskaliga variationen inom vik indikerade att lika mycket variation associerades till mellan transekter som inom transekter (Figur 17). En utmaning för tolkningen är dock den låga replikeringen som användes, fyra transekter per vik och två replikat per transekt. För att få en bra skattning av variationen som associeras till de olika tids- och rumsliga nivåerna behövs studier som initialt ”över-replikerar” för att deras betydelse ska kunna modelleras på ett bra sätt (Lindegarth et al. 2016).

Visserligen ger det inledningsvis en högre kostnad, men i förlängningen uppnås väl designade övervakningsprogram med en större möjlighet att skilja naturlig variation från faktiska (bestånds)förändringar.

En källa till variation som inte varit möjlig att undersöka inom ePIKE är variation över tid (år). För att få en uppfattning om hur stor variationen är mellan år behövs av naturliga skäl fleråriga studier. Ett flerårigt pilotprogram skulle fylla denna kunskapslucka. En annan metodologisk utmaning med eDNA-metoder är avsaknaden av kunskap om hur storleksstruktur påverkar uppföljningen. Även om vi inte fann stöd för storleksstrukturens betydelse på uppmätta DNA-koncentrationer i lekvikarna i Stockholms skärgård (Ogonowski et al. 2023) har andra visat att storlekssammansättningens betydelse för DNA-utsöndringshastigheten kan vara avsevärd (t.ex. Yates et al. 2020). Eftersom både storleksstrukturen och mängden fisk (antal och biomassa) kan förändras över tid behövs sådan kunskap. Långa tidsserier över populationsutveckling hos gädda är dock sällsynta, men förekommer. I Mälaren, vid SLU:s sötvattenslaboratorium i Drottningholm, följdes gäddbeståndet 1945–1967 med ängsryssjor. Efter det hårda fisket under andra världskriget återhämtade sig beståndet successivt, vilket visade sig genom en ökad storlek men färre antal (Svärdson & Molin 1968). Hur sådana förändringar påverkar eDNA-signalen är okänt. Ett pilotprogram som parallellt undersöker mängd, storleksstruktur och eDNA kan ge en bättre förståelse av den eventuella betydelsen av DNA-utsöndringshastighet, vilket skulle vara av stor vikt för den fortsatta utvecklingen av eDNA som övervakningsmetod.

4.4 eDNA kan användas för övervakning av gädda

Genom det här projektet har vi kommit en lång bit på vägen mot målet att utveckla eDNA som övervakningsmetod för gädda. De laboratorietekniska metoderna har utvecklats. Exempelvis optimering av filterkombinationer, kostnadseffektiva extraheringskit och lämpliga/känsliga assayer har testats och är redo att tillämpas praktiskt. Utifrån den utvecklade kunskapen om metoderna kan nu också reella bedömningar av kostnader i form av material, tid och resurser sättas ihop för tids- och kostnadseffektiv provtagning.

Vi har även undersökt rumslig och temporal variation. Det innebär att kunskap finns om vilken omfattning som krävs på provtagning för att följa enskilda delpopulationer över tid (i en vik, en sjö eller ett specifikt avgränsat område), eller för att göra rumsliga jämförelser av relativa mängder mellan olika avgränsade områden.

Projektet har även undersökt effekter av yttre faktorer. I likhet med andra provtagningsmetoder, till exempel nätprovfisken, kan provtagningen påverkas av miljövariabler. Inte minst temperatur har en direkt fysiologisk effekt på fisk och deras beteende vilket påverkar sannolikheten att fångas. Baserat på projektets resultat ger vi konkreta rekommendationer för vilka förhållanden som bör råda vid provtagning.

Även om eDNA kan användas för övervakning av gädda återstår pusselbitar innan det kan tillämpas fullt ut i ett nationellt samordnat övervakningsprogram. Återstående kunskap kan fås genom att initiera ett pilotprogram. Ett sådant program bör fokusera på ett antal områden som följs över tid (3–5 år) och föreslås inkludera

parallella insamlingsmetoder. Det skulle generera bättre kunskap om variation mellan år. Genom en ordentlig replikering av de bedömt viktigaste källorna till rumslig och temporal variation kan modellering av varianskomponenter bidra till ett i slutänden väldefinierat övervakningsprogram. För att öka förståelsen av vad skillnader i eDNA-koncentrationer innebär vad gäller motsvarande skillnader i antal och storleksstruktur behövs parallella insamlingsmetoder. Bland de insamlingsmetoder som kan användas för gädda, till exempel ryssjefisken och i vissa miljöer båtelfiske, bedöms spöprovfiske vara en kostnadseffektiv metod för insamling av antal (relativ täthet) och storleksstruktur (Sundblad 2023). Att parallellt nyttja eDNA-metoder och spöprovfiske skulle bidra till ökad kunskap om hur antal och storleksstruktur påverkar uppmätt koncentration av eDNA. Spöprovfiske ger också möjlighet att använda fångst-återfångst-metoder för att skatta totala populationens storlek, vilket kan vara relevant att jämföra med eDNA-provtagning som inkluderar en större del av populationen än spöprovfiske.

En sista pusselbit som behöver belysas när vi rör oss mot en långsiktig övervakning av gädda med eDNA-metoder är behovet av standardisering. En styrka med till exempel nätprovfisken är att de är standardiserade och utförs på samma sätt över tid, vilket ger jämförbara data. Den snabba utvecklingen kring eDNA-metoder innebär dock att laborietekniska metoder genomgår snabba förändringar. Exempelvis förbättras och modifieras filtreringsmetoder, DNA-extraktionsprotokoll, PCR-assayer och kemiska reagenser vilket komplicerar jämförbarheten av analysresultat över det tidsperspektiv övervakningsprogram normalt verkar inom. En fullskalig standardisering av metoderna i alla led, där en specifik metodik befästs som orubblig är därmed osannolik. För att ändå följa med i utvecklingen och samtidigt tillåta tidserier att bli jämförbara krävs det (1) att insamlingen och konserveringen av vattenprover sker enligt gängse accepterade metoder för vilka det idag finns nationella och internationella standarder (SIS/CEN 2023) (2) noggrann dokumentation och vetenskaplig transparens och (3) tillsatser av interna standarder och olika typer av kontroller i alla steg av eDNA-analysen – från insamling av vattenprov till amplifiering via PCR eller motsvarande metod (Mauvisseau et al. 2022). Genom att tillsätta en känd mängd syntetiskt DNA i olika steg av analysarbetet tillåter man därmed kvantifiering av eventuella DNA-förluster i processtegen vilket skulle generera långsiktigt jämförbara data, även om detaljer i metoderna ändras över tid. Det pilotprogram vi föreslår bör utveckla och beskriva hur en standardisering går till.

Sammantaget finns nu alla förutsättningar för skonsam uppföljning av gädda med eDNA-metoder. Ett pilotprogram kan utveckla de delar som återstår för att ta fram en övervakningsmanual och lägga grunden för ett nationellt samordnat program för övervakning av gädda i svenska vatten.

5. Tack

För att ett flerårigt forskningsprojekt ska bli framgångsrikt krävs goda samarbeten. Inom ePIKE har vi haft fördelen att få arbeta tillsammans med många duktiga och dedikerade personer på ett antal organisationer. Vi vill tacka för detta och uppmärksamma Värmdö kommun för gott samarbete och möjligheten att genomföra undersökningen i Hemmesta sjöäng 2021, Fiskevårdsteknik för stöd med fiskräknaren och alla på Sportfiskarna, särskilt Victor Sandberg och Nils Ljunggren, som utöver ha varit ett bra stöd i Hemmesta också bidrog till insamlingen av yngel för våra första experiment. Tack till Per Vidlund för insamling av adult gädda till försöken i mesokosmer. Tack till Kenneth Karlsson för insamling av gäddmjölke. Tack till Henrik C. Andersson vid Länsstyrelsen i Stockholms län och alla sportfiskare involverade i spöprovfisket av vikar och projektet REFISK för sportfiskedata. Tack till Zandra Gerdes (Aquabiota Water Research/NIRAS), Ofir Svensson (Calluna AB) för hjälp i laboratoriet, våra kollegor Ola Renman, John Persson och Stefan Nyberg för hjälp med utrustning och fältarbete och Linda Söderberg för hjälp på genlab, Veljo Kisand, Riho Gross, Ilkka Nousiainen och Lilian Pukk för deras råd och hjälp vid laboratoriearbetet vid Tartu universitet och Estonian University of Life Sciences.

Källhänvisning

- Bean, N.J. (2010). *An Improved Bioenergetics Model for Northern Pike (Esox Lucius) of Box Canyon Reservoir, Pend Oreille River, Washington*. Eastern Washington University.
- Bergström, U., Larsson, S., Erlandsson, M., Ovegård, M., Ragnarsson Stabo, H., Östman, Ö. & Sundblad, G. (2022). Long-term decline in northern pike (*Esox lucius* L.) populations in the Baltic Sea revealed by recreational angling data. *Fisheries Research*, 251, 106307. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2022.106307>
- Bylemans, J., Furlan, E.M., Hardy, C.M., McGuffie, P., Lintermans, M. & Gleeson, D.M. (2017). An environmental DNA-based method for monitoring spawning activity: a case study, using the endangered Macquarie perch (*Macquaria australasica*). *Methods in Ecology and Evolution*, 8 (5), 646–655. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12709>
- Capo, E., Spong, G., Königsson, H. & Byström, P. (2020). Effects of filtration methods and water volume on the quantification of brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic char (*Salvelinus alpinus*) eDNA concentrations via droplet digital PCR. *Environmental DNA*, 2 (2), 152–160. <https://doi.org/10.1002/edn3.52>
- Carstensen, J. & Lindegarth, M. (2016). Confidence in ecological indicators: A framework for quantifying uncertainty components from monitoring data. *Ecological Indicators*, 67, 306–317. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.03.002>
- Casselmann, J.M. (1974). External Sex Determination of Northern Pike, *Esox lucius* Linnaeus. *Transactions of the American Fisheries Society*, 103 (2), 343–347. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1974\)103<343:ESDONP>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1974)103<343:ESDONP>2.0.CO;2)
- Craig, J.F. (2008). A short review of pike ecology. *Hydrobiologia*, 601, 5–16.
- Deiner, K., Bik, H.M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière-Roussel, A., Altermatt, F., Creer, S., Bista, I., Lodge, D.M., Vere, N., Pfrender, M.E. & Bernatchez, L. (2017). Environmental metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology*, 26 (21), 5872–5895. <https://doi.org/10.1111/mec.14350>
- Diaz-Suarez, A., Noreikiene, K., Kisand, V., Burimski, O., Svirgsden, R., Rohtla, M., Ozerov, M., Gross, R., Vetemaa, M. & Vasemägi, A. (2022). Temporally stable small-scale genetic structure of Northern pike (*Esox lucius*) in the coastal Baltic Sea. *Fisheries Research*, 254, 106402. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2022.106402>
- Donadi, S., Austin, Å.N., Bergström, U., Eriksson, B.K., Hansen, J.P., Jacobson, P., Sundblad, G., Regteren, M. van & Eklöf, J.S. (2017). A cross-scale trophic cascade from large predatory fish to algae in coastal ecosystems. *Proc. R. Soc. B*, 284 (1859), 20170045. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.0045>
- Dunker, K.J., Sepulveda, A.J., Massengill, R.L., Olsen, J.B., Russ, O.L., Wenburg, J.K. & Antonovich, A. (2016). Potential of Environmental DNA to Evaluate Northern Pike (*Esox lucius*) Eradication Efforts: An Experimental Test and Case Study. *PLOS ONE*, 11 (9), e0162277. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162277>

- Eklöf, J.S., Hansen, J.P., Eriksson, B.K., Östman, Ö., Austin, Å.N., Yanos, C., Fredriksson, R., Bergström, U. & Andersson, H.C. (2023). Effects of seasonal spawning closures on pike (*Esox lucius* L.) and perch (*Perca fluviatilis* L.) catches and coastal food webs in the western Baltic Sea. *Fisheries Research*, 263, 106674. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2023.106674>
- Eklöf, J.S., Sundblad, G., Erlandsson, M., Donadi, S., Hansen, J.P., Eriksson, B.K. & Bergström, U. (2020). A spatial regime shift from predator to prey dominance in a large coastal ecosystem. *Communications Biology*, 3 (1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01180-0>
- Flink, H., Tibblin, P., Hall, M., Hellström, G. & Nordahl, O. (2023). Variation among bays in spatiotemporal aggregation of Baltic Sea pike highlights management complexity. *Fisheries Research*, 259, 106579. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2022.106579>
- Goutte, A., Molbert, N., Guérin, S., Richoux, R. & Rocher, V. (2020). Monitoring freshwater fish communities in large rivers using environmental DNA metabarcoding and a long-term electrofishing survey. *Journal of Fish Biology*, 97 (2), 444–452. <https://doi.org/10.1111/jfb.14383>
- Hansen, J.P., Sundblad, G., Bergström, U., Austin, Å.N., Donadi, S., Eriksson, B.K. & Eklöf, J.S. (2019). Recreational boating degrades vegetation important for fish recruitment. *Ambio*, 48, 539–551. <https://doi.org/10.1007/s13280-018-1088-x>
- Hansson, S., Bergström, U., Bonsdorff, E., Härkönen, T., Jepsen, N., Kautsky, L., Lundström, K., Lunneryd, S.-G., Ovegård, M., Salmi, J., Sendek, D. & Vetemaa, M. (2017). Competition for the fish – fish extraction from the Baltic Sea by humans, aquatic mammals, and birds. *ICES Journal of Marine Science*, 75 (3), 999–1008. <https://doi.org/10.1093/icesjms/fsx207>
- HaV (2022). *Fritidsfisket i Sverige 2018-2020*. (2022:6). <http://havochvatten.diva-portal.org/smash/get/diva2:1657751/FULLTEXT01.pdf>
- Holmes, V., Aman, J., York, G. & Kinnison, M.T. (2022). Environmental DNA detects Spawning Habitat of an ephemeral migrant fish (Anadromous Rainbow Smelt: *Osmerus mordax*). *BMC Ecology and Evolution*, 22 (1), 121. <https://doi.org/10.1186/s12862-022-02073-y>
- Inskip, P.D. (1982). *Habitat Suitability Index Models: Northern Pike*. Western Energy and Land Use Team, Office of Biological Services, Fish and Wildlife Service, U.S. Department of the Interior.
- Jo, T., Murakami, H., Yamamoto, S., Masuda, R. & Minamoto, T. (2019). Effect of water temperature and fish biomass on environmental DNA shedding, degradation, and size distribution. *Ecology and Evolution*, 9 (3), 1135–1146. <https://doi.org/10.1002/ece3.4802>
- Jo, T.S., Tsuru, K. & Yamanaka, H. (2022). Can nuclear aquatic environmental DNA be a genetic marker for the accurate estimation of species abundance? *The Science of Nature*, 109 (4), 38. <https://doi.org/10.1007/s00114-022-01808-7>
- Joseph, C., Faiq, M.E., Li, Z. & Chen, G. (2022). Persistence and degradation dynamics of eDNA affected by environmental factors in aquatic ecosystems. *Hydrobiologia*, 849 (19), 4119–4133. <https://doi.org/10.1007/s10750-022-04959-w>

- Karås, P. & Lehtonen, H. (1993). Patterns of movement and migration of pike (*Esox lucius* L.) in the Baltic Sea. *Nordic Journal of Freshwater Fish*, 1993 (68).
- Karlsson, E., Ogonowski, M., Sundblad, G., Sundin, J., Svensson, O., Nousiainen, I. & Vasemägi, A. (2022). Strong positive relationships between eDNA concentrations and biomass in juvenile and adult pike (*Esox lucius*) under controlled conditions: Implications for monitoring. *Environmental DNA*, 4 (4), 881–893. <https://doi.org/10.1002/edn3.298>
- Kitchell, J.F., Stewart, D.J. & Weininger, D. (1977). Applications of a Bioenergetics Model to Yellow Perch (*Perca flavescens*) and Walleye (*Stizostedion vitreum vitreum*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 34 (10), 1922–1935. <https://doi.org/10.1139/f77-258>
- Klymus, K.E., Merkes, C.M., Allison, M.J., Goldberg, C.S., Helbing, C.C., Hunter, M.E., Jackson, C.A., Lance, R.F., Mangan, A.M., Monroe, E.M., Piaggio, A.J., Stokdyk, J.P., Wilson, C.C. & Richter, C.A. (2020). Reporting the limits of detection and quantification for environmental DNA assays. *Environmental DNA*, 2 (3), 271–282. <https://doi.org/10.1002/edn3.29>
- Laikre, L., Miller, L.M., Palmé, A., Palm, S., Kapuscinski, A.R., Thoresson, G. & Ryman, N. (2005). Spatial genetic structure of northern pike (*Esox lucius*) in the Baltic Sea. *Molecular Ecology*, 14, 1955–1964
- Larsson, P., Tibblin, P., Koch-Schmidt, P., Engstedt, O., Nilsson, J., Nordahl, O. & Forsman, A. (2015). Ecology, evolution, and management strategies of northern pike populations in the Baltic Sea. *AMBIO*, 44 (3), 451–461. <https://doi.org/10.1007/s13280-015-0664-6>
- Lindgarth M, Carstensen J, Drakare S, Johnson RK, Nyström Sandman A, Söderpalm A, Wikström S A (Editors). (2016). Ecological Assessment of Swedish Water Bodies; development, harmonisation and integration of biological indicators. Final report of the research programme WATERS. Deliverable 1.1-4, WATERS report no 2016:10. Havsmiljöinstitutet, Sweden.
- Marshall, N.T., Vanderploeg, H.A. & Chaganti, S.R. (2021). Environmental (e)RNA advances the reliability of eDNA by predicting its age. *Scientific Reports*, 11 (1), 2769. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82205-4>
- Mauvisseau, Q., Harper, L.R., Sander, M., Hanner, R.H., Kleyer, H. & Deiner, K. (2022). The Multiple States of Environmental DNA and What Is Known about Their Persistence in Aquatic Environments. *Environmental Science & Technology*, 56 (9), 5322–5333. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c07638>
- Miller, L.M., Kallemeyn, L. & Senanan, W. (2001). Spawning-Site and Natal-Site Fidelity by Northern Pike in a Large Lake: Mark–Recapture and Genetic Evidence. *Transactions of the American Fisheries Society*, 130 (2), 307–316. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(2001\)130<0307:SSANSF>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(2001)130<0307:SSANSF>2.0.CO;2)
- Miya, M. (2022). Environmental DNA Metabarcoding: A Novel Method for Biodiversity Monitoring of Marine Fish Communities. *Annual Review of Marine Science*, 14 (1), 161–185. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-041421-082251>

- Murakami, H., Yoon, S., Kasai, A., Minamoto, T., Yamamoto, S., Sakata, M.K., Horiuchi, T., Sawada, H., Kondoh, M. & Yamashita, Y. (2019). Dispersion and degradation of environmental DNA from caged fish in a marine environment. *Fisheries science*, 85 (2), 327–337
- Ogonowski, M., Karlsson, E., Vasemägi, A., Sundin, J., Bohman, P. & Sundblad, G. (2023). Temperature moderates eDNA–biomass relationships in northern pike. *Environmental DNA*, 5 (4), 750–765. <https://doi.org/10.1002/edn3.440>
- Olsen, J.B., Lewis, C.J., Massengill, R.L., Dunker, K.J. & Wenburg, J.K. (2015). An evaluation of target specificity and sensitivity of three qPCR assays for detecting environmental DNA from Northern Pike (*Esox lucius*). *Conservation Genetics Resources*, 7 (3), 615–617. <https://doi.org/10.1007/s12686-015-0459-x>
- Olsen, J.B., Lewis, C.J., Massengill, R.L., Dunker, K.J. & Wenburg, J.K. (2016). Erratum to: An evaluation of target specificity and sensitivity of three qPCR assay for detecting environmental DNA from Northern Pike (*Esox lucius*). *Conservation Genetics Resources*, 8 (1), 89–89. <https://doi.org/10.1007/s12686-016-0526-y>
- Olsson, J., Andersson, M.L., Bergström, U., Arlinghaus, R., Audzijonyte, A., Berg, S., Briekmane, L., Dainys, J., Ravn, H.D., Droll, J., Dziemian, Ł., Fey, D.P., van Gemert, R., Greszkiewicz, M., Grochowski, A., Jakubavičiūtė, E., Lozys, L., Lejk, A.M., Mustamäki, N., Naddafi, R., Olin, M., Saks, L., Skov, C., Smoliński, S., Svirgsden, R., Tiainen, J. & Östman, Ö. (2023). A pan-Baltic assessment of temporal trends in coastal pike populations. *Fisheries Research*, 260, 106594. <https://doi.org/10.1016/j.fishres.2022.106594>
- Östman, Ö., Eklöf, J., Eriksson, B.K., Olsson, J., Moksnes, P.-O. & Bergström, U. (2016). Top-down control as important as nutrient enrichment for eutrophication effects in North Atlantic coastal ecosystems. *Journal of Applied Ecology*, 53 (4), 1138–1147. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12654>
- Pauwels, I.S., Goethals, P.L.M., Coeck, J. & Mouton, A.M. (2013). Movement patterns of adult pike (*Esox lucius* L.) in a Belgian lowland river. *Ecology of freshwater fish*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1111/eff.12090>
- Pont, D., Meulenbroek, P., Bammer, V., Dejean, T., Erős, T., Jean, P., Lenhardt, M., Nagel, C., Pekarik, L., Schabuss, M., Stoeckle, B.C., Stoica, E., Zornig, H., Weigand, A. & Valentini, A. (2023). Quantitative monitoring of diverse fish communities on a large scale combining eDNA metabarcoding and qPCR. *Molecular Ecology Resources*, 23 (2), 396–409. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13715>
- Rourke, M.L., Fowler, A.M., Hughes, J.M., Broadhurst, M.K., DiBattista, J.D., Fielder, S., Wilkes Walburn, J. & Furlan, E.M. (2022). Environmental DNA (eDNA) as a tool for assessing fish biomass: A review of approaches and future considerations for resource surveys. *Environmental DNA*, 4 (1), 9–33. <https://doi.org/10.1002/edn3.185>
- Seaburg, K.G. & Moyle, J.B. (1964). Feeding Habits, Digestive Rates, and Growth of Some Minnesota Warmwater Fishes. *Transactions of the American Fisheries Society*, 93 (3), 269–285. [https://doi.org/10.1577/1548-8659\(1964\)93\[269:FHDRAG\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1577/1548-8659(1964)93[269:FHDRAG]2.0.CO;2)
- Simon, N., Shallat, J., Williams Wietzikoski, C. & Harrington, W.E. (2020). Optimization of Chelex 100 resin-based extraction of genomic DNA from dried blood spots. *Biology Methods & Protocols*, 5 (1), bpaa009. <https://doi.org/10.1093/biomethods/bpaa009>

- SIS/CEN (2023). SIS/CEN standard (2023) Water quality – Sampling, capture and preservation of environmental DNA from water. Standard.
- Sundblad, G. (2023). *Spöprovfiske efter gädda i Vänern*. (2023:15). Institutionen för akvatiska resurser, Sveriges lantbruksuniversitet. <https://doi.org/10.54612/a.7scudfk3ut>
- Sundblad, G. & Bergström, U. (2014). Shoreline development and degradation of coastal fish reproduction habitats. *Ambio*, 43, 1020–1028. <https://doi.org/10.1007/s13280-014-0522-y>
- Svärdson, G. & Molin, G. (1968). *Fiskets effekt på gäddans storlek och numerär*. (Information från Sötvattenslaboratoriet, 5)
- Symonová, R., Ocalewicz, K., Kirtiklis, L., Delmastro, G.B., Pelikánová, Š., Garcia, S. & Kovařík, A. (2017). Higher-order organisation of extremely amplified, potentially functional and massively methylated 5S rDNA in European pikes (*Esox sp.*). *BMC Genomics*, 18 (1), 391. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3774-7>
- Tibblin, P., Bergström, K., Flink, H., Hall, M., Berggren, H., Nordahl, O. & Larsson, P. (2023). Higher abundance of adult pike in Baltic Sea coastal areas adjacent to restored wetlands compared to reference bays. *Hydrobiologia*, 850 (9), 2049–2060. <https://doi.org/10.1007/s10750-023-05216-4>
- Tibblin, P., Forsman, A., Koch-Schmidt, P., Nordahl, O., Johannessen, P., Nilsson, J. & Larsson, P. (2015). Evolutionary Divergence of Adult Body Size and Juvenile Growth in Sympatric Subpopulations of a Top Predator in Aquatic Ecosystems. *The American Naturalist*, 186 (1), 98–110. <https://doi.org/10.1086/681597>
- Tillotson, M.D., Kelly, R.P., Duda, J.J., Hoy, M., Kralj, J. & Quinn, T.P. (2018). Concentrations of environmental DNA (eDNA) reflect spawning salmon abundance at fine spatial and temporal scales. *Biological Conservation*, 220, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2018.01.030>
- Tsuji, S. & Shibata, N. (2021). Identifying spawning events in fish by observing a spike in environmental DNA concentration after spawning. *Environmental DNA*, 3 (1), 190–199. <https://doi.org/10.1002/edn3.153>
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M. & Rozen, S.G. (2012). Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Research*, 40 (15), e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>
- Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P.F., Bellemain, E., Besnard, A., Coissac, E., Boyer, F., Gaboriaud, C., Jean, P., Poulet, N., Roset, N., Copp, G.H., Geniez, P., Pont, D., Argillier, C., Baudoin, J.-M., Peroux, T., Crivelli, A.J., Olivier, A., Acqueberge, M., Le Brun, M., Møller, P.R., Willerslev, E. & Dejean, T. (2016). Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 25 (4), 929–942. <https://doi.org/10.1111/mec.13428>
- Värmdö kommun. 2014. Hemmesta sjöäng – rekreation för fågel, fisk och människa. Slutrapport 36 sid. Dnr 11SPN/0074.
- Walsh, P.S., Metzger, D.A. & Higuchi, R. (1991). Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques*, 10 (4), 506–513

- Wennerström, L., Olsson, J., Ryman, N. & Laikre, L. (2016). Temporally stable, weak genetic structuring in brackish water northern pike (*Esox lucius*) in the Baltic Sea indicates a contrasting divergence pattern relative to freshwater populations. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1–10. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2016-0039>
- Woods, H.A., Makino, W., Cotner, J.B., Hobbie, S.E., Harrison, J.F., Acharya, K. & Elser, J.J. (2003). Temperature and the Chemical Composition of Poikilothermic Organisms. *Functional Ecology*, 17 (2), 237–245
- Wu, L., Yamamoto, Y., Yamaguchi, S. & Minamoto, T. (2022). Spatiotemporal changes in environmental DNA concentrations caused by fish spawning activity. *Ecological Indicators*, 142, 109213. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2022.109213>
- Yates, M.C., Cristescu, M.E. & Derry, A.M. (2021a). Integrating physiology and environmental dynamics to operationalize environmental DNA (eDNA) as a means to monitor freshwater macro-organism abundance. *Molecular Ecology*, 30 (24), 6531–6550. <https://doi.org/10.1111/mec.16202>
- Yates, M.C., Glaser, D., Post, J., Cristescu, M.E., Fraser, D.J. & Derry, A.M. (2020). Allometric scaling strengthens the relationship between eDNA particle concentration and organism abundance in nature. *bioRxiv*, 2020.01.18.908251. <https://doi.org/10.1101/2020.01.18.908251>
- Yates, M.C., Glaser, D.M., Post, J.R., Cristescu, M.E., Fraser, D.J. & Derry, A.M. (2021b). The relationship between eDNA particle concentration and organism abundance in nature is strengthened by allometric scaling. *Molecular Ecology*, 30 (13), 3068–3082. <https://doi.org/10.1111/mec.15543>
- Yates, M.C., Wilcox, T., Stoeckle, M.Y. & Heath, D.D. (2022). *Interspecific allometric scaling in eDNA production in fishes reflects physiological and surface area allometry*. <https://doi.org/10.1101/2022.04.22.489177>
- Yates, M.C., Wilcox, T.M., McKelvey, K.S., Young, M.K., Schwartz, M.K. & Derry, A.M. (2021c). Allometric scaling of eDNA production in stream-dwelling brook trout (*Salvelinus fontinalis*) inferred from population size structure. *Environmental DNA*, 3 (3), 553–560. <https://doi.org/10.1002/edn3.150>
- Zhang, J., Ding, R., Wang, Y. & Wen, J. (2022). Experimental study on the response relationship between environmental DNA concentration and biomass of *Schizothorax prenanti* in still water. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fevo.2022.972680> [2023-11-01]

Bilaga

Kompletterande bilder



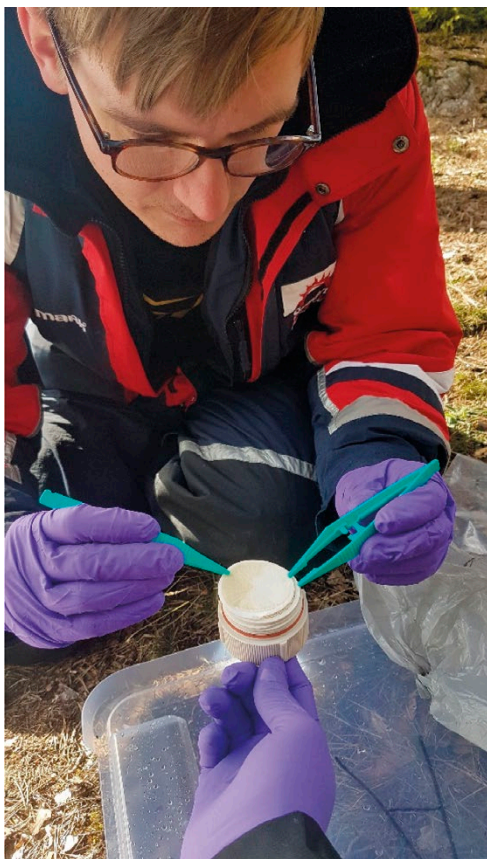
Figur B1. Insamling av unga gäddor för att testa eDNA-biomassaförhållanden i akvarium.



Figur B2. Insamlade unga gäddor för att testa eDNA-biomassaförhållanden i akvarium.



Figur B3. Insamling av replikatvattenprover från Östersjövikarna.



Figur B4. Insamling av eDNA-filter.



Figur B5. Gädda som användes i mesokosmosexperiment.



Figur B6. eDNA-provtagningskit bestående av filterhållare, filter och pincett.



Figur B7. Förberedelse av mesokosmosexperiment.



Figur B8. Filtring av eDNA under mesokosmexperiment.



Figur B9. Konstruktion av konstgjorda växter för vuxna gäddor under mesokosmexperiment.



Figur B10. Uppsättning av fiskräknare med konstruktionsram i våtmarken.



Figur B11. Kamera och sensorer i fiskräknaren.



Figur B12. Kollage av tidpunkter vid mynningen till våtmarken.



Figur B13. Mynningen till våtmarken två dagar efter det ovanligt stora regnet som orskade översvämning.

Rapporten uttrycker nödvändigtvis inte Naturvårdsverkets ställningstagande. Författaren svarar själv för innehållet och anges vid referens till rapporten.

Utveckling av eDNA som metod för övervakning av gädda

Vi vet idag för lite om hur mycket gäddor som finns. Flera studier visar på att antalet gäddor i Östersjön minskat drastiskt de senaste 30 åren, vilket förmodligen har flera orsaker. Men vi vet för lite om hur gäddbestånden mår och förändras. Därför behöver vi utveckla en bättre övervakningsmetodik.

Forskningsprojektet Utveckling av eDNA som metod för övervakning av gädda har utvecklat eDNA som övervakningsmetod, vilken visat sig ha hög precision vid jämförande studier. Men om eDNA ska etableras som övervakningsmetod för gädda så behöver delar av metodiken standardiseras i avseende på reproducerbarhet och kunskap om variation i tid och rum utökas.

Projektet har finansierats med medel från Naturvårdsverkets miljöforskningsanslag som finansierar forskning till stöd för Naturvårdsverkets och Havs- och vattenmyndighetens kunskapsbehov.