

Iceland
Liechtenstein
Norway grants



KESKKONNAINVESTEERINGUTE
KESKUS



KLIIMAMINISTEERIUM



Eesti Maaülikool
Estonian University of Life Sciences



Veterinærinstituttet
Norwegian Veterinary Institute

Euroopa Majanduspiirkonna Finantsmehhanismi 2014–2021 programmi
"Kliimamuutuste leevendamine ja nendega kohanemine" rahastatud
projekti „Invasiivsete võõrliikide tõrje Eesti magevetes“ lõpparuande osa

Keskkonna DNA (eDNA) meetodi kasutamine vähi võõrliikide
tuvastamisel

Aruande koostaja: Lilian Pukk

Uuringu läbiviijad: Lilian Pukk, Michael Oliewo Aluma,
Oksana Burimski, Katrin Kaldre, Margo Hurt

Tartu, 2024

SISUKORD

SISSEJUHATUS	3
1. MATERJAL JA METOODIKA	4
1.1. eDNA proovide kogumine	4
1.2. eDNA eraldamine ja kvantitatiivse polümeraasahelreaktsiooni (qPCR-i) analüüs	4
2. ANALÜÜSIDE TULEMUSED	5
KOKKUVÕTE	7
LISAD	8
KASUTATUD KIRJANDUS	10

SISSEJUHATUS

Eesti loodusele kujutavad järjest enam ohtu invasiivsed võõrliigid, mis on inimtegevuse tõttu nii tahtmatult kui tahtlikult jõudnud väljapoole oma algset leviala. Võõrliikide levik ohustab kohalikke ökosüsteeme, liike ja nende elupaiku. Üheks organismide grupiks, kes Eesti loodust ohustavad, on vähi võõrliigid (signaalvähk, ogapõskne vähk ja marmorvähk). Nende pidev levik ja arvukuse tõus on põhjustanud kohaliku jõevähi populatsioonide drastilise languse, kuna on ressursikonkurendiks ning kannavad edasi vähikatku (Aluma, Pukk, Hurt, & Kaldre, 2023; Grandjean et al., 2017). Seetõttu on vähi võõrliikide pidev seire ohustatud jõevähi populatsioonide kaitsmiseks ülioluline.

Siiani on enamus Euroopa riikides vähi võõrliikide seireks, leviku kontrolliks ja tõrjeks kasutatud mõrrapüüki (Green, Bentley, Stebbing, Andreou, & Britton, 2018; Hudina, Maguire, Dragičević, & Galic, 2022). Selleks aga, et vähi võõrliike saaks võimalikult varakult tuvastada (enne kui neil õnnestub veekogus stabiilne populatsioon luua), on vaja kasutusele võtta uuenduslikke seiremeetodeid.

Üheks selliseks meetodiks on keskkonna DNA (eDNA), mille käigus filtreeritakse, eraldatakse ja analüüsitakse vees olevat DNA-d (Agersnap et al., 2017; Chucholl, Fiolka, Segelbacher, & Epp, 2021; King, Krieg, Weston, & Zenker, 2022; Klymus, Marshall, & Stepien, 2017; Rusch et al., 2020). eDNA-d on edukalt kasutatud ka vähikatku patogeeni *Aphanomyces astaci* tuvastamiseks (Mirimin et al., 2022; D. A. Strand et al., 2019). Erinevad teadusuuringud on näidanud, et tegemist on usaldusväärse meetodiga vähi võõrliikide varajaseks tuvastamiseks (Johnsen, Strand, Rusch, & Vrålstad, 2020; Mauvisseau et al., 2018; D. A. Strand et al., 2019).

Käesoleva pilootuuringu käigus hinnati eDNA meetodi sobilikkust erinevates Eesti veekogudes vähi võõrliikide tuvastamiseks ja selle võimalikku integratsiooni iga-aastase seireprogrammi osana.

1. MATERJAL JA METOODIKA

1.1. eDNA proovide kogumine

Keskkonna DNA ehk eDNA proove õnnestus koguda 16-st veekogust üle Eesti. Need veekogud olid: Riksu oja, Koimla peakraav, Pärnu jõgi, Reiu jõgi, Pärnu Vallikraav, Ropka järv, Balti ja Eesti SEJ väljavoolukanalid, Reo karjäär I, Reo karjääri vastas oleva paisjärv (Reo karjäär II), Kuke oja, Väana jõgi, Mustjõgi, Loobu jõgi, Narva jõgi ja Urbukse järv. eDNA proovide filtreerimine viidi läbi 2022. ja 2023. aasta augustis ja septembris. 2022. aastal koguti 92 eDNA proovi (k.a. 9 negatiivset kontrolli) 13-st veekogust ning 2023. aastal koguti koos negatiivsete kontrollidega 64 proovi, võttes kordusproovid Riksu jõest, Reo karjäärist ja Mustjõgi jõest. 2023. aastal lisandus kolm uut veekogu – Loobu jõgi, Narva jõgi ja Urbukse järv.

eDNA proovide kogumisel lähtuti Strand et al., (2019) artiklis kasutatud meetodikast. Lühidalt, proovide võtmiseks heideti proovivõtu anum (Lisa 1) soovitud kohta veekogus, lastes sellel põhja vajuda ning oodati vähemalt 2 minutit, et üles kerkinud muda uuesti settiks. Proovivõtu anum oli ühendatud voolikuga peristaltilise pumba külge (Lisa 2). Seejärel loputati voolik ja filtrihoidik enne proovi võtmist veel veekogu veega läbi (pumbates läbi süsteemi 2 L vett; seda tehti selle pärast, et vältida peale seadmete desinfitseerimist valgendi jääkide sattumist proovi). Olenevalt veekogust, pumbati klaasfiiber filtrist läbi 2-5 L vett (sogases vees ummistus filter kiiremini; Lisa 3). Peale filtreerimist asetati filter steriilsete pintsettidega selleks ettenähtud 15 ml Falcon tuubidesse. Tuubid olid eelnevalt steriilsetes tingimustes (laboris) täidetud säilituspuhvriga ATL (Qiagen). Kontaminatsiooni vältimiseks ning kindlustamaks, et proovivõtu vahenditega vähikatku ei levitatakse, desinfitseeriti kõik seadmed iga päeva lõpus.

1.2. eDNA eraldamine ja kvantitatiivse polümeraasahelreaktsiooni (qPCR-i) analüüs

eDNA molekulaargeneetilised analüüsid viidi läbi EMÜ vesiviljeluse õppetooli kalageneetika laboris.

Klaasfiiber filtritest eraldati eDNA kasutades selleks Dneasy Blood and Tissue (Qiagen) eralduskitti koos NucleoSpin Filters Midi ja NucleoSpin Plant II Midi kittidega (Macherey-Nagel). Kõik eDNA proovid puhastati inhibeerivatest ainetest (mis võivad hiljem takistada qPCR-i reaktsiooni), kasutades selleks Zymo Research PCR inhibitor removal kitti ning pipeteeriti pikaajaliseks säilitamiseks mõeldud lo-bind 1.5ml tuubidesse (Eppendorf).

Seejärel viidi läbi liigispetsiifiline qPCR-i analüüs nelja erineva vähi liigi (jõevähk, signaalvähk, marmorvähk ja ogapõskne vähk) ja vähikatku markeritega. Kõik proovid analüüsiti kolmes tehnilises korduses. Jõevähi, signaalvähi, marmorvähi ja ogapõskse vähi analüüsiks kasutati Mauvisseau et al., (2018), Rusch et al., (2020) protokollid ning vähikatku analüüsiks kasutati Vrålstad et al., (2009) protokollid koos Strand et al., (2023) geneetiliste markeritega. Koostöös projektipartneri David Strandiga optimeeriti Mauvisseau et al., (2018) ogapõskse vähi markereid, muutes need liigispetsiifilisemaks.

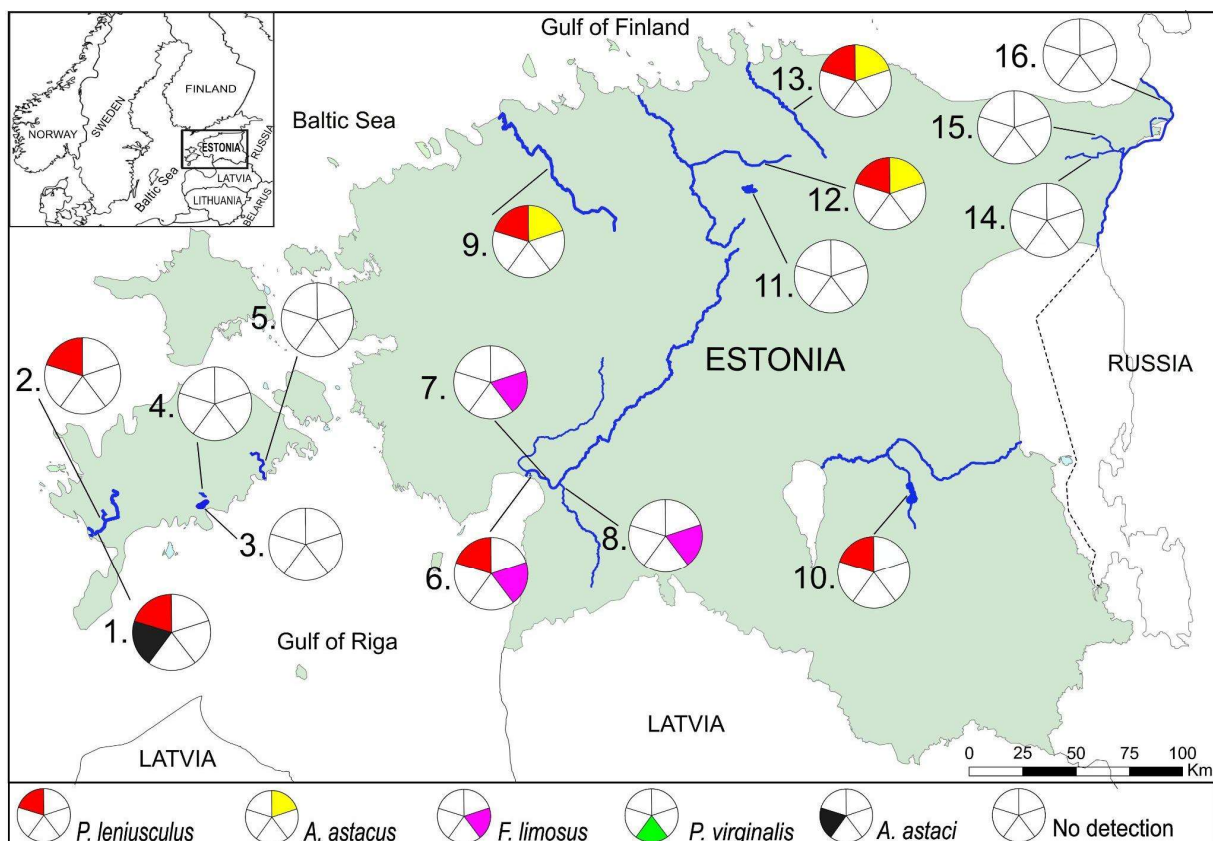
Selleks, et teada saada, kui tundlik qPCR-i meetod on, selgitati iga liigi puhul välja avastamis- ja kvantifitseerimise piirid (ing.k. *limit of detection* (LOD) ja *limit of quantification* (LOQ)). Seda tööd teostati Klymus et al., (2020) meetodika järgi. LOD-i defineeritakse kui madalaimat DNA kontsentratsiooni, kus 95% tehnilistest qPCR-i kordustest amplifitseeruvad. LOQ on aga madalaim DNA kontsentratsioon, kus variatsioonikoefitsient on alla 35% Klymus et al., (2020).

Kõiki proove analüüsiti kolmes qPCR-i korduses ning proov peeti positiivseks, kui vähemalt 2/3 kordustest olid positiivsed (qPCR-i tulemus pidi jääma üle LOD väärtuse). Samuti võrreldi eDNA qPCR-i tulemusi iga-aastaste mõrrapüügi andmetega.

2. ANALÜÜSIDE TULEMUSED

qPCR-i analüüs tuvastas jõevähi eDNA-d järgmistes veekogudes: Väana jõgi, Loobu jõgi, Kuke oja ja Mustjõgi (Joonis 1, Tabel 1). Kui Väana ja Loobu jõe eDNA tulemused langesid kokku eelnevalt läbiviidud mõrrapüügi andmetega, siis Kuke ja Mustjõgi tulemused jäid ebaselgeks. Signaalvähi eDNA-d tuvastati Riksu ojast, Koimla peakraavist, Pärnu Vallikraavist, Väana jõest, Mustjõgi jõest, Loobu jõest ja Ropka järvest, langedes kokku mõrrapüügi andmetega. Samas, vastupidiselt mõrrapüügi informatsioonile, Reo karjäärist ning Urbukse järvest seda liiki ei tuvastatud. Samuti langesid mõrrapüügi andmetega kokku ka ogapõskse vähi eDNA tulemused Pärnu jões, Pärnu Vallikraavis ja Reiu jões.

Väana, Loobu ja Mustjõgi jões elavad jõevähid koos signaalvähkidega, seda kinnitavad nii mõrrapüügi kui ka eDNA andmed (Joonis 1, Tabel 1). Selline kahe liigi koeksisteerimine saab võimalik olla siis, kui võõrvähid ei ole vähikatu kandjad ja kui nende arvukus on suhteliselt madal. Lisaks elavad kaks võõrvähi liiki, signaalvähk ja ogapõskne vähk, edukalt koos Pärnu Vallikraavis.



Joonis 1. Kaart eDNA qPCR-i analüüsi tulemustega. Sektordiagrammidega on välja toodud signaalvähi (punane), jõevähi (kollane), ogapõskse vähi (roosa), marmorvähi (roheline) ja vähikatu (must) tuvastamine antud veekogus. Tühi sektordiagramm tähendab, et ei tuvastatud ühtegi liiki. Numbrid tähistavad proovivõtu veekogu (täpsem info Tabel 1).

Tabel 1. Püügi saagikus (CPUE ehk tk/mõrraõõ kohta) uuritud veekogude lõikes

Nr	Veekogu	CPUE*			
		Signaalvähk	Jõevähk	Ogapõskne vähk	Marmorvähk
1	Riksu oja	2.2			
2	Koimla peakraav	0.7			
3	Reo karjäär I	0.2			
4	Reo karjäär II				
5	Kuke oja				
6	Pärnu Vallikraav	0.1		0.3	
7	Pärnu jõgi			1.7	
8	Reiu jõgi			0.3	
9	Vääna jõgi	1.4	2.2		
10	Ropka järv	0.1			
11	Urbukse järv	0.7			
12	Mustjõgi	0.1	0.1		
13	Loobu jõgi	0.3	1.2		
14	ESEJ väljavoolukanal				0.1
15	BSEJ väljavoolukanal				0.1
16	Narva jõgi			0.4	

* - CPUE info on võetud 30-ne päeva jooksul enne eDNA proovide kogumist või siis sama aasta kõige lähimal kuupäeval (CPUE < 1 = madal, CPUE 1-4 = keskmine ja CPUE > 4 = kõrge (Tulonen et al., 1998).
BSEJ – Balti Soojuselektrijaam, ESEJ – Eesti Soojuselektrijaam.

Marmorvähi eDNA tulemused ei näidanud liigi olemasolu BSEJ ja ESEJ väljavoolukanalites, kuigi mõrrapüükidega on see kinnitatud. Siinkohal on tähtis mainida, et osad proovid loeti negatiivseks selle tõttu, et nende tulemus jäi alla LOD-i väärtuse. Nõrga signaali põhjuseks võib olla asjaolu, et tegemist on võrdlemisi suurte veekogudega ning vähkide arvukus on eDNA meetodiga tuvastamiseks madal. Samuti sai kinnitust tõsiasi, et eDNA proovid on soovitatav koguda mõrrapüükidega samadest kohtadest, et suurendada liigi tuvastamise tõenäosust eDNA-ga. Järgmiste uuringute puhul võiks suurendada eDNA proovide ja proovivõtu punktide arvu veekogus ning veelgi suurendada marmorvähi geneetilise markeri tundlikkust.

Vähikatku eDNA-d tuvastati ainult Riksu ojas ning Urbukse järves ja Reo karjäär II ei tuvastatud eDNA meetodikaga ühtegi uuritud liiki.

KOKKUVÕTE

Esiialgsed pilootuuringu tulemused näitavad, et eDNA meetod on usaldusväärne vähkide esinemise tuvastamisel mõõduka populatsioonitihedusega veekogudes. Jõevähi DNA-d tuvastati neljas, signaalvähi DNA-d seitsmes, ogapõskse vähi DNA-d kolmes ning vähikatku DNA-d ühes veekogus. Samuti oli veeprooviga võimalik kindlaks teha need veekogud, kus esines kaks liiki koos (Vääna jõgi, Mustjõgi, Loobu jõgi ja Pärnu Vallikraav).

Selleks aga, et tõsta liikide tuvastamise tõenäosust ka väikeste populatsioonitihedustega veekogudes (nagu näiteks marmorvähkide puhul Narva jõe süsteemis), tuleb meetodit veel edasi arendada ja optimeerida, suurendades eDNA proovide ja proovivõtu punktide arvu veekogus ning töötades välja veelgi tundlikumad geneetilised markerid.

Lõpetuseks võib siiski öelda, et eDNA meetod on hea täiendus mõrrapüükide kasutamisele invasiivsete vähiliikide tuvastamiseks, seireks ja kontrolliks. Samuti on soovitatav eDNA meetodit kasutada juhtudel, kui seirata on vaja uusi veekogusid, kus töö- ja ajamahukas mõrrapüük ei ole õigustatud.

Aruandes kasutatud eDNA informatsiooni põhjal on koostamisel teadusartikkel (eeldatava pealkirjaga „*eDNA-based detection of invasive crayfish and crayfish plague in Estonia*“), mis on plaanis avaldada ajakirjas *Environmental DNA* (<https://onlinelibrary.wiley.com/journal/26374943>).

LISAD

Lisa 1. Proovivõtu anum.



Lisa 2. Peristaltiline pump.



Lisa 3. Klaasfiiber filter peale filtreerimist.



KASUTATUD KIRJANDUS

- Agersnap, S., Larsen, W. B., Knudsen, S. W., Strand, D., Thomsen, P. F., Hesselsoe, M., . . . Moller, P. R. (2017). Monitoring of noble, signal and narrow-clawed crayfish using environmental DNA from freshwater samples. *Plos One*, *12*(6). doi:10.1371/journal.pone.0179261
- Aluma, M. O., Pukk, L., Hurt, M., & Kaldre, K. (2023). Distribution of Non-Indigenous Crayfish Species in Estonia and Their Impacts on Noble Crayfish (*Astacus astacus* L.) Populations. *Diversity*, *15*(4), 474.
- Chucholl, F., Fiolka, F., Segelbacher, G., & Epp, L. S. (2021). eDNA Detection of Native and Invasive Crayfish Species Allows for Year-Round Monitoring and Large-Scale Screening of Lotic Systems. *Frontiers in Environmental Science*, *9*. doi:10.3389/fenvs.2021.639380
- Grandjean, F., Roques, J. A. C., Delaunay, C., Petrusek, A., Becking, T., & Collas, M. (2017). Status of *Pacifastacus leniusculus* and its role in recent crayfish plague outbreaks in France: improving distribution and crayfish plague infection patterns. *Aquatic Invasions*, *12*, 541-549.
- Green, N., Bentley, M., Stebbing, P., Andreou, D., & Britton, R. (2018). Trapping for invasive crayfish: comparisons of efficacy and selectivity of baited traps versus novel artificial refuge traps. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.*(419), 15.
- Hudina, S., Maguire, I., Dragičević, P., & Galic, N. (2022). Evaluating the Efficacy of Approaches to Control Invasive Populations: A Conceptual Model Development for the Signal Crayfish. *Ecologies*, *3*(2), 78-95.
- Johnsen, S. I., Strand, D. A., Rusch, J. C., & Vrålstad, T. (2020). Environmental DNA (eDNA) Monitoring of Noble Crayfish *Astacus astacus* in Lentic Environments Offers Reliable Presence-Absence Surveillance – But Fails to Predict Population Density. *Frontiers in Environmental Science*, *8*. doi:10.3389/fenvs.2020.612253
- King, A. C., Krieg, R., Weston, A., & Zenker, A. K. (2022). Using eDNA to simultaneously detect the distribution of native and invasive crayfish within an entire country. *Journal of Environmental Management*, *302*, 113929.
- Klymus, K. E., Marshall, N. T., & Stepien, C. A. (2017). Environmental DNA (eDNA) metabarcoding assays to detect invasive invertebrate species in the Great Lakes. *Plos One*, *12*(5). doi:10.1371/journal.pone.0177643
- Klymus, K. E., Merkes, C. M., Allison, M. J., Goldberg, C. S., Helbing, C. C., Hunter, M. E., . . . Richter, C. A. (2020). Reporting the limits of detection and quantification for environmental DNA assays. *Environmental DNA*, *2*(3), 271-282.
- Mauvisseau, Q., Coignet, A., Delaunay, C., Pinet, F., Bouchon, D., & Souty-Grosset, C. (2018). Environmental DNA as an efficient tool for detecting invasive crayfishes in freshwater ponds. *Hydrobiologia*, *805*(1), 163-175. doi:10.1007/s10750-017-3288-y
- Mirimin, L., Brady, D., Gammell, M., Lally, H., Minto, C., Graham, C. T., . . . Nelson, B. (2022). Investigation of the first recent crayfish plague outbreak in Ireland and its subsequent spread in the Bruskey River and surrounding areas. *Knowl. Manag. Aquat. Ecosyst.*(423), 13.
- Rusch, J. C., Mojžišová, M., Strand, D. A., Svobodová, J., Vrålstad, T., & Petrusek, A. (2020). Simultaneous detection of native and invasive crayfish and *Aphanomyces astaci* from environmental DNA samples in a wide range of habitats in Central Europe. *NeoBiota*, *58*, 1-32.
- Strand, D. A., Jinnerot, T., Aspán, A., Viljamaa-Dirks, S., Heinikainen, S., Rolén, E., & Vrålstad, T. (2023). Molecular detection of *Aphanomyces astaci* – An improved species specific qPCR assay. *201*, 108008.
- Strand, D. A., Johnsen, S. I., Rusch, J. C., Agersnap, S., Larsen, W. B., Knudsen, S. W., . . . Vralstad, T. (2019). Monitoring a Norwegian freshwater crayfish tragedy: eDNA snapshots of invasion, infection and extinction. *Journal of Applied Ecology*, *56*(7), 1661-1673. doi:10.1111/1365-2664.13404
- Tulonen, J., Erkamo, E., Järvenpää, T., Westman, K., Savolainen, R., & Mannonen, A. (1998). *Rapuvedet Tuottaviksi*. Riistan- ja kalantutkimuslaitos: Helsinki, Finland, 152 pp.

Vralstad, T., Knutsen, A. K., Tengs, T., & Holst-Jensen, A. (2009). A quantitative TaqMan (R) MGB real-time polymerase chain reaction based assay for detection of the causative agent of crayfish plague *Aphanomyces astaci*. *Veterinary Microbiology*, 137(1-2), 146-155.
doi:10.1016/j.vetmic.2008.12.022