

## eDNA meetodi väljaarendamine (krüptiliste) võõrliikide varajaseks tuvastamiseks

(Deliverable 2.4.1. Applicability of eDNA based methodology for early detection of alien (cryptic) species)

Teostatud projekti "Eesti mereala keskkonna ja loodusväärtuste hindamise ja seire innovaatilised lahendused" raames

30.06.2021

Kogu projekti vastutav täitja: Georg Martin

Alateema vastutav täitja: Anti Vasemägi

Leping: RITA1/02-60-05

Aruande koostajad: Kristel Panksep, Veljo Kisand, Anti Vasemägi

Tartu 2021



## Sisukord

Sisukord	3
Executive Summary	4
1. Sissejuhatus	4
1.1 Keskkonna DNA	4
1.2 eDNA meetodika põhietapid veekeskkonnas	5
1.3 eDNA meetodika tugevused ja puudused	10
2. Materjal ja meetodika	12
2.1. Uuringualad ja eDNA proovide kogumine	12
2.2. eDNA eraldamine	14
2.3. Liigispetsiifiline võõrliikide määramine kvatitatiivse PCR (qPCR) meetodiga	14
2.3.1 Meetodika väljatöötamiseks valitud võõrliigid	14
2.3.2 Liigispetsiifiliste praimerite ja märgisega sondide disainimine	15
2.3.3 qPCR	16
2.4 Metatriipkoodistamine	17
2.5 Andmete analüüsimine	18
2.5.1 qPCR	18
2.5.2 Metatriipkoodistamine	18
3. Tulemused ja arutelu	19
3.1. Võõrliikide eDNA olemasolu ja hulga määramine qPCR meetodika abil, eDNA eraldamise meetodite võrdlus	19
3.2. Loomade (Metazoa) metatriipkoodistamise - mass-sekveneerimise tulemused	25
3.3. Kontrollproovide tulemused	27
4. Kokkuvõte	29
5. Soovitused seireprogrammi täiendamiseks	31
Kasutatud allikad	31
Lisad	34

## Executive Summary

This study aimed to develop eDNA-based methods for the early detection of alien species relevant to the Baltic Sea.

Traditional methods for invasive species monitoring have been mainly based on morphology, which is a time-consuming and skill-dependent approach. In recent years, environmental DNA (eDNA) based methods are rapidly emerging as an important tool for the early detection of invasive alien species in aquatic environments. In the frame of this study, we developed eDNA-based methods for the early detection of alien species in the Baltic Sea. We tested different types of enclosed filters and eDNA extraction methods to find the most suitable methodology for the Baltic Sea. A species-specific quantitative PCR and community-based NGS approach was used to identify alien species. qPCR methodology was optimized for five species (*Dreissena polymorpha*, *Neogobius melanostomus*, *Cercopagis pengoi*, *Rangia cuneata*, *Marenzelleria neglecta*). Community-based NGS analysis of the samples revealed 147 different animal genera, including 12 alien species in the studied area. In near future, developed methods can be integrated into the national environmental monitoring programs.

### 1. Sissejuhatus

Läänemere seire üldine eesmärk on hinnata looduslike ja inimtekkeliste survetegurite mõju ja ulatust Läänemere keskkonnale ja elustikule. Mereseire allprogrammi rannikumere seire osana teostatakse ka võõrliikide seiret, mille eesmärgiks on hinnata võõrliikide arvukust ning levikut ning nende mõju Läänemere ökosüsteemile. Samuti on eesmärgiks uute võimalike võõrliikide varajane tuvastamine (<https://www.keskkonnaagentuur.ee/et/seire>). Traditsiooniliselt põhineb võõrliikide seire isendite püügil ja vaatlusel, mille käigus morfoloogiliste tunnuste alusel määratakse proovidest liigiline koosseis, arvukus ja biomass. Töö on mahukas ja aeganõudev ning liikide täpne määramine nõuab kogemustega eksperdi oskusi. Seetõttu suudetakse traditsiooniliste seiremeetoditega vajaliku sageduse ja tihedusega katta vaid väikest osa Eesti rannikumerest. Järjest enam on hakatud traditsiooniliste seiremetoodikate kõrval välja arendama ja kasutusele võtma innovaatilisi meetodeid võõrliikide varajaseks tuvastamiseks keskkonnas. DNA-põhised meetodid liikide tuvastamiseks ja identifitseerimiseks on oluliselt suurendanud teadlaste võimekust aja- ja kulutõhusalt hinnata maismaa-, magevee- ja mereökosüsteemide bioloogilist mitmekesisust (Bruce et al., submitted). Meetodite standardiseerimiseks on rahvusvahelisel tasemel tehtud suuri pingutusi, mis võimaldavad juba praegu DNA põhiseid meetodeid integreerida tavapärasesse monitooringuprogrammidesse, sealhulgas ka võõrliikide ja ohustatud liikide seiresse (Hänfling et al., 2016) Bruce et al., submitted). Näiteks on Euroopa teaduse ja tehnoloogia valdkonna koostöö programmi COST Action DNAqua-net konsortsiumi liikmete poolt väljatöötamisel DNA põhise monitooringu standardid bioloogilistele kvaliteedielementidele liitmaks need EL Veepoliitika ja EL Merestrategie raamdirektiivi (2000/60/EÜ ja 2008/56/EÜ).

#### 1.1 Keskkonna DNA

Kulutõhusa meetodina kasutatakse bioloogilise mitmekesisuse uurimiseks ning liikide tuvastamiseks keskkonna DNA ehk eDNA triipkoodistamist ja metatriipkoodistamist (Ficetola et al., 2008). eDNAks

nimetatakse DNAd, mille organismid enda elutegevuse käigus elukeskkonda maha jätavad (joonis 1). See DNA võib pärineda süljest, sugurakkudest, väljaheidetest, naharakkudest, karvadest, sulgedest või organismi ümbritsevast kaitsvast limast. eDNA proove saab koguda mitmesugustest keskkondadest, nagu näiteks vesi, jää, pinnas, sete, tolm või õhk ((Biggs et al., 2015) Bruce et al., submitted). Triipkoodideks nimetatakse liikide määramiseks kasutatavaid kindlaid DNA järjestusi (Hebert et al., 2003). Triipkoodistamine on liigispetsiifiline ja selle abil tuvastatakse kindla liigi esinemine. Metatriipkoodistamine on aga koosluse põhine lähenemine ja selle käigus tuvastatakse üheaegselt mitme liigi esinemine keskkonnas. Saadud DNA järjestusi võrreldakse olemasolevate referentsandmebaasidega (Barcode of Life: BOLD <http://www.boldsystems.org>) ja selle põhjal antakse järjestustele nimi ja kuuluvus.



**Joonis 1.** eDNA veekeskkonnas. Joonis K.Panksep, joonise koostamiseks on kasutatud BioRender programmi.

## 1.2 eDNA meetodika põhietapid veekeskkonnas

Keskkonna DNA meetodika vees elavate liikide tuvastamiseks vkoosneb peamiselt viiest põhietapist. Nendeks on veeproovide kogumine, proovide filtreerimine, DNA eraldamine, DNA analüüsimine PCR ja qPCR (joonis 2) ja/või uue põlvkonna sekveneerimise meetodil ning andmete analüüsimine (joonis 3).

- **Veeproovide kogumine**

Et uuringutulemused oleksid usaldusväärsed ja saadud andmed sobilikud vastavalt püstitatud eesmärkidele, on iga ökoloogilise uuringu puhul välitööplaanide ja proovivõtumetodika paikapanemine võtmetähtsusega etapp (Hering et al., 2018). Proovivõtustrateegiat valides tuleb

lähtuda uuritava liigi ja tema elukeskkonna eripäradest. Näiteks ei pruugi seisuveekogus katsetatud meetodika olla sobilik vooluveekogu või merekeskkonna uurimiseks ja vastupidi (Bruce et al., submitted). Üks olulisemaid aspekte, mida proovivõtul arvestada, on eDNA ruumiline paiknemine uuritavas keskkonnas, arvestada tuleb sellega, kui kaugele ja kuidas eDNA oma nõ vabanemiskohast liikuda võib (eriti oluline on see vooluveekogude puhul) ning kuidas vesi veesambas segunenud on (Deiner et al., 2018, 2015; Deiner and Altermatt, 2014; Hänfling et al., 2016). Sõltuvalt veekogust ja uuritavatest organismidest kogutakse proovid kas pinnaveest, sügavamalt põhjakihtidest või integreerituna kogu veesambast. Seisuveekogudes jaguneb eDNA ebaühtlaselt ja seetõttu tuleb alamproove koguda mitmest punktist, et suurendada erinevate liikide tuvastamise tõenäosust (Brys et al., 2020b, 2020a). Vooluveekogudes on eDNA küll ühtlasemalt jaotunud, aga tuleb arvestada, et vool kannab endaga edasi ka eDNA ja seega on raske hinnata kust piirkonnast see täpselt pärineb. Kuna eDNA jaotumise ja edasikandumise kohta merevees on veel vähe teada, siis käesolevaks hetkeks veel kindlaid soovituslikke proovivõtustrateegiaid veel välja töötatud ei ole. Küll aga on leitud, et alamproove võiks koguda erinevatest erinevatest proovipunktidest ja proovipunktide vesi koguda kogu veesamba ulatuses (Bruce et al., submitted).

eDNA püsivust veekogus mõjutavad veekogu suurus, sügavus, avatus päikesele, kihistumine, veetemperatuur, aastaaeg ja vee-keemia (Bruce et al., submitted). Pärast vabanemist keskkonda, püsib DNA mõnda aega veesambas ja hakkab seejärel erinevate biotiliste ja abiotiliste mõjurite (UV kiirgus, soolus, pH, temperatuur, erinevad mikroorganismid, endonukleasid) tõttu lagunema (Harrison et al., 2019). Mesokosmikates on leitud, et eDNA on proovides tuvastatav mõnest nädalast (Thomsen et al., 2012) kuni 30 päevani (Dejean et al., 2011) peale organismi eemaldamist mesokosmist. Looduslikes keskkondades on lagunemine oluliselt kiirem ja eDNA tuvastatav lühiajalisemalt, enamus uuringutes kuni nädal (Barnes et al., 2014; Piaggio et al., 2014; Saito and Doi, 2021). Kuna eDNA kaob ja laguneb looduslikes keskkondades võrdlemisi kiiresti, kinnitab uuritava DNA tuvastamine proovis isendite hiljutist viibimist keskkonnas.

Kuna eDNA meetodika on väga tundlik, tuleb erilist tähelepanu osutada proovide võimaliku saastusohu vältimisele. Selleks kasutatakse proovivõtuvahendeid kas ühekordselt või neid steriliseeritakse/puhastatakse. Üldiselt suuremad proovivõtu vahendid nagu näiteks veeproovide kogumisanumad ja batomeeter dekontamineeritakse, kasutades selleks tugevalt leeliselise valgendi (Bleach) või Virkon® S lahust. Väiksemad proovivõtuvahendid (süstlad, korgid, filtrid) on tavaliselt ühekordselt kasutatavad. Proovide kogumisel tuleb kasutada ühekordseid kummikindaid. Proovivõtumetoodika valideerimiseks on soovitatav kasutada negatiivseid kontrollproove kõikides töötappides.

- **Geneetilise materjali isoleerimine ja säilitamine**

DNA isoleerimiseks veeproovidest kasutatakse peamiselt kahte erinevat lähenemisviisi. Varasemates uuringutes (Ficetola et al., 2008; Herder et al., 2014) kasutati DNA sadestamist etanooli ja naatriumatsetaadiga. Praeguseks on erinevad keskkonnaDNAGA tegelevad töörühmad jõudnud konsensusele, et veeproovide filtreerimine DNA isoleerimiseks efektiivsem, kuna proovimahud on suuremad ja seetõttu liikide tuvastamise tõenäosus suurem (Bruce et al., submitted). Uuringud on näidanud, et ka samade proovimahtude juures annab filtreerimine paremaid tulemusi kui sadestamine (Spens et al., 2017). Kuna sadestamiseks vajalik etanooli hulk on võrdlemisi suur aga paljudes riikides on etanooli kättesaadavus ja rahvusvaheline transport raskendatud (kõrgelt maksustatud, liigitatud ohtlike ainete hulka, lennutransport eridokumnetatsiooniga), siis on filtreerimine nii proovide transpordi, käitlemise ja rahvusvahelise koostöö mõttes lihtsam alternatiiv.

Proovide filtreerimiseks kasutatakse erinevast materjalist ja erineva poori suurusega filtreid ning ühtset, kõikidesse keskkondadesse sobivat filtrit välja pakkuda pole ilmselt võimalik. Kõige laialdasemalt on materjalidena kasutusel klaaskiud (GF), tselluloosnitraat (CN), polüetersulfaan (PES), polükarbonaat (PCTE), polüvinülideendifluoriid (PVDF) filtrid ning nende erinevad kombinatsioonid (Bruce et al., submitted). Lisaks filtri materjalile ja poori suurusele tuleb langetada otsus ka filtritüübi osas. Hetkel on võimalus valida kolme erineva lähenemise vahel. Nendeks on avatud filtrid - filtreerimiseks kasutatakse pumpa ja korduvkasutatavaid filtrihoidjaid. Kuna filter on tööprotsessi käigus õhule avatud seda käsitletakse avatult korduvalt, on seda tüüpi filtrite kasutamisel proovide saastusohu risk suurim. Teise valikuna saab kasutada poolsuletud filtreid, kus filter ise on kaitstud filtrihoidja vahel ja avatakse vaid filtri asetamiseks säilitusnõusse. Saastusohu on madalam kui filtrid avada alles laboris puhastes ja kontrollitud laboritingimustes. Kolmandana valikuna saab kasutada suletud filtersüsteeme, kus filter ei puutu välisõhuga kokku üheski tööetapis. Esimese kahe filtritüübi eeliseks on see, et lisaks kommertslikult kättesaadavatele filtersüsteemidele on võimalik neid ka ise kokku konstrueerida, mis teeb nende kasutamise odavamaks (samas ettevalmistamise ajakulukamaks ja saastusohu suuremaks). Kolmandat tüüpi, ehk suletud filtreid, on võimalik soetada hetkel vaid mõnelt tootjalt (NatureMetrics, Spygen, Millipore). Seda tüüpi filtrid on kõige kallimad, kuid ajakulu eeltöödele ning käsitlemisest tulenev saastusohu on eeldatavalt minimaalne.

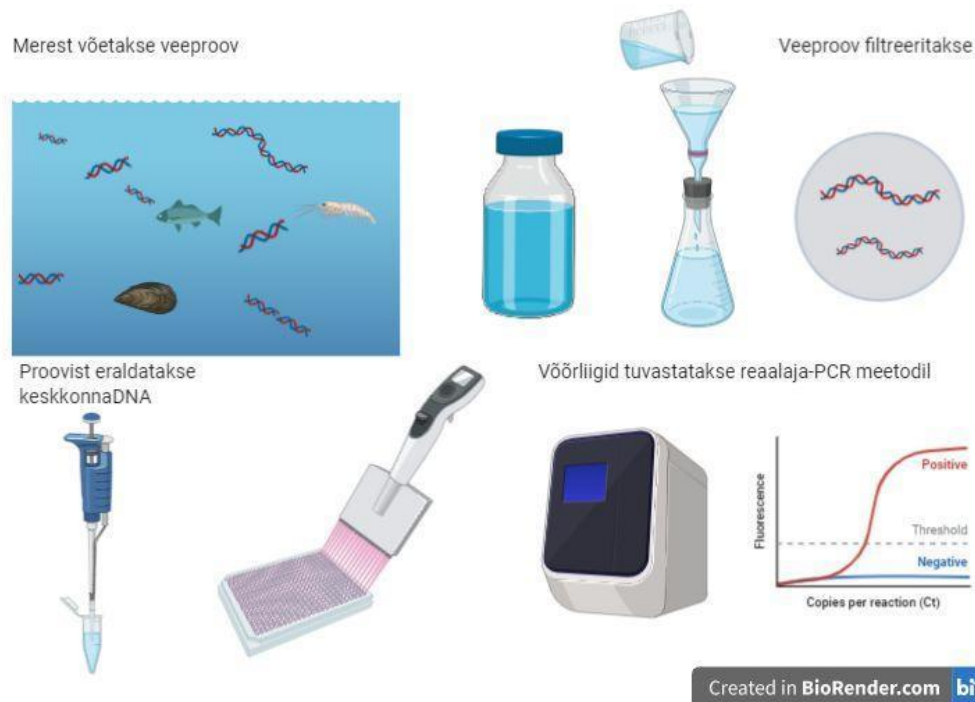
DNA proovide analüüsieelseks säilitamiseks on erinevaid võimalusi (Bruce et al., submitted). Kasutatakse proovide külmutamist, kuivatamist või erinevaid säilituslahuseid (etanol, Longmires' puhver, RNA Later lahus, DESS puhver). Otsus, millist meetodit kasutada, tuleb langetada lähtuvalt enda võimalustest ja vahendite kättesaadavusest. Kui proovid filtreeritakse laboris ja sügavkülmikud on koheselt kättesaadavad, on külmutamine lihtne ja odav lahendus proovide säilitamiseks. Kui aga välitööd kestavad kaua ja proovid filtreeritakse laborist eemal, on otstarbekas kasutada säilituspuhvrit, mis ei eelda külmaahela olemasolu.

- **DNA eraldamine**

Labor, kus toimub keskkonnaDNA proovide eraldamine, peaks saastusohu vältimiseks olema füüsiliselt eraldatud laborist, kus tegeletakse sama liikide koeproovidega, DNAGA, DNA amplifitseerimise ning amplifitseerimisjärgsete protsessidega. Laboris peab olema tagatud pidev õhuvahetus ja õhuringlus koos UV töötusega. DNA eraldamiseks kasutatakse peamiselt enamasti kommertslikult kättesaadavaid eralduskittide ning järgitakse nende etteantud protokolle. Iga eralduskorraga tuleb teha ka negatiivseid eralduskontrolle mis ei sisalda uuritavat DNA-d, et kontrollida eraldusetapi puhtust.

- **Liigispetsiifiline või kooslusepõhine proovide analüüsimine**

Peale DNA eraldamist analüüsitakse proove kas liigipõhiselt, kasutades selleks kindlale liigile disainitud praimerjärjestusi ning polümeraasi ahelreaktsiooni (PCR/qPCR) meetodikat (joonis 2) või analüüsitakse proove kooslusepõhiselt kasutades selleks uue põlvkonna sekveneerimistehnoloogiaid (joonis 3). Mõlema analüüsimeetodiga lisatakse proovide hulka negatiivsed kontrollproovid, et kontrollida analüüsietapi ja kasutatavate reagentide puhtust.

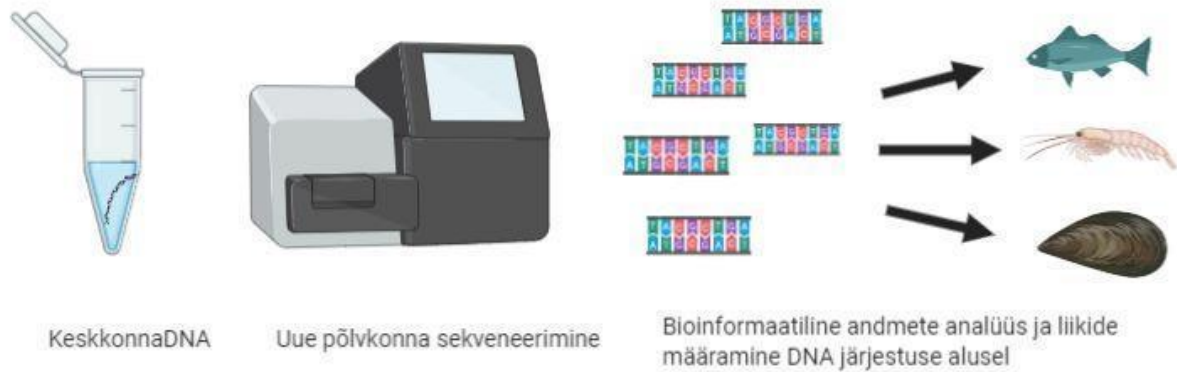


**Joonis 2.** Liigispetsiifilise eDNA analüüsimise etapid. Joonis K.Panksep, joonise koostamiseks on kasutatud BioRender programmi.

Liigispetsiifiliseks võõrliikide tuvastamiseks qPCR meetodiga kasutatakse fluorestreeruvalt märgistatud oligonukleotiidide ehk sonde ning vastavaid praimereid. Taksonispetsiifiliste praimerite disainimise esimeseks etapiks on liigile omase spetsiifiline DNA järjestuse ehk markergeeni valik. Metatriipkoodistamisel kasutatakse erinevate organismirühmade puhul erinevaid geene (Bruce et al., submitted). Loomade puhul kasutatakse liikide eristamiseks kõige enam tsütokroom C oksüdaasi (COI) geeni fragmenti, kuna see piirkond on võrdlemisi varieeruv ja seetõttu sobilik erinevate liikide eristamiseks ning sellele vastav avalikult kättesaadav standardiseeritud DNA triipkoodide referentsandmebaas (Barcode of Life - BOLD) on käesoleval hetkel kõige täiuslikum (Hering et al., 2018). Liikide eristamiseks ja määramiseks kasutatakse taimede ja seente puhul peamiselt tuuma ribosomaalse tsistroni (ITS), ränivetikatel *rbcl* (RuBiSCO suurt subühikut kodeeriva geeni), kaladel ja kahepaiksetel 12S ja COI ja eukarüootidel laiemalt 18S DNA piirkonda (Bruce et al., submitted). Organismirühmale universaalsete praimerite valikul on olulisemaks kriteeriumiks kõrgekvaliteedilise ja kontrollitud referentsandmebaasi olemasolu.

qPCR reaktsiooni ajal seonduvad praimerid ja fluorestseeruv sond hübridiseerub üheaheelise DNA külge, DNA sünteesi käigus sond laguneb, fluorestseeruv märkis eraldub ning loob fluorestentsignaali. Iga amplifikatsioonietapi käigus fluorestsentsignaali intensiivsus kasvab ja seda signaali detekteeritakse ja mõõdetakse qPCR masina vastavate optiliste kanalite abil. Iga PCR tsükliga fluorestsentsi intensiivsus kasvab proportsionaalselt sünteesitud DNA kogusega. Saadud tulemusi analüüsitakse võrdleva standardkõvera meetodi abil. Standardkõver väljendab DNA koguse ja  $C_p$  (cross-point tsükkel) vahelist seost.





Created in [BioRender.com](https://BioRender.com) 

**Joonis 3.** Kooslusepõhine eDNA analüüsimine. Joonis K.Panksep, joonise koostamiseks on kasutatud BioRender programmi.

- **Andmete analüüsimine**

qPCR tulemused väljendatakse proovis leiduva DNA kogusena, mida saab teisendada analüüsitava geeni koopiaarvuks juhul, kui on teada DNA koguse ja geenide hulga suhe ning uuritava geeni korduste arv raku kohta. Kui seda infot teada ei ole, saab arvutamiseks kasutada kaudset seost genoomse DNA kontsentratsiooni ja vastava qPCR Cp (crossing point cycle) väärtuse vahel. Koguse hindamisel kasutatakse peamiselt standardkõvera meetodit. Kindla kontsentratsiooniga genoomse DNA lahusest tehakse kaliiberlahendus ja sellest omakorda lahjendusterea abil standardkõver. Uuritavate proovide Cp väärtused teisendatakse standardkõvera põhimõttel DNA kontsentratsiooniks.

Metagenoomsel triipkoodistamise puhul saadakse sekveneerimiselt DNA sadades tuhandetes fragmentide lugemeid/järjestusi, mida esimeses etapis töödeldakse bioinformaatsiliselt, et leida unikaalsed proovides leiduvatele liikidele taksonitele vastavad järjestused ning nende järjestuste hulk.

### 1.3 eDNA metoodika tugevused ja puudused

Keskkonna DNA põhiste meetodite tugevused:

- **Mitteinvasiivne meetod** – analüüsimiseks kasutatakse vaid veeproovi ja seega häiritakse loomulikku elukeskkonda võimalikult vähesel määral. See on eriti oluline vähearvukate, varjatud eluviisiga ja haruldaste liikide seirel.
- **Kulu- ja ajatõhusus** – välitöödeks kuluv aeg on reeglina lühem ja seetõttu saab katta monitooringuga laiemaid alasid ja proove koguda suurema tihedusega. Samuti on uue põlvkonna sekveneerimistehnoloogiate abil võimalik üheaegselt analüüsida mitmeid proove korraga, mis vähendab ka laboritöödele kuluvat aega. Mass-sekveneerimine muutub ajas järjest odavamaks ja seega ka kättesaadavamaks laiemale kasutajaskonnale.
- **Meetodi tundlikkus** – kvantitatiivse polümeraasi ahelreaktsiooni (qPCR) meetodiga on võimalik tuvastada organismide DNA-d väga madalate kontsentratsioonide juures. See on väga oluline võõrliikide varajaseks tuvastamiseks ning suurendab vähearvukate ja raskesti kättesaadavate liikide tabamise tõenäosust.
- **Universaalsus** - samadest veeproovidest on võimalik eristada nii üksikuid huvipakkuvaid liike kui ka analüüsida kogu kooslust ning keskkonna elurikkust.
- **Andmete võrreldavus** - tulemused ei sõltu eksperdi kogemustest ja liigitundmise oskustest.
- Paljud senised uuringud näitavad tugevat seost eDNA hulga ja isendite biomassi ja arvukuse vahel. Samuti on võimalik hinnata liikide suhtelist arvukust proovides

Keskkonna DNA põhiste meetodite puudused:

- **Vajadus kõrge kvaliteediga ja kontrollitud võrdlusandmebaaside järele** – selleks, et DNA järjestuste abil liike määrata, on vajalikud võrdlevad DNA andmebaasid, kus on korrektselt nimetatud liigid koos nende kindlaksmääratud DNA järjestustega. Avalikes andmebaasides võib esineda mittekorrektseid määranguid ja võib olla puudulik liigiline katvus. Samas **selliseid andmebaase täiendatakse ja uuendatakse pidevalt ja järjestusi ning määranguid kontrollitakse oma ala ekspertide poolt**. Seega on juba praeguseks viidud valede määrangute tõenäosus miinimumini.
- **Kontaminatsioonioht** – töö erinevates etappides on võimalik proove tahtmatult saastada. Selle kontrollimiseks lisatakse negatiivseid kontrollproove igas tööetapis.
- Metoodika uudsuse tõttu võib lähtuvalt uuringuvaldkonna spetsiifikast olla vajalik täpse metoodika kohandamine ja väljatöötamine keskkonda sobivaks.
- Negatiivne proov ei kinnita, et huvipakkuvat liiki keskkonnas ei ole (sama kehtib kõigi seiremetoodikate puhul)
- eDNA abil ei ole võimalik eristada surnud ja elus isendeid.
- Võimalik inhibitsioonioht - looduslikes keskkondades võib esineda erinevaid reaktsiooni-inhibiitoreid, mis võivad mõjutada analüüsimise erinevaid etappe. Soovituslik on inhibitsiooni vähendamiseks eDNA proove analüüsimist vastavate puhastuskittidega töödelda.
- eDNA abil ei saa otseselt määrata isendi vanust, pikkust ega kaalu (võib olla oluline näiteks kalavarude seirel)

### Töö eesmärk ja uurimisrühm

Käesoleva töö peamiseks eesmärgiks oli keskkonna DNA ehk eDNA põhise meetodi väljatöötamine (krüptiliste) võõrliikide varajaseks tuvastamiseks Läänemeres.

Töö teostasid Kristel Panksep (Eesti Maaülikool/Tartu Ülikool), Veljo Kisand (Eesti Maaülikool/Tartu Ülikool) ja Anti Vasemägi (Eesti Maaülikool/Rootsi Põllumajandusteaduste Ülikool).

**Uuringu tellis ja uuringut rahastab Eesti Teadusagentuur Euroopa Regionaalarengu Fondist toetatava programmi „Valdkondliku teadus- ja arendustegevuse tugevdamine“ (RITA) tegevuse 1 „Strateegilise TA tegevuse toetamine“ kaudu. Uuring valmis Keskkonnaministeriumi eesmärkide elluviimiseks.**

## 2. Materjal ja meetodika

### 2.1. Uuringualad ja eDNA proovide kogumine

KeskkonnaDNA põhise seiremetoodika väljatöötamiseks (tegevus 2.4.1) valiti uuringualaks Muuga sadam, kui suure invasiooniriskiga piirkond ning referentsalaks Lohusalu sadam. Eeltööd välitöömetoodika katsetamiseks toimusid Merivälja ja Muuga-Randvere katsealal juunis 2019 (Tabel 1). Välitööd keskkonna DNA proovide kogumiseks toimusid kokku kuuel korral aastatel 2019 ja 2020. Muuga sadama akvatooriumil koguti veeproove kolmest eri piirkonnast (väikelaevakai, viljakai, konteinerikai, joonis 4).

**Tabel 1.** Tegevuse 2.4.1 uuringualad

	Jaam	Uuringuala	Pikkus E	Laius N
1	Lohusalu	Referentsala	24.206574	59.402678
2	Konteinerikai	Muuga, Uuringuala	24.96526	59.49006
3	Viljakai	Muuga, Uuringuala	24.9575	59.494
4	Väikelaevade kai	Muuga, Uuringuala	24.9383	59.4979
5	Merivälja	Esmane katseala	24.827574	59.491238
6	Muuga-Randvere	Esmane katseala	24.918449	59.499464



**Joonis 4.** Tegevus 2.4.1 uuringualad

Veeproovid koguti van Dorni batomeetriga integraalselt erinevatest sügavustest kogu veesamba ulatuses. Eesmärgiga suurendada võõrliikide detekteerimise tõenäosust sadamaalal üldiselt, segati erinevate kaide juurest kogutud veeproovid kokku ühtseks põhiprooviks. Lohusalu sadamas koguti veeproovid jahtide ja kaatrite kai (Kai 1) kõige avaveepoolsemast osast. Muuga sadamas teostati välitoid paralleelselt TÜ mereinstituudi võõrliikide seirega.

Võõrliikide varajaseks tuvastamiseks sobivaima filtritüübi leidmiseks testiti kolme erinevat filtrit (joonis 5). Kaks filtritüüpi on kommertslikult kättesaadavad valmislahendused (Sterivex ja NatureMetrics) ja üks isekombineeritud filter (ülemine - Whatman™ Binder-Free Glass Microfiber Grade GF/A, 47 mm + alumine Sartorius Cellulose nitrate, white membrane, black - grid, 47 mm). Filtrite materjal ja poorisuurused on toodud tabelis 2. Kogutud vesi filtreeriti paralleelselt kõikidele filtritüüpidele kolmes korduses, sõltuvalt filtritüübist, et vältida filtri ummistumist, oli filtreeritava proovi kogus kas 600 või 1200 ml (tabel 2). Kokku koguti välitööde käigus 128 eDNA proovi ja 12 negatiivset kontrollproovi. Negatiivse kontrollproovina kasutati pudeldatud Saaremaa joogivett, mis avati esmakordselt vahetult enne filtreerimist. Proovide säilitamiseks kasutati Longmire puhverlahust (0.1 M Tris-HCL at pH 8.0, 0.1 M EDTA, 0.1 M NaCl, 0.5% w/v SDS)( Longmire et al., 1997)

**Tabel 2.** Töös kasutatud filtritüübid

Filter	Sterivex	NatureMetricx	isekombineeritud
Lühendnimi	SX-capsule	NM-capsule	CN-CN; CN-GF
Materjal	PES	GF + PES	GF + CN
Poori suurus µm	0.22	5 + 0.8	5 + 1.2
Filtri hind	15 EUR	12 EUR	2 EUR + hoidjad ühekordse kuluna
Filtreeritud vee kogus filtri kohta ml	600	1200	1200



**Joonis 5.** Kasutatud filtritüübid.

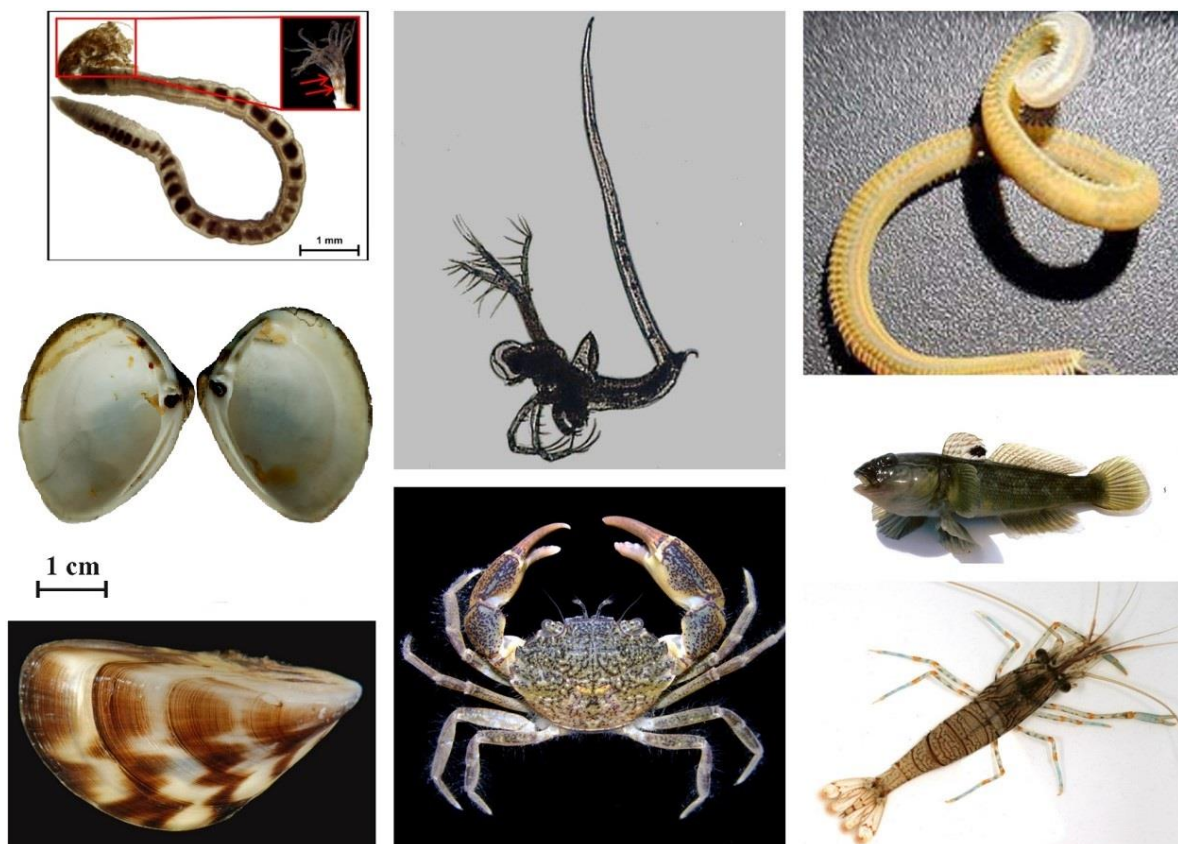
## 2.2. eDNA eraldamine

eDNA eraldamiseks NatureMetrics ja isekombineeritud filtritelt kasutati Nucleospin Tissue (Macherey Nagel) eralduskitti ning Sterivex filtritelt DNeasy PowerWater Sterivex (QIAGEN®) kitti vastavalt tootjapoolsetele soovitudele. DNA kontsentratsiooni määramiseks ja kvaliteedi kontrollimiseks kasutati NanoDrop™ UV-Vis spektrofotomeetrit (Thermo Fisher Scientific Inc.). Kuna keskkonnadNA proovides esineb suure tõenäosusega erinevaid inhibiitoreid, mis meetodi tundlikkust mõjutavad, siis puhastati eraldatud eDNA proovid enne analüüsimist OneStep PCR Inhibitor Removal Kit (Zymo Research, USA) kitiga vastavalt tootja protokollile.

## 2.3. Liigispetsiifiline võõrliikide määramine kvatitatiivse PCR (qPCR) meetodiga

### 2.3.1 Metoodika väljatöötamiseks valitud võõrliigid

Liigispetsiifilise eDNA meetoodika väljatöötamiseks keskenduti esialgu nendele liikidele, kes on juba Eestis olemas, kaetud võõrliikide seirega ning kelle levila on piisavalt lai või laienemas. Koostöös TÜ Mereinstituudi teadlastega valiti selleks välja 8 Eesti vetes kohanenud võõrliiki: ogajas tolmuhari *Laonome xeprovala*, Mehhiko lahest pärit merikarp *Rangia cuneata*, rändkarp *Dreissena polymorpha*, sabaloom *Cercopagis pengoi*, harilik rändkrabi *Rhithropanopeus harrisi*, Virgiinia keeritsuss *Marenzelleria neglecta*, ümarmudil *Neogobius melanostomus* ja elegantne krevett *Palaemon elegans* (joonis 6)



**Joonis 6.** Liigispetsiifilise eDNA meetodika väljatöötamiseks valitud võõrliigid. Fotod: J. Kotta; A. Bick; R. Neideman; M. Storey; P. Sluijs; Smithsonian Environmental Research Center; TÜ Mereinstituut

### 2.3.2 Liigispetsiifiliste praimerite ja märgisega sondide disainimine

Antud projekti käigus disainiti liigispetsiifilised COI (mitokondriaalne tsütokroom-oksüdaas I geen) *Forward* ja *Reverse* praimerid ning neile vastav sond kokku kaheksale võõrliigile (Tabel 3). Praimerid disainiti spetsiaalselt selleks loodud tarkvara (Primer3 2.3.7) abil. Seejärel testiti loodud praimerite sobivust *in-silico*, mis tähendab, et praimerijärjestusi võrreldi kõigi avalikes andmebaasides olevate DNA järjestustega. *In-silico* analüüsi teostati primer-BLAST (Ye et al., 2012) tarkvaraga NCBI GENBank andmebaasi vastu. *In-silico* analüüsi järgselt testiti praimereid *in-vitro*. Selles etapis katsetati disainitud praimerite sobivust võõrliikide koeproovidest eraldatud DNA amplifitseerimiseks. Kolmandas, *in-situ*, etapis kontrolliti praimereid projekti käigus kogutud eDNA proovidel. Meetodika optimeerimiseks ning praimerite optimaalseima sulamistemperatuuri leidmiseks kasutati gradient-PCR meetodikat, samuti optimeeriti praimerite ja sondi lõppkontsentratsioone.

**Tabel 3.** Liigispetsiifilised praimerijärjestused valitud võõrliikidele

Liik	Praimeri nimi	Praimeri järjestus 5' -> 3'
Sabaloom	Cercop_322F	GGA GGT GCA GTA GAA AGA GGA
	Cercop_377P	[FAM]CGG CTG GTA TCG CAC ACG CTG G[BHQ-1]
	Cercop_447R	AGA GAT CCC AGC CAA GTG AA
Rändkarp	Dreiss_285F	TGG GTT TTA CCT GTC TCT ATA GGA
	Dreiss_319P	[FAM]GTT CAG CTT TTA GGG AAG GAG GAT TCG GGG[BHQ-1]
	Dreiss_416R	TCT ATC GCA GGG CCT GAA TG
Merikarp	Rangia_509F	AAA GTG GTT CTG GGA CTG GT
	Rangia_P	[FAM]ACA CCC AGG CCC CGC TAT GGA[BHQ-1]
	Rangia_422R	AAG ACA AAC CAC CAA CAT GCA
Ümarmudil	GobyCOI_F2d	CTT CTG GCC TCC TCT GGT GTT G
	GobyCOI_R2d	CCC TAG AAT TGA GGA AAT GCC GG
	GobyCOI-Pr	[FAM]CAG GCA ACT TGG CAC ATG CAG[BHQ-1]
Ogajas tolmuhari	Laonome_128R	GCA TGA GCC GTC ACA ATA GA
	Laonome_54P	[FAM]TCG GGT AGA GCT TGG ACA ACC TGG ATC A[BHQ-1]
	Laonome_6F	TTT AGG GGT GTG ATC GGG AA
Virgiina	Maren_258_F	TCT GAC TTC TTC CTC CAT CAC T

<b>keeritsuss</b>	Maren_282P	[FAM]CCC TCC TGG TTT CAT CTG CAG CAG TTG A[BHQ-1]
	Maren_382R	TAC AGA AGG TCC GGC ATG AG
<b>Elegantne</b>	Palaem_108P	[FAM]CCT GGC AGG TTG ATT GGA AAT GAC CA[BHQ-1]
<b>krevett</b>	Palaem_224R	CAG TCA ATT TCC AAA TCC GCC A
	Palaem_37F	TTA TTT TCG GAG CCT GAG CAG
<b>Harilik</b>	Rhith_697F	ACC TGC CTT TGG AAT AAT TTC TCA
<b>rändkrabi</b>	Rhith_793P	[FAM]TGG CGT TTT AGG ATT TGT TGT CTG AGC TCA[BHQ-1]
	Rhith_880R	AGT GGC AGA AGT AAA GTA AGC T

### 2.3.3 qPCR

Võõrliikide tuvastamiseks kogutud keskkonna DNA proovides loodi igale valitud liigile vastav qPCR standardkõver. 1:10 lahjendusteseeria (10, 1, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001, 0.00001 ng/μL) abil loodi iga võõrliigi koeproovi DNA kaliiberlahusest standardkõver. Liigispetsiifilise COI geeni tuvastamiseks kasutati disainitud praimereid ja sondipõhist TaqMan® tehnoloogiat. Iga qPCR reaktsioonisegu mahuga 10 μl koosnes järgmistest komponentidest: 1x HOT FIREPol® Probe Universal qPCR Mix (Solis BioDyne), 0,2 μM F ja R praimer (va *Dreissena* 0.4 μM) ning 0,2 μM flurostsentsmärgisega sond, 2,5% DMSO ja ülejäänud mahus dH<sub>2</sub>O (Molecular grade). Keskkonnaproovi analüüsiti kolmes korduses ning iga qPCRi analüüsiplaat sisaldas lisaks uuritavatele proovidele negatiivseid kontrollproove ning positiivseid standard DNA lahjendusi. Kõik qPCR analüüsid teostati LightCycler® 480 System (Roche Life Science) seadmel 384 kannulist platvormi kasutades. qPCR programmid on toodud tabelites 4 ja 5.

**Tabel 4.** qPCR programm liikidele *Laonome xeprovala*, *Rangia cuneata*, *Rhithropanopeus harrisii*, *Marenzelleria neglecta*, *Neogobius melanostomus* ja *Palaemon elegans*

Etapp	Temperatuur	Aeg	Tsüklite arv
Polümeraasi aktivatsioon	95 °C	10 min	1
Denaturatsioon	95 °C	20 sek	
Praimerite seondumine ja elongatsioon	60 °C	1 min	45

**Tabel 5.** qPCR programm liikidele *Dreissena polymorpha* ja *Rangia cuneata*

Etapp	Temperatuur	Aeg	Tsüklite arv
Polümeraasi aktivatsioon	95 °C	10 min	1
Denaturatsioon	95 °C	20 sek	



Praimerite seandumine ja 54 °C  
 elongatsioon

1 min

45

## 2.4 Metatriipkoodistamine

eDNA proovide mass-sekveneerimiseks kasutati varasemalt avaldatud ja korduvalt testitud universaalseid Metazoa COI praimereid (mICOLintF - (Leray et al., 2013) ja jgHCO2198 - (Geller et al., 2013)). Praimeripaar sai välja valitud seetõttu, et need on juba varasemate uuringute valideeritud (Lacoursiere-Roussel et al., 2018) ning neile on olemas vastav usaldusväärne referentsandmebaas (BOLD) ning bioinformaatiline tööriist (BARQUE). DNA sekveneerimisraamatukogu valmistati kahes etapis. Esimeses etapis amplifitseeriti eDNA proovid geenispetsiifiliste praimeritega millele oli lisatud üleulatuvad adapterjärjestused. 20 µl reaktsioonisegu sisaldas 3 µl DNA-d, 0.8 µl mICOLintF-tag ja 0.8 µl jgHCO2198-tag praimereid (10 µM), 10 µl 2x Qiagen Multiplex PCR Kit ensüümisegu (2X), 4 µl Solution Q (5X) (Qiagen) ja 1.4 µl RNAasi-vaba vett (Qiagen). Kõik eDNA proovid amplifitseeriti kolmes korduses. PCR programm on toodud tabelis 6. Amplifikatsiooni, produkti suuruse ja adapterjärjestustega praimerite seandumise kontrollimiseks visualiseeriti PCR produktid geel-elektroforeesi abil. 1.5% agarosgeeli valmistamiseks kasutati Atlas ClearSight Gold Tablets with TAE tablette (BIOATLAS) ja MQ vett. 5 µl PCR produkti segati 6X TriTrack DNA Loading Dye (ThermoFisher Scientific) värviga ja kanti geelile. Suurusmarkerina kasutati GeneRuler Low Range ja GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladderit (ThermoFisher Scientific).

**Tabel 6.** DNA sekveneerimisraamatukogu esimese etapi PCR programm

Etapp	Temperatuur	Aeg	Tsüklite arv
Polümeraasi aktivatsioon	95 °C	15 min	1
Denaturatsioon	94 °C	30 sek	
Praimerite seandumine	52 °C	30 sek	35
Elongatsioon	72 °C	1 min	
Lõppsüntees	72 °C	30 min	1
Jahutus	4 °C	∞	

Kuna ühe sekveneerimise protsessi käigus sooviti analüüsida koos mitmeid proove, siis selleks et hilisema analüüsi käigus oleks võimalik erinevaid proove üksteisest eristada, lisati DNA raamatukogu valmistamise teises etapis igale proovile unikaalsed adapterjärjestusega seonduvad ning võtmejärjestusi sisaldavad Illumina indeksid (nn indekseerimine). Indekseerimiseks tehti esimese etapi PCR produktidest 1:20le lahjendused. 20 µl reaktsioonisegu sisaldas 1 µl 1:20le lahjendatud adapterjärjestusega PCR produkti, 2 µl unikaalset F ja R indeksit (5µM) , 10 µl Phusion High-Fidelity PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) ensüümisegu (2X) ja 5 µl dH2O (Molecular grade). Indekseerimisprogramm on toodud tabelis 7. Indeksite seandumine kontrolliti geel-elektroforeesi abil sarnaselt eelnevalt kirjeldatud meetodikale.

**Tabel 7.** IndeksPCR programm

Etapp	Temperatuur	Aeg	Tsükli arv
Ensüümi aktiveerimine	esmane 98 °C	2 min	1
DNA denaturatsioon	98 °C	20 sek	
Primerite seondumine	60 °C	30 sek	12
DNA ahela süntees	72 °C	30 sek	
Lõppsüntees	72 °C	5 min	1

Indekseeritud proovid segati omavahel kokku üheks DNA raamatukoguks ja uue põlvkonna sekveneerimisteenus telliti firmalt Asper Biogene kasutades Illumina MiSeq sekvenaatorit.

## 2.5 Andmete analüüsimine

### 2.5.1 qPCR

Kuna kasutatud mitokondriaalse COI geeni ja uuritava looma koest eraldatud DNA vahelist suhet ei ole kuigi kerge tuvastada, kasutati genoomse DNA kontsentratsiooni ja vastava qPCR Cp väärtuse vahelist kaudset seost. Uuritavate proovide Cp väärtused arvutati samal põhimõttel DNA kontsentratsiooniks. Saadud andmeid analüüsiti standardsete statistiliste meetoditega (ANOVA ja Tukey post-hoc paariviisiline võrdlus), et tuvastada kasutatud meetodite sarnasusi/erinevusi. Andmeanalüüs viidi programmiga R-Statistic (R Core Team 2013).

### 2.5.2 Metatriipkoodistamine

Bioinformaatiliseks analüüsiks kasutati tööriista BARGUE v1.5.2 (Lacoursière-Roussel et al., 2018) (<https://github.com/enormandeau/barque>). Tulemuseks on nn molekulaarsete taksonoomiliste ühikute (mOTUd inglise keeles *molecular operational taxonomic units*) arvukused, mida analüüsitakse sobilike statistiliste meetodite abil.

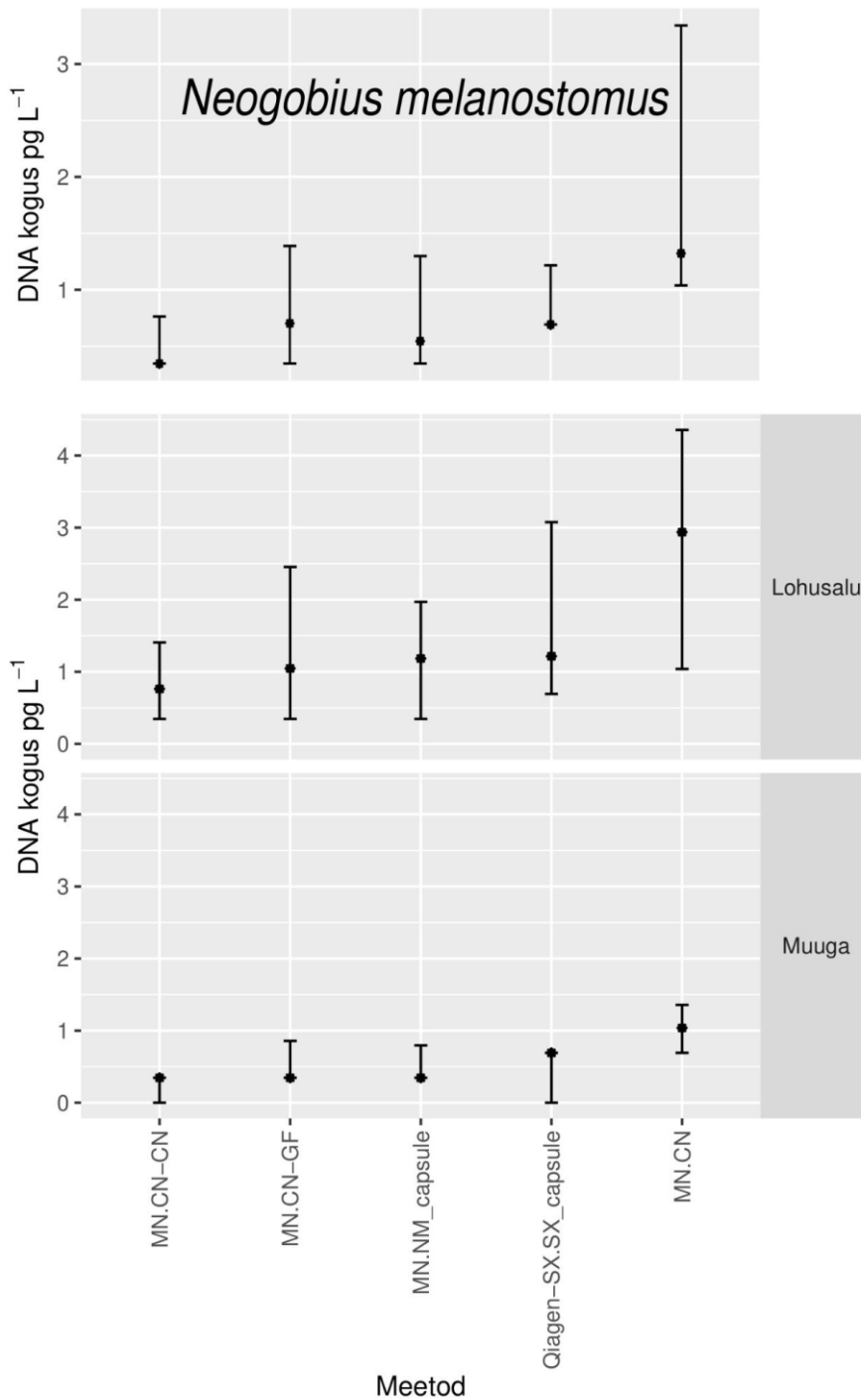
### 3. Tulemused ja arutelu

#### 3.1. Võõrliikide eDNA olemasolu ja hulga määramine qPCR metoodika abil, eDNA eraldamise meetodite võrdlus

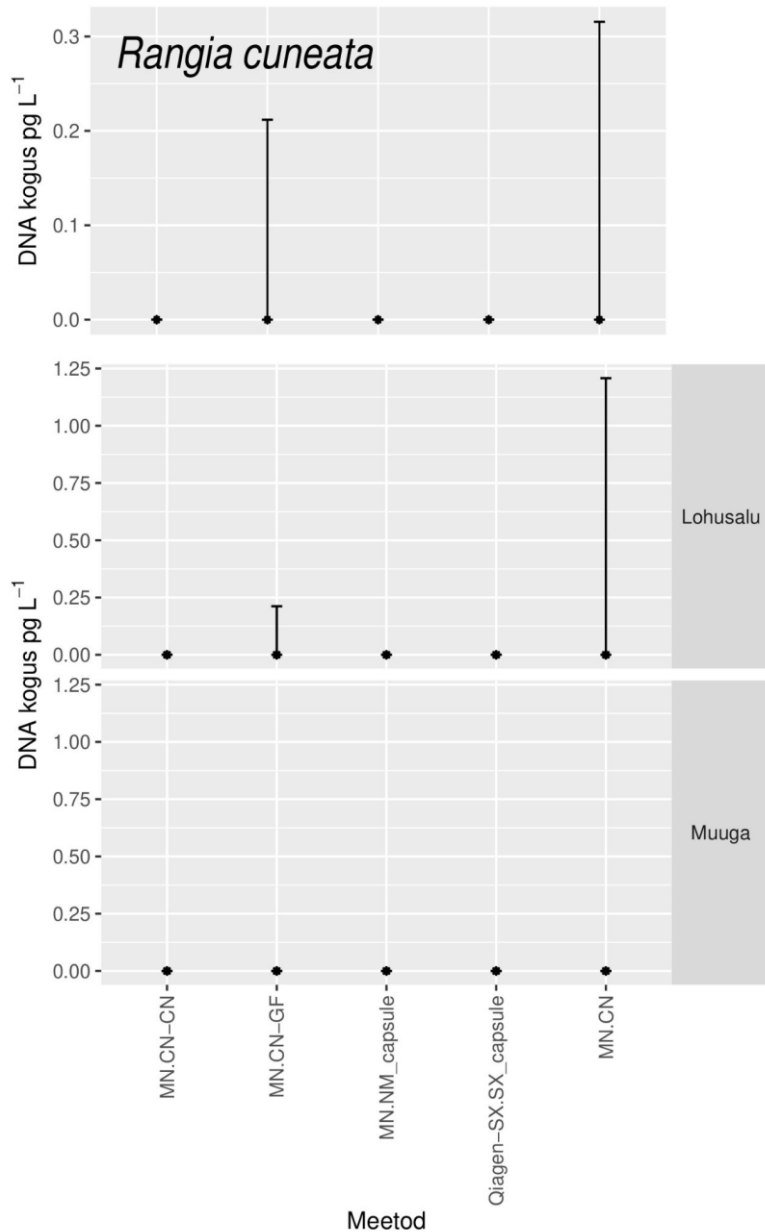
Käesoleva projekti raames väljatöötatud liigispetsiifilisi primereid ja sonde kasutades analüüsiti 8 võõrliigi esinemist kõigis kogutud veeproovides (N=128). qPCR tulemused ning filtreerimise ja eDNA eraldamise metoodika võrdlused on esitatud joonistel 7 kuni 11 ning statistiliste analüüside tulemused on esitatud lisa tabelites 1 kuni 5. Üldjuhul osutus eDNA saagis kõige kõrgemaks isekombineeritud filtersüsteemi kasutades ning see erinevus oli alati ka statistiliselt oluline.

Kogutud veeproovides tuvastati kõige sagedamini ümarmudila eDNAd (N=99). Sealjuures olid Lohusalu sadama proovialal ümarmudila eDNA saagised oluliselt kõrgemad (Joonis 5). Antud liigi puhul osutus kõige efektiivsemaks isekonstrueeritud filtersüsteem ning erinevus filtritüüpide ja proovikoha eDNA saagikuse vahel oli statistiliselt oluline (lisa tabel 1). Ümarmudilat peetakse üheks invasiivseimaks võõrliigiks, Eesti rannikumeri on ümarmudilale soodne elupaik - talle jagub siin piisavalt toitu ja looduslikke vaenlasi on vähe (TÜ Mereinstituut, 2020). Kuna kalad on vees pidevas liikumises eritavad nad pidevalt ümbritsevasse keskkonda oma DNAd, mis pärineb kala naharakkudest, kaitsvast limakihist, soomustest, eritistest või kudumise ajal vette vabastatud sugurakkudest. Seetõttu on ka veesambas lisaks ümarmudilale ka teised kalaliigid eDNA abil võrdlemisi lihtsasti tuvastatavad (Hänflig et al., 2016; Bruce et al., submitted)

*Rangia cuneata* eDNAd leiti kokku vaid 15st analüüsitud veeproovist. Antud liigi eDNAd tuvastati enamasti madalates kontsentratsioonides nii Muuga kui ka Lohusalu uuringualal 2019. aasta oktoobri ja 2020. aasta aprilli proovides ning lisaks ainult Lohusalus augustis 2019 ja märstis 2020. Ka selle liigi kõige kõrgema eDNA saagikuse andis isekonstrueeritud filter (joonis 8; Lisa Tabel 2). Võõrliik *Rangia cuneata* leiti esmakordselt Eestist 2014. aastal Pärnu lahe põhjaosas. Mereinsituudi 2019. ja 2020. aasta seirearuannete põhjal leiti liiki 2020. aastal vaid Pärnu lahe veekogumis. Kuna 2020. aastal tabati liiki esmakordselt ka põhjaammutajaga, arvatakse, et liigi asustustihedus Pärnu lahes on oluliselt kasvanud. Senini ei ole seda liiki rannikumere seire raames muudes piirkondades täheldatud (TÜ Mereinsituut, 2019, 2020). Kuna antud liigi DNAd tuvastati ka DNApõhise metazoa koosluse analüüsi käigus, võib arvata, et tõenäoliselt on *Rangia cuneata* asustustihedus käesolevas töös kasutatud uuringualadel niivõrd väike, et traditsiooniliste meetoditega ja püügivahenditega neid seal tabada on väga ebatõenäoline. *Rangia cuneata* eDNA sattumine Muuga sadama proovialale laevade ballastveest on samuti võimalik, mitte aga Lohusalu proovialale.



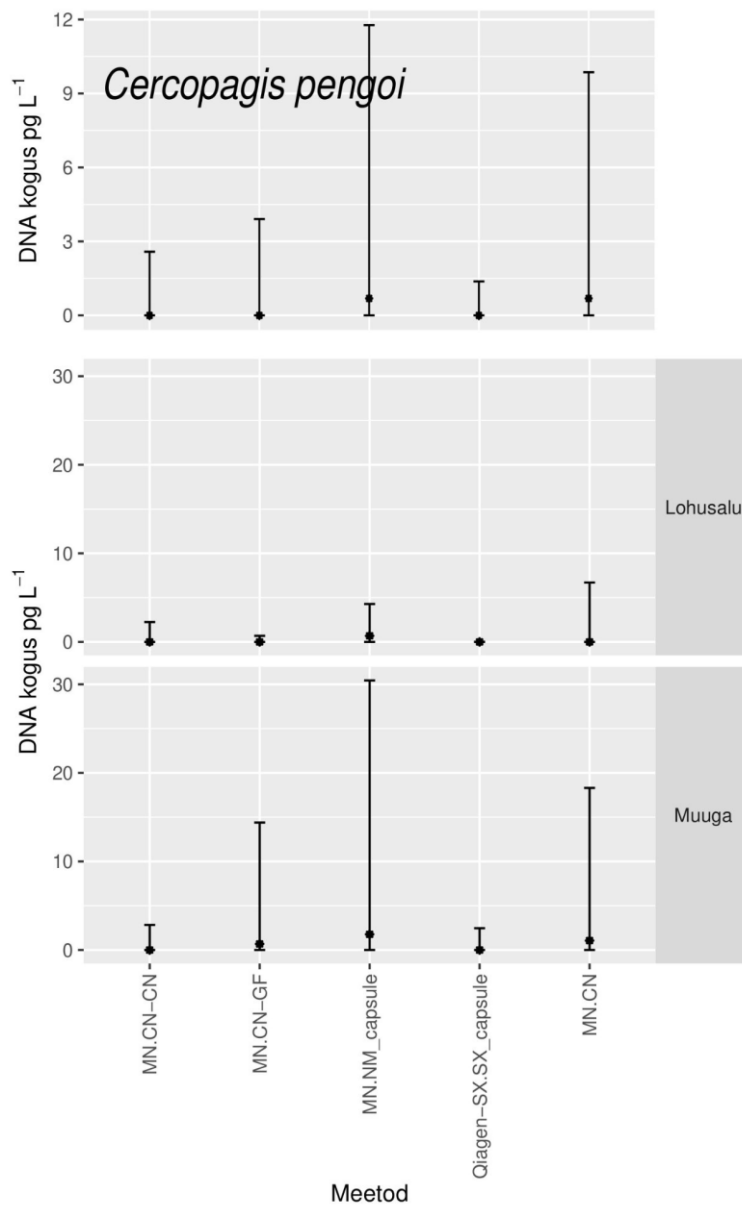
**Joonis 7.** Unimudila eDNA hulk sõltuvalt kasutatud filtri tüübist ja proovide kogumise asukohast. Joonisel on toodud eDNA hulga mediaanväärtus ning alumine ja alumine kvartiil (25%, 75% “vurrud”). MN ja Qiagen tähistavad eraldusmeetodikat, CN\_CN - tselluloosnitraat, CN\_GF - GF/A klaasfiiber, NM\_capsule - NatureMetrics ja SX\_capsule - Millipore Sterivex, CN - isekombineeritud filter koos).



**Joonis 8.** Karbi *Rangia cuneata* eDNA hulk sõltuvalt kasutatud filtri tüübist ja proovide kogumise asukohast. Joonisel on toodud eDNA hulga mediaanväärtus ning elamine ja alumine kvartiil (25%, 75% "vurrud"). MN ja Qiagen tähistavad eraldusmeetodikat, CN-CN = tselluloosnitraat, CN-GF = GF/A klaasfiiber, NM\_capsule = NatureMetrics ja SX\_capsule = Millipore Sterivex, CN - isekombineeritud filter koos).

Sabalooma *Cercopagis pengoi* eDNAd tuvastati kokku 51s veeproovis. Sabalooma DNAd leiti kõigis 2019. ja 2020. aasta augustis kogutud veeproovides. Teistel aasta-aeagadel sattus sabalooma DNAd vaid üksikutesse proovidesse. Antud vesikirbu eDNA saagikus oli kõrgem Muuga sadama akvatooriumil (joonis 9). TÜ Mereinsituudi võõrliikide seire on näidanud, et sabaloom on Eesti rannikumeres laialdaselt levinud. Alates 2016. aastast on *C. pengoi* planktoni hulgas esinenud juuni lõpust septembrini (seirekuud aprill - oktoober). See toetab eDNA põhiseid tulemusi - suvistes proovides liiki

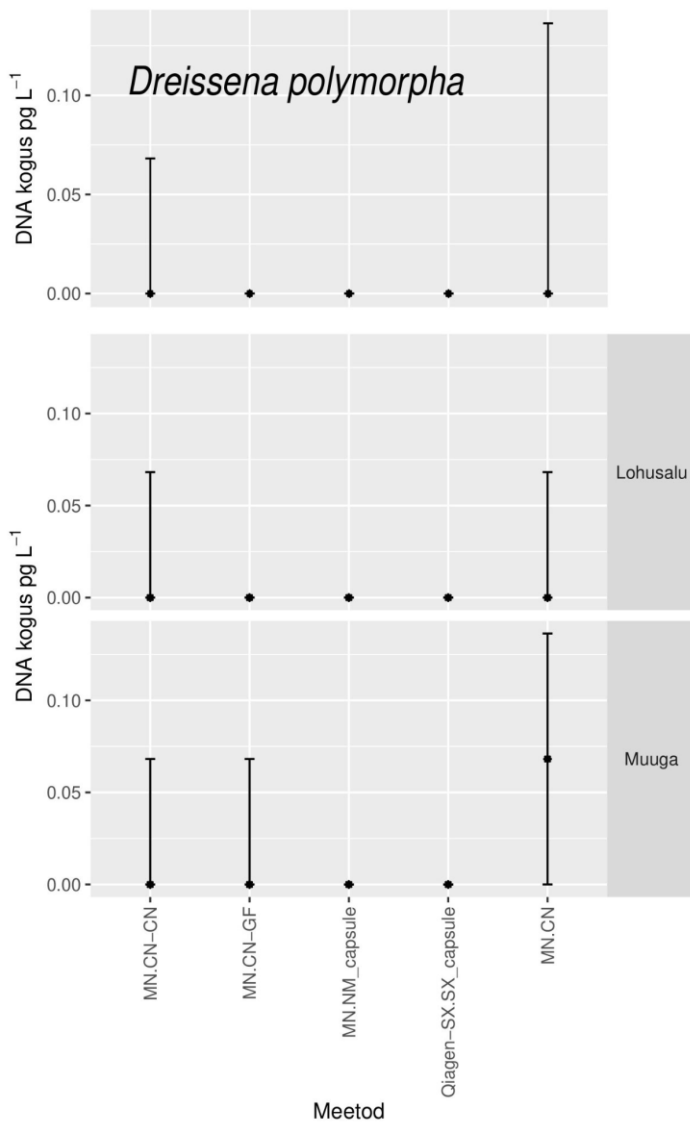
tuvastati, kuid teistel aastaegadel vaid väga üksikutes proovides ja määramispiiri lähedastes kontsentratsioonides. Käesoleva töö käigus leidsime, et sabalooma DNA püüdmiseks veesambast sobivad meetodiliselt tegelikult kõik katsetatud filtritüübid (lisa tabel 3).



**Joonis 9.** Sabalooma eDNA hulk sõltuvalt kasutatud filtri tüübist ja proovide kogumise asukohast. Joonisel on toodud eDNA hulga mediaanväärtus ning alumine ja alumine kvartiil (25%, 75% “vurrud”). MN ja Qiagen tähistavad eraldusmeetodikat, CN\_CN = tselluloosnitraat, CN\_GF = GF/A klaasfiiber, NM\_capsule = NatureMetrics ja SX\_capsule = Millipore Sterivex, CN - isekombineeritud filter koos).

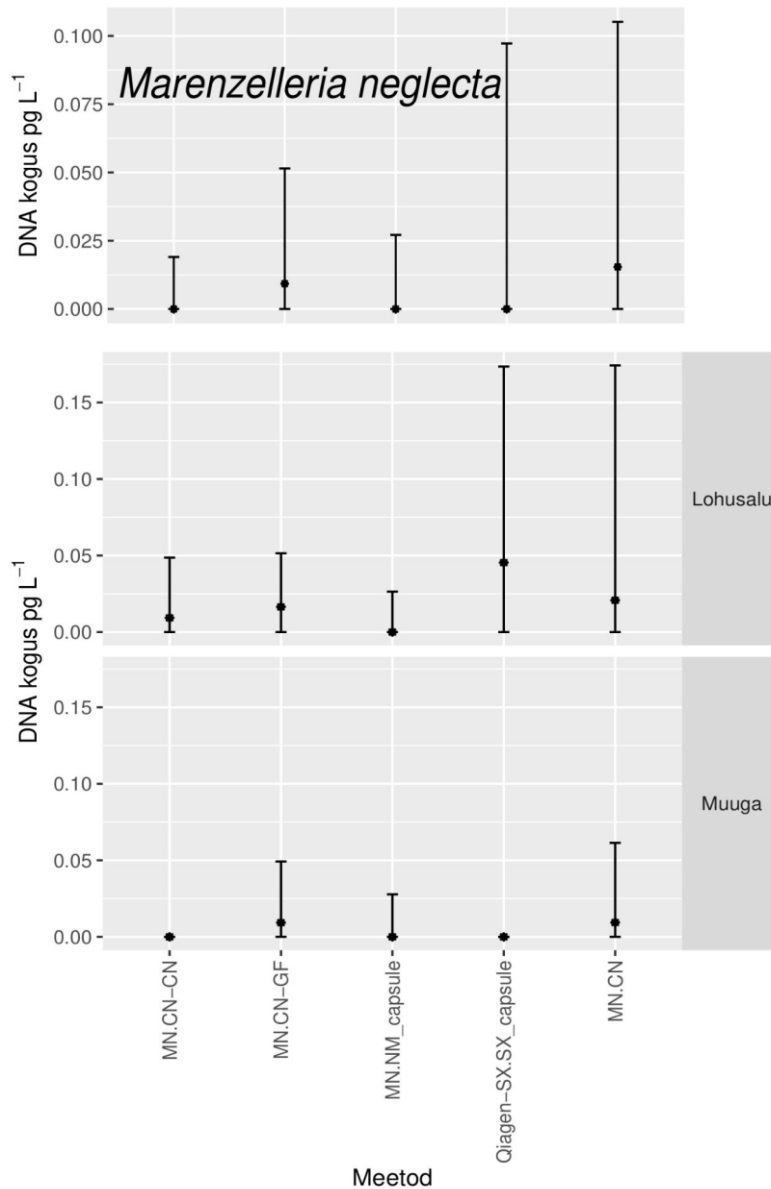
Rändkarbi eDNAd tuvastati kokku 21s veeproovis, peamiselt vaid augusti ja oktoobrikuu filtritelt. Tuvastatud eDNA kontsentratsioonid olid küll pigem madalad, aga tänu meetodi tundlikkusele oli võimalik siiski liigi esinemine uuritud proovialadel tuvastada. Kõige sobilikumaks osutus ka selle liigi puhul isekombineeritud kahefiltriline süsteem (joonis 10), mille pealne, suurema poorisuurusega

GF/A filter, püüab just osakestega seotud eDNA-d. Rändkarpide purjukvastsed elavad veesambas ja see võib selgitada suuremate DNA koguste leidmise augustikuistes proovides. Samuti jõuab karpide DNA veesambasse ka siis, kui nad kellegi poolt ära süüakse ja seetõttu satuvad nende kudede osakesed vette. Oktoobris, kus suuremad eDNA kogused saadi just GF/A filtritelt ja vaba DNA kogused olid madalamad, võib arvata, et see on sinna sattunud just ärasöömise käigus lõhutud kudedest. Lohusalu ja Muuga proovide DNA koguste vahel statistilistelt olulist erinevust ei tuvastatud (lisa tabel 4). Muuga sadama akvatooriumi proovides traditsioonilise võõrliikide seire käigus rändkarpi ei leitud (TÜ Mereinstituut 2019, 2020).



**Joonis 10.** Rändkarbi eDNA hulk sõltuvalt kasutatud filtri tüübist ja proovide kogumise asukohast. Joonisel on toodud eDNA hulga mediaanväärtus ning elamine ja alumine kvartiil (25%, 75% “vurrud”). MN ja Qiagen tähistavad eraldusmeetodikat, CN\_CN = tselluloosnitraat, CN\_GF = GF/A klaasfiiber, NM\_capsule = NatureMetrics ja SX\_capsule = Millipore Sterivex, CN - isekombineeritud filter koos).

Virgiinia keeritsussi DNAd leiti kokku 48s veeproovis. Kõige suuremad olid *M. neglecta* DNA kogused kevadistes - märtsi ja aprillikuistes proovides. Ka TÜ Mereinsituudi seiretulemustes moodustasid *M. neglecta* vastsed märtsis ja aprillis suurima osa Muuga sadama zooplanktoni koguarvukusest ja biomassist (TÜ Mereinsituut, 2020). Antud võõrliigi eDNAd leiti rohkem Lohusalu sadama proovides ja kõige efektiivsemaks filtritüübiks osutus kaheosaline isekombineeritud filter. Erinevus proovikohtade ja filtritüüpide vahel oli statistiliselt oluline (Joonis 11, lisa tabel 5).



**Joonis 11.** Virgiinia keeritsussi eDNA hulk sõltuvalt kasutatud filtri tüübist ja proovide kogumise asukohast. Joonisel on toodud eDNA hulga mediaanväärtus ning elamine ja alumine kvartiil (25%, 75% "vurrud"). MN ja Qiagen tähistavad eraldusmeetodikat, CN\_CN = tselluloosnitraat, CN\_GF = GF/A klaasfiiber, NM\_capsule = NatureMetrics ja SX\_capsule = Millipore Sterivex, CN - isekombineeritud filter koos).



Kuna antud uuringuperioodi jooksul oli vöörlükkide *Laonome xeprovala* (ogajas tolmuhari), *Rhithropanopeus harrisi* (rändkrabi) ning *Palaemon elegans* (elegantne krevett) DNA kogus veeproovides määramispiiri lähedastes kontsentratsioonides, siis nende liikide tuvastamiseks sobilikku filtritüübi ja eraldusmeetodika väljaselgitamine kahjuks ei olnud võimalik. Vöörlükkide seire käigus ei ole alates 2017. aastast rändkrabi Muuga lahes leitud, mis selgitab liigi DNA ülimadalad kontsentratsioonid kogutud veeproovides. Kuigi elegantse kreveti täiskasvanud isendeid leiti nii 2019. kui ka 2020. aasta Muuga sadama kaiäärse seire käigus ja vasteid leiti ka 2019. aasta zooplanktoni proovides (TÜ Eesti Mereinstituut, 2019, 2020), siis kahjuks jäid antud liigi DNA kogused meetodika lõplikuks katsetamiseks ja optimeerimiseks liiga madalaks. Kokkuvõtvalt võib öelda, et neile kolmele vöörlükkile väljatöötatud liigispetsiifiline DNA põhine meetodika vajab optimeerimist suurema arvu proovidega.

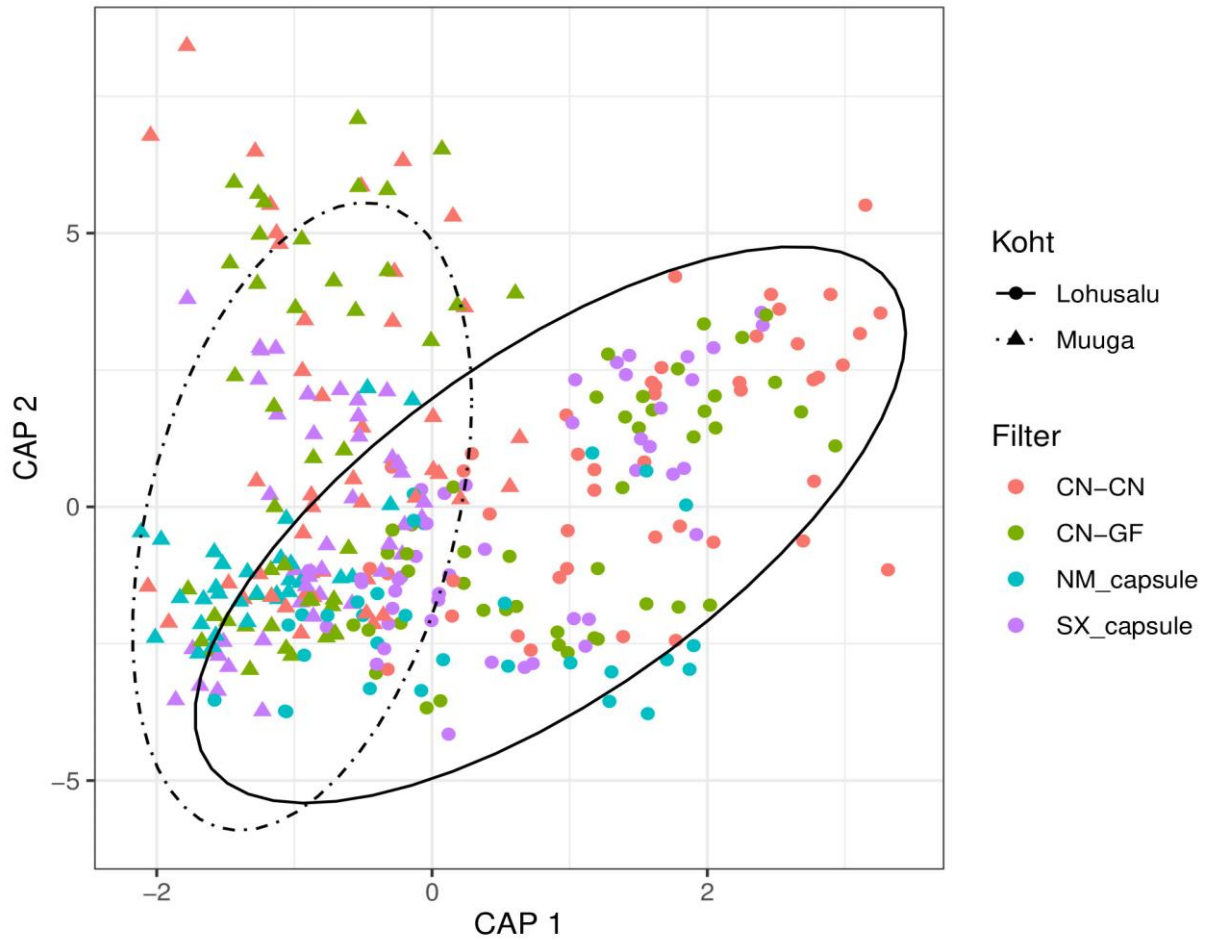
### 3.2. Loomade (Metazoa) metatriipkoodistamise - mass-sekveneerimise tulemused

Metagenoomse sekveneerimise ehk metatriipkoodistamise analüüs näitas, et proovides esines vähemalt 147 erinevasse perekonda kuuluvat (193 liiki) looma (*Metazoa*), nende hulgas kõige arvukamalt lüljalgsete (*Arthropoda*), rõngusside (*Annelida*) ja limuste (*Mollusca*) esindajaid. Ülevaade suhtelistest arvukustest perekonna tasemel on esitatud lisa joonistel 1 ja 2. Ühe näitena leiti kõigist kogutud veeproovidest kokku 21 kalaliigi eDNA-d. Seega antud meetodika võimaldab saada väga laiapõhjalisi andmeid proovikogumisalade elurikkuse kohta.

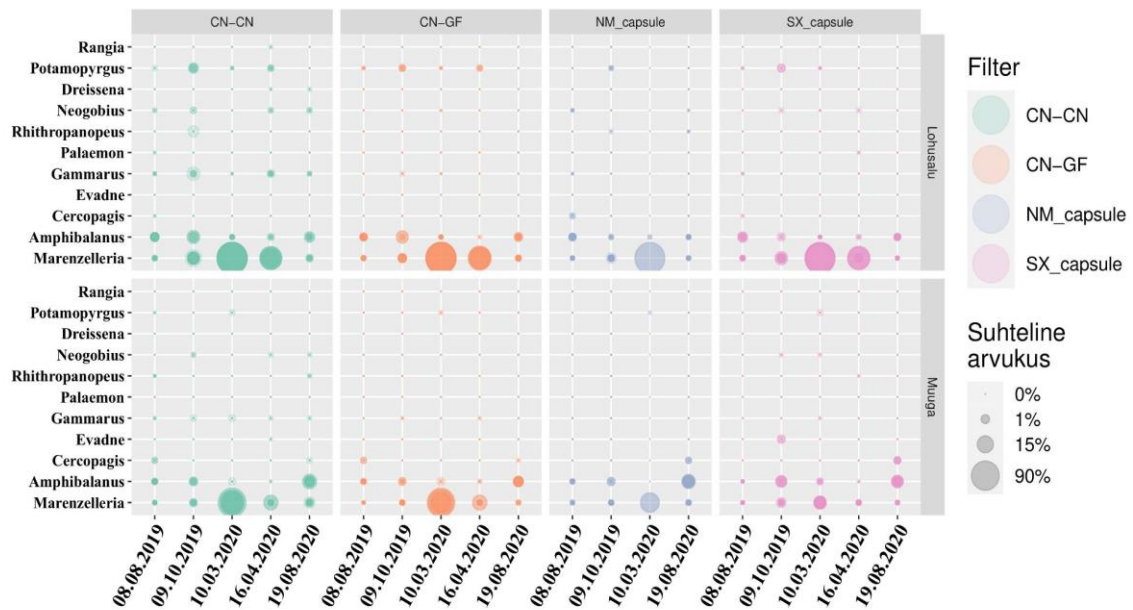
Joonisel 12 ja tabelis 8 esitatud tulemustest on näha, et peamiselt erinevad proovialade kooslused. Filtri tüübi mõju koosluses leiduvale liigilisele mitmekesisusele on küll statistiliselt oluline kuid väiksem. Üksikute perekondade suhtelise arvukuse andmed on esitatud lisa joonistel 1 ja 2.

**Tabel 8.** Filtritüübi, eralduskiti ja proovivõtu koha mõju metagenoomse sekveneerimise tulemusel saadud liigilisele mitmekesisusele, nende tulemuse saamisel on kasutatud ainult põhilisi proovikogumise alasid (Muuga sadam ja Lohusalu)

Muutuja	df	Dispersioon	F	Pr(>F)
Filtri tüüp	2	6,03	3,4	0,001
Proovivõtu koht	1	12,61	14,22	0,001
Jääk	325	288,2	NA	NA



**Joonis 12.** Metagenoomselt sekveneeritud proovide rühmitumine vastavalt proovialale ning kasutatud filtri tüübile (analüüsiks on kasutatud ordineerimist - ddrDA). Mõlemad rühmitavad tunnused (prooviala ja filtri tüüp) olid statistiliselt olulised (vt tabelit 4).



**Joonis 13.** Tedaolevate Eesti võõrliikide esinemine ja suhteline arvukus metatranskriptoomistamise andmestikus.

DNA põhine koosluse analüüs näitas, et võõrliikidest esines kõige arvukamalt veeproovides *Marenzelleria viridis* DNAd (joonis 13), temale järgnes tõrUVähk *Amhibalanus improvisus*. Kokku tuvastati metatranskriptoomistamise käigus Muuga ja Lohusalu sadama piirkonnas 12 võõrliiki.

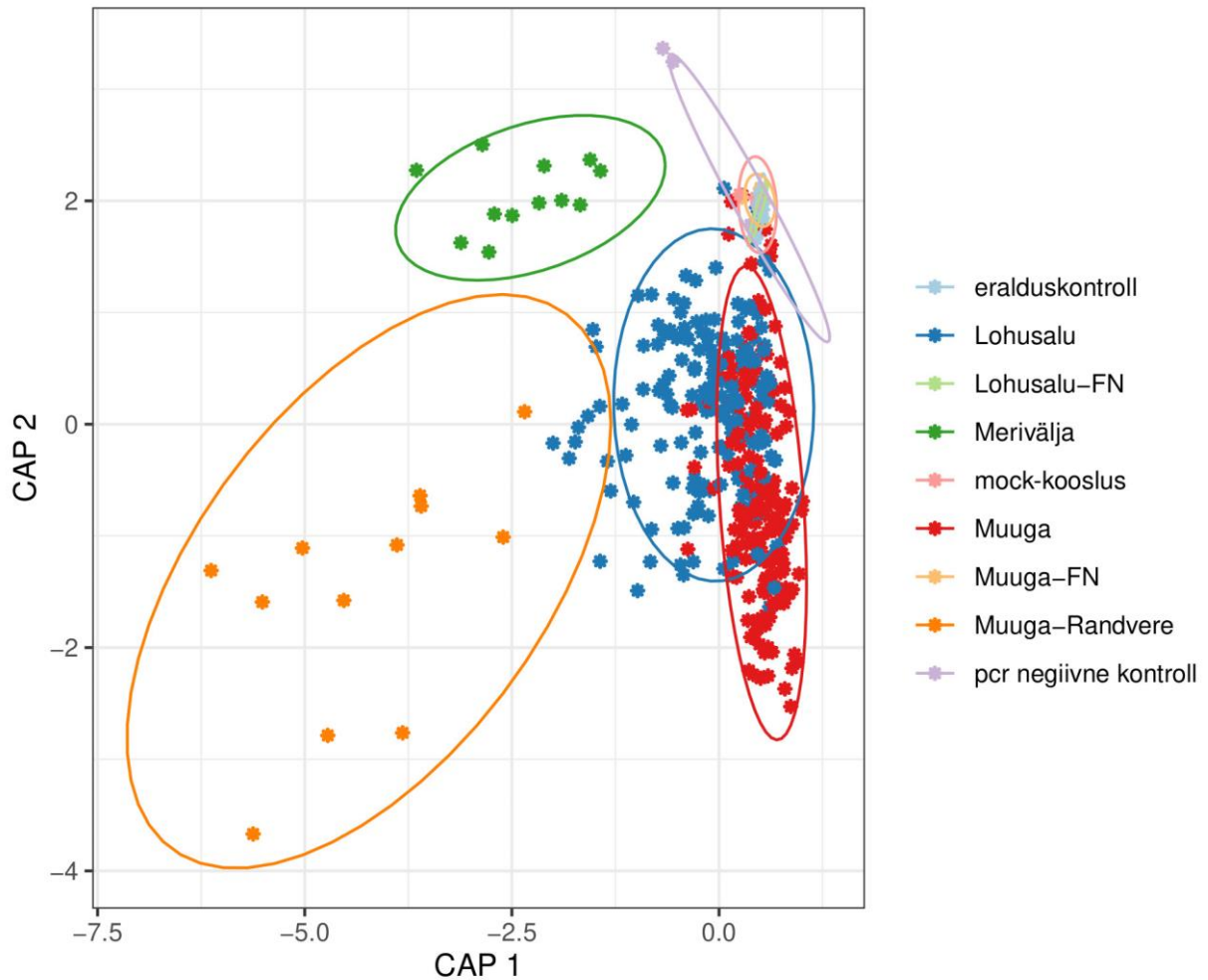
Koosluse analüüsi tulemusel tuvastati veeproovidest ka rändkrabi, vööt-kirpvähi ja elegantse kreveti DNAd, mida qPCR analüüsiga leiti vaid ülimaladates kogustes ja mistöttu liigispetsiifiline qPCR protokoll vajab veel optimeerimist (tabel 9). Mõlema meetodiga tuvastatud võõrliigid on toodud tabelis 9. Metatranskriptoomistamise andmetes leidis palju *Marenzellaria viridis*'e DNAd. Sellele liigile qPCR meetodikat antud projekti raames välja ei töötatud küll aga testiti qPCR abil sama perekonna, aga teise liigi, *M. neglecta* eDNA hulka, mis näitas selle liigi suhteliselt tagasihoidlikku levikut.

### 3.3. Kontrollproovide tulemused

Kontrollproovidesse sattunud DNAd on kõige ilmekamalt võimalik esitada metatranskriptoomistamise tulemuste abil. Joonis 14 demonstreerib selgelt, et kõik kontrollproovid on väga erinevad proovialadelt kogutud veeproovidest, kontrollproovide detailsem analüüs näitas, et neisse sattunud DNA on juhuslikku päritolu aga mitte arvukas - valdavalt ainult mõneks üksidud järjestuse lugemid (sh inimese omad, mis on üsna loomulik kõrvalnähtus, sest meetodika on ülitundlik). Teise kasutatud meetodika, qPCR põhise testimise käigus ei leitud negatiivsetest kontrollproovidest ühelgi juhul uuritavate liikide DNAd.

**Tabel 9.** Kooslusepõhise ja liigispetsiifilise lähenemise võrdlus. - opt tähendab, et meetod vajab optimeerimist.

Liigi nimi	Kooslusepõhine analüüs	Liigispetsiifiline analüüs
<i>Amphibalanus improvisus</i>	+	NA
<i>Potamopyrgus antipodarum</i>	+	NA
<i>Dreissena polymorpha</i>	+	+
<i>Neogobius melanostomus</i>	+	+
<i>Rhithropanopeus harrisi</i>	+	- opt
<i>Palaemon elegans</i>	+	- opt
<i>Gammarus tigrinus</i>	+	- opt
<i>Evadne anonyx</i>	+	NA
<i>Cercopagis pengoi</i>	+	+
<i>Rangia cuneata</i>	+	+
<i>Marenzelleria neglecta</i>	-	+
<i>Marenzelleria viridis</i>	+	NA
<i>Laonome xeprovala</i>	+	- opt



Joonis 14. Metagenoomselt uuritud proovide rühmitumine kui analüüsi on lisatud erinevad kontrollproovid: eralduskontroll - tühi kontrollproov DNA puhastamise/eraldamise etapis, FN - nn 'field' negative' kontrollproov, koos tegelike merest võetud veeproovidega tehtud kontrollproov kasutades kauplusest ostetud puhast joogivett, mock-kooslus - teadaolevate invasiivsete võõrliikide (millised? DNA), PCR negatiivne kontroll on PCR tehtud tühiproov, Merivälja ja Muuga-Randvere on ühekordselt analüüsitud proovialad (juunis 2019), et katsetada üldist töövoogu.

#### 4. Kokkuvõte

Käesoleva projekti raames töötati välja keskkonna DNA põhised meetodid võõrliikide varajaseks tuvastamiseks Läänemeres. Selleks koguti 2019-2020. aastal Lohusalu ja Muuga sadama akvatooriumil veeproove eDNA eraldamiseks ja analüüsimiseks. Selleks, et leida Läänemere oludesse sobivaim meetodika, testiti proovide kogumiseks erinevaid filtritüüpe ja eDNA eraldamiseks erinevaid meetodikaid. Võõrliikide tuvastamiseks kasutati liigispetsiifilist ja kooslusepõhist (metatriipkoodistamine) lähenemist. Töö käigus disainiti liigispetsiifilised COI (mitokondriaalne tsütokroom-oksüdaas I geen) praimerid ning neile vastav sond kokku kaheksale võõrliigile, kes on juba Eestis olemas, kaetud võõrliikide seirega ning kelle levila on piisavalt lai või laienemas. Loodud

praimeritega analüüsiti kogutud veeproove nende võõrliikide tuvastamiseks. Kaheksast väljavalitud liigist saadi qPCR meetodika optimeeritud viiele liigile (ümarmudil, rändkarp, virgiinia keeritsuss, merikarp). Kolmele liigi (ogajas tolmuhari, rändkrabi, vööt-kirpvähk) puhul vajab liigispetsiifiline meetodika veel optimeerimist suurema arvu proovidega, kuna kogutud proovides oli nende liikide DNA hulk väga madal. Metatriipkoodistamise käigus leiti proovides vähemalt 147. erinevasse perekonda kuuluvat (193 liiki) looma. Kõige arvukamalt leiti proovides lüljalgsete (*Arthropoda*), rõngusside (*Annelida*) ja limuste (*Mollusca*) esindajaid. Seni Eestis leitud võõrliike tuvastati Lohusalu ja Muuga sadama veeproovide eDNA kooslusepõhise analüüsiga 12, ühtegi uut võõrliiki ei tuvastatud.

Töö käigus testitud filtritest osutus pea kõikide liikide puhul sobivaimaks isekombineeritud kaheosaline filtersüsteem. Erinevus tuli ennekõike välja liigispetsiifilisel qPCR analüüsil. Metatriipkoodistamisel filtri tüüp statistiliselt olulist rolli ei mänginud. Samuti ei olnud olulist erinevust eDNA eraldamisemetoodika vahel.

Kuigi eDNA põhised meetodid on võrdlemisi uued, on mitmeid põhjuseid, miks oleks oluline nende lülitamine Eesti traditsioonilistesse seireprogrammidesse.

eDNA meetodika on **sobilik traditsiooniliste meetodite täiendamiseks**, näiteks saab eDNA abil eelnevalt kindlaks teha kohad, kus uuritavaid liike võiks esineda ja seejärel teha traditsiooniliste meetoditega uuringuid fookuseeritult nendel aladel.

**Kulu- ja ajatõhusus** – monitooringuga saab katta laiemaid alasid ja proove koguda suurema tihedusega. Samuti on laboris võimalik üheaegselt analüüsida mitmeid proove korraga.

**Meetod on mitteinvasiivne** – analüüsimiseks kasutatakse vaid veeproovi ja seega häiritakse loomulikku elukeskkonda võimalikult vähesel määral. See on eriti oluline vähearvukate ja haruldaste liikide seirel.

**Meetodi tundlikkus** – organismide DNAd on võimalik tuvastada juba väga madalate kontsentratsioonide juures. See on väga oluline võõrliikide varajaseks tuvastamiseks ning suurendab vähearvukate ja raskesti kättesaadavate liikide tabamise tõenäosust.

**Tulemused ei sõltu eksperdi kogemustest ja liigitundmise oskustest** ja seetõttu on tulemused võrreldavad.

Morfoloogiliste tunnuste abil **raskesti eristatavaid arengustaadiumeid** (vastset, noorjärgud) on DNA põhiselt **võimalik täpsemini liigini määrata**.

eDNA on riiklikes seireprogrammides kasutusel juba mitmets Euroopa riigis (Belgia, Suurbritannia, Prantsusmaa, Hispaania, Portugal) ja praeguseks väljatöötamisel on DNA põhise monitooringu standardid bioloogilistele kvaliteedielementidele liitmaks need EL Veepoliitika ja EL Merestrateegia raamdirektiivi (2000/60/EÜ ja 2008/56/EÜ). Peame oluliseks valmisolekut eDNA põhiste meetodite rakendamiseks riiklikes seireprogrammides juba praegu. Meetodika arendamise ja väljatöötamisega oleme jõudnud niikaugele, et Eesti võiks olla valmis eDNA põhiste meetodikate lülitamiseks riiklikesse seireprogrammidesse ja seda nii mere kui mageveekogude seiresse.

Kokkuvõtvalt võib öelda, eDNA liigispetsiifilisel analüüsimisel ja metatriipkoodistamisel on suur potentsiaal võõrliikide varajaseks avastamiseks Eesti rannikualade keskkonnaproovides.

Traditsiooniliste ja innovatiivsete meetodite integreerimine võiks olla järgmine samm bioloogilise mitmekesisuse ja võõrliikide seire jaoks teabe hankimisel.

## 5. Soovitused seireprogrammi täiendamiseks

Soovitame eDNA põhise analüüsi lülitada lähiajal võõrliikide riiklikusse seire programmi. Selle meetodika peamine eesmärk oleks olla eelhoiatussüsteemiks, et tuvastada võimalikke uusi võõrliike, ka selliseid keda on visuaalselt raske määrata. Invasiivsete võõrliikide puhul on nende varajane avastamine äärmiselt oluline, kuna see võimaldab vajadusel rakendada kiireid vastumeetmeid. Siinkohal tulevad välja eDNA põhiste meetodite eelised, sest väga madalate arvukuste juures on traditsiooniliste meetoditega võõrliikide tuvastamine väga keeruline. eDNA meetodite abil oleks võimalik küllaltki väiksemahulise ja pisteliste proovide kogumise abil kontrollida võõrliikide levimist suurte aladel. Mõlema DNA põhise meetodiga, st metatriipkoodistamine ja üksikute liikide eDNA kvantifitseerimise abil saab üheaegselt analüüsida suurt arvu proove, metatriipkoodistamise abil saab korraga analüüsida lausa sadu proove. Ka saab eDNA proove koguda suurema tihedusega võrreldes klassikaliste loomade kinnipüüdmisel põhineva seiremeetodikaga, mis on aja- ja tööjumahukad ettevõtmised. eDNA põhise seire teiseks eesmärgiks oleks nende olemasolevate võõrliikide, kelle levikust puudub veel piisav andmestik, võimalike esinemisalade tuvastamine. eDNA leiu korral tuleks siiski liigi olemasolu kinnitada elusate organismide tabamisega, ainult eDNA põhine tuvastamine ei ole liigi asurkonna laienemise lõplikuks tõendiks.

## Kasutatud allikad

- Barnes, M.A., Turner, C.R., Jerde, C.L., Renshaw, M.A., Chadderton, W.L., Lodge, D.M., 2014. Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environ. Sci. Technol.* 48, 1819–1827. <https://doi.org/10.1021/es404734p>
- Biggs, J., Ewald, N., Valentini, A., Gaboriaud, C., Dejean, T., Griffiths, R.A., Foster, J., 2015. Using eDNA to Develop a National Citizen Science-Based Monitoring Programme for the Great Crested Newt (*Triturus cristatus*). *Biol. Conserv.* <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.029>.
- Brys, R., Haegeman, A., Halfmaerten, D., Neyrinck, S., Staelens, A., Auwerx, J., Ruttink, T., 2020a. Monitoring of Spatiotemporal Occupancy Patterns of Fish and Amphibian Species in a Lentic Aquatic System Using Environmental DNA. *Mol. Ecol.* <https://doi.org/10.1111/mec.15742>.
- Brys, R., Halfmaerten, D., Neyrinck, S., Mauvisseau, Q., Auwerx, J., Sweet, M., Mergeay, J., 2020b. Reliable eDNA Detection and Quantification of the European Weather Loach (*Misgurnus fossilis*). *J. Fish Biol.* <https://doi.org/10.1111/jfb.14315>.
- Deiner, K., Altermatt, F., 2014. Transport Distance of Invertebrate Environmental DNA in a Natural River, in: *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0088786>
- Deiner, K., Lopez, J., Bourne, S., Holman, L., Seymour, M., Grey, E.K., Lacoursière, A., 2018. Optimising the Detection of Marine Taxonomic Richness Using Environmental DNA Metabarcoding: The Effects of Filter Material, Pore Size and Extraction Method. *Metabarcoding Metagenomics*. <https://doi.org/10.3897/mbmg.2.28963>.

- Deiner, K., Walser, J.-C., Mächler, E., Altermatt, F., 2015. Choice of Capture and Extraction Methods Affect Detection of Freshwater Biodiversity from Environmental DNA. *Biol. Conserv.* <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.018>.
- Dejean, T., Valentini, A., Duparc, A., Pellier-Cuit, S., Pompanon, F., Taberlet, P., Miaud, C., 2011. Persistence of Environmental DNA in Freshwater Ecosystems. *PLoS ONE* 6, e23398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023398>
- Ficetola, G.F., Miaud, C., Pompanon, F., Taberlet, P., 2008. Species Detection Using Environmental DNA from Water Samples. *Biol. Lett.* <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>.
- Geller, J., Meyer, C., Parker, M., Hawk, H., 2013. Redesign of PCR Primers for Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Subunit I for Marine Invertebrates and Application in All-Taxa Biotic Surveys. *Mol. Ecol. Resour.* 13, 851–61.
- Harrison, J.B., Sunday, J.M., Rogers, S.M., 2019. Predicting the Fate of eDNA in the Environment and Implications for Studying Biodiversity. *Proc. Biol. Sci.* 286, 20191409.
- Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L., deWaard, J.R., 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270, 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Herder, A., Valentini, E., Bellemain, T., Dejean, J.J.C.W., Van Delft, P.F., Thomsen, P., Taberlet, 2014. Environmental DNA - a review of the possible applications for the detection of (invasive) species. <https://doi.org/10.13140/RG.2.1.4002.1208>
- Hering, D., Borja, A., Jones, J.I., Pont, D., Boets, P., Bouchez, A., Bruce, K., Drakare, S., Hänfling, B., Kahlert, M., Leese, F., Meissner, K., Mergen, P., Reyjol, Y., Segurado, P., Vogler, A., Kelly, M., 2018. Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive. *Water Res.* 138, 192–205. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2018.03.003>
- Hänfling, B., Handley, L.L., Read, D.S., Hahn, C., Li, J., Nichols, P., Blackman, R.C., Oliver, A., Winfield, I.J., 2016. Environmental DNA Metabarcoding of Lake Fish Communities Reflects Long-Term Data from Established Survey Methods. *Mol. Ecol.* 25, 3101–19.
- Lacoursière-Roussel, A., Howland, K., Normandeau, E., Grey, E.K., Archambault, P., Deiner, K., Lodge, D.M., Hernandez, C., Leduc, N., Bernatchez, L., 2018. eDNA metabarcoding as a new surveillance approach for coastal Arctic biodiversity. *Ecol. Evol.* 8, 7763–7777. <https://doi.org/10.1002/ece3.4213>
- Leray, M., Yang, J.Y., Meyer, C.P., Mills, S.C., Agudelo, N., Ranwez, V., Boehm, J.T., Machida, R.J., 2013. A New Versatile Primer Set Targeting a Short Fragment of the Mitochondrial COI Region for Metabarcoding Metazoan Diversity: Application for Characterizing Coral Reef Fish Gut Contents. *Front. Zool.* 10, 34.
- Piaggio, A.J., Engeman, R.M., Hopken, M.W., Humphrey, J.S., Keacher, K.L., Bruce, W.E., Avery, M.L., 2014. Detecting an elusive invasive species: a diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA. *Mol. Ecol. Resour.* 14, 374–380. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12180>
- R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>
- Saito, T., Doi, H., 2021. Degradation modeling of water environmental DNA: Experiments on multiple DNA sources in pond and seawater. *Environ. DNA* edn3.192. <https://doi.org/10.1002/edn3.192>
- Spens, J., Evans, A.R., Halfmaerten, D., Knudsen, S.W., Sengupta, M.E., Mak, S.S.T., Sigsgaard, E.E., Hellström, M., 2017. Comparison of Capture and Storage Methods for Aqueous Microbial eDNA Using an Optimized Extraction Protocol: Advantage of Enclosed Filter. *Methods Ecol. Evol.* <https://doi.org/10.1111/2041-210x.12683>.
- Thomsen, P.F., Kielgast, J., Iversen, L.L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M.T.P., Orlando, L., Willerslev, E., 2012. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA: SPECIES



MONITORING BY ENVIRONMENTAL DNA. Mol. Ecol. 21, 2565–2573.

<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x>

TÜ Eesti Mereinstituut, 2019. "Mereseire 2019" aruanne

TÜ Eesti Mereinstituut, 2020. "Mereseire 2020" aruanne

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T.L., 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. BMC Bioinformatics 13, 134.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>

## Lisad

Lisa Tabel 1. eDNA saagiste statistiline analüüs sõltuvalt proovivõtu kohast ning kasutatud filtri tüübist. Alumises osas on esitatud erinevate filtritüüpide vaheliste võrdluste tulemused. Uuritud unimudila esinemist, df- vabadusastmete arv, SS - ruutude summa, MSS- keskmine ruutude summa, CI - usalduspiir, P adj - korrigeeritud p väärtus.

<i>Neogobius melanostomus</i>	df	SS	MSS	F väärtus	Pr(>F)
**Filtri.tüüp**	4	171.7	42.93	54.43	0.0001
**Proovivõtu.koht**	1	259.2	259.2	328.6	0.0001
**Jääk**	1164	918.1	0.7887	NA	NA

**Filtri.tüüp**	Erinevus	AlumineCI	ÜlemineCI	p adj
**CN-GF vs CN-CN**	0.3589	0.1501	0.5677	<0.001
**NM_capsule vs CN-CN**	0.3224	0.08895	0.5559	0.002
**SX_capsule vs CN-CN**	0.3987	0.1899	0.6075	<0.001
<b>**CN vs CN-CN**</b>	<b>1.241</b>	<b>1.007</b>	<b>1.474</b>	<b>&lt;0.001</b>
**NM_capsule vs CN-GF**	-0.0365	-0.27	0.197	0.993
**SX_capsule vs CN-GF**	0.03976	-0.1691	0.2486	0.985
<b>**CN vs CN-GF**</b>	<b>0.8819</b>	<b>0.6484</b>	<b>1.115</b>	<b>&lt;0.001</b>
**SX_capsule vs NM_capsule**	0.07626	-0.1572	0.3097	0.900
<b>**CN vs NM_capsule**</b>	<b>0.9184</b>	<b>0.6626</b>	<b>1.174</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>**CN vs SX_capsule**</b>	<b>0.8421</b>	<b>0.6086</b>	<b>1.076</b>	<b>&lt;0.001</b>

Lisa tabel 2. eDNA saagiste statistiline analüüs sõltuvalt proovivõtu kohast ning kasutatud filtri tüübist. Alumises osas on esitatud erinevate filtritüüpide vaheliste võrdluste tulemused. Uuritud karbi *Rangia cuneata* esinemist, df- vabadusastmete arv, SS - ruutude summa, MSS- keskmine ruutude summa, CI - usalduspiirid, p adj - korrigeeritud p väärtus.

---

<i>Rangia cuneata</i>	df	SS	MSS	F väärtus	Pr(>F)
<b>**Filtri.tüüp**</b>	4	124.4	31.09	21.96	<0.001
<b>**Proovivõtu.koht**</b>	1	44.77	44.77	31.63	<0.001
<b>**Residuals**</b>	1164	1648	1.415	NA	NA

---



---

<b>**Filtri.tüüp**</b>	Erinevus	AlumineCI	ÜlemineCI	p adj
<b>**CN-GF vs CN-CN**</b>	0.2146	-0.06515	0.4944	0.223
<b>**NM_capsule vs CN-CN**</b>	-0.3111	-0.6238	0.00170	0.052
<b>**SX_capsule vs CN-CN**</b>	-0.37	-0.6497	-0.09024	0.003
<b>*CN vs CN-CN**</b>	<b>0.5655</b>	<b>0.2527</b>	<b>0.8783</b>	<b>&lt;0.001</b>
NM_capsule vs CN-GF**	-0.5257	-0.8385	-0.2129	<0.001
*SX_capsule vs CN-GF**	-0.5846	-0.8643	-0.3048	<0.001
<b>**CN vs CN-GF**</b>	<b>0.3509</b>	<b>0.03811</b>	<b>0.6637</b>	<b>0.019</b>
SX_capsule vs NM_capsule**	-0.05892	-0.3717	0.2539	0.986
<b>**CN vs NM_capsule**</b>	<b>0.8766</b>	<b>0.5339</b>	<b>1.219</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>**CN vs SX_capsule**</b>	<b>0.9355</b>	<b>0.6227</b>	<b>1.248</b>	<b>&lt;0.001</b>

---

Lisa tabel 3. eDNA saagiste statistiline analüüs sõltuvalt proovivõtu kohast ning kasutatud filtri tüübist. Alumises osas on esitatud erinevate filtritüüpide vaheliste võrdluste tulemused. Uuritud sabalooma esinemist, df - vabadusastmete arv, SS - ruutude summa, MSS- keskmine ruutude summa, CI - usalduspiirid, p adj - korrigeeritud p väärtus.

---

<i>Cercopagis pengoi</i>	df	SS	MSS	F väärtus	Pr(>F)
**Filtri.tüüp**	4	13856	3464	3.937	0.004
**Proovivõtu.koht**	1	35606	35606	40.47	<0.001
**Residuals**	1164	1024090	879.8	NA	NA

---



---

**Filtri.tüüp**	Erinevus	AlumineCI	ÜlemineCI	p adj
**CN-GF vs CN-CN**	3.359	-3.615	10.33	0.681
**NM_capsule vs CN-CN**	3.921	-3.877	11.72	0.645
**SX_capsule vs CN-CN**	9.891	2.917	16.87	0.001
**CN vs CN-CN**	5.348	-2.449	13.15	0.332
**NM_capsule vs CN-GF**	0.562	-7.236	8.36	0.999
**SX_capsule vs CN-GF**	6.532	-0.4425	13.51	0.079
**CN vs CN-GF**	1.989	-5.809	9.787	0.957
**SX_capsule vs NM_capsule**	5.97	-1.828	13.77	0.224
**CN vs NM_capsule**	1.427	-7.115	9.969	0.991
**CN vs SX_capsule**	-4.543	-12.34	3.255	0.503

---

Lisa tabel 4. eDNA saagiste statistiline analüüs sõltuvalt proovivõtu kohast ning kasutatud filtri tüübist. Alumises osas on esitatud erinevate filtritüüpide vaheliste võrdluste tulemused. Uuritud rändkarbi esinemist, df - vabadusastmete arv, SS - ruutude summa, MSS- keskmine ruutude summa, CI - usalduspiirid, p adj - korrigeeritud p väärtus.

---

<i>Dreissena polymorpha</i>	df	SS	MSS	F väärtus	Pr(>F)
<b>**Filtri.tüüp**</b>	4	26.33	6.581	28.35	<0.001
<b>**Proovivõtu.koht**</b>	1	0.8998	0.8998	3.875	0.049
<b>**Residuals**</b>	1164	270.3	0.2322	NA	NA

---



---

<b>**Filtri.tüüp**</b>	Erinevus	AlumineCI	ÜlemineCI	p adj
<b>**CN-GF vs CN-CN**</b>	-0.1307	-0.244	-0.01738	0.0143
<b>**NM_capsule vs CN-CN**</b>	-0.2553	-0.382	-0.1286	<0.001
<b>**SX_capsule vs CN-CN**</b>	-0.2516	-0.3649	-0.1383	<0.001
<b>**CN vs CN-CN**</b>	<b>0.167</b>	<b>0.0403</b>	<b>0.2936</b>	<b>0.003</b>
<b>**NM_capsule vs CN-GF**</b>	-0.1246	-0.2513	0.00208	0.055
<b>**SX_capsule vs CN-GF**</b>	-0.1209	-0.2342	-0.007636	0.030
<b>**CN vs CN-GF**</b>	<b>0.2976</b>	<b>0.171</b>	<b>0.4243</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>**SX_capsule vs NM_capsule**</b>	0.0037	-0.123	0.1303	1
<b>**CN vs NM_capsule**</b>	<b>0.4222</b>	<b>0.2835</b>	<b>0.561</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>**CN vs SX_capsule**</b>	<b>0.4186</b>	<b>0.2919</b>	<b>0.5453</b>	<b>&lt;0.001</b>

---

Lisa tabel 5. eDNA saagiste statistiline analüüs sõltuvalt proovivõtu kohast ning kasutatud filtri tüübist. Alumises osas on esitatud erinevate filtritüüpide vaheliste võrdluste tulemused. Uuritud Virginia keeritsussi esinemist, df - vabadusastmete arv, SS - ruutude summa, MSS- keskmine ruutude summa, CI - usalduspiirid, p adj - korrigeeritud p väärtus.

---

<i>Marenzelleria neglecta</i>	df	SS	MSS	F väärtus	Pr(>F)
<b>**Filtri.tüüp**</b>	4	66.37	16.59	9.812	<0.001
<b>**Proovivõtu.koht**</b>	1	106.9	106.9	63.2	<0.001
<b>**Residuals**</b>	1164	1969	1.691	NA	NA

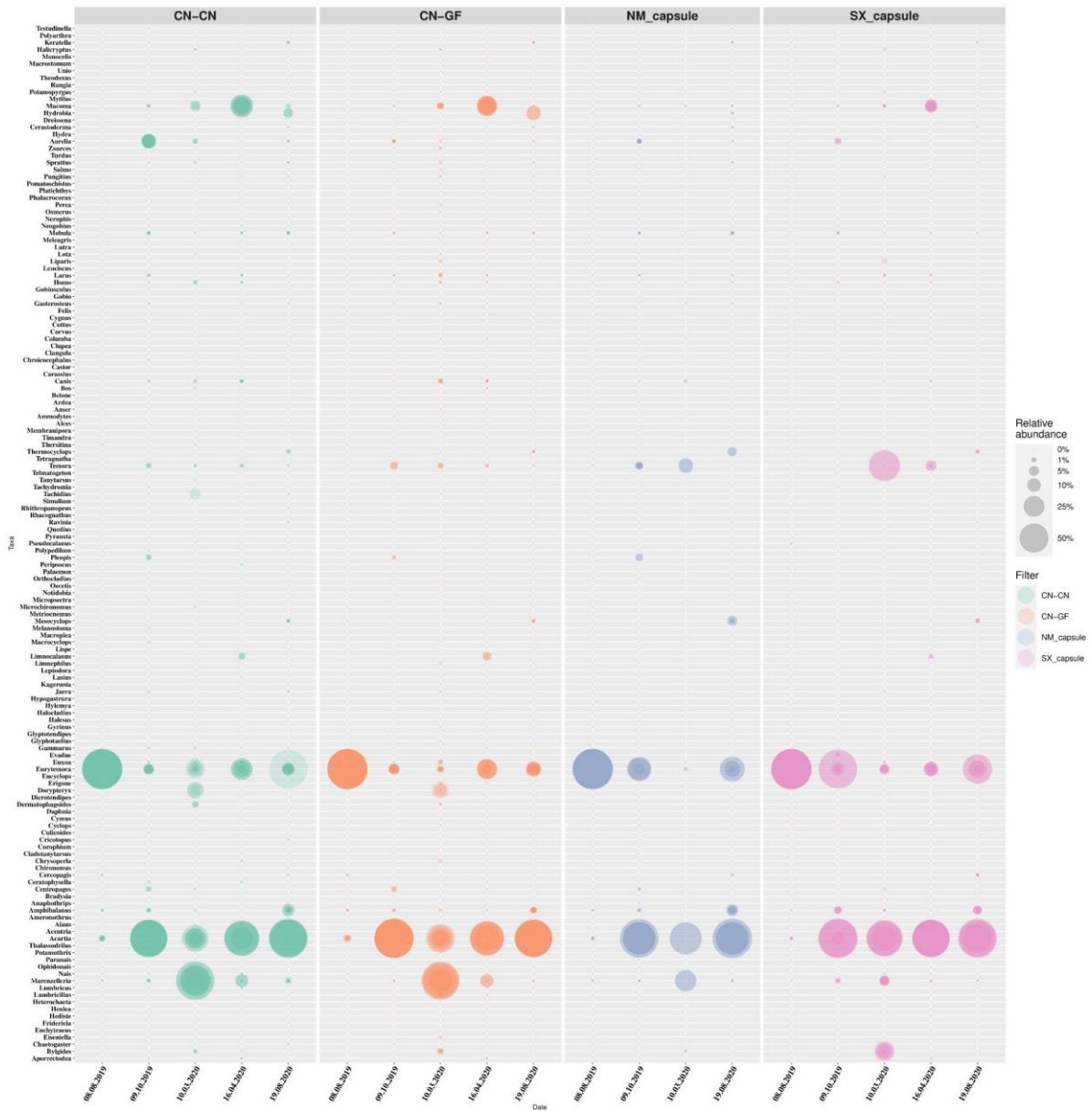
---



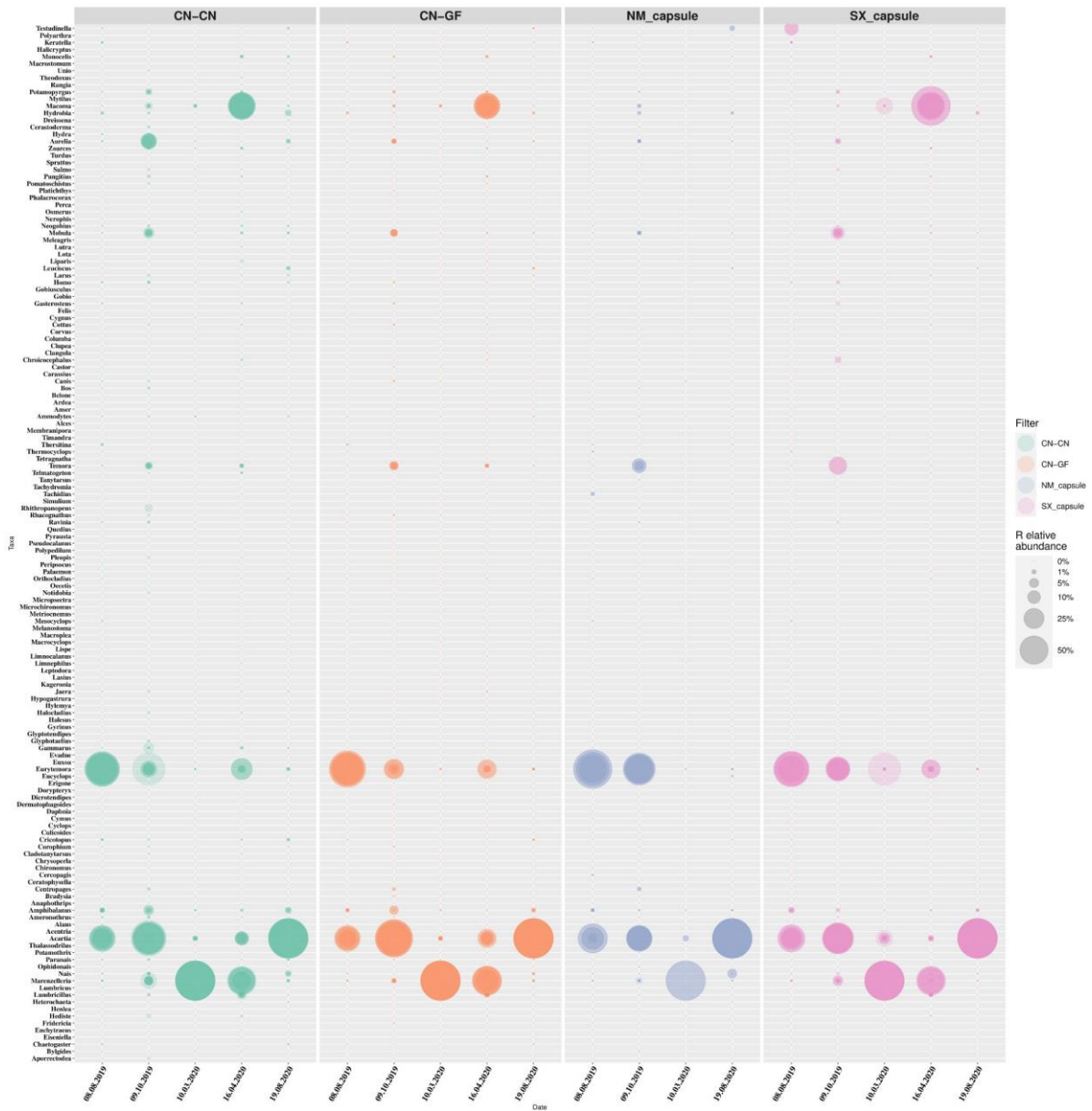
---

<b>**Filtri.tüüp**</b>	Erinevus	AlumineCI	ÜlemineCI	p adj
<b>**CN-GF vs CN-CN**</b>	0.413	0.1072	0.7188	0.002
<b>**NM_capsule vs CN-CN**</b>	-0.07662	-0.4185	0.2653	0.9732
<b>**SX_capsule vs CN-CN**</b>	0.08374	-0.222	0.3895	0.945
<b>**CN vs CN-CN**</b>	<b>0.5799</b>	<b>0.238</b>	<b>0.9218</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>**NM_capsule vs CN-GF**</b>	-0.4896	-0.8315	-0.1477	0.001
<b>**SX_capsule vs CN-GF**</b>	-0.3292	-0.635	-0.02346	0.028
<b>**CN vs CN-GF**</b>	<b>0.1669</b>	<b>-0.175</b>	<b>0.5088</b>	<b>0.670</b>
<b>**SX_capsule vs NM_capsule**</b>	0.1604	-0.1815	0.5022	0.703
<b>**CN vs NM_capsule**</b>	<b>0.6565</b>	<b>0.282</b>	<b>1.031</b>	<b>&lt;0.001</b>
<b>**CN vs SX_capsule**</b>	<b>0.4962</b>	<b>0.1543</b>	<b>0.838</b>	<b>&lt;0.001</b>

---



**Lisa Joonis 1.** Metatriipkoodistamise tulemused Muuga proovides, suhteline arvukus perekonna tasemel määratud mOTUdest.



**Lisa Joonis 2.** Metatriipkoodistamise tulemused Lohusalu proovides, suhteline arvukus perekonna tasemel määratud mOTUdest.