

Inventering av invasiva främmande arter i Vänern

– Kinesisk ullhandskrabba



Titel: Inventering av invasiva främmande arter i Vänern – Kinesisk ullhandskrabba

Tryckår: 2021

ISSN: 1403-6134

Rapportnummer: 126

Författare: Sonja Leidenberger, Andrea Kilströmer och Matthew Herring

Institutionen för biovetenskap Högskolan i Skövde samt Eric Bergwall

Länsstyrelsen Västra Götaland

Foto: Sonja Leidenberger

Utgivare: Vänerns vattenvårdsförbund

Rapporten finns som pdf på www.vanern.se

Copyright: Vänerns vattenvårdsförbund. Kopiera gärna texten i rapporten men ange författare och utgivare. Användande av rapportens fotografier eller bilder i annat sammanhang kräver tillstånd från Vänerns vattenvårdsförbund.

Förord

Rapporten är framtagen inom ett LOVA-finansierat samarbetsprojekt mellan Vänerns vattenvårdsförbund, Länsstyrelsen Värmland, Länsstyrelsen Västra Götaland och Högskolan i Skövde. Högskolan i Skövde fick uppdraget i december 2020 för en förstudie för en inventering av invasiva främmande arter ”IFA” i Vänern. Vänerns vattenvårdsförbund med Länsstyrelserna runt Vänern ser ett stort behov av att tidigt upptäcka invasiva främmande arter för att snabbt kunna bekämpa dessa. Några av Vänerns stora hamnar (Gruvöns bruk, Stora Enso skogshall, Karlstads hamn, Otterbäcken, Kristinehamn, Vänersborg och Lidköping) kan vara bra platser för övervakning.

Högskolan i Skövde fick i uppdrag att genomföra en pilotstudie där en kartläggning av kräftdjur med fokus på ullhandskrabban (*Eriocheis sinensis*) i Vänern skulle genomföras under första halvåret 2021. Vi ansåg att risken för en utbredning av ullhandskrabban är mycket stor. Sista kartläggningen hade gjorts mellan 2004-2010, alltså för mer än 10 år sedan. Andra arter såsom vitfingrad brackvattenskrabba (*Rhithropanopeus harrisii*), röd sumpkräpta (*Procambarus clarkii*), taggkindskräpta (*Fraxonioides limosus*) och gulvårdskräpta (*Faxonius virillis*) är mindre troliga att de förekommer enligt min uppfattning, eftersom de inte har anträffats i närlheten av Vänern eller i Sverige överhuvudtaget.

Det är viktigt att testa och ta fram väl fungerade metoder för en inventering av invasiva främmande arter i Vänern. Lämpliga metoder måste därför testas och anpassas, gärna över ett längre tidsintervall. Generellt är det dock viktigt med tidig upptäckt av främmande arter i vattenmiljön, eftersom det ofta är avgörande för möjliga bekämpningsåtgärder och att skador på den biologiska mångfalden kan förhindras/minimeras. Framtida generationer ska också få möjlighet att uppleva Vänerns ekosystemtjänster (fiske, bra dricksvatten, hälsa och livskvalitet för människan genom en natur i balans) på samma sätt som vi har det idag.

Den här pilotstudie har förhoppningsvis lagt grunden för ett fortsatt arbete med invasiva främmande arter i Vänern, ett arbete som kommer ha en stor ekologisk betydelse för framtiden.

Vi vill ta chansen att tacka all yrkes- och fritidsfiskare som deltog i vår telefonintervju och talade om för oss om sina observationer, erfarenheter och fynd av kinesiska ullhandskrabbor i Vänern. Utan ert engagemang hade vår kartläggning inte varit möjligt i samma omfattning. Tusen tack för er goda vilja att delta och tala om för oss!

*Sonja Leidenberger, Projektledare,
Institutionen för Biovetenskap,
Högskolan i Skövde
15:e Oktober 2021*

Innehåll

Inventering av invasiva främmande arter i Vänern	1
– Kinesisk ullhandskrabba.....	1
Förord.....	3
Innehåll.....	4
Inledning.....	5
Metoder	7
1) Telefonintervju av fiskare.....	7
2) Provfiske.....	7
3) Klassisk fältinventering.....	9
4) Sedimentprovtagning för molekylära analyser.....	10
Resultat och Diskussion	11
1) Telefonintervju av fiskare.....	11
2) Provfiske.....	13
3) Klassisk fältinventering.....	13
4) Sedimentprovtagning för molekylära analyser.....	13
Sammanfattning och Slutsats	14
Förslag till åtgärder och för möjliga nästa steg	15
1) Ersättning till yrkesfiskare för insamling av krabbor.....	15
2) Metodutveckling för övervakning av ullhandskrabban	15
3) Problematiken med barlastvatten.....	16
Referenser.....	17
Bilagor	19
Bilaga I - Frågekatalog från telefonintervju med fiskare.....	19
Bilaga II – Metodbeskrivning om DNA-metabarcoding med MiDeca Primer.....	20
Bilaga III – Metodbeskrivning PCR och qPCR med Primern A+B	21
Bilaga IV – Detaljerade resultat av telefonintervjuer.....	22
Bilaga V – Resultat med MiDeca Primer	24
Bilaga VI – Resultat med COI+ITS primern med PCR och qPCR	26
Vänerns vattenvårdsförbund.....	28
Medlemmar.....	28
Mer information.....	28

Inledning

Den kinesiska ullhandskrabban (*Eriocheir sinensis* H. Milne Edwards, 1853) har sitt ursprung i Kina, i västra Stilla Havet. Den kom för första gång till Europa 1912, där den upptäcktes i bifloden Aller i norra Tyskland (Peters 1933). Redan två år senare kom rapporter från närliggande vattendrag så som Elbefloden. Idag kämpar flera europeiska länder, såsom Tyskland, Belgien och Storbritannien, med en massförekomst av den kinesiska ullhandskrabban. Introduktionen av krabban har skett genom en omedveten förflyttning och frisläppning genom barlastvatten. Stora fartyg pumpar sitt barlastvatten in och ut vid av- och pålastning för att ge fartygen stabilitet och i dessa vattenmängder kan det sedan finnas stora/vuxna individer av krabban eller även juvenilstadier i sedimentet (Gollasch et al. 2002).

Ullhandskrabban lever största delen av sitt liv i sötvatten, där den växer under flera år från ett juvenil- till ett vuxenstadium (Bentley 2011). Vuxna individer vandrar sen tillbaka till havet, där parning och spridning av larvstadier sker i det marina vattnet. Parningsvandring är en stor påfrestning, vilket förklarar varför reproduktion endast sker en gång för att sedan efterföljas av att krabban dör. Hanar dör efter parningen, honor efter frisläppning av larverna i havet. När det sista frisimmande larvstadiet omvandlas till ett bottenlevande juvenilstadium, kan krabban börja migrera från brackvattenmiljön till en sötvattensmiljö som floder och sjöar. Här växer den sedan till en vuxen individ. Salthalt och temperatur har visats vara två avgörande faktorer under larvutvecklingen och det är endast inom strikta salthalts- och termoeraturintervaller som larverna kan fullborda alla utvecklingssteg (Anger 1991). Vuxna individer kan också vandra stora distanser över land (Panning 1938).

Enligt EU förordningen (EU förordning nr 1143/2014) om invasiva främmande arter, alltså arter som sprids med mänskans hjälp utanför deras naturliga utbredningsområde, så tillhör ullhandskrabban en av de 100 värsta invasiva främmande arter som kan förorsaka stora ekonomiska skador och hotar vår biologiska mångfald (Lowe et al. 2004).

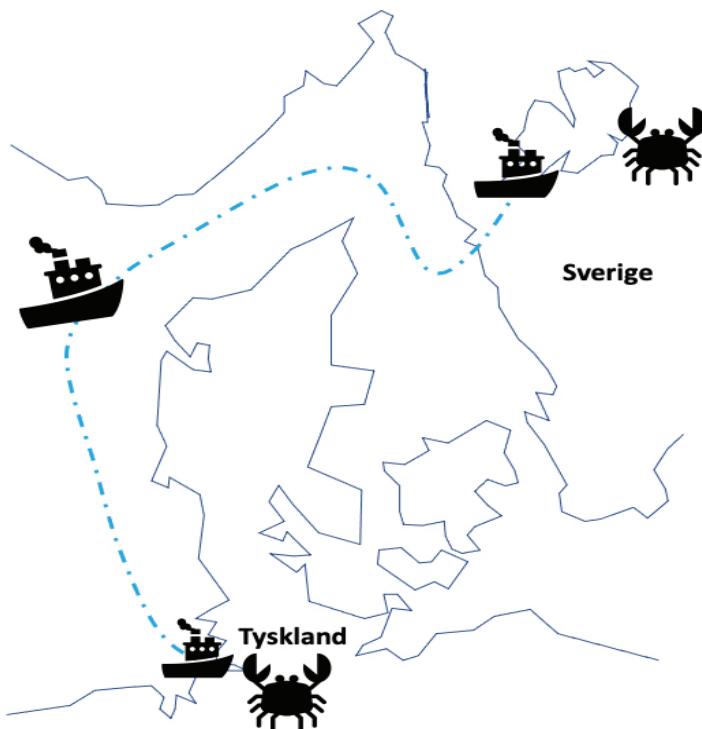
Det finns flera kända hot och problem som kan uppstå om ullhandskrabban skulle etablera sig i Vänern. Ullhandskrabban är en allätare (Panning, 1938) detta kan leda till allvarliga konsekvenser för inhemska arter, eftersom krabban kan konkurrera ut dem baserat på födo- och habitattillgång. En annan effekt kan vara att krabban äter upp fiskrom samt små ryggradslösa djur och slår ut ömtåliga fiskbestånd. Ullhandskrabban kan också ge sig direkt på fiskar som sitter fast i näts, äta upp betet samt potentiellt orsaka skador på fiskeredskap (Gollasch 2011), vilket kan ge en negativ påverkan på det yrkes- och fritidsfiske som bedrivs i Vänern idag.

Svoboda et al. (2014) genomförde en studie där de analyserade om sötvattenslevande krabbor kan vara överförningsvektor av svampen *Aphanomyces astaci* som orsakar kräftpesten. Bland annat undersöktes kinesiska ullhandskrabbor från en lokal i södra Vänern och analysresultaten bekräftade att arten kan vara bärare av kräftpesten då samtliga provtagna krabbor redan var infekterade. Den kinesiska ullhandskrabban kan därmed vara en spridningsvektor för kräftpesten och det kan få förödande

konsekvenser för vår utrotningshotade inhemska flodkräfta (*Astacus astacus*), speciellt då den kan vandra från ett infekterat vatten via land till ett opåverkat vatten.

Då ullhandskrabban tidigare har visat ett stort vandringsbeteende (Panning 1938, Bentley 2011) kan vandring av individer ske i olika riktningar från Vänern. Om krabban skulle vandra genom Klarälven till Norge skulle det betyda en stor risk för en spridning av kräfpest där. Än så länge är Norge dock kräfpestfria. Vandrar kraborna mot söder, alltså ner längs Göta älvadalen skulle det betyda en stor potential för rasrisk av älvens branta sidor, eftersom ullhandskrabbor kan gräva ordentlig i flodkanter och dammar och perforera dessa (Panning 1938).

Första fyndet av ullhandskrabban i Sverige gjordes redan 1936 i Bråviken (Östersjön/Östergötland), lite senare i Mälaren och där mera regelbunden från 1990-talet. I Vänern upptäcktes första fyndet 1954 (HaVs Faktablad 2016). Under 2004 gjordes sedan flera fynd av ullhandskrabbor i Kinneviken utanför Lidköping av fiskare i deras fiskeredskap. Detta pågick sedan frekvent till och med år 2010 (Drotz et al. 2010). Därefter verkade invasionen ha minskat igen. Genetiska studier kunde visa att individer i Vänern, insamlade mellan 2003–2008, kom från en population i Elbe River i Tyskland (Czerniejewski et al. 2012) förmödlig med fartygets barlastvatten (*Figur 1*).



Figur 1: Bilden visar var utvandringsrutsen är mellan 2004–2008. Design och ritning: Sonja Leidenberger

Idag utgår man från att det inte finns en stabil population av ullhandskrabbor i Sverige på grund av för kalla vinter. Dessa blir dock allt mer isfria, varmare och kortare, varför risken blir allt större att ullhandskrabban kunde teoretisk etablera en stabil population i Sverige. Vänerns vattenvårdsförbund med länsstyrelserna i Värmland och Västra Götalands län ansåg efter mer än 10 år, att en ny kartläggning

av ullhandskrabbor i Vänern behövdes och gav Högskolan i Skövde uppdrag för en pilotstudie om ullhandskrabbor i Vänern som genomfördes nu under våren 2021.

Syftet med den här pilotstudien var att kartlägga förekomsten av invasiva främmande arter i Vänern, med fokus på den kinesiska ullhandskrabban (*Eriocheir sinensis*). Under studien har olika klassiska och nya fältmetoder testas som lämpar sig för en tidig upptäckt av både juveniler och/eller vuxna individer av ullhandskrabban. Slutsatser om fynd och möjliga orsaker görs i slutet av rapporten. Det finns också några förslag för möjliga åtgärder och vad som kunde göras som nästa steg för en långsiktig övervakning för att motverka en invasion och utbredning av invasiva främmande arter, men speciellt en etablering av ullhandskrabban, i Vänern.

Metoder

Inom ramen för denna förstudie har vi använt oss fyra olika metoder: 1) insamling av fångstinformation genom telefonintervju med yrkesfiskare; 2) provfiske i de områden där förekomst av kinesisk ullhandskrabba har pekats ut av yrkesfiskare; 3) test om en klassisk fältinventering med vattenrikare fungerar som provtagningsmetod för invasiva främmande arter och 4) sedimentprovtagning för molekylära analyser, så kallade miljö-DNA/e-DNA (från engelska environmental DNA, där man spåra genetiska avtryck som celler, avföring, m.m.) från organismer i vattenmiljön. Det är en relativ ny metod som testas inom miljöövervakningen under de senaste åren för att försöka få en bättre bild av artförekomst. Metoden har mer och mer används för att spåra invasiva främmande arter (Hardulak et al. 2019, Klymus et al. 2107).

1) Telefonintervju av fiskare

Pilotstudien började med en systematisk telefonintervju av yrkesfiskare. Det finns total 50 yrkesfiskare runtom i Vänern idag. Fiskare fick en frågekatalog där de skulle svara på frågor om krabbor (Kinesisk ullhandskrabba) de har sett i Vänern. Frågor var t.ex. var någonstans de hade sett krabban, när på året de hittade krabban, med vilket redskap osv. (för närmare detaljer se *Bilaga I – Frågekatalog från telefonintervju med fiskare*). Eftersom vi också frågade om det känner några andra som eventuell kunde ha sett krabbor, fick vi tips om fyra fritidsfiskare som också intervjuades med samma frågekatalog för vår pilotstudie.

2) Provfiske

Provfiske genomfördes tillsammans med Länsstyrelsen Värmland i områdena som pekades ut av yrkesfiskare och fritidsfiskare där de har observerat kinesisk ullhandskrabba. Att välja dessa lokaler ökade sannolikheten att fånga krabban. Målet med provfisket var att utvärdera val av fångstmetod, för att på så sätt utveckla en effektiv provtagning av främmande krabbor i Vänern.

Två olika typer av fångstredskap placerades ut under perioden maj-juni 2021 i Karlstad, Kristinehamn, Vänersborg, Lidköping och Otterbäcken. På varje lokal placerades två rörfällor (*Figur 2*) och en ålryssja ut (*Figur 3*). Redskapen placerades ut i områden som var lättåtkomliga med vadarbyxorna från land samt så hade de en sandigt till lerigt bottensubstrat. Samtliga redskap placerades på ett djup om cirka 1,5-2 m och låg i under ungefär 72 timmar. Fällorna agnades med kräftpellets, vilket specifikt framtagits för att attrahera kräftdjur.

Valet av rörfälla som fångstredskap syftar till att fånga mindre individer, alltså juveniler av kräftdjur. Fällan är konstruerad för provtagning av mindre kräftdjur på Kristinebergs marina forskningsstation (Matz Berggren, Göteborgs Universitet). Redskapet består av ett modifierat plaströr (stuprör) med en tratt i ena änden för att leda in kräftdjur och finmaskigt nät i den andra änden för att förhindra att fångsten rymmer (*Figur 2*). I mitten av rörfällan sitter ett modifierat falkonrör, i vilket agn kan placeras. Tyngder på vardera sidan om rörfällan, säkerställer att rören ligger stilla på bottnen och förtjäningslinan, med tillhörande boj, markerar platsen.



Figur 2: Översiktsbild över två av de rörfällor som placerades ut i de områden som pekats ut av yrkesfiskare som hotspots områdena. Fotograf: Sonja Leidenberger.

Ålryssja som användes i provfiske täremot syftar till att fånga större, alltså vuxna individer. För att få tillåtelse att använda denna typ av redskap, har en dispens utfärdats från Länsstyrelsen Värmland samt Länsstyrelsen Västra Götaland. Dispens gällde för hela Vänern inom projektets ramar. En ålryssja, i detta fall 10 m lång, är utformad att ligga på bottnen och hålls på plats med hjälp av de vikter som sitter på mittarmen (*Figur 3*). För att sträcka ut ålryssjan, samt öppna upp fångthusen, placerads extra vikter i vardera änden av redskapet. Ålryssjan utrustades även med en boj för tydlig uppmärkning i vattnet. Organismer, som lever i nära anslutning till bottnen, leds på detta vis in och kvarhålls längst ut i de så kallade fångstkassarna.



Figur 3: Översiktsbild av en av de ålyssjor som användes i projektet. Fotograf: Eric Bergwall.

Både typer av redskap som användes i pilotstudien möjliggör således riktat provfiske av alla storleksklasser/åldersklasser av kinesisk ullhandskrabba.

3) Klassisk fältinventering

En provtagningsmetod som tidigare har visat sig vara framgångsrik både för kinesisk ullhandskrabba i Storbritannien (Gilbay *et al.* 2008) samt för blåskrabba (*Hemigrapsus sanguineus*) på västkusten (pers. kom. Anna Dimming, Länsstyrelsen Västra Götalands län), är klassisk fältinventering av potentiellt utsatta områden. Fältinventering utfördes i ett avgränsat provtagningsområde i Kinneviken ($58,3149^{\circ}\text{N}$, $13,0752^{\circ}\text{E}$). I den östra delen av Kinneviken ligger en sandstrand med varierande bottensubstrat. Bland annat återfinns sandiga och leriga områden, grus- och stenblocksinblandad botten, samt partier med växtlighet i form av vass och näckrosor. Utöver Kinneviken gjordes också en fältinventering i Mariestadsvenen ($58,4159^{\circ}\text{N}$, $13,4500^{\circ}\text{E}$). Väster om Mariestad ligger en skyddad sandstrand med varierande bottensubstrat. Provtagningslokalen bestod av zoner med sand, sten samt vassbestånd. Fältinventeringen av kinesisk ullhandskrabba genomfördes på kvällstid sista veckan i juni 2021.

Båda områdena kan klassas som hotspots för kinesisk ullhandskrabba i Vänern. Genom en aktiv visuell avläsning av lokalerna, med hjälp av vattenkikare samt genom att vända på stenar och annat löst liggande material, uppstår möjligheten att påträffa krabbor som annars inte skulle fångas av ett passivt fiskeredskap.

4) Sedimentprovtagning för molekylära analyser

A) Primer sökning och test

I ett första steg söktes det i litteraturen och databaser för möjliga primrar som tidigare har använts för genetiska studier av den kinesiska ullhandskrabban. Följande primrar hittades i vår förstudie:

- A) COI: mlCOIintF (Leray *et al.* 2013) och jgHCo2198 (Geller *et al.* 2013) samt PMT1 och PMT2 (Tang *et al.* 2003, Folmer *et al.* 1994), som primer av proteinkodande gener i mitokondrie-DNA (mtDNA) av genen för subenheten I av cytokrome Coxidas (COI)
- B) ITS: PT1 och PT3 primer baserad på 18S, 5.8srDNA och 28S rDNA sekvenser (Czerniejewski *et al.* 2012, Tang *et al.* 2003)
- C) MiDeca primer (Komai *et al.* 2019) baserad på 16S rRNA gen utvecklad för metabarcoding miljö-DNA för storkräftdjur (Decapoda).

För att testa dessa olika primrar (A+B) tog vi muskelvävnad från fyra olika krabbor: kinesisk ullhandskrabba (*Eriocheir sinensis*: U1), räfflad simkrabba (*Liocarcinus depurator*: L1), rödvit eremitkräfta (*Pagurus bernhardus*: P1) och maskeringskrabba (*Hyas araneus*: H1). Ullhandskrabban är den enda krabban av valda arter som förekommer i sötvatten. Vävnadsprover extraherades med DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) enligt tillverkarens instruktioner. Ullhandskrabban kom från Vänern och fångades på 10 meters djup i Otterstad, Lidköping av Lars Löfholm (Rapport i Artportalen 2021-04-03). Övriga krabbor fångades i Gullmarsfjord 2020 i ramen av Sonja Leidenbergers pågående FORMAS projekt (*Stoppa biodiversitetsförlusten genom förbättrad spårning av hotade evertebrater*).

B) Sedimentprover

Provtagning av sediment genomfördes på tre olika platser, nämligen i Kristinehamn (59.162282°N, 14.3620°E, K1-3), Lidköping (58.305389°N, 13.83701°E, L1-3) och Vänersborg (58.231162°N, 12.192508°E, V1-3) den 5:e resp. 6:e maj 2021. Tre delprover samlades in vid varje lokal två gånger (totalt 6 prover per lokal). Två negativa kontroller samlades in i Axvall (58.225905°N, 13.344867°E, C1-2). Vid provtagning följdes riktlinjer av Pawłowski *et al.* (2020) för sedimentprover.

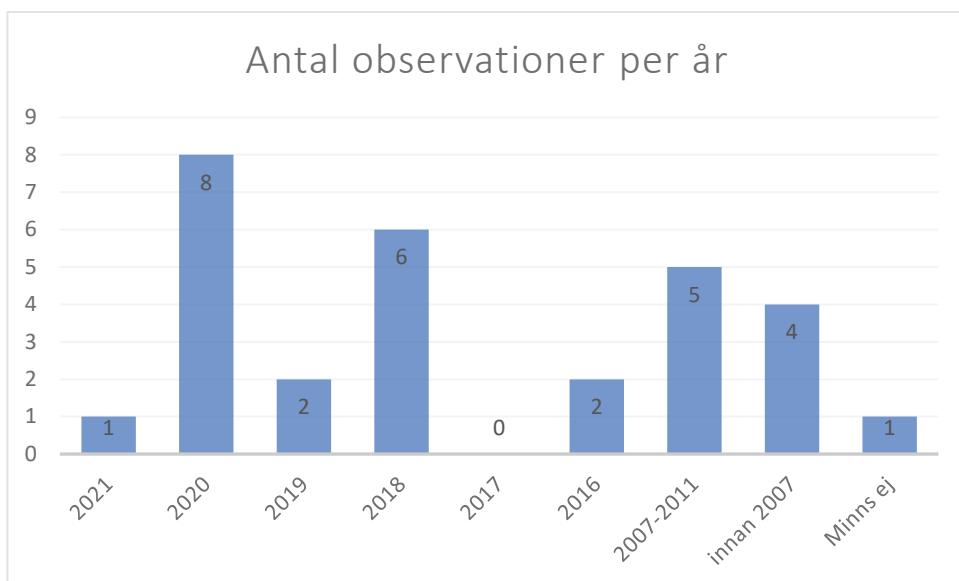
Sedimentproverna analyserades sen med två olika miljö-DNA-metoder: a) med metabarcoding och b) med qPCR. För båda metoder extraherar man det genetiska materialet från själva sedimentprovet och amplifierar sedan målgenen genom en Polymerase Chain Reaction (PCR) resp. qPCR (quantitative PCR).

Hälften av sedimentproverna och tre prover med muskelvävnad av ullhandskrabban skickades för extraktion och metabarcoding analys med MiDeca primer till ett laboratorium till Tyskland. För metodbeskrivning om DNA-metabarcoding se *Bilaga II* (på engelska). Som test extraherades tre av sedimentproverna (Vänern – V1, Lidköping L1 och Axvall C2) med olika PCR och qPCR-metoder med primarna som nämnts ovan (A+B) på DNA-laboratoriet vid Högskolan i Skövde. För metodbeskrivning se *Bilaga III* (på engelska).

Resultat och Diskussion

1) Telefonintervju av fiskare

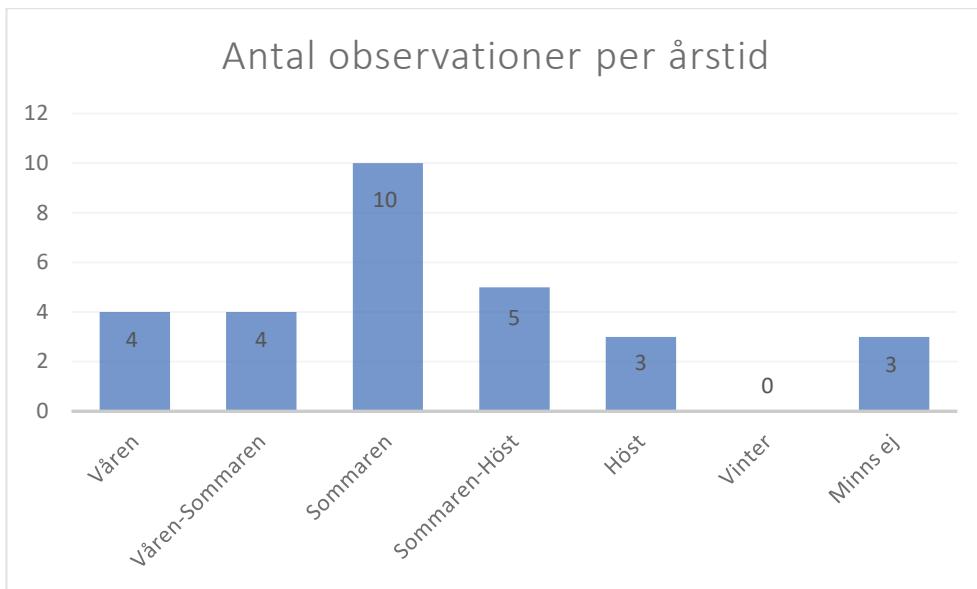
Totalt deltog 34 (68%) av 50 verksamma yrkesfiskare i telefonintervju, samt 4 fritidsfiskare. Tre yrkesfiskare angav att de fiskar tillsammans med släkt, partner eller andra fiskare som också har en yrkes-licens för att fiska i Vänern. Total har 70,6% (24 stycken) av deltagande yrkesfiskare observerat ullhandskrabbor i Vänern. Av de fyra fritidsfiskarna har bara en av dem fångat en ullhandskrabba under våren 2021. Man ser tydligt två olika toppar av observationer, den första mellan 2004-2010, sen en stagnering (2012-2017) och de senaste tre åren (2018-2020) ser man en ökning igen med total 16 observationer. Den sista toppen är dessutom högre än för 15 år sedan.



Figur 3: Antal observationer (total 29) av ullhandskrabbor av yrkesfiskare per år i Vänern mellan 2004-2021. Några svarade med flera årtal där de hade sett krabbor. Observation från 2021 var av en fritidsfiskare.

De flesta observationerna gjordes i Lidköping (Kinneviken), Mariestad och Kristinehamn. En yrkesfiskare berättade om stora antal individer av ullhandskrabbor i fiskeredskapen den senaste tiden (2019: 107 resp. 2020: 125 individer per år). Det var totalt fyra yrkesfiskare som rapporterade två årtal där de har observerat krabbor i Vänern. De flesta yrkesfiskarna (79%) som gjorde fynd av krabbor berättade också om regelbundna observationer (flera gånger under samma år) av ullhandskrabbor i Vänern, både tidigare och under senare år.

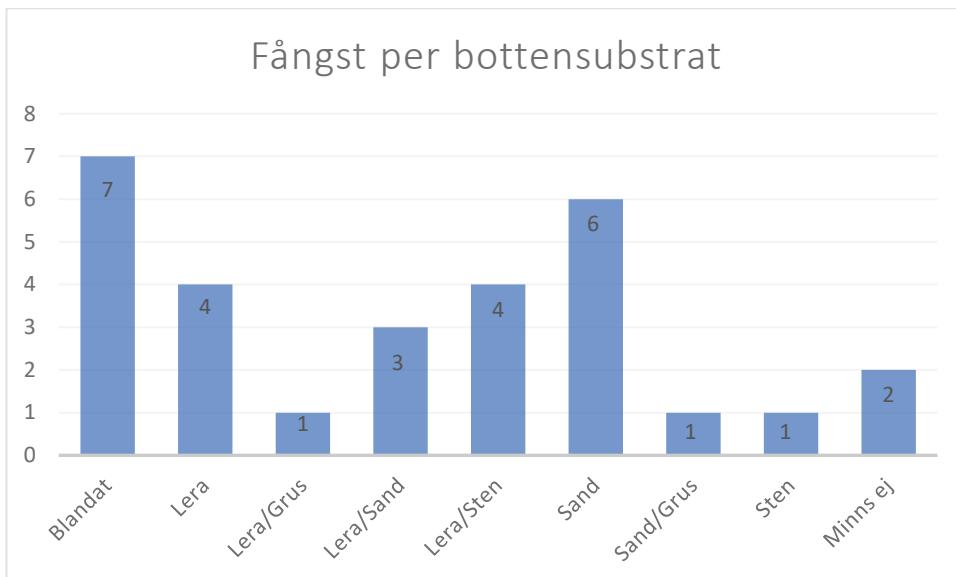
När vi frågade efter antal observationer per årstid blev det tydlig att de flesta fynden gjordes under sommaren och sommaren till höst (*Figur 4*), medan inga observationer gjordes under vintern i Vänern. Observationer under våren gjordes av en fritidsfiskare.



Figur 4: Antal observationer (total 29) av ullhandskrabbor per årstid i Vänern.

Fångsten av ullhandskraborna har skett mest med bottensatta nät (40-85cm) (17 gångar) eller i storryssja (maskstorlek 26–70 cm) (9 gångar) och i ett fall med en lite ålyrssja. Tre av yrkesfiskare mindes ej fångstmetoden. Djupet varierade för bottensatta nät mellan 4,5-40m, för storryssja mellan 0-10m och för den ålyssjan mellan 2-3m.

De flesta fångsterna har gjorts på mjukbotten, bara en endaste fångst har skett på stenbotten. De dominerande bottensubstrat var sand, lera, lera/sten och blandat material (*Figur 5*). Ullhandskraborna gillar ju att gräva in sig i sand och lera så det var nog ett förväntat resultat.



Figur 5: Fångst av ullhandskrabban per olika typer av bottensubstrat i Vänern.

Alla observationer som har gjorts i Vänern var från ”stora” (=vuxna) individer. I tre fall kunde fiskare ange kön (”hane”). Flera detaljer om resultaten se *Bilaga IV*.

2) Provfiske

Provfiske efter kinesisk ullhandskrabba genererade inte några fynd av ullhandskrabban. Dock indikerade den initiala kartläggningen av kinesisk ullhandskrabba, baserad på telefonintervju med yrkesfiskare och fritidsfiskare, att arten skulle förekomma i de områden som valdes ut för provfiske.

Då provfisket utformades så att det skulle vara lätt att genomföra från land och med vadarbyxorna, kan det ha resulterat i att fiskeredskapen inte kom på tillräckligt djupt i vattnet. Provtagningslokalerna kan även ha varit felplacerade, detta då det på några platser var mycket svårt att ta sig fram i terrängen och då strandzonen till mestadels bestod av fyllnadsmaterial samt stenhällar. Fiskeredskapen placerades i de områden som uppskattades som mest naturliga ur en ekologisk synvinkel, något som givetvis var svårt att klassificera då området inte undersöktes under vattenytan innan provfiske.

Ytterligare orsaker varför provfisket inte lede till några fångster kan ha varit:

- A)** Fel årstid för provfiske. Rörfällorna och ålryssja lades ut i maj-juni, medan yrkesfiskare berättade om flest fångster under sommaren resp. sommar/höst.
- B)** För kort tidsintervall av utlägg av redskap. Ett längre utlägg hade ökat sannolikheten att generera några fångster, men tidsramen för anställda i pilotstudie var begränsade, varför inga längre utlägg med regelbundna kontroller kunde genomföras.
- C)** Användning av icke optimalt fångredskap för ullhandskrabban. Yrkesfiskare fångade krabborna mest med bottensatta nät resp. storryssja och bara i ett fall med en lite ålryssja.

3) Klassisk fältinventering

Fältinventeringen av kinesisk ullhandskrabba genererade inte i några nya fynd av arten. Under inventeringen påträffades dock signalkräfta (*Pacifastacus leniusculus*) i Kinneviken, bärandes på färdigutvecklade juveniler. Med detta fynd kan vi bekräfta att större kräftdjur kan överleva i strandzonen på denna lokal. Även flertalet hålor observerades i samma område, vilket indikerar på att fler kräftdjur bor i denna lokal. I Mariestadsvennen, observerades inga sådana bohålor.

4) Sedimentprovtagnings för molekylära analyser

Ullhandskrabban kunde inte hittas med MiDeca Primer i sedimentproverna. Det kan bero på att det inte fanns spår av krabban i de insamlade prover, eller andra faktorer som kan ha påverkat analysen (t.ex. negativ PCR amplifikation genom inadekvat provfixering eller extrem nedbrytning av eDNA före fixering). MiDeca Primer kan fungera för ullhandskrabban, eftersom det är det endaste sötvattenkrabban primer binder för enligt Koimai *et al.* (2019).

Tester med COI och ITS primrarna visade att ITS är nog mer lämplig än COI primrar vilket också upptäcktes av Czerniejewski *et al.* 2012. ITS1 fungerade lite bättre än ITS2, men PT1 primern kan binda på många olika organizmer (t.ex. svampar, olika kräftor, fiskparsiter etc.) vilket förmodligen är orsaken till varför även den negativa kontrollen visade ett band. Dessutom så är PT2R primerns 3' ände inte specifik. Primrarna verkar alltså inte lämpliga när man letar efter en specifik art. De testade primerpare är bättre att se mer som en kontroll att metoden (qPCR) fungerar, mer än för att hitta ullhandskrabban. Mer art-specifika primrar skulle behövas, men det skulle ta längre arbetstid för utveckling och testkörning vilket inte fanns under pilotprojektets korta tidsintervall (6 månader).

Sammanfattning och Slutsats

Telefonintervju med yrkesfiskare och fritidsfiskare kartlägger en tydlig ökat förekomst av vuxna individer i Vänern inom de senaste tre åren (2018-2020) jämfört med åren innan (2012-2017). Alarmerande är också de stora antal av observationer från mer än 100 vuxna individer i Kinneviken (2019 och 2020).

Vår kartläggning visar att det finns generellt flera fynd och observationer på den västra sidan av Vänern (mellan Vänersborg och Kristinehamn) jämförd med den östra sidan (mellan Karlstad och Mellerud) (*Figur 6*).



Figur 6: Kartan över antal observationer av ullhandskrabban enligt intervjuade yrkesfiskare och fritidsfiskare i pilotstudie. Design och ritning: Sonja Leidenberger

Däremot har fortfarande inga juvenila individer av ullhandskrabban upptäckts i Vänern, varken från fiskare eller genom vårt provfiske. Det är nog ett positivt besked, eftersom det vore ett bevis för en etablerad population av den kinesiska ullhandskrabban.

I nuläget är det dock oklart varifrån dessa stora mängder vuxna individer de senaste åren kommer ifrån. Transport från fartygets barlastvatten är dock mest sannolikt.

Provfiske kan förbättras och behöver förmodligen genomföras med bottensatta nät och/eller storryssja på större djup, men framförallt under en annan årstid (sommar till höst). Även rörfällorna för juvenilfångst skulle med fördel placeras i Göta älv för övervakning av eventuella uppwandrande juveniler från Älvmynningen upp till Vänern.

Som molekylär metod verkar qPCR en bra metod för att upptäcka en målart, men för ullhandskrabban behövs mer art-specifika primer som i nuläget inte är publicerade.

Förslag till åtgärder och för möjliga nästa steg

1) Ersättning till yrkesfiskare för insamling av krabbor

Enligt vår intervju med yrkesfiskare förekommer det regelbundet observationer och fångster i Vänern i de så kallade hotspotområdena. Dessa fynd är i nuläget ej rapporterade i rapporteringssystemet *Rappen.nu – Rapportering för vattenlevande organismer* (Havs- och vattenmyndighet) – vilket gör att t.ex. en årlig kartläggning av fynd av ullhandskrabban i Vänern blir mycket svår att genomföra. Man skulle kunna inrätta ett system där yrkesfiskare får ersättning för sin rapportering av observationer av ullhandskrabbor med en samtidig bortblockning (stykpris per fångad och rapporterad individ till exempel). Om yrkesfiskare också kunde samla in krabbnor skulle andra analyser kunde göras med materialet (t.ex. mätning av carapax-storlek, könsbestämning samt genetiska analyser för att kontrollera vilken ursprungspopulation individen kommer ifrån).

2) Metodutveckling för övervakning av ullhandskrabban

Både provfiske och molekylära metoder behöver utvecklas för en övervakning av ullhandskrabban i Vänern. Här vore det bäst om båda metoderna kunde testas parallellt under några år framöver för att samla in mer erfarenheter och genomföra klassiska vs. nya molekylära metoder. Provfisket måste genomföras över hela säsongen dock minst våren till hösten och över större djup. Här skulle det satsas mycket mer på rörfällorna som kan upptäcka eventuella juvenilstadier. Ett samarbete med utvalda yrkesfiskare i hotspotområdena vore ett bra tillvägagångssätt.

Angående miljö-DNA prover skulle man kunna fortsätta testa sedimentprover, men kanske även testa för vattenprover. I alla fall behövs art-specifika primrar. Här är det dock viktigt att *data sharing* om primrarna mellan olika intressenter förbättras för att spara tid. Bara en snabb upptäckt av invasiva främmande arter kan leda till ett agerande så som t.ex. bortplockning eller större satsning till en övervakning av hot-spot-områden.

3) Problematiken med barlastvatten

Sverige har sen många år en barlastvattenlag (2009:1165). År 2017 trädde dessutom den internationella barlastvattenkonventionen i kraft, som signeras av de flesta länder i världen. Sveriges regeringen beslutade i det sammanhanget också en barlastvattenförordning (SFS 2017:74). Samma år införde Transportstyrelsen föreskrifter om hantering och kontroll av fartygs barlastvatten och sediment (TSFS 2017:73) som ändrades i slutet av 2019 (TSFS 2019:103).

Barlastvattenkonventionen gäller även i Vänern för internationella fartyg, men sen ikrafträdande av den internationella konventionen finns en övergångsperiod från 2017 till år 2024. Under denna övergångsperiod kommer det att ske installation av utrustningen för ballastvattenhantering vid alla fartyg, något som tar tid och ofta görs när service och kontroll av fartygen genomförs (ungefärligt inom ett 5-årsintervall för de flesta fartyg) (pers. kom. Henrik Ramstedt, Transportstyrelsen, 2021-10-14). Utrustning för ballastvattenhantering består i första hand av filtrering, men även av UV-strålning, klorering/elektroklorering eller kemisk behandling som är godkänd av IMO (International Maritime Organization). Varje fartyg måste även föra en barlastvattenhanteringsplan och dagbok. Transportstyrelsen kan genomföra dokumentationskontroller men har även möjligheter för provtagningar (pers. kom. Henrik Ramstedt, Transportstyrelsen, 2021-10-14).

På grund av förekomst av ullhandskrabbor i delvis stort antal, är det fortfarande mest sannolikt att den troligaste vägen in till Vänern är genom barlastvattnet. Detta eftersom det hittills inte har rapporterats några observationer av juvenilstadier. När övergångsperioden av den nya barlastvattenkonventionen har passerat (i slutet av 2024) skulle det teoretiskt sett inte kunna förekomma några stora mängder av vuxna individer av krabbor i Vänern eller att antalet minskar årligen. Krabborna kan leva upp till 5 år i sötvatten innan parning ska ske i marint vatten. Det är alltså av yttersta vikt att det sker en regelbunden kartläggning och övervakning av ullhandskrabban under närmaste tiden men dock minst till och med 2025-2026.

Om det fortfarande efter åren 2025-2026 kvarstår samma problematik med vuxna ullhandskrabbor i stora antal kan flera dokumentationskontroller och/eller provtagningar av barlastvatten vara aktuella för Vänern. Den andra möjliga förklaringen till eventuella frekventa fynd av vuxna individer efter 2025-2026 kan vara att ullhandskrabban har lyckats att etablera en stabil population i Vänern. Om så blir fallet gäller det att fortsätta hitta bevis för det, i form av observationer av krabbanas juvenilstadier.

Referenser

Anger K (1991) Effects of temperature and salinity on the larval development of the Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis* (Decapoda: Grapsidae). *Marine Ecology Progress Series* 72: 103-110

Bentley MG (2011) The global spread of the Chinese Mitten Crab *Eriocheir sinensis*. In: Galil BS, Clark PF, Carlton JT (eds.) In the wrong place – alien marine crustaceans: distribution, biology and impacts. Invading Nature – Springer Series in Invasion Ecology 6, Springer, pp. 107-128.

Czerniejewski P, Skuza L, Drotz MK & Berggren M (2012) Molecular connectedness between self and non self-sustainable populations of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*, H. Milne Edwards, 1853) with focus to the Swedish Lake Vänern and the Oder and Vistula River in Poland. *Hereditas* 149:55-61

Drotz MK, Lundin K, Aneer G, Berggren M, Lundberg S & von Proschwitz T (2010) Kräftgång för ullhandskrabban. *Fauna & Flora* 105:3, 2010.

Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R, Vrijenhoek R (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3:294–299.

Geller L, 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-taxon biotic surveys. *Molecular Ecology Resources* 13: 851-861.

Gilbay V, Attrill MJ, Coleman RA (2008) Juvenile Chinese mitten crabs (*Eriocheir sinensis*) in the Thames estuary: distribution, movement and possible interactions with the native crab *Carcinus maenas*. *Biological Invasions* 10: 67-77

Gollasch S (2011) NOBANIS – Invasive Alien Species Fact Sheet – *Eriocheir sinensis*. – From: Online Database of the European Network on Invasive Alien Species – NOBANIS www.nobanis.org, Date of access 13/10/2021.

Gollasch S, MacDonald DW, Beldon S, Botnen H, Christensen JT, Hamer JP, Houvenhagel G, Jelmert A, Lucas I, Masson D, McCollin T, Olenin S, Person A, Walletius I, Wetsteyn LPMJ, Wittling T (2002) Life in ballast tanks. In: Leppäkoski E, Gollasch S, Olenin S (eds) Invasive aquatic species of Europe. Distribution impacts and management. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, London, pp 217–231.

Hardulak LA, Monriniere J, Hausmann A, Hendrich L, Schmidt S, Doczkal D, Müller J, Hebert PDN, Haszprunar G (2019) DNA metabarcoding for biodiversity monitoring in a national park: Screening for invasive and pest species. *Molecular Ecology and Resources* 2020:001-16.

Havs- och vattenmyndighet (2016) Faktablad *Eriocheir sinensis* - Kinesisk ullhandskrabba – Havs och Vatten myndigheten
<https://www.havochvatten.se/download/18.1690613b166605675de4bf35/1599212248193/faktablad-eriocheir-sinensis.pdf>

Klymus KE, Marshall NT, Stepien CA (2017) Environmental DNA (eDNA) metabarcoding assays to detect invasive invertebrate species in the Great Lakes. *PLoS ONE* 12(5):e0177643.

Komai T, Gotoh RO, Sado T, Miya M (2019) Development of a new set of PCR primers for eDNA metabarcoding decapod crustaceans. *Metabarcoding and Metagenomics* 3:1-19.

Leray M, Yang J Y, Meyer CP, Mills SC, Agudelo N, Ranwez V, Boehm JT, Machida RJ (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. *Frontiers in Zoology* 10:34

Lowe S, Browne M, Boudjelas S & De Poorter M (2000) 100 of the World's Worst Invasive Alien Species A selection from the Global Invasive Species Database. Published by The Invasive Species Specialist Group (ISSG) a specialist group of the Species Survival Commission (SSC) of the World Conservation Union (IUCN), 12pp. November 2004.

Panning A (1938) The Chinese mitten crab. *Annual Report Smithsonian Institution* 361-375.

Pawlowski J, Apothéloz-Perret-Gentil L, Mächler E, Altermatt F (2020) Environmental DNA applications in biomonitoring and bio-assessment of aquatic ecosystems. Guidelines. Federal Office for the Environment, Bern. Environmental Studies. no. 2010: 71 pp.

Peters N (1933) Lebenskundlicher Teil. In: Peters N, Panning A Schnakenbeck W (eds) Die chinesische Wollhandskrabbe (*Eriocheir sinensis* H. Milne-Edwards) in Deutschland. *Zoologischer Anzeiger* pp 59–155

Svoboda J, Strand DA, Vrålstad T et al. (2014) The crayfish plague pathogen can infect freshwater- inhabiting crabs. *Freshwater Biology* 59:918-929.

Tang B, Zhou K, Song D, Yang G, Dai A (2003) Molecular systematics of the Asian mitten crabs, genus *Eriocheir* (Crustacea: Brachyura). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 29:309-316.

Bilagor

Bilaga I - Frågekatalog från telefonintervju med fiskare

Har du sett krabbor (Kinesisk ullhandskrabba) i Vänern?

1. Var någonstans var du då?

- Lokal:
 - GPS-koordinater, longitud/latitud

2. När på året hittade du krabban?

- Tidpunkt:
 - Månad/Kvartal/årstid
- Hur många krabbor såg/fångade du?
 - Antal:

3. Vilket redskap använde du?

- Garn/bur

4. Vilket djup var det på?

-

5. Har du någon uppfattning om hur stort skalet var (cm)?

- Storlek (ungefärlig):

6. Kunde du se om det var en hane eller en hona?

-

7. Har du sett krabbor vid flera tillfällen?

- Ja/nej
 - Var det på samma plats eller annan lokal?
 - Tidpunkt:
 - Antal:
 - Redskap:
 - Storlek
 - Kön:

Känner du till någon annan som har sett krabbor i Vänern?

1. Har du kontaktuppgifter till den personen?

-

2. Vet du var hen fiskade?

-

3. Vet du tid på året som hen fiskade?

-

Bilaga II – Metodbeskrivning om DNA-metabarcoding med MiDeca Primer

1. Sample preparation and DNA extraction

All procedures were conducted on a sterile bench under a laminar-flow hood. A total of 10 sediment samples were prepared for DNA extraction (V1-3, K1-3, L1-3 and a negative control). Additionally, three samples of *Eriocheir sinensis* were used to obtain genomic DNA of the target species, which was used to test the PCR primers.

Circa 1 g of each sediment sample and the three tissue samples were suspended in 1.5 mL sterile tubes with 180 µL of T1 buffer (Macherey-Nagel, Düren, Germany) and 25 µL of proteinase K. The samples were incubated overnight at 65°C. The DNA extraction was completed using the NucleoSpin Tissue Kit (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Germany) according to manufacturer instructions.

A second extraction was performed on the sediment samples with the same amount of material (ca. 1 g) using the NucleoSpin Soil Kit (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Germany), a DNA extraction kit specifically developed for PCR inhibitor-rich samples. The DNA extraction was performed following manufacturer instructions.

A third extraction was performed on the sediment samples with the complete remaining material. The sediment was homogenized using ceramic beads and then processed for extraction using the NucleoSpin Soil Kit (Macherey-Nagel GmbH, Düren, Germany) according to the manufacturer's instructions.

2. PCR amplifications

In order to restrict the taxonomic range of the PCRs a set of oligonucleotides specifically designed to target only crustaceans (Komai et al., 2019) was used. These nucleotides amplify a 154-184 bp fragment of the mitochondrial encoded 16S. The primer efficiency on the target species was tested with a PCR using the genomic DNA extracts. The amplification was performed using the KaPa HiFi HotStart Ready Mix (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) containing 1 µL of each primer (10 pmol/µL), 1–2 µL of DNA extract and molecular grade water to a final volume of 25 µL. The PCR was performed using the following cycling protocol: initial denaturation 95°C for 3 minutes; 35 cycles of denaturation at 98°C for 20 seconds, annealing at 60°C for 15 seconds and extension at 72°C; final extension at 72°C for 1 minute. PCR products were visualized on a 1.7% agarose gel stained with GelRed® (Biotium, Inc. Fremont, CA, USA).

Extracts from sediment samples were processed similarly to the tissue samples, but using 8 µL of eDNA extracts and 45 amplification cycles. Different replicates of PCR amplifications were performed on the various extracts (Tissue Kit and Soil Kit, see details below). In the different replicates we also used the AccuStart II PCR ToughMix (QuantaBio, Beverly MA, USA).

Bilaga III – Metodbeskrivning PCR och qPCR med Primern A+B

1. Sample preparation and DNA extraction

All procedures were conducted on a sterile bench. Sediment was gently dried on Whatman filter paper using a Büchner flask and appropriate funnel to remove traces of ethanol. DNA extraction from sediment was performed with 5 to 8g (dry weight) of sediment using the DNeasy Powermax Soil Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instruction.

2. PCR amplifications

PCR with ITS primers was performed in 30 μ L reactions with 1 U Taq DNA polymerase (Thermo scientific), 250nM forward and reverse primers, 2mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs (Thermo scientific) and 20ng of template DNA. Thermocycling conditions were: 2 minutes at 95°C followed by 30 cycles of 1 min at 95°C, 30 sec at 55°C, 90 sec at 72°C and a final extension for 7 min at 72°C. 10 μ L of PCR product was mixed with 2 μ L 6X loading dye and run at 80 V on a 1.2% agarose gel.

PCR with COI primers PMT1/2 and mlCOIintF/jgHCO2198 were performed in 30 μ L reactions with 1 U Taq DNA polymerase (Thermo scientific), 250nM forward and reverse primers, 2mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs (Thermo scientific) and 25ng of template DNA. Thermocycling conditions were: 2 minutes at 95°C followed by 30 cycles of 45 sec at 95°C, 45 sec at 55°C, 60 sec at 72°C and a final extension for 7 min at 72°C. 10 μ L of PCR product was mixed with 2 μ L 6X loading dye and run at 80 V on a 1.2% agarose gel.

Touchdown PCR was performed in 20 μ L reactions with 1 U Taq DNA polymerase (Thermo scientific), 300nM forward and reverse primers, 2mM MgCl₂, 0.5 mM dNTPs (Thermo scientific) and 20ng of template DNA. Thermocycling conditions were 2 min at 95°C, 16 cycles of 10 sec at 95°C, 30 sec at 62°C (decreasing by 1°C each cycle) and 60 sec at 72°C and finally 25 cycles of 10 sec at 95°C, 30 sec at 46°C and 60 sec at 72°C.

Touchdown qPCR was performed in 10 μ L reactions using SYBR Select Master Mix (Applied Biosystems), 300nM each primer and 20ng of template DNA. Thermocycling conditions were the same as for touchdown PCR with the exception of 40 cycles being run instead of 25, and the addition of a melt curve. Fluorescence was measured during the last 40 cycles. The qPCR amplicon from sediment samples was subsequently mixed with 2 μ L of 6X loading dye and run at 80 V on a 1.2% agarose gel.

Bilaga IV – Detaljerade resultat av telefonintervjuer

NR	Fynd	Flera ggr	Lokal	Ort	År	Årstid	Redskapstyp	Djup (m)	Substrat
1	Ja	Ja	Kinneviken	Lidköping	2020	Sommar-Höst	Storryssja	0-5	Sand
1	Ja	Ja	Kinneviken	Lidköping	2019	Sommar-Höst	Storryssja	0-5	Sand
2	Ja	Ja	Kållandsö	Lidköping	2020	Sommar	Nät	20	Lera/Grus
3	Ja	Ja	Raholmen	Kristinehamn	2020	Vår-Sommar	Storryssja	1,5-10	Blandat
3	Nej	Nej	Kristinehamn	Kristinehamn	Alla		Nät	15-35	Blandat
4	Ja	Ja	Kinneviken	Lidköping	2011	Sommar-Höst	Storryssja	2-6	Sand
4	Nej	Nej	Kållandsö	Lidköping	Alla		Nät	50	Blandat
4	Nej	Nej	Kållandsö	Lidköping	Alla		Siklöjenät	50	Blandat
5	Ja	Nej	Läckö	Lidköping	2019	Sommar	Nät	15-20	Sand
5	Nej	Nej	Hindens rev och N om Spiken	Lidköping	Alla		Nät	15-20	Lera
5	Nej	Nej	Hindens rev och N om Spiken	Lidköping	Alla		Kräftbur	15-20	Lera
6	Nej	Nej	N om Kållandsö V ut i Dalbosjön	Lidköping	Alla		Siklöjenät	Ytan-15	Sand/Grus
7	Ja	Nej	Svartskär	Säffle	2016	Minns ej	Nät		Sten
7	Nej	Nej	Dalbosjön	Säffle	Alla		Nät	12-30	Sten
8	Nej	Nej	Dalbosjön, N Hindens rev	Lidköping	Alla		Nät	8-30	Lera/Sten
8	Nej	Nej	Dalbosjön, N Hindens rev	Lidköping	Alla		Kräftbur	2-10	Lera/Sten
9	Nej	Nej	Mårön, Askevik	Gullspång	Alla		Nät	15-20	Lera/Sten
9	Nej	Nej	Mårön, Askevik	Gullspång	Alla		Storryssja	15-20	Lera/Sten
10	Nej	Nej	Vänerns näs, Dalbosjön	Säffle	Alla		Nät	12-35	Blandat
11	Ja	Ja	Gullspång	Gullspång	2018	Sommar-Höst	Nät	15	Sand/Grus
11	Nej	Nej	Gullspång	Gullspång	Alla		Laxnät (bojade)	12	Sand/Grus
12	Ja	Ja	NÖ Lakholmen	Kristinehamn	2020	Höst	Nät	4,5-7,5	Lera
13	Ja	Ja	Kinneviken (Värmeverket)	Lidköping	2018	Sommar	Storryssja	0-4,5	Sand
13	Nej	Nej	Hindens rev	Lidköping	Alla		Nät	20-30	Lera
13	Nej	Nej	Hindens rev	Lidköping	Alla		Kräftbur	0-30	Lera
14	Ja	Ja	Brandsfjorden	Vänernsborg	2018	Sommar	Storryssja	2-9	Sand/Lera
14	Ja	Ja	Dätttern	Vänernsborg	2005	Sommar	Storryssja	2-9	Sand/Lera
15	Ja	Ja	S om Torsö, Mariestads viken	Mariestad	2020	Sommar	Nät	10-20	Blandat
16	Ja	Ja	Vänernsborgsviken	Mellerud	2018	Vår-Sommar	Nät	18-30	Lera
16	Nej	Nej	Vänernsborgsviken	Mellerud	Alla		Kräftbur		
16	Nej	Nej	Vänernsborgsviken	Mellerud	Alla		Siklöjenät		
17	Ja	Ja	Lakholmen	Kristinehamn	2016	Sommar	Nät	22-28	Lera/Sten
17	Nej	Nej	Lakholmen	Mariestad	Alla		Kräftbur		
18	Nej	Nej	Gullspång	Gullspång	Alla		Nät	12-30	Lera/Sten
18	Nej	Nej	Gullspång	Gullspång	Alla		Nät (bojade)	12-30	Lera/Sten
19	Ja	Ja	Sunnanå Mellerud skärgård	Mellerud	2011	Sommar	Liten ålryssja	2-3	Lera
19	Nej	Nej	V Dalbosjön, Säffle ner till Vänernsborg	Mellerud	Alla		Nät	15-30	Lera
19	Nej	Nej	V Dalbosjön, Säffle ner till Vänernsborg	Mellerud	Alla		Kräftbur		
20	Ja	Ja	Hällekis	Götene	2011	Höst	Nät	10-30	Lera

NR	Fynd	Flera ggr	Lokal	Ort	Ar	Årstid	Redskapstyp	Djup (m)	Substrat
21	Ja	Nej	Hammarö hörna	Gullspång	2018	Vår-Sommar	Nät	10-30	Blandat
21	Nej	Nej		Gullspång	Alla		Nät (bojade)	60-70	Blandat
22	Nej	Nej	N om Hindens rev	Lidköping	Alla		Siklöjenät	Ytan-6	Sand/Lera
22	Nej	Nej	N om Hindens rev	Lidköping	Alla		Nät	15-20	Sand/Lera
23	Nej	Nej	Värmlandssjön, upp mot Mariestad	Lidköping	Alla		Nät	16-24	Lera
24	Nej	Nej	Kinneviken	Lidköping	Alla		Nät	15-35	Blandat
24	Nej	Nej	Kinneviken	Lidköping	Alla		Nät (bojade)	15-35	Blandat
25	Nej	Nej	S om Hindens rev, ner mot Vänersnäs	Lidköping	Alla		Storryssja	1-10	Blandat
25	Nej	Nej	S om Hindens rev, ner mot Vänersnäs	Lidköping	Alla		Kräftbur	1-10	Blandat
26	Ja	Ja	N Brommö	Mariestad	2011	Sommar	Nät	10-30	Blandat
27	Ja	Ja	Brommö, längs Onsö ner till Hällekis	Mariestad		Vår-Sommar	Nät	10-40	Blandat
27	Nej	Nej	Brommö, Djurö, Hällekis	Mariestad	Alla		Siklöjenät	Ytan-	Blandat
28	Ja	Nej	Mellerud skärgård	Mellerud	1990tal	Minns ej	Minns ej		Minns ej
28	Nej	Nej	Mellerud och Köpmannebro	Mellerud	Alla		Nät	12-20	Lera
29	Nej	Nej	Öster om Karlstad	Karlstad	Alla		Nät	6-7	Lera
30	Ja	Nej	Minns ej	Mariestad	2000tal	Minns ej	Minns ej		Minns ej
30	Nej	Nej	Runt Kalvö, Brommö	Mariestad	Alla		Nät	10-20	Blandat
30	Nej	Nej	Runt Kalvö, Brommö	Mariestad	Alla		Siklöjenät		Blandat
31	Ja	Ja	Medhamns skärgård	Kristinehamn	2018	Sommar	Nät	15-30	Lera/Sten
32	Ja	Ja	Infarten till Kristinehamn	Kristinehamn	2007	Sommar-Höst	Storryssja	15-20	Sand/Lera
32	Nej	Nej	Kristinehamn och västerut, Fallskären	Kristinehamn	Alla		Nät	10-20	Sand/Lera
32	Nej	Nej	Kristinehamn och västerut, Fallskären	Kristinehamn	Alla		Kräftbur	10	Sand/Lera
33	Ja	Ja	Medhamns skärgård	Kristinehamn	2020	Vår	Nät	12-35	Lera/Sten
33	Ja	Ja	Otterbäcken	Kristinehamn	1997	Vår	Nät	12-35	Lera/Sten
33	Nej	Nej	Medhamns skärgård	Kristinehamn	Alla		Nät (bojade)	12	Lera/Sten
34	Ja	Ja	Mariestadssjön	Mariestad	2020	Höst	Storryssja	0-6	Blandat
34	Ja	Ja	Storebank (söder om Djurö)	Mariestad	2020	Vår	Nät	10-35	Blandat
34	Nej	Nej	Mariestadssjön	Mariestad	Alla		Kräftbur	1-14	Blandat
A	Nej	Nej	Medhamns skärgård	Kristinehamn	Alla		Nät	15-20	Sten
B	Nej	Nej	Medhamns skärgård	Kristinehamn	Alla		Nät	10-20	Sten
C	Nej	Nej	Medhamns skärgård	Kristinehamn	Alla		Nät	10-20	Sten
D	Ja	Nej	Kinneviken	Lidköping	2021	Vår	Nät	10	Sand

Nr. 1-34: yrkesfiskare, A-D: fritidsfiskare

Redskap: Nät = Nät (bottensatta)
Siklöjenät = Siklöjenät (bojade)

Bilaga V – Resultat med MiDeca Primer

In the test for primer efficiency, the amplification of the target fragment was observed in all *E. sinensis* samples. A fragment of 275 bp encompassing both the amplicon (171 bp) and the combination of primers and Illumina overhang adapters (104 bp) was clearly visible in the gel electrophoresis (*Figure 1*).

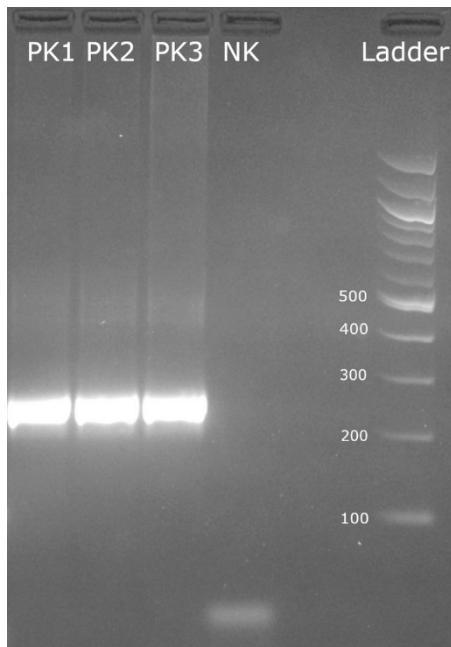


Figure 1. Test of the crustacean specific primers on the *E. sinensis* samples. The bright bands represent the PCR products (PK1-3). The expected fragment length of 275 bp can be verified with the reference ladder on the right side. NK: negative control.

The optimal annealing temperature for the amplification was also tested with a gradient PCR. A first gradient PCR was performed with the KaPa HiFi HotStart Ready Mix setting a series of 12 temperatures ranging from 50°C to 60°C. After unsuccessful amplification (*Figure 2*) the reaction was repeated with the AccuStart II PCR Tough Mix on the second extracts (Soil Kit) in order to account for potential inhibitors. Also in this second attempt the amplification was unsuccessful (*Figure 2*).

Despite the unsuccessful amplification a series of PCR tests were made on the eDNA extracts using the annealing temperature provided by Komai et al. (2019), but even in this case no results were obtained. Assuming a low concentration of eDNA in the samples, we performed a final extraction using the complete amount of remaining sediment (described above), but that resulted also in no amplification success (*Figure 3*).

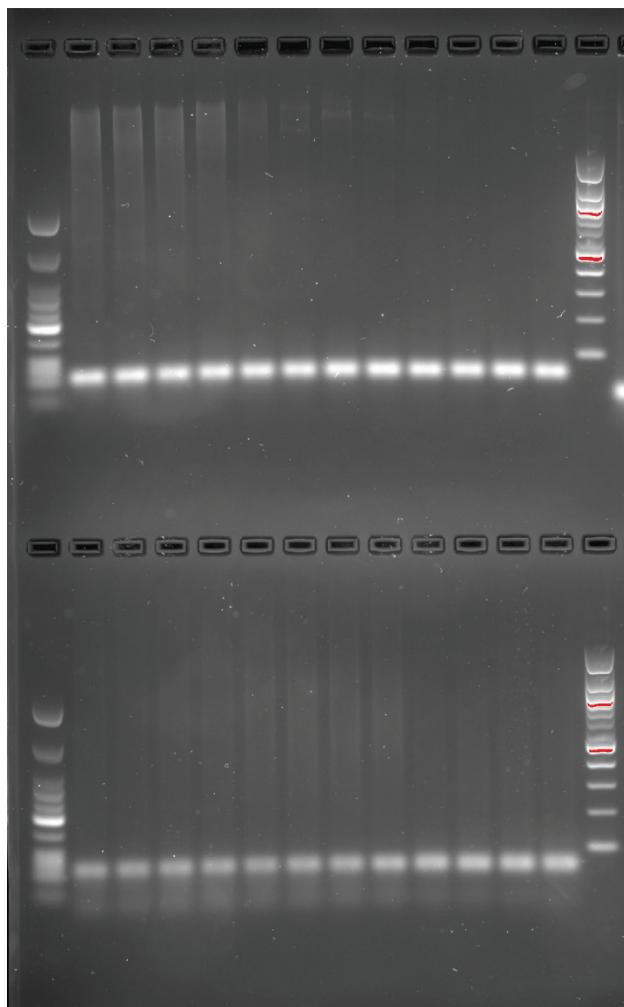


Figure 2. Testing for the optimal annealing temperature for the PCR primers. The upper row shows the PCR performed with the KaPa HiFi HotStart Ready Mix, the lower row that with the AccuStart II PCR Tough Mix. Ladders for product length measurements are on the left (Low Range lanes) and right of the figure.

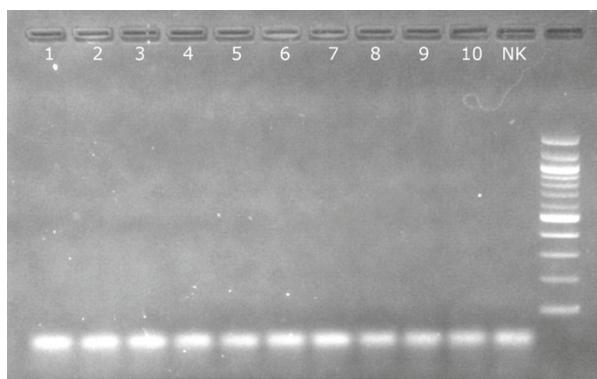


Figure 3. Test of PCR amplification on eDNA extracts obtained from the maximum amount of sediment. The PCR was performed using the condition described under PCR amplifications with the AccuStart II PCR Tough Mix.

Bilaga VI – Resultat med COI+ITS primern med PCR och qPCR

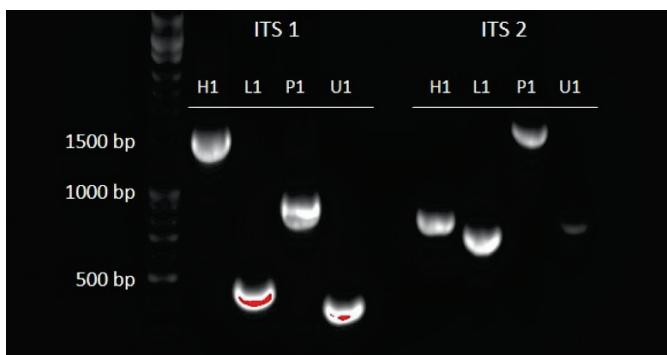


Figure 1: Results of the PCR test on the four different crab tissues (H1, L1, P1, U1) with the ITS1 and ITS2 primers (2021-06-22).

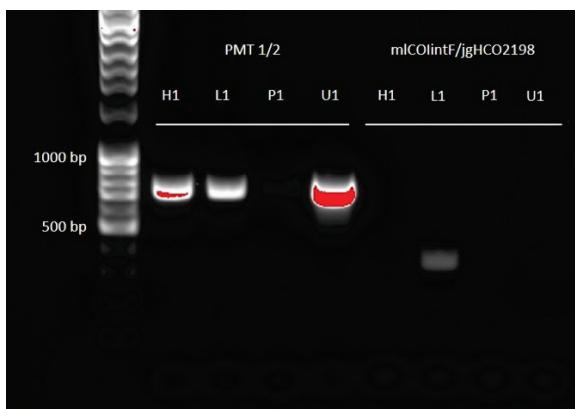


Figure 2: Results of the PCR test on the four different crab tissues (H1, L1, P1, U1) with COI primers (2021-06-23).

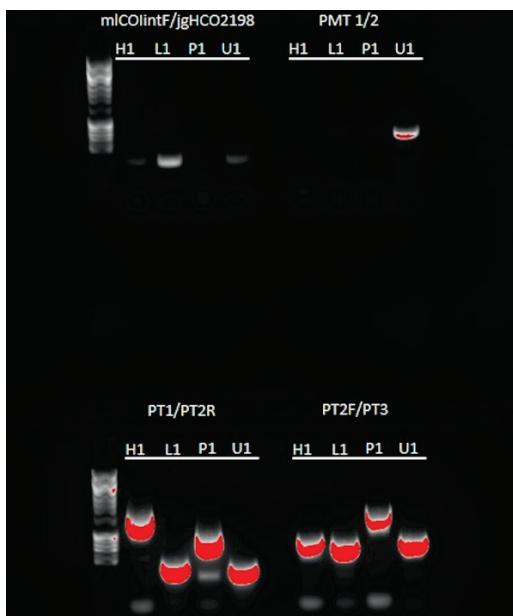


Figure 3: Results of Touchdown PCR test on the four different crab tissues (H1, L1, P1, U1) with COI and ITS primers (2021-06-24).

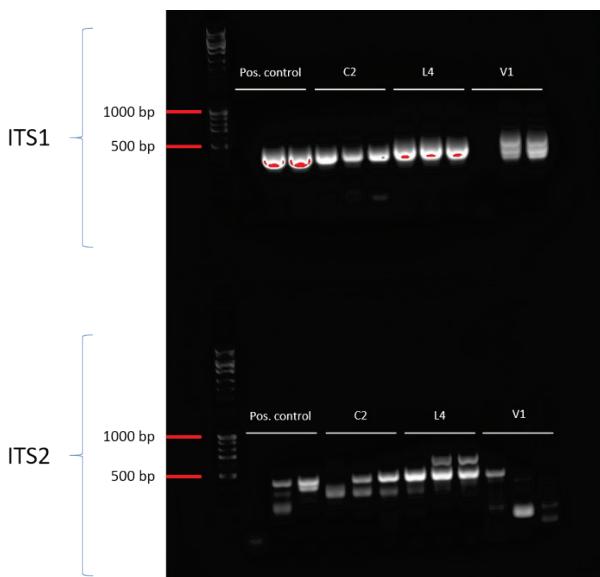


Figure 4: Results of Touchdown qPCR test on the three sediment samples and positive control with the ITS primers (2021-07-01).

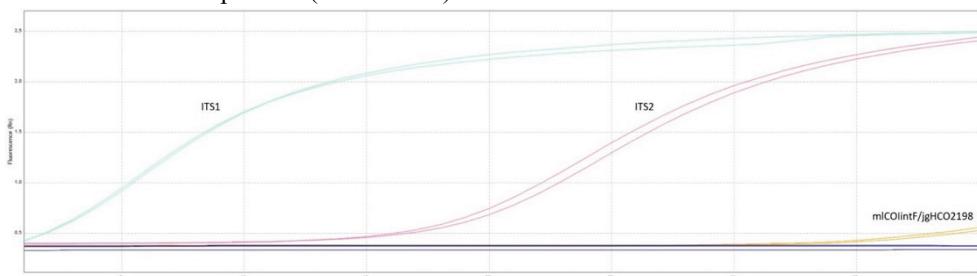


Figure 5: Amplifications curves tested for TD-qPCR on crab tissues for primers ITS1+2.

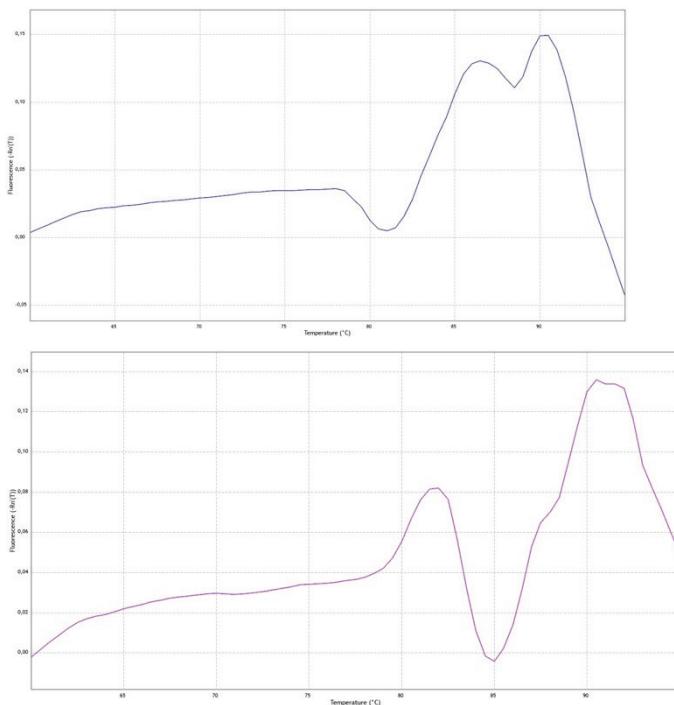


Figure 6: Analysis of melt curves indicated amplification of multiple amplicons. Above: ITS1 primer and below ITS2 primer.

Vänerns vattenvårdsförbund

Vänerns vattenvårdsförbund är en ideell förening med totalt 75 medlemmar varav 37 stödjande medlemmar. Medlemmar i förbundet är alla som nyttjar, påverkar, har tillsyn eller i övrigt värnar om Vänern.

Förbundet ska verka för att Vänerns naturliga miljöförhållanden bevaras genom att:

- fungera som ett forum för miljöfrågor för Vänern och för information om Vänern
- genomföra undersökningar av Vänern
- sammanställa och utvärdera resultaten från miljöövervakningen
- formulera miljömål och föreslå åtgärder där det behövs. Vid behov initiera ytterligare undersökningar. Initiera projekt som ökar kunskapen om Vänern
- informera om Vänerns miljötillstånd och aktuella miljöfrågor
- ta fram lättillgänglig information om Vänern
- samverka med andra organisationer för att utbyta erfarenheter och effektivisera arbetet.

Medlemmar

Medlemmar är samtliga kommuner runt Vänern, industrier och andra företag med direktutsläpp till Vänern, organisationer inom sjöfart och vatten-kraft, landsting, region, intresseorganisationer för fiske, jordbruk, skogsbruk och fritidsbåtar, naturskyddsföreningar, andra vattenvårdsförbund och vattenförbund vid Vänern med flera. Länsstyrelserna kring Vänern, Naturvårdsverket och Fiskeriverket deltar också i föreningsarbetet.

Mer information

Mer information om Vänern och Vänerns vattenvårdsförbund finns på förbundets webbplats: www.vanern.se. Förbundets kansli kan svara på frågor, telefonnummer 010-224 52 05.

