

Gradu Amaierako Lana
Biologiako Gradua

**Umeak zientziara eta DNA-ra hurbiltzen:
environmental DNA (eDNA) eta Euskal kostaldeko
iktiofauna-aniztasunaren ebaluazioa**

Egilea:
Maitane Pérez Cebrecos

Zuzendariak:
Ibon Cancio
Oihane Diaz de Cerio

© 2018, Maitane Pérez Cebrecos



Agerkariak

Pérez-Cebrecos, M; Diaz de Cerio, O; Andonegi, G. eta Cancio, I. “Using environmental DNA to assess ichthyofauna diversity in the basque coast”. VII Congreso Ibérico de Ictiología 2018 (Faro, Portugal). 2018ko Ekaina. Ahozko aurkezpena.

Pérez-Cebrecos, M; Diaz de Cerio, O; Andonegi, G. eta Cancio, I. “Haurrak metodo zientifikoaren jakitun egiten: arrainen dibertsitatearen ebaluazioa *environmental DNA* (eDNA) bidez”. Euskal Esperientziak Zientzia Zabalkundean 2018 (Donostia, Euskal Herria). 2018ko Ekaina. Posterra.

EiTB-ko Teknopolis saioan eskainitako erreportajea: “Zientziakide: ciudadanos que hacen ciencia”. Eskuragarri: <https://goo.gl/Uw48NL>

AURKIBIDEA

Laburpena	1
Abstract	1
1. Sarrera	2
2. Material eta metodoak	5
2.1. Aldez aurretiko testak: akuarioko esperimenduak	5
2.2. Landa ikerketa	6
2.2.1. Ikerketa area.....	6
2.2.2. Ur-laginen bilketa eta iragazketa	7
2.3. DNA erauzketa	8
2.4. 5S rRNA-ren PCR-a eta gel elektroforesia aurretiko saiakuntzetan	8
2.5. Urumea ibaiko laginen PCR kuantitatiboa eta gel elektroforesia	8
2.6. Anplifikatuaren berrespena: sekuentziazioa eta ingelesezko “cross reaction” azterketa	10
2.6.1. Anplifikatuaren sekuentziazioa eta analisi bio-informatikoa	10
2.6.2. Hasleen espezifikotasunaren anplifikazio-froga: “cross reaction”	10
3. Emaitzak	11
3.1. Aldez aurretiko testak: akuarioko esperimenduak	11
3.2. Urumea arroko azterketa.....	11
3.2.1. Aingira eta korrokoiaaren ehunetatik erauzketa eta eDNA erkaketa	12
3.3. Bio-informatikaren bidezko sekuentziazioaren emaitzen azterketa	14
3.4. “Cross reaction” frogaren emaitzak	14
4. Eztabaida	15
5. Ondorioak	19
6. Esker onak	20
7. Bibliografia	20
1. Eranskina	26
2. Eranskina	29

Laburpena

Maiz, arrainak harrapatuz egiten da arrain-dibertsitatearen identifikazioa ur-masetan. Orokorrean, harrapaketa horiek sare, tranpa edo arrantza-elektrikoa bezalako metodologiaren bitartez egiten dira. Haatik, ingurumen-DNA (ingelesez *environmental DNA*, eta aurrerantzean eDNA) hurbilketa oparotsua suertatu da ur-ekosisteman animalia-dibertsitatea ikertzeko, galzorian dauden espezieak edota espezie inbaditzaileak barne. Gainera, eDNA analisiak ur-bolumen gutxi-asko txikiak biltzea eskatzen dute; era berean, azken honek ahalbidetzen du trebatu gabeko jendeak burutu ahal izatea laginketak. Esperientzia gabeko jende horren adibidea eskolako ikasleak izan daitezke, analizatu nahi deneko ur-baliagaitik hurbil bizi daitezkeenak.

Ikerlan honetan, Urumea ibaia hautatu zen zortzi arrain-espezieen presentzia aztertzeko. Ikuskatutako espezieen artean bertako arrainak eta barneratutakoak sailkatzen dira, jarraian zerrendatzen direnak: korrokoia (*Chelon labrosus*), lanproia (*Petromyzon marinus*), perka amerikarra (*Micropterus salmoides*), amuarrain arrunta (*Salmo trutta*), aingira (*Anguilla anguilla*), ezkailua (*Phoxinus phoxinus*), zamo arrunta (*Cyprinus carpio*) eta zamo txikia (*Carassius auratus*). Ur-laginak (1L) Astigarragako eskola-ikasleek (11 urte) jaso zituzten bai ibai bide nagusian bai bi ibaiadarretan. Laborategian, ura iragazi egin zen (3 eta 0,45µm-tako iragazkiak baliatuta), eta DNA TriZol erabilia erauzi zen filtro horietatik. eDNA edukia analizatu zen erabilia bai mitokondrioko *b zitokromoa*-ren genearentzako espezie-espezifikokoak ziren hasleak bai denbora-errealeko PCR-a (qPCR). qPCR-tik ateratako emaitzak sekuentziazio bidez baieztatu ziren. DNA-ren barra-kodearen meta-analisiaren bitartez, honako espezieen presentzia detektatu zen: korrokoia, aingira, amuarraina, zamo arrunta eta zamo txikia. Espezie horiek hauteman ziren behintzat lagindutako lau estazioetatik batean eta bi filtroetatik ateratako laginetatik, hots 3- eta 0,45µm-tako poro-tamainako filtroetatik. Ikerketa hau da Euskal ibaietan egindako iktiofaunaren lehenengo ikuskatze molekularra, eDNA metodoan oinarritutakoa. Emaitzek agertzen dute herritarrekin elkarlanak izan dezakeen ahalmena bioaniztasuna ikuskatzerako orduan. Horrez gain, eskola-ikasleen ezaguera emendatzen du dela prozedura zientifikoaren gainean dela bioaniztasunaren kontserbazioaren inguruan. Bestalde, eDNA hurbilketa etorkizun handikoa izan daitekeela erakutsi da galzorian dauden espezie zein espezie inbaditzaileen presentzia ebaluatzerako orduan, nola estuario-ingurune hala ibai-ertzeko-inguruneetan.

Abstract

Identifying ichthyofauna diversity in water bodies is often performed capturing fish via nettings, trappings and electrofishing methodologies. However, environmental DNA (eDNA) analysis has appeared as a promising methodological approach to investigate animal diversity in aquatic ecosystems, including endangered and/or invasive species. In addition, eDNA analysis only needs collection of small

water volumes, in a process accessible to non-trained citizens including school students living close to the water resources that we would like to analyse.

In this study the Urumea river (Basque Country) was selected to assess the presence of eight native and introduced fish species: thicklip grey mullet (*C. labrosus*), lamprey (*P. marinus*), largemouth sea bass (*M. salmoides*), brown trout (*S. trutta*), European eel (*A. anguilla*), European minnow (*P. phoxinus*), common carp (*C. carpio*) and gold fish (*C. auratus*). Water samples (1L) were collected by Astigarraga school students (age 11) in the main river course and in two tributary creeks. In the lab, the water was filtered (3- and 0.45- μ m), and DNA was extracted from the filters with TriZol. eDNA content was analysed using species specific primers for real-time PCR amplification of the mitochondrial *cytochrome b* gene. qPCR results were confirmed by sequencing. Metabarcoding approach detected presence of mullet, eel, trout, carp and gold fish onto 3- and 0.45- μ m pore size filters, at least in one of the four sampled sites. This study represents the first eDNA-based ichthyofauna molecular survey in Basque rivers. The results illustrate the potential of citizen collaboration in biodiversity monitoring while awareness of school students on scientific procedures and biodiversity conservation can be gained. Additionally, eDNA approach has been shown as promising to assess presence of endangered and/or invasive fish species in estuarine/riparian environments.

1. Sarrera

Teknologia genomikoetan berriki egon diren aurrerapenek, aukera berriak eskaintzen dituzte ingurumen-zientzietako aplikazio zabal baterako (adib. [Thomsen et al., 2015](#); [Barnes et al., 2016](#); [Doi et al., 2017](#)). Abagune horietako bat oinarritzen da organismoek berauen DNAREN zantzuak ingurunean uzten dituztenaren egitatean. DNA hori nonahikoa da, animaliek ingurunera galdutako azal, mukosa, listu, esperma, jariakin, arrautza, gorotz zein gernuko zeluletatik askatzen dela, eta osorik iraun dezake ingurunean ordu gutxi batzuk zein ehundaka urte, ingurune motaren arabera ([Willerslev et al., 2004](#)). Halaber, DNA horri kolektiboki *environmental DNA* (aurrerantzean, eDNA) edo ingurumen-DNA deritzo.

eDNA-ren sekuentziazioa lanabes egokia suertatu da jadanik uretako organismo eta organismo lurtarren banaketa eta dibertsitatea ikertzeko (e.g. [Stat et al., 2017](#); [Doi et al., 2017](#); [Torresdal et al., 2017](#)), besteak beste espezie urtarren presentzia zehazteko (e.g. [Fukumoto et al., 2015](#); [Ikeda et al., 2016](#); [Baldigo et al., 2017](#); [Carim et al., 2017](#)).

Makroorganismoek dagokiela, metodo hau urmael-laginetan aplikatu zuten lehenengoz [Ficetola eta kolaboratzaileek 2008](#)an. Orduz gozotik, hurbilketa hau ikerketa askotan erabilia izan da urgezetako ekosistemetan, ez bakarrik itu-espezieen (espezie inbaditzaile edo galzorian egon daitezkeenak) bioaniztasuna aztertzeke (e.g. [Takahara et al., 2013](#); [Bohmann et al., 2014](#)), baita horien ugaritasuna ere ezagutzeko (e.g. [Takahara et al., 2012](#); [Katano et al., 2017](#); [Stoeckle et al., 2017](#)). Are

gehiago, habitat-konektagarritasuna determinatzeko ere metodo eraginkorra dela egiaztatu da ([Yamanaka et al., 2016](#)).

Aplikazio arrakastatsuak gorabehera, eDNA bidezko makroorganismoen detekzioa oraindik urria da ur arinetan (hots, lotikoetan) ([Seymour et al., 2018](#)). Gainera, teknika hau ez da inoiz gauzatu Euskadiko ibaietan.

Hasteko, garrantzitsua da eDNA erabiliz estimatzea arrain-bioaniztasuna Euskal kostaldeko ibaietan, ezarri ahal izateko gaur egun dauden metodoak bezain inbasiboa ez den detekzio-metodo fidagarri bat. Izatez, frogatu da eDNA-hurbilketa baino garestiago eta neketsuagoak direla limnologian eta arrantza-industriako azterketetan erabiltzen diren eskala handiko ikuskatzeak, arrantza elektrikoa barne ([Rees et al., 2014](#); [Evans et al., 2017](#)). Areago, metodo tradizionalak interesezko espeziea harrapatzea eskatzen dute, animaliaaren ongizatea asaldatu dezaketenak. Bestalde, behaketa-detekzio eta kontaktetan oinarritutako metodoak ez daude estandarizaturik eta trebezia taxonomiko eta praktikoa eskatzen dute; azken hauek, baina, gainbeheran dauden abileziak dira ([Wheeler et al., 2004](#)). Honetaz gain, ikerketa askok eDNA bidezko espezieen detekzio-probabilitatea altuagoa dela frogatu dute ([Jerde et al., 2011](#); [Dejean et al., 2012](#)), beste edozein arrazoi ez bada ere, espezie asko zailak direlako harrapatzen.

eDNA bidezko metodologiak aipatutako oztopo hauek alde batera baztertzen ditu, aski asetuz, edo behintzat arinduz, espezieak biomonitorizatzeko dugun beharra. Horretaz gainera, metodo hau espezieen aurkikuntza-abiadura bizkortzen ari da; izan ere, ez da behar *a priori*-ko informaziorik identifikatzeko espezie jakin baten presentzia ingurumen zehatz batean ([Bohmann et al., 2014](#)).

Bestalde, azpimarratu beharrekoa da, ur gezetako ekosistemak Lur planetako habitat mehatxatuenetarikoak direla, dela inpaktu antropogenikoaren aldetik dela galzorian dauden espezieen aldetik ([Darwall et al., 2009](#); [Hambler et al., 2011](#)).

Horren harira, ikerketa honetan, bi esperimentu-mota aurrera eraman dira. Batetik, laborategiko esperimentu batzuk abiatu dira teknikarekin trebatzeko eta hurbilketaren ahalmena ezagutzeko. Azken hauek, itsasoko-urarekin, iturriko urarekin eta Milli-Q bidez iragazitako urarekin burutu dira; bai eta tankan itxitako akuario baten urarekin, bertan korrokoi bat 3 egunez mantendu izan ostean. Bestetik, landa-esperimentu bat egin da 6 ornodun-espezie espresuki ikuskatzeko asmoz: itsas-lanproia (*Petromyzon marinus*, L.), perka amerikarra (*Micropterus salmoides*, L.), amuarrain arrunta (*Salmo trutta*, L.), ezkailua (*Phoxinus phoxinus*, L.), zamo arrunta (*Cyprinus carpio*, L.) eta zamo txikia (*Carassius auratus*, L.). Modu osagarrian beste bi espezie ikuskatu dira: korrokoa (*Chelon labrosus*, R.) eta aingira (*Anguilla anguilla*, L.), kontrol positibo modura balio zitezen.

Sei espezie horien artean, Urumea ibaiko espezie inbaditzaile arrotzak dira perka amerikarra, zamo arrunta eta zamo txikia. Espezie inbaditzaile arrotzen eraginak berealdikoak eta eskuarki

itzulezinak izan daitezkeenez gero, sekulako ingurumen-kalte eta kalte ekonomikoak sor ditzakete. Espezie arrotz bat ingurumen berri batean sartzen delarik inbaditzailea bihur daiteke, antzekoak baldin badira ingurumen berri horren eta espeziea berezkoa den ingurumenaren baldintzak ([Rafferty, 2015](#)). Horrela, ahalezko-inbaditzailea den organismo bat, espezie natiboak gailendu ditzake eta erabilgarri dauden nitxoak aprobetxatu. Bertako ekosisteman, ugaltu eta ugarituko da bere populazioa mugatzen duten bere harrapakari naturalak ez badaude. Beraz, espezie inbaditzaile batek, potentzialki, ekosistema oso bat desoreka dezake.

Eragin hauek kontuan hartuta, hiru espezie arrotz hauen jarraipena argiki nahitaezkoa da, kontrolatuak eta, beharrezkoa izatekotan, ezabatuak izango badira.

Aitzitik, itsas-lanproia mehatxatuta dago ibai zein estuarioetako kutsadura, gehiegizko arrantza, errute-eremuen galera eta larben habitat-galera dela eta, bai eta migrazioa oztopatzen duten barrera fisikoak direla medio ([Mateus et al., 2012](#); [Maitland et al., 2015](#)). Izan ere, Urumea ibaiko arrain komunitateari dagokiola, aingira izan ezik, espezie migratzailetaz osaturiko populazioak ia guztiz desagertu ziren XX. mendearen erdialdean ([Departamento de Medio Ambiente, Planificación Territorial, Agricultura y Pesca, 2012](#)). Beste alde batetik, nahiz eta espezie anadromoek munduko arrain-faunaren %1-a baino ez izan, gizakiarentzako duten balioak proportzio hau luzez gainditzen du ([Limburg et al., 2009](#)). Lanproia Euskal Herriko ibaietan bakarrik ikuskatu da Bidasoa ibaian azken hamarkadan ([Departamento de Medio Ambiente, Planificación Territorial, Agricultura y Pesca, 2012](#)). Ondorioz, ikerlan hau baliagarria izango da jakiteko lanproia Urumea ibaira bueltatu ote den ala ez.

Egoera antzekoa aurki daiteke amuarrainari so eginda, 19. mendean beheranzko joera bat jasan zuenak Euskal Herrian ([Ihobe, Sociedad Pública del Departamento de Medio Ambiente, Planificación Territorial, Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco, 2008](#)). Amuarrainaren egoera kezkarria da ezaugarri hauengatik: espeziearen kutsadura genetiko, gehiegizko arrantza, birpopulatze-kanpaina ezegokiak eta bizi deneko ibaien baldintza ekologiko eta hidrológicoen okerragotzea ([Almodóvar et al., 2000](#); [Almodóvar et al., 1999](#)).

Bestalde, ezkailua Euskal Autonomia Erkidegoan zehar arrain espezierik zabaldueña da, edozein ibai-arro betetzen duela. Hala ere, ez dago argi espezie autoktonoa edo barruratu denentz, batik bat honako bi arrazoiak direla-eta: (1) behin baino gehiagotan barruratu izan da amuarrainaren harrapakinen kopurua emendatzeko eta (2) aintzinako erregistro gutxi daude bere presentziari buruz aritzen direnak ([Doadrio, 2001d](#)). Espezie arrotzen sarrerak, eta gizakiak sortutako ibaien kutsadura eta eutrofizazioak eragina dute Euskal Autonomia Erkidegoko ezkailu-populazioetan ([Ikaur & Ekolur, 2006](#)). Hori dela eta, interesgarria litzateke espezie honen egoera ezagutzea, Urumean behintzat desager ez dadin.

Azpimarratu beharrezkoa da, ikerketa hau ZientziaKIDE kids proiektuaren parte dela. ZientziaKIDE ekimena 2016an abiatu zuen Elhuyar Fundazioak, eta Herritarren Zientzia sustatzea du

helburu. Herritarren Zientzia gizarteko kideek egindako zientziatzat definitzen da, maiz gauzatzen dena ikertzaile profesional edo ikerketa-erakundeekin elkarlanean edo hauen gidaritzapean ([Gura, 2013](#)). Horrenbestez, Herritar Zientzialariak dira gizarte zabalaren interes orokorrei begira lan egiten duten zientzialariak, gizarteko kideak edo zientzialari amateurak. Inoiz, zientzia mota hau hezkuntza-helburuekin lotu da, eta baita zientziaren komunikazio eta zabalpenarekin.

Halaber, ikerlan honetan aurrera eramandako ikasleekin elkarlanak, Danimarkan gauzatu den proiektu bat hartu du eredutzat. Proiektu hori Danimarkako Historia Naturaleko Museoak abiarazi du, “DNA & life” izenarekin (proiektuaren ingelesezko web orrirako esteka: <https://goo.gl/2emt85>). Hezkuntza-programa honetan, institutuko ikasleek, hautatutako espezieen mapa sortzen dute, ura jaso eta *in situ* iragazketa eginez.

Horrenbestez, ikerlan honen bitartez jakin nahi izan da ea metodo hau baliagarria izan daitekeen Euskal Herriko ibaietan ere bioaniztasuna ikertzeko bai eta hori herritarrekin elkarlanaren bitartez egingarria den ala ez. Halaber, lan honetako helburu zehatzak hiru dira:

- Itu-espezieen detekzioa ahalbidetu dezakeen metodo bat frogatzea Euskal kostaldeko ibai batean, ikuskatzeen kostuak gutxiagotu litzakeena eta zehaztasuna handitu lezakeena.
- Urumea ibaiko 8 arrain-espezie jakinen identifikazioa gauzatzea, bertatik jasotako ur-laginetako ingurumen-DNA-n oinarrituta.
- ZientziaKIDE kids proiektuan parte hartuz zientzia jendarteratzea, haur eta gazteek egindako zientziaren bitartez, “DNA & life” saiakuntzak antzeratuz.

2. Material eta metodoak

2.1. Aldez aurretiko testak: akuarioko esperimenduak

Aldez aurretiko saiakuntza bat gauzatu zen bai teknikarekin trebatzeko bai eta eDNA hurbilketaren ahalmena ezagutzeko. Test honetan jatorri ezberdineko lau ur-lagin jaso eta iragazi ziren: Kantauri itsasoko 1 L ur, iturriko 1L ur, Mili-Q (0,22 μm) 1L ur (kontrol negatibo gisa) eta korrokoi bat egondako uraren 1L ur.

Azken lagin hori lortzeko, 50L-ko batea batean korrokoi bat mantendu zen 3 egunez, ur-zirkulazioa itxia zelarik (kontrol positibo).

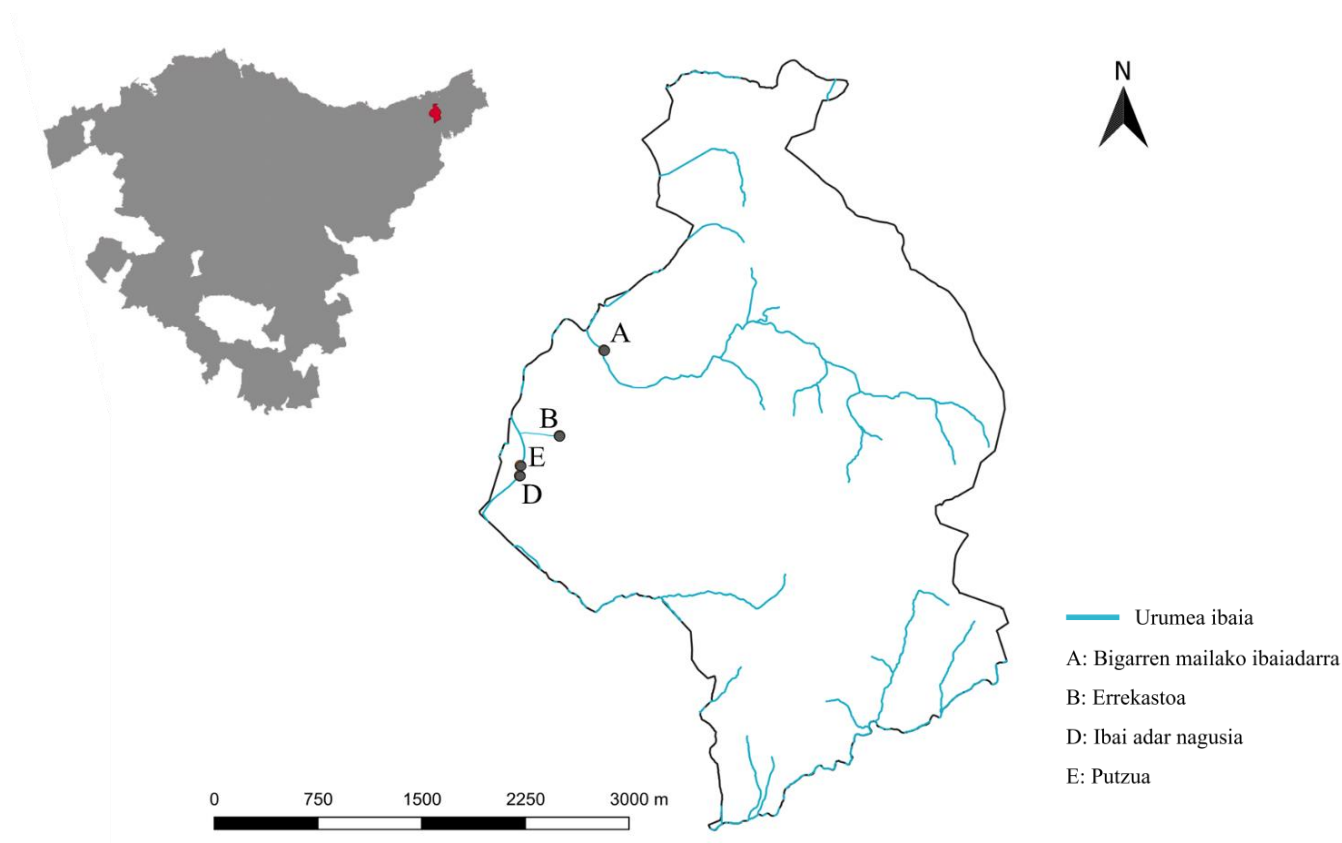
Saiakuntza honetan, ur laginak hiru filtrotatik igaroarazi ziren: lehenengoa, 100 μm -ko poroduna (egon daitekeen material partikulatua baztertzeko), bigarrena 3 μm -ko poroduna eta, azkena, 0,45 μm -ko poroduna. Iragaketarako prozedura eta zehaztasunak 2.2.2. puntuan deskribatuta ageri dira.

2.2. Landa ikerketa

2.2.1. Ikerketa area

Urumea ibaia Nafarroan sortu eta Kantauriar Itsasoan itsasoratzen da Donostian (Gipuzkoa). Ibaiadarrei dagokiela, Añarbe eta Landarbaso ibaiak ditu, bai eta Urdiñola, Iturri eta Zumarreztako ubideak ere. Zeharkatzen dituen herrien artean Astigarraga dago, Gipuzkoako udalerrietako bat, eta honakoak dira bere koordenatuak: 43° 16' 54''N/1° 56' 51''O (1. irudia). Ikerketa honetako laginketak egin ziren, hain zuzen, Astigarraga zeharkatzen duen Urumea ibaiko tartean. Ikerketa-area gisa Astigarraga aukeratu zen, bertako Udalak proiektua onartu baitzuen.

Itsas-lanproia (*Petromyzon marinus*), perka amerikarra (*Micropterus salmoides*), amuarrain arrunta (*Salmo trutta*), ezkailua (*Phoxinus phoxinus*), zamo arrunta (*Cyprinus carpio*), zamo txikia (*Carassius auratus*), korrokoaia (*Chelon labrosus*) eta aingira (*Anguilla anguilla*) 8 arrainen banaketa ikuskatu zen 4 laginketa-puntuetan adierazitako ibai-zatian. Lagin-puntuetako bat ibai nagusian ezarri zen (1. irudian: D), bigarren bat bigarren mailako ibaiadarretako batean (1. irudian: A) eta beste bat erreka batetik (1. irudia: B). Laugarren lagin bat jaso zen ibai nagusitik eratzen zen putzu batetik (1. irudia: E).



1. Irudia: Ikerketa-area den Astigarragaren kokapena Euskal Autonomia Erkidegoan (goiko mapan gorriz) eta bertatik igaro den Urumea ibaiko zatia (urdinez adierazita). Puntuen bitartez ageri dira adierazita laginketa-puntuak: A, bigarren mailako ibaiadarra; B, erreka; E, putzua eta D, ibai adar nagusia.

2.2.2. Ur-laginen bilketa eta iragazketa

ZientziaKIDE kids proiektuari jarraiki (goo.gl/Wsjy3m), Astigarrako eskola-ikasleekin batera jaso ziren laginak. Gainera, partaide izan den ikasle-taldeari, batetik, eDNA teknikaren inguruko azalpenak eman zitzaizkien, egin zuten lanaren balioaren berri emanez eta, bestetik, ikerketaren emaitzak lehen eskutik ezagutzeko aukera eskaini zitzaaien. Xede horrekin, 2017ko Abenduaren 19an Astigarragako Herri Eskolan proiektuko partaideei ikerketaren ondorioak jakinarazteko saio bat antolatu zen, bai eta erakusketa bat Astigarrako eskolan bertan eta Udaletxean.

2017ko urriak 27an ikasleekin batera jaso ziren laginak, zehazki, ikasle bakoitzak ur litro bat bildu zuen ibaitik, eskularru eta mantalak soinean zeramatzatela (2. irudia). Laginak jaso ostean, zuzenean laborategira garraiatuak izan ziren eta egun horretan bertan egin zen laginen iragazketa, protokolo gehienetan aholkatzen den bezala ([Shaw et al. 2016](#)). Hala ere, laginak laborategian -4°C -tan mantendu ziren iragazita izan aurretik.



2. Irudia: Umeak ibaiadarreko errekaetan laginak biltzen (B laginketa-puntuak), bakoitzak litro bat jasotzen zuelarik. Irudien portafolioa: goo.gl/Wsjy3m

Akuarioko laginak bezala, ibaitik bildutako ur-laginak ere hiru filtrotatik igaroarazi ziren: lehenengoa, $100\ \mu\text{m}$ -ko poroduna, bigarrena $3\ \mu\text{m}$ -ko poroduna eta, azkena, $0,45\ \mu\text{m}$ -ko poroduna. $100\ \mu\text{m}$ -tako iragazki gisa sare bat erabili zen, aldiz, 3 eta $0,45\ \mu\text{m}$ poroetako iragazkiak $47\ \text{mm}$ diametroko zelulosa-nitratozko iragazki-paperak ziren (Isopore™). Lehenengo iragazkia partikula handiak baztertzeko erabili zen, eta 3 eta $0,45\ \mu\text{m}$ -ko poroetako iragazkiak eDNA eskuratzeko baliatu ziren. $3\ \mu\text{m}$ -ko poroetako iragazkiak ibaietako mikroorganismo gehienak harrapatzeko erabilia izan daiteke; izan ere, hauek dira ibaietan aurki daitezkeen mikroorganismoen tamainak: zianobakterioak, $3\ \mu\text{m}$ inguru; protistoak, $10\ \mu\text{m}$ eta, bakterioen artean, ur gezan ugaria den *Proteus* generoa, $1-3\ \mu\text{m}$ -ko tamainaduna ([Atlas et al., 1998](#)). Helburua zen $3\ \mu\text{m}$ -tako iragazkiaren bitartez mikroorganismo gehienak baztertzea, eta horrela, $0,45\ \mu\text{m}$ -ko poroetako iragazkiak jalkinez ez betetzea.

Iragazkiak berdin maneiatu ziren lagin bakoitzerako eta guztiak modu berean iragazi ziren, huts-xurgagailu bati akoplatutako iragazgailu baten bitartez. Lehenengo, filtro-tresnaren plastikozko inbutua kendu zen, erabili eta botatzeko nitrilozko eskularruak baliatuta; horrela, filtroa agerian geratu zela. Gerora, laginak zeramatzen filtroak altzairu herdoilgaitzezko pintzak erabilia bildu ziren barrurantz eta 1,5 mL-ko tutuetan sartu ziren. Pintzak alkoholarekin garbitu ziren prozesuaren hasieran eta alkoholean bertan mantendu ziren lagin batetik bestera, kutsadura gurutzatua ekiditeko. Gainera, iragazketa, iragazkien maneia eta biltegitratzea su pean burutu ziren, esterilitatea mantentzearen helburuarekin. Tutu bakoitza itxi ostean nitrogeno likidoan mantendu ziren eta, gerora, -80°C -tan gorde ziren analisi gehiago egin artean.

2.3. DNA erauzketa

Bai aurretiazko saiakuntzetako ur-laginen DNA bai Urumea ibaiko ur-laginetako DNA erauzi zen metodo berdina jarraituta. Alegia, DNA-ren erauzketa TRIzol™ Reagent-eko protokolo manuala jarraituta gauzatu zen bi kasuetan (Invitrogen™). Honen aurretik, iragazkiak fisikoki homogeneizatu ziren zirkonio-bolatxoak erabiliz 2400 rpm-tan 15 segundoz bi aldiz, eta TRIzol-a “buffer” gisa erabiliz. Erauzketaren azken pausu gisa ordea, laginetako DNA kontzentrazioa estimatu zen, bere absorbantzia neurtuz, bai eta purutasuna ere (proteinei zein RNA-ri zegozkionak). Bukatzeko, iragazki-disko bakoitzetik eluitutako lagin-soluzioak 1.5 mL-ko mikrotutuetan (Eppendorf®) biltegitratu ziren, -80°C -tako hozkailuan.

DNA erauzketarako laginketa-estazio bakoitzeko 2 iragazki erabili ziren bai 3 μm -tako iragazkien kasuan bai eta 0,45 μm -koen kasuan ere.

2.4. 5S rRNA-ren PCR-a eta gel elektroforesia aurretiko saiakuntzetan

Aurretiko saiakuntzetako ur-laginetatik erauzitako DNA amplifikatu zen korrokoia 5S rRNA-ren hasleak erabilia, organismoan ugaria delako. Hasle horiek Rojo-Bartolomé eta kolaboratzaileek (2016) erabilitakoak ziren. PCR-ko erreakzio bakoitzak 0,25 μL Taq polimerasa eta hasle bakoitzeko 0,1 μL zeramatzen (200 pMol kontzentrazioko hasleak), guztira 23 μL -ko *master mix*-ean; gainera, erreakzio bakoitzean DNA soluzioa 2 μL gehitu ziren. Horrenbestez, erreakzio-nahasketa bakoitzaren bolumen osoa 25 μL zen. Halaber, PCR-a honako baldintza hauetan aurrera eraman zen: 2 minutu 94°C -tan, 18 segundo 94°C , 58°C eta 72°C -tan, hurrenez hurren, 35 amplifikazio-ziklotan zehar, eta bukatzeko 7 minutu 72°C -tan.

2.5. Urumea ibaiko laginen PCR kuantitatiboa eta gel elektroforesia

eDNA-ren detekzioa denbora-erreakzio PCR kuantitatiboa erabilia burutu zen, qPCR-bidezko amplifikazioaren sentikortasunaz baliatzeko (Pilliod *et al.*, 2014). Espezie-espezifikoak ziren hasleak diseinatu ziren ikuskatutako 8 espezieentzako, *b zitokromo* gene mitokondrialaren gainean. Horretarako, aukeratutako 8 espezieen *b zitokromo* geneen sekuentziak CLUSTALW tresnaren bitartez lerrotatu

ziren eta hasleak genearen alderik ezberdinean diseinatzen ahalegindu zen (ikusi 1 anexoa). Erabilitako hasle sorta 1. taulan laburbilduta ageri da. Bakterioentzat ere *16S rRNA* genearen hasle-bikote bi diseinatu ziren, kutsadura-kontrol gisa.

1. Taula: Espezie-espezifikoak diren qPCR hasleen sekuentziak, DNA mitokondrialaren zati laburrak amplifikatzeko diseinatuak hurrengo espezieentzako: korrokoia (bi hasle-bikote desberdin), itsas-lanproia, perka amerikarra, amuarrain arrunta, aingira, ezkailua, zamo arrunta eta zamo txikia.

Espezia	Haslearen izena	Haslearen sekuentzia	Anplifikatuaren tamaina
<i>Chelon labrosus</i>	Cl-cytB-Fw	5'-GCCTGATTGCCCAAATCG-3'	602bp
	Cl-cytB-Rv	5'-GCTAGTGCAGTAAGGGAGGATTG-3'	
<i>Chelon labrosus</i>	Cl-cytb-Fw	5'-CTTACTGCACTAGCATCCCTTG-3'	409bp
	Cl-cytb-Rv	5'-TTCAACTTGCTGCTGGTATTAGG-3'	
<i>Petromyzon marinus</i>	Pm-cytb-Fw	5'-CTTTAGCAGCAGCTATCATAATCCTC-3'	201bp
	Pm-cytb-Rv	5'-ATGAAGTAGACTGTTGATGAATTTGTG-3'	
<i>Micropterus salmoides</i>	Ms-cytb-Fw	5'-CTACTCGCCTCAATTCTTGTACT-3'	239bp
	Ms-cytb-Rv	5'-TCCAGCCAGCCTGCTAGGGGAG-3'	
<i>Salmo trutta</i>	St-cytb-Fw	5'-CTTGGCCTAACATCATTAGCTCTG-3'	389bp
	St-cytb-Rv	5'-GCGAGAAGTAGGAAGATAGT-3'	
<i>Anguilla anguilla</i>	Aa-cytb-Fw	5'-TCACCGCCCTAACAAATACTTGCC-3'	392bp
	Aa-cytb-Rv	5'-GTTTAGCACCAGGAATAGGGAA-3'	
<i>Phoxinus phoxinus</i>	Pp-cytb-Fw	5'-TACTAGCTCTTACATCACTAACC-3'	393bp
	Pp-cytb-Rv	5'-GTGTGAGGATGAGAAAGAGTG-3'	
<i>Cyprinus carpio</i>	ccarp-cytb-Fw	5'-CTAGCTCTTACACTACTAGCAC-3'	372bp
	ccarp-cytb-Rv	5'-TGCGAAGTATAGGACGGATGCA-3'	
<i>Carassius auratus</i>	caras-cytb-Fw	5'-TGGAGGAGTTCTTGCATTATTATTC-3'	348bp
	caras-cytb-Rv	5'-ATCCTGCTAGTGAAAGAGGAC-3'	

qPCR-ko erreakzio bakoitzak 10 µL SYBR Green eta 200 pMol kontzentrazioko hasle bakoitzeko 0,06 µL zeramatzan, guztira, 18 µL-ko *master mix*-ean; erreakzio bakoitzean, era berean, DNA soluzioko 2 µL zeuden. Erreakzio-nahasketa bakoitzaren bolumen totala 20 µL ziren. Denbora errealeko PCR-aren baldintzak honakoak ziren: 2 minutu 50°C-tan, 10 minutu 95°C-tan, eta 15 eta 60 segundoko 40 ziklo 95°C eta 60°C-tan, hurrenez hurren. Ziklo hauetaz gain, disoziazio-fase bat gehitu zitzaion saio bakoitzari.

PCR kuantitatiboa bai 3 µm-tako iragazkietako laginen gainean bai 0,45 µm-takoen gainean egin zen. qPCR saio bakoitzak espezie bakoitzerako lagin zuri bat zeraman (NTC-a edo *non template control* ingelesez), DNA soluziorik gabekoa, kontrol negatibo gisa balio zitekeena.

qPCR-aren produktuak gel elektroforesi bidez berretsi ziren, etidio bromuroarekin tindatutako %2-ko agarosa-geletan.

2.6. Anplifikatuaren berrespena: sekuentziazioa eta anplifikazio-gurutzatuaren aukeraren bazterketa

2.6.1. Anplifikatuaren sekuentziazioa eta analisi bio-informatikoa

Bai aingiraren zein korrokoiairen ehunetatik (laborategian gordetako laginetatik) DNA erauzi zen eta eDNA-rekin erabilitako hasle berak erabili ziren. Hortik jasotako anplikoia erkatuko zen agarosazko gelean migratuta, bi espezieen eDNA-n behatutako bandekin. Modu honetan, eDNA-n lortutako anplifikatuaren izaera berretsi ahal izango zen.

Lagin hauetako DNA erauzketa TRIzol™ Reagent-eko protokolo manuala jarraituta (Invitrogen™) egin zen, iragazkiekin egin bezala. Ostera, anplifikazioa PCR arrunta baliatuta gauzatu zen, zuzenean ehun batetatik erauzitako DNA zenez gero, ez baitzen beharrezkoa qPCR-ak heltzen duen espezifikotasuna. PCR arrunta 35 ziklorako ezarri zen. Bukatzeko, anplifikatutako laginak %1,5-eko agarosazko gelean migratu egin ziren, aurretik deskribatu bezala.

Berresteko goian deskribatutako hasle-sortaren espezifikotasuna landa-laginekiko, qPCR-arentzako positiboak izan ziren qPCR-anplifikatuak ere sekuentziatu egin ziren. Aingira eta korrokoiairen kasuan, ehunetatik erauzitako DNA sekuentziatu egin zen. Sekuentziazioa sekuentziazio-zerbitzu batean gauzatu zen (LASCARAY ikergunea, Gasteiz).

Sekuentziazioaren emaitzak jasotzean NCBI datu baseko BLAST tresna bio-informatikoaz (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) baliatuta analizatu ziren. Azkenik, sekuentzia berak CLUSTALW programa bio-informatikoaren (<http://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) bitartez analizatu ziren, lerrotatuz espezie bakoitzerako jasotako sekuentzia eta hasleak diseinatzeke erabilitako sekuentzia.

2.6.2. Hasleen espezifikotasunaren anplifikazio-froga: erreakzio-gurutzatua

Bestalde, jakiteko ea emaitzen artean positibo faltsuak zeuden ala ez, kontrol positiboen hasleen espezifikotasuna aztertu zen. Hau da, hasiera batean espezie-espezifikoak ziren hasleekin anplifikatutako laginak berriz anplifikatu ziren korrokoia eta aingirarentzako diseinatutako hasleak erabilia, ikusteko agarosazko gel batean bandarik agertzen zenentz. Berriz anplifikatutako lagin horiek hurrengo espeziei zegokien: *Chelon labrosus*, *Anguilla anguilla*, *Salmo trutta* eta *Cyprinus carpio*; alegia, qPCR-aren osteko agarosazko gelean banda bat agertu zuten espezieak.

3. Emaitzak

3.1. Aldez aurretiko testak: akuarioko esperimenduak

Behin iragazki desberdinen DNA erazuta, DNA-soluzio horietako DNA kontzentrazioa, proteinekiko purutasun-maila eta RNA-rekiko purutasun-maila neurtu zen. Honen emaitzak 2. taulan bildu dira.

2. Taula: Jatorri ezberdinetako ur-laginen DNA kontzentrazioa (ng/ μ L unitateetan), proteinekiko purutasun-maila eta RNA-rekiko purutasun-mailak; balio guztiak bai 3 μ m zein 0,45 μ m-ko poro-tamainadun iragazkientzako adierazi dira.

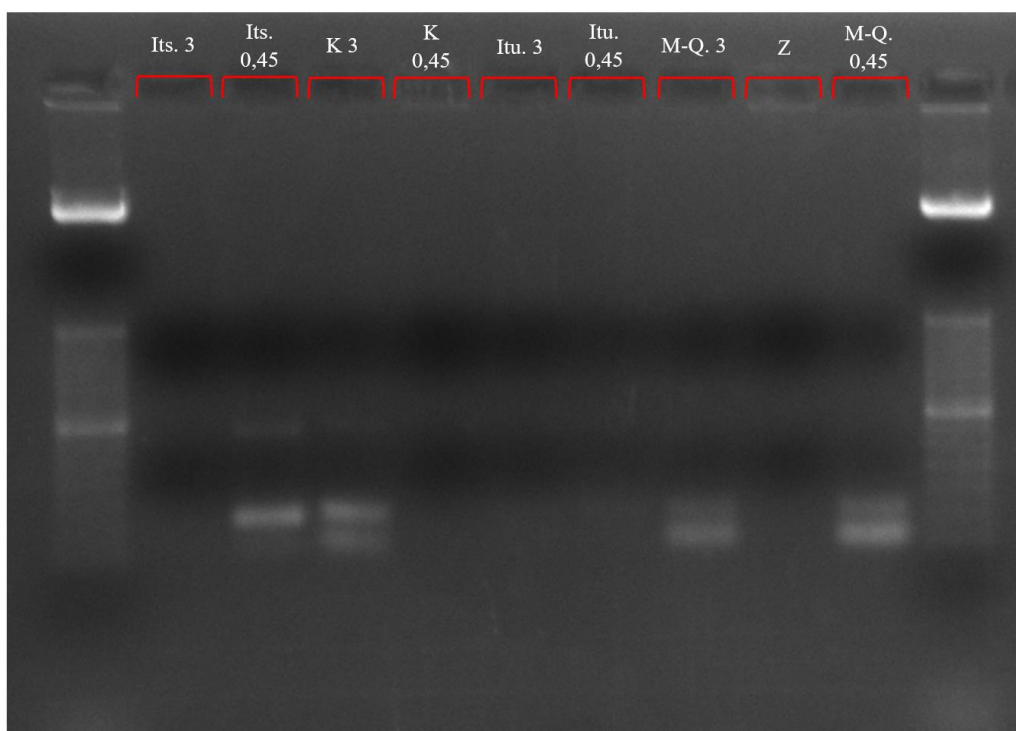
Ur-laginareen jatorria	Iragazki-poroaren tamaina	[DNA]	Proteinekiko purutasun-maila (A260/280)	RNA-rekiko purutasun-maila (A260/230)
Kontrol-ura	3	0	----	----
	0,45	845	1,07	0,75
Iturriko ura	3	34	1,18	0,4
	0,45	1192	1,02	0,75
Akuarioa	3	2018	1,07	0,89
	0,45	1437	1,01	0,76
Mili-Q ura	3	56	1,08	0,42
	0,45	712	1,05	0,72

Korrokoia *5S rRNA* genearentzako hasleek korrokoien presentzia agertu zuten itsas-ura lagineko 0,45 μ m-ko poro-tamainako iragazkiarekin (3. Irudia).

3.2. Urumea arroko azterketa

Erauzketaren ostean (3 μ m eta 0,45 μ m-ko porotako 17 eta 20 iragazki, hurrenez hurren) neurtutako DNA kontzentrazioen batz bestea 57,5 \pm 20,14 izan zen, proteinekiko purutasun-mailen batz bestea 2,47 \pm 0,83 eta RNA-rekiko purutasun-mailen batz bestea 0,60 \pm 0,03 izan zen.

qPCR eta gelen emaitzek *C. labrosus* lau lekutan detektatu zuten, *A. anguilla* eta *S. trutta* hiru laginketa-puntutan, eta *C. carpio* eta *C. auratus* bakoitza leku bakarrean. 4. taulan ageri da informazio hori laburbilduta. Amuarrainaren kasuan emaitza positiboa jasotzean, sekuentziatu egin zen eta konfirmatu zen anplikoia *S. trutta*-ren *cytb*-ri zegokiola. Aingira eta korrokoia kasuan, emaitzak berretsi ziren erkatuta ehunetatik erazutako DNA-ren banda eta eDNA-k agertutako banda (4. eta 5. irudiak). Azkenik, zamo arruntaren kasuan, qPCR-aren ostean lagin nahikorik ez zegoen sekuentziatzeko, eta hortaz, ezin izan zen emaitza baieztatu. Esan beharra dago, bakterioei dagokiela kasu guztietan agertu zela emaitza positiboa, laginketa-estazioa edo iragazkiaren poro-tamaina gorabehera.



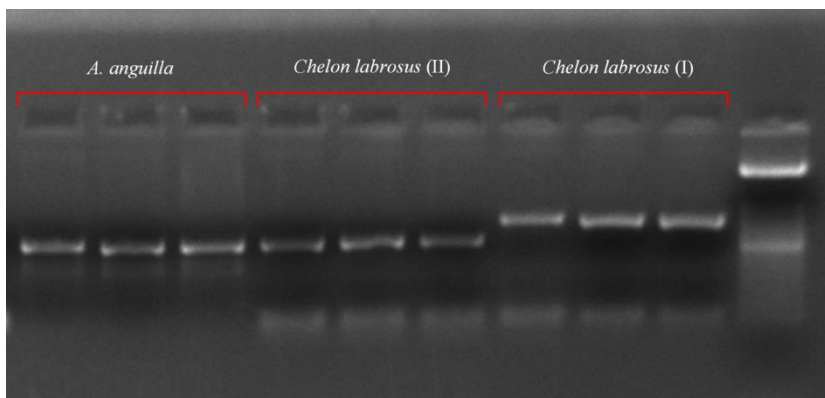
3. Irudia: Iturri desberdinetako ur-laginen anplifikatuen migrazioa % 1,5-eko agarosa-gelean. Its.: kontrol-ura; K: korrokoia egondako batearen ura; Itu.: iturriko ura; M-Q: Mili-Q ura eta Z: zuria (DNA gabeko lagina). Izenaren alboan 3 zenbakia ageri deneko kasuetan, lagina 3µm-tako iragazkitik jaso zela adierazten du; ordea, 0,45 zenbakia ageri bada, lagina 0,45µm-ko poro-tamainadun iragazkitik jaso zela erakusten du.

4. Taula: qPCR eta gelen emaitzetan ageritako espezieak, iragazkiaren poro-tamainaren arabera. Espezie bakoitza detektatu zeneko estazio bakoitzean X bat ageri da.

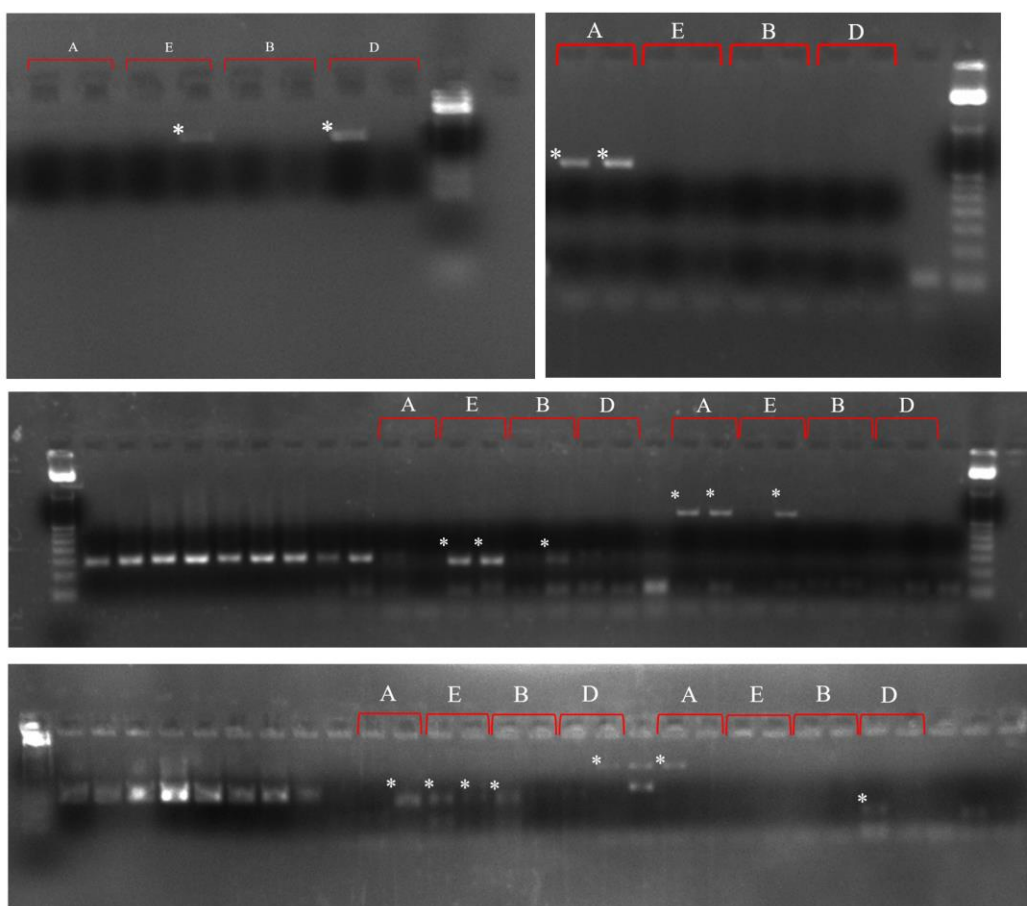
	3µm-ko poroko iragazkia				0,45µm-ko poroko iragazkia			
	A	E	B	D	A	E	B	D
<i>Anguilla anguilla</i>	X	X				X		X
<i>Chelon labrosus</i>	X	X	X		X	X		X
<i>Salmo trutta</i>	X	X						X
<i>Cyprinus carpio</i>								X
<i>Carassius auratus</i>				X				

3.2.1. Aingira eta korrokoia-aren ehunetatik erauzketa eta eDNA erkaketa

Erkatuta aingira eta korrokoia-aren ehunetatik erauzitako DNA laginak (4. irudia) eta ur-laginetatik erauzitako eDNA (5. irudia), ikusi zen emaitzak espeziearekiko espezifikoak zirela.



4. Irudia: Aingira eta korrokoiaeren ehunetatik erauzitako DNA-ren migrazioa, hasle-sorta bakoitzarentzako hiru erreplika. *Chelon labrosus* (II) izenarekin adierazita daude Cl-cytb hasleekin anplifikatutako laginak eta *Chelon labrosus* (I) izenarekin Cl-cytB hasleekin anplifikatutakoak.



5. Irudia: ur laginetatik erauzitako eDNA-ren migrazioa, %2-ko agarosazko gelean. A) eta B) irudietan aingiraren hasleekin anplifikatutako eDNA-ren elektroforesiak. A) irudian $3\mu\text{m}$ poro-tamainako iragazkian agertutako aingiraren DNA ageri da, non A laginketa-estazioan 2 errepliketan DNA banda beha daitekeen (izartxo batekin adierazita). B) irudian $0,45\mu\text{m}$ poro-tamainako iragazkian agertutako aingiraren DNA-elektroforesia dago, E eta D laginketa-puntuetako erreplika batean positiboa delarik emaitza (izartxoekin adierazita). C) eta D) irudietan korrokoiaeren hasle-sortarekin anplifikatutako eDNA elektroforesia, bietan lehenengo lau taldeak (A, E, B eta D) Cl-cytb hasle-sortari dagokio eta Cl-cytB hasle-sortari. C) irudian $3\mu\text{m}$ poro-tamainako iragazkian agertutako korrokoiaeren DNA elektroforesia dago, non E eta B estazioetan Cl-cytb hasle-sortentzako banda ageri den, eta A eta E estazioetan Cl-cytB hasle-sortentzako. D) irudian $0,45\mu\text{m}$ poro-tamainako iragazkian agertutako korrokoiaeren DNA-migrazioa dago, non A, E eta B estazioetan Cl-cytb hasle-sortentzako banda ageri den, eta A eta D estazioetan Cl-cytB hasle-sortentzako.

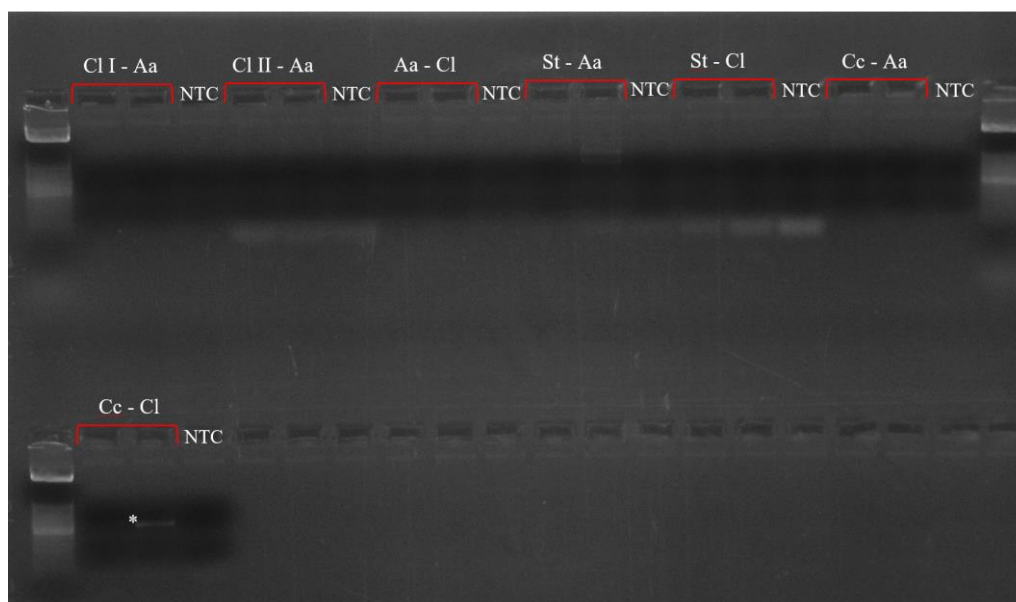
3.3. Sekuentziazioaren emaitzen azterketa bio-informatikoa

Cl-cytB, Cl-cytb, Aa-cytb eta St-cytb hasle-sorten anplifikatuekin egindako BLAST lerrokatzeak honako identitate-portzentajea agertzen zuten: Aa-cytb hasle-sortaren anplifikatuak %100-ko identitatea partekatzen zuen *A. anguilla* espeziearen *b zitokromo* genearekin (EU492326.1) Cl-cytB hasle-sortaren anplifikatuak %100-eko identitatea partekatzen zuen *C. labrosus* espeziearen *b zitokromo* genearekin (DQ197935.1); Cl-cytb hasle-sortaren anplifikatuak %99-ko identitate-portzentajea azaltzen zuen *C. labrosus* espeziearen *b zitokromo* genearekin (KF375111.1); eta St-cytb hasle-sortaren anplifikatuak %100-ko identitate-portzentajea partekatzen zuen *S. trutta*-ren *b zitokromo* genearekin, (KF985673.1).

Clustalw tresna bio-informatikoarekin jasotako emaitzen irudiak ikusteko, jo 2. eranskinera. Azpimarratu beharrekoa da, *Salmo trutta* espeziearentzako bakarrik jaso zela hasle zuzenarekin burututako sekuentziazioa.

3.4. Anplifikazio gurutzatua baztertzeke frogaren emaitzak

Hasleen espezifikotasunaren egiaztatze-frogaren emaitza aztertuta (6. irudia), esan daiteke ez dagoela haslerik dagokion espeziea ez den beste espezie bat anplifikatzen duenik, bat izan ezik. Izan ere, korrokoa ikuskatzeko diseinatutako Cl-cytb hasle-parea gai da zamo arrunta (*Cyprinus carpio*) anplifikatzeko.



6. Irudia: Korrokoia eta aingirarentzako diseinatutako hasleak erabilia, berriz anplifikatutako eta migratutako laginak, hots, qPCR-aren osteko agarosazko gelean banda bat agertu zuten laginak. Irudian Cl I – Aa hasiera batean korrokoia Cl-cytb hasle-parearekin anplifikatutako laginari dagokio, orainoan aingiraren hasle-parearekin anplifikatuta. NTC izena daramaten zutabeak ingelesezko *non template control* laginei dagozkie, alegia, DNA laginik gabekoei. Izendapenak eredu berdina jarraitzen du espezie guztientzako.

4. Eztabaida

Daukaten garrantzi ekologiko eta sozio-ekonomikoagatik ere, sistema lotikoak (hots, azkar mugitzen diren ur gezetako ur-masak, ibaiak edo errekek esaterako) bakanka izan dira eDNA ikerketen galdegaia. Guk hemen erakusten dugu lehenengo aldiz Euskal Herrian, ibaietan ere eDNA hurbilketa bidez detektatu daitezkeela makro-organismoak, arrainak besteak beste. Gainera, proiektu hau guztia erabilia izan da zientzia herritarrei hurbiltzeko, “*Citizen Science*” deritzon egitasmo baten bitartez.

Eskuarki, eDNA-ren garraioaren seinalea neurtzea izan da aipatutako ur lotikoetako eDNA azterketa horien ituetako bat, metro zein kilometroko distantzien artean darabilten distantzia ezberdinak erregistratu direlarik ([Jane et al., 2014](#); [Civade et al., 2016](#)). Horrek zaildu dezake eDNA-ren detekzioa ibaietan, bilatzen den espeziea ez bada oso ugaria; beraz, ez da arraroa, estazio guztietan guk detektatutako espezie bakarra korrokoia izatea, oso espezie naroa baita Euskal Herriko itsasadarretan ([Ortiz-Zarragoitia et al., 2014](#)).

Burututako azterketan guztira, 24 L ur iragazi ziren. Kantitate total horretatik, iragazitako 10 L ibaiaren adar nagusiarri zegozkion, A laginketa puntuan (1. irudia). B laginketa-puntuan (1. irudia), alegia ibaiadarretik sortzen zen errekaetan, jasotako ur-bolumenetik beste 5 L iragazi ziren. Era berean, D estazioari (ibaiadarreko lagina, 1. irudia) zegokion ur-bolumenetik 5 L iragazi ziren. Bukatzeko, ibaiadarreko putzutik, hots E laginketa-puntutik (1. irudia), 4 L iragazi ziren. Aipatutako azken estazio honetatik 4 L baino ez iragazi izanaren arrazoia da laginketa-puntua tankan-itxiriko ur-masa zela eta, beraz, eDNA bertan mantentzeko aukera gehiago zeudela; izatez, ezaugarri hauetako ur-masetan estimatutako beharrezko lagin-bolumena 2 L ingurukoa da ([Rees et al., 2014](#)). Gehiengo laginketa estazioetan, ibai bati zegokien heinean, 5 L jaso ziren hori baita orokorrean erabili den bolumena azterketa mota hauetan ([Pilliod et al., 2013](#); [Deiner et al., 2015](#)).

Zamo arruntari dagokiola, ikerketa honetan lau laginketa-estaziotatik soilik batean detektatu da espeziea. [Olds eta kolaboratzaileek \(2016\)](#) aurrera eramandako ikerketan, baina, lagindutako 8 puntuetatik guztietan detektatu zuten espeziea. Azterketa horretan ere, filtrazio-estrategia erabili zen, 1-2µm-ko poro-tamainako iragazkiak erabilia. Gure kasuan, iragazkietako bat poro-tamaina txikiagoa zuen, hortaz ez da ezberdintasun hori guk eDNA gutxiago jaso izanaren erantzule. Aitzitik, ezberdintasun nagusia da, filtrazio ostean Olds eta taldekideek CTAB (ingelesezko Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) konposatua gehitu ziotela laginei. Agian horrek lagundu zuen laginaren babesean, baimenduz eDNA kantitate gehiago mantentzea. Gainera, 3 gene ezberdin erabili zituzten 4 qPCR azterketa gauzatzeko: *b zitokromoa*, *12S* genearen bi eskualde eta *16s rDNA*; horrela, detekzio probabilitatea handitzea lortzen delarik.

Zamo txikia ere laginketa-estazio bakarrean detektatu da, Euskal Herrian espezie inbaditzailea dena. Beste estazioetan detektatu ez izanaren arrazoia izan daiteke espezie hau, zamo arruntaren antzera, lohian ia guztiz lurperatuta igarotzen duela negua, bere aktibitatea asko murrizten duelarik udaberria heldu arte ([Doadrio et al., 2001a](#)). Hala ere, badaude aurrerago azaltzen diren beste aukera batzuk emaitza negatibo hauek argudiatzeko.

Bestalde, esan beharra dago, Espainiako ibaietan nahiko ohikoa dela zamo arrunta eta zamo txikiaren arteko hibridoa, Kollar karpa (*Cyprinus carpio x carassius auratus*) ([Doadrio et al., 2001b](#)). Puntu honetan, desabantaila bat izan daiteke mitokondrioko gene bat erabili izana espezieen ikuskatzerako. Izan ere, animalietan mitokondrioko DNA, kasu arraro batzuetan izan ezik (adibidez, [Zouros et al., 1994](#)), amarengandik heredatzen dira eta inongo birkonbinazio genetikorik gabe ([Giles et al., 1980](#)), eta horrek ez du baimentzen organismo hibridoaren identifikazioa. Horretarako, gene nuklear baten erabilera litzateke komenigarria, eta horretarako *5S rRNA* genea izan daiteke erabilgarria. Izatez, arrainen genoma nuklearrean *5S rRNA* genearen kopia anitz daude ([Diaz de Cerio et al., 2012](#)), ehunkatik milaka kopiatarata. Horrek ahalbidetu egiten du bere aurkikuntza uretan, lan honetan korrokoiarekin frogatu zen moduan, laborategiko lehen esperimentuan.

Azterketa honen helburuetan ikuskatu nahi ziren 8 espezieen artean, hiru ez dira aurkitu: itsas-lanproia (*Petromyzon marinus*), perka amerikarra (*Micropterus salmoides*) eta ezkailua (*Phoxinus phoxinus*). Itsas-lanproia, sarreraren azaldu den moduan, zaugarri kategorian sailkatuta dago UICN-aren zerrenda gorrian eta kasik desagertu da Urumea ibaitik. Beraz, ez litzateke arraroa izango gure ikerketak agerian utzitako itsas-lanproiaren gabezia errealtatearen isla izatea; izan ere, Eusko Jaurlaritzako azterketetan soilik Bidasoan aurkitu izan da azken hamarkadan zehar ([Ihobe, Sociedad Pública del Departamento de Medio Ambiente, Planificación Territorial, Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco, 2009](#)). Aldiz, ezkailua askoz ugariagoa da, eta nahiz eta bere populazio osoa gainbeheran egon, lagindutako Urumearen itsasadarrean behatuak izan ziren laginketa egunean bertan. Perka amerikarraren inguruan ez da ikuskatzerik egin eta erregistrorik ere ez dago Urumea ibaian, hortaz ikerketa honek agertzen duen bezala posiblea da Urumean ez egotea.

Emaitza positiboen falta, negatibo faltsuen erakusgarria izan daiteke. Negatibo faltsuak agertzeko lehenengo aukera laginetatik erauzketa egiterako pausuan egon daiteke. Izan ere, materia organikoa DNA-ra lotzen da, inhibizioa eragin dezakeena; alegia, oso probablea da ur laginetatik azido humikoa eta taninoak ko-erauztea, PCR-an elkarrekiten dutenak DNA-ra batuz (azido humikoa), edo DNA-polimerasaren lotzea ekidinez (taninoak) ([Opel et al., 2010](#)). Negatibo faltsuak agertzeko beste aukera bat da gene-anplifikatuen tamaina. Hau da, eDNA normalean oso degradatua eta zatikatua egoten da eta honek esan nahi du oro har oso sekuentzia laburrak (150 base pare baino gutxiago) egongo direla eskuragarri laginean ([Deagle et al., 2006](#)). Anplifikatutako tamainak luzeegiak badira, gure genearen presentzia oharkabea izaroko zaigu (esaterako, [Yoccoz et al., 2012](#)). Hori dela eta, eDNA

ikerkuntzetan erabiltzen diren PCR-hasle-sortak, normalean diseinatzen dira amplifikatu laburrak ekoizteko ([Dejean et al., 2011](#)), amplifikatu motzek detekzio-sentikortasun altuagoa baitute ([Huver et al., 2015](#)). Haatik, guk diseinatutako hasle-sortak, orokorrean, aholkatutakoak baino luzeagoak dira (1. taula), alegia 300-600bp arteko tamaina dute. Honen arrazoia da Sanger sekuentziazio-metodoa erabili nahi zela gerora emaitzak berresterako orduan, eta metodo hau ez dihardu egokiro 100bp baino txikiagoko amplifikatuekin. Bestetik, *cytb* genearen sekuentzia hain kontserbatua egonik, zenbat eta sekuentzia luzeagoa amplifikatu, gero eta errazagoa izango da bai sekuentziazioa bera bai eta sekuentzia espezie jakin bati esleitzea. Hala ere, gai izan gara korrokoirako 600bp-tako sekuentzia amplifikatzeko laborategian egindako froga-esperimentu batean non korrokoi bat 50 L-tako ur-tanke batean mantendu zen, eta horrenbestez, eDNA kontzentrazio altua espero genezakeen.

Azterketa honetan erabilitako laginketa-estrategia ur-laginen iragazketa izan da. Beste estrategia da zentrifugazio bidez uretan egon daitekeen DNA-ren prezipitazioa bultzatzea. Horretan, 15 mL ur, 33 mL etanolarekin eta azetato sodikoarekin nahasten dira prezipitazioa ahalbidetzeko. Iragazketak ur-bolumen handiagoak aztertzea baimentzen du, teoriar detekzio-probabilitatea emendatzen duena ([Wilcox et al., 2013](#)). Hala eta guztiz ere, honek ez du esan nahi filtrazioak beti dihardula prezipitazio-metodoa baino hobeto eta, halaber, filtrazioak denbora gehiago eskatzen du eta garestiagoa da (filtoak, punpa, etab.). Ur-bolumen handiagoak iragaztean inhibitzaile gehiago ere kontzentratzen dira laginean. Eta, garrantzitsuago dena, eDNA sarritan asko degradatzen da, zati txikietan batez ere ([Deagle et al., 2006](#)). Gerta daiteke zati horiek ez geratzea harrapatuta filtroetan, poro-tamainak oso handiak baitira; izatez, [Turner eta kolaboratzaileek \(2014\)](#) aurkitu zuten zamo arruntaren eDNA totala ugarien zela 0,2µm baino poro-tamaina txikiagoko iragazkiak erabiltzerakoan. Horrek esan nahiko luke gaur egun alor honetan erabiltzen ari diren iragazkiak, guk erabilitakoak barne (0,45µm-3µm), argi galtzen dutela eDNA-ren parte bat. Gure emaitzei so eginda, ikus daiteke zamo arruntaren arrastoak soilik 0,45µm-ko iragazkiarekin detektatu genituela, eta bakarrik estazio batean. Agian, poro-tamaina txikiagoko iragazkiekin errepikatu beharko litzateke saiakuntza, zamo arrunta eta beharbada beste espezieen DNA detektatuko bada.

Negatibo faltsuen beste eragile garrantzitsua da itu-espezieen DNA biltzerakoan hutsegitea egon izana. Hau da, porrot egin daiteke itu-espeziearen DNA biltzerakoan nahiz eta espeziearen DNA benetan egon lagindutako lekuan. Akats mota hau ekiditeko, espeziearen jarrera eta habitataren ezagumendu ekologikoa funtsezkoa da ([Valentini et al., 2008](#)). Modu honetan, ezagutuko genuke ea zein den itu-espezie(ar)en habitata urtean zehar, noiz d(ir)en aktiboago, etab. Faktore hauek espezie-espezifikoak dira gehienbat, eta horrenbestez, iktiologo espezializatuak gako izan daitezke laginketa arrakastatsu bat gauzatzeko. Izan ere, hau izan daiteke ezkailua ez detektatu izanaren arrazoi garrantzitsu bat; ezkailua apiriletik ekainera erruten du ([Doadrio et al., 2001c](#)), eDNA gehien askatuko duelarik bereziki garai horretan. Guk, baina, urriaren bukaera aldera lagindu genuen ibaia. Areago, honek azal dezake amuarrain arrunta detektatu izana, errun-garaia urriaren hasieratik otsailera duenez gero ([García et al.,](#)

1988; [Rustadbakken et al., 2004](#)). Perka amerikarra ez detektatzearen beste arrazoi bat izan daiteke ere ez dugula beharrezko momentuan eta lekuan lagindu; perka amerikarra udaberrian erruten du eta, gainera, ur-landaredia itxiko lekuetan egon ohi dira. Guk, baina, ur-laginak ibaiaren ur-gainazalean hartu genituen. Gauzak horrela, egokiena izango litzateke etorkizuneko saiakuntzetan biologo molekularrak eta iktiologoak lankidetzan burutzea ikerketa.

Aipatu bezala, ur-laginak ibaiaren gainazalean jaso ziren eta hori ere lotuta egongo da, ziur aski, eDNA gutxiago jasotzearen auziarekin. Izatez, arrainen eDNA 8 eta 1800 aldiz ugariagoa da ur-sedimentu gramo batean ur-mL batean baino ([Turner et al., 2015](#)). Honen arrazoia da partikulei atxikitutako eDNA jalki egiten dela bai eta sedimentuetan eDNA-k gehiago irauten duela degradatu gabe ([Thomsen et al., 2015](#)). Gainera, uretan aurkitzen den edozein eDNA, laginketa-momentuko espeziearen presentzia islatzen du, eta ez bere presentzia historikoa. Ikerketa askok, baina, aurkitu dute uretako DNA nahiko azkar eta maila detektaezinetara degradatzen dela espeziea desagertu eta ordu batzuetatik aste pare bat bitartera ([Pilliod et al., 2014](#); [Barnes et al., 2014](#)). eDNA-ren iraunkortasuna ingurunearen tenperatura, pH eta izpi ultramoreen menpe dago, besteak beste. Horrenbestez, denbora mugatua da espezie baten presentzia eta detekzioaren artean; beste hitzetan, uretan espezie baten DNA aurkitzekotan, ondoriozta daiteke espeziea bertan egon dela laginketa egin eta denbora erlatiboki gutxi aurretik ([Dejean et al., 2011](#)).

Beste alde batetik, jakina da DNA kalitatea jaitsi daitekeela behin laginak bilduta maneiua ez bada guztiz biribila. Ikerketa hau ez dute esku adituek aurrera eraman, eta beraz, akatsei utzitako tokia emendatu izana ez litzateke ustekabekoa.

Laginen kutsadura, bai landan bai laborategian ardura serioa da. ZientziaKide proiektuari jarraiki, laginketa 5. eta 6. mailako umeek burutu zuten, eta nahiz eta mantala eta eskularruak soinean zeramatzaten, zaila da inolako kutsadurarik ez gertatu izana. Hortaz gain, laborategian DNA-lan tradizionala egiten denean, itu DNA-ren kantitate eta kalitate altu bat eskuztatzen da (adibidez, ehunetako laginak). Ordea, eDNA-lanetan arras bakana, eta askotan degradatuta dagoen itu-DNA erabiltzen da. Hori dela eta, gomendagarria da gutxienez DNA erauzketaren gela eta PCR-ak gauzatzen direnoko gelak (non DNA-maila altuagoak sortzen diren) bananduta egotea; ez hori bakarrik, baita presio-kontrolatutako geletan jardutea ere aholkatzen da ([Herder et al., 2014](#)). Ikerketa honetan ez da horrelakorik erabili aukerarik ez zegoelako, nahiz eta erauzketa-gunea eta PCR-gunea behintzat laborategiaren baitan aldentuta egon. Baldintza hauetan, kutsadura gurutzatua probablea bihurtzen da.

ZientziaKide proiektuari so eginda, badaude baita ikasleekin elkarlana maximizatzeko aukerak. Hau da, eredu bezala hartutako “DNA & life” proiektuan ([Danimarkako Historia Naturaleko Museoa, 2015](#)), ikasleak dira prozesu metodologiko osoa aurrera eramaten dutenak, baita laborategian burutu beharrekoa ere. Are gehiago, saiakuntza osoa goiz batean zehar burutzen dute. Egia da, Danimarkako Historia Naturaleko Museoak ekintza hau planteatzen duela ikasle nagusiagoei begira, institutuko

ikasleentzat alegia. Modu horretan, ikasleek ez dute bakarrik landa-ikerkuntzan parte-hartzen, baita ezagutzen dute laborategiko-lanaren ideia, laborategiko egunerokotasunaren garrantzia, eta laborategi batean lan egitearen esanahia ulertzen dute bai eta sartuta dauden prozesuak ere. Ideia hori garatzeko hurrengo saiakuntzetan ikasle nagusiagoekin jardun beharko litzateke eta laborategiko teknika findu ere, heziketa-programa ikasleen eskola-orduekin bateragarria izan dadin. Hala ere, adin-esparru desberdin hauetan, helburuak desberdinak izan daitezke. Hamaika urteko umeekin beraien etorkizuneko bokazioan eragina izan genezakeen, hau da, ume batzuk zientziara bideratzea izan daiteke helburua. Institutuko ikasleetan, aldiz, erabaki nagusiak hartuak egon daitezke, eta honelako ekimenak, zientziarekiko jarrera positiboa sustatzera bideratuak beharko lukete. Noski, hau berdin-berdin aplikatu behar da hamaika urteko umeentzako bideraturiko egitasmoetan, ume guztiek ez baitituzte zientziak aukeratu behar.

Haatik, lan handia hartu da positibo faltsuak detektatzeko. Izatez, emaitza positiboak sekuentziatu dira posiblea zireneko kasuetan, hots, *A. anguilla*, *C. labrosus* eta *S. trutta* espezieen kasuetan, eta berretsi dira BLAST eta CLUSTALW tresna bio-informatikoekin. Horrela frogatu ahal izan da detektatutako sekuentzia zegokion espeziearena dela. *Cyprinus carpio* espeziearen kasuan, baina, ezin izan zen konfirmatu benetan espeziea detektatu zenik sekuentziazioak huts egin zuelako. Hala ere, baliteke korrokoia detektatu izana, erreakzio gurutzatuko frogan gelean aplikioia agertu zenez gero korrokoia lagina zamo arruntaren hasle-parearekin aplikatu zeneko zutabeen (6. irudia). Egia da positibo faltsuak agertu daitezkeela DNA ingurunean mantentzen bada behin iturri espeziea inguruetik alde egin duela edo desagertu bada; baina aurretik esan bezala, ur-laginen kasuan aukera hori ia ezinezkoa da.

Iradoki izan da kontserbazioarekiko jendartearen ardura emendatu daitezkeela gizarte-kapitala eraikiz ([Schwartz, 2006](#)). Gizarte-kapitalak neurtzen du Herritarren Zientzian parte hartzen duten komunitateen konfiantza, harmonia eta lankidetzaren emendioa ([Sultana et al., 2008](#)). Azken batean, gizartearen balio hauen igoerak komunitate hezituago bat bidera dezake ([Cooper et al., 2007](#)). Gainera, bultzatuz hiritar partaideak hiri-inguruko naturaren ikuskatzean eta kudeaketa aktiboan, herritarren zientzia horrek matrize indartsu bat sor dezake, bioaniztasunean eragin positibo, metagarri eta neurgarriak ekar ditzakeena. Izatez, ikerketa honen emaitzek agertzen dute herritarrekin elkarlanak izan dezakeen ahalmena zientzian, bai eta ikasleen heziketa eta zientziarekiko interesa handitzeko izan dezakeen potentziala ere.

5. Ondorioak

Ikerketa hau eDNA metodoan oinarritutako Euskal Herriko lehenengo ikerlana izan da, hots, teknikarekin trebatzeko lehenengo hurbilketa bat. Argi dago teknikari dagokionez badaudela hobetzeko alderdiak, baina ZientziaKide KIDS programari dagokiola, esan daiteke ikerlan honetan abiatutako elkarlana arrakasta bat izan dela. Hala ere, honakoa lehenengo saiakera izan da eta analisiak ikasleen

lan orduetara moldatu beharko lirateke eta metodologiaren aldetik egokitu, prozedura osoaren jabe izan daitezten, Danimarkako “DNA & life” proiektuan gertatzen den antzera.

Gero eta ikerketa-talde eta erakunde gehiagok jartzen diote arreta eDNA-ri; hortaz, espero daiteke gero eta espezie gehiagoren gene mitokondrialetarako hasleak garatuko eta egongo direla eskuragarri. eDNA-ren inguruko jakintza azkar eraikiko da bi ikerketa-mota hauen bitartez: eDNA-ren iraunkortasunean eragiten duten faktoreen inguruko ikerketak, bai eta ingurune ezberdineko eDNA-ren banaketaren ikerketak. Horrek, era berean, lagunduko du laginketa-protokoloen hobekuntzan. Halaber, eDNA metodologiak potentzial handia agertzen du espezie arrotz inbaditzaileen aurkikuntzan (adib. [Jerde et al., 2011](#); [Dejean et al., 2012](#)) eta espezie mehatxatuen ikuskatzean (adib. [Thomsen et al., 2011](#)). Gainera, gaur egun, espezie adierazleak erabiltzen dira habitataren kalitatea ebaluatzeko, etorkizunean, eDNA-ri esker, ingurunean dagoen bioaniztasun osoa kontuan har liteke asmo honetarako. Adibidez, iktiofaunaren aniztasunaren indize egokiak garatuta.

6. Esker onak

Gradu Amaierako Lan hau ezin izan litzateke aurrera eraman izan Eusko Jaurlaritzaren, Kutxa Fundazioaren eta Astigarragako Udalaren finantzaziorik gabe, Elhuyarrek abiarazitako ZientziaKide Proiektuaren bitartez. ZientziaKide Proiektuaren harira, eskertu beharrekoa da umeekin Garazi Andonegik eskainitako laguntza. Azkenik, gustatuko litzaidake eskertzea nire zuzendariei, Oihane Diaz de Cerio-ri eta Ibon Cancio-ri, ikerlanaren garapenean eta zabalkuntzan lagundu izanagatik.

7. Bibliografia

- Almodóvar, A. & Nicola, G. G. (1999). Effects of a small hydropower station upon brown trout *Salmo trutta* L. in the river Hoz Seca (Tagus basin, Spain) one year after regulation. *Regulated Rivers, Research & Management*, 15, 477-484.
- Almodóvar, A., Nicola, G. G. & Suárez, J. (2000). Trucha común. Un pez en crisis. *Biológica: conocer y conservar la naturaleza*, 48, 44-52.
- Atlas, R. M. & Bartha, R. (1998). 8. Kapitulua. In L. Wesley (Eds.), *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. (pp. 442-444). California: Pearson.
- Baldigo, B. P., Sporn, L. A., George, S. D. & Ball, J. A. (2017). Efficacy of Environmental DNA to Detect and Quantify Brook Trout Populations in Headwater Streams of the Adirondack Mountains, New York. *Transactions of the American Fisheries Society*, 146, 99-111. doi:10.1080/00028487.2016.1243578.
- Barnes, M. A. & Turner, C. R. (2016). The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 17, 1-17. doi:10.1007/s10592-015-0775-4.
- Barnes, M. A., Turner, C. R., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Chadderton, L. & Lodge, D. M. (2014). Environmental Conditions Influence eDNA Persistence in Aquatic Systems. *Environmental Science & Technology*, 48, 1819-1827. doi:10.1021/es404734p.
- Bohmann, K., Evans, A., Gilbert, M. T. P., Carvalho, G. R., Creer, S., Knapp, M., ... de Bruyn, M. (2014). Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology and Evolution*. 29, 358-367. doi:10.1016/j.tree.2014.04.003.

- Carim, K. J., Dysthe, J. C., Young, M. K., McKelvey, K. S & Schwartz, M. K. (2017). A Noninvasive Tool to Assess the Distribution of Pacific Lamprey (*Entosphenus tridentatus*) in the Columbia River Basin. *PLoS ONE*, 12, e0169334. doi:10.1371/journal.pone.0169334.
- Civade, R., Dejean, T., Valentini, A., Roset, N., Raymond, J-C., Bonin, A., ... Pont, D. (2016). Spatial Representativeness of Environmental DNA Metabarcoding Signal for Fish Biodiversity Assessment in a Natural Freshwater System. *PLoS ONE*, 11, e0157366. doi:10.1371/journal.pone.0157366.
- Cooper, C. B., Dickinson, J., Phillips, T. & Bonney, R. (2007). Citizen Science as a Tool for Conservation in Residential Ecosystems. *Ecology and Society*, 12, 11.
- Darwall, W. R. T., Smith, K. G., Allen, D., Seddon, M. B., Reid, G. M., Clausnitzer, V. & Kalkman, V. J. (2009). Freshwater biodiversity: a hidden resource under threat. In: Vié, J-C., Hilton-Taylor, C. & Stuart, S. N., (Eds.). *Wildlife in a Changing World - An analysis of the 2008 IUCN Red List of Threatened Species™*. (pp. 48-52). Barcelona: Ingoprint, S. A.
- Deagle, B. E., Eveson, J. P. & Jarman, S. N. (2006). Quantification of Damage in DNA Recovered from Highly Degraded Samples – a Case Study on DNA in Faeces. *Frontiers in Zoology*, 3, 11. doi:10.1186/1742-9994-3-11.
- Deiner, K., Walser, J-C., Mächler, E., Altermatt, F. (2015). Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biological Conservation*, 183, 53-63. doi: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, 8-11. doi:10.1371/journal.pone.0023398.
- Dejean, T., Valentini, A., Miquel, C., Taberlet, P., Bellemain, E. & Miaud, C. (2012). Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology*, 49, 953-959. doi:10.1111/j.1365-2664.2012.02171.x.
- Departamento de Medio Ambiente, Planificación Territorial, Agricultura y Pesca. (2012). Medidas de conservación de la ZEC “ES2120015 – Urumea ibaia/Río Urumea”. Eskuragarri: goo.gl/7djeKi
- Díaz de Cerio, O., Rojo-Bartolomé, I., Bizarro, C., Ortiz-Zarragoitia, M. & Cancio, I. (2012). 5S rRNA and accompanying proteins in gonads: powerful markers to identify sex and reproductive endocrine disruption in fish. *Environmental Science & Technology*, 46, 7763-7771. doi:10.1021/es301132b.
- Doadrio, I., Ambrosio, L., Sostoa, A., Álvarez, J., Asensio, R., García, J. ... Zaldivar, C. (2001a). *Carassius auratus*. In: Doadrio, I. (Eds.), *Atlas y Libro Rojo de los Peces Continentales de España*. (pp. 165-166). Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales.
- Doadrio, I., Ambrosio, L., Sostoa, A., Álvarez, J., Asensio, R., García, J. ... Zaldivar, C. (2001b). *Cyprinus carpio*. In: Doadrio, I. (Eds.), *Atlas y Libro Rojo de los Peces Continentales de España*. (pp. 187-189). Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales.
- Doadrio, I., Ambrosio, L., Sostoa, A., Álvarez, J., Asensio, R., García, J. ... Zaldivar, C. (2001c). *Phoxinus phoxinus*. In: Doadrio, I. (Eds.), *Atlas y Libro Rojo de los Peces Continentales de España*. (pp. 193-195). Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales.
- Doadrio, I., Ambrosio, L., Sostoa, A., Álvarez, J., Asensio, R., García, J. ... Zaldivar, C. (2001d). *Salmo trutta*. In: Doadrio, I. (Eds.), *Atlas y Libro Rojo de los Peces Continentales de España*. (pp. 129-131). Madrid: Museo Nacional de Ciencias Naturales.
- Doi, H., Inui, R., Akamatsu, Y., Kanno, K., Yamanaka, H., Takahara, T. & Minamoto, T. (2017). Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish. *Freshwater Biology*, 62, 30-39. doi:10.1111/fwb.12846.

- Evans, N. T., Shirey, P. D., Wieringa, J. G., Mahon, A. R. & Lamberti, G. A. (2017). Comparative Cost and Effort of Fish Distribution Detection via Environmental DNA Analysis and Electrofishing. *Fisheries*, 42, 90-99. doi:10.1080/03632415.2017.1276329.
- Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F. & Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4, 423-425. doi:10.1098/rsbl.2008.0118.
- Fukumoto, S., Ushimaru, A. & Minamoto, T. (2015). A basin-scale application of environmental DNA assessment for rare endemic species and closely related exotic species in rivers: a case study of giant salamanders in Japan. *Journal of Applied Ecology*, 52, 358-365. doi:10.1111/1365-2664.12392.
- García, A. & Braña, F. (1988). Reproductive biology of brown trout (*Salmo trutta* L.) in the Aller river (Asturias; northern Spain). *Polskie Archiwum Hydrobiologii*, 35, 361-373.
- Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M. & Wallace, D. C. (1980). Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77, 6715-6719.
- Gura, T. (2013). Citizen science: Amateur experts. *Nature*, 496, 259-261. doi:10.1038/nj7444-259a.
- Hambler, C., Henderson, P. A. & Speight, M. R. (2011). Extinction rates, extinction-prone habitats, and indicator groups in Britain and at larger scales. *Biological Conservation*, 144, 713-721. doi:10.1016/j.biocon.2010.09.004.
- Herder, J., Valentini, A., Bellemain, E., Dejean, T., van Delft, J., Thomsen, P. F. & Taberlet, P. (2014). Environmental DNA – a review of the possible applications for the detection of (invasive) species. Stichting RAVON, Nijmegen. Report 2013-104.
- Huver, J. R., Koprivnikar, J., Johnson, P. T. J. & Whyard, S. (2015). Development and application of an eDNA method to detect and quantify a pathogenic parasite in aquatic ecosystems. *Ecological Applications*, 25, 991-1002. doi:10.1890/14-1530.1.
- Ihobe, Sociedad Pública del Departamento de Medio Ambiente, Planificación Territorial, Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco. (2008). “Tendencias recientes de las poblaciones de peces continentales en la Comunidad Autónoma del País Vasco (1994-2008)”. Eskuragarri: goo.gl/G97wZt
- Ihobe, Sociedad Pública del Departamento de Medio Ambiente, Planificación Territorial, Agricultura y Pesca del Gobierno Vasco. (2009). “Estudio de situación actual y evolución reciente de la población de Sábalo (*Alosa alosa* L.) en la CAPV”. Eskuragarri: <https://goo.gl/zNb1di>.
- Ikaur & Ekolur. (2006). Bases para la elaboración de las directrices sobre el uso sostenible del agua en Gipuzkoa. Gipuzkoako Foru Aldundiarentzako espresuki gauzatutako txostena. Eskuragarri: <https://goo.gl/zD3FSj>.
- Ikeda, K., Doi, H., Tanaka, K., Kawai, T. & Negishi, J. N. (2016). Using environmental DNA to detect an endangered crayfish *Cambaroides japonicus* in streams. *Conservation Genetics Resources*, 8, 231-234. doi:10.1007/s12686-016-0541-z.
- Jane, S. F., Wilcox, T. M., McKelvey, K. S., Young, M. K., Schwartz, M. K., Lowe, W. H., ... Whiteley, A. R. (2014). Distance, flow and PCR inhibition: eDNA dynamics in two headwater streams. *Molecular Ecology Resources*, 15, 216-227. doi:10.1111/1755-0998.12285.
- Jerde, C. L., Mahon, A. R., Chadderton, W. L. & Lodge, D. M. (2011). “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters*, 4, 150-157. doi:10.1111/j.1755-263X.2010.00158.x.
- Karlov, D. S., Marie, D., Sumbatyan, D. A., Chuvochina, M. S., Kulichevskaya, I. S., Alekhina, I. A. & Bulat, S. A. (2017). Microbial communities within the water column of freshwater Lake Radok, East Antarctica: predominant 16S rDNA phylotypes and bacterial cultures. *Polar Biology*, 40, 823-836. doi:10.1007/s00300-016-2008-9.

- Katano, I., Harada, K., Doi, H., Souma, R. & Minamoto, T. (2017). Environmental DNA method for estimating salamander distribution in headwater streams, and a comparison of water sampling methods. *PLoS ONE*, 12, e0176541. doi:10.1371/journal.pone.0176541.
- Laramie, M., B., Pilliod, D. S. & Goldberg, C. S. (2015). Characterizing the distribution of an endangered salmonid using environmental DNA analysis. *Biological Conservation*, 183, 29-37. doi:10.1016/j.biocon.2014.11.025.
- Limburg, K. E. & Waldman, J. R. (2009). Dramatic Declines in North Atlantic Diadromous Fishes. *BioScience*, 59, 955-965. doi:10.1525/bio.2009.59.11.7.
- Maitland, P. S., Renaud, C. B., Quintella, B. R., Close, D. A. & Docker, M. F. (2015). Conservation of native lampreys. In: Docker, M. F. (Eds.), *Lampreys: biology, conservation and control*, 37. (pp. 375-428). Dordrecht: Springer.
- Mateus, C. S., Rodríguez-Muñoz, R., Quintella, B. R., Alves, M. J. & Almeida, P. R. (2012). Lampreys of the Iberian Peninsula: distribution, population status and conservation. *Endangered Species Research*, 16, 183-198. doi:10.3354/esr00405.
- Museth, J., Borgstrøm, R., Brittain, J. E., Herberg, I. & Naalsund, C. (2002). Introduction of the European minnow into a subalpine lake: habitat use and long-term changes in population dynamics. *Journal of Fish Biology*, 60, 1308-1321. doi:10.1111/j.1095-8649.2002.tb01722.x.
- Natural History Museum of Denmark. (2015). *DNA & life – biodiversity and molecular biology*. URL: <https://goo.gl/2emt85>.
- Olds, B. P., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Li, Y., Evans, N. T., Turner, C. R., ... Lamberti, G. A. (2016). Estimating species richness using environmental DNA. *Ecology and Evolution*, 6, 4214-4226. doi:10.1002/ece3.2186.
- Opel, K. L., Chung, D. & McCord, B. R. (2010). A Study of PCR Inhibition Mechanisms Using Real Time PCR. *Journal of forensic sciences*, 55, 25-33. doi:10.1111/j.1556-4029.2009.01245.x.
- Ortiz-Zarragoitia, M., Bizarro, C., Rojo-Bartolomé, I., Diaz de Cerio, O., Cajaraville, M. P. & Cancio, I. (2014). Mugilid Fish Are Sentinels of Exposure to Endocrine Disrupting Compounds in Coastal and Estuarine Environments. *Marine Drugs*, 12, 4756-4782. doi:10.3390/md12094756.
- Piggott, M. P. (2016). Evaluating the effects of laboratory protocols on eDNA detection probability for an endangered freshwater fish. *Ecology and Evolution*, 6, 2739-2750. doi:10.1002/ece3.2083.
- Pilliod, D. S., Goldberg, C. S., Arkle, R. S. & Waits, L. P. (2013). Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 70, 1123-1130. doi:10.1139/cjfas-2013-0047.
- Pilliod, D. S., Goldberg, C. S., Arkle, R. S. & Waits, L. P. (2014). Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources*, 14, 109-116. doi:10.1111/1755-0998.12159.
- Rafferty, J. P. (2015). Invasive species (Biology). *Encyclopaedia Britannica*. URL: goo.gl/WiBpgF.
- Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R. M. & Gough, K. C. (2014). The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*, 51, 1450-1459. doi:10.1111/1365-2664.12306.
- Robin, E. D. & Wong, R. (1988). Mitochondrial DNA molecules and virtual number of mitochondria per cell in mammalian cells. *Journal of Cellular Physiology*, 136, 507-513. doi:10.1002/jcp.1041360316.
- Rojo-Bartolomé, I., Diaz de Cerio, O., Diez, G. & Cancio, I. (2016). Identification of Sex and Female's Reproductive Stage in Commercial Fish Species through the Quantification of Ribosomal Transcripts in Gonads. *PLoS ONE*, 11, e0149711. doi:10.1371/journal.pone.0149711.

- Rustadbakken, A., L'Abée-Lund, J. H., Arnekleiv, J. V., Kraabøl, M. (2004). Reproductive migration of brown trout in a small Norwegian river studied by telemetry. *Journal of Fish Biology*, 64, 2-15. doi:10.1111/j.1095-8649.2004.00275.x.
- Schwartz, M. W. (2006). How conservation scientists can help develop social capital for biodiversity. *Conservation Biology*, 20, 1550–1552. doi:10.1111/j.1523-1739.2006.00421.x.
- Shaw, J. L. A., Weyrich, L. & Cooper, A. (2016). Using environmental (e)DNA sequencing for aquatic biodiversity surveys: a beginner's guide. *Marine and Freshwater Research*, 68, 20-33. doi:10.1071/MF15361.
- Stat, M., Huggett, M. J., Bernasconi, R., DiBattista, J. D., Berry, T. E., Newman, S. J., ... Bunce, M. (2017). Ecosystem biomonitoring with eDNA: metabarcoding across the tree of life in a tropical marine environment. *Scientific Reports*, 7, 1-7. doi:10.1038/s41598-017-12501-5.
- Stoeckle, M. Y., Soboleva, L. & Charlop-Powers, Z. (2017). Aquatic environmental DNA detects seasonal fish abundance and habitat preference in an urban estuary. *PLoS ONE*, 12, e0175186. doi:10.1371/journal.pone.0175186.
- Sultana, P. & Abeyasekera, S. (2008). Effectiveness of participatory planning for community management of fisheries in Bangladesh. *Journal of Environmental Management*, 86, 201-213. doi:10.1016/j.jenvman.2006.12.027.
- Takahara, T., Minamoto, T. & Doi, H. (2013). Using Environmental DNA to Estimate the Distribution of an Invasive Fish Species in Ponds. *PLoS ONE*, 8, e56584. doi:10.1371/journal.pone.0056584.
- Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H. & Kawabata, Z. (2012). Estimation of Fish Biomass Using Environmental DNA. *PLoS ONE*, 7, 3-10. doi:10.1371/journal.pone.0035868.
- Thomsen, P. F. & Willerslev, E. (2015). Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 183, 4-18. doi:10.1016/j.biocon.2014.11.019.
- Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M. T. P., ... Willerslev, E. (2011). Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21, 2565-2573. doi:10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x.
- Torresdal, J. D., Farrell, A. D. & Goldberg, C. S. (2017). Environmental DNA Detection of the Golden Tree Frog (*Phytotriades auratus*) in Bromeliads. *PLoS ONE*, 12, 1-8. doi:10.1371/journal.pone.0168787.
- Tsuji, S., Yamanaka, H. & Minamoto, T. (2017). Effects of water pH and proteinase K treatment on the yield of environmental DNA from water samples. *Limnology*, 18, 1-7. doi:10.1007/s10201-016-0483-x.
- Turner, C. R., Barnes, M. A., Xu, C. C. Y., Jones, S. E., Jerde, C. L., Lodge, D. M. (2014). Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods in Ecology and Evolution*, 5, 676-684. doi:10.1111/2041-210X.12206.
- Turner, C. R., Uy, K. L. & Everhart, R. C. (2015). Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Biological conservation*, 183, 93-102. doi:10.1016/j.biocon.2014.11.017.
- Valentini, A., Pompanon, F. & Taberlet, P. (2008). DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology and Evolution*, 24, 110-117. doi:10.1016/j.tree.2008.09.011.
- Wheeler, Q. D., Raven, P. H. & Wilson, E. O. (2004). Taxonomy: Impediment or Expedient?. *Science*, 303, 285. doi:10.1126/science.303.5656.285.
- Wilcox, T. M., McKelvey, K. S., Young, M. K., Jane, S. F., Lowe, W. H., Whiteley, A. R. & Schwartz, M. K. (2013). Robust Detection of Rare Species Using Environmental DNA: The Importance of Primer Specificity. *PLoS ONE*, 8, e59520. doi:10.1371/journal.pone.0059520.

Willerslev, E., Hansen, A.J. & Poinar, H.N. (2004). Isolation of nucleic acids and cultures from fossil ice and permafrost. *Trends in Ecology & Evolution*, 19, 141–147. doi:10.1016/j.tree.2003.11.010.

Yamanaka, H. & Minamoto, T. (2016). The use of environmental DNA of fishes as an efficient method of determining habitat connectivity. *Ecological Indicators*, 62, 147-153. doi:10.1016/j.ecolind.2015.11.022.

Yoccoz, N. G., Bråthen, K. A., Gielly, L., Haile, J., Edwards, M. E., Goslar, T., ... Taberlet, P. (2012). DNA from Soil Mirrors Plant Taxonomic and Growth Form Diversity. *Molecular Ecology*, 21, 3647-3655. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05545.x.

Zouros, E., Ball, A. O., Saavedra, C. & Freeman, K. R. (1994). An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91, 7463-7467.

Zwart, G., Crump, B. C., Kamst-van Agterveld, M. P., Hagen, F. & Han, S-K. (2002). Typical freshwater bacteria: an analysis of available 16S rRNA gene sequences from plankton of lakes and rivers. *Aquatic Microbial Ecology*, 28, 141-155. doi:10.3354/ame028141.

1. Eranskina

CLUSTALW (1.2.4) multiple sequence alignment

```
Petromizon      KJ684768.1      ATGTCACCACCAACCGTCTATTATTTCGAAAAAACCACCCCTCTCCTATCATTAGGTAACAGT
Micropterus     AY115999.1      -----ATGGCAAGCCTCCGAAAAACCACCCCTTACTAAAAATCGCAAACGAC
Chelon          DQ197935.1      -----ATGATTAAACATCCGAAAAACCACCCCTCTCCTTAAAAATCGCAAACGAC
Salmo           KF985738.1      -----ATGGCCAAACCTCCGAAAAAACCACCCCTCCTAAAAATTGCTAATGAC
Anguilla        EU492326.1      -----ATGGCAAACCTACGAAAAACCACCCACTTCTAAAAATTGCTAACGAT
Phoxinus        EU755036.1      -----ATGGCAAGCCTACGAAAGACGCATCCACTAATAAAAAATCGCAACGGC
Carpio          AB158806.1      -----ATGGCAAGCCTACGAAAAACACACCCCTCTCATTAAAAATCGTAAACGAC
Carassius       KT630394.1      -----CGCTAATGAT
* * *

KJ684768.1      ATATTAGTAGACCTCCCTTCTCCTGCTAACATCTCGGCCTGATGAAATTTGGCTCATT
AY115999.1      GCACCTCGTCGACCTCCCCGCTCCATCAAACATTTTCGGTCTGATGAAACTTCGGCTCCCTG
DQ197935.1      GCATTAGTCGATCTCCCTGCCCCAGCAAATATTTCTGCATGATGAAACTTTGGCTCCCTG
KF985738.1      GCCTAGTCGATCTCCAGCACCATCTAACATCTCAGTTTGATGAAACTTTGGCTCACTC
EU492326.1      GCCCTAGTGGATCTACCAACCCCATCCAATATTTTCAGCATGATGAAATTTGGCTCCTT
EU755036.1      GCCTAGTTCGATCTCCAAACACCCCTCCAATATTTCTGCATCTGGAACTTGGTTCCTT
AB158806.1      GCCTAGTTCGATCTCCAAACACCCCTCCAATATTTTCAGCATGATGAAACTTTGGATCCCTC
KT630394.1      GCCTAGTTCGATCTCCAAACACCCCTCCAATATTTTCAGCATGATGAAACTTTGGATCCCTC
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

KJ684768.1      TTAAGTTTATGCTTAATTCTACAAATATTACTGGACTTATCTTGTCTATACACTACACC
AY115999.1      CTAGGCCTCTGCCTGGCAACCAGATCCTCACAGGCTTATCCTCGCTATACACTATACC
DQ197935.1      CTGCGACTCTGCCCTGATTGCCCAAAATCGTCACAGGCCTATTCCCTTGTCTATACATTACT
KF985738.1      TTAGGCTTATGTCTAGCCACCCAAATTTCTACCGGACTCTCCTAGCCATACACTACACT
EU492326.1      CTAGGATATGTTCTTATTTCAAAAATCCTTACAGGACTATTCTGAGCCATACATTATACA
EU755036.1      CTAGGATGTTGTTAATTACCCTCAAAATTTCTCACAGGACTATTCTAGCCATACATTATACA
AB158806.1      CTAGGACTATGCTTAATTACCCTCAAAATTTTAAACGGCTTATCCTAGCCATACACTACACC
KT630394.1      CTAGGATATGCTTAATTACTCAAAATCCTTAAACGGCTTATCCTAGCCATACACTATACC
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

KJ684768.1      GCTAATACTGAAGCTGCTTCTCCTCAGTTATACACATTTGTCGTGACGTTAATAACGGA
AY115999.1      TCTGATATCGCAACCGCTTCTCATCCGTTGCCACATTTTTTTGATGTAACACTACGGT
DQ197935.1      CCCGACACTGCATCCGCCTTTTCTCCGTAGCCACATTTGTCGAGACGTTAAATACGGC
KF985738.1      TCCGATATCTCAACAGCCCTTTTCTCTGTGTTGCCACATTTGCCGAGATGTTAGCTACGGC
EU492326.1      TCAGACATCTCAACTGCCTTCTCCTCAGTAGCTCACATCTGCCGAGACGTTCAACTATGGA
EU755036.1      TCTGACATCTCAACCGCATTTTTCATCCGTTACCCATATCTGCCGAGACGTTAATATGGG
AB158806.1      TCAGACATTTCAACCGCATTTTTCATCTGTTACCCACATCTGCCGAGACGTTAATATGCGG
KT630394.1      TCAGACATTTCAACCGCATTTTTCATCCGTTGCCACATCTGCCGAGATGTAATATGCGG
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

KJ684768.1      TGACTTATACGAAACCTCCATGCTAATGGCGCTCTATATTTTATCTGCATCTACGCT
AY115999.1      TGACTAATTCGAAACATTTCATGCTAACGGTGCATCCTCTCTTTTTCATCTGCATCTACTTG
DQ197935.1      TGATTAATCCGAAATATACATGCAAACGGTGCATCCTTCTCTTTATCTGCATTTACCTC
KF985738.1      TGACTCATCCGAAACATTTCACGCTAACGGAGCATCTTTCTCTTTATCTGATTTATATA
EU492326.1      TGACTAATTCGAAACCTACATGCAAATGGGGCTCATTTCTTCTTTATCTGCCTATACCTC
EU755036.1      TGACTAATTCGAAATATACACGCCAACGGGCGATCATTTCTCTTTCATCTGCATTTATATG
AB158806.1      TGACTAATCCGTAATGTCACAGCCAACGGAGCATCTTTCTCTTTCTCATTTGCAATTTACATA
KT630394.1      TGACTAATCCGTAATATTACAGCCAACGGGCGATCATTTCTTCTTCATCTGATTTATATA
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

KJ684768.1      CATATCGGACGAGGAATTTATTTATGGCTCCTATTTATATAAAGAAACATGAAACGTCGGA
AY115999.1      CATATCGGCCGGGGCTTATATTATGGTTCATACCTCTACAAAGAGACATGAAACATCGGA
DQ197935.1      CATATCGGACGAGGCTCTACTATGGCTCCTACCTCTATAAAGAAACATGAAATATCGGA
KF985738.1      CATATCGCCGAGGACTCTACTATGGTTCCTACCTATATAAAGAAACCTGAAATATCGGA
EU492326.1      CACATTCGCCGAGGGCTTACTACGGCTCATACCTTTACATAGAAACATGAAACATCGGA
EU755036.1      CATATTCGCCGAGGCTTTATTTATGGTTCATATCTTTATAAAGAAACCTGAAACATCGGA
AB158806.1      CACATCGCCGAGGCTTACTACTACGGATCATACCTTTACAAAGAAACCTGAAACATCGGT
KT630394.1      CACATTCGCCGAGGCTTATTTATGGATCTTACCTTTACAAAGAAACCTGAAACATCGGA
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

KJ684768.1      GTTATTTTATTTGCCTAACTGCAGTACTGCCTTCGTAGGTTATGTTCTCCATGGGGA
AY115999.1      GTAGTCCTCCTCCTAGTTATAATGACTGCCTTCGTAGGGTAGCTCCTCCCTGAGGA
DQ197935.1      GTTGTCTACTCCTTTAGTAATGATAACCGCATTCGTAGGATAGCTTCTCCCTTGGGC
KF985738.1      GTCGTACTGCTACTTCTCATAATAAACCGCTTCGTGGGCTACGTTCTCCATGAGGA
EU492326.1      GTTGTATTATTCCTATTAGTAATAATAACAGCATTCGTAGGATAGTGTCTCCATGAGGA
EU755036.1      GTAGTACTACTCCTCCTGTAATAATAACAGCCTTTGTGGGCTACGTTCTCCATGAGGC
AB158806.1      GTAGTCTTCTACTACTAGTCATAATAACAGCCTTCGTTGGCTATGTTCTCCATGAGGA
KT630394.1      GTAGTCTTATTTCTTACTAGTTATAATAACAGCCTTTGTTGGTTATGTTCTCCATGAGGA
* * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

KJ684768.1      CAAATATCCTTTTGGGGGCAACCGTTATACAAATTTAATTTTCAGCCATACCATATGTA
AY115999.1      CAAATATCCTTTTGGGGGCAACAGTTATTAATAATCTCCTCCGGCCGTCCTCCATCATC
DQ197935.1      CAAATGTCCTTTCTGAGGTGCTACTGTAATACAAACCTCCTCTGCTGTCCCTCATAC
```

KF985738.1 CAGATATCCTTCTGAGGAGCCACTGTAATTACAAACCTTCTCTCCGCTGTCCCATACGTT
 EU492326.1 CAGATATCATTCTGAGGTGCTACAGTAATTACCAACCTACTATCTGCCGTCCCATATGTG
 EU755036.1 CAAATGTCTTTTTGAGGCGCCACAGTAATTACTAACTTGTATCAGCAGTCCCTTACATA
 AB158806.1 CAAATATCCTTTTTGAGGCGCCACAGTAATCAAAACCTCCTATCTGCCGTACCATACATG
 KT630394.1 CAAATATCCTTTTTGAGGCGCTACAGTAATTACAAACCTCCTATCCGCTGTACCATATG
 * * * * *

KJ684768.1 GGAAATGATATTGTAGTATGATTATGGGGAGGCTTCTCAGTATCAAACGCCACTTTAACCC
 AY115999.1 GGCAACACTTTAGTTCATGAATCTGAGGCGGCTTCTCAGTCGACAATGCCACCCTCAC
 DQ197935.1 GGAGACTCCCTTGTCCAATGAATCTGGGGAGGCTTTTCAGTTGACAATGCCACCCTCAC
 KF985738.1 GGAGGCGCCCTTGTACAATGAATTTGAGGCGGATTCTCTGTCGACAACGCCACCCTAAC
 EU492326.1 GGAAACTCCCTAGTCCAATGAATCTGAGGGGATTCTCAGTTGACAACGCCACATTAACC
 EU755036.1 GGAGACATACTGGTTCATGAATCTGAGGTTGGCTTCTCAGTAGATAATGCTACCCTCACG
 AB158806.1 GGAGACATGTTAGTCCAATGAATCTGAGGTGGGTTCTCAGTAGACAATGCAACACTAAC
 KT630394.1 GGAGATATATTAGTTCATGAATTTGAGGAGGCTTCTCCGTAGACAACGCAACACTAAC
 * * * * *

KJ684768.1 CGATTCTTTACCTTCCATTTTATCTTACCATTCTTTAGCAGCAATAACAATAATTCAC
 AY115999.1 CGCTTCTTTGCCCTCCATTTCCATTTTGTATCGCTGCCGCCACAGTAATCCAT
 DQ197935.1 CGATTCTTTGCCCTCCACTTCCCTTCCCTTTGTTATCCTAGCAATAACTTAGTTTAC
 KF985738.1 CGATTTTTTCGCCCTTCCACTTCCCTTCCCTTTGTTATCCTAGCAATAACTTAGTTTAC
 EU492326.1 CGATTCTTCGCATTCCTTCCCTTCCCTTTGTTATGTTAGTTGCCGGGGCCACAATACTTCAC
 EU755036.1 CGATTCTTCGCATTCCTTCCCTTCCCTTTGTTATGTTAGTTGCCGGGGCCGACCGTCCCTGCAC
 AB158806.1 CGATTCTTCGCATTCCTTCCCTTCCCTTTGTTATGTTAGTTGCCGGGGCCGACCGTCCCTGCAC
 KT630394.1 CGATTCTTCGCATTCCTTCCCTTCCCTTTGTTATGTTAGTTGCCGGGGCCGACCGTCCCTGCAC
 * * * * *

KJ684768.1 ATTATATTTCTTACCAAAACAGGATCTAGTAACCCCTATAGGAATTAATTTCTAATTTGGAT
 AY115999.1 CTACTCTTTCTTACGAAACAGGATCTAATAACCCCTTGGGACTAAACTCTGACGCCGAT
 DQ197935.1 CTCATTTTTCTTACGAAACAGGCTCAAACAACCCCTCGGCCATAACTCAGATGCAGAA
 KF985738.1 CTTCTATTTTTACATGAAACCGGCTCTAATAACCCAGCAGGTATCAACTCCGATGCCGAT
 EU492326.1 CTCCTATTTCTCCATGAAACAGGATCAAACAACCCCGTAGGATTAATACTCCGACGAC
 EU755036.1 TTATTGTTTCTACACGAGACAGGATCAAATAACCCCGTTGGATTAAACTCAGATGCAGAT
 AB158806.1 CTACTGTTCTCCACGAAACAGGATCAAACAACCCCAATCGGACTAAACTCAGACCGACAG
 KT630394.1 CTACTATTTCTTACGAAACAGGATCGAACAACCCCATGGACTAAACTCGGACGACGAC
 * * * * *

KJ684768.1 AAGATTCAATTTACCCGATTTTTCTTTCAAAGATATTTTAGGTTTTGTTATTCTACTG
 AY115999.1 AAAATTTTCGTTTACCCCTACTTCTTCTATAAAGACTTGTCTGGGTTTCGACCTCTTCTC
 DQ197935.1 AAAATTTCTCCATTTCCATATTTACATACAAGGACCTCCTGGGATTCCGCAATCCTCT
 KF985738.1 AAAATCTCATTCCACCATACTTCTCATACAAAGACCTCCTAGGATTTGTAGCTATAGTA
 EU492326.1 AAAATCCCATTTCCACCATACTTCTCCTACAAAGACCTACTGGGTTTCATATCATGTC
 EU755036.1 AAAATTTCTTTTACCCCTACTTTTCTTATAAAGACCTTCTAGGTTTTGCAGTGATCTA
 AB158806.1 AAAGTCTTTTCCACCGTACTTCTCATACAAAGACCTCCTTGGATTCTGTAATTTACTC
 KT630394.1 AAAATTTCTTTTCCACCATACTTTTCTATAAAGACCTCCTTGGGTTTCGTAATTTACTA
 * * * * *

KJ684768.1 GGCATTCTTTTACATAATTTCCCTTTTGTAGCCCTAATGCACCTAGGTGAACAGACAATTT
 AY115999.1 ATTGGCCCTCACCTCATAGCCTTATTTTTCCCTAACCTTCTAGGGGACCCGACAATTT
 DQ197935.1 ACTGCACTAGCATCCCTTGCATTATTTGACCCACCTTCTAGGGGACCCGACAAATTT
 KF985738.1 CTTGGCCCTAACATCATTAGCTCTGTTTCGCACCCACCTCCTTGGAGACCCGACAAATTT
 EU492326.1 ACCGCCCTAACAACTACTGCTCTATTCTACCCGAACCTGCTTGGAGACCCGACAACTTC
 EU755036.1 CTAGCTCTTACACTACTAACCCTATTCTTACCAAGTCTACTAGGTGACCCAGAAAATTT
 AB158806.1 CTAGCTCTTACACTACTAGCACTATTCTCCCTAACCTACTAGGAGACCCGACAACTTC
 KT630394.1 TTAGCCCTTACACTCCTAGCATTATTCTCCCAATCTTTTAGGAGACCCGACAACTTT
 * * * * *

KJ684768.1 ATTTATGCTAATCCTCTTAGTACCCCTCCCCATATTAACCAGAATGATACTTTCTATTT
 AY115999.1 ACCCCTGCCAACCCCTTAGTGACTCCACCCACATTAAGCCGAGTGATACTTCTTTTT
 DQ197935.1 ACCCCTGCCAACCCCTAGTAACCCCTCCCCATATTAACCAGAATGATACTTCTTTTT
 KF985738.1 ACGCCTGCCAACCCCTAGTCAACCCACCTCATATCAAGCCGAATGATACTTCTTATTC
 EU492326.1 ACCCCAGCAAATCCAATAGTTACTCCACCACACATCAAGCCAGAGTGGTATTTCTATTT
 EU755036.1 ACTCCTGTAAACCCCTCGTTACCCCGCCTCATATTAACCAGAATGGTATTTCTGTTT
 AB158806.1 ACCCCCGCAAACCCCTTAGTTACACCACCCACATCAAACCAGAATGATACTTCTTATTT
 KT630394.1 ACCCCGCAAATCCCTGGTTACTCCCTCATATTAACCAGAATGATACTTCTTATTT
 * * * * *

KJ684768.1 GCCTATGCCATTCTACGCTCTGTTCCCTAATAAACTTGGAGGTGTTGTAGCTTTAGCAGCA
 AY115999.1 GCCTACGCCATTCTCCGCTCTATTCCCTAACAAACTAGGAGGGTATTAGCTCTACTCGCC
 DQ197935.1 GCCTACGCCATTCTCCGCTCTATTCCGAACAAACTAGGAGGTGTTCTCGCCTTCTATGC
 KF985738.1 GCCTACGCAATCCTTCGCTCCATTCCTAATAAGCTAGGCGGAGTACTCGCCCTCTTATTC
 EU492326.1 GCCTACGCCATTCTACGATCAATTCCTAACAAACTCGGCGGGGTATTAGCCTTGTATTC
 EU755036.1 GCCTACGCTATCTTACGATCTATCCCTAACAAAGTTGGGGGTGTCCTGCACTATTTATTT
 AB158806.1 GCCTACGCCATCCTACGATCAATTCCTAACAAACTCGGAGGTGTCCTGCACTCCTATTC
 KT630394.1 GCCTACGCCATTCTCCGATCAATCCCTAACAAACTTGGAGGAGTCTTGCATTATTTATTC
 * * * * *

```

KJ684768.1 GCTATCATAATCCTCCTAATTATCCCATTACTCACACCTCCAAAACAACGCGGAATACAA
AY115999.1 TCAATTCTTGTACTTATAGTCGTGCCCATCCTTCACACATCAAAAACAACGAGGCTGACC
DQ197935.1 TCAATTCTTGTCTTAATGGTTGTCCCCATTCTCCACACATCCAAAACAACGAGGCTAACA
KF985738.1 TCGATCCTGGTCTTATAGTCGTTCCATCCTCCATACCTCTAAGCAACGCGGACTAAC
EU492326.1 TCCATCCTAGTTCTAATAGTAGTACCAATTCTTCACACCTCAAAAACAACGAGGACTTACA
EU755036.1 AGTATCTTGGTATTAATAGTCGTCCTACTTTACACACCTCAAAAACAACGAGGATTAAC
AB158806.1 TCCATTCTGGTATTAATAGTAGTACCCTACTACACACCTCAAAAACAACGAGGACTAACA
KT630394.1 TCTATCCTCGTACTAATGGTAGTACCCTACTACACACCTCAAAAACAACGAGGACTAACA
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

KJ684768.1 TTTCCGCCACTCGCCCAAATTACATTTTGAATTTTAAATTGCCGATCTAGCACTACTTACA
AY115999.1 TTCCGCCCCCTCACCCAGCTCCTATTTTGAAGCCCTCGTCGCGACGTCGCCATCCTAAC
DQ197935.1 TTCCGCCCCCTCAACTCAATTCCTCTTTTGTAGTTCTTGTTCGAGACGTTGTTATCCTTACC
KF985738.1 TTTCCGCCCTTAACCCAAATTCCTTATTCCTGAACCCCTAGTAGCAGACATACTGATCCTCAC
EU492326.1 TTCCGACCTGCTTCCCACTACTATTCTGAATTTTGTAGCAGATATACCTAGTACTAACA
EU755036.1 TTCCGCCCATTAACCCAAATTCCTTATTCCTGAACCCCTACTAGCAGATATAGTCATTTTGACA
AB158806.1 TTCCGCCCCATCACCCAAATTCCTTATTCCTGAACCCCTAGTAGCGGACATAATTATCCTAACA
KT630394.1 TTCCGCCCAATCACTCAATTCCTTATTCCTGAACCTTGTAGTTGCAGATATGGCTATCCTAACA
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

KJ684768.1 TGACTAGGGGGAGAGCCCGCTGAATATCCATTTTATCTTAATAA CACAAATTGCATCAACA
AY115999.1 TGAATTGGAGGTATGCCCGTGAACATCCATTTGTCAATTATTGGACAAGTTGCCCTCTTTC
DQ197935.1 TGAATCGGAGGCATGCCAGTAGAAGACCCCTACATTTGTTATCGGACAAGTTGCGTCCCTA
KF985738.1 TGAATTGGGGGATACCTGTAGAACACCCATTCATTATCATCGGTCAAGTTGCCCTCTGTA
EU492326.1 TGAATCGGAGGAATACCCAGTAGAACATCCGTACATTTATCATCGGCCAAGTAGCATCAGTA
EU755036.1 TGAATTGGGGGCATACCCGTAGAACACCCATATATTTATTGTTGTTCAAGTAGCGTCAATT
AB158806.1 TGAATTGGAGGCATACCCAGTAGAACACCCCTTCATCATTATTGGACAAT TGCATCCGTC
KT630394.1 TGGATTGGAGGCATACCCAGTAGAACACCCATTCATTATTATTGGACAATCGCATCCATT
          ** * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

KJ684768.1 GTCTACTTCAT AATTTTTATTCTAGTTTCCCAATTTTAGGATATTTAGAAAATAAAATA
AY115999.1 TTGTACTTCTTCTCTTCTGTTCTTTCTCCCTTAGCAGGCTGGCTGGAGAACAAGGCC
DQ197935.1 CTGTATTTCTCACTCTTCTTGAT CCTAATACCAGCAGCAAGTTGAATTGAAAATAAACTC
KF985738.1 ATTTACTTT ACTATCTTCTAGTTCTCGC CCCCTTGGCTGGCTGGGCTGAAAATAAAGCT
EU492326.1 CTTTATTT TCCCTATTCTGTTGCTAAAC CCCTTAGTCGGCTGACTAGAAAACAAGTA
EU755036.1 TTATACTTTG CACTCTTCTCATCCTCACAC CACTGGCAGGATGGCTAGAGAATAAGACA
AB158806.1 CTATACTTCGCA CTATTCCTCATTTTATCCCACTAGCAGGATGGTTAGAAAATAAAGCA
KT630394.1 CTATATTTTACATTTATTCCTT GTCCCTTTCCACTAGCAGGAT GACTAGAAAACAAGCA
          * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

KJ684768.1 CTATAATATCAAAAATACTGGTAAATTTAATTGAAAATTAGTTTACAGA
AY115999.1 CTCGAATGATCC-----
DQ197935.1 CTCTTTTGATGAT-----
KF985738.1 CTTGAATGAACCT-----
EU492326.1 ATAAACTGATAA-----
EU755036.1 TTAAATGAGCC-----
AB158806.1 CTAAATGAGCTT-----
KT630394.1 CTGAAATGAGCTT-----
  
```

1. Irudia: CLUSTALW programaren bitartez egindako *cytB* sekuentzien lerrokadura, ikuskatutako 8 itue-
 espezieekin. Korrokoia kasuan, Cl_{cytB} hasle-parea horiz markatu da eta Cl_{cytB} hasle-parea urdinez; Cl_{cytB}
 hasle-parearen alderantzizko haslea eta Cl_{cytB} hasle-parearen hasle zuzena amankomunean duten sekuentzia-
 zatia grisez adierazi da. Sarbide-zenbaki (*accession number*) bakoitzari dagokion espeziea: KJ684768.1,
Petromyzon marinus; AY115999.1, *Micropterus salmoides*; DQ197935.1, *Chelon labrosus*; KF985738.1, *Salmo*
trutta; EU492326.1, *Anguilla anguilla*; EU755036.1, *Phoxinus phoxinus*; AB158806.1, *Cyprinus carpio*;
 KT630394.1, *Carassius auratus*.

2. Eranskina

Clustalw programa bio-informatikoarekin jasotako emaitzak. Irudi bakoitzean lerrokatuta ageri dira espezie bakoitzerako jasotako sekuentzia eta hasleak diseinatzeko erabilitako sekuentzia; alegia, 1. Irudian *Anguilla anguilla* espeziearen lerrokadura, 2. Irudian *Chelon labrosus* espeziearenak eta 3. Irudian *Salmo trutta* espeziearenak. Nukleotido bakoitzerako izartxo (*) da erabiltzen den kontsentsu-sinboloa adierazteko nukleotido jakin bat, bat datorrela alderaturiko sekuentzietan.

Aa2_F	-----TGAAACTACTTGCGACCAGACA
Aa2_R	-----
Aasek	TCACCGCCCTAACAACTACTTGCCCTATTCTACCCGAACCTGCTTGGAGACCCAGACAACCT
Aa2_F	CTTCACCCCGGCAATCCATAGTTACTCCGCCACACATTAAGCCAGAGTGGTATTTTCTAT
Aa2_R	-----CCGCCACACATTAAGCCAGAGTGGTATTTTCTAT
Aasek	TCACCCAGCAAATCCAATAGTTACTCCACCACACATCAAGCCAGAGTGGTATTTTCTAT ** *****
Aa2_F	TTGCCTACGCCATTCTACGATCAATTCTAATAAACTCGGCGGGGTATTAGCCTTGTTAT
Aa2_R	TTGCCTACGCCATTCTACGATCAATTCTAATAAACTCGGCGGGGTATTAGCCTTGTTAT
Aasek	TTGCCTACGCCATTCTACGATCAATTCTAATAAACTCGGCGGGGTATTAGCCTTGTTAT *****
Aa2_F	CCTCCATTCTAGTTCTAATAGTAGTACCAATTCTTCACACCTCAAAACAACGAGGACTTA
Aa2_R	CCTCCATTCTAGTTCTAATAGTAGTACCAATTCTTCACACCTCAAAACAACGAGGACTTA
Aasek	CCTCCATCCTAGTTCTAATAGTAGTACCAATTCTTCACACCTCAAAACAACGAGGACTTA *****
Aa2_F	CATTCCGACCTGCTTCCCAACTACTATTCTGAATTTTAGTAGCAGATATACTAGTACTAA
Aa2_R	CATTCCGACCTGCTTCCCAACTACTATTCTGAATTTTAGTAGCAGATATACTAGTACTAA
Aasek	CATTCCGACCTGCTTCCCAACTACTATTCTGAATTTTAGTAGCAGATATACTAGTACTAA *****
Aa2_F	CATGAATCGGAGGGATACCAGTAGAACATCCGTACATTATCATCGGCCAAGTAGCATCAG
Aa2_R	CATGAATCGGAGGGATACCAGTAGAACATCCGTACAT-ATCATCG-CCAAG-AGC-TGAG
Aasek	CATGAATCGGAGGAATACCAGTAGAACATCCGTACATTATCATCGGCCAAGTAGCATCAG *****
Aa2_F	TACTTTATTTTCCCTATTCTGGTGCTAAACA
Aa2_R	TA-----
Aasek	TACTTTATTTTCCCTATTCTGGTGCTAAAC- **

1. Irudia: *Anguilla anguilla* espeziearen anplifikatuaren sekuentziazotik jasotako sekuentzien, hasle zuzenarentzako (Aa2_F) eta alderantzizko haslearentzako (Aa2_R) eta hasleak diseinatzeko erabilitako sekuentziaren (Aasek, EU492326.1) arteko lerrokadura.


```

ChI2_F      -----TGAGGAGAAAGGAGATGTGAG-TCCAGACAATTCACCCCTGCA
Chsek      --ATCCCTTGCAATATTTGCACCCAACCTTCTAGGCGACCCAGACAATTCACCCCTGCA
ChI2_R      TCTATCCCTACACCCCTTCATATGCACCACTTTAGCGACCAG-CAATTCACCC-TGCA
              *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

ChI2_F      A-CCCCTAGTAACCCCTCCCATATTAACCCGAAAGATATTTCTCTTCGCATACGCC
Chsek      AACCCCTAGTAACCCCTCCCATATTAACCCGAAATGATATTTCTCTTCGCATACGCC
ChI2_R      A-CCCCTAGTAACCC-TCCCATATTAACCCGAAATGATATT-CCTCTTCGCATACGCC
              *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

ChI2_F      ATTCTCCGCTCTATTCGAACAAACTAGGAGGTGTTCTCGCACTTCTATGCTCAATTCTT
Chsek      ATTCTCCGCTCTATTCGAACAAACTAGGAGGTGTTCTCGCACTTCTATGCTCAATTCTT
ChI2_R      ATTCTCCGCTCTATTCGAACAAACTAGGAGGTGTTCTCGCACTTCTATGCTCAATTCTT
              *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

ChI2_F      GTCTTAATGGTTGTCCCATTTCTCCACACATCCAAACACCGAAGCCTAACATTCCGCCCT
Chsek      GTCTTAATGGTTGTCCCATTTCTCCACACATCCAAACACCGAAGCCTAACATTCCGCCCT
ChI2_R      GTCTTAATGGTTGTCCCATTTCTCCACACATCCAAACACCGAAGCCTAACATTCCGCCCT
              *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

ChI2_F      CTAACCTCAATTCCTCTTTTGTAGTTCTTGTGACAGCGTTGTTATCCTTACCTGAATCGGA
Chsek      CTAACCTCAATTCCTCTTTTGTAGTTCTTGTGACAGCGTTGTTATCCTTACCTGAATCGGA
ChI2_R      CTAACCTCAATTCCTCTTTTGTAGTTCTTGTGACAGCGTTGTTATCCTTACCTGTATCGGA
              *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

ChI2_F      GGCATGCCAGTAGAAGACCCCTACATTGTTATCGGACAAGTTGCGTCCCTACTGTATTTG
Chsek      GGCATGCCAGTAGAAGACCCCTACATTGTTATCGGACAAGTTGCGTCCCTACTGTATTTG
ChI2_R      GGCATGCCAGTAGAAGACCCCTACATTGTTATCGGACAAGTTGCGTCCCTACTGTATTTG
              *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

ChI2_F      TCACTCTTCTTGATCCTAATACCAGCAGCAAGTTGAAAA
Chsek      TCACTCTTCTTGATCCTAATACCAGCAGCAAGTTGAAA--
ChI2_R      TTCCCGCCAGG-----
              *   *   *   *   *
  
```

3. Irudia: *Chelon labrosus* espeziearen amplifikatuaren sekuentziaziotik jasotako sekuentzien, hasle zuzenarentzako (ChI2_F) eta alderantzizko haslearentzako (ChI2_R) eta hasleak diseinatzeko erabilitako sekuentziaren (Chsek, DQ197935.1) arteko lerrokadura.

```

St2_F      -----TTTGAAGTTGTGGGCGACGCTCCCGCCGCGCCGCGTCCGGGGAGCCGAGGAAG
StSek      CTTGGCCTAACATCATTAGCTCTGTTTCGCACCCAACCTC---CTTGGAGACCCGGACAAT
              *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

St2_F      CCTACGCAGACGCGAATTTTCGCCGCCACCCCTAGTC-CCCACCTCATATCAAGCCCG
StSek      TTTACGC-----CTGCCA--ACCCCTAGTCACCCACCTCATATCAAGCCCG
              *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

St2_F      AATGATACTTCTATTCGCCTACGCAATCCTTCGCTCCATTCCATAAAGCTAGGCGGAG
StSek      AATGATACTTCTATTCGCCTACGCAATCCTTCGCTCCATTCCATAAAGCTAGGCGGAG
              *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

St2_F      TACTCGCCCTCTTATTCTCGATCCTGGTCCCTTATAGTCGTTCCCTATCCTCCATACCTCTA
StSek      TACTCGCCCTCTTATTCTCGATCCTGGTCCCTTATAGTCGTTCCCTATCCTCCATACCTCTA
              *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

St2_F      AGCAACGCGGACTAACCTTTCGCCCCCTAACCCAATTCTTATTCTGAACCTTAGTAGCAG
StSek      AGCAACGCGGACTAACCTTTCGCCCCCTAACCCAATTCTTATTCTGAACCTTAGTAGCAG
              *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

St2_F      ACATACTAATCCTCACCTGAATTGGGGGGATACCTGTAGAACACCCATTCAATTATCATCG
StSek      ACATACTGATCCTCACCTGAATTGGGGGGATACCTGTAGAACACCCATTCAATTATCATCG
              *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

St2_F      GTCAAGTTGCCTCTGTAATTTACTTTACTATCTTCCCTAGTTCTCGCAGG
StSek      GTCAAGTTGCCTCTGTAATTTACTTTACTATCTTCCCTAGTTCTCGC-----
              *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *
  
```

4. Irudia: *Salmo trutta* espeziearen amplifikatuaren sekuentziaziotik jasotako sekuentziaren, hasle zuzenarentzako (St2_F), eta hasleak diseinatzeko erabilitako sekuentziaren (StSek, KF985738.1) arteko lerrokadura.