

eDNA-inventering

AV FLODPÄRLMUSSLOR I LINAÄLVEN



EDNASOLUTIONS

waterCIRCLE

Dokumenttitel: eDNA-inventering av flodpärlmusslor i Linaälven

eDNA solutions AB

*Adress: Björkåsgatan 16, 43131 Mölndal Tel: +46 702 11 52 91
www.ednasolutions.se*

WaterCircle

*Postadress: Räntmästaregatan 23c
416 58 Göteborg
E-post: info@watercircle.info*

Beställare: Sweco Environmental AB

Författare: Alexander Eiler (alex@ednasolutons.se), Johan Andersson (info@watercircle.se)

Foto framsida: Linaälven (Lokal 303)

Kvalitetsgranskat av:

Rapportnummer: eDNA solutions Rapport 2018:01

Dokumentdatum: 2018-12-16

Kartmaterial hämtat från VISS.

Innehåll

SAMMANFATTNING	2
1. INLEDNING	3
2. MATERIAL OCH METOD	3
2.1 Fältarbete	3
2.2 Laboratoriearbete	5
2.2.1 Extraktion, PCR och sekvensering	5
3. RESULTAT OCH SLUTSATS	5
3.2 eDNA kvalitet samt kvalitetskontroll	7
Referenser	9

SAMMANFATTNING

Akvatiskt miljö-DNA eller eDNA (från engelskans environmental DNA) har under det senaste decenniet visat sig vara ett lovande verktyg för miljöövervakning av vattenorganismer. Undersökningsmetoden baserar sig på det faktum att alla levande organismer, både växter och djur, kontinuerligt avger genetiska avtryck i miljön i form av slem, avföring, svett och döda celler. Dessa genetiska spår kallas eDNA. eDNA kan utvinnas ur ett vattenprov och genom molekylära analyser ange vilka arter som befinner sig inom ett område utan att man varken ser eller fångar organismen. Eftersom eDNA i vattenmassan är kortlivat ger analyserna en bild av artförekomst i nutid.

I september 2018 utförde eDNA solutions AB och WaterCircle på uppdrag av Sweco Environment AB en eDNA inventering av flodpärlmusslor utanför Gällivare i Linaälven och referenser till detta vattendrag.

eDNA från flodpärlmusslor detekterades i sju provlokaler i området (tabell 2). I tre av dessa vattendrag fanns sedan tidigare rapporterade förekomster av flodpärlmusslor och de andra representera vattendrag där flodpärlmusslor inte har observerats. Våra resultat visar att eDNA baserad inventering av flodpärlmusslor gör det möjligt att inventera ett större område under kortare tid än traditionella inventeringar av flodpärlmusslor med vattenkikare.

1. INLEDNING

Undersökningsmetoden miljö-DNA eller eDNA (environmental DNA) baserar sig på det faktum att alla levande organismer som till exempel växter och djur kontinuerligt avger genetiska fotavtryck i miljön i form av slem, avföring, respiration, svett och döda celler (Taberlet & Bouvet 1992, Goldberg m.fl. 2011). Definitionen på eDNA anges som; "det DNA som kan studeras från dessa spår i miljön utan att målorganismen är närvarande i provet" (Taberlet m.fl. 2012). I akvatiska miljöer kan detta material utvinnas ur små mängder vatten och genom molekylära analyser ange vilka arter som befinner sig inom ett område, utan att man varken ser eller fångar organismen. Eftersom eDNA i vattenmassan i stor utsträckning är kortlivat ger analyserna en bild av artförekomst i nutid. eDNA har visat sig ha en stor potential som verktyg för inventering av vattenlevande organismer (Giovannoni m.fl. 1990, Eiler m.fl. 2004, Bohman m.fl. 2014, Eiler m.fl. 2018).

I september 2018 utförde eDNA solutions AB på uppdrag av Sweco Environment AB en eDNA inventering av flodpärlmusslor i flera vattendrag utanför Gällivare. Sammanslaget togs prov från 12 lokaler i avrinningsområdet av Linaälven och 4 lokaler i Harrträskbäcken/Leipjoki.

2. MATERIAL OCH METOD

2.1 Fältarbete

Fältarbetet utfördes 25 och 26 september 2018. Provtagningspunkter anges i figur 1 och 2. För provtagningen i fält användes sterila sprutor (50 ml) och filter (sterivex filter 0.22 µm). Vatten filtrerades genom att fylla sprutorna och trycka vatten genom filter tills motståndet från klockande filter blir för stort. De filtrerades mellan 480 och 1100 ml vatten genom varje filter. Två filter togs från varje lokal som resulterade i 32 prover. Negativa fältkontroller utgjordes av vatten som filtrerades på plats för att utesluta kontaminering av DNA mellan provtagningar. Positiva fältkontroller utgjordes av vatten som togs vid en flodpärlmusslor förekomst. Flodpärlmusslor observerades även med vattenskickare från denna lokalen.

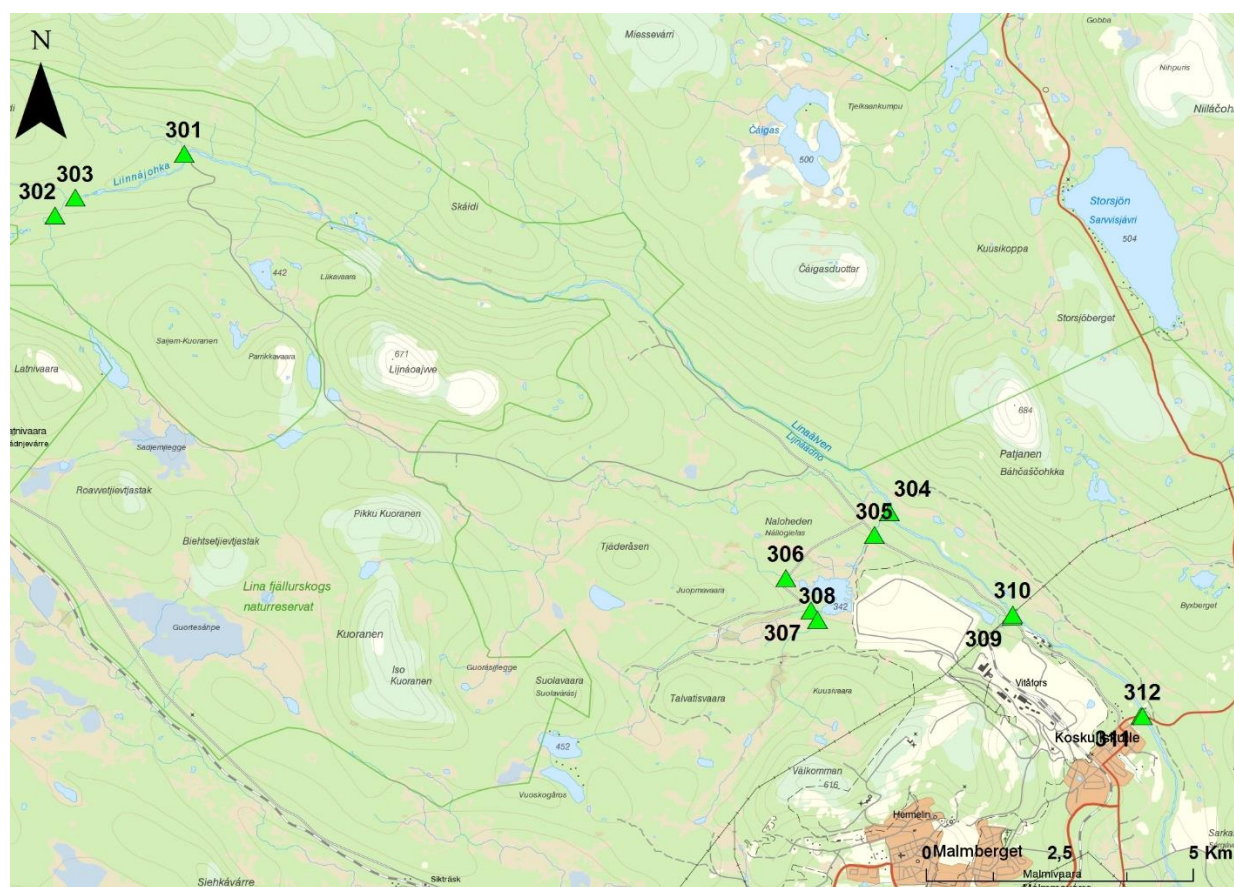
Även swipes från Flodpärlmusslor togs som positiva kontroll och för en spädningsserie för att testa sensitiviteten och dynamiska området. För att testa specificiteten togs swipes från Äkta Målmusslor. Dessa prover togs från sportfiskarnas odling av musslor i Göteborg.



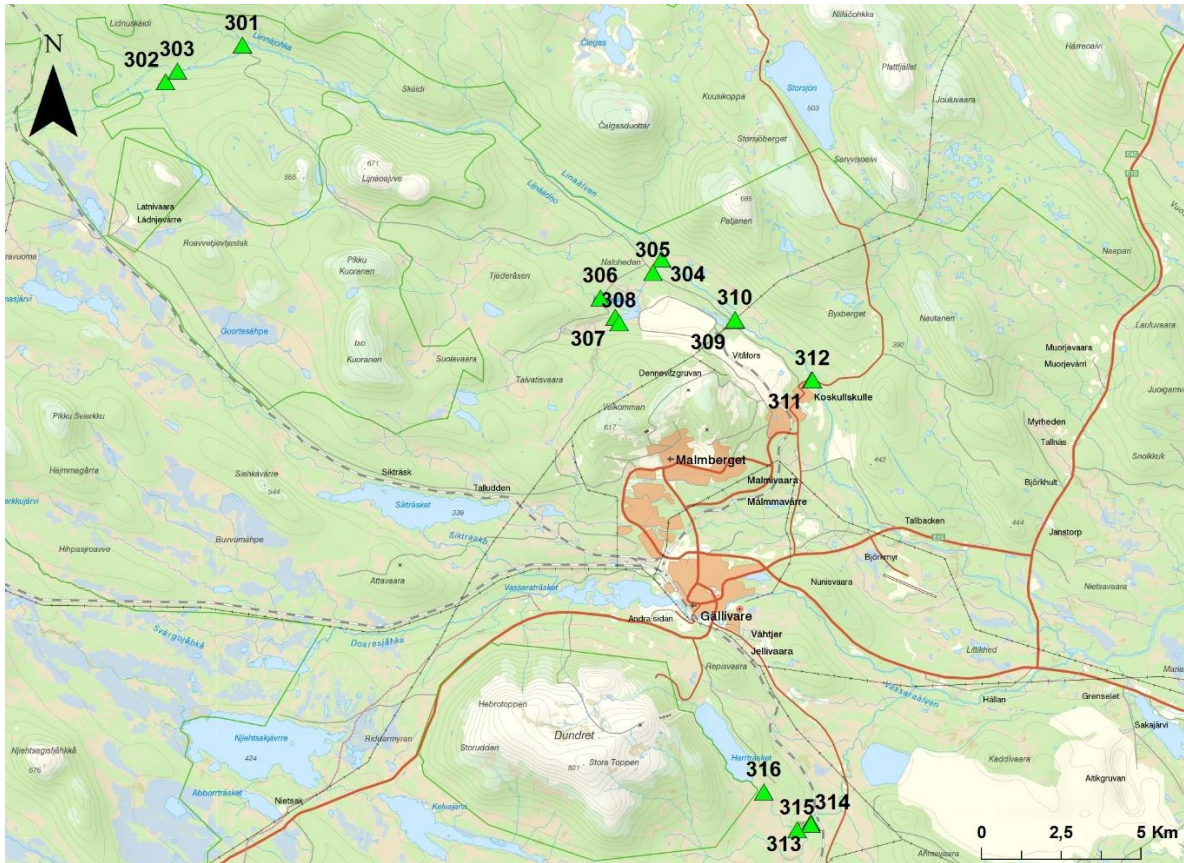
Figur 1. Inventering av flodpärlmusslor i Sadjemjoki.

Tabell 1. Visar provlokaler, vattendrag samt vilken vattenmängd som filtrerats. Alla prover utom prov två på lokal 4 har tagits med spruta.

Lokal	Vattendrag	Volym filtrerat vatten
301	Linaälven	prov 1: 530ml pump, prov 2: 540ml spruta
302	Sadjemjoki	Prov 1: 720ml, prov 2: 720ml
303	Linaälv	Prov 1: 540ml, prov 2: 540ml
304	Linaälven	Prov 1: 660ml, prov 2: 660ml
305	Naalojoki	Prov 1: 780ml, prov 2: 780ml
306	Namnlösbäck	Prov 1: 1100ml, prov 2: 900ml
307	Bäck	Prov 1: 1000ml, prov 2: 840ml
308	Laxöringsbäcken	Prov 1: 500ml, prov 2: 480ml
309	Linaälven Södra sidan	Prov 1: 600ml, prov 2: 600ml
310	Linaälven norra sidan	Prov 1: 600ml, prov 2: 600ml
311	Linaälven Södra sidan	Prov 1: 600ml, prov 2: 600ml
312	Linaälven norra sidan	Prov 1: 600ml, prov 2: 600ml
313	Leipjoki	Prov 1: 400ml, prov 2: 185ml
314	Harrträskbäcken	Prov 1: 700ml, prov 2: 600ml
315	Harrträskbäcken	Prov 1: 650ml, prov 2: 640ml
316	Harrträskbäcken	Prov 1: 480ml, prov 2: 480ml



Figur 2. Karta över provpunkterna i Linaälven.



Figur 3. Samtliga provpunkter i den aktuella undersökningen.

2.2 Laboratoriearbete

2.2.1 DNA extraktion och kvantitativ PCR detektion

eDNA utvanns (extraherades) enligt protokoll från Qiagen (DNeasy PowerWater Sterivex Kit) i sterila laboratorier speciellt byggda för analyser av akvatiskt eDNA. Fyra musslor swipes (2 från Flodpärlmusslor och 2 från Äkta Flodpärlmusslor) extraherades enligt protokoll från Qiagen (DNeasy Blood and Tissue kit). Extraktionerna utfördes av en molekylär-biolog som är tränade i att extrahera eDNA. Proverna analyserades sen med ett kvantitativ PCR assay. Varje prov utfördes i 2 replikata PCR tillsammans med en standardserie av den positiva kontrollen (Flodpärlmusslor DNA). Flera negativa kontroller användes som fältprovtagningkontroller och tekniska kontroller för molekylära labarbete. Primer som amplifierar en region av 16S rRNA genet av Flodpärlmusslor mitochondria användes (Stoeckle m.fl. 2016). PCR protokollet följa beskrivningen i Eiler m.fl. (2018).

3. RESULTAT OCH SLUTSATS

3.1 Flodpärlmusslor förekomst

eDNA av flodpärlmusslor detekterades i 7 lokaler av 16. Under fältarbetet såg provtagarna flodpärlmusslor i av dessa lokaler. I Härtrräskbäcken detekterades flodpärlmusslor i alla fyra prover (2 lokaler). Även nerströms av sammanflöde mellan Härtrräskbäcken och Leipojoki/Dunderbäcken kunde eDNA av flodpärlmusslor detekteras. Det filtrerades på båda sidorna i Leipojoki (lokal 313), det provet som togs på den motstående sidan från där Härtrräskbäcken rinner in var resultaten negativ samma gällde för prover 1 kilometer

uppströms i lokal 316. Flodpärlmusslor detekterades i Sadjemjoki (lokal 302), ett vattendrag känd för flodpärlmusslor förekomster. Nedströms av sammanflöde med Linaälven gav eDNA analysen negativ resultat för lokalerna 303 och 305. Längre nerströms i Linaälven kunde flodpärlmusslor detekteras igen och lokalerna 309 och 310 visar på spår av flodpärlmusslor. Provlokalen 311 gav en signal som ska tolkas som brus och negativ (Cq > 38). I tabell 2 visas även signalstyrkan av eDNA detektionen i de tekniska replikatet. De mest tydliga mönstret är att eDNA signalen är av avtagande nerströms (314 och 313), den positiva provtagningspunkten (315) finns i Härträskbäcken. De skall också nämnas att proverna fixerades med ethanol (70%) vilket gav dåligt DNA (indikeras i tabellen "dåligt DNA extrakt").

Tabell 2. Signalstyrkan av QPCR assay i de olika proverna och tekniska duplikat ('1', '2'). Cq "quantification cycle threshold" (the point at which the amplification curve crosses the threshold) SQ "signal quantity" (absolute signal strength at Cq)

Sample ID	Cq 1	SQ 1	Cq 2	SQ 2
301	Dåligt DNA extrakt			
301	36.22	1258476	36.22	1259421
302	Dåligt DNA extrakt			
302	33.05	145768	32.44	96659
303				
303				
304				
304				
305				
305				
306				
306				
307				
307				
308				
308				
309	36.15	1202979	35.83	968515
309				
310	37.71	3476300		
310				
311	38.55	6138996		
311			39.87	15079162
312				
312				
313				
313	36.39	1409299	36.42	1445063
314	34.37	358830	35.03	559216
314	35.16	612463	35.45	744221
315	29.97	18028	29.73	15299
315	29.19	10549	29.50	13076
316	Dåligt DNA extrakt			
316	Dåligt DNA extrakt			
Kvarn	35.67	868215	35.74	908142

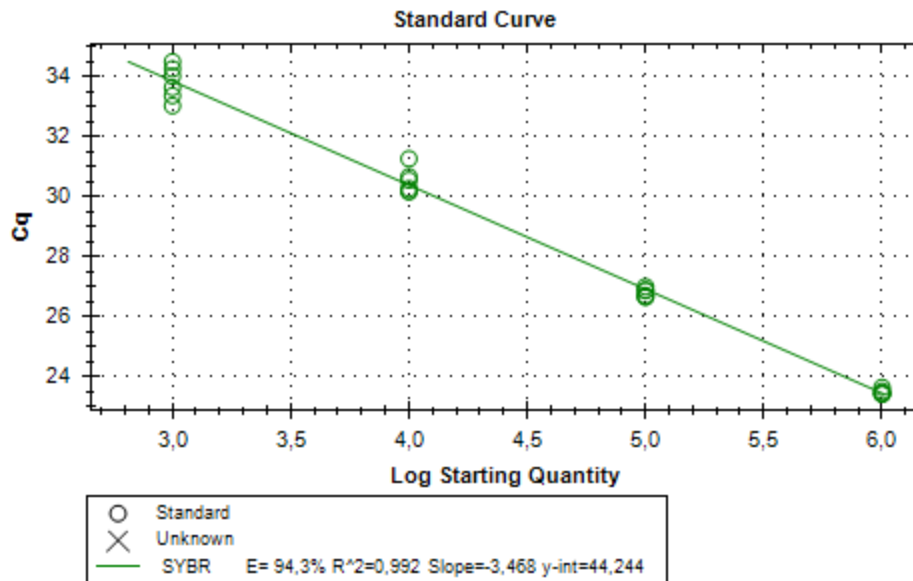
De sporadiska detektionerna i Linaälven efterfrågar en mer detaljerad inventering av flodpärlmusslor i älven och dessa biflöden för att kartlägga förekomster i Linaälvens avrinningsområde. Dock tyder det på att det finns flodpärlmusslor i Linaälven eller i något biflöde mellan provpunkterna lokalerna 301 och 309.



Figur 4. Flodpärlmussla (*Margaritifera margaritifera*) från Sadjemjoki.

3.2 eDNA kvalitet samt kvalitetskontroll

Kvalitetskontrollerna samt mängden filtrerat vatten anges i tabell 1 och följer direktiven i Sveriges lantbruksuniversitets kunskapssammanställning av eDNA analyser (Bohman 2018). DNA var rent och visade hög kvalitet. Alla negativa kontroller var negativa. De positiva kontrollerna var positiva. Två PCR assays testades. Vi använde oss av en assay med hög effektivitet och sensitivitet (figur 5). På alla prover kördes också smältkurva för att testa för icke-specifik amplifisering. Resultaten från smältkurvor visade enstaka toppar på samma temperatur och kan tolkas som PCRn resulterade i PCR produkter av korrekt storlek.



Figur 5. Standardkurva av QPCR assayn. Visa god E – effektivitet och R² – regression-coefficiens.

I figur 5 visas en jämförelse av standardserier med två olika assays för att detektera eDNA från flodpärlmusslor. Dessa assays använde sig av olika primer för PCR och amplifiera två olika gener COI och 16S rRNA som finns i mitochondria-genomet av flodpärlmusslor. Som man kan se gav de väldigt liknande resultat.

Referenser

- Bohmann, K., A. Evans, M. T. P. Gilbert, G. R. Carvalho, S. Creer, M. Knapp, D. W. Yu, M. de Bruyn. 2014. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution* 29:358–367.
- Bohman, K. 2018. eDNA i en droppe vatten Vattenprovtagning av DNA från fisk, kräftor och musslor – en kunskapssammanställning. *Aqua Reports* 2018:18.
- Eiler, A., S. Bertilsson. 2004. Composition of freshwater bacterial communities associated with cyanobacterial blooms in four Swedish Lakes. *Environmental Microbiology* 6:1228–1243.
- Eiler, A., A. Löfgren, O. Hjerne, S. Nordén, P. Saetre. 2018. Environmental DNA (eDNA) detects the pool frog (*Pelophylax lessonae*) at times when traditional monitoring methods are insensitive. *Scientific Reports* 8:5452.
- Giovannoni, S. J., T. B. Britschgi, C. L. Moyer, K. C. Field. 1990. Genetic diversity in Sargasso Sea bacterioplankton. *Nature* 345:60–63.
- Goldberg, C. S., D. S. Pilliod, R. S. Arkle, L. P. Waits. 2011. Molecular Detection of Vertebrates in Stream Water: A Demonstration Using Rocky Mountain Tailed Frogs and Idaho Giant Salamanders. *PLoS ONE* 6: e22746.
- Taberlet, P., J. Bouvet. 1992. Bear conservation genetics. *Nature* 358:197.
- Taberlet, P., E. Coissac, M. Hajibabaei, L. H. Rieseberg. 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21:1789-1793.

waterCIRCLE

EDNASOLUTIONS