

eDNA-inventering

av fiskfaunan i Svartån



EDNASOLUTIONS

waterCIRCLE

Dokumenttitel: eDNA-inventering av fiskfaunan i Svartån
Version: 2

eDNA solutions AB

Adress: Björkåsgatan 16, 43131 Mölndal, Tel: +46 702 11 52 91

Hemsida: www.ednasolutions.se

WaterCircle

Adress: Röntmästaregatan 23c, 416 58 Göteborg, Tel +46 703 45 43 47

E-post: info@watercircle.info

Beställare: Sveriges Sportfiske- och Fiskevårdsförbund

Författare: Alexander Eiler (alex@ednasolutons.se), Johan Andersson (info@watercircle.se),
Tomas Larsson (tomas@ednasolutions.se), Mats Töpel (mats@ednasolutions.se) och Omneya
Ahmed (omneya@ednasolutions.se)

Foto framsida: Svartån vid Fabriksgatan i Tranås

Rapportnummer: eDNA solutions Rapport 2019:02

Dokumentdatum: 2020-01-05

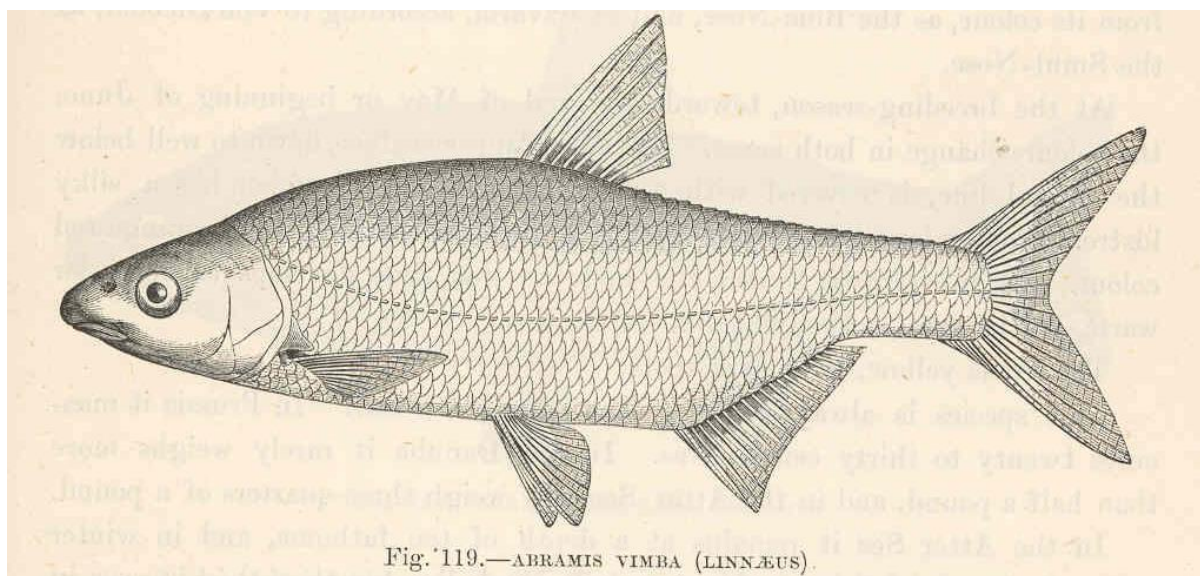
Innehåll

SAMMANFATTNING.....	4
1. INLEDNING.....	5
2. MATERIAL OCH METOD	6
2.1 Fältarbete.....	6
2.2 Laboratoriearbete	8
DNA extraktion och kvantitativ PCR detektion.....	8
3. RESULTAT	9
4. DISKUSSION.....	11
REFERENSER	12

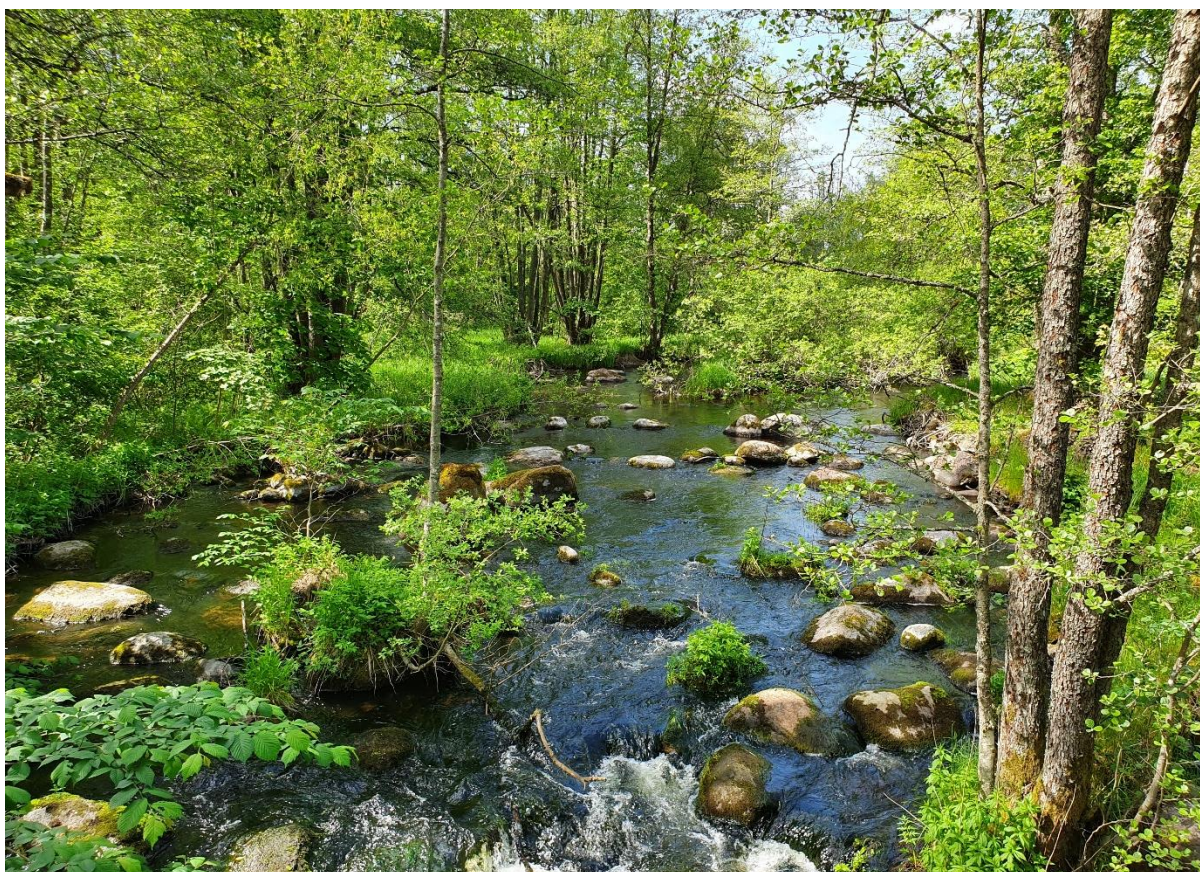
SAMMANFATTNING

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 att alla levande organismer kontinuerligt utsöndrar genetiska avtryck i miljön. Dessa genetiska spår kallas eDNA. eDNA kan utvinnas ur ett vattenprov och genom molekylära analyser påvisa vilka arter som befinner sig inom ett område utan att man behöver observera eller fånga organismer. Eftersom eDNA i vattenmassan är kortlivat ger analyserna en bild av artförekomst i nutid.

Den 2 och 15 juni 2019 utförde eDNA solutions AB och WaterCircle, på uppdrag av Sveriges sportfiske- och fiskevårdsförbund (Sportfiskarna), en eDNA-inventering av fiskfauna i Svartån i Jönköpings län. Provtagningen gjordes på fem lokaler uppströms sjön Sommen. Syftet med detta projekt har varit att undersöka förekomsten av Vimma (*Abramis vimba*). Då det i nuläget inte finns en specifik metod för att detektera enbart Vimma så har hela fiskfaunan undersökas. Totalt detekterades 15 fiskarter, t.ex. asp, björkna och gös men inte Vimma.



Figur 1. Vimma (*Abramis vimba*) Wikipedia



Figur 2. Provloken i Noån, Detta är den högst belägna lokalen som provtagits i Svartåns avrinningsområde.

1. INLEDNING

Undersökningsmetoden miljö-DNA eller eDNA (environmental DNA) baseras på att alla levande organismer som till exempel växter och djur kontinuerligt avger genetiska fingeravtryck i miljön i form av slem, avföring, och döda celler (Taberlet & Bouvet 1992, Goldberg m.fl. 2011). Definitionen av eDNA är enligt Taberlet m.fl. (2012) "det DNA som kan studeras från dessa spår i miljön utan att målorganismen är närvarande i provet". I akvatiska miljöer kan 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).

Den 2 och 15 juni 2019 utförde eDNA solutions AB på uppdrag av Sportfiskarna en eDNA inventering av fiskfaunan i Svartån i Jönköpings län. Sammantaget togs prov från fem lokaler i Svartån (Figur 4). Anledningen till att två provtagningar genomfördes var att de första proverna förstördes då fryskärlet som de förvarades i inte höll rätt temperatur. De analyserade proverna är därför enbart från den 15 juni. Provtagningen utfördes i samband med ett högtryck och en lufttemperatur på 24 grader.

2. MATERIAL OCH METOD

2.1 Fältarbete

Fältarbetet utfördes den 15:e juni 2019. Provtagningspunkter anges i figur 4 och tabell 1. För provtagningen i fält användes sterila sprutor (60 ml) och filter (Sterivex filter 0.22 µm, figur 3). Det genetiska materialet samlades in genom att provtagaren först fyllde en spruta med vatten som sedan trycktes genom filtret tills motståndet från det så småningom igensatta filtret blev för stort. Mellan 400 och 840 ml vatten filtrerades på detta vis genom varje filter (Tabell 1). Två filter-prov samlades in från varje lokal, vilket resulterade i totalt tio prover där partiklar på filtret är utgångspunkten för analysen. Filtren lagrades sedan omedelbar i flyttande kväve (dryshipper).

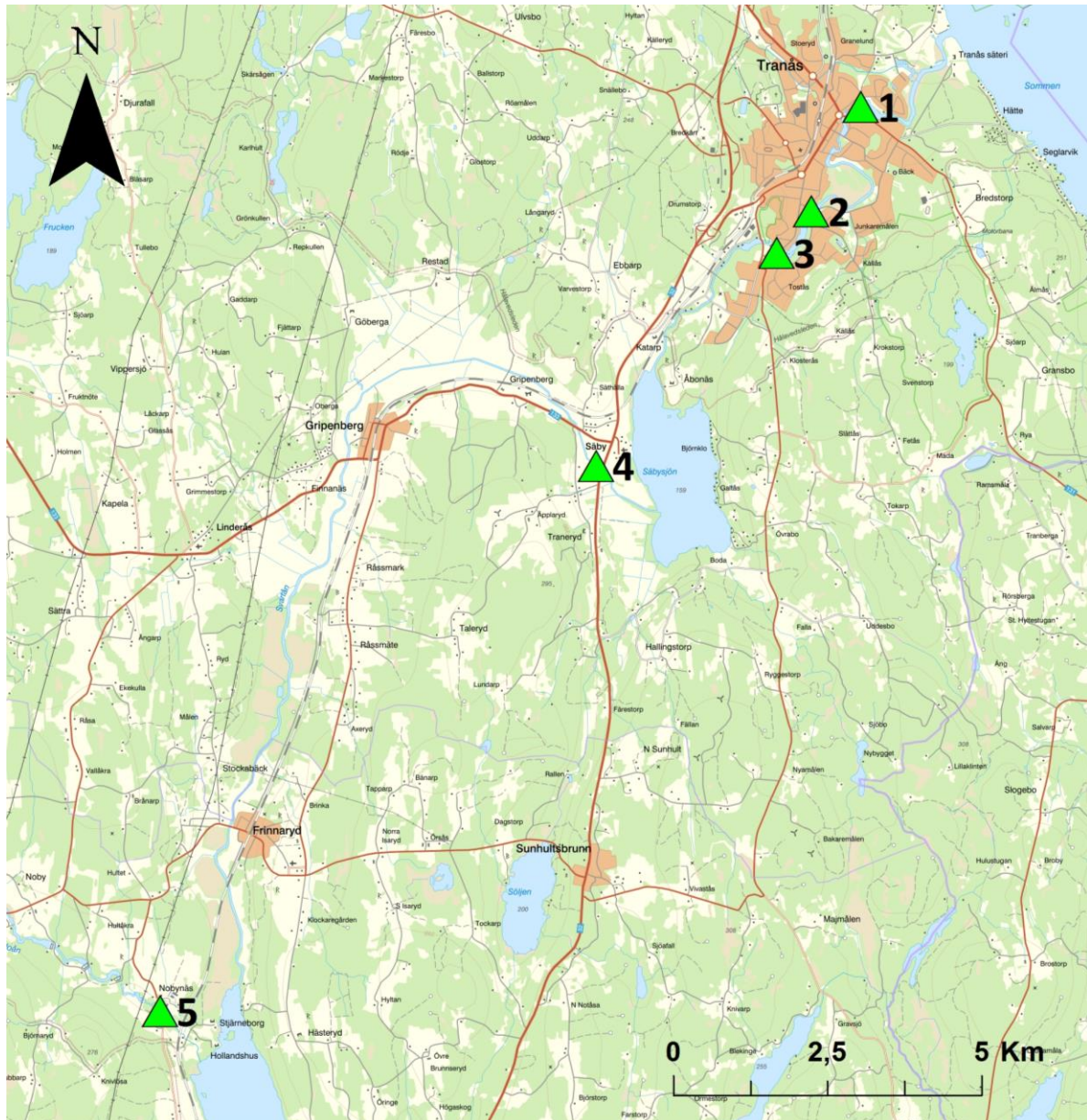


Figur 3. Denna modell av Sterivex-filtret används vid e-DNA provtagningen av fiskfaunan.

Tabell 1. Metadata från varje provlokal, och inkluderar vattendrag, koordinater (Sweref 99 TM), vattenmängd som filtrerats samt vattentemperatur.

Lokal	Vattendrag	N	E	Volym filter 1 (ml)	Volym filter 2 (ml)	Temperatur (c°)
1	Svartån	6433162	499065	440	420	19
2	Svartån	6431531	498423	420	440	20
3	Svartån	6430827	497857	450	400	21
4	Svartån	6427378	494937	600	600	20
5	Noån	6418555	487835	800	840	19,5

DNA har extraherats från vävnadsprover från tio fiskarter (*Clupea harengus* [Sill], *Glyptocephalus cynoglossus* [Rödtunga], *Scomber scombrus* [Makrill], *Thunnus alalunga* [Långfenad tonfisk], *Pleuronectes platessa* [Rödspätta], *Pollachius virens* [Gråsej], *Salmo salar* [Lax], *Gadus morhua* [Torsk], *Reinhardtius hippoglossoides* [Mindre hälleflundra], *Melanogrammus aeglefinus* [Kolja]). DNA från dessa vävnadsprover har användes som positiva kontroller. Analys av dessa prover användes i en spädningsserie för att uppskatta känsligheten för att detektera DNA från fisk i proverna. Materialet till DNA extraktionen kommer från två fiskbutiker på Tjörn.



Figur 4. Kartan visar en del av Svartåns sträckning utanför Tranås. Provpunkter besökta i den aktuella undersökningen indikeras med gröna trianglar och lokalnummer (tabell 1).

2.2 Laboratoriearbete

DNA extraktion och kvantitativ PCR detektion

DNA extraherades enligt protokoll från Qiagen (DNeasy PowerWater Sterivex Kit) för analys av akvatiskt eDNA. DNA från vävnadsproverna extraherades enligt protokoll från Qiagen (DNeasy Blood and Tissue kit).

Protokollet som användes för metabarcoding-analysen kallas MiFish (Miya mfl 2015). Denna baseras på primrar som är specifika för fisk och amplifierar en hypervariabel region av 12S rRNA-genen (163–185 bp lång) som är en del av mitokondrie-genomet (mtDNA). Regionen innehåller i de flesta fall tillräcklig information för att identifiera fiskar till artnivå.

Två replikat från varje DNA-prov användes för en första PCR med MiFish-primerparet. Efter att PCR-produkten från replikaten slagits samman (poolats) gjordes ytterligare en PCR för att märka proverna med unika streckkoder, för att möjliggöra identifiering av sekvenser från individuella prov, samt för att ligera adaptrar som krävs för Illumina-sekvensering. Efter rening och kvantifiering av PCR produkterna blandades de i ekvimolära mängder och sekvenserades sedan på en Illumina MiSeq maskin, i PE250 mode (dvs. 250 baser långa sekvensläsningar där varje DNA-fragment sekvenserades i båda riktningar).

I den bioinformatiska analysen av sekvensdata ingick:

1. Sekvensdata trimmades från primers med Cutadapt v1.18 (Martin 2011) och även sekvenser utan matchande primrar togs bort.
2. R-paketet dada2 v. [1.12](#) (Callahan et al., 2016) användes för att göra demultiplexering och att hitta sekvens-överlapp.
3. Felaktiga sekvenser avlägsnades med hjälp av funktionen 'removeBiomeraDenova' från dada2-paketet, vilket resulterade i den slutliga sekvens-tabellen;
4. Naive Bayesian Classifier användes för att klassificera proverna med hjälp av en manuell sammanställd databas av 12S sekvenser från olika fiskarter.
5. Potentiella "spill-over"-sekvenser från felaktigt demultiplexade sekvenser från den positiva kontrollen (se nedan) togs sedan bort genom att sätta ett tröskelvärde på 100 sekvenser för detektion av arterna i kontrollen.

För att uppskatta känsligheten i ovan beskrivna metod så testades protokollet genom analys av ett artificiellt "fisksamhälle", där DNA från referensmaterial blandats. DNA från detta kontrollprov spädades också i en fyrfaldig utspädningsserie (dvs. provet analyserades i 1x, 0.1x, 0.01 samt 0.001x koncentration). Utfallet av utvärderingsexperimenten visar att: 7 av de 10 fiskarterna i kontrollprovet kunde detekteras och att lägsta spädningen (10 pg DNA) inte gav något positivt resultat.

3. RESULTAT

3.1 Fiskfaunan i Svartån

Den fullständiga artlistan för de fem provlokaler finns i tabell 2. Totalt är 15 olika arter varav det fyra arter som återfanns i samtliga prover. Vart varje provlokal är lokaliserad finns i tabell 1 och figur 3.

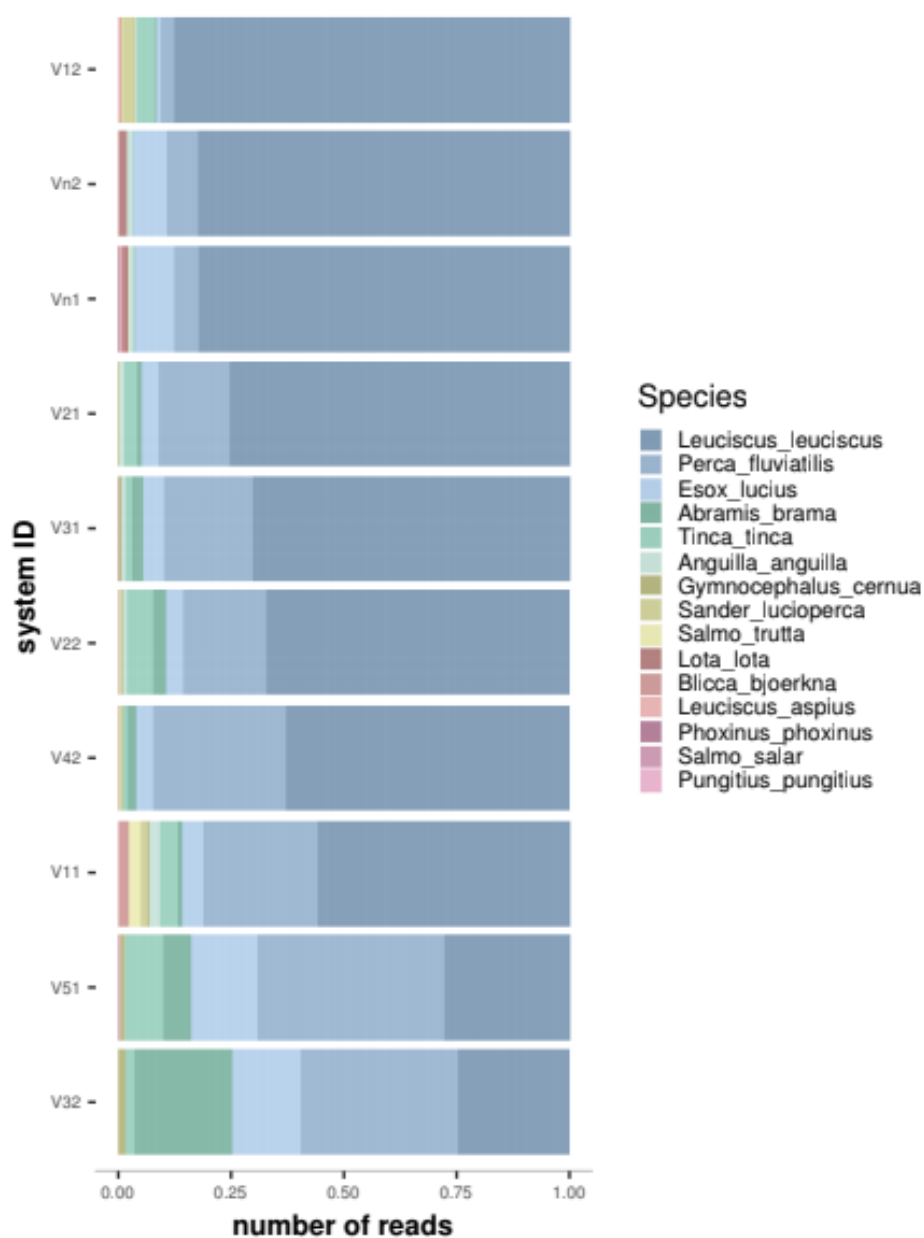
Tabell 2. Fiskfaunan för de olika provlokalerna,

Fiskarter	Lokal 1		Lokal 2		Lokal 3		Lokal 4		Lokal 5	
	Filter		Filter		Filter		Filter		Filter	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Brax (<i>Abramis brama</i>)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	
Europeisk ål (<i>Anguilla anguilla</i>)	✓	✓	✓	✓	✓		✓	✓	✓	✓
Björkna (<i>Blicca bjoerkna</i>)	✓	✓		✓						
Gädda (<i>Esox lucius</i>)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Gärs (<i>Gymnocephalus cernua</i>)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓		
Asp (<i>Leuciscus aspius</i>)	✓	✓							✓	✓
Stäm (<i>Leuciscus leuciscus</i>)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Lake (<i>Lota lota</i>)	✓				✓		✓	✓	✓	✓
Abborre (<i>Perca fluviatilis</i>)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Elritsa (<i>Phoxinus phoxinus</i>)				✓			✓	✓	✓	✓
Småspigg (<i>Pungitius pungitius</i>)							✓			
Öring (<i>Salmo trutta</i>)	✓	✓		✓			✓	✓	✓	
Gös (<i>Sander lucioperca</i>)	✓	✓								
Sarv (<i>Scardinius erythrophthalmus</i>)						✓				
Sutare (<i>Tinca tinca</i>)	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Figur 5 visar förhållandet mellan mängden DNA från de 15 detekterade fisk-arterna. Det går inte att säga hur stort ett bestånd är med hjälp av denna metod, men den ger en fingervisning om hur mycket DNA det förekommer från varje art i det provtagna vattnet. Mängden DNA kan bero på olika saker, till exempel så släpper olika arter olika mycket DNA och avståndet mellan fisk och platsen där provet tas kan även variera.

Tabell 3. Tabellen visar vilket filter-id som hör till vilken lokal samt prov-replikat

Fiskarter	Lokal 1		Lokal 2		Lokal 3		Lokal 4		Lokal 5	
	Filter		Filter		Filter		Filter		Filter	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Filtrer-id	V11	V12	V21	V22	V31	V32	V42	V51	Vn2	Vn1



Figur 5. Fördelningen av identifierade DNA fragment från de 15 detekterade fiskarterna. Y-axeln indikerar vilket filter resultatet kommer från (se även Tabell 3).

DNA från 15 olika fiskarter kunde identifieras från de fem provlokalerna. Vomma detekterades inte, dock kunde mer ovanliga fiskarter så som asp, björkna och gös detekteras. Brax, ål, gädda, stäm, abborre och sutare detekterades i alla prov. Genomgång av databasen visade att från mört (*Rutilus rutilus*) saknades den del av 12S rRNA gensekvensen som användes som markör i MiFish protokollet, vilket resulterat i att mört inte har kunnat detekteras i denna undersökning.

4. DISKUSSION

Syftet med undersökningen har varit att bestämma om arten vimma förekommer i Svartåns avrinningsområde uppströms om sjön Sommen. Vår undersökning visar dock inte på någon sådan förekomst i undersökningsområdet.

Totalt detekterades 15 olika arter, vilket visar på en stor mångfald i fiskpopulationen. Några mer ovanliga arter, så som asp, hittades på två provlokaler. Även ål och lake verkar vara väl spridda i systemet. Dessa undersökningar går att använda till att se hur fiskpopulationen påverkas av exempelvis vandringshinder och att se för vilka arter som fiskvägar fungerar effektivt. Eftersom undersökningen är mycket beroende av kvaliteten på tillgängliga databaser med referenssekvenser av hög kvalitet finns flera problem som måste adresseras i framtiden. Problemet med att detektera mört omnämns ovan är ett tydligt exempel på detta. Troligtvis är en del av sekvenserna som klassificerats som stäm i själva verket mört. Ofullständiga databaser gör att metoden såsom den används i denna studie kan ge en skev bild av den taxonomiska upplösning som faktisk uppnås eftersom avsaknaden av en viss referenssekvens gör att arter klassificeras som den närmast relaterade arten i databasen.

Potentiellt kan olika grad av sekvensvariation inom olika taxonomiska grupper också orsaka att vissa arter sammanblandas till följd av väldigt små artskillnader. Detta kan åtgärdas genom komplettering av existerande databaser samt att flera och längre markörsekvenser används. Ett ytterligare potentiellt problem i en studie som den här är spridning av fisk-DNA via andra djur (exempelvis fåglar) som rör sig mellan vattendragen och därigenom "kontaminerar" provpunkterna. Detta problem kan delvis lösas genom tätare provtagning.

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.

Miya mfl 2015: <https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rsos.150088>

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

Bild: [https://sv.wikipedia.org/wiki/Vimba_elongata#/media/Fil:FMIB_48088_Abramis_elongatus_\(Agassiz\).jpeg](https://sv.wikipedia.org/wiki/Vimba_elongata#/media/Fil:FMIB_48088_Abramis_elongatus_(Agassiz).jpeg)



Figur 6. Omlöpet vid Åsvallehult, en del av provlokal 2.

waterCIRCLE

EDNASOLUTIONS