

# eDNA-inventering

av fiskfaunan i tre vattendrag  
i Hallands län



EDNASOLUTIONS

**water**CIRCLE

*Dokumenttitel: eDNA-inventering av fiskfaunan i tre vattendrag i Hallands län.  
Version: 2*

*eDNA solutions AB*

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

*WaterCircle*

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

*Beställare: Länsstyrelsen i Halland*

*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: Provloken i Himleån*

*Rapportnummer: eDNA solutions Rapport 2019:01*

*Dokumentdatum: 2020-01-05*

## Innehåll

SAMMANFATTNING.....	4
1. INLEDNING.....	5
2. MATERIAL OCH METOD .....	6
2.1 Fältarbete.....	6
2.2 Laboratoriearbete .....	9
DNA extraktion och kvantitativ PCR detektion.....	9
3. RESULTAT .....	10
4. DISKUSSION.....	12
REFERENSER .....	13

## 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:e juli 2019 utförde eDNA solutions AB och WaterCircle, på uppdrag av Länsstyrelsen i Halland, en eDNA-inventering av fiskfauna i tre vattendrag.

Syftet med detta projekt har varit att undersöka förekomsten av havsnejonöga (*Petromyzon marinus*). Då det i nuläget inte finns en specifik metod för att detektera enbart havsnejonöga så har hela fiskfaunan undersökas. Totalt detekterades 13 fiskarter, till exempel lax, ål och flodnejonöga men inte havsnejonöga.



Figur 1. Havsnejonöga (*Petromyzon marinus*) Wikipedia



*Figur 2. Provloken i Himleån,*

## 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:e juli 2019 utförde eDNA solutions AB på uppdrag av Länsstyrelsen i Halland eDNA inventering av fiskfaunan i tre Halländska vattendrag. Sammantaget togs prov från tre olika vattendrag. De tre vattendragen var Tvååkers kanalen, Himleån och Löftaån (Figur 5). Provtagningen utfördes i samband med ett högtryck och en lufttemperatur på 22 grader.

## 2. MATERIAL OCH METOD

### 2.1 Fältarbete

Fältarbetet utfördes den 2:e juli 2019. Provtagningspunkter anges i figur 5 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 320 och 600 ml vatten filtrerades på detta vis genom varje filter (Tabell 1). Två filter-prov samlades in från varje lokal, vilket resulterade i totalt sex 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 (Sweref99 TM), vattenmängd som filtrerats samt vattentemperatur.

Lokal	Vattendrag	N	E	Volym filter 1 (ml)	Volym filter 2 (ml)	Temperatur (c°)
1	Löftaån	6357083	333116	320	280	18,4
2	Himleån	6336210	334791	320	280	17,2
3	Tvååkers kanalen	6323518	338212	600	600	18,2

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. Provloken i Tvååkers kanalen.



Figur 5. Kartan visar de tre vattendragen som provtagits i Hallands län. Provpunkter besökta i den aktuella undersökningen indikeras med gröna trianglar och lokalnummer, dessa finns mer beskrivna i 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 späddes också i en fyrfaldig utspädningsserie (dvs 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 de tre vattendragen

Den fullständiga artlistan för de tre provlokalerna finns i tabell 2. Totalt är 13 olika arter varav det sju arter som återfanns i samtliga prover. Vart varje provlokal är lokaliserad finns i tabell 1 och figur 5.

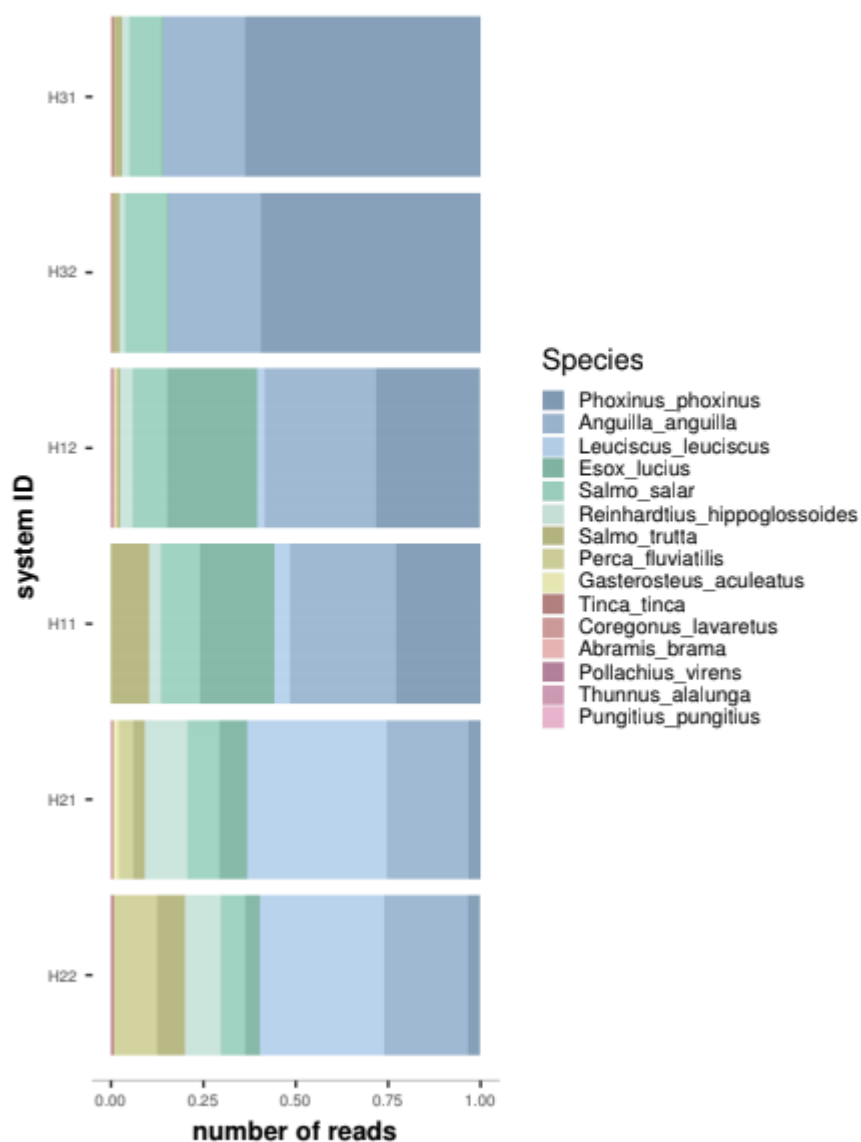
Tabell 2. Fiskfaunan för de olika provlokalerna.

Fiskarter	Löftaån		Himleån		Tvååkerskanalen	
	Filter 1	2	Filter 1	2	Filter 1	2
<b>Braxen</b> ( <i>Abramis brama</i> )					✓	✓
<b>Europeisk ål</b> ( <i>Anguilla anguilla</i> )	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<b>Sik</b> ( <i>Coregonus lavaretus</i> )		✓				
<b>Gädda</b> ( <i>Esox lucius</i> )	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<b>Storspigg</b> ( <i>Gasterosteus aculeatus</i> )		✓	✓			
<b>Flodnejonöga</b> ( <i>Lampetra fluviatilis</i> )	✓					
<b>Stäm</b> ( <i>Leuciscus leuciscus</i> )	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<b>Abborre</b> ( <i>Perca fluviatilis</i> )	✓		✓	✓	✓	✓
<b>Elritsa</b> ( <i>Phoxinus phoxinus</i> )	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<b>Småspigg</b> ( <i>Pungitius pungitius</i> )			✓			
<b>Lax</b> ( <i>Salmo salar</i> )	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<b>Öring</b> ( <i>Salmo trutta</i> )	✓	✓	✓	✓	✓	✓
<b>Sutare</b> ( <i>Tinca tinca</i> )	✓	✓	✓	✓	✓	✓

Figur 6 visar förhållandet mellan mängden DNA från de 13 detekterade fiskarterna. 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

	Löftaån		Himleån		Tvååkers kanalen	
	Filter		Filter		Filter	
	1	2	1	2	1	2
Filtrer-id	H11	H12	H21	H22	H31	H32



Figur 6. Fördelningen av identifierade DNA fragment från de detekterade fiskarterna. Y-axeln indikerar vilket filter resultatet kommer från (se även Tabell 3).

DNA från 13 olika fiskarter kunde identifieras från de tre provlokaler. Havsnejonöga detekterades inte, dock kunde mer ovanliga fiskarter så som ål och flodnejonöga detekteras. Ål, öring, lax, elritsa, stäm, gädda 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 havsnejonöga förekommer i de tre vattendragen. Vår undersökning visar dock inte på någon sådan förekomst i de undersökta vattendragen. Undersökning av vandrade fisk så som havsnejonöga krävs det att provtagningen sker vid rätt tidpunkt, detta kan vara en av orsak till att inte havsnejonöga detekterades i någon av de tre vattendragen.

Totalt detekterades 13 olika arter, vilket visar på en relativ mångfald i fiskpopulationen. Några mer ovanliga arter, så som flodnejonöga, hittades på en provlokal. Även ål och lax verkar vara väl spridda i dessa vattendrag. 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://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/28/Petromyzon\\_marinus.jpg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/28/Petromyzon_marinus.jpg)

**water**CIRCLE

**EDNA**SOLUTIONS