



Naturhistoriska  
riksmuseet

# eDNA detektion av fisk från vattenprover

Diarienummer NRM 4.1-688-2019

20200325



Centrum för genetisk identifiering

Centrum för genetisk identifiering (CGI) vid Naturhistoriska riksmuseet är en uppdragsfinansierad verksamhet som erbjuder myndigheter och organisationer hjälp med genetiska analyser av biologiskt material.

## Uppdrag

CGI har 2019 fått i uppdrag av Västmanlands länsstyrelse att undersöka fiskförekomst på 2 olika lokaler med hjälp av eDNA analys av vattenprover.

## Material och metoder

Vattenprover togs 18 April 2019 innan aspleken kommit igång i vattendraget. Vattenprover förvarades kallt fram till filtrering genom 0.45 µm Sterivex filter. DNA extraktion gjordes med en extraktionsrobot och “Kingfisher Cell and Tissue” DNA extraktionskit enligt beskrivning från tillverkaren. En kort bit av mitokondrien amplifierades med primer MiFish U-F (GTCCGGTAAACTCGTGCCAGC) och MiFish U-R (CATAGTGGGGTATCTAATCCAGTTTG) med en touch-down PCR från 62°C till 57°C. Totalt gjordes tre oberoende PCR replikat med “Illustra™ PureTaq Ready-To-Go™ PCR Beads” från GE healthcare. PCR reaktioner visualiserades efter amplifiering på agarosgel och kvantifierades med en Qubit 3.0 flourometer enligt beskrivning från tillverkaren. Sekvensbiblioteken gjordes med “QIaseq 1-Step Amplicon Library Kit” från material från alla tre amplifieringar och sekvensering från bägge riktningarna gjordes av NGI (National Genomics Infrastructure) Stockholm på ett Illumina MiSeq instrument med version 3 kemikalier med en sekvenslängd på 301bp.

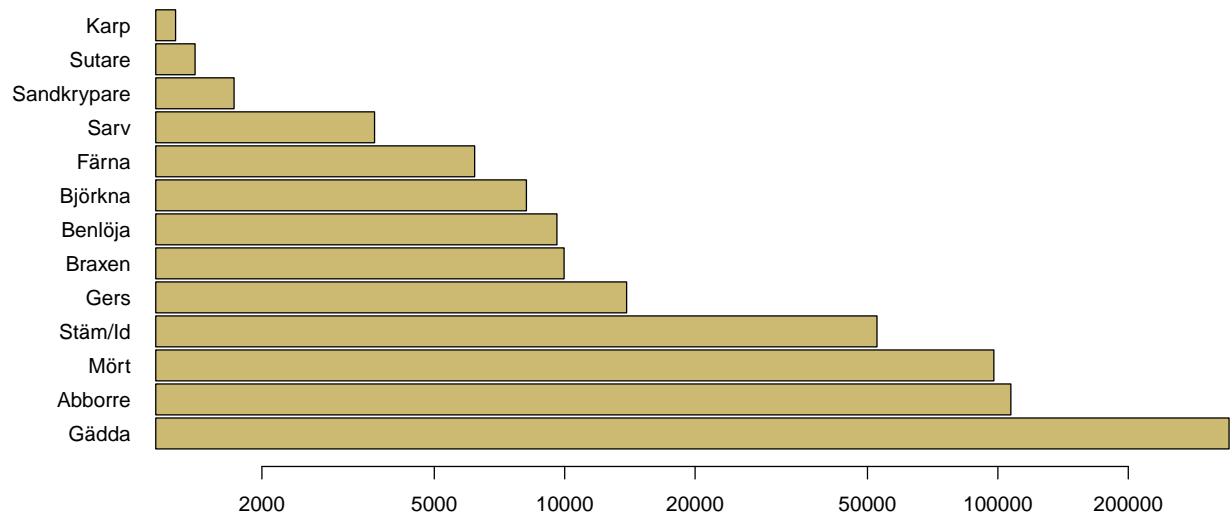
## Analysmetoder

Från rådata filtrerades primersekvenser bort med hjälp av cutadapt (Martin 2011) och kvarvarande data analyserades med R-paketet dada2 (Callahan et al. 2016). Dada2 använder sekvensdata från prover för identifiera unika sekvenser av biologiskt ursprung och hur många gånger dessa hittas i vardera prov. För att minimera problem med sekvenseringsfel filterades samtliga sekvenser vars frekvens var lägre 0.5% av totala antalet läsningar. Kvarvarande sekvensvarianter spårades till art genom att jämföra sekvenserna mot NCBI:s öppna nukleotiddatabas (Nucleotide collection) med verktyget blast (Altschul et al. 1990).

## Resultat

PCR reaktioner genererade rena amplifieringar av förväntad storlek för alla tre replikat och var därmed lämpliga för att skapa sekvenseringsbibliotek. Totalt erhöles kring en halv miljon sekvenser från vardera prov och cirka 80% av dessa innehöll amplifieringsprimer och var av tillräckligt god kvalite för att inkluderas i analysen. Bland dessa fanns det DNA spår från fåglar, däggdjur, bakterier och fiskar, men som väntat med en metod optimerad för fisk var den absolut största andelen sekvenser från olika fiskarter. Från Herrkvarnprovet var det 342 571 sekvenser som kunde spåras till fisk och motsvarande siffra för Nykvarn var 311 166.

Totalt detekterade spår av 13 olika arter och samtliga arter hittades från bägge lokalerna (Figur 1 och 2). Det vanligaste arten på bägge platserna var gädda (*Esox lucius*) som utgjorde 65% av sekvenserna i Herrkvarn, och 38% i Nykvarnprovet (Figur 1). Det finns en viss korrelation mellan biomassa och antal sekvenser från en art, men det är många faktorer som kan påverka hur pass väl eDNA sekvensering återspeglar fisksamhället i vattnet. Inom prover kan man nog säga att fördelningen av sekvenser relativt väl visar sammansättningen av arter, men mellan prover är det svårare att göra jämförelser då metoden inte mäter absoluta mängder DNA utan enbart representerar relativa frekvenser. Detta gör att man bör fokusera på de arter som detekteras och lägga mindre vikt vid hur många gånger de har sekvenserats i projektet. I dessa prover har vi spår från många vanliga sötvattensarter, men vi har också ett par arter som är mer oväntade. Spår av karp (*Cyprinus carpio*) och sandkrypare (*Gobio gobio*) är ett par arter som inte hittas i så många svenska vatten. Famför allt den sistnämnda hittas framför allt i södra delen av Sverige och detta skulle vare den mest nordliga



Figur 1: Detekterade sötvattenarter av fisk från Herrkvarn och Nykvarn. Staplarnas längd motsvarar det sammanlagda antalet sekvenser från respektive art

observationen hittills (Artportalen 2020-03-24). Detta fynd bör valideras med ytterligare provtagning eller med annan metod. Karp finns däremot utplanerat på många lokaler och det sker än idag flytt av karp till nya vatten.

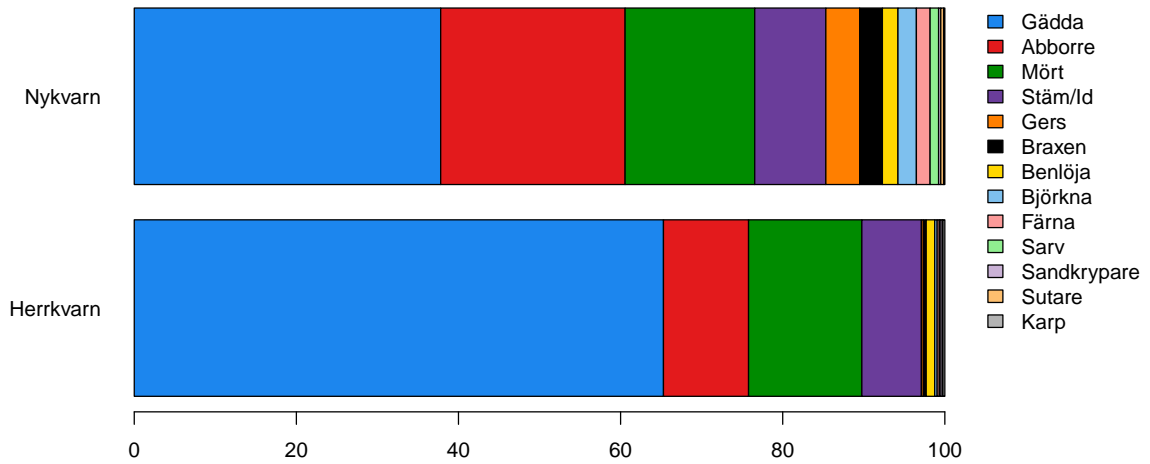
Även sett till andelen sekvenser av vardera art i de två proverna är likheterna mellan proverna mycket stor (Figur 3 och 4) även om gers och björkna verkar vara vanligare i Nykvarn, medan eDNA från gädda helt dominerar i provet från Herrkvarn.

## Projektinformation

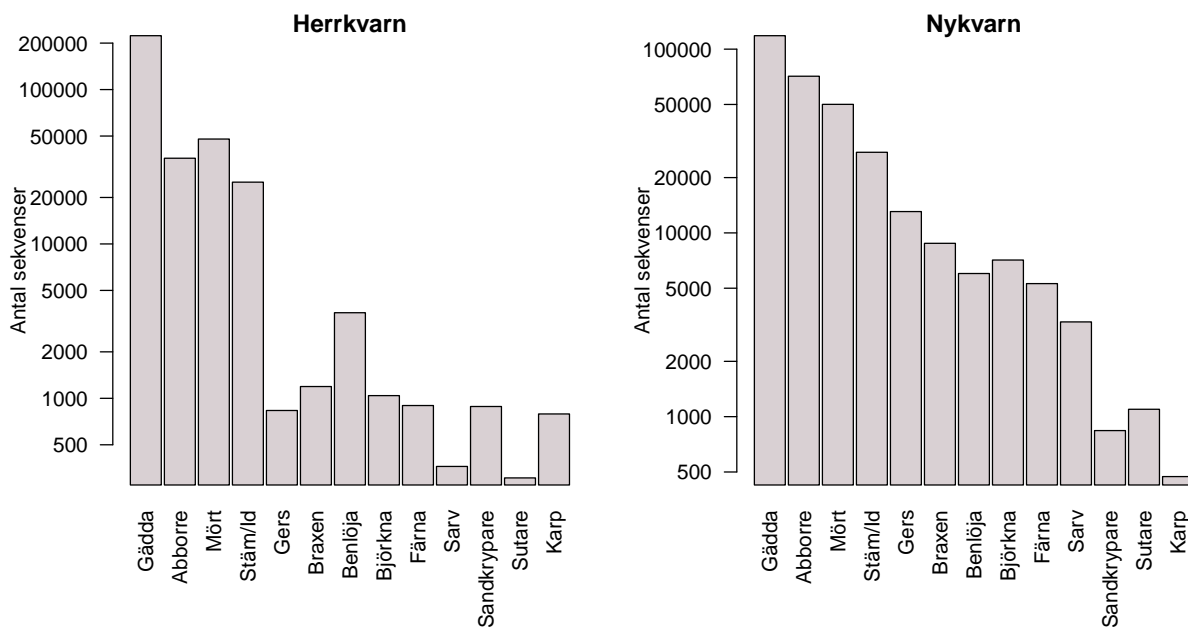
Analysdata och resultat lagras tills vidare hos NRM. Vid eventuella framtida frågor i detta ärende kontakta NRM på antingen [cgi@nrm.se](mailto:cgi@nrm.se) eller [registrator@nrm.se](mailto:registrator@nrm.se) och ange diarienummer i maillets ämnesrad.

Thomas Källman Analytiker

Niclas Gyllenstrand Intendent



Figur 2: Fördelning av sekvenser från olika fiskarter från de analyserade lokalerna. Mer detaljerad information med arter per lokal finns i figur 3



Figur 3: Antal sekvenser från olika fiskarter från de två lokalerna. Notera att y-skalan är logaritmisk.

## Referenser

Altschul, Stephen F, Warren Gish, Webb Miller, Eugene W Myers, and David J Lipman. 1990. "Basic Local Alignment Search Tool." *Journal of Molecular Biology* 215 (3): 403–10.

Callahan, Benjamin J, Paul J McMurdie, Michael J Rosen, Andrew W Han, Amy Jo A Johnson, and Susan P Holmes. 2016. "DADA2: High-Resolution Sample Inference from Illumina Amplicon Data." *Nature Methods* 13 (7): 581.

Martin, Marcel. 2011. "Cutadapt Removes Adapter Sequences from High-Throughput Sequencing Reads." *EMBnet. Journal* 17 (1): 10–12.