



Naturhistoriska
riksmuseet

eDNA detektion av fisk från Värmland

Diarienummer NRM 4.1-596-2022
20230125



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 under sommaren fått i uppdrag av att inventera fiskfaunan från 7 olika vattendrag i Värmland från Klarälvens vattenråd. I två av sjöarna har förutom vattenprover även nät från nattsländor samlats in för att undersöka huruvida dessa kan fungera som bra substrat för att med DNA inventera fiskfauna.

Tabell 1: Information rörande de prover som analyserats för fiskfauna med eDNA analyser. Havsjötjärnen är för litet för att klassas som vattenförekomst och har därför inget värde där.

Vattendrag	Vattenförekomst	Datum	Latitude	Longitude
Kvarnsjön	WA75708706	20220729	6753170	375473
S Havsjön	WA62897036	20220729	6756049	375161
N Havsjön	WA90549297	20220729	6757231	374825
Havsjötjärnen		20220729	6757929	375545
Acksjön	WA42333523	20220809	6596357	410314
N Hyn	WA57420549	20220809	6598345	409515
S Hyn	WA21336127	20220809	6596181	408862
Kvarnsjön utlopp nät	WA75708706	20220729	6753170	375473
N Havsjön utlopp nät	WA90549297	20220729	6757231	374825

Material och metoder

Vattenprovet filtrerades genom 0.8 μm Sylphium filter. DNA extraktion gjordes med en extraktionsrobot och “Omega Mag-Bind Blood & Tissue” DNA extraktionskit enligt beskrivning från tillverkaren. För fiskanalysen amplifierades en kort bit av mitokondrien med primer MiFish U-F (GTCGGTAAACTCGTGCCAGC) och MiFish U-R (CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG) med en touch-down PCR från 62°C till 57°C (Miya et al. 2015).

Totalt gjordes tre oberoende PCR replikat för fiskfauna för provet 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 fluorometer 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 och eventuell kontaminering filtrerades samtliga sekvenser vars frekvens var lägre 0.5% av totala antalet sekvenser i prover eller motsvarande inom ett prov. Kvarvarande sekvensvarianter spårades till art genom att jämföra sekvenserna mot NCBI:s öppna nukleotiddatabas (Nucleotide collection) med verktyget blast den 20 januari 2023 (Altschul et al. 1990). Endast likhet som överstigit 98.5% identitet betraktas som säkra artbestämningar. Vetenskapliga och svenska namn för de fiskarter som vi omnämner i rapporten finns listade i tabell 1.

Tabell 2: Svenska och vetenskapliga namn för de fiskarter som omnämns i rapporten.

Arter	Vetenskapligt namn
abborre	<i>Perca fluviatilis</i>
elritsa	<i>Phoxinus phoxinus</i>
braxen	<i>Abramis brama</i>
röding	<i>Salvelinus alpinus</i>
mört	<i>Rutilus rutilus</i>
gärs	<i>Gymnocephalus cernuus</i>
öring	<i>Salmo trutta</i>
gädda	<i>Esox lucius</i>
sutare	<i>Tinca tinca</i>
björkna	<i>Blicca bjoerkna</i>
sarv	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>

Resultat

PCR reaktioner genererade rena ampliferingar av förväntad storlek för alla tre replikat i provet och var därmed lämpligt för att skapa sekvenseringsbibliotek.

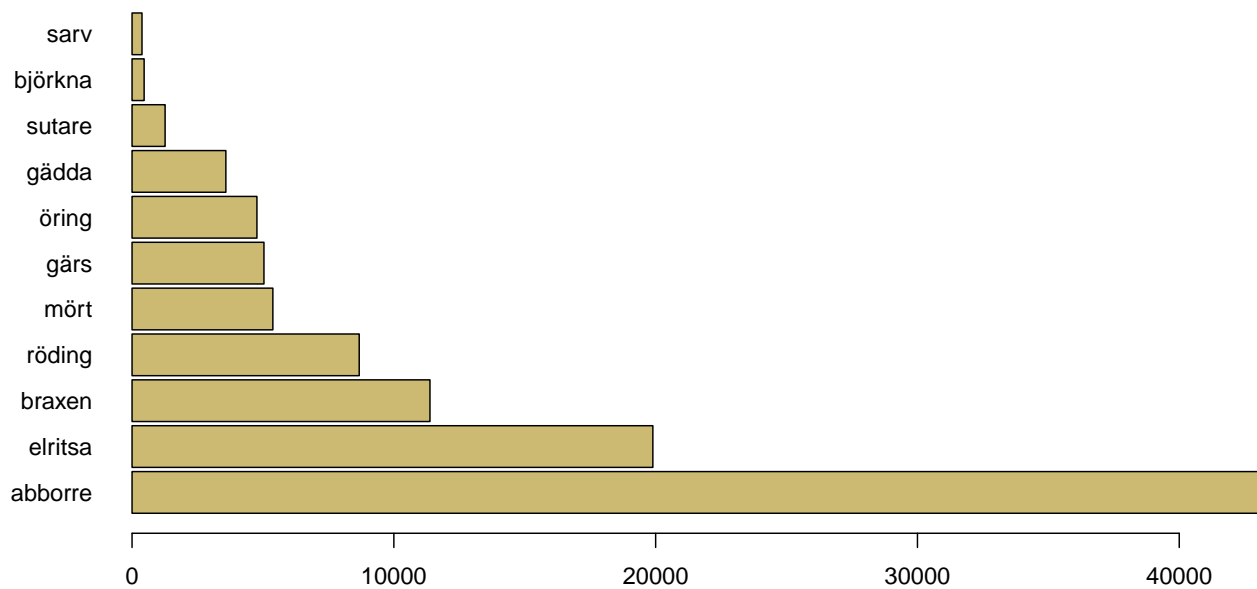
Medelantalet sekvenser per prov som hade förväntade primers och av tillräckligt god kvalitet för att bibehållas för vidare analys per prov var 34567.

Trots att primers optimerade för fisk användes hittades relativt mycket data från fågel, bakterier och däggdjur bland sekvenserna vilket med undantag av ett prov (N Havsjön utlopp (nät)) var det mellan 13 och 74% av sekvenserna som var från fisk. Utöver detta har vi också filterart bort spår svaga spår av sill och strömming som inte kan förväntas finnas i dessa vatten.

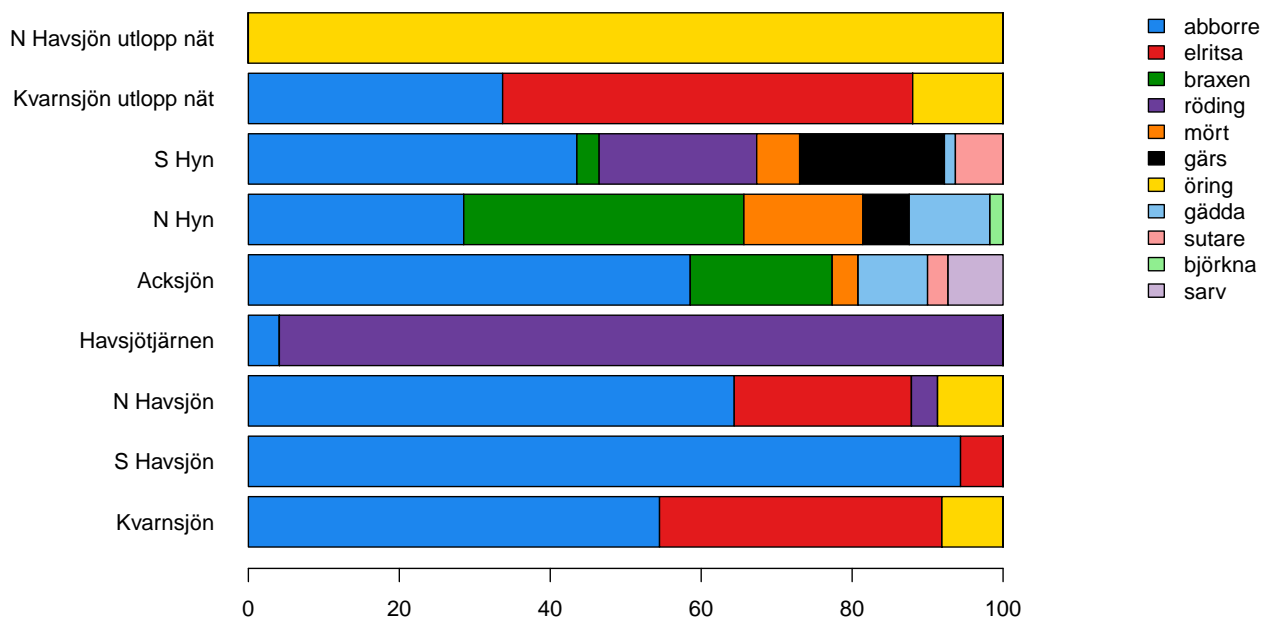
Fiskfauna

Sett över alla prover hittades det spår från 11 olika fiskarter och de tre vanligaste sett över alla prover var abborre, elritsa och braxen. Dessa tre utgjorde 71.5% av all erhållen sekvensdata från fisk (Figur 1 och 2). Abborre var den enda arten som hittades i alla vatten (även om nätprovet från N Havsjön inte innehöll spår av arten).

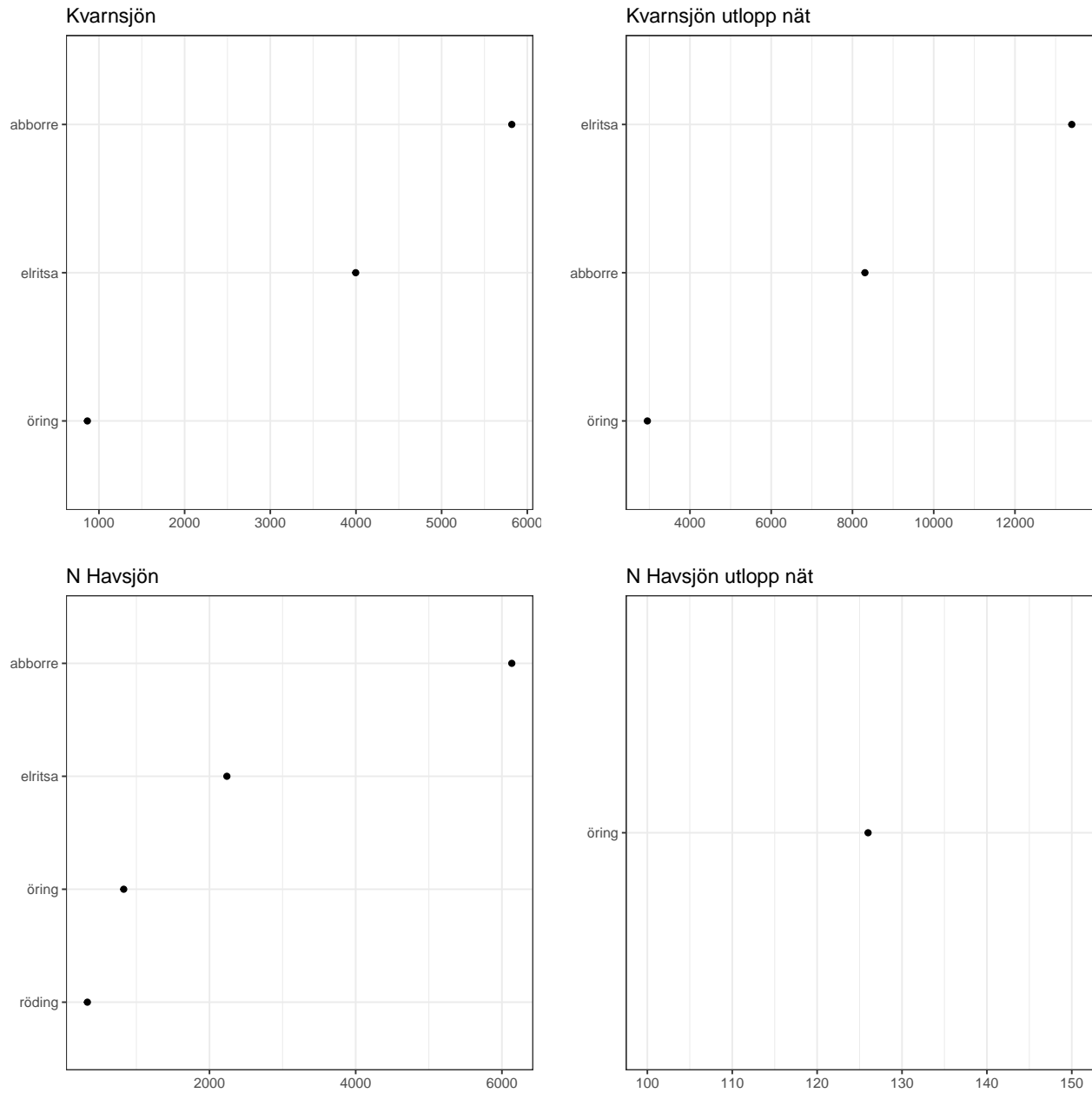
Från Kvarnsjön och Norra Havsjön har både vattenprover och nattsländnätprover analyserats. I Kvarnsjön hittades samma tre arter i både vatten och nät, men hur stor andel av sekvenserna som respektive art som hittades i proverna var olika (Figur 2 och 3). I vattenprovet var abborre vanligast följt av elritsa och öring, medan elritsa var vanligast i nätprovet. I Norra Havsjön hittades abborre, elritsa, öring och röding i vattenprovet, medan nätprovet endast hade spår från öring. Det sistnämnda provet innehöll en mycket stor andel av sekvenser från andra artgrupper och med färre än 1000 sekvenser från fisk gör att det inte är optimalt för att karaktärisera fiskfaunan i vattnet. Sammantaget visar dock dessa första försök att använda nattsländelarvernas nät för eDNA analys avseende fiskfauna lovande resultat. När man provtar från bottenstrat kan det krävas lite modifieringar i DNA-extraktionen då sediment ofta innehåller mer inhibitorer för DNA analys jämfört med vattenprover. Med ytterligare optimeringar av metoden kan detta vara ett effektivt sätt att minska behovet av att göra flera provtagningar i ett vattendrag.



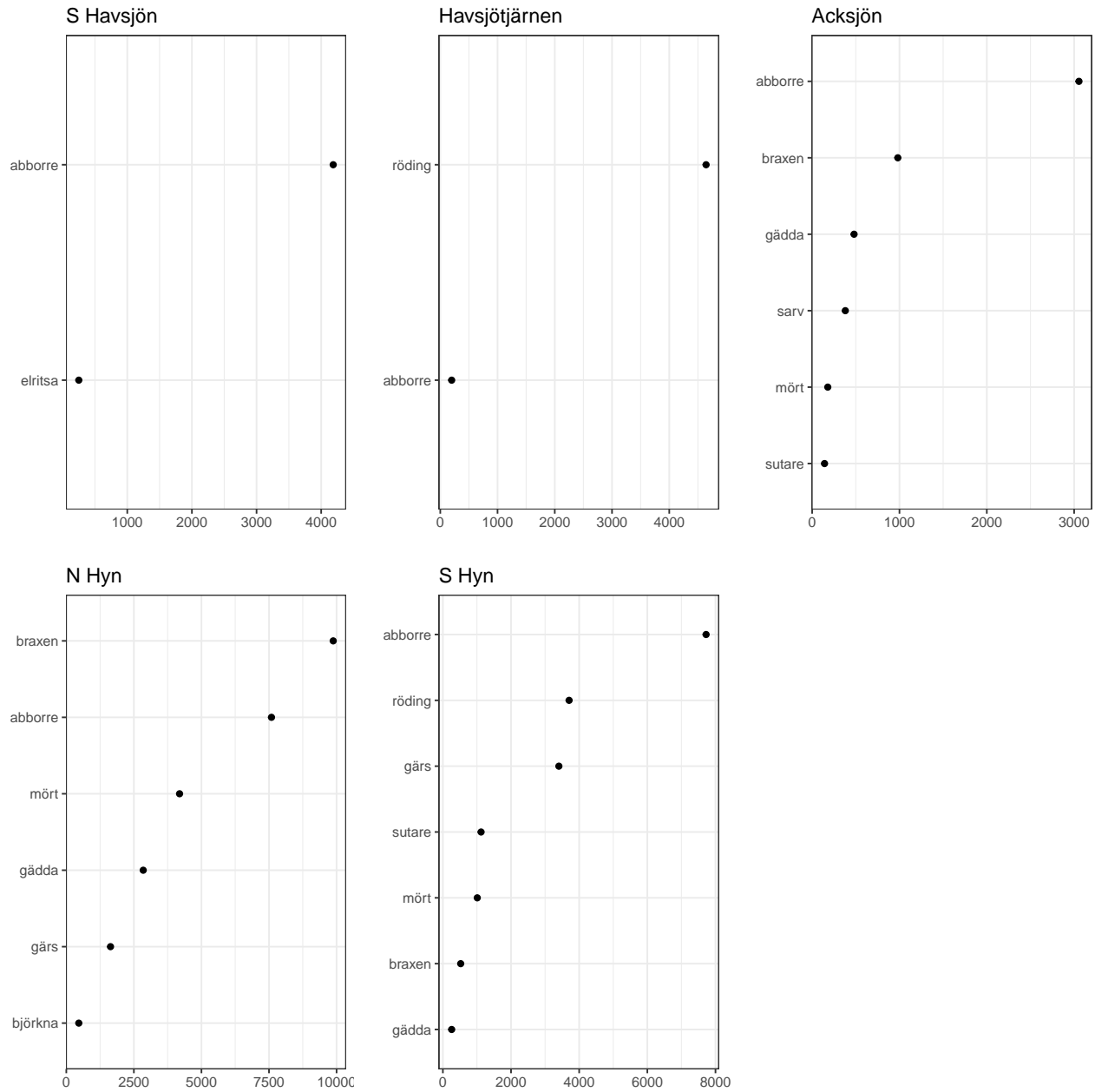
Figur 1: Fiskarter som detekterats i projektet. Staplarnas längd motsvarar det sammanlagda antalet sekvenser från respektive art



Figur 2: Fördelning i procent av sekvenser från olika fiskarter i projektet.



Figur 3: Detekterade arter av fisk från Kvarnsjön och Norra Havsjön. Notera att både antal arter och längden på x-axeln är olika mellan delfigurer.



Figur 4: Detekterade arter av fisk från Södra Havsjön, Havsjötjärnen, Acksjön, Norra och Södra Hyn. Notera att både antal arter och längden på x-axeln är olika mellan delfigurer.

Projektinformation

Analysdata och resultat lagras tills vidare hos NRM. Vid eventuella framtida frågor i detta ärende kontakta NRM på antingen cgi@nrm.se eller registrator@nrm.se och ange diarienummer i maillets ämnesrad. Artbestämning av DNA-sekvenser sker genom jämförelse med databaser. Vi använder den internationellt största och mest kompletta databasen i våra försök att spåra ursprung till de sekvenser vi rapporterar, men det finns både luckor och felaktigheter i databasen. Arterna i denna rapport är den bästa informationen som finns att tillgå vid söktillfället, men om databasen uppdateras kan kopplingen mellan sekvens och art komma att ändras.

Thomas Källman Analytiker

Niclas Gyllenstrand Intendent

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.
- Miya, M, Y Sato, T Fukunaga, T Sado, JY Poulsen, K Sato, Toshifumi Minamoto, et al. 2015. "MiFish, a Set of Universal Pcr Primers for Metabarcoding Environmental Dna from Fishes: Detection of More Than 230 Subtropical Marine Species." *Royal Society Open Science* 2 (7): 150088.