



Naturhistoriska  
riksmuseet

**eDNA detektion av fisk från Karsjön**  
Diarienummer NRM 4.1-294-2019  
20190904



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 kontaktades av Kräftmannen AB för att analysera eventuella spår av fisk i vattenprov från Karsjön i Värmland (6609092, 420746 SWEREF99).

## Material och metoder

Vattenprover togs av Kräftmannen AB den 4 April 2019 då det fortfarande var is på sjön. Vattenprover filtrerades genom ett Sterivex filterades den 15 April varefter filter förvarades kallt fram till DNA extraktion. DNA extraktion gjordes på en extraktionsrobot med "Kingfisher Cell and Tissue" DNA extraktionskit enligt beskrivning från tillverkaren. En kort bit av mitokondrien amplifierades med primer Fisk2\_FWD (AAACTCGTGCCAGCCACC) och Fisk2\_REV (GGGTATCTAATCCCAGTTTG) 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 på en Qubit 3.0 fluorometer enligt beskrivning från tillverkaren. Sekvensbiblioteken gjordes med "QIAseq 1-Step Amplicon Library Kit" och sekvensering från bägge riktningarna gjordes av NGI (National Genomics Infrastructure) Stockholm på en Illumina MiSeq maskin 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 programmet blast (Altschul et al. 1990).

## Resultat

PCR reaktioner genererade tydliga och rena amplifieringar för alla tre replikat och var därmed lämpliga för att skapa sekvensbibliotek. Total erhöles cirka 650 000 sekvenser varav strax över 85% 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 en specifik artgrupp utgör sekvenser från fisk den största delen av alla sekvenser (66%).

Sekvenserna kunde spåras till 5 olika fiskarter, men om man tittar man hur många sekvenser som dessa fem arter representeras av visar det sig att mer än 97% kommer från mört och ruda (Tabell 1). Under antagandet att antal sekvenser från ett prov reflekterar biomassan av den arten i vattnet skulle dessa två arter således vara helt dominerande. Spåren från öring och regnbåge är lite oväntat givet att dessa arter har andra krav på vattenkvalitet. Det kan dock fortfarande vara så att det finns små bestånd av dessa arter i sjön eller så kan dessa spår komma från tillrinnande vatten. Vi vet till exempel från tidigare studier att utsättning av regnbåge (eller odlingar med regnbåge) kan generera en väldigt kraftig eDNA-signal från den arten. Så även odlingar på relativt stora avstånd, men i samma vattensystem, kan leda till att spår av arten finns i vattnet.

Tabell 1: Fiskarter vars DNA hittas i vattenprovet. Andel är hur stor del av alla sekvenser från fisk som arten utgör.

Art	Svenskt namn	Sekvenser	Fraktion
Rutilus rutilus	Mört	327301	0.897
Carassius carassius	Ruda	26543	0.075
Esox lucius	Gädda	5030	0.014
Salmo trutta	Öring	4095	0.012
Oncorhynchus mykiss	Regnbåge	1980	0.006

## 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.

Tabell 2 visar de kostnader som associerats med projektet.

Tabell 2: Ekonomisk redovisning

Post	SEK (exklusive moms)
Material	2695
Arbete	2700
Totalkostnad	5395

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). Elsevier: 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). Nature Publishing Group: 581.

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