

eDNA detektion av fisk och musslor från Åtvidaberg

Diarienummer: 4.1-488-2022



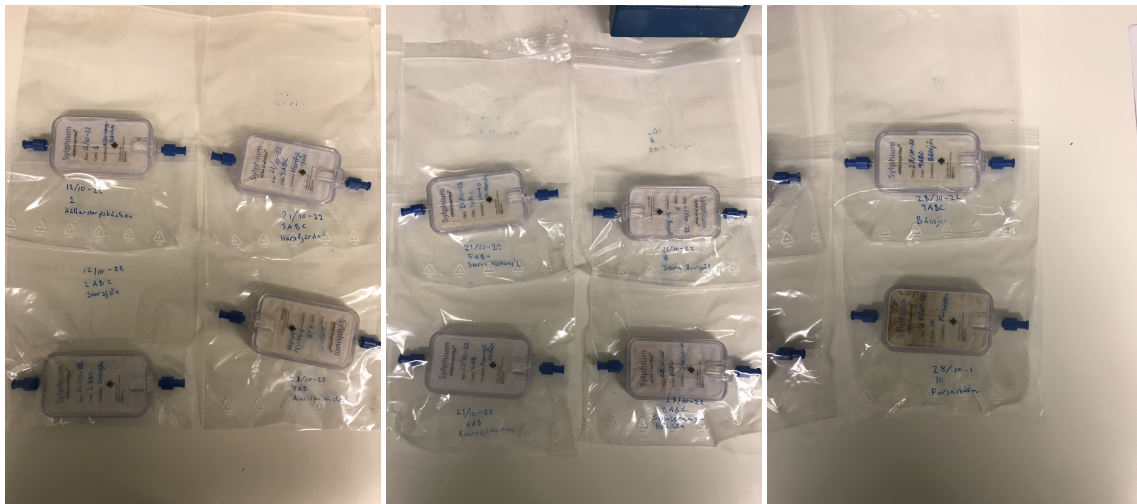
Centrum för genetisk identifiering (CGI) vid Naturhistoriska riksmuseet är en uppdragsfinansierad verksamhet som erbjuder myndigheter och organisationer hjälp med genetiska analyser av biologiskt material.

Uppdrag

CGI har fått i uppdrag av Åtvidaberg kommun att inventera fisk- och musselfauna från vattenprover insamlade under hösten 2022.

Material och metoder

Vattenprover samlades in av uppdragsgivaren. Tio olika vatten provtogs med mellan ett och tre delprov per vatten under hösten 2022 (Tabell 1). Vattnet filtrerades sedan genom ett 0.8 μ m Sylphium filter som skickades till CGI för eDNA analys (Figur 1).



Figur 1: Sylphium filter med eDNA som skickades till CGI för analys

Tabell 1: Provtagningsdatum och andra data för proverna som samlades in kring Åtvidaberg hösten 2022. Kolumnen delprov anger hur många olika delprov som tagits för det analyserade provet. Volym anger total volym vatten som filtrerats genom filtret för analys. Temperatur är vattentemperatur vid provtagningsstillfället. Ett kryss i kolumnen Fisk och Musslor betyder att provet analyseras för den artgruppen.

Vattenförekomst	Datum	Delprov	Volym	Temperatur	Fisk	Musslor
Hållerstorpsbäcken	2022-10-12	1	486 ml	10°C	X	X
Storsjön	2022-10-12	3	452 ml	14°C	X	
Horsfjärden	2022-10-21	3	454 ml	12°C	X	
Amerikabäcken	2022-10-21	2	402 ml	8°C	X	X
Storån Åkervristen/Storsjö	2022-10-21	3	453 ml	10,3°C	X	X
Kvarnsjöbäcken	2022-10-21	2	403 ml	9,5°C	X	X
Stora Burgöl	2022-10-21	1	402 ml	10°C	X	
Svenserumsbäcken	2022-10-28	3	451 ml	13°C	X	
Båtsjön	2022-10-28	3	453 ml	14°C	X	
Storån Forsaström	2022-10-28	1	422 ml	14°C	X	X

Molekylära metoder

DNA extraktion gjordes på en extraktionsrobot med "Omega Mag-Bind HDQ blood DNA kit" extraktionskit enligt beskrivning från tillverkaren. För flerartsanalys avseende fisk och musslor amplifierades korta bitar av mitokondrien. För fisk användes den så kallade MiFish markören som amplifierar omkring 200 baspar från genen 12S (Miya et al. 2015). För musslor användes två olika markörer, då tidigare studier indikerat att dessa kan ge delvis generera komplementära resultat. Ett av primerparen amplifierar en bit på strax över 400 baspar från ITS (Internal Transcribed Spacer) regionen (Zieritz et al. 2012) medan det andra amplifierar cirka 130 baspar från genen 16S (Prié et al. 2021) (Tabell 2).

Totalt gjordes för vardera prov och markör 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 fluorometer enligt beskrivning från tillverkaren. Sekvensbiblioteken gjordes med "QIAseq 1-Step Amplicon Library Kit" med material från alla tre amplifieringar och sekvensering från bägge riktningarna gjordes på ett Illumina instrument hos Novogene med 150 baspars läslängd.

För enartsanalysen med avseende öring amplifierades en kort bit av genen cytb med primer följande primer StCytbF: CGCCCGAGGACTCTACTATGGT och primer StCytbR GGAAGAACGTAGCCACGAA som tillsammans en probsekvens CGGAGTCGACTGCTAC användes för att med kvantitativ PCR detektera spår av öring i proven (Carim et al. 2016). För denna analys gjordes tre tekniska replikat och samtidigt kördes positiva och negativa kontroller.

Tabell 2: Sekvenser för de primers som använts för flerartsanalyserna. Temperatur är annealingtemperatur i grader celsius i PCR-reaktionerna.

Typ av analys	Primer F	Primer R	Temperatur
Fisk (12S)*	AAACTCGTGCCAGCCACC	GGGTATCTAATCCCAGTTTG	62 – 57
Musslor (ITS)†	AGACTGGGTTGCGGAGGT	CGAGTGATCCACCGCTTAGA	60 – 55
Musslor (16S)‡	GCTGTTATCCCCGGGGTAR	AAGACGAAAAGACCCCGC	60 – 55

* Miya et al. 2015

† Zieritz et al. 2012

‡ Prié et al. 2021

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 0.1% av totala antalet sekvenser i prover. Kvarvarande sekvensvarianter spårades till art genom att jämföra sekvenserna mot NCBI's öppna nukleotiddatabas (Nucleotide collection) med verktyget blast den 20 mars 2023 (Altschul et al. 1990). Endast likhet som överstiger 98.5% identitet betraktas som säkra artbestämningar.

För qPCR identifierades positiva prover där exponentiell amplifiering av fragmentet observerades under de 50 cykler av amplifiering som genomfördes.

Resultat

PCR reaktioner genererade tydliga amplifieringar av förväntad storlek för alla tre replikat för både flerartsanalysen avseende fisk och bägge metoder för musslor som kördes. Enartsanalys avseende närvaro av öring visade förväntade resultat för positiv kontroll och ingen av analyserna indikerade amplifiering i negativa kontroller.

Tabell 3: Svenska och vetenskapliga namn för de arter som omnämns i rapporten.

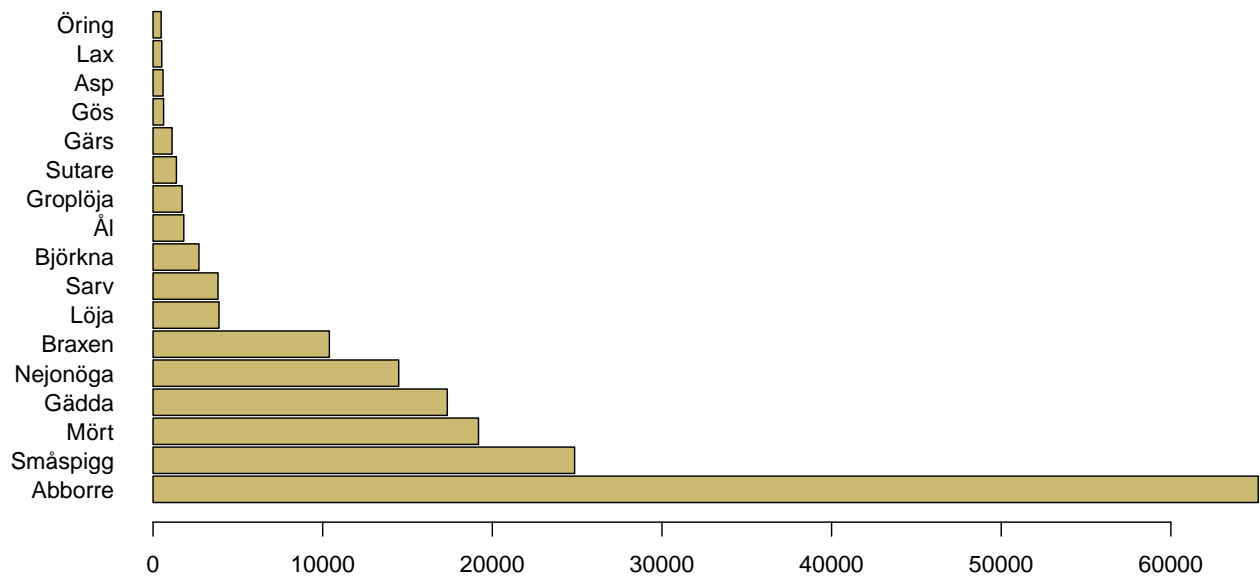
Arter	Vetenskapligt namn
Fisk	
Abborre	<i>Perca fluviatilis</i>
Asp	<i>Leuciscus aspius</i>
Björkna	<i>Blicca bjoerkna</i>
Braxen	<i>Abramis brama</i>
Groplöja	<i>Leucaspis delineatus</i>
Gädda	<i>Esox lucius</i>
Gärs	<i>Gymnocephalus cernuus</i>
Gös	<i>Sander lucioperca</i>
Lax	<i>Salmo salar</i>
Löja	<i>Alburnus alburnus</i>
Mört	<i>Rutilus rutilus</i>
Nejonöga	<i>Lampetra fluviatilis/planerii</i>
Sarv	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>
Småspigg	<i>Pungitius pungitius</i>
Sutare	<i>Tinca tinca</i>
Ål	<i>Anguilla anguilla</i>
Öring	<i>Salmo trutta</i>
Musslor	
Flat dammussla	<i>Pseudanodonta complanata</i>
Spetsig målarmussla	<i>Unio tumidus</i>
Större dammussla	<i>Anodonta cygnea</i>
Tjockskalig målarmussla	<i>Unio crassus</i>
Vanlig dammussla	<i>Anodonta anatina</i>
Äkta målarmussla	<i>Unio pictorum</i>

Vetenskapliga och svenska namn för samtliga arter som nämns i rapporten hittas i tabell 3. I löpande text och resterande figurer används endast de svenska namnen på arter.

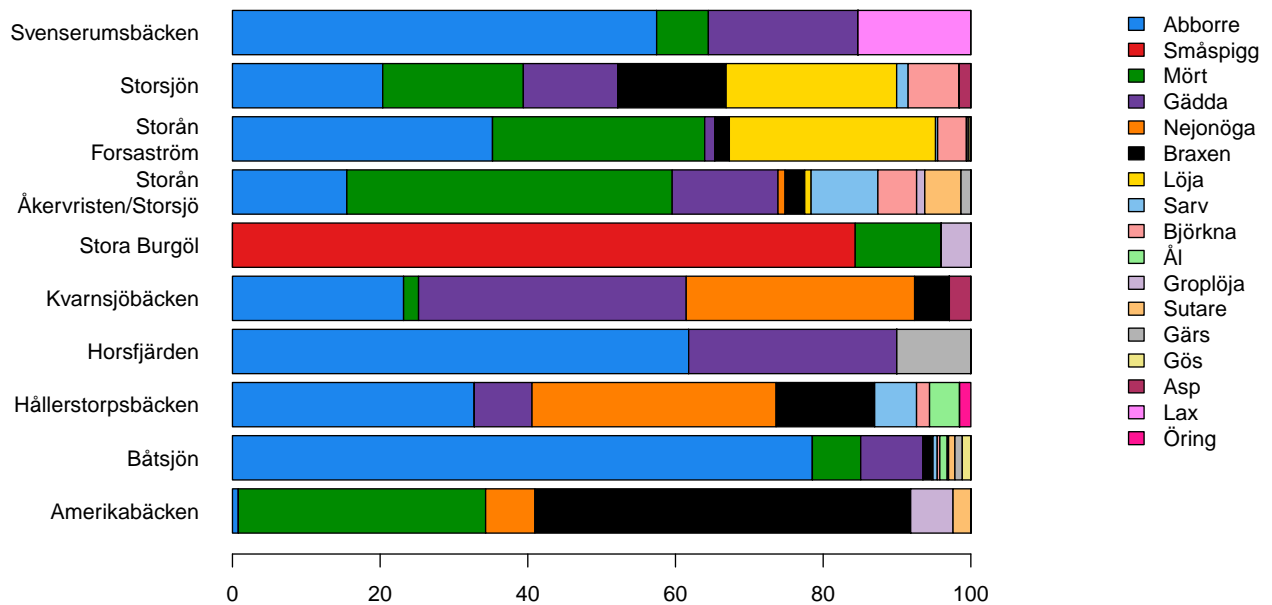
Fisk

Mellan 0.7 och 1.1 miljoner fragment sekvenserades per prov. Bland dessa var det dock endast en liten del som hade förväntade primersekvenser och var av tillräckligt god kvalitet för att användas för artbestämning. Efter filtrering kvarstod endast mellan 16 000 och 306 000 sekvenser per prov. Trots att primers optimerats för fisk hittas det bland dessa sekvenser förutom spår av fisk även DNA från bakterier, däggdjur och fågel.

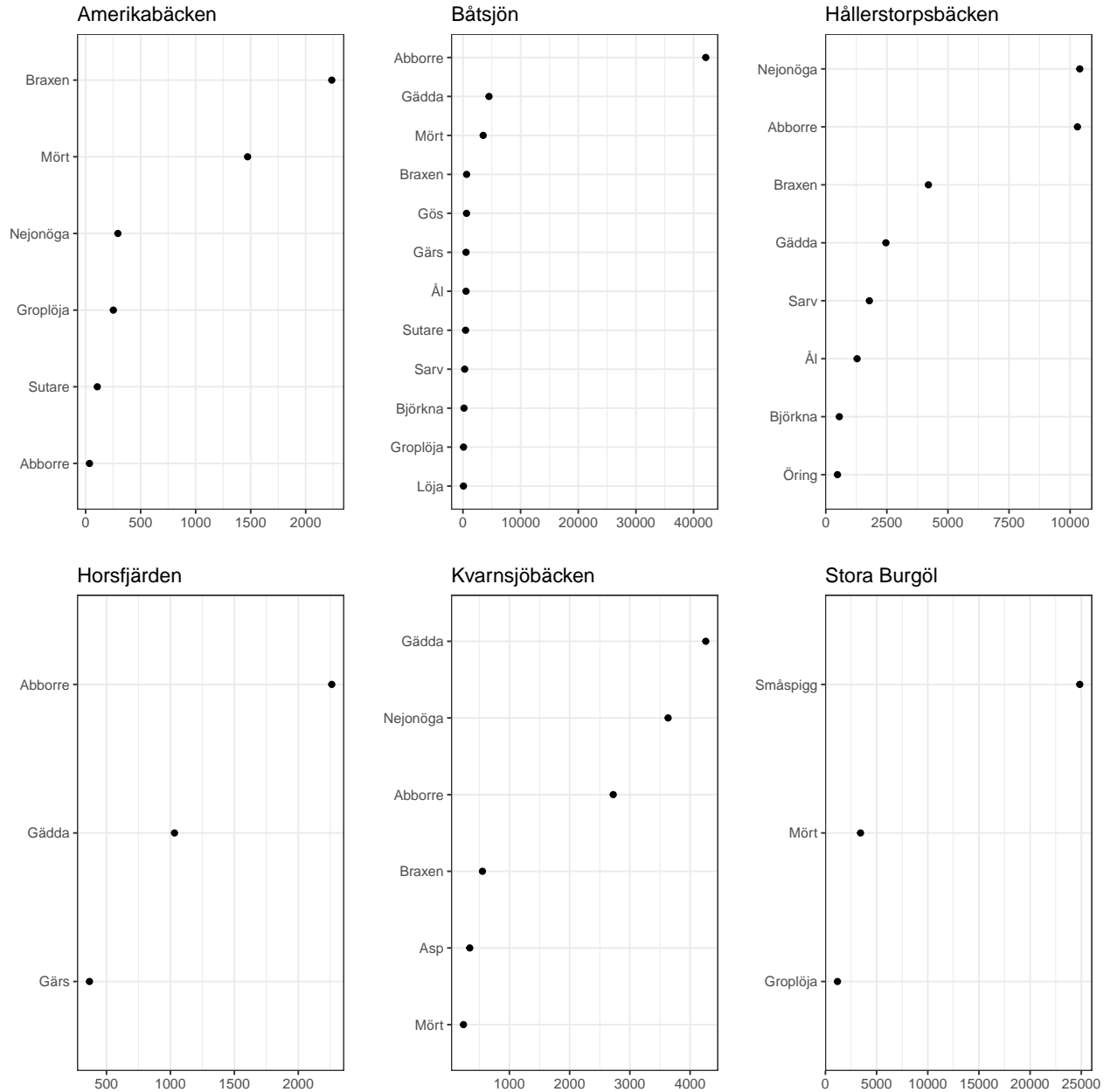
Sett över alla tio prover detekterades spår från 17 olika fiskarter. Abborre var den vanligaste sekvensen sett både till sekvensantal och utgjorde nästan 40% av all erhållen sekvens från fisk. Abborre hittades i alla prover utom Stora Burgöl. I proverna från "Storån Åkervristen/Storsjö", Båtsjön och "Storån Forsaström" hittades spår av fler än 10 arter av fisk, medan det i övriga prover hittades mellan tre och åtta arter (Figur 2-5). I några av proverna var det totala antalet sekvenser från fisk i underkant för vad som önskas vid dylika analyser så för att säkerställa att vi har tillräckligt med data för en eDNA analys kompletterade vi flerartsanalysen med enartsanalys med avseende öring. Arten var av extra intresse från beställarens synvinkel och eftersom den endast hittades i låga koncentrationer i ett av proven med flerartsanalys är den också i detta fall en god kandidat för att se om resultat från flerartsanalysen är tillförlitligt. Enartsanalysen genererade identiska resultat med flerartsanalysen och endast Hållerstorpsbäcken gav en svag signal av öring. Baserat på detta drar vi slutsatsen att trots det något låga antalet sekvenser av fisk är erhållen data tillräckliga för att uttala oss kring fiskfaunan i proverna.



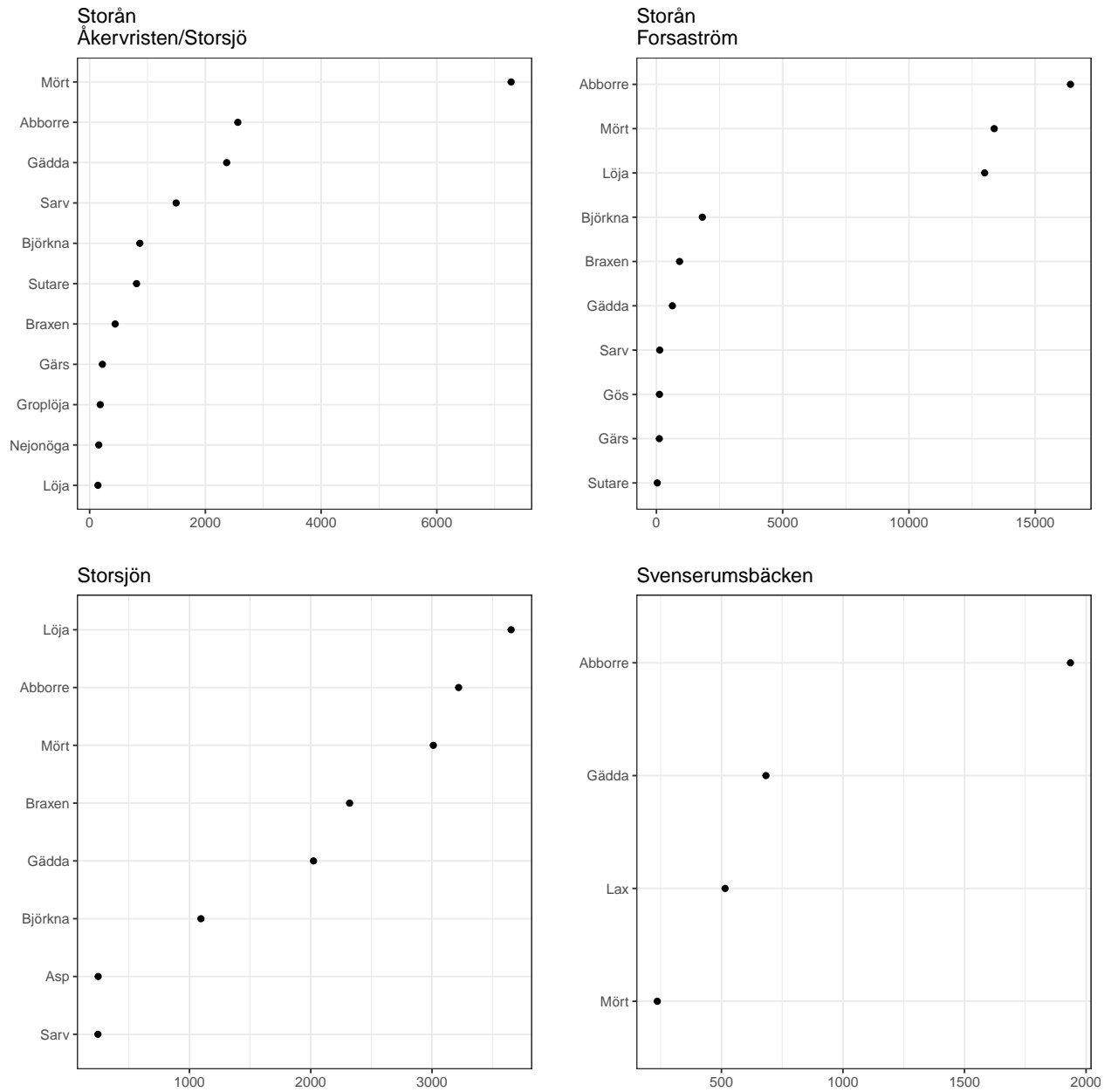
Figur 2: Fiskarter som detekterats i projektet. Staplarnas längd motsvarar det sammanlagda antalet sekvenser från respektive art



Figur 3: Fördelning i procent av sekvenser från olika fiskarter i de analyserade proverna.



Figur 4: Detekterade fiskarter i proverna från Hållerstorpsbäcken, Storsjön, Horsfjärden, Amerikabäcken, "Storån Åkervristen/Storsjö" och Kvarnsjöbäcken. Notera att både antal arter och längden på x-axeln är olika mellan delfigurer.



Figur 5: Detekterade fiskarter i proverna Stora Burgöl, Svenserumsbäcken, Båtsjön och "Storån Forsaström". Notera att både antal arter och längden på x-axeln är olika mellan delfigurer.

Från Båtsjön, Storsjön och Hållerstorpsbäcken finns det provfiskedata från tidigare nät- och elfisken. I de första två handlar det om provfiske med nät, medan Hållerstorpsbäcken har provfiskats med elfiske. Samtliga arter (abborre, benlöja, braxen, björkna, gärs, gädda, gös, mört och sarv) som rapporterats från Båtsjön under provfiske 2019 och 2022 (SLU 2023) återfinns även med eDNA i denna studie. Förutom dessa arter hittar vi med eDNA också spår av groplöja, sutare och ål i detta vatten. Jämförelse med provfiske i Storsjön uppvisar större skillnader mellan metoder. Från nätprovfisket rapporteras fångst av abborre, benlöja, braxen, björkna, gers, gädda, gös, lake, mört, nors, sarv och sutare (Helmerson 2017). eDNA analysen hittar de flesta av dessa, men inga spår av gärs, gös, lake och nors erhöles.

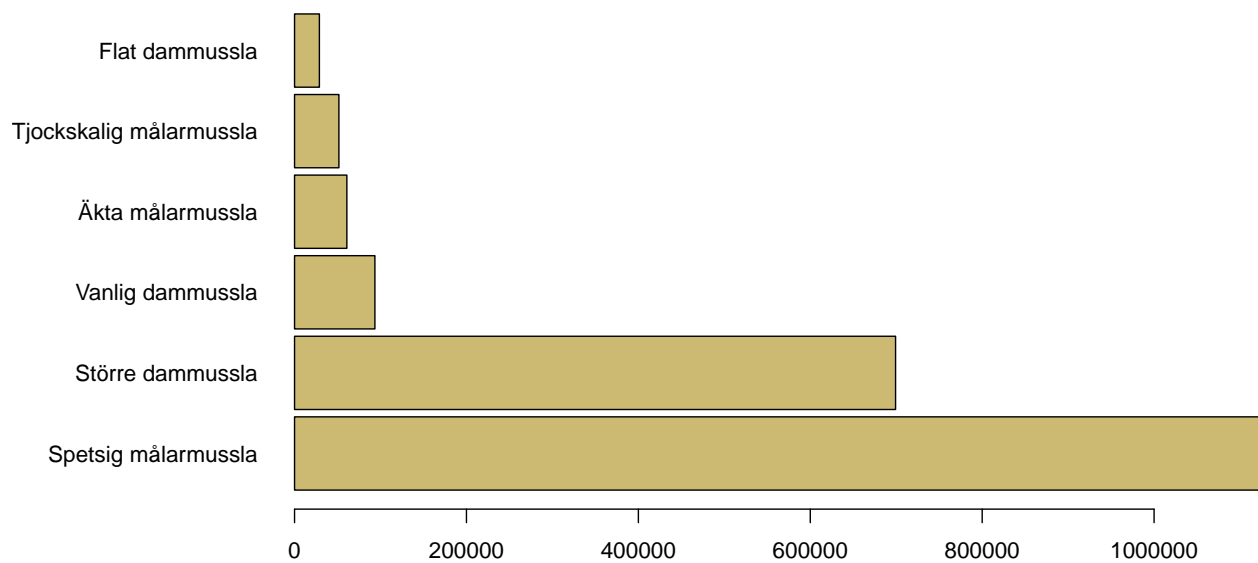
De registrerade provfisken som finns för Hållerstorpsbäcken visar liksom Båtsjön en stor överensstämmelse mellan eDNA och mer traditionella provfiskemetoder. Här fångades bäcknejonöga, ål och öring med elfiske och dessa arter hittades också med eDNA. Dock hittade eDNA analysen även spår av abborre, braxen, björkna, gädda och sarv i vatten från den bäcken. Att fler arter hittas med eDNA än vid elprovfiske är väntat då elprovfiske som sker i begränsad biotop i ett vattendrag och därmed oftast endast fångar arter som lever i dessa mer strömmande (och grunda delar) av vattendraget, medan eDNA analyser fångar spår både från arter som finns på platsen och från arter som lever uppströms provtagen lokal.

Sammantaget är överensstämmelsen relativt god mellan metoderna, men det finns flera olika anledningar till att man inte alltid får en god överensstämmelse med olika metoder. Det första och mest uppenbara är så klart att alla metoder ger en ögonblicksbild av hur det ser ut i ett vattendrag vid ett givet tillfälle. Det innebär att det oavsett metod kan vara skillnader i artförekomst på en lokal både mellan och inom ett år. Baserat på tidigare resultat är det dock vanligt att eDNA analyser hittar något fler arter än andra former av provfisken. Detta beror åtminstone till viss del på att vissa arter är svårare att fånga med nät/elfiske, medan de ofta ändå lämnar tillräckligt med eDNA spår för att hittas med DNA baserade analyser. Som exempel kan nämnas gädda och ål som är svåra att fånga i nät och därmed ofta missas/underskattas med nätprovfiske, medan bägge dessa arter ofta lämnar tillräckliga DNA spår för att detekteras med eDNA analyser. Det är dock också så att eDNA analyser endast är indirekta bevis på närvaro av fisk i ett vatten och DNA från fiskar kan spridas med fågelspillning eller från mänsklig aktivitet vilket gör det nödvändigt att validera oväntade artfynd med upprepade provtagningar och/eller kompletterande metoder.

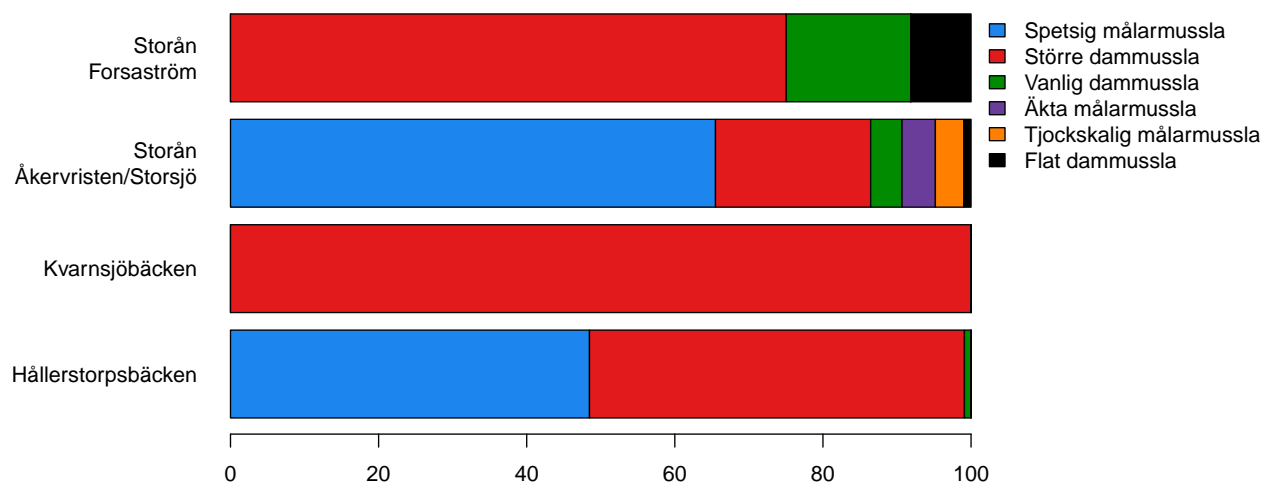
De flesta arter som hittas i denna eDNA analys är arter som är förväntade i vatten från denna del av Sverige, men det är några fynd som sticker ut. Vi hittar spår av groplöja i fyra olika platser (Amerikabäcken, "Storån Åkervristen/Storsjö", Stora Burgöl och Båtsjön). Denna art har inte rapporterats från dessa vatten tidigare och är en art med naturligt utbredningsområde längre söderut i Sverige. Under 60-talet och framåt blev det dock populärt att sätta ut groplöja i nya vattendrag varför ett stort antal bestånd etablerades sig norr om naturliga utbredningsområdet (Artdatabanken 2023). Arten hittas ofta i vegetationsrika små vattendrag (eller avsnörda vikar), men kan också leva i mindre bäckar och diken. Andra oväntade fynd är spår av asp i Storsjön och Kvarnsjöbäcken samt spår av lax i Svenserumsbäcken. Aspen är nog inte helt orimlig i dessa vatten, medan det verkar mer troligt att spåren av lax är från exogena källor och/eller kontaminering vid provtagning eller vid laboratoriehantering.

Musslor

Vi erhöj mellan 0.8 och 1.85 miljoner sekvenser för eDNA analys med avseende på musslor. En majoritet av dessa sekvenser var av tillräckligt god kvalitet och med förväntade primers för att bibehållas för vidare analys. Totalt över alla prover var det 2056457 sekvenser som gick att spåra till någon av de stormusslor som var målet för analysen, det var dock extremt stor skillnad mellan proverna. I Amerikabäcken var det inga spår av musslor, medan hela sex olika musselarter hittades i provet från "Storån Åkervristen/Storsjö". Vanligast sett till sekvensantal var spetsig målarmussla som hittades i mycket stora sekvensantal i både Hållerstorpsbäcken och "Storån Åkervristen/Storsjö". Vanligast sett till hur många platser arten hittades på var större dammussla som hittades i alla lokaler utom Amerikabäcken och det var också den enda arten som hittades i Kvarnsjöbäcken (Figur 5-7).

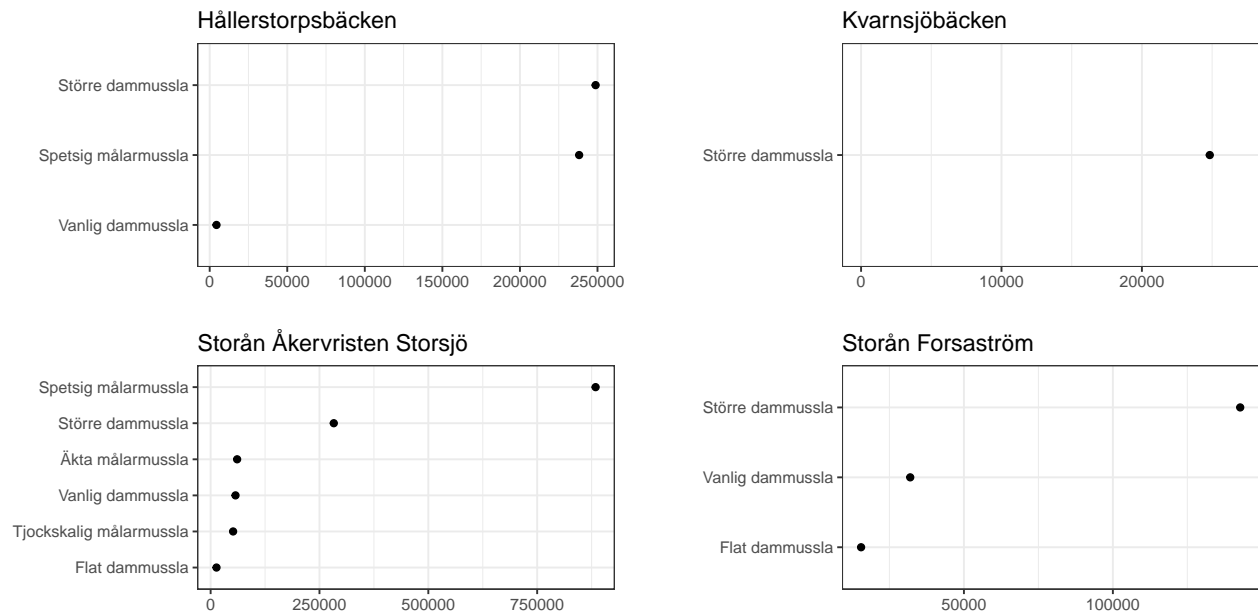


Figur 6: Musselarter som detekterats i projektet. Staplarnas längd motsvarar det sammanlagda antalet sekvenser från respektive art



Figur 7: Fördelning i procent av sekvenser från olika musselarter i projektet. Notera att Amerikabäcken inte visas då inga spår av musslor hittades där.

Noterbart är att det hittas spår av tjockskalig målarmussla från "Storån Åkervristen/Storsjö". Arten är starkt



Figur 8: Detekterade arter av Musslor från Hållerstorpsbäcken, Kvarnsjöbäcken, "Storån Åkervristen/Storsjö" och "Storån Forsaström". Notera att både antal arter och längden på x-axeln är olika mellan delfigurer.

hotad och har under många år visat vikande populationsutveckling. Det är dock sedan tidigare känt att arten förekommer i Storån (Årnfelt et al. 2014).

Nivåerna av DNA från musslor i vatten kan bli mycket lågt vid låga vattentemperaturer vilket gör att provtagning i slutet av oktober eventuellt skulle kunna vara sent att provta för eDNA analys. Givet detta är det intressant att se att spår av ett stort antal musselararter i det här projektet.

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.
- Artdatabanken, SLU. 2023. "Artfakta." 2023. <https://artfakta.se/naturvard/taxon/100074>.
- Årnfelt, E, Mattias Ibbe, Lars Gezelius, and Bergengren Jakob. 2014. "Stormusslor I östergötland - Inventeringar 1999 till 2014." Rapport 2014:11. Länsstyrelsen Östergötland.
- 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.
- Carim, KJ, TM Wilcox, M Anderson, DJ Lawrence, MK Young, KS McKelvey, and MK Schwartz. 2016. "An Environmental Dna Marker for Detecting Nonnative Brown Trout (*Salmo Trutta*)." *Conservation Genetics Resources* 8: 259–61.
- Helmerson, Ola. 2017. "Nätprovfiske I Storsjön 20–25 Augusti 2017." Hushållningssällskapet.
- 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.
- Prié, Vincent, Alice Valentini, Manuel Lopes-Lima, Elsa Froufe, Mathieu Rocle, Nicolas Poulet, Pierre Taberlet, and Tony Dejean. 2021. "Environmental Dna Metabarcoding for Freshwater Bivalves Biodiversity Assessment: Methods and Results for the Western Palearctic (European Sub-Region)." *Hydrobiologia* 848: 2931–50.
- SLU, Institutionen för akvatiska resurser. 2023. "Nationellt Register över Sjöprovfisken - Nors."
- Zieritz, Alexandra, Bernhard Gum, Ralph Kuehn, and Juergen Geist. 2012. "Identifying Freshwater Mussels (Unionoida) and Parasitic Glochidia Larvae from Host Fish Gills: A Molecular Key to the North and Central European Species." *Ecology and Evolution* 2 (4): 740–50.