



Naturhistoriska
riksmuseet

eDNA detektion av fisk från Bällstaån

Diarienummer NRM 4.1-449-2020
20210406



Centrum för genetisk identifiering

Totalt gjordes tre oberoende PCR replikat och prov 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

Tabell 1: Sekvenser för de primers och prober som använts för detektion av eDNA. Temperatur är annealing-temperatur i PCR-reaktionerna.

Typ av analys	Primer F	Primer R	Probe	Temperatur
Däggdjur [*]	ACTGGGATTAGATACCCC	TAGAACAGGCTCCTCTAG	-	65-60
Fisk [†]	AAACTCGTGCCAGCCACC	GGGTATCTAATCCCAGTTTG	-	62-57
Musslor [‡]	AGACTGGGTTGCCGAGGT	CGAGTGATCCACCGCTTAGA	-	60-55

^{*} Riaz et al. 2011
[†] Miya et al. 2015
[‡] Zieritz et al. 2012

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 filtrerades samtliga sekvenser vars frekvens var lägre 0.5% av totala antalet läsningar i ett prov. Dock sparades även de lågfrekventa sekvenserna om de hittades i flera olika prover även om de var under 0.5%. Kvarvarande sekvensvarianter spårades till art genom att jämföra sekvenserna mot NCBI's öppna nukleotiddatabas (Nucleotide collection) med verktyget blast den 11 November 2020(Altschul et al. 1990).

Resultat

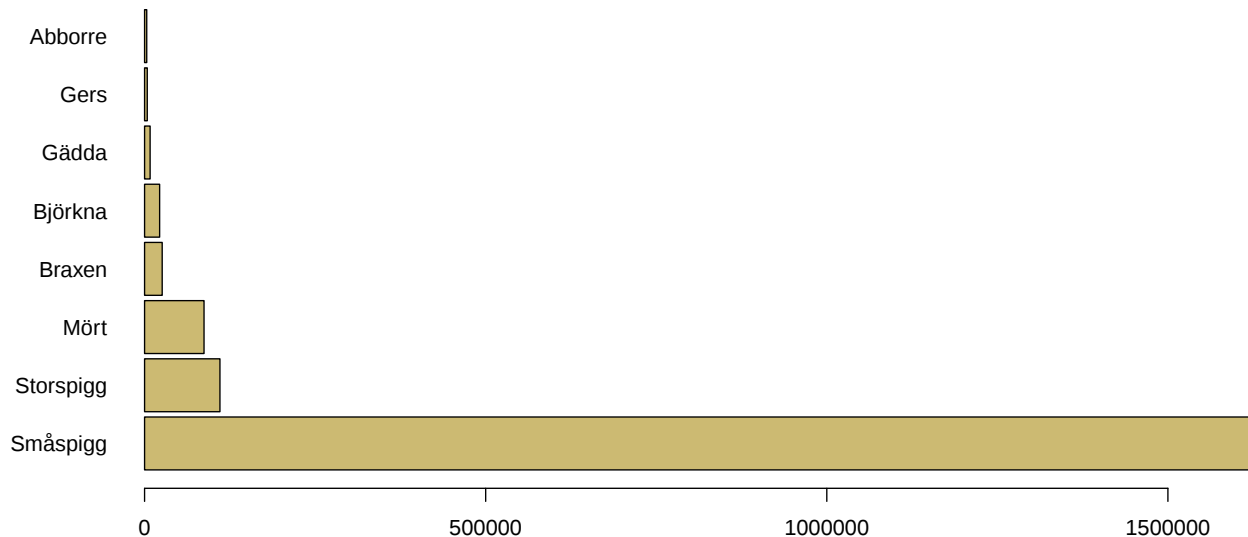
PCR reaktioner genererade rena amplifieringar av förväntad storlek för alla tre replikat och alla prover och var därmed lämpliga för att skapa sekvenseringsbibliotek. Även amplifieringar av musslor och däggdjur genererade förväntade resultat (även om amplifiering av musslor gav en svag signal).

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

Arter	Vetenskapligt namn
Fisk	
Småspigg	<i>Pungitius pungitius</i>
Storspigg	<i>Gasterosteus aculeatus</i>
Mört	<i>Rutilus rutilus</i>
Braxen	<i>Abrama bramis</i>
Björkna	<i>Blicca bjoerkna</i>
Gädda	<i>Esox lucius</i>
Gers	<i>Gymnocephalus cernuus</i>
Abborre	<i>Perca fluviatilis</i>
Däggdjur	
Bäver	<i>Castor fiber</i>
Vattensork	<i>Arvicola amphibius</i>
Nötkreatur	<i>Bos taurus</i>
Gris/Vildsvin	<i>Sus scrofa</i>
Brunråtta	<i>Rattus norvegicus</i>
Människa	<i>Homo sapiens</i>
Stormusslor	
Större dammussla	<i>Anodonta cygnea</i>

Fiskfauna

Totalt erhöles 2.6 miljoner sekvenser från proverna och 73% av dessa var från fisk och inkluderades i analysen. Övriga sekvenser var av låg kvalitet eller var spår från fåglar, däggdjur och bakterier.

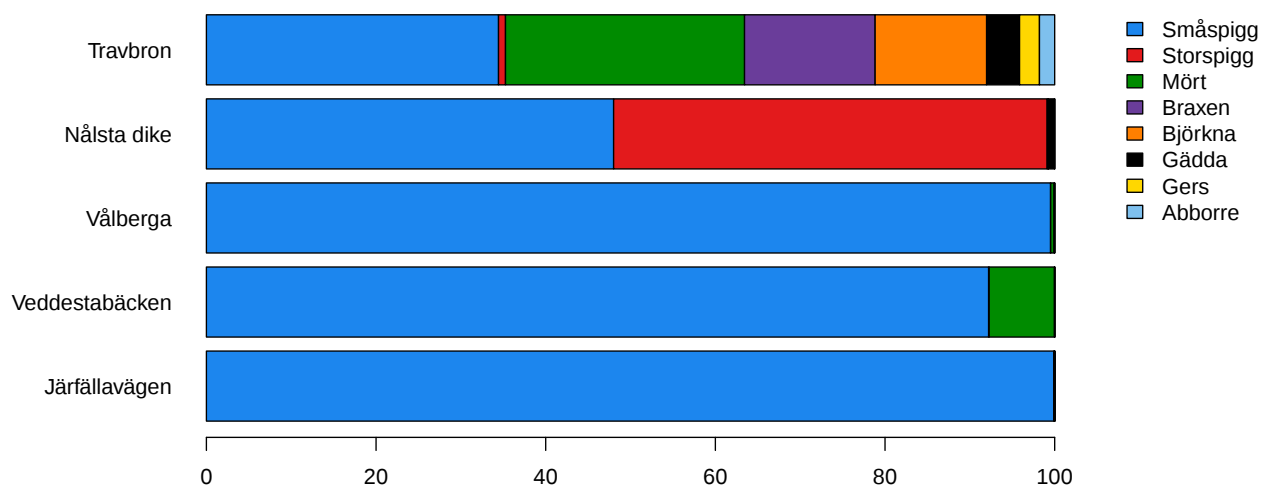


Figur 2: Detekterade sötvattenarter av fisk från Ballstaåns avrinningsområde. Staplarnas längd motsvarar det sammanlagda antalet sekvenser från respektive art

Tittar vi specifikt på fiskfauna och slår samman alla insamlade data över alla fem lokaler hittas spår från åtta olika fiskarter.

Tre av arterna småspigg, storspigg och mört, hittades på samtliga lokaler och är också helt dominerande om man ser till antal sekvenser då de tillsammans utgör mer än 97% av de eDNA spår som detekteras (Figur 2). Det finns en viss korrelation mellan biomassa av en art och antalet sekvenser som detekteras från arten med eDNA, men det är långt ifrån en enkel korrelation och det finns många parametrar som kan påverka korrelationen. Man kan dock när man slår samman flera prover med viss konfidens säga att de arter som är vanligast bland eDNA också tillhör de vanligaste arterna i vattnet.

Från proven vid Järfällavägen och Vålberga utgjorde småspigg mer än 99% av eDNA som detekteras och resterande arter var under detektionsgränsen för enskilda prov, men bibehölls i analysen då det var arter som hittades på flera av lokalerna (Figur 4). Från veddesta var det förutom småspigg även en tydlig signal från mört. Nålsta dike var mer divers och hade ungefär lika många sekvenser från storspigg som småspigg och även en svag signal av gädda. Travbron var tydligt artrikast och hade eDNA spår av alla åtta arter som detekteras i studien (Figur 3 och 4).

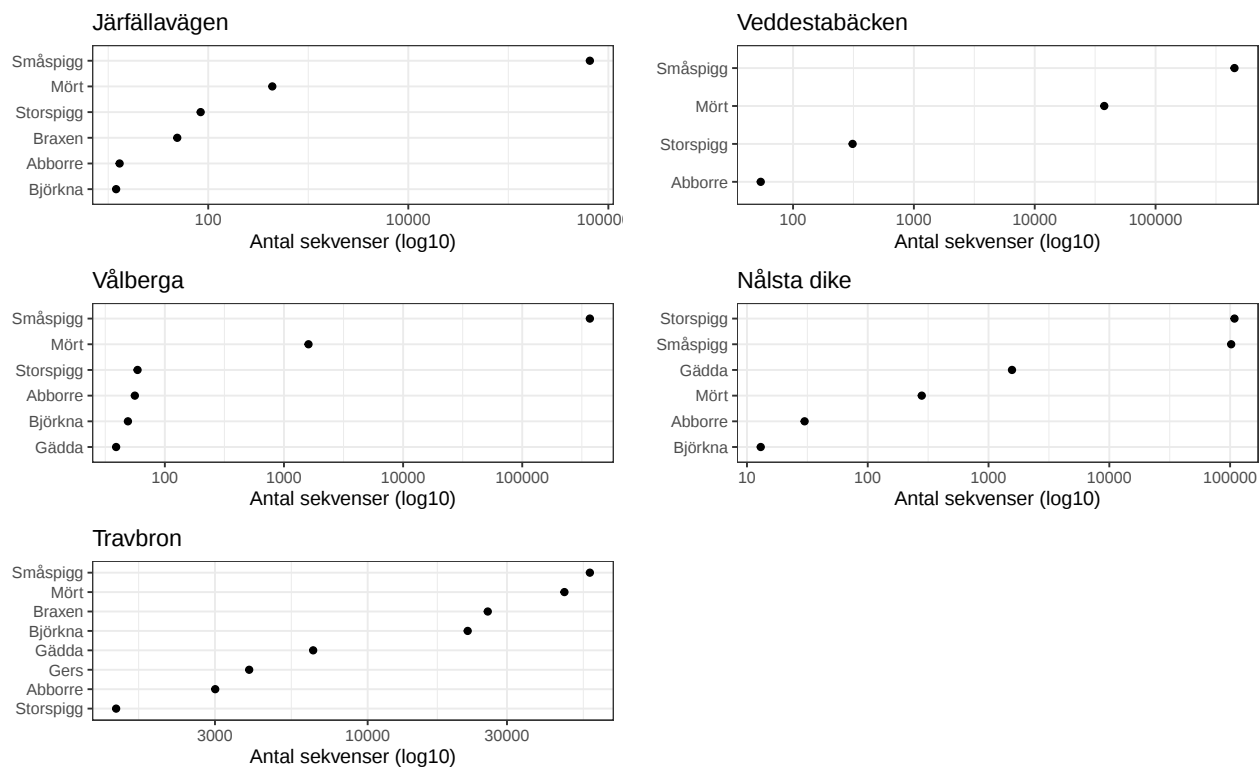


Figur 3: Fördelning i procent av sekvenser från olika fiskarter från de analyserade lokalerna. Mer detaljerad information med arter per lokal finns i figur 3.

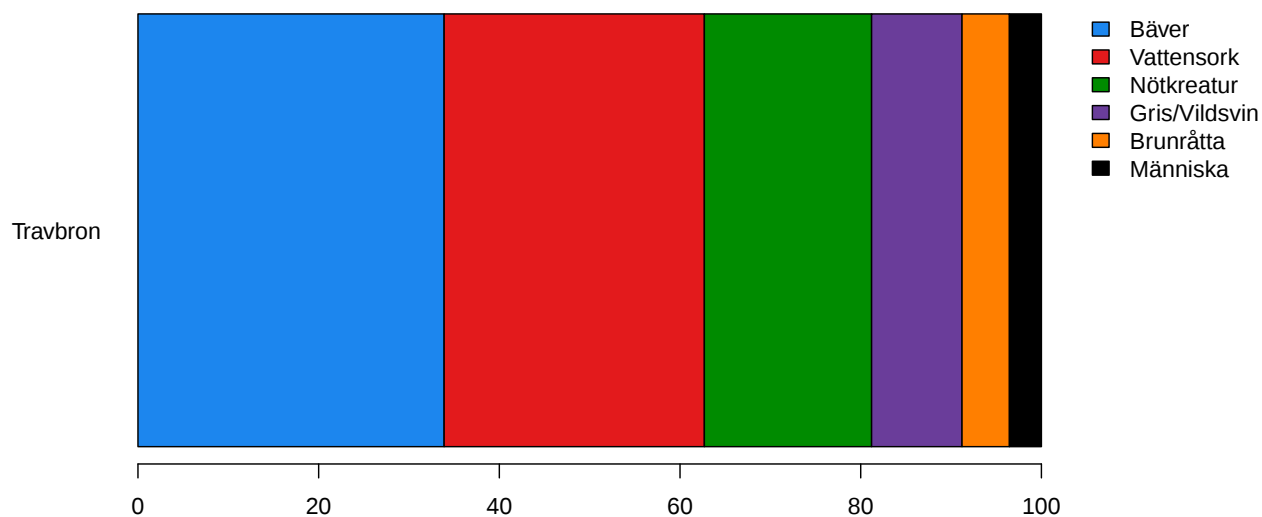
Musslor och däggdjur vid Travbron

Från travbrons prov analyserades även stormusslor och däggdjursfauna i två separata analyser. I däggdjursanalysen erhöles nästan 100 tusen sekvenser men endast några procent av dessa kunde, trots att metoden optimerats för däggdjur, spåras till däggdjursarter. Resterande sekvenser kunde spåras till fisk och fågel. Detta kan ses som en indikation på att det finns relativt lite DNA från däggdjur i vattenprovet. Tittar vi på de däggdjursarter som finns i området är det tydliga spår av tamdjur som nötkreatur och gris och vi ser även spår från människa. Lite oväntat givet att provet togs nära ett stall så hittas det inga spår av häst i vattenprovet. Tittar vi bland vilda djur hittas det spår av bäver, vattensork och brunrätta (Figur 5).

I analys avseende musslor hittas spår från en art, Större dammussla (*Anodonta cygnea*). Arten är tämligen sällsynt och föredrar jämfört med andra musselarter lugna näringsrika sjöar eller lugna delar av vattendrag. Under de senaste åren har observationer från arten rapporteras från sjöar i Stockholm, men givet att arten har lite mer krav på sin livsmiljö än flera andra arter av stormussla är spåren från Bällstaån, som är kraftigt påverkat och knappast utgör en optimal livsmiljö för arten, oväntad. eDNA signalen från arten är tydlig, men eDNA är endast indirekta bevis på artförekomst, vilket innebär att DNA spår kan finnas i vattnet utan att arten lever där (komma från spillning av arter som ätit musslan etc). Man bör därför vid oväntade fynd validera att arten förekommer i vattendraget genom att från ny vattenprovtagning validera dessa eDNA-spår och/eller att inventera med andra metoder.



Figur 4: Detekterade arter av fisk i analyserade prover. Notera att x-axeln är logaritmisk och att både antal arter och längden på x-axeln är olika mellan delfigurer.



Figur 5: Fördelning i procent av sekvenser från olika däggdjursarter från provplatsen Travbron

Sammanfattning

Denna studie visar att man med eDNA provtagning kan skapa en god bild kring vilka arter som finns i ett vattendrag. 2014 genomfördes ett elfiske på bland annat de platser som provtogs här. Under den provtagningen noterades inga fiskar på någon av platserna även om det rapporterades om en flyende gädda vid travbron (Fränstam 2014). Det gjordes även ett elfiske i år under samma period som dessa eDNA vattenprover samlades in, men det finns ingen publik rapport från denna studie ännu. Muntligt rapporterade dock Malin Kjellin från Sportfiskarna som gjorde elfisket att det fångades en del fisk, bland annat små- och storspigg. Detta tillsammans med våra resultat här tyder på att det kan ha skett en viss förbättring för fiskar i detta vattendrag.

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. Arbetsstämning 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.
- Fränstam, Tobias. 2014. "Elprovfiskeundersökning i Bällstaån 2014." Sportfiskarna, på uppdrag av Miljöförvaltningen Stockholms Stad.
- 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.
- Riaz, Tiayyba, Wasim Shehzad, Alain Viari, François Pompanon, Pierre Taberlet, and Eric Coissac. 2011. "EcoPrimers: Inference of New Dna Barcode Markers from Whole Genome Sequence Analysism." *Nucleic Acids Research* 39 (21): e145–e145.
- 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.