



Naturhistoriska
riksmuseet

eDNA detektion av fisk från Medelpad

Diarienummer NRM 4.1-693-2022

20230317



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 fått i uppdrag av SWECO att inventera fiskfaunan i vattenprover insamlade kring Torsboda området i Medelpad.

Material och metoder

Vattenprover filtrerades genom ett filter från Sylphium optimerade för eDNA (Sylphium eDNA Dual Filter Capsule) och DNA extraktion gjordes med en extraktionsrobot och “Omega Mag-Bind HDQ blood DNA kit” extraktionskit enligt beskrivning från tillverkaren. För fiskanalysen amplifierades en kort bit av mitokondrien med primer MiFish U-F (GTCGGTAAAACCTCGTGCCAGC) och MiFish U-R (CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG) med en touch-down PCR från 62°C till 57°C (Miya et al. 2015). Extra analyser för att validera resultat från ovanstående analys gjordes med ett annat primerpar (Karp16SF, CATGCAGACGAGAAGACCCTTTGGAG och Karp16SR, CTCCAAAGGGTCTTCTCGTCTGCATG) optimerat för att detektera och särskilja karpfiskar som förekommer i svenska vatten.

Totalt gjordes tre oberoende PCR replikat 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 på ett Illumina sekvensmaskin hos Novogene med 150 bp läslängd.

Parallellt med hanteringen av vattenproverna analyserades ett kontrollprov bestående av kranvatten för att kunna detektera problem med kontaminering.

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. Kvarvarande sekvensvarianter spårades till art genom att jämföra sekvenserna mot NCBI:s öppna nukleotiddatabas (Nucleotide collection) med verktyget blast (Altschul et al. 1990) mars 2023. Endast likhet som översteg 98.5% identitet betraktas som säkra artbestämningar.

Resultat

PCR reaktioner genererade svaga amplifieringar av förväntad storlek för alla tre replikat i proverna och var därmed lämpligt för att skapa sekvenseringsbibliotek. Från kontrollprovet gick det inte att skapa något sekvensbibliotek och därmed erhöles inget sekvensdata från det provet.

Antalet sekvenser per prov varierande från cirka 500 tusen till strax över en miljon. Medelantalet sekvenser som innehöll förväntade primers och av tillräckligt god kvalitet för att bibehållas för vidare analys per prov var dock endast 302747.

Trots att metod optimerad för fiskanalys användes hittades stora andelar DNA från både däggdjur i proverna. Människa (*Homo sapiens*) var vanligast i samtliga prover och i alla utom prov “Torsboda nord 2” och “Torsboda syd 5” utgjorde DNA spår från svin (*Sus scrofa*) en stor andel av sekvenserna. I prover med små mängder DNA från fisk är det vanligt att spår av däggdjur och andra organismgrupper amplifieras, men i prov där det finns gott om fisk dominerar oftast signalen från fisk.

Fiskfauna

I prov "Torsboda syd 3" hittades inga spår av fisk, medan "Torsboda nord 1", "Torsboda nord 2", "Torsboda syd 5" uppvisade spår av enstaka fiskarter. Resultaten från dessa tre prover var atypiska för lyckade eDNA analyser. Från prov "Torsboda syd 4" erhålls dock data med förväntad mönster från en eDNA analys och spår av björkna (*Blicca bjoerkna*), abborre (*Perca fluviatilis*), gädda (*Esox lucius*), mört (*Rutilus rutilus*) och löja (*Alburnus alburnus*) hittades. Atminstone björkna och löja får anses vara oväntade att hitta spår av i en mindre bäck i mellansverige. Givet detta och det faktum att flera av proverna hade avvikande data gjordes ett omtag med samtliga prover med det alternativa primerparet. Det var inte möjligt att amplifiera DNA från fisk med den markören i något av proverna. På basis av detta drar vi slutsatsen att de atypiska signalerna som observerades inte är DNA spår av fisk från dessa prover utan kommer någon form av artefakter i sekvenseringen. I och med att den första analysen såg ok ut rent tekniskt för prov "Torsboda syd 4" kan vi inte bara bortse från dessa resultat och tänker oss att den mest troliga orsaken till dessa oväntade spår av fisk är kontaminering in något av stegen. Kontaminering i laboratoriestegen kan inte uteslutas, men mönstret vi ser stämmer inte med vad vi förväntar oss från kontaminering i dessa steg, då man väntar sig att de skulle påverka alla prover på liknande vis och istället har vi till exempel prover som är helt tomma i samma analys.

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.