

FISKINVENTERING MED eDNA FYRISÅN, UPPSALA 2020

Micaela Hellström och Liselott Rasmussen



MIX Research

Postadress: Dekangatan 5, 75257 Uppsala

E-post: info@mixresearch.se

Telefon: 070-782 03 10

Dokumenttitel: Fiskeinventering med eDNA , Fyrisån Uppsala 2020

Författare: Micaela Hellström, Liselott Rasmussen (MIX Research)

Granskning: Anders Modig (Tyréns AB)

Foton och illustrationer: MIX Research, om inte annat anges.

Omslagsbild: MIX Research

Fältarbete: Micaela Hellström (MIX Research), Anders Larsson (Tyréns AB)

Dokumentdatum: 2020-10-18

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

INNEHÅLLSFÖRTECKNING	3
1. Sammanfattning	4
2. Inledning	4
3. Metoder	5
3.1 Fältarbete	5
3.2 Laboratoriearbete	5
4. Resultat och diskussion	5
5. Referenser	7
Bilaga 1. Vad menas med enarts- och flerartsanalyser?	8
Bilaga 2. Laboratoriearbete	9
Bilaga 3. Kvalitetssäkring av DNA - kontroller	10
Bilaga 4: Kvalitetskontroller som redovisas	11
Bilaga 5: Resultat av kvalitetskontroller för flerartsanalyser	12



1. SAMMANFATTNING

Miljö-DNA, eller eDNA (från engelskans environmental DNA), är samlingsnamnet på de genetiska avtryck som alla levande organismer lämnar efter sig i miljön i form av t.ex. fotspår, svett, slem och fingeravtryck. Eftersom genetiska analyser utvecklats mycket under de senaste decennierna är det fullt möjligt att genom vatten eller jordprov fånga upp dessa avtryck och med precisa metoder identifiera de arter som finns i en given miljö. eDNA kan utvinnas från en halv liter vatten och med hög precision ange vilka arter som är närvarande i t.ex. en sjö, damm eller flod. Detta verktyg är välutvecklat i vattenmiljöer och har visat sig vara användbart för miljöövervakningen. eDNA har visat sig vara kortlivat i vattenmassan (normalt maximalt ca. 2 veckor beroende på omständigheter) och ger därför en bild av arters förekomst i nutid.

Den 28 september 2020 utförde MIX Research, på uppdrag av Tyrens AB, en fiskinventering med hjälp av eDNA på två lokaler i Fyrisån (ovan Islandsfallet samt ovan Kvarnfallet) i Uppsala. Uppdraget var en pilotstudie för att ta reda på hur fisksamhället kan inventeras och om asp detekteras med eDNA. Resultaten jämfördes med elfiskeresultat från samma område 2019. eDNA detekterade sammanlagt 15 arter; 13 ovan Islandsfallet och 13 arter ovan Kvarnfallet. De hotade arterna asp och ål detekterades. De mest dominanta arterna var mört, abborre, braxen och stensimpa. Elfisket från 2019 detekterade 6 arter av vilka mört, abborre och stensimpa dominerade, vidare detekterades en individ av gädda, id och ål.

Resultaten visade att eDNA metastreckkodning är ett effektivt verktyg för fiskinventeringar och detekterar betydligt mer arter än elfiske. Vidare visade resultatet från de båda proven att det är önskvärt att ta prover både ovanför och nedanför fallen för att få en tydlig bild av hur fiskarna är utbredda i Fyrisån.

2. INLEDNING

Miljö-DNA eller eDNA (från engelskans environmental DNA) är samlingsnamnet på de genetiska avtryck som alla levande organismer lämnar efter sig i miljön i form av t.ex. fotspår, svett, slem och fingeravtryck (Pedersen m.fl. 2015). Taberlet m.fl. (2012) definierar eDNA som "det DNA som kan studeras från efterlämnade spår i miljön utan att målorganismen är närvarande i provet" Eftersom genetiska analyser har utvecklats mycket under de senaste decennierna är det fullt möjligt att genom vatten- eller jordprov fånga upp dessa avtryck och med precisa metoder identifiera de arter som finns i en given miljö. eDNA kan utvinnas från en halv liter vatten och med hög precision ange vilka arter som är närvarande. Detta verktyg är välutvecklat i vattenmiljöer och har visat sig vara användbart för miljöövervakningen (Harper m.fl. 2015, 2018, Lawson Handley 2015, Leese m.fl. 2016, Olds m.fl. 2016, Deiner m.fl. 2017). eDNA har visat sig vara kortlivat i vattenmassan och ger därför en bild av arters förekomst i nutid.

Traditionella inventeringar är både tids- och resurskrävande vilket ofta gör storskaliga inventeringar ogenomförbara. Vidare är många provtagningsmetoder destruktiva vilket kan påverka sällsynta och hotade arter negativt. Eftersom eDNA-metoden är en icke-dödande metod är det idealiskt för undersökningar av biologisk mångfald.

Den 28 september 2020 utförde MIX Research, på uppdrag av Tyrens AB, en fiskinventring med hjälp av eDNA på två lokaler i Fyrisån (ovan Islandsfallet samt ovan Kvarnfallet) i Uppsala. Uppdraget var en pilotstudie för att ta reda på hur eDNA kan användas förfiskinventeringar i Fyrisån.

3. METODER

3.1 FÄLTARBETE

Fältarbetet utfördes den 28 augusti 2020 ovanför Islandsfallet samt ovanför Kvarnfallet i Fyrisån i centrala Uppsala (Figur 1, Tabell 1).

Innan eDNA-provtagningen genomfördes i fält, steriliserades all provtagningsutrustning. Filtreringsutrustning köptes in som sterila DNA-fria kit (NatureMetrics Ltd UK). För båda lokalerna samlades 5 liter vatten in i form av delprover. Delproven slogs ihop till ett samlingsprov för säkrare resultat (Harper m.fl. 2018). Vattnet filtrerades för hand genom NatureMetrics 5 µm GF/0,8 µm PES inkapslade filterenheter. Fixering med LM solution följde tillverkarnas protokoll.

Tabell 1. Provpunkter. Namn, position (WGS 84), tidpunkt vid provtagningen, vattentemperatur och total volym filtrerat vatten (ml). Samtliga prover samlades in 28 augusti 2020.

Provpunkt namn	Latitud (N)	Longitud (Ö)	Tid	H2O °C	V H2O ml
ASP-01					
Islandsfallet	59,854958	17,639993	10:08	17,5	3 000
ASP-02					
Kvarnfallet	59,8595771	17,633569	11:02	17,5	3 000

3.2 LABORATORIEARBETE

Se bilaga 2.

4. RESULTAT OCH DISKUSSION

Sammanlagt 15 fiskarter detekterades med hjälp av eDNA. Tretton arter detekterades ovanför Islandsfallet och 13 arter ovanför Kvarnfallet. Sekvenserna för id är identiska för sekvenserna för stäm, i detta fall annoterades läsningarna till id. Antalet läsningar i ett prov ger en uppfattning om den relativa förekomsten av arten vid en punkt. Resultaten och kvalitetskontrollerna samt skullkraven beskrivs i bilaga 3 och 4.

De vanligaste arterna var mört, abborre, braxen och stensimpa. De hotade arterna ål och asp detekterades. Asp upptäcktes i små mängder vid Islandsfallet.

Denna undersökning visar att provtagning både ovanför och nedanför vattenfallen hade varit önskvärt, målet med undersökningen var att ta två prover för att demonstrera hur eDNA kan användas för fiskinventeringar. Resultaten jämfördes med provfiske från samma lokaler 2019 (Persson och Johansson, 2019). Elfisket angav enbart antal fiskar per art och inte biomassa. Elfisket detekterade 6

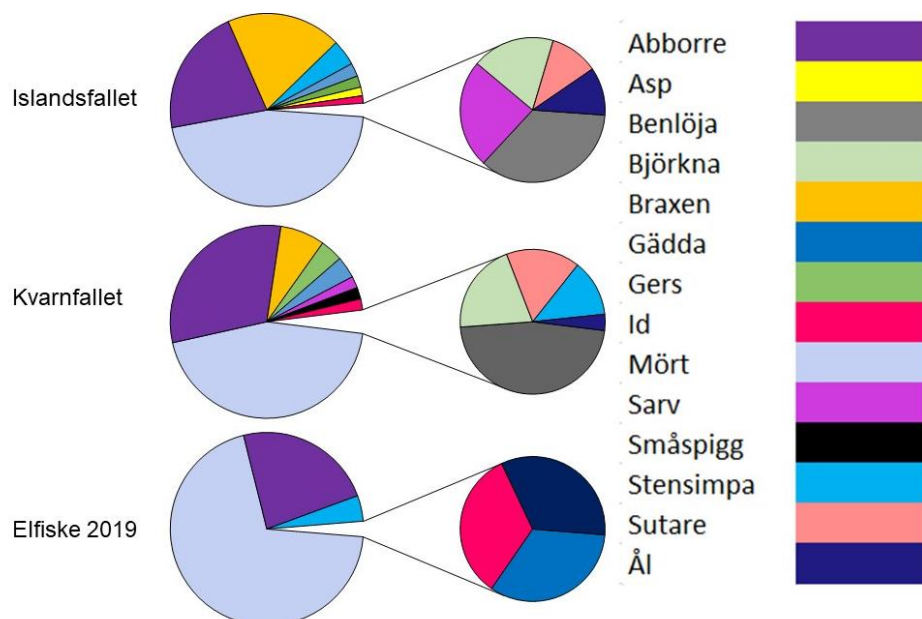
arter. Arternas förekomst för eDNA och provfiske anges i tabell 2, samt dominansförhållande till varandra genom de olika metoderna i figur 1.

Under fältdagen observerades stora mängder asp mellan de båda provtagningspunkterna. Elfisken kan skada arterna och har begränsats i vissa delar av Fyrisån på lokaler med små mängder fisk för att populationen vid lokaler uppströms inte skall utarmas (Persson och Johansson, 2019).

Eftersom eDNA inte skadar fiskarna kan undersökningar av fiskförekomst på dessa lokaler göras med eDNA. Denna pilotstudie visar att eDNA metastreckkodning är ett effektivt verktyg för att inventera fiskförekomst i Fyrisån. Vidare visar pilotstudien att artdominansen framkommer med eDNA och ger en uppfattning om förekomst och mängd av både vanliga och sällsynta art, vilka undgår provfisken.

Tabell 2. Identifierade fiskarter med: eDNA ovanför Islandfallet (Asp 1), eDNA ovanför Kvarnfallet (Asp_02) samt elfiske i samma lokaler 2019

	ASP-01	ASP-02	EI_2019
Abborre	x	x	x
Asp	x		
Benlöja	x	x	
Björkna	x	x	
Braxen	x	x	
Gers	x	x	
Gädda	x	x	x
Id	x	x	x
Mört	x	x	x
Sarv	x	x	
Småspigg		x	
Stensimpa	x	x	x
Sutare	x	x	
Ål	x	x	x



Figur 1. Dominansförhållande mellan fiskarter på de två lokalerna med eDNA vs. Provfiske vid Islandfallet 2019.

5. REFERENSER

- Deiner, K., H. M. Bik, E. Mächler, M. Seymour, A. Lacoursière-Roussel, F. Altermatt, S. Creer, I. Bista, D. M. Lodge, N. de Vere, M. E. Pfrender, och L. Bernatchez. 2017. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology* 26:5872-5895.
- Harper, L. R., Buxton, A. S., Rees, H. C., Bruce, K., Brys, R., Halfmaerten, D., ... & Priestley, V. 2018. Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. *Hydrobiologia*, 1-17.
- Lawson-Handley, L., 2015. How will the “molecular revolution” contribute to biological recording? *Biological Journal of the Linnean Society* 115: 750–766.
- Leese, F., Altermatt, F., Hellström M. + 103 authors & Stenke, D (2016). DNAqua-Net: Developing new genetic tools for bioassessment and monitoring of aquatic ecosystems in Europe. *Research Ideas and Outcomes (Rio)*, 2, e11321.
- Olds, B. P., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Li, Y., Evans, N. T., Turner, C. R., ... Shirey, P. D. (2016). Estimating species richness using environmental DNA. *Ecology and Evolution*, 6, 4214–4226.
- Pedersen, M. W., S. Overballe-Petersen, L. Ermini, C. D. Sarkissian, J. Haile, M. Hellstrom, J. Spens, m.fl. 2015. Ancient and modern environmental DNA. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 370:20130383
- Persson J och Johansson G, 2019. Fiskundersökningar i Fyrisån 2019. Rapport 2019/4. Upplandsstiftelsen.
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21, 1789-1793

BILAGA 1. VAD MENAS MED ENARTS- OCH FLERARTSANALYSER?

Enartsstudier - qPCR eller ddPCR

Inventering av förekomst av en enskild art med eDNA görs med så kallad qPCR eller ddPCR. Frågeställningen för dessa studier är: Finns art X här? Varje art analyseras med en markör som är specifik för precis den arten. Provsvaren anger närvaro/frånvaro av den specifika arten.

Om flera arter undersöks med enartsanalyser kan data över relativa abundansen mellan art A och art B inte jämföras med varandra eftersom markörerna för varje art skiljer sig markant från varandra. Analystiden för enartsanalyser är kortare än analystiden för flerartsanalyser.

Flerartsstudier - Metastreckkodning genom NGS (Next Generation Sequencing)

Frågeställningen för flerartsstudier är: Vilka arter finns här och hur hög är deras förekomst? Med andra ord behöver man inte på förhand veta vad man letar efter.

Invasiva eller skygga arter kan identifieras och antalet arter som detekteras i en analys är obegränsat. Om man inventerar tre eller fler arter är denna metod att föredra och blir snabbt mer kostnadseffektiv än enartsanalyser. Analystiden för flerartsanalyser är längre än analystiden för enartsanalyser men mängden av data och information är så pass stor att inventeringarna kan producera "stort data" som inte har varit möjligt före eDNA- metastreckkodning.

BILAGA 2. LABORATORIEARBETE

Extraktion, PCR och sekvensering

eDNA utvanns (extraherades) enligt protokoll från Spens m.fl. (2017) i sterila laboratorier speciellt byggda för analyser av akvatiskt eDNA. Proverna analyserades med enartsanalyser för förekomst av större vattensalamander och flerartsanalyser för förekomst av groddjur (bilaga 1).

Enartsanalyser

För enartsanalyserna utfördes qPCR (Biggs, m.fl. 2014) i 12 replikat. Resultaten anges som närvaro eller frånvaro av arten.

Flerartsanalyser

För flerartsanalyserna användes markörer och protokoll enligt Miya, m.fl. (2015). Varje PCR-prov utfördes i 12 replikat som sammanslogs under bioinformatiken. Som positiv laboratoriekontroll användes ett prov med känd artsammansättning som standard för jämförelse. Negativa kontroller analyserades för att säkerhetsställa kvaliteten och tillförlitlighet av resultat.

Bioinformatik och verifiering

Varje enskild art har en unik streckkod eller DNA-sekvens. De unika sekvenserna jämfördes med en internationell databas (tillgänglig för allmänheten, som grundar sig på GenBank och upprätthålls av *National Center for Biotechnology Information*, NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) där sekvenser på närmare 450 000 kända arter finns tillgängliga med 1 miljard sekvenser och 6,25 triljoner baspar enligt GenBank och NCBI:s hemsida (Sayers, m.fl. 2020). De olika sekvenserna matchades mot databasen och fick på så sätt groddjurens identitet. Vidare användes en verifierad (vilket betyder att arterna som används för referens-DNA är verifierade av en auktoriserad taxonom) intern databas från NatureMetrics Ltd. Tack vare nya framsteg inom metastreckkodning för groddjur är det möjligt att få träffar på artnivå istället för enbart familje- eller genusnivå. Antalet läsningar per art ger en relativ uppskattning av hur mycket eller litet arten förekommer i ett prov.

Referenser

- Biggs J, Ewald N, Valentini ... Dunn F 2014. Analytical and methodological development for improved surveillance of the Great Crested Newt. Appendix 5. Technical advice note for field and laboratory sampling of great crested newt (*Triturus cristatus*) environmental DNA. Freshwater Habitats Trust, Oxford.
- Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., ... & Kondoh, M. (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.
- NCBI websida <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Sayers, E.W., ..., Karsch-Mizrachi, I. (2020). GenBank. *Nucleic Acids Research*, 48: D84-D86.
- Spens, J., A. R. Evans, ... M. Hellström. 2017. Comparison of capture and storage methods for aqueous microbial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(5), 635-645.

BILAGA 3. KVALITETSSÄKRING AV DNA - KONTROLLER

Positiva och negativa kontrollprov

För tillförlitliga resultat vid eDNA-provtagning är positiva och negativa kontroller nödvändiga för att utesluta kontamineringar eller andra felkällor. Detta gäller alla DNA-undersökningar och innefattar alla utövare. Om en utförare avviker från denna praxis är resultaten inte tillförlitliga och därmed oanvändbara.

Utöver generella huvudprinciper för DNA-undersökningar (Goldberg, m.fl. 2016, Griffiths, m.fl. 2016) finns speciella regelverk för kriminaltekniska (Hedman, m.fl. 2017) och medicinska (SFMG, 2011) undersökningar. Strikta riktlinjer för ett standardiserat utövande av eDNA-undersökningar tas just nu fram inom EU under COST aktionen DNAquaNet.

Negativ kontroll: Ett prov med vatten som inte innehåller DNA filtreras vid inventerade lokaler med samma provtagningsmetodik som vattenproverna. Detta prov kallas för negativ kontroll. Under hela undersökningen från fält till slutsekvensering bör negativa kontroller införas i varje steg av analyserna. De DNA-fria proverna analyseras så att kontaminering kan uteslutas och falska positiva provsvar inte uppkommer. Om DNA-signaler av målarartsgrupperna hittas i en negativ kontroll innebär det att undersökningen måste göras om ifall källan inte kan identifieras och konsekvenserna av kontamineringen fastställas.

Konsekvenserna av en kontaminerad negativ kontroll kan i praktiken innebära att arter som inte finns i en miljö detekteras (falsk positiv).

Positiv kontroll: En positiv kontroll innebär att ett prov som innehåller ett känt DNA testas för att verifiera att den använda metodiken fungerar som den skall. Om DNA-signaler inte hittas i en positiv kontroll innebär det att metodiken måste justeras och analysen eller undersökningen måste göras om.

Konsekvenserna av en positiv kontroll utan DNA-signal kan i praktiken innebära att arter som finns i en miljö inte detekteras (falsk negativ).

Referenser

- Goldberg, Caren S., m.fl. 2016. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*, 7.11: 1299-1307.
- Griffiths Anthony et al. 2016. *An Introduction to Genetic Analysis*. 11th edition. WH Freeman. New York. ISBN-13: 978-1464109485.
- Hedman, Johannes m.fl.. 2017. Pre-PCR processing-projektet, P4 Stärkt beredskapskapacitet via rationell laboratoriediagnostik samt förenklad provberedning. -Nationellt Forensiskt Centrum, NFC 2017-05-07. NFC Rapport Avdelningskansliet 2017:04.
- SFMG, Svensk Förening för Medicinsk Genetik. 2011. Riktlinjer för kvalitetssäkring i klinisk genetisk verksamhet. http://sfmg.se/download/riktlinjer/Kvalitetsriktlinjer/sfmg_riktlinjer-for-kvalitetssakring_rev101228.pdf

BILAGA 4: KVALITETSKONTROLLER SOM REDOVISAS

1. Mängden insamlat/filtrerat vatten dokumenteras för att kunna avgöra hur mycket prov som samlats in totalt. Alla eDNA-mätningar ställs i relation till hur mycket vatten som samlats in.
2. Total eDNA-koncentration för samtliga prov (inkl. negativa) anges. Koncentrationen varierar avsevärt naturligt men ger ändå en första indikation om hur eDNA-extraktionen lyckats.
3. Inhibitionskontroll dokumenteras och redovisas. Inhibition betyder risk för att arter som finns i proverna inte detekteras därför att DNA inhiberas av humus etc. Detta går att åtgärda så länge inhibitionstest utförs. Resultatet av antiinhibering före och efter utförandet redovisas så att resultatens tillförlitlighet kan bedömas.
4. Band på gel efter målinriktad PCR dokumenteras (närvaro/frånvaro) inklusive negativa kontroller. Detta visar att PCR har fungerat och kontroll av vilka prover som har spår av målarter, eller riskerar att vara kontaminerade, kan utföras.
5. Negativa kontroller indelade i a) fält-negativa (filter-negativa) b) extraktions-negativa samt c) PCR-negativa utförs och utfallet redovisas. Detta möjliggör en kontroll av vilka prover som riskerar att vara kontaminerade och vid vilket steg detta i så fall skett.
6. Positiva kontroller (används inte alltid): a) Fält-positiva där ett område känt för artförekomst provtas för kontroll att arten detekteras i fält. b) PCR-positiva för enartsanalyser (gäller qPCR och ddPCR) där DNA från målarten testas. c) Positiv flerartskontroll, där prov från ett artificiellt sammansatt samhälle ("mock community") används som positiv kontroll vid PCR och sekvensering. Falska positiva prover redovisas. De positiva proverna försäkrar att PCR och bioinformatiken fungerar som avsett.
7. För enartsanalyser anges närvaro och frånvaro av arten, för flerartsanalyser anges andel (%) av målarterna i ett givet prov. Detta ger en bild av hur väl sekvenseringen av målarterna lyckats.
8. Andel sekvenser (%) av människa, ko och gris (vildsvin) och bakterier som förekommer som bakgrundssekvenser redovisas. Detta möjliggör en kontroll av att tillräckligt många läsningar täcker målarterna.
9. Minst 12 st. PCR-replikater per art/artgrupp och eDNA-prov utförs. Dessa sammanläs i sekvenseringen. Färre replikater minskar analys säkerheten avsevärt.
10. Antal prover för en specifik MiSeq-körning (sekvensering) överstiger inte 100 stycken exklusive sekvenseringskontroller. Detta säkerställer att antalet läsningar per prov inte ska bli alltför lågt för att kunna detektera ovanligare arter.

BILAGA 5: RESULTAT AV KVALITETSKONTROLLER FÖR FLERARTSANALYSER

Värden för kontrollerna anges i tabell B5-1. DNA var rent och visade hög kvalitet. Alla negativa kontroller var negativa för målarter. De positiva kontrollerna var positiva. Kontaminations-DNA tillhörande människa, som är vanliga i reagenser och vattnet runtomkring oss, togs automatiskt bort från analysen.

MiSeq parvis sekvensering för Miya 12S markören gav sekvenser som godkändes genom kvalitetsfiltren för godkända fiskidentiteter. Detta är en indikation på hög kvalitet på eDNA och slutgiltigt data. Sekvenseringsdata analyserades genom en pipeline som är specialdesignad av NatureMetrics Ltd. Datat testades mot både NCBI och NatureMetrics kurerade referensdatabaser.

Tabell B5-1. Kvalitetsgranskning av eDNA och kontroller. eDNA-koncentrationen uppmättes med *Qubit Fluorometric Quantitation* (Fisher Scientific). Inhiberingskontroll utfördes med qPCR. Band på gel av målarter efter PCR visar att provanalyserna har fungerat, varje PCR kördes i 12 replikat. PCR-negativ innefattar 12 replikat. Filtreerad vattenvolym (H₂O V) anges i liter, eDNA koncentration ng/μl. Inhibering samt anti-inhibering anger om DNA är påverkat av humus. Gel Miya anger om målarterna visade band på gel före sekvenseringen. Kont% anger % av sekvenser från hund och människa som togs bort som naturlig kontaminering.

Provlokal	H ₂ O V (l)	eDNA (ng/ul)	Inhibering	Anti-inhibition	# PCR Miya	Gel Miya	Non target kont% Miya	Antal läsningar
1. Asp_01	3	86	Nej	Nej	12	12/12	4.0%	36 448
2. Asp_02	3	78,2	Nej	Nej	12	12/12	0.6%	46 655
Lab Neg 1	1,0	<0,001	Nej	Nej	12	0/12	100%	-