

eDNA-inventering av Större vattensalamander (*Triturus cristatus*) vid Storsjöns fiskevårdsområde, Sandviken

AquaBiota Rapport 2018:06

Författare: Micaela Hellström, Johan Näslund och Johan Spens



STOCKHOLM, AUGUSTI 2018

Beställare:

Undersökningen är utförd av AquaBiota Solutions för Sveriges Sportfiske- och fiskevårdsförbund i Gävle.

Författare:

Micaela Hellström (micaela.hellstrom@aquabiota.se), Johan Näslund (johan.naslund@aquabiota.se) och Johan Spens

Bilder:

Omslagsbild; Nicklas Wijkmark, övriga bilder; Micaela Hellström

Kontaktinformation:

AquaBiota Solutions AB
Adress: Löjtnantsgatan 25, 115 50 Stockholm
Tel: +46 8 522 302 40
www.aquabiota.se

Kvalitetsgranskad av:

Martin Isaeus (martin.isaeus@aquabiota.se)

Distribution:

Fri

Internetversion:

Nedladdningsbar hos www.aquabiota.se

Citera som:

Hellström, M., Näslund, J. & Spens, J. 2018. eDNA-inventering av Större vattensalamander (*Triturus cristatus*) vid Storsjöns fiskevårdsområde, Sandviken. AquaBiota Rapport 2018:06. ISBN: 978-91-85975-75-4

Ämnesord:

AquaBiota Rapport 2018:06

Projektnummer:

ISBN: 978-91-85975-75-4

© AquaBiota Solutions 2018



INNEHÅLL

Innehåll.....	3
Sammanfattning.....	4
1. Inledning	5
2. Material och metoder.....	7
2.1 Fältarbete.....	7
2.2 Laboratoriearbete.....	8
Resultat och Konklusion.....	9
3.1 Enartsanalys – Större och mindre vattensalamander	9
Referenser	11
Bilaga 1. Enarts- och flerartsanalyser vid eDNA undersökningar.....	12
Bilaga 2. Kvalitetssäkring av eDNA	13
Bilaga 3: Kvalitetskontroller som redovisas vid flerartsanalyser	14
.....	16

SAMMANFATTNING

Akvatiskt miljö-DNA eller eDNA (från engelskans environmental DNA) har under det senaste decenniet visat sig vara ett lovande verktyg för inventering av vattenorganismer för miljöövervakning. Undersökningsmetoden baserar sig på det faktum att alla levande organismer, både växter och djur, kontinuerligt avger genetiska avtryck i miljön i form av slem, avföring, svett och döda celler. Dessa genetiska spår kallas eDNA. Akvatiskt eDNA är spåren som organismer avger i vattenmiljön. eDNA kan utvinnas ur ca en halv liter vatten och genom molekylära analyser ange vilka arter som befinner sig inom ett område utan att man varken ser eller fångar organismen. Eftersom eDNA i vattenmassan är kortlivat ger analyserna en bild av artförekomst i nutid.

I augusti 2017 utförde AquaBiota Solutions AB på uppdrag av Sportfiskarna i Gävle en eDNA-pilotinventering av större vattensalamander (*Triturus cristatus*) samt mindre vattensalamander (*Lissotriton vulgaris*) vid tio provpunkter (bäckar och våtmarker) i närheten av Storsjön, Sandviken. Arterna inventerades genom så kallade enartsanalyser av större och mindre vattensalamander.

Större vattensalamander detekterades inte på provpunkterna medan mindre vattensalamander verifierades med eDNA vid tre av lokalerna. På några lokaler observerades även fisk.

1. INLEDNING

Undersökningsmetoden miljö-DNA eller eDNA (environmental DNA) baserar sig på det faktum att alla levande organismer, -både växter och djur, -kontinuerligt avger genetiska fotavtryck i miljön i form av slem, avföring, respiration, svett och döda celler (Pedersen m.fl. 2015). Definitionen på eDNA anges som; "det DNA som kan studeras från dessa spår i miljön utan att målorganismen är närvarande i provet" (Taberlet m.fl. 2012). I akvatiska miljöer kan detta material utvinnas ur små mängder vatten och genom molekylära analyser ange vilka arter som befinner sig inom ett område, utan att man varken ser eller fångar organismen. Eftersom eDNA i vattenmassan är kortlivat (ca. 1-2 veckor) ger analyserna en bild av artförekomst i nutid. eDNA har visat sig ha en stor potential som verktyg för inventering av vattenorganismer (Bohmann m.fl. 2014, Leese m.fl. 2016, Olds m.fl. 2016, Deiner m.fl. 2017).

I augusti 2017 utförde AquaBiota Solutions AB på uppdrag av Sportfiskarna i Gävle, en eDNA pilot inventering av större vattensalamander (*Triturus cristatus*) samt mindre vattensalamander (*Lissotriton vulgaris*) vid tio provpunkter (bäckar och våtmarker) i närheten av Storsjön vid Sandviken.



Lokal 2. Svarttäman



Lokal 3. Skadängstjärn



Lokal 5. Yttertorp myr, strand



Lokal 8. Mackmyra



Lokal 10. Kolsved

2. MATERIAL OCH METODER

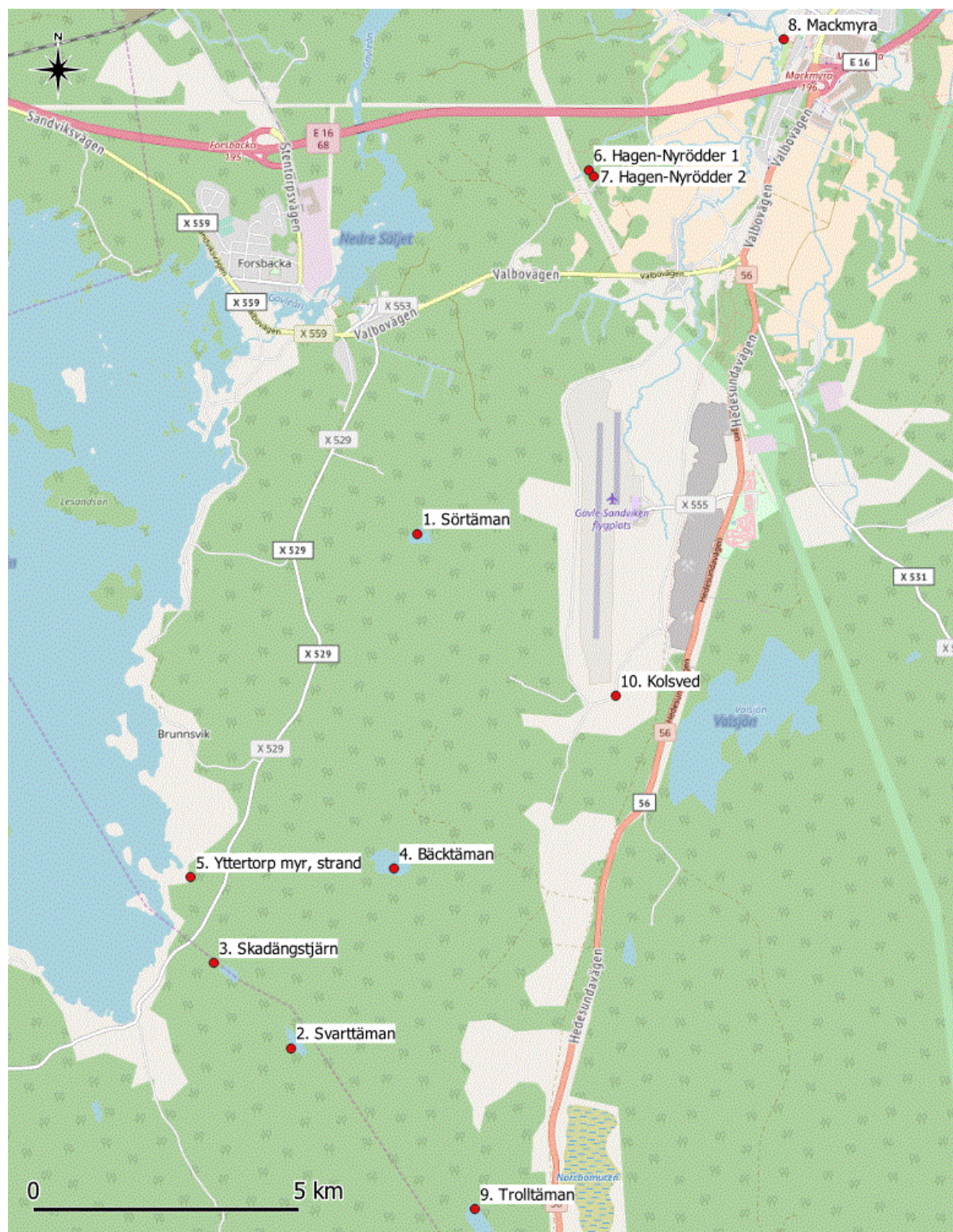
2.1 Fältarbete

Fältarbetet utfördes nära Storsjön i Gävleborgs län. Provtagningspunkter anges i figur 1 och i tabell 1. Koordinaterna anges som decimalgrader i WGS84. Lufttemperaturen mätte 18-20 °C.

Innan provtagningen genomfördes i fält, steriliserades all provtagningsutrustning. Filtreringsutrustning köptes in som sterila DNA-fria engångsförpackningar. För båda lokalerna i sjöar samlades flera liter vatten in i form av 10 stycken underprover 50 ml i vardera riktningen från provpunkten. Proven togs i två replikat. För småvatten samlades 5 underprover in. Negativa fältkontroller utgjordes av rent vatten som filtrerades på plats för att utesluta kontaminering av DNA mellan prover eller från provtagare. Insamling och fixering följde Spens m.fl. (2017).

Tabell 1. Provpunkter. Position, tidpunkt vid provtagningen, vattentemperatur och total volym filtrerat vatten (mL). Samtliga prover samlades in i augusti 2017.

Provpunkt namn	Latitud (N)	Longitud (Ö)	Tid	H ₂ O °C
1. Sörtäman	60,59290	16,92082	12.45	19,5
2. Svarttäman	60,55025	16,89947	12.50	19.5
3. Skadängstjärn	60,55730	16,88647	10.15	17,5
4. Bäcktäman	60,56514	16,91688	14.50	18.7
5. Yttertorp myr, strand	60,56440	16,88256	11.10	12
6. Hagen-Nyrödder 1	60,62303	16,94965	19.00	17.3
7. Hagen-Nyrödder 2	60,62249	16,95045	18.20	17.3
8. Mackmyra	60,63406	16,98245	17.28	13.5
9. Trolltäman	60,53688	16,93052	12.20	19,7
10. Kolsved	60,57947	16,95415	14.45	13.7



Figur 1. Översiktskarta med provpunkterna

2.2 Laboratoriearbete

2.2.1 Extraktion, qPCR och analys

Flödesschemat i bilaga 2 beskriver eDNA-processen från insamling till analys. eDNA utvanns (extraherades) enligt protokoll från Spens m.fl. (2017) i sterila laboratorier speciellt byggda för analyser av akvatiskt eDNA. Detta kunde ske genom ett exklusivt samarbete med MoRe Research i Örnsköldsvik. Extraktionerna utfördes av molekylärbioologiska tekniker som är tränade i att extrahera eDNA. Proverna analyserades med enartsanalyser för förekomst av större och mindre vattensalamander (bilaga 2). Varje qPCR prov utfördes i 12 replikat. Artspecifika markörer på Cyt b genen användes för qPCR. Vidare användes positiva kontroller med DNA extraherat ur vävnad från större och mindre vattensalamander (se bilaga 2).

RESULTAT OCH KONKLUSION

3.1 Enartsanalys – Större och mindre vattensalamander

qPCR med artspecifika markörer detekterade inte större vattensalamander i tagna prover, däremot detekterades mindre vattensalamander på provpunkt 1A vid Sörtäman samt vid de positiva kontrollpunkterna 6 och 7 vid Hagen-Nyrödder. Mindre vattensalamander observerades även med håvprovtagning vid provpunkt 6 och 7. Varje prov testades med 12 qPCR replikat.

Kvalitetskontrollerna samt mängden filtrerat vatten anges i tabell 2 och följer direktiven i bilaga 3. Proverna innehöll stora mängder humus och renades så att DNA inte visade inhibition. Alla negativa kontroller var negativa. De positiva kontrollerna var positiva. Större vattensalamander påträffades inte i något av proverna, medan mindre vattensalamander påträffades i tre av proverna.

Tabell 2. Resultat och kvalitetskontroll. Närvaro/frånvaro av vattensalamander eDNA signaler anges med "+/-" Totala vattenvolymen anges i mL filterat vatten. eDNA koncentrationen anges som total DNA, dvs. allt DNA i provet uppmättes med NanoDrop (Fisher Scientific). Inhiberingskontroll utfördes med qPCR efter ett reningsteg av eDNA.

	Lokal #										Fält neg	LAB NEG	PCR POS	PCR NEG	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10					
Större vattensalamander	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Mindre vattensalamander	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
Volym H ₂ O (mL)	700	900	1020	360	370	390	670	720	455	280	500	500	15	-	-
eDNA total (ng/uL)	48	76	66	155	61	56	95	77	138	61	-	-	36	-	-
Inhibering	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	Nej	-	Nej	-	-
Antal PCR replikat per markör	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12
Antal PCR replikat per markör	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12	12

För framtida undersökningar föreslås flerartsanalyser eftersom de ger en tydligare bild av vilka andra arter av groddjur som är närvarande och möjliggör även en parallell analys av fisksamhället och kan därför hjälpa till och förklara resultaten ekologiskt.

Laboratoriesvaren var positiva/negativa med stor säkerhet då alla negativa kontroller var negativa och även de punkter i fält med kända populationer av mindre vattensalamander detekterades som avsett med metodiken. Inget av resultaten visade osäker utgång. Metodiken för fältprovtagning var lämplig då den fungerade som avsett.

TACK

Tack till Nicklas Wijkmark för omslagsbilden samt Pähr Hellström för arbete med insamling av prover.

REFERENSER

- Bohmann, K., A. Evans, M. T. P. Gilbert, G. R. Carvalho, S. Creer, M. Knapp, D. W. Yu, och M. de Bruyn. 2014. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution* 29:358 – 367.
- 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.
- Hellström, M & Spens, J.** 2017. eDNA - Fiskförekomst i 10 kustmynnande vattendrag, Norrbottens län AquaBiota Rapport 2017:10. 30 sid. ISBN: 978-91-85975-67-9
- Kelly, R.P., Port, J.A., Yamahara, K.M. och L.B. Crowder. 2014. Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm. *PloS One* 9 (1): e86175
- 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.
- 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.
- 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
- Spens, J.**, A. R. Evans, D. Halfmaerten, S. W. Knudsen, M. E. Sengupta, S. S. T. Mak, E. E. Sigsgaard, och **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
- Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology* 21, 1789-1793

Författarnamn i **fet stil** anger medarbetare på AquaBiota

Bilaga 1. Enarts- och flerartsanalyser vid eDNA undersökningar

Varje levande art utsöndrar genetisk arvs massa eller DNA i sin omgivning genom respiration, rörelser, filtrering, avföring, döda hudceller osv. Detta DNA som lämnas kvar i miljön utan att individen i sig provtas kallas miljödDNA eller eDNA (från engelskans environmental DNA).

Vissa delar av en arts DNA är helt unikt för just den arten, medan andra delar av DNA ser likadant ut hos alla organismer i en grupp. Med hjälp av jättelika databaser över DNA-sekvenser, som är öppet tillgängliga för alla (ex <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), kan man välja ut en liten bit DNA som man kan kopiera industriellt. Dessa små bitar kallas primers. Eftersom primern är artspecifik fastnar den enbart på DNA för den valda arten. Resultatet, dvs en liten bit av DNA som primern kopierar kallas barcode (streckkod), och kan liknas vid den streckkod som används för att betala för just den enskilda varan i affärer. Dessa primers, en droppe eDNA, ett enzym och salter blandas i ett provrör. Provröret placeras i en maskin som gör DNA kopior för just den arten. Detta kallas för PCR (Polymerase Chain Reaction) och bygger på hur levande celler kopierar sin arvs massa vid celledelning.

Enartsstudier qPCR eller ddPCR

Inventering av förekomst av en enstaka art med eDNA görs med så kallad qPCR. Frågeställningen för dessa studier är: **Finns art X här?** Varje art analyseras med en markör som är specifik för precis den arten. Provs varen anger närvaro/frånvaro av just den arten och en relativ eDNA-abundans mellan olika provtagningslokaler. Minst 12 qPCR replikat skall analyseras för att ge tillförlitliga resultat.

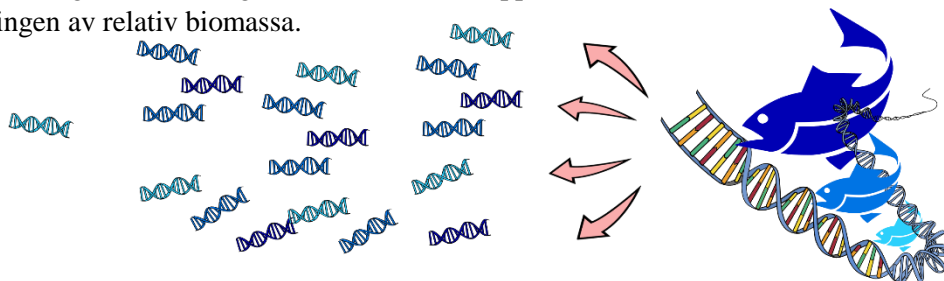
Om flera arter undersöks med enartsanalyser kan data över relativa abundanser mellan art A och art B inte jämföras med varandra eftersom markörerna för varje art skiljer sig markant från varandra. Som exempel kan nämnas att 1000 DNA kopior av gädda inte motsvarar 1000 kopior av abborre och analyserna kan inte tillförlitligt svara på vilken av arterna som är mest förekommande.

Flerartsstudier –Metastreckkodning genom NGS (Next Generation Sequencing)

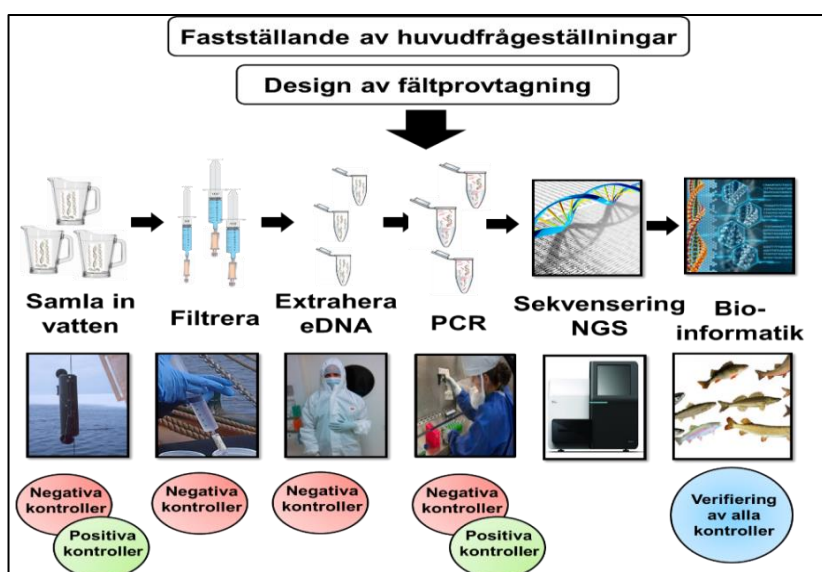
Frågeställningen för flerartsstudier är; **Vilka arter finns här och vilka av dessa är vanliga eller sällsynta?** Med andra ord behöver man inte på förhand veta vad man letar efter.

Metastreckkodning eller metabarcoding innebär att man designar en primer som är gemensam för alla arter inom en grupp – indelade exempelvis med fokus på fisk, fokus på groddjur eller fokus på musslor. Eftersom man analyserar flera olika arter på en gång kallas metoden metastreckkodning. Anledningen till att man inte kan analysera alla djurgrupper samtidigt med en primer är det inte finns lämpliga målregioner i genomen som både är gemensamma för alla arter men samtidigt varierar så pass mycket att enskilda arter kan identifieras.

Invasiva eller skygga arter kan identifieras och antalet arter som kommer upp i en analys är obegränsat. Om man inventerar 3 eller fler arter är denna metod att föredra, och blir snabbt mer kostnadseffektiv än enartsanalyser. Flerartsanalyser visar även vilka arter man har fått och vilket dominansförhållande dessa har till varandra i ett vattendrag. Med andra ord kan den relativa biomassan räknas ut. Notera dock att under parningstiden förekommer DNA av de arter som förökar sig i större mängder då köns celler släpps ut i vattnet, vilket kan interferera med bestämningen av relativ biomassa.



Bilaga 2. Kvalitetssäkring av eDNA



Därför är kontrollprover nödvändiga vid eDNA-provtagning

En undersökning med hjälp av eDNA som saknar positiva och negativa kontroller kan inte ge tillförlitliga resultat. Detta gäller egentligen för 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 (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 med utgångspunkt från Goldberg m.fl. (2016). Dessa regler kommer att kräva negativa och positiva kontroller som ett grundläggande krav.

Negativ kontroll; Ett prov med vatten som inte innehåller DNA filtreras vid inventerade lokaler med samma provtagningsmetodik. Detta prov kallas för negativ kontroll. Vidare analyseras DNA-fria prover i olika steg av undersökningen så att man kan försäkra sig om att kontaminering inte förekommer i fält eller laboratorium och orsakar falska positiva provsvar. Om DNA-signaler hittas i en negativ kontroll innebär det att undersökningen måste göras om.

Konsekvenserna av en kontaminerad negativ kontroll kan i praktiken innebära att:

- | | |
|---|--|
| a) en frisk person får en cancerdiagnos | b) fel person binds till ett brott |
| c) faderskapstest anger fel far till ett barn | d) arter som inte finns i ett område 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:

- | | |
|---|--|
| a) en cancersjuk person blir inte diagnostiserad och dör | b) en skyldig person kan inte bindas till brottet |
| c) ett faderskapstest kan inte knyta rätt far till barnet | d) arter som finns i ett område detekteras ej (falsk negativ) |

Bilaga 3: Kvalitetskontroller som redovisas vid enartsanalyser

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 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 vara kontaminerade och vid vilket steg detta i så fall skett.*
6. Minst 12 PCR replikat per art/artgrupp och eDNA prov utförs. Maximalt 4 av dessa sammanslås i sekvenseringen. *Färre replikat minskar analyssäkerheten avsevärt.*



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://sfmtg.se/download/riktlinjer/Kvalitetsriktlinjer/sfmtg_riktlinjer-for-kvalitetssakring_rev101228.pdf

www.aquabiota.se