

# eDNA-Vombsjön 2020



AquaBiota Report 2021:03

Författare: Martin Andersson-Li

AquaBiota Water Research

STOCKHOLM, 03-2021

**Beställare:**

Kävlingeåns vattenvårdsförbund 2021 utförd av AquaBiota Water Research.

**Kontaktinformation:**

AquaBiota Water Research  
Adress: Sveavägen 159, 113 46 Stockholm  
Tel: +46 8 522 302 40  
Mail: [info@aquabiota.se](mailto:info@aquabiota.se)  
[www.aquabiota.se](http://www.aquabiota.se)

Distribution: Fri

**Internetversion:**

Nedladdningsbar hos [www.aquabiota.se](http://www.aquabiota.se)

**Citera som:**

Ämnesord: Vombsjön, primer, eDNA.

AquaBiota Report 2021:03  
Projektnummer: 2020006  
ISBN: 978-91-89085-18-3  
ISSN: 1654-7225

© AquaBiota Water Research 2021



# INNEHÅLL

Innehåll.....	3
Sammanfattning.....	4
1. Inledning .....	5
2. Material och Metoder .....	5
3. Resultat och diskussion .....	8
Referenser .....	13

## SAMMANFATTNING

eDNA (environmental DNA) har under det senaste decenniet visat sig vara ett lovande verktyg för inventering av vattenorganismer inom miljöövervakning och andra miljöundersökningar. 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 små mängder vatten och genom molekylära analyser ange vilka arter som befinner sig inom ett område utan att man vare sig ser eller fångar organismen. Eftersom eDNA i vattenmassan är kortlivat ger analyserna en bild av artförekomst i nutid.

AquaBiota har på uppdrag av Kävlingeåns vattenråd organiserat eDNA-undersökningen av Vombsjöns fiskefauna. Fältprovtagning genomfördes av beställaren den 14 december 2020. Totalt detekterades 13 arter, 12 fiskarter och 1 rundmun.

eDNA resultaten påvisar att gärs, mört och abborre dominerade fisksamhället i Vombsjön. Ål påträffades i 8 av de 9 proverna som sekvenserades i sjön, vilket visar på en allmän förekomst och vikten av Vombsjön ur bevarande synpunkt för den akut hotade ålen (rödlistan 2020). Provtagningen identifierade flera arter som inte inrapporterats för sjön de senaste 25 åren (artfakta), inklusive id, storspigg och småspigg.

# 1. INLEDNING

Undersökningsmetoden miljö-DNA eller eDNA 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 påvisa vilka arter som befinner sig inom ett område, utan att man vare sig ser eller fångar organismen. Eftersom eDNA i vattenmassan är kortlivat (ca. 2 dagar till 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) och har en stor fördel vid inventering av skyddsvärda arter i och med att det är en icke-destruktiv metod till skillnad från exempelvis provfisken.

AquaBiota har på uppdrag av Kävlingeåns vattenråd organiserat eDNA-undersökningen av Vombsjöns fiskefauna. Fältprovtagning genomfördes av beställaren den 14 december 2020. Rapporten sammanställer resultaten av eDNA-undersökningen från Vombsjön, diskuterar resultaten samt ger rekommendationer för framtida undersökningar.

## 2. MATERIAL OCH METODER

### 2.2.1 EXTRAKTION, PCR & SEKVENSERING

eDNA utvanns (extraherades) enligt protokoll från Spens m.fl. (2017) i sterila laboratorier speciellt byggda för analyser av akvatiskt eDNA. Extraktionerna utfördes av molekylärbiologiska tekniker som är tränade i att extrahera eDNA. Proverna analyserades med flerartsanalyser för förekomst av fisk. För detta användes MiFish primern (kallas ofta markör i svenska texter) som amplifierar 12S rRNA regionen. Vidare användes en positiv DNA-kontroll med känd artsammansättning som standard för jämförelse, samt negativa kontroller.

Illumina MiSeq teknologi användes för sekvenseringen. Tekniken läser DNA-sekvensen från två riktningar om cirka 250-300 DNA-baspar vardera, dessa sekvenser läggs sedan ihop bioinformatiskt genom att studera överlappen mellan de två sekvenserna. Detta resulterar normalt i sekvenser som är cirka 500 baspar långa. Inom denna provtagning analyserades drygt 530,000 hög kvalitativa sekvenser som tillsammans bestod av cirka 265 miljoner baspar ( $500 \cdot 530,000 = 2,650,000,00$ ).

DNA extraktion genomfördes av [MoRe research](#) (tabell 1), laboratorier preparation och bioinformatikssammanställning av [Nature Metrics](#).

NM ID	Kit ID	Sample ID	Volume filtered	Date arrived	DNA (ng/μl)	Index (ng/μl)
9415	7776010017000040777	84_1 (Vomb_1)	2000	27-Jan-21	14.9	17.5
9416	7776010017000041777	84_2 (Vomb_2)	2000	27-Jan-21	16.8	16
9417	7776010017000042777	84_3 (Vomb_3)	2000	27-Jan-21	19.5	11.1
9418	7776010017000043777	84_4 (LabNeg)	NA	27-Jan-21	< 0.1	3.7
9419	7776010017000044777	84_5 (Vomb_4)	2000	27-Jan-21	15.7	18.2
9420	7776010017000045777	84_6 (Vomb_5)	2000	27-Jan-21	43	12.7
9421	7776010017000046777	84_7 (Vomb_6)	2000	27-Jan-21	21.4	16.8
9422	7776010017000047777	84_8 (Vomb_7)	2000	27-Jan-21	21.8	15.9
9423	7776010017000048777	84_9 (Vomb_8)	2000	27-Jan-21	21.2	20.6
9424	7776010017000049777	84_10 (Vomb_9)	2000	27-Jan-21	26.2	17.1
9425	7776010017000050777	84_11 (Vomb_10)	2000	27-Jan-21	26	15
9426	7776010017000051777	84_12 (Vomb_12)	2000	27-Jan-21	< 0.1	7.42

**Tabel 1.** Sammanställning av DNA-extraktions protokollet urtagen från Nature Metrics analysrapport av Vombsjön.

## 2.2.2. BIOINFORMATIK OCH VERIFIERING

Arter har unika streckkoder eller sekvenser som ger arter en molekylär identitet. I detta fall användes mitokondriellt DNA från en hypervariabel del av 12s rRNA genen. 12s rRNA genen (eller motsvarande) förekommer hos alla organismer då denna gen är nödvändig för framställningen av ribosomer. Ribosomer producerar i sin tur proteinerna som är en förutsättning för liv. De olika 12sRNA sekvenserna kördes mot 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 mer än 400 000 kända arter finns tillgängliga (Benson m.fl. 2018). De olika sekvenserna matchad mot databasen och resulterar i en lista över förekommande arter.

Arter bestämdes automatiskt i de fall där sekvensen matchade en referenssekvens med över 99% träffsäkerhet. I fall där sekvensen fick identisk matchning mot flera referenssekvenser användes i första hand GBIF-databasen, därefter analysportalen och artefakta för att rimlighetsbedöma vilken referenssekvens som var den troligaste kandidaten. Arter (ibland kallat OTU, operational taxonomic unit) med mindre än 10 sekvenser eller med en sekvensandel <0.05% uteslöts från analysen, då dessa lätt uppstår till följd av felläsningar under sekvenseringen.

Antalet läsningar per art ger en relativ uppskattning av artens förekomst. Det är dock inte möjligt att få fram exakt biomassa utifrån antalet sekvenser, b.l.a. till följd av att arter släpper ifrån sig olika mängd DNA. Studier som jämfört simultana [fiskefångster med eDNA-resultat](#) påvisar dock en hög korrelation mellan sekvens och fångstdata.

### 3. RESULTAT OCH DISKUSSION

Totalt hittades 13 arter i Vombsjön, 12 fiskarter och 1 rundmun (nejonöga). Arterna som påträffades anges närmare i kartan och bubbeldiagrammet (figur 1, figur 2). Av de tio prover som togs i fält kunde nio sekvenseras och artbedömmas.

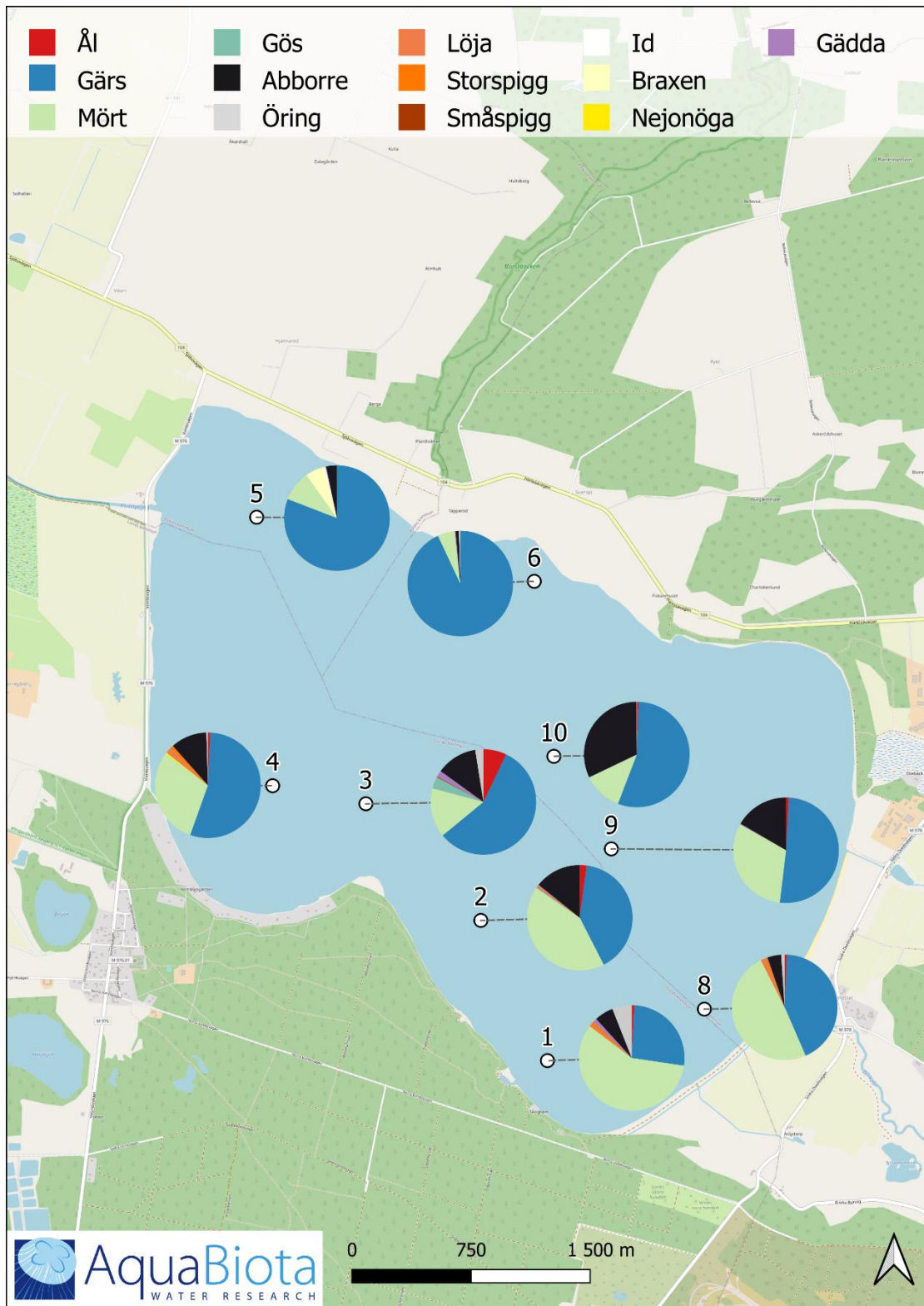
Antal arter per prov var i genomsnitt  $7,2 \pm 1.4$ . Gärs var med god marginal den vanligast förekommande med 58.1% av alla sekvenser, följt av mört (25.5%), abborre (10.8%) och ål (1.7%) (figur 3). Gärs var den mest abundanta arten i 6 av de 9 proverna och var särskilt dominerande vid sjöns nordvästra sida där den utgjorde över 80% sekvenserna. I de södra och sydöstra delarna utgjorde mört och abborre en betydande del av DNA-sammansättningen. Mört, abborre och gärs förekom i samtliga eDNA-prover (figur 4). Ål och gädda förekom i lägre koncentrationer i 8 av 9 respektive 7 av 9 prover och hade en förhållandevis homogen distribution över sjön. Den allmänna förekomsten av ål i Vombsjön påvisar lokalens betydelse ur bevarande synpunkt för den akut hotade ålen (rödlistan 2020).

Arter som inte direkt kunde identifieras till art var id och nejonöga. Id sekvensen hade en identisk matchning mot även stäm, stäm har dock inte observerats i södra Sverige medan id har inrapporterats i Kävlingeån så sent som 2019. Sekvenserna bestämdes därmed som id. Sekvenserna från släktet nejonögon valde vi att inte artbestämma. Enligt inrapporterade data så rör det sig mycket sannolikt om bäcknejonöga. Bäcknejonöga och flodnejonöga är dock genetiskt extremt närbesläktade och det råder delade meningar om huruvida dessa borde beskrivas som skilda arter. Arterna id, storspigg, småspigg och braxen detekterades i sjön och dessa saknar inrapportering i Vombsjön från den senaste 25 årsperioden (de har dock påträffats i närliggande vattendrag enligt artefakta). Huruvida detta beror på bristande inrapportering eller att det för sjön är mycket sällsynta observationer är för oss okänt. Vi kan dock konstatera att framför allt id, småspigg och storspigg hade mycket låg signalstyrka (<0.1% av sekvenserna) och förekom bara i enstaka prover (1-3) vilket antyder att förekomsten i Vombsjön är begränsad.

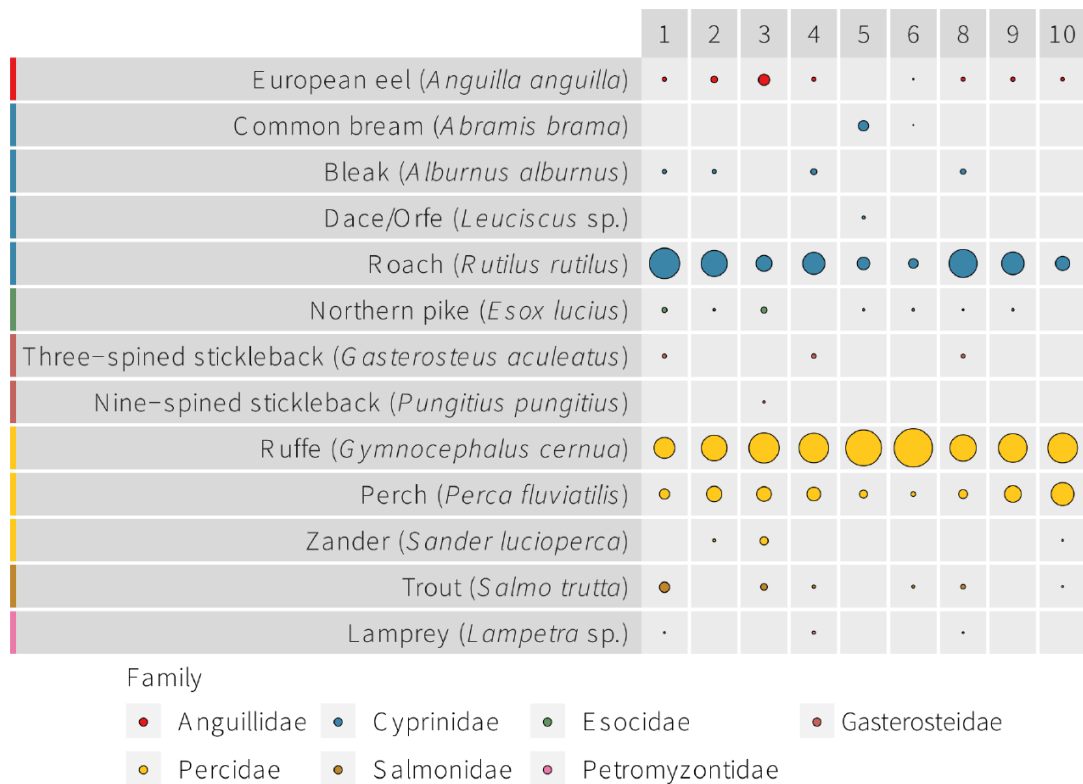
Frågan lyftes även om ytterligare karpfiskar som observerats i sjön men som inte detekterats av eDNA-proverna (karp, björkna, sarv och sutare). Det är svårt att säga med säkerhet vad som är orsaken men det finns flera möjliga förklaringar. Studier som jämfört [nätfiske mot eDNA-resultat](#) har visat att eDNA ibland missar arter som förekommer i nätfiske, men också att nätfiske missar betydligt fler arter som påvisas av eDNA. Fördelning av prover i djupled och tid har också en markant inverkan på artobservationer via eDNA. Exempelvis är det tänkbart att sutare aggregera när botten och är inaktiva under vintern vilket skulle kunna göra dem svåra detektera, särskilt via ytprover. Ovan nämnda arter har alla återfunnits av AquaBiota vid tidigare eDNA-inventeringar så rent tekniskt vet vi att metoden fungerar för dem. Om man fångar arter som eDNA-metodiken missat, och tror att dessa har förekommit i lokalen vid provtagningstillfället, kan man ta ett vävnadsprov och sända in den tillsammans med eDNA-proven i framtida undersökningar. Detta kommer då ge ett definitivt svar på individens genetiska tillhörighet och om dess sekvenser förekommer i vattenproverna.

Analys av observerad biodiversitet i förhållande till antalet prover (rarefaction curve) visar att antalet prover var tillräckligt och att effekten av att ta ytterligare prover med motsvarande metodik vid motsvarande tidpunkt skulle vara begränsad (figur 5). Redan vid fyra prover upptäcktes i genomsnitt 11.4 arter och endast arter som förekom i mycket låg signalstyrka missades. I syfte att reducera kostnaden för framtida provtagningar skulle det då vara möjligt att ta färre prover. En försiktig reduktion vore att gå ner till 8 prover men som nämnt skall även 4 prover relativt väl beskriva artsammansättningen. Övervägning av fördelning av prover i djupled är dock värt att beakta, särskilt om proverna tas under sommaren då temperaturskiktningen har en stark påverkan på struktureringen av eDNA i sjöar.

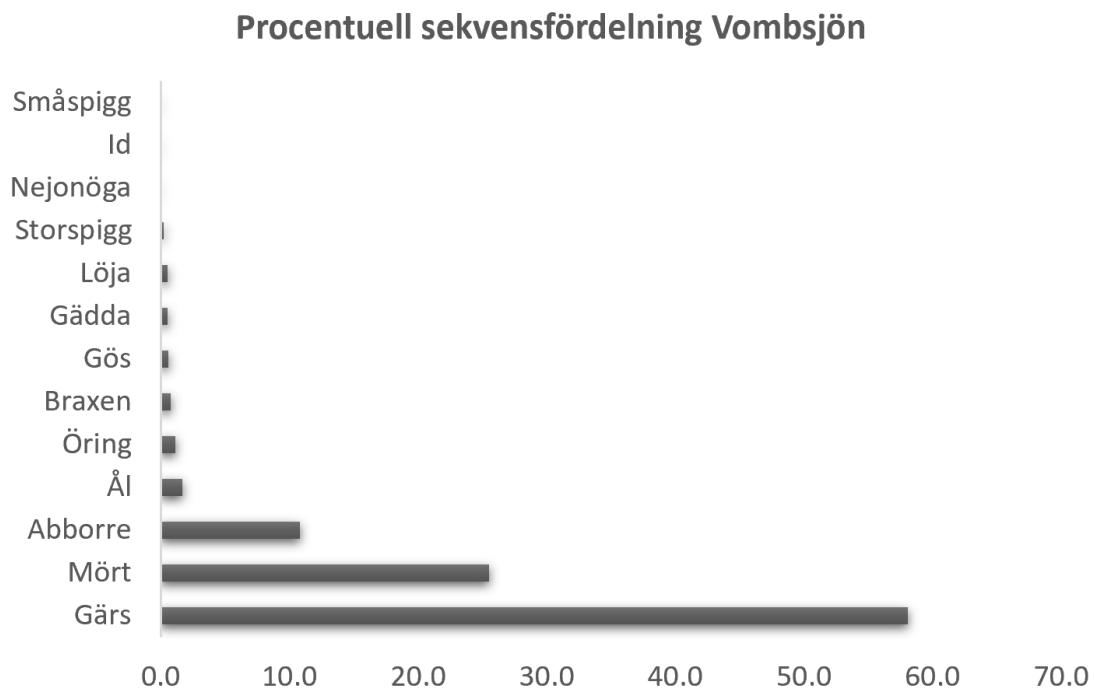




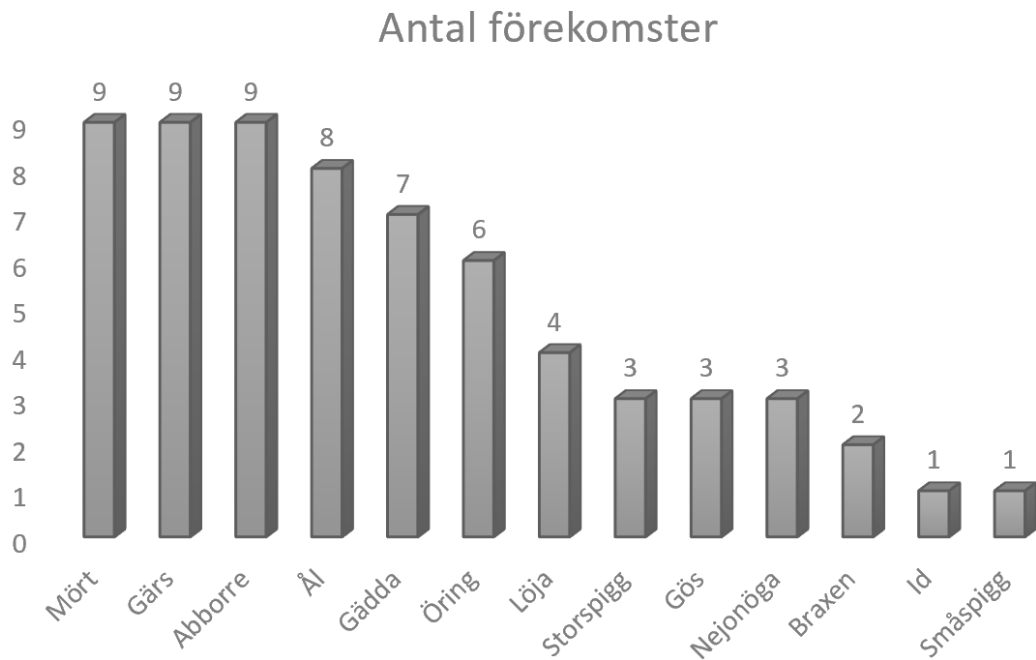
**Figur 1.** eDNA-karta Vombsjön. Vanligaste förekommande arter i fallande ordning: Gärs (58.1%), Mört (25.5%), Abborre (10.8) och Ål (1.7%). Gärs dominerad i proverna från sjöns nordvästra sida medan de södra proverna hade större inslag av mört och abborre. Zooma in för att tydligare se arter med låg frekvensandel. Bakgrundskarta: © OpenStreetMap.



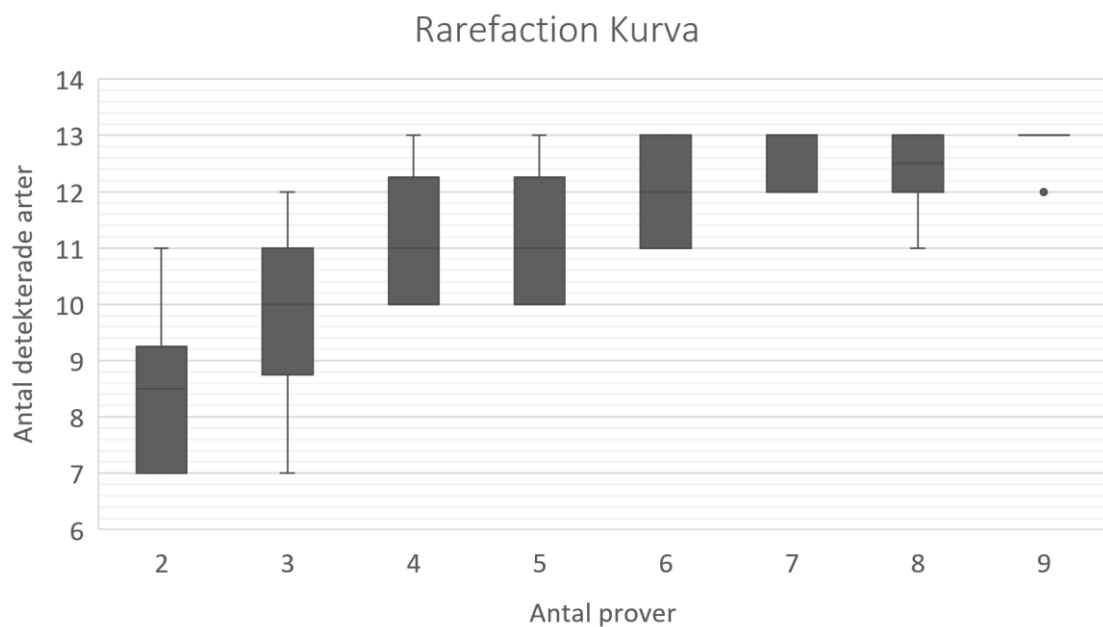
**Figur 2.** Sammanställning av sekvensfördelningen mellan prover utdragen från Nature Metrics analysrapport från Vombsjön. Storleken på bubblan visar andel sekvenser i relation till det totala antalet sekvenser i vardera prov. Färgerna indikerar familjetillhörighet. Arter på svenska uppifrån: ål, braxen, löja, id, mört, gädda, storspigg, gärs, abborre, gös, örring och nejonögon.



**Figur 3.** Procentuell sekvensfördelning i Vombsjön.



**Figur 4.** Antal förekomster per art. Nio prover sekvenserades. Mört, gärs och abborre förekom i samtliga prover.



**Figur 5.** Antalet arter som i genomsnitt detekteras när en bestämd mängd prover slumpas ut. För varje kategori (antal) slumpades ett urval av prover fram tio gånger. Exempel: när två prover slumpades ut återfanns i genomsnitt  $8.5 \pm 1.8$  fiskarter. När nio prover slumpades ut återfanns i genomsnitt  $12.9 \pm 0.31$  fiskarter. Alla tio prover inkluderades i analysen.

## REFERENSER

- Benson, D. A., Cavanaugh, M., Clark, K., Karsch-Mizrachi, I., Ostell, J., Pruitt, K. D., & Sayers, E. W. (2018). GenBank. *Nucleic acids research*, 46(D1), D41-D47.
- 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.
- 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.
- Näslund, J., Didrikas, T., Hellström P., & Hellström M. AquaBiota Rapport 2019:15 Inventering av fisk vid Gåsefjärden I Karlskrona skärgård med nätprovfiske och eDNA
- 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
- Rödlistan 2020, <https://www.artdatabanken.se/globalassets/ew/subw/artd/2.-varverksamhet/publikationer/31.-rodlista-2020/rodlista-2020>
- 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

[www.aquabiota.se](http://www.aquabiota.se)