Bilaga 3

NATURHISTORISKA RIKSMUSEET • FORSKAR, BEVARAR OCH FÖRKLARAR • NRM.SE

eDNA-detektering av fisk

Diarienummer NRM 712-2025

NATURHISTORISKA
RIKSMUSEET

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 Ekologigruppen att med hjälp av eDNA (environmental DNA) detektera vilka arter av fisk som finns i 10 vattenprov.

Material och metoder

Proverna togs av Ekologigruppen med provtagningsmaterial från CGI. DNA från vatten fångades med ett Sylphium filter med porstorlek 0.8 µm. Efter filtrering tillsattes ATL-buffer och proverna skickades till Naturhistoriska för fortsatt analys.

Molekylära metoder

Proteinas K tillsattes till filter med ATL-buffer och proverna inkuberades vid 56° i minst 4 timmar. DNA-extraktion utfördes därefter med en Kingfisher extraktionsrobot (model Duo prime eller Flex) och ett "Omega MagBind Blood and Tissue" DNA-extraktionskit enligt beskrivning från tillverkaren. För analyserna amplifierades två olika bitar av mitokondrien - 12S (Miya et al. 2015) och 16S (Wang et al. 2023) med primers (se Tabell 1) med PCR-reaktioner som optimerats för flerartsanalys med sekvensering.

Tabell 1: Sekvenser för de primers som använts för detektion av eDNA. Temperatur är annealingtemperatur i PCR-reaktionerna.

Typ av analys	Primer F	Primer R	Temperatur
Fisk (12S)*	AAACTCGTGCCAGCCACC	GGGTATCTAATCCCAGTTTG	65
Vertebrate (16S)†	ACGAGAAGACCCYRYGRARCTT	TCTHRRRANAGGATTGCGCTGTTA	65-60

* Miya et al. 2015
† Wang et al. 2023

Bioinformatiska analysmetoder

Från rådata trimmades primersekvenser bort med hjälp av programmet cutadapt (Martin 2011) och kvarvarande data analyserades med R-paketet dada2 (Callahan et al. 2016). Dada2 använder sekvensdata från prover för att identifiera unika sekvenser av biologiskt ursprung och hur många gånger dessa hittas i vardera prov. Kvarvarande sekvensvarianter spårades till art genom att med hjälp av verktyget BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul et al. 1990) jämföra sekvenserna mot NCBIs öppna nukleotiddatabas (Nucleotide collection). Vår sökning utfördes januari 2026. Träffar med en identifikation på lägre än 95% exkluderades direkt.

Resultat

PCR-reaktioner genererade rena amplifieringar av förväntad storlek i alla tre replikat för vissa prover och bedömdes därmed lämpliga för att skapa sekvenseringsbibliotek. Biblioteken skapades av CGI och sekvenserades av BMKGene på ett NovaSeq-instrument (PE150). Prover K50, K54 och K81 gav inga synliga amplifieringar och bedömdes olämpliga för sekvensering.

Fauna

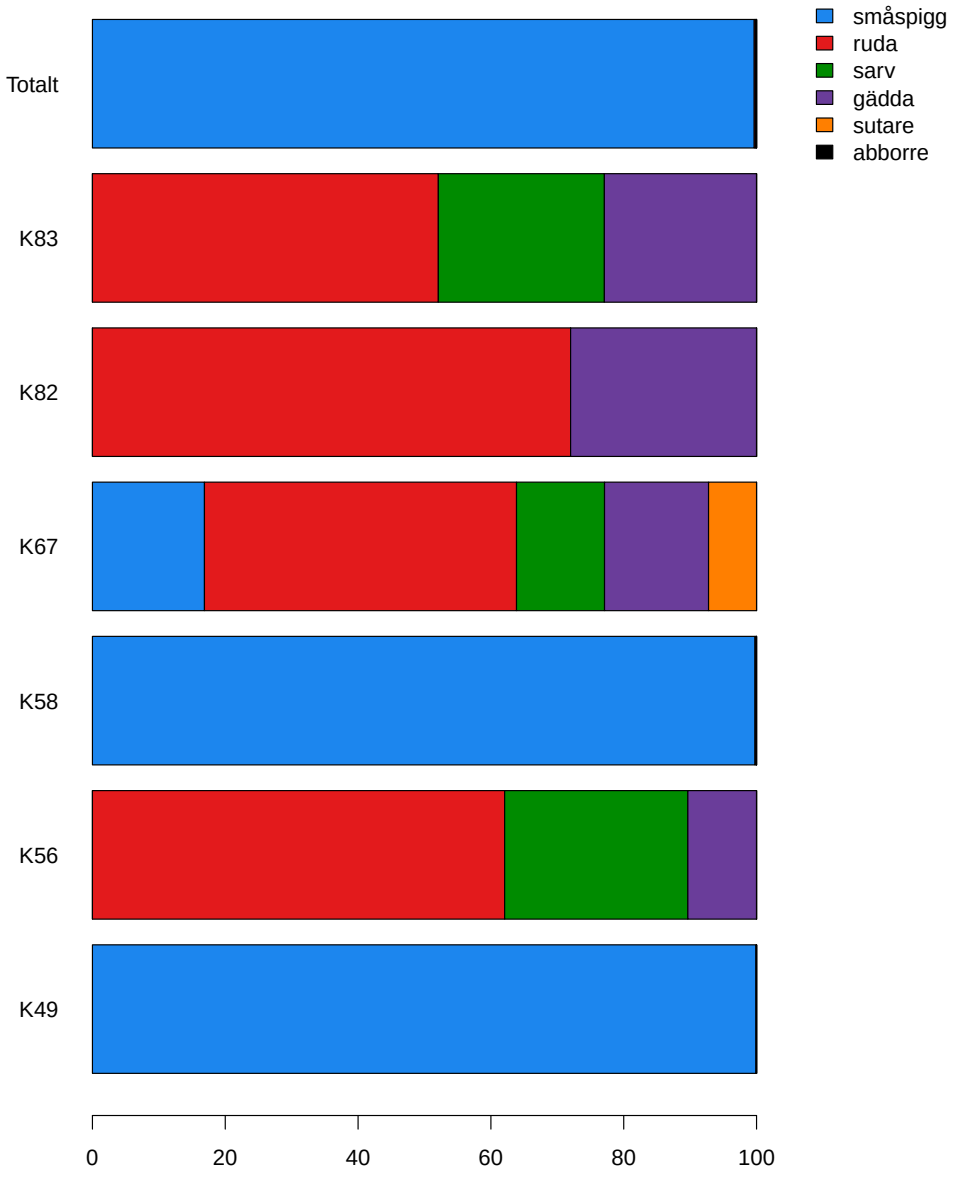
Det totala antalet fragment efter sekvensering av proverna var 24,5 miljoner,

Av dessa sekvenser var det ~71% som innehöll primers för 12S-fragmentet och var av tillräckligt god kvalitet för att bibehållas i analysen. Av dessa tillhörde ~0% av sekvenserna fisk. Baserat på detta bedöms samtliga prover ha misslyckats vid användning av 12S-primern.

För 16S innehöll cirka 71% av sekvenserna förväntade primers och var av tillräckligt god kvalitet för att bibehållas i analysen. Av dessa tillhörde ~1% av sekvenserna fisk. Fiskarna tillhörde 6 olika arter (se tabell 2 samt se figur 1 och 2 för relativa andelar sekvenser från varje art i varje prov) där de vanligaste arten stod för över 99 % av fisksekvenserna (se figur 1). Övriga sekvenser var av låg kvalitet eller var spår av andra organismer. Inga fisksekvenser kunde påvisas i prov K20, vilket indikerar att provet har misslyckats.

Tabell 2: Tabell över latinska och svenska namn på de arter av fisk som identifierats i proverna. Om sekvenser ej kunde bestämmas till exakt art anges i dessa fall 'sp.' eller vilka två arter det kan handla om.

Latin	Svenska
Pungitius pungitius	småspigg
Carassius carassius	ruda
Scardinius erythrophthalmus	sarv
Esox lucius	gädda
Tinca tinca	sutare
Perca fluviatilis	abborre



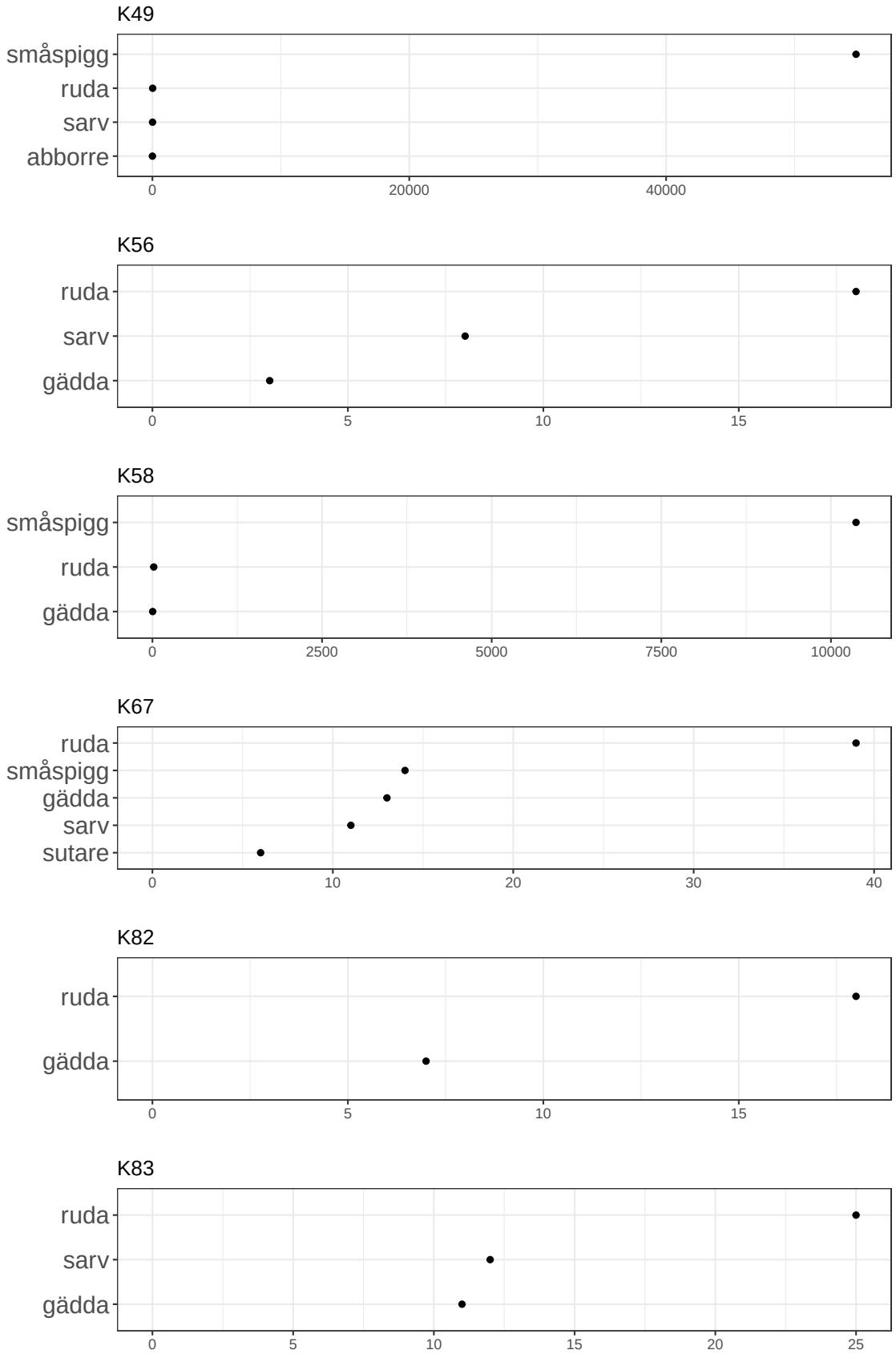
Figur 1: Fördelning i procent av antal sekvenser från olika arter av fisk i proverna detekterade med 16S-fragmentet.

Sammanfattning

Undersökning med eDNA på 10 vattenprover har identifierat sekvenser från 6 olika arter av fisk. Vår bedömning är att de detekterade arterna med stor sannolikhet finns närvarande i proverna, men eDNA är indirekta spår vilket innebär att spår inte nödvändigtvis kommer från individer som lever på provtagen lokal. Vidare innebär ett negativt resultat (alltså arter som inte detekterades) inte nödvändigtvis att dessa arter är frånvarande. Vi vill även påpeka att DNA rör sig med vatten och att en eventuell lokal uppströms kan påverka vilka arter som detekteras vid en lokal nedströms. Detta kan vara värt att ha i åtanke vid tolkning av inventeringsresultat från eDNA.

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 mailets 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.



Figur 2: Antal sekvenser från varje art av fisk i proverna detekterade med 16S-fragmentet.

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.

Wang, Z, X Liu, D Liang, Q Wang, L Zhang, and P Zhang. 2023. “VertU: Universal Multilocus Primer Sets for eDNA Metabarcoding of Vertebrate Diversity, Evaluated by Both Artificial and Natural Cases.” *Frontiers in Ecology and Evolution* 11 (1164206).