Amfibieinventering via eDNA–Villmanstrand 2021

AquaBiota Report 2021:012

Författare: Martin Andersson-Li

AquaBiota Water Research

AquaBiota

STOCKHOLM, 09-2021

Beställare:
EnviroPlanning AB, uppdrag utfört av AquaBiota Water Research AB.

Kontaktinformation:
AquaBiota Water Research
Adress: Sveavägen 159, 113 46 Stockholm
Tel: +46 8 522 302 40
Mail: info@aquabiota.se
www.aquabiota.se

Distribution: Fri

Internetversion:
Nedladdningsbar hos www.aquabiota.se

Ämnesord: Villmanstrand, primer, eDNA, metabarcoding, PCR, OTU.

AquaBiota Report 2021:03
Projektnummer: 2021012
ISBN: 978-91-89085-35-0
ISSN: 1654-7225

© AquaBiota Water Research 2021

INNEHÅLL

Innehåll....4
Sammanfattning....5
1. Inledning....6
2. Material och Metoder....7
2.1 Extraktion, PCR & sekvensering....7
2.2 Bioinformatik och verifiering....7
2.3 Inventering....8
3. Resultat och diskussion....9
4. Referenser....15

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 närtid.

AquaBiota har på uppdrag av Enviroplanning organiserat eDNA-undersökningen av amfibiefaunan i Villmanstrand. Fältprovtagning genomfördes av projektansvarige den 26:e maj 2021. Totalt detekterades fyra arter av amfibier, vanlig groda, åkergroda, vanlig padda och mindre vattensalamander. Vanlig groda var vanligaste förekommande med drygt 63% av sekvenserna från groddjur. Vanlig groda och mindre vattensalamander förekom i samtliga fältprover och påvisar att de förekommer allmänt inom områdets våtmarker och diken. Vanlig groda hade en mycket stark signal i proverna från det norra diket och mindre vattensalamander uppvisa en tydlig signal i de två södra våtmarkerna.

Utöver groddjur detekterades även 32 ytterligare arter från däggdjur, fisk och fågel.

1. INLEDNING EDNA

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 ögonblicksbild av artförekomsten.

Den första eDNA-studien genomfördes 2008 på amerikansk oxgroda och påvisade potentialen av att använda arters genetiska fotavtryck för att observera deras utbredning (Ficetola m.fl. 2008). eDNA har sedan dess vuxit till ett väletablerat forskningsområde och metodiken har implementerats inom ett stort spann av organismer och miljöer (Hering m.fl. 2016). Det sannolikt vanligaste användningen av eDNA är inventering av vattenorganismer där eDNA återkommande påvisat starka resultat i form av hög detektionsförmåga och specificitet (Bohmann m.fl. 2014, Miya et al. 2015, Leese m.fl. 2016, Olds m.fl. 2016. Deiner m.fl. 2017). Styrkor hos eDNA-tekniken är exempelvis dess förmåga att effektivt screena regioner, att varierande organismer och habitat kan inventeras av en person vid ett enskilt tillfälle och att metoden inte påverkar organismerna som inventeras. Detta gör tekniken lämplig för inventering av sällsynta, invasiva och skyddsvärda arter (Ma m.fl. 2016, Stewart m.fl. 2017). Bland teknikens tillkortakommande hör dock dess oförmåga att bedöma kön och hälsotillstånd, således bör tekniken betraktas som ett komplement till den traditionella miljöövervakningen (Goldberg m.fl. 2016).

I takt med genteknikens mognad implementeras den även i ökande utsträckning inom myndigheternas miljöövervakning. Detta inkluderar exempelvis björnspillningsinventering av Naturhistoriska riksmuseet (i samarbete med norska Viltskadecenter) och en ökande användning hos Länsstyrelser och kommuner.

AquaBiota har på uppdrag av Enviroplanning AB organiserat eDNA-undersökningen av amfibier inom diken och våtmarker inom Villmanstrands-området (Halmstad). Fältprovtagning genomfördes av AquaBiota den 26:e maj 2021. Rapporten sammanställer resultaten av eDNA-undersökningen från Villmanstrand och diskuterar tolkningen av dessa.

2. MATERIAL OCH METODER

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 eDNA-extraktion. Proverna analyserades sedan via eDNA-tekniken metabarcoding för förekomst av amfibier. Proverna amplifierades med MiSuite primern (kallas ofta markör i svenska texter) som amplifierar en region inom 12S rRNA genen. Detta är i själva verket tre primers som gemensamt beskrivs under namnet MiSuite. Primerna är designade för att matcha de tre amfibiska grupperna grodor, paddor och salamandrar. Då dessa grupper innehåller hög genetisk diversitet måste primern vara ”flexibel” för att matcha alla målarter. En bieffekt av detta är att primern även matchar djur från andra grupper, vilket gör att primern resulterar i en divers sammanställning av områdets fauna.

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 340 000 högkvalitativa sekvenser som tillsammans bestod av cirka 170 miljoner baspar.

DNA extraktion genomfördes av MoRe research, laboratorier preparation och bioinformatikssammanställning av Nature Metrics.

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 förekommer hos alla eukaryota organismer (bakteriernas motsvarighet kallas 16S), då denna gen är nödvändig för framställningen av ribosomer. Ribosomer producerar i sin tur proteinerna som är en förutsättning för liv. De olika 12S mRNA-sekvenserna testas mot den internationella gendatabasen NCBI, vilken innehåller sekvenser från över 400 000 kända arter (Benson m.fl. 2018). De olika sekvenserna matchad mot databasen och resulterar i en lista över förekommande arter.

I fall där sekvensen fick identisk matchning mot flera referenssekvenser användes i första hand GBIF-databasen, därefter analysportalen och artfakta för att rimlighetsbedöma vilken referenssekvens som var den troligaste kandidaten. Arter (ibland beskrivit som 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.

Arter bestämdes automatiskt i de fall där sekvensen matchade en referenssekvens med över 99% träffsäkerhet. Vid inventeringen i Villmanstrand matchade 35 av 37 arter (eller högre taxonomisk grupp) mot gendatabasen med 100% matchning. Arterna (eller mer korrekt sekvensklusterna) med lägre matchning var en tätting fågel som endast bestämdes till ordning och en dykand som endast bestämdes till släkte.

2.3 Fältinventering

Fältinventeringen vid Villmanstrand genomfördes den 26:e maj 2021. Vädret var inledningsvis blött och inventeraren kände sig själv lite amfibisk ute i våtmarken, men framåt lunchtid klarnade vädret upp till det bättre. Förutom de utmarkerade våtområdena var större arealer i den norra delen av inventeringsområdet vattenbärande vid inventeringstillfället.

Innan provtagning inleddes gjordes en genomvandring av området där det konstaterades att det utmarkerade diket strax norr om GN-transport var torrlagt (trots nederbörd) och att ett ytterligare dike och vattendrag var för starkt strömmande för att uppehålla grodyngel. Således analyserades bara 9 prover i stället för de 13 prover som planerades i uppdragsofferten. Ett proverna var ett s.k. negativt prov, vilket inkluderas i syfte att detektera kontamineringskällor.

Varje prov samlades in längs en transekt på ca 150 m. Delprover togs med jämna mellanrum, eller vid heterogena delar av sträckan om sådan observerades, för att täcka in olika habitattyper. Varje provpunkt fotograferades samt att koordinater, temperatur, djup och vattenrörelse noterades (tabell 1). Vid varje prov filtrerades mellan 1.5–2.5 liter vatten genom ett 0.8 µm polyetersulfon filter.

Tabell 1. Fältdata från inventeringen i Villmanstrand.

Station name	Collection date	°C	Water movement	mL filtered	Collected by
NVS_Neg	26/05/2021	-	-	1500.00	Martin AL
NVS_1	26/05/2021	15	Stilla	2100.00	Martin AL
NVS_3	26/05/2021	15	Stilla	2400.00	Martin AL
NVS_3	26/05/2021	16	Stilla	2100.00	Martin AL
NVS_4	26/05/2021	16	Stilla	1860.00	Martin AL
NVS_5	26/05/2021	15	Stilla	2220.00	Martin AL
NVS_6	26/05/2021	15	Stilla	2400.00	Martin AL
NVS_7	26/05/2021	17	Stilla	1320.00	Martin AL
NVS_8	26/05/2021	17	Stilla	1400.00	Martin AL
Target species	**N**	**E**	**Filtertype**	**Depth sample**	**Primer**
Amfibians	x	x	Sterlitech		MiSuite
Amfibians	12.91056	56.64691	Sterlitech	0.3	MiSuite
Amfibians	12.91083	56.64692	Sterlitech	0.3	MiSuite
Amfibians	12.91479	56.64365	Sterlitech	0.5	MiSuite
Amfibians	12.91419	56.64361	Sterlitech	0.5	MiSuite
Amfibians	12.91631	56.64216	Sterlitech	0.5	MiSuite
Amfibians	12.91622	56.64219	Sterlitech	0.5	MiSuite
Amfibians	12.91597	56.64044	Sterlitech	0.3	MiSuite
Amfibians	12.91623	56.64045	Sterlitech	0.3	MiSuite

2.4 Kvantitativ bedömning

Antalet läsningar per art ger en relativ uppskattning av artens förekomst, en s.k. semi-kvantitativ bedömning. Det är dock inte möjligt att få fram exakt antal eller biomassa utifrån antalet sekvenser.

Hur väl eDNA-resultat lämpar sig för semi-kvantitativ bedömning varierar mellan miljöer och organismer. Exempelvis kan det vara olämpligt att jämföra arter som har aktiv leksäsong med arter som inte leker. En ytterligare faktor som kan orsaka en skevhet i den kvantitativa bedömningen är om antalet arter i ett prov som kan binda mot primern skiljer sig markant åt mellan proverna. Detta ger upphov till variation (mellan prover) eftersom sannolikheten att primern binder mot en enskild arts sekvens blir lägre i prov med många arter.

Då båda ovanstående faktorer förekom i resultaten från Villmanstrand-rekommenderar vi en konservativ bedömning av de kvantitativa skillnaderna.

3 RESULTAT OCH DISKUSSION

3.1 Groddjur

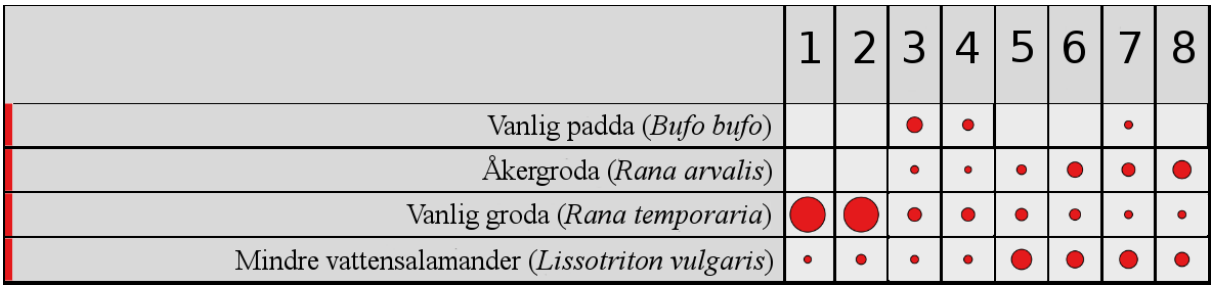
Samtliga nio prover (8 fältprover + 1 negativ) som skickades för analys kunde sekvenseras och artbedömmas. Totalt detekterades fyra groddjur i inventerings-området, vanlig groda (*Rana temporaria*), åkergroda (*Rana arvalis*), vanliga

padda (*Bufo bufo*) och mindre vattensalamander (*Lissotriton vulgaris*).
Både vanliga padda och vanlig groda som observerades vid naturvärdes-inventeringen 2017 återfanns därmed (Figur 1-2). Mindre vattensalamander och åkergroda har inte tidigare rapporterats i inventeringsområdet, men har observerats i närliggande lokaler (artfakta.se).

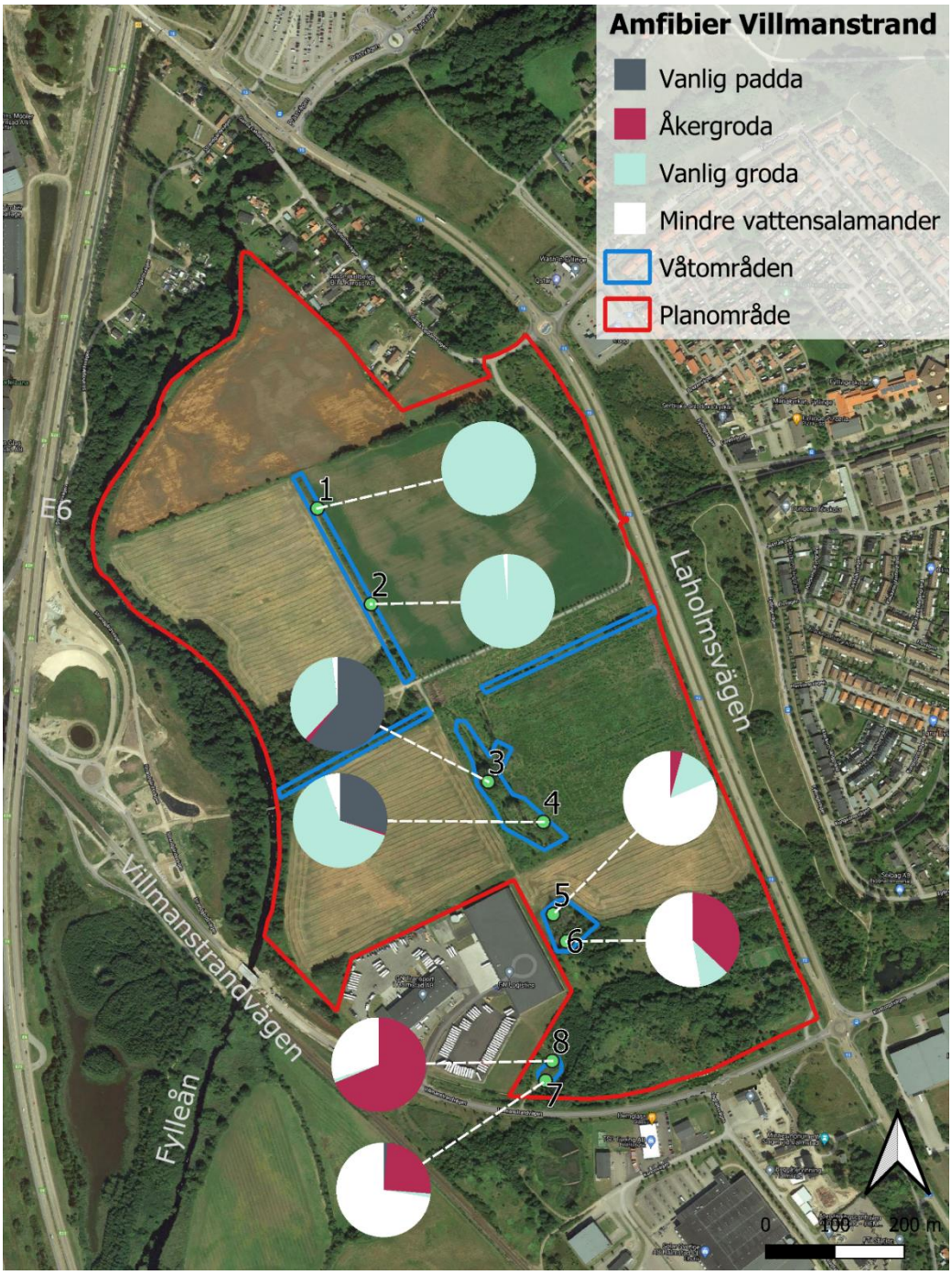
Vanlig groda hade största antalet lästa sekvenser, med 63% av alla amfibiesekvenser. Det var särskilt tydligt i det norra diket där vanlig groda utgjorde 97% av alla sekvenser. I samband med provtagningen i diket observerades också grodyngel vid upprepande tillfällen vilket kan antas vara grodyngel av vanliga groda. Mindre vattensalamander uppvisade också en stark signal, framför allt i de två södra våtmarkerna. Vanlig groda och mindre vattensalamander förekom vidare i samtliga fältprover, vilket indikerar att arterna förekommer allmänt inom områdets våtmarker och diken.

Åkergroda hade en tydlig signal i den södra proverna men endast sparsamt i den norra delen. Vanlig padda hade lägst antal detektioner (3 av 8 prover) och även lägst sekvensandel. Vanlig padda fick dock en förhållandevis stark signal i den norra våtmarken och vi noterar även att observationen av vanlig padda från 2017 var intill samma lokal, vilket indikerar att våtmarken är en viktig lokal för paddorna i området.

Resultaten visar vidare att när en amfibieart detekterades vid en lokal förekom den genomgående i båda proverna, med undantag för detektion av vanlig padda i den södra våtmarken där endast ett av proven påvisa förekomst.



Figur 1. Bubbeldiagram över fördelningen av amfibiearter (rader) inom varje prov (kolumner) vid Villmanstrand. Bubblans storlek är relativt till den totala andelen amfibiesekvenser inom respektive prov.



Figur 2. Karta över amfibieinventeringen via eDNA i Villmanstrandsområdet. Kvantitativa skillnader mellan lokaler bör betraktas konservativt. Zooma gärna i kartan för att se detaljer. Bakgrundskarta: © GoogleEarth Hybrid.

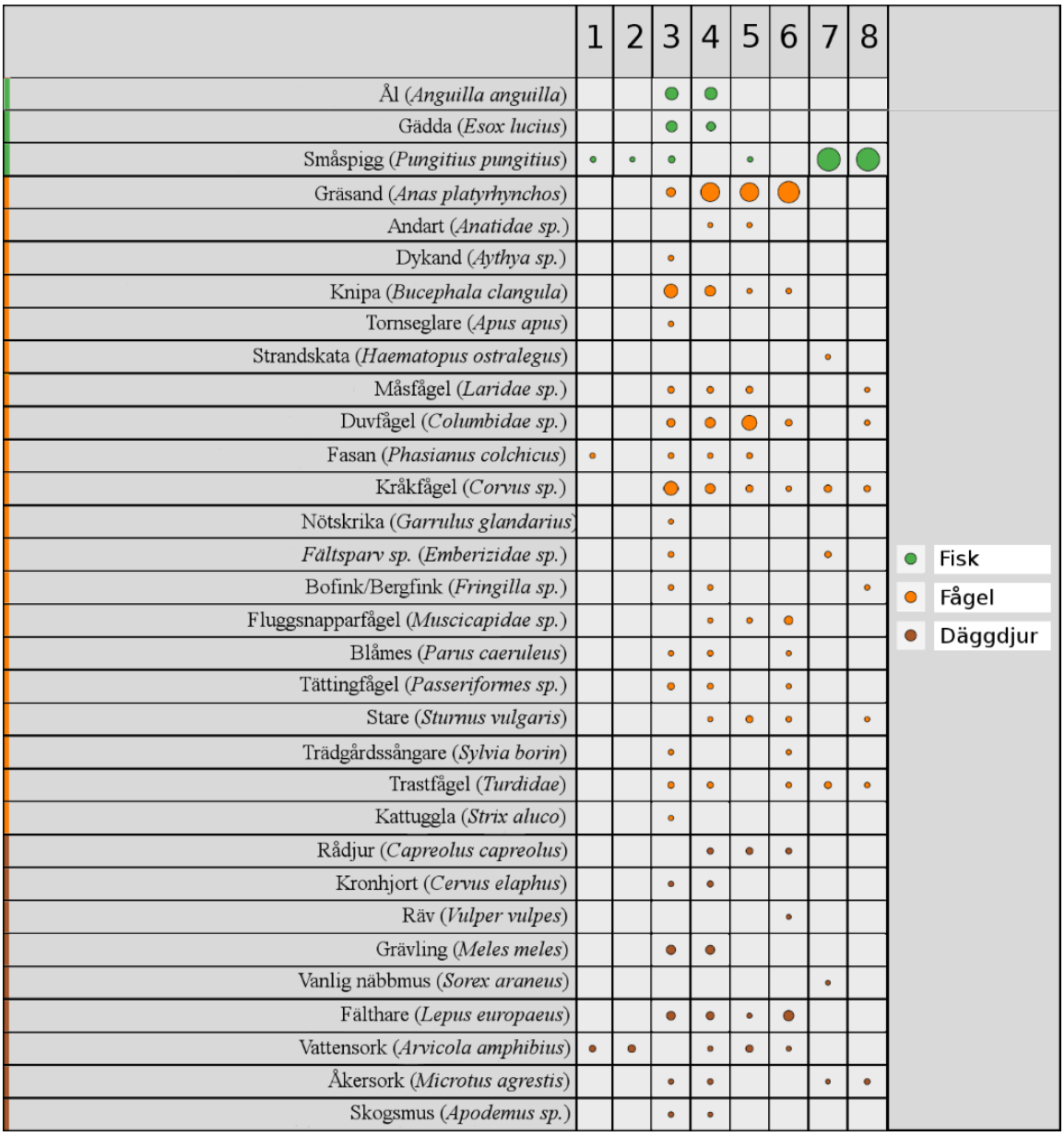
3.2 Övriga vertebratgrupper

Totalt detekterades 32 taxa från djurgrupperna fåglar (20), däggdjur (9) och fisk (3). 22 av dessa identifierades till art och 10 till släkte eller högre taxonomisk grupp. Nio av de tio taxa som inte kunde bestämmas till art var fåglar, den återstående en skogsmus som inte kunde skiljas mellan större och mindre skogsmus. Den detekterade biodiversiteten skilde sig markant mellan lokalerna. Den norra våtmarken utmärkte sig med 33 detekterade vertebratarter, inklusive de fyra amfibiearterna. Lägst diversitet var i det norra diket (prov 1-2) där bara fem vertebrater återfanns, värt att åter notera att diket däremot var rikt på amfibier.

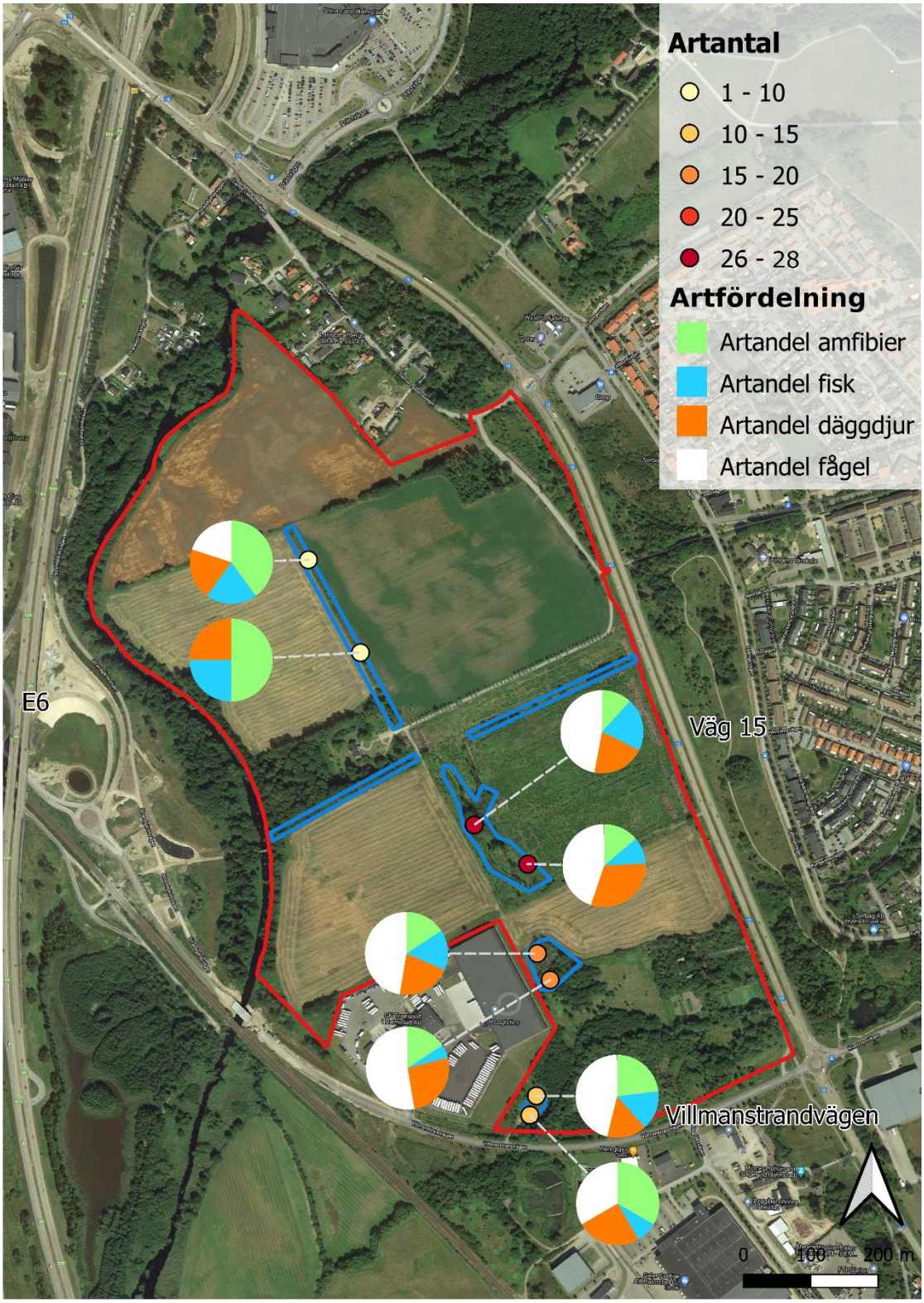
Sett över hela inventeringsområdet var fåglar den grupp som hade högst antal sekvenser, undantaget var i det norra diket där amfibier dominerade eDNA-signalen. Fåglar med tydligast signal var typiska stads- och vattenfåglar, inklusive gräsand, knipa, duvfågel (släkte) och kråkfågel (släkte). Ingen fågel förekom i samtliga prover, men en stor andel av fåglarna förekom i 2-3 lokaler och i 3-5 av proven. Den starka signalen från vattenlevande fåglar kan dels vara en orsak av miljön, dels att akvatiska organismer får större genomslag i analyser av vattenprover än terrestra organismer. Noterbara fågelarter inkluderade bland annat fasan, strandskata, tornseglare, nötskrika och kattuggla. De fyra sistnämnda hade dock en svag signal och återfanns bara i ett prov från den norra våtmarken, alla hade däremot en 100% matchning mot gendatabasen till artnivå.

Däggdjur inkluderade fyra gnagare samt rådjur, kronhjort, räv, grävling och fälthare. De norra våtmarken hade även flest detektioner av däggdjur, och inkluderade alla utom räv och näbbmus som endast återfanns i ett prov vardera från de södra lokalerna. De däggdjur som hade starkast signal och vilka mest frekvent detekterades var fälthare och vattensork.

Slutligen detekterades fiskarterna gädda, småspigg, och ål. De tre arterna återfanns i den norra våtmarken, övriga lokaler hade endast förekomst av småspigg. Det södra dammen (prov 7-8) hade en stark signal av småspigg. Ål hade inte tidigare rapporteras i inventeringsområdet men återfinns regelbundet i den angränsande Fylleån (artfakta.se). Ål är kritiskt hotad i den internationella rödlistan och ingår i den nationella ålförvaltningsplanen.



Figur 3. Bubbeldiagram över fördelningen av fisk, fågel och däggdjur (rader) per prov (kolumner) vid Villmanstrand. Bubblans storlek är relativt till den totala andelen sekvenser inom respektive prov.



Figur 4. Karta över fördelning av djurgrupper och deras biodiversitet i Villmanstrand. Zooma gärna i kartan för att se detaljer. Bakgrundskarta: © GoogleEarth Hybrid.

4. 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.

Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. Biology letters, 4(4), 423-425.

Goldberg, Caren S.; Turner, Cameron R.; Deiner, Kristy; Klymus, Katy E.; Thomsen, Philip Francis; Murphy, Melanie A.; Spear, Stephen F.; McKee, Anna; Oyler-Mccance, Sara J.; Cornman, Robert Scott; Laramie, Matthew B.; Mahon, Andrew R.; Lance, Richard F.; Pilliod, David S.; Strickler, Katherine M.; Waits, Lisette P.; Fremier, Alexander K.; Takahara, Teruhiko; Herder, Jelger E.; Taberlet, Pierre (2016). "Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species". Methods in Ecology and Evolution. 7 (11): 1299–1307.

Hering, D., Borja, A., Jones, J. I., Pont, D., Boets, P., Bouchez, A., ... & Kelly, M. (2018). Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive. Water research, 138, 192-205.

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.

Ma, Hongjuan; Stewart, Kathryn; Lougheed, Stephen; Zheng, Jinsong; Wang, Yuxiang; Zhao, Jianfu (1 December 2016). "Characterization, optimization, and validation of environmental DNA (eDNA) markers to detect an endangered aquatic mammal". Conservation Genetics Resources. 8 (4): 561–568.

Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., ... & Iwasaki, W. (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.

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.-var-verksamhet/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 macrobial eDNA using an optimized extraction protocol: advantage of enclosed filter. Methods in Ecology and Evolution, 8(5), 635-645

Stewart, Kathryn; Ma, Hongjuan; Zheng, Jinsong; Zhao, Jianfu (2017). "Using environmental DNA to assess population-wide spatiotemporal reserve use". Conservation Biology (in Spanish). 31 (5): 1173–1182.

Taberlet, P., Coissac, E., Hajibabaei, M., & Rieseberg, L. H. 2012. Environmental DNA. Molecular Ecology 21, 1789-1793

www.aquabiota.se