



Naturhistoriska
riksmuseet

Artbestämning av marina fiskägg

Diarienummer 4.1-694-2017

5 april 2018



Centrum för genetisk identifiering

Centrum för genetisk identifiering

Centrum för genetisk identifiering vid Naturhistoriska riksmuseet är en uppdragsfinansierad verksamhet som erbjuder myndigheter och organisationer hjälp med genetiska analyser av biologiskt material.

Uppdrag

Att från morfologi bestämma vilka fiskarter som rommen kommer ifrån är inte trivialt. En alternativ metod är att använda sig av DNA sekvenser från romkorn för att identifiera vilken art de kommer från. I denna rapport vi försökt identifiera fiskart från 590 romkorn insamlade från Sveriges västkust av SLU Aqua genom att sekvensera en del av genen CO1.

Material och metoder

Från erhållen fiskrom lagrad i alkohol har DNA extraherats med “Thermo Scientifics KingFisher Cell and Tissue DNA Kit” enligt beskrivning från tillverkaren. Vi amplifierade en 658bp bit av COI med primers från den så kallade COI-2 cocktailen (Ivanova et al. 2007). Amplifierade fragment renades sedan med Exo-SAP och sekvenserades med M13F primers. Innan identifiering av arter trimmades samtliga sekvenser så att endast baser med god kvalitet bibehålls. Sekvensanalys, filtrering och art-identifiering gjordes alla med hjälp av programmeringsspråket R och paketen: sangerseqR (Hill et al. 2014), DECIPHER (Wright 2016), sangeranalyseR (Lanfear 2015).

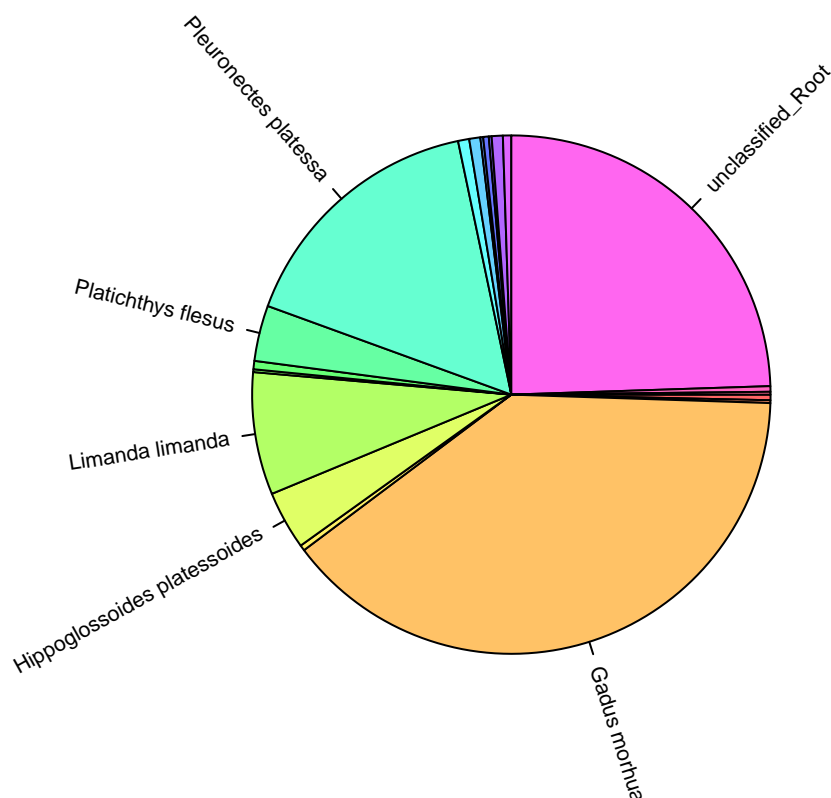
För att skapa en referensdatabas med svenska fiskarter hämtade vi namn på samtliga fiskarter som enligt dyntaxa.se reproducerar i svenska vatten. Släktskap och CO1 sekvenser för dessa hämtades sedan från “Barcode of Life Data System” med hjälp av R-paketet bold (Chamberlain 2017).

All kod vi använt för analys finns tillgänglig för nedladdning från Centrum för Genetisk Identifierings githubsida (<https://github.com/CGI-NRM/Fiskagg>).

Resultat

Från de 590 proverna som var en del av projektet var det 12 stycken där vi inte kunde identifiera något romkorn eller något som såg ut som material av biologiskt ursprung i provrören. För dessa 12 har det inte gjorts någon DNA extraktion eller sekvensering. För de kvarvarande 578 proverna har vi extraherat och sekvenserat 576 (väntar fortfarande på resultat för de sista två). Vi har dock vid extraktion noterat att ytterligare 25 av proverna är så skräpiga eller innehåller så extremt små romkorn att vi bedömer det svårt att få till tillräckligt mycket och rent DNA för att kunna erhålla bra sekvensdata. Vi har dock gått vidare med alla dessa prover och kört de genom hela analysen.

Totalt amplifierades och sekvenserades således 576 prover. Av dessa var 434 av tillräckligt hög kvalite för att kunna avgöra vilken art romkornet kommer från. För de 132 proverna som inte gick att bestämma beror de flesta (kring 70) på att det inte går att amplifiera DNA från extraktionen. Det är alltså prover där man antingen inte har ett rent prov eller, mer troligt, prover där inte tillräckligt med DNA erhållits för att kunna amplifiera genen. Av de kvarvarande proverna som inte vi lyckats arbestämma finns det DNA, men ursprunget är inte fisk utan det ser ut som olika former av proteobakterier och något oväntat ser 4 prover (17_E477, 17_480, 17_482, 17_E487) ut att komma från krill (*Meganyctiphanes norvegica*). Detta trots att metoden vi använt oss av är designad och opimerad för att amplifiera fisk. En trolig förklaring till detta är att vi inte erhållit tillräckligt mycket DNA från romkornet och det vi lyckats amplifiera representerar DNA rester från andra celler som fanns i provet. Ett romkorn kan ju vara så lite som några få celler, så är det mycket bakterieceller eller material från andra arter in provet kan det vara svårt att effektivt amplifiera DNA från romkornet.



Figur 1: Cirkeldiagram med klassificering av romkorn från CO1 sekvens. Endast klasser med mer än 10 sekvenser har namn utskrivet

Detekterade arter

I resultatfilen som bifogas som ett excel-blad finns två flikar med data; en flik med era löpnummer och kommentarer från våran DNA extraktion och en andra flik som innehåller art-information för de prover som vi lyckats artbestämma.

I figur 1 ser vi antal sekvenser per art/grupp för samtliga prover som sekvenserats i ett cirkeldiagram. Det vi tydligast kan läsa ur detta är att det är som nämnts tidigare att mellan 20 och 25% av proverna inte kunnats klassificerats. Vidare ser vi att det är två arter som dominerar bland de klassificerade proverna.

Tittar vi närmare på de prover som klassificerats ser vi i tabell 1 de 15 olika arterna som finns bland proverna. I kolumnen med namnet "Fraktion" ser vi andelen av artbestämda romkorn som kommer från respektive art. Vi kan således se att nästan 75% av de prover som spårats till artnivå var torsk eller rödspätta. Vanligast efter dessa är sand-, ler- och skrubbskädda som tillsammans utgör nästan 20% av de artbestämda romkornen.

Figur 2 visar antal romkorn från de olika arterna i form av ett stapeldiagram och man ser tydligt att hur dominerande de fem ovannämnda arter är till antal. Det är noterbart att det finns romkorn från både kolja, vitling och lyrtorsk som i rödlistebedömningen 2015 klassas som sårbar och akut hotad. Notera att det latinska namnet på småvar *Zuegopterus punctatus* inte är det som erkänns av de flesta taxonomiker utan oftast går den under det latinska namnet *Phrynorhombus norvegicus*. Vi har dock i rapporten använt de de tidigare namnet då det används i boldsystems databaser.

Tabell 1: Antal romkorn per art

Art	Svenskt namn	Antal
Gadus morhua	Torsk	226

Art	Svenskt namn	Antal
<i>Pleuronectes platessa</i>	Rödspätta	93
<i>Limanda limanda</i>	Sandskädda	44
<i>Hippoglossoides platessoides</i>	Lerskädda	21
<i>Platichthys flesus</i>	Skrubbskädda	20
<i>Pollachius pollachius</i>	Lyrorsk	4
<i>Sprattus sprattus</i>	Skarpsill	4
<i>Merlangius merlangus</i>	Vitling	3
unclassified_ <i>Pleuronectidae</i>	Oklassificerad Flundra	3
<i>Ciliata mustela</i>	Femtömmad skärlånga	2
<i>Gaidropsarus vulgaris</i>	Tretömmad skärlånga	2
unclassified_ <i>Actinopterygii</i>	Oklassificerad strålfenig fisk	2
<i>Zeugopterus norvegicus</i>	Småvar	2
<i>Enchelyopus cimbrius</i>	Fyrtömmad skärlånga	1
<i>Melanogrammus aeglefinus</i>	Kolja	1
<i>Trisopterus minutus</i>	Glyskolja	1
unclassified_ <i>Chordata</i>	Oklassificerad	1
<i>Zeugopterus punctatus</i>	Bergvar	1

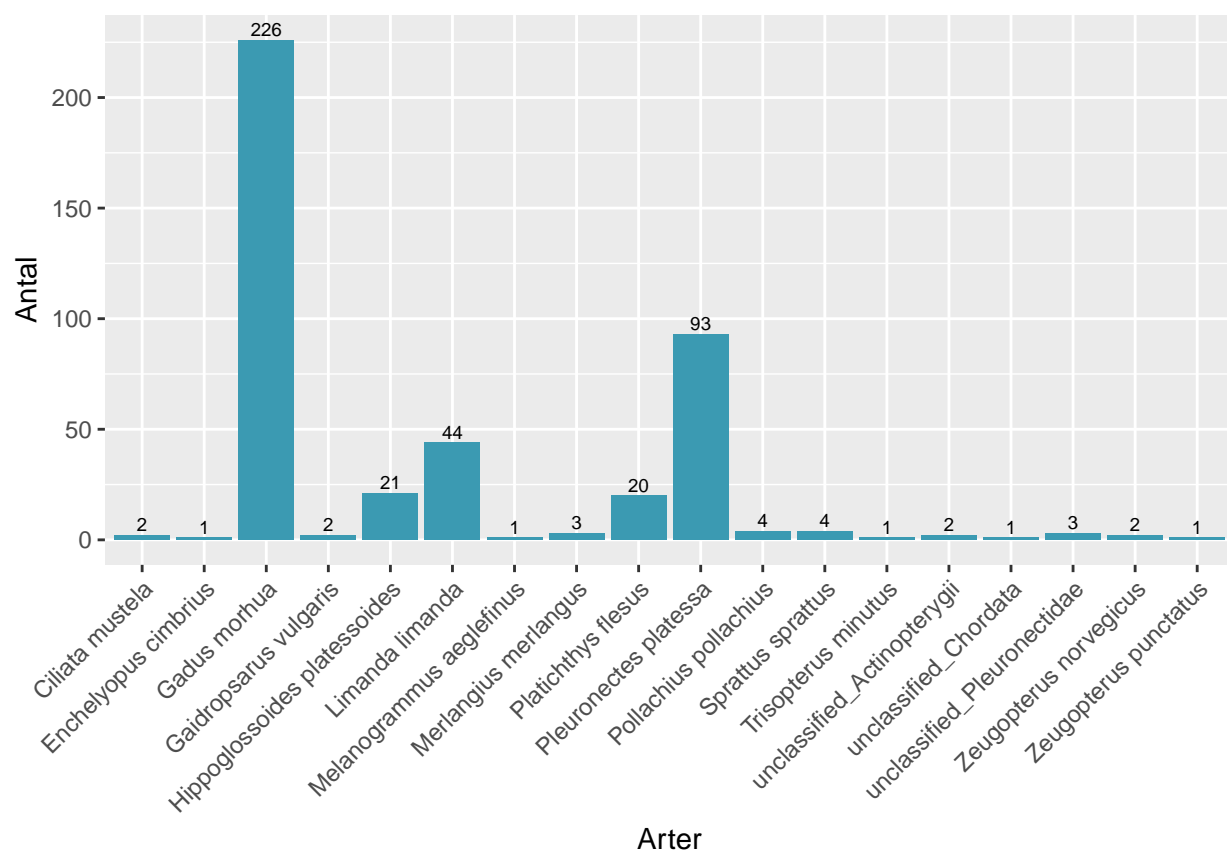
Ekonomisk redovisning

Den största delen av projektets kostnader rör arbetstid som gått åt för extraktion av DNA från romkorn samt utveckling av en analys-pipeline. Nedan presenteras de kostnader som är associerade till projektet. Priser är i SEK och exklusive moms.

Material	68828
Arbetstid	108372
Summa	177000

Referenser

- Chamberlain, Scott. 2017. *Bold: Interface to Bold Systems Api*. <https://CRAN.R-project.org/package=bold>.
- Hill, Jonathon T, Bradley L Demarest, Brent W Bisgrove, Yi-chu Su, Megan Smith, and H. Joseph Yost. 2014. "Poly Peak Parser: Method and Software for Identification of Unknown Indels Using Sanger Sequencing of Polymerase Chain Reaction Products." *Developmental Dynamics*.
- Ivanova, Natalia V, Tyler S Zemlak, Robert H Hanner, and Paul DN Hebert. 2007. "Universal Primer Cocktails for Fish Dna Barcoding." *Molecular Ecology Resources* 7 (4). Wiley Online Library: 544–48.
- Lanfear, Rob. 2015. *SangeranalyseR: SangeranalyseR: A Suite of Functions for the Analysis of Sanger Sequence Data in R*.
- Wright, Erik S. 2016. "Using Decipher V2.0 to Analyze Big Biological Sequence Data in R." *The R Journal* 8 (1): 352–59.



Figur 2: Antal romkorn per art.