

eDNA-inventering av groddjur och fiskar på två lokaler i Skåne

AquaBiota Rapport 2018:05

Författare: Micaela Hellström och Johan Näslund



STOCKHOLM, AUGUSTI 2018

Beställare:

Undersökningen är utförd av AquaBiota Solutions för Sweco Environmental AB

Författare:

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

Bilder:

Omslagsbild; Bäck vid järnväg (Pähr Hellström). Övriga bilder: Pähr Hellström.

Kontaktinformation:

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

Kvalitetsgranskad av:

Nicklas Wijkmark (nicklas.wijkmark@aquabiota.se)

Distribution:

Fri

Internetversion:

Nedladdningsbar hos www.aquabiota.se

Citera som:

Hellström, M. och J. Näslund. 2018. eDNA-inventering av groddjur och fiskar på två lokaler i Skåne. AquaBiota Rapport 2018:05. ISBN: 978-91-85975-74-7

AquaBiota Rapport 2018:05

ISBN: 978-91-85975-74-7

ISSN: 1654-7225

© AquaBiota Solutions 2018



INNEHÅLL

Innehåll.....	3
Sammanfattning.....	4
1. Inledning	5
2. Material och metoder.....	5
2.1 Fältarbete.....	5
2.2 Laboratoriearbete.....	7
2.2.1 Extraktion, PCR och sekvensering	7
2.2.2. Bioinformatik och verifiering.....	7
3. Resultat och konklusion.....	7
3.1 Flerartsanalyser – Fiskar och groddjur	7
3.2 eDNA kvalitet samt kvalitetskontroll	9
TACK	9
Referenser	10
Bilaga 1. Enarts- och flerartsanalyser vid eDNA undersökningar.....	11
Bilaga 2. Kvalitetssäkring av eDNA	12
Bilaga 3: Kvalitetskontroller som redovisas vid flerartsanalyser	13

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 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 maj 2018 utförde AquaBiota på uppdrag av Sweco Environment AB en eDNA inventering av groddjurs-förekomst i två diken vid Flöjen och i en damm söder om Ödåkra, Skåne Län.

I Flöjen (Flöjbäcken) detekterade eDNA nio arter; vanlig padda, den fridlysta ätliga grodan (som genetiskt även matchar gölgroda som inte finns i Skåne och sjögrodan som inte påträffats i Sverige), vanlig groda, och mindre vattensalamander samt, europeisk ål, gädda, ruda, groplöja och mört. I dammen söder om Ödåkra påträffades fyra arter; vanlig padda, vanlig groda, mindre vattensalamander samt ruda.

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 maj 2018 utförde AquaBiota på uppdrag av Sweco Environmental AB en eDNA inventering av groddjurs förekomst på två lokaler; sammanslaget prov av två diken vid Flöjeln som går ihop ca 70 m uppströms, samt en damm direkt söder om Ödåkra, Skåne län. Två markörer användes av vilka den ena detekterade både groddjur och fiskar.

2. MATERIAL OCH METODER

2.1 Fältarbete

Fältarbetet utfördes 30 maj 2018. Provtagningspunkter anges i tabell 1. Lufttemperaturen mätte 23 °C.

Innan provtagningen genomfördes i fält, steriliserades all provtagningsutrustning. Filtreringsutrustning köptes in som DNA-fria sterila engångsförpackningar. Från diken samlades 10 stycken underprover på vardera sidan om järnvägen och slogs samman till prov 1. Fem underprover samlades in från dammen och slogs ihop till prov 2. Vattnet filtrerades och fixerades i fält enligt Spens m.fl. (2017). Negativa fältkontroller utgjordes av rent vatten som filtrerades på plats för att utesluta kontaminering av DNA mellan prover eller från provtagare.

Tabell 1. Provpunkter. Position, tidpunkt samt vattentemperatur.

Provpunkt namn	SWEREF 99 TM		WGS 84		Tid	H ₂ O °C
	y	x	Latitud (N)	Longitud (Ö)		
1. Flöjen, två diken	6222344	361091	56,12596	12,76523	12:40	22,3
2. Ödåkra, damm	6219369	359376	56,09871	12,73926	10:40	22,3



Bild 1. Provpunkt 1. Flöjen två diken. Det ena diket gick under järnvägen, det andra längs med järnvägen. Mittenbilden visar vattnets färg. (Foto: Pähr Hellström)



Bild 2. Provpunkt 2. Damm söder om Ödåkra. Mittbilden visar groddjursyngel som påträffades vid provpunkten. (Foto: Pähr Hellström)



Bild 3. Karta över provpunkterna.

2.2 Laboratoriearbete

2.2.1 Extraktion, PCR och sekvensering

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. Extraktionerna utfördes av molekylärbiologiska tekniker som är tränade i att extrahera eDNA. Proverna från tjärnen analyserades med a) flerartsanalyser för förekomst av fisk, samt groddjur med fokus på större vattensalamander (bilaga 1). Varje PCR prov utfördes i 12 replikat som poolades under bioinformatiken. Två modifierade markörer som amplifierar 12S rDNA regionen användes. Principerna för metabarkodning förklaras mer utförligt i bilaga 1. Vidare användes en positiv DNA kontroll med känd artsammansättning som standard för jämförelse, samt negativa kontroller (bilaga 2).

2.2.2. Bioinformatik och verifiering

Varje enskild art har en unik streckkod (Se bilaga 1) eller sekvens. Varje unik sekvens fick en molekylär identitet. De olika 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 370 000 kända arter finns tillgängliga (Benson m.fl. 2017, bilaga 1) med 0,6 miljarder sekvenser och 2,6 biljoner baspar enligt NCBI:s hemsida. De olika sekvenserna matchades mot databasen och fick på så sätt fisk, däggjurs, groddjurs identitet. Tack vare nya framsteg inom metabarkodning är det möjligt att få träffar på artnivå istället för enbart familje- eller genusnivå. Antalet läsningar per art gav en relativ uppskattning av hur mycket eller litet arten förekom i ett prov.

3. RESULTAT OCH KONKLUSION

3.1 Flerartsanalyser – Fiskar och groddjur

Arterna som påträffades på de två lokalerna anges i tabell 2. Antalet läsningar per art motsvarar artens relativa biomassa, vilket innebär att arter med ett högt antal läsningar är vanligare (i biomassa) än arter med ett lågt antal läsningar. Under fältarbetet såg provtagarna grodyngel vid dammen. Vattnet på båda lokalerna var mycket grumligt. I Flöjbäcken detekterade eDNA nio arter (angivna i fallande relativ förekomstgrad för respektive djurgrupp); vanlig padda, den fridlysta ätliga grodan (som även matchar gölgroda och sjögroda, se text nedan), vanlig groda, och mindre vattensalamander samt, europeisk ål, gädda, ruda, groplöja och mört. I dammen påträffades fyra arter; vanlig padda, vanlig groda, mindre vattensalamander samt ruda.

Groplöjan har tidigare klassats på svenska rödlistan som sårbar (2000) samt nära hotad (2005) men är sedan 2010 klassad som livskraftig och anses i dagsläget inte vara hotad. Europeisk ål är vitt spridd i svenska vatten men trots det klassad som akut hotad på den svenska rödlistan, bland annat på grund av ett alltför intensivt fiske.

Genetiskt sett är sjögrodans (*Pelophylax ridibundus*), gölgrodans (*Pelophylax lessonae*) och den ätliga grodans (*Pelophylax kl. esculentus*) mycket snarlika (Artdatabanken 2015) – även genetiskt (Leuenberger m.fl. 2015). Arterna bildar hybrider och är därför svåra att skilja åt. Gölgrodan har inte påträffats i Skåne och sjögrodan har inte påträffats i Sverige - därför dras slutsatsen att grodarten som matchar sekvenserna är ätlig groda. Vidare undersökningar kan behövas för att verifiera detta. Sjögroda har inte klassats på rödlistan för hotade arter i Sverige eftersom den inte förekommer i landet. Artdatabankens hemsida informerar dock att både den ätliga grodan och sjögrodan är "Fridlyst enligt Artskyddsförordningen (SFS 2007:845), enligt paragraf: 5. Bestämmelsen gäller hela landet" (Artdatabanken 2015). Detta är överraskande eftersom sjögrodan som bildar hybrider anses invasiv.

Tabell 2. Relativ biomassa (%) av målarterna inom respektive djurgrupp (grodjur och fiskar). Antalet eDNA läsningar per art inom de olika provlokaler anges i parentes och visar hur många gånger en sekvens blivit läst på artnivå. Datat från den modifierade MiFish markören presenteras i tabellen.

ART	Lokal 1. Flöjen, diken	Lokal 2. Ödåkra, damm
Ruda (<i>Carassius carassius</i>)	15 % (4 973)	100 % (37 652)
Europeisk ål (<i>Anguilla anguilla</i>)	50 % (16 749)	
Gädda (<i>Esox lucius</i>)	26 % (8 628)	
Mört (<i>Rutilus rutilus raria</i>)	<1 % (206)	
Groplöja (<i>Leucaspis delineatus</i>)	9 % (3 023)	
Mindre vattensalamander (<i>Lissotriton vulgaris</i>)	1 % (729)	<1 % (92)
Vanlig padda (<i>Bufo bufo</i>)	64 % (52 918)	99 % (65 611)
Vanlig groda (<i>Rana temporaria</i>)	2 % (1 761)	<1 % (557)
*) Ätlig groda (<i>Pelophylax kl. esculentus</i>) / Sjögroda (<i>Pelophylax ridibundus</i>) / Gölgroda (<i>Pelophylax lessonae</i>)	33 % (27 175)	

*) Identitet se text.

3.2 eDNA kvalitet samt kvalitetskontroll

Kvalitetskontrollerna samt mängden filterat vatten anges i tabell 3 och följer direktiven i bilaga 3. Proverna innehöll stora mängder humus och var kraftigt inhiberade vilket betyder att ett extra antiinhiberingssteg infördes. DNA var rent och visade hög kvalitet. Alla negativa kontroller var negativa. De positiva kontrollerna var positiva. För flerartsanalyserna gäller följande; Mängden mänsklig kontamination i proverna var extremt liten och låg på 0,22 %. Värdena brukar ligga upp till 20-30%. Ko i proverna är en funktion av koserum i reagenserna, även här var värdet mycket lågt. Då en hög andel av läsningarna anger målarterna är datat tillförlitligt. Ett acceptabelt värde ligger på 40% beroende på markörer och överstiger sällan 70%. I detta uppdrag översteg andelen målarter dvs. fiskar, groddjur och däggdjur 90%. Den negativa fältkontrollen innehöll små mängder mänskligt DNA, men inga andra kontamineringar. Orsaken att mänskligt DNA (under 10 läsningar) i fältnegativa visade 100% är att inget annat DNA fanns i provet.

Tabell 3. Kvalitetskontroll av eDNA och kontroller. eDNA koncentrationen uppmättes med Qubit Fluorometric Quantification (Fisher Scientific). Inhiberingskontroll utfördes med qPCR. Band på gel av målarter efter PCR visar att provanalyserna har fungerat. PCR negativ innefattar 12 replikat.

	1. Flöjen, diken	2. Damm	Fält negativ	Lab negativ	PCR negativ
Volym filterat vatten (mL)	1800	1600	500	500	-
eDNA koncentration (ng/uL)	100+	100+	0,06	0	-
Inhibering	Ja	Ja	Nej	Nej	Nej
Antiinhibition	Ja	Ja	Nej	Nej	Nej
Band på gel av målarter	Ja	Ja	Nej	Nej	Nej
Antal PCR replikat per markör	12	12	12	12	12
Ko (<i>Bos taurus</i>) %	0,14	0	0	0	0
Människa (Homo Sapiens) %	0,02	0,03	100	0	0

TACK

Tack till Pähr Hellström för insamling och fixering av prover samt för fotografier.

REFERENSER

- Artdatabanken. 2015. <https://artfakta.artdatabanken.se/taxon/208252>
- 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.
- Leuenberger, J., Gander, A., Schmidt, B. R., & Perrin, N. (2014). Are invasive marsh frogs (*Pelophylax ridibundus*) replacing the native *P. lessonae*/*P. esculentus* hybridogenetic complex in Western Europe? Genetic evidence from a field study. *Conservation genetics*, 15(4): 869-878.
- 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 miljöDNA 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 (levereras ej i detta projekt)

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.

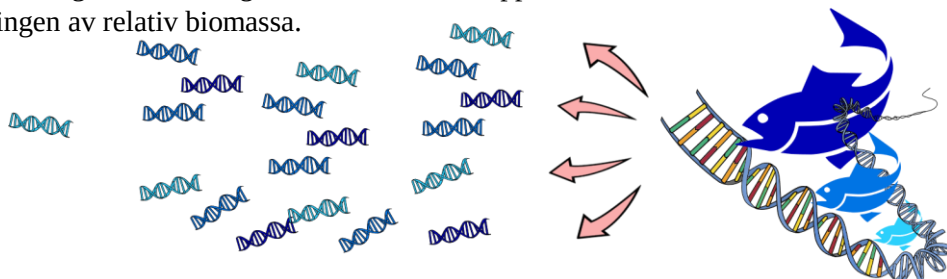
Om flera arter undersöks med enartsanalyser kan data över relativa abundanser mellan art A och art B inte jämföras med varandra eftersom markörerna för varje art skiljer sig markant från varandra. Som exempel kan nämnas att 1000 DNA kopior av gädda inte motsvarar 1000 kopior av abborre och analyserna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

Flerartsstudier –Metastrekkodning genom NGS (Next Generation Sequencing)

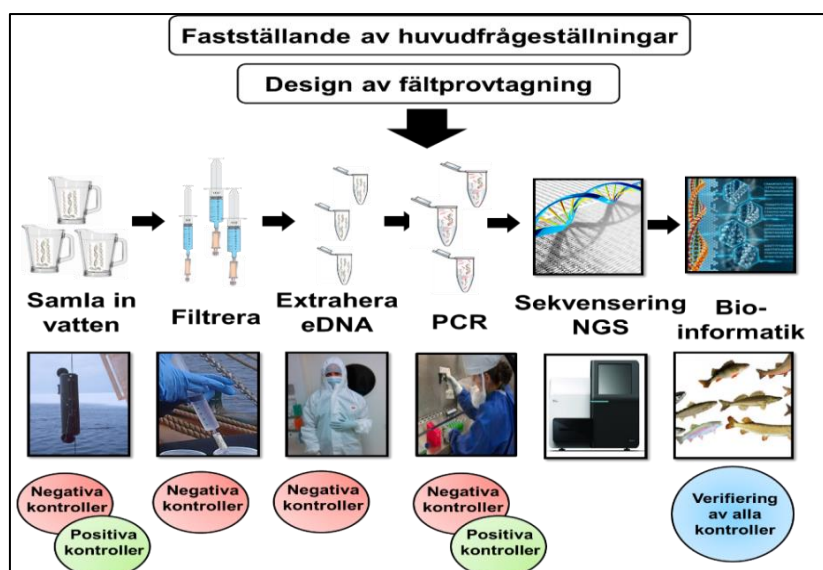
Frågeställningen för flerartsstudier är; **Vilka arter finns här och vilka av dessa är vanliga eller sällsynta?** Med andra ord behöver man inte på förhand veta vad man letar efter.

Metastrekkodning 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 metastrekkodning. 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-sigener 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-sigener 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 flerartsanalyser

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. Prov från ett artificiellt sammansatt samhälle ("mock community") används som positiv kontroll vid PCR och sekvensering. Falska positiva prover redovisas. *De positiva proverna försäkrar att PCR och bioinformatiken fungerar som avsett.*
7. Det totala antalet sekvenseringsläsningar, samt andel (%) av målarterna i läsningarna redovisas. *Detta ger en bild av hur väl sekvenseringen av målarterna lyckats.*
8. Andel sekvenser (%) av människa, ko, och gris (vildsvin) och bakterier som förekommer som bakgrundssekvenser redovisas. *Detta möjliggör en kontroll av att tillräckligt många läsningar täcker målarterna.*
9. Minst 12 PCR replikat per art/artgrupp och eDNA prov utförs. Maximalt 4 av dessa sammanslås i sekvenseringen. *Färre replikat minskar analys säkerheten avsevärt.*
10. Antal prover för en specifik MiSeq-körning (sekvensering) överstiger inte 100 stycken exklusive sekvenseringskontroller. *Detta säkerställer att antalet läsningar per prov inte ska bli alltför lågt för att kunna detektera ovanligare arter.*



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 beredskapscapacitet 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://sfmg.se/download/riktlinjer/Kvalitetsriktlinjer/sfmg_riktlinjer-for-kvalitetssakring_rev101228.pdf



www.aquabiota.se

