



eDNA och fiskinventeringar – ställ krav på rapporterna!

eDNA kan vara ett kraftfullt verktyg för att kartlägga biologisk mångfald, och tekniken har under senare år använts för att inventera förekomsten av fiskarter i vattendrag. Rapporteringen av fiskinventeringar gjorda med eDNA saknar dock ofta den information som gör det möjligt att kritiskt utvärdera resultaten, eller att upprepa undersökningen. Vi har försökt sammanställa en lista över information som bör efterfrågas och varför.

.....
TEXT: PER SUNDBERG, MARINA PANOVA, MALIN STRAND & MIKAEL SVENSSON

Djur och växter lämnar spår efter sig i naturen i form av DNA från till exempel urin, fjäll, celler, och kanske också i ren form. Detta DNA benämns eDNA (från engelskans "environmental DNA"), eller miljö-DNA, och det kan användas för att påvisa förekomst av en art utan att man behöver observera eller fånga individer. Därmed är eDNA ett attraktivt verktyg för miljöövervakningen och skulle kunna komplettera, och i vissa fall ersätta, en del av de nuvarande metoderna – beroende på frågeställningen.

Vattenburet eDNA kan fångas och extraheras för vidare analys för att få svar på frågor om vilka arter som finns eller har funnits i vattnet (s.k. metabarcoding), eller om en specifik och eftersökt art finns där (s.k. målartsanalys). Det finns idag ett stort antal vetenskapliga artiklar som bekräftar att tekniken fungerar, med många empiriska belegg när det gäller fisk. Fiskar är relativt sett stora organismer; de simmar runt, släpper ifrån sig exkrementer och fjäll, och de andas genom gälar, vilket sammantaget gör att de lämnar många DNA-spår. För många geografiska områden finns goda referensbibliotek med DNA-sekvenser för fiskarterna i det aktuella området. Det är inte lika väl känt hur bra eDNA fungerar för att hitta spår av djur från andra grupper, men forskning pågår för att undersöka detta.

I vetenskaplig litteratur är det en självklarhet att de metoder som har använts redovisas på ett sådant sätt att läsaren dels kan ha en möjlighet att upprepa undersökningen under samma förutsättningar, dels kan bedöma hur väl underbyggda slutsatserna är. Det är också viktigt att primärdata redovisas, och att dessa finns tillgängliga för andra att analysera. När det kommer till rapporter utförda på beställning av olika avnämare (som i fallet med fiskförekomst kan vara t.ex. länsstyrelser eller vattenvårdsförbund) varierar metodbeskrivningarna på ett sätt som i vetenskapliga sammanhang inte accepteras. Vi har undersökt hur metoder och fältdata återges i 16 rapporter publicerade under åren 2017 till 2019. Vi har tittat på hur

.....
♦ Fig. 1. Dvärgörding. XXXXXXXXXXX XXXXXXXX XXXXXXX XXXXXX XXX
XXXXXXXXX X XXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
Foto: Tomas Carlberg

primärdata redovisas och tolkas, och hur bakomliggande data har gjorts tillgängliga för beställaren.

I 14 rapporter har undersökningen gällt frågan "Vilka arter av fisk finns i det undersökta området?" Metabarcoding används i princip i alla dessa studier (se faktaruta nedan för mer detaljer). I två rapporter har det handlat om att påvisa förekomst av en specifik art. Då behövs ingen sekvensering av DNA – det är tillräckligt att påvisa att en artspecifik sekvens mångfaldigas (amplifieras) i en PCR (se faktaruta nedan).

Vi har identifierat ett antal variabler (Tabell 1) som vi menar bör finnas med som minimum i en rapport (även om det också finns mer som kan vara värdefullt att förmedla). Syftet är att ge läsaren tillräcklig information för att: 1) kunna upprepa en genomförd studie; 2) förstå analysarbetet; 3) tydliggöra på vilka grunder slutsatser baseras. Vårt förslag till variabler bygger på innehåll och erfarenheter från publicerade vetenskapliga studier som bl.a. visar att resultatet i hög grad kan påverkas av den praktiska provhanteringen. Vi delar upp variablerna under fem rubriker: Fältdarbete, Provtagning, Laboratoriearbete, Analys av data, Utvärdering.

Vilken information bör finnas med i en rapport?

Fältdarbete:

- platsangivelse
- datum
- vattenförhållanden
- temperatur
- djup

Plats för provtagningen. Bör anges med en tydlig position (t.ex. SWEREF99) och inte bara med namn på vattendraget. Detta för att kunna upprepa och avgöra förhållanden vid provtagningstillfället.

Datum. Anger när provtagningen gjordes. Det finns flera studier som visar att den mängd DNA som kan upptäckas varierar med årstid.

Om strömmande vatten eller inte. Det bör finnas information om vattnet är strömmande eller stillastående, gärna med mätning av strömhastigheten som kan påverka resultatet beroende på frågeställning. Denna information ger en bättre bild av förutsättning-

arna för att kunna hitta påvisbart DNA – strömning kommer att påverka spridning av DNA, och förekomst uppströms kan påverka ett utfall.

Vattentemperatur. Bör anges framför allt för att kunna uppskatta fiskens aktivitetsnivå. Det är fördelaktigt om också lufttemperaturen anges, eftersom det kan ha betydelse för nedbrytningen av DNA i vattenprovet om det går lång tid mellan provtagning, filtrering och fixering.

Provtagningsdjup. Det bör finnas uppgift om vilket djup provet togs på (eller om det togs från ytan). Detta kan vara en avgörande variabel beroende på frågeställning – t.ex. om man söker efter en bottenlevande art.

Provtagning:

Mängden och kvaliteten på insamlat DNA påverkas framför allt av tre faktorer:

- Typ av filter
- Tiden mellan provtagning och fixering
- Provförvaring

Typ av filter (sterila, inkapslade, porstorlek). Måste anges, gärna med produktmärke om det handlar om kommersiellt tillgängliga filter. Det finns flera artiklar som visar dels hur valet av filter påverkar resultaten, dels att mängden erhållen DNA i filtret påverkas av många olika faktorer. Det är därför avgörande information för att kunna utvärdera resultaten. Det bör också anges om provet förfiltrerats – i så fall också med angivelse om porstorlek och produktmärke samt med uppgift om DNA har extraherats även från förfiltret.

Tid mellan provtagning och fixering. Flera studier visar att DNA kan brytas ner snabbt i ett prov, och därför är det mycket viktigt att ange hur proverna hanterats och hur lång tid som förflutit mellan provtagning och filtrering respektive fixering.

Provförvaring. Det bör anges hur DNA-proverna förvarats mellan provtagning, fixering och extraktion (t.ex. kyllda eller frysta).

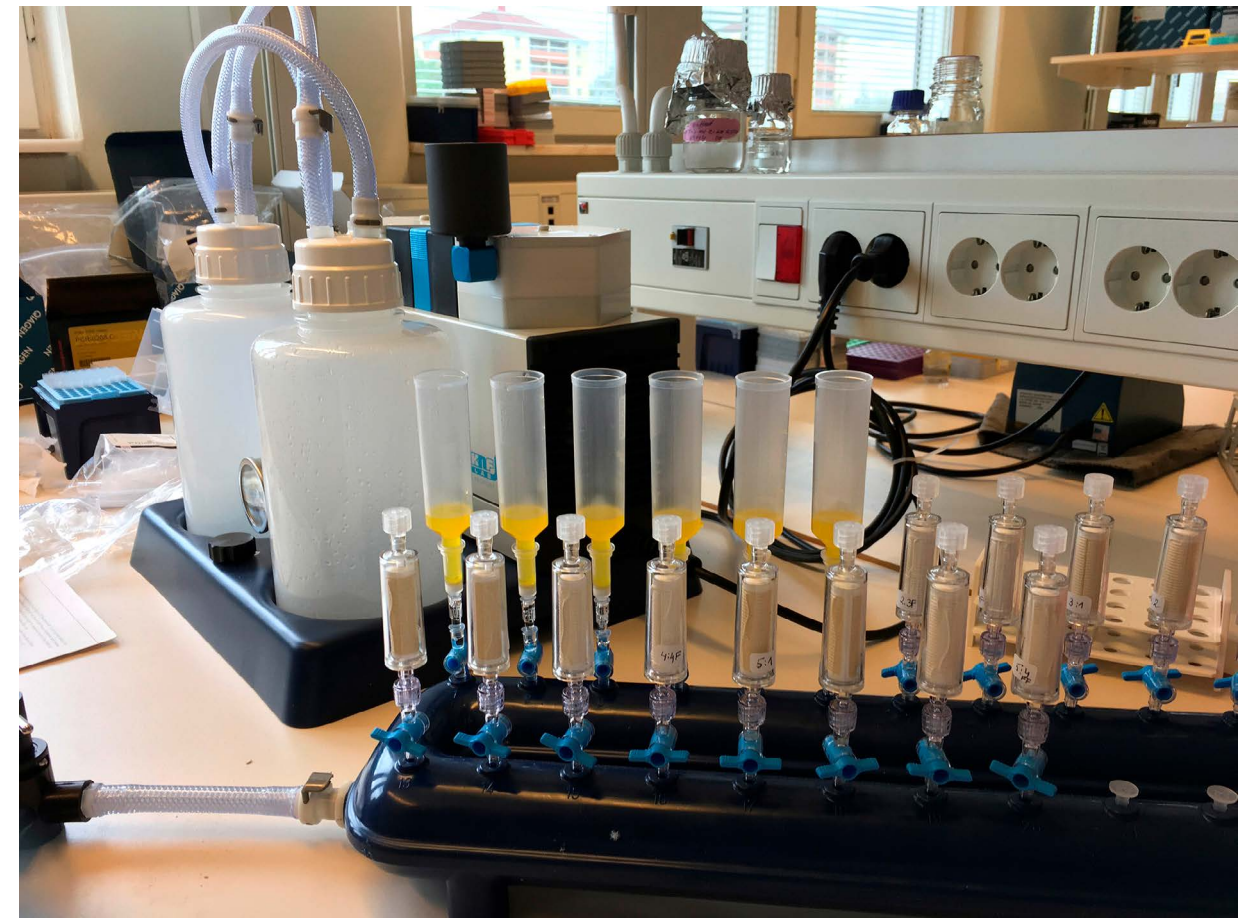
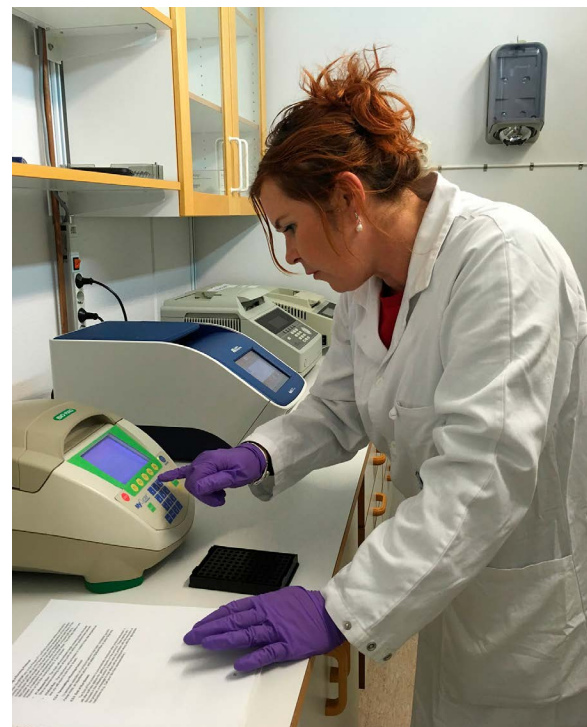
XXXXX XXXXXXXXXXXX XXXXXX XXXXXX XXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXX
X XXXXXXXX XXX XXXXXXXXXXXX X XXXXXXXXXXXX XXXXXXX XXXXXXX XXXX
XXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

Laboratoriearbete:

- Extraktionsmetod
- Markörer och primers
- PCR
- Sekvensering
- Negativ kontroll

Extraktionsmetod. Hur extraheras DNA från filtret? Här krävs att man redovisar exakt vilken metod man använt, det är inte tillräckligt att hänvisa till namn på metodbeskrivningar. Det bör medfölja ett fullständigt extraktionsprotokoll med en rapport.

Markör och primers (se faktaruta för förklaring av ”markör” och ”primer”). Den markör som används mest för fiskundersökningar är 12S, ibland används också t.ex. COI. Oavsett markör finns det olika primer-sekvenser som är undersökningsspecifika, och därför måste det anges exakt vilken eller vilka som har använts. Det räcker inte med hänvisning till vetenskapliga arbeten där flera olika sekvenser finns publicerade. Valet av primers är avgörande för utfall och tolkning av resultat. Det bör följa med ett fullständigt PCR-protokoll med en rapport.



XXXXX XXXXXXXXXXXX XXXXXX XXXXXX XXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXX X XXXXXXXX XXX XXXXXXXXXXXX X XXXXXXXXXXXX XXXXXXX XXXX XXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

PCR-amplifiering (bibliotek-preparation). Här måste mängden för de olika kemikalierna i en PCR-reaktion anges, och det ska framgå om man använt modifierade primers (”blocking-primers”) för att blockera amplifiering av DNA från oönskade organismer (t.ex. mänskligt DNA). Temperatur för de olika stegen i PCR-amplifiering ska anges eftersom förhållanden för PCR har stor påverkan på mängden sekvenser man får ut för sin målgrupp (fisk) och andra, oönskade, grupper samt sannolikhet att fånga upp alla de olika fisksekvenser som kan finnas i provet. Informationen bör finnas i ett fullständigt PCR-protokoll som publiceras i samband med en rapport.

NGS-sekvensering (se faktaruta). Efter att markören masskopierats från fisk-DNA med hjälp av PCR ska det läsas av – dvs. sekvenseras. Detta utförs ofta av

antingen en akademisk facilitet eller ett kommersiellt företag som följer ett beprövat protokoll för den aktuella sekvenseringstekniken (ofta Illumina). Här bestäms hur mycket data man vill ha, och det är viktigt att redovisa det för att bedöma om datamängden per prov var tillräckligt stor. Vidare kan man välja längden på läsningar av PCR-fragmentet, och om varje fragment ska läsas från bägge håll (”PE-sekvensering”) eller bara från ett håll (”SE-sekvensering”). För att få säkra sekvenser utan fel bör läsningarna vara så långa att de täcker PCR-fragmentet nästan helt, och läsning från bägge håll (PE) är att föredra. Därför bör det framgå klart i rapporten vilken strategi som har valts.

Negativ kontroll. Metoderna för DNA-analys är mycket känsliga och risken för kontamination och falska resultat är stor. Det är därför nödvändigt med

kontrollprover (både under provtagning och i laboratoriarbete) som analyseras tillsammans med proverna, och att resultaten från dessa redovisas på ett sådant sätt att man kan bedöma hur kontrollen av kontamination genomförts i de olika stegen. Om denna information utelämnas kan läsaren inte själv uppskatta kvaliteten på resultaten.

Analysen av data – bioinformatik:

- Mängd sekvenser per prov
- Metod för kvalitetssäkring
- Data efter bioinformatisk filtrering
- Taxonomi/referensdatabas
- Mängd relevant DNA-data

Mängden rådata (sekvenser) per prov. För att kunna bedöma kvaliteten på sekvenseringen bör mängden sekvensdata anges (se nedan). Man strävar efter att få lika mycket data för varje prov, men det kan hända att vissa prover har genererat betydligt mindre data än de andra. Det är den minsta datamängden per prov som kommer att ligga till grund i de bioinformatiska analyserna, och den bör alltid redovisas.

Metod för kvalitetssäkring. Det är viktigt att ange hur sekvensdata har filtrerats för att ta bort sekvenser med dålig kvalitet. Då kan läsaren bedöma om alla sekvenser som man inte kan lita på tagits bort, och också uppskatta kvaliteten på filtrerade data.

Mängd data som är kvar efter filtrering. Det ska anges hur mycket data som blev kvar efter kvalitetsfiltreringen. Om laboratoriet utfördes korrekt får man ofta bra sekvensdata och det är inte mycket som behöver filtreras bort. Har laboratoriet varit problematiskt kan många sekvenser bli för korta, t.o.m. innehålla bara de tekniska hjälp-sekvenserna ("adaptrarna") och därmed vara oanvändbara.

Om man har använt för korta läsningar i jämförelsen av PCR-fragment blir många sekvenser osäkra och de kommer att exkluderas i filtreringen. Därför är det viktigt att veta hur många sekvenser som "höll måttet" och slutligen kunde användas för att uppskatta sammanställningen av fiskar i proverna.

Taxonomi/referensdatabas. Det bör anges vilken eller vilka referensdatabaser som använts i matchningen mellan sekvenser och artnamn. När man har fått

pålitliga sekvenser jämförs de med varandra för att gruppera identiska sekvenser, sedan räknar man deras förekomst i varje prov. I sista steget jämför man sina sekvenser med en referensdatabas som innehåller representativa sekvenser för olika arter – detta för att få fram information om vilka arter som påträffas i provet. Det går bara att hitta de arter där det finns artspecifika DNA-sekvenser i databasen, och därför är det avgörande vilken databas som har använts. Vad gäller markören 12S (som är den mest populära för fiskar) finns det i dagsläget ingen publik databas för de olika organismer på det sätt som det finns för andra markörer (t.ex. BOLD-databasen som hittills byggts upp framför allt med COI). Därför måste varje undersökning göra ett urval av vilka sekvenser man ska använda som sin referensdatabas. Är det 12S för alla möjliga organismer? Eller alla fiskar? Eller bara de fiskar som kan tänkas finnas i det undersökta vattendraget? Har man baserat urvalet på geografisk region eller enbart på taxa? *Mängd relevant DNA-data.* Mängden DNA-data som har gått att matcha mot arter i referensdatabasen är ett mått på hur bra undersökningen lyckats, och hur stabila resultaten är. De primers för 12S som nämns ovan är utvecklade för att fånga upp DNA från så många olika fiskarter som möjligt. Men, de kan också fånga upp DNA från andra organismer som finns i vattnet, som människor, groddjur och andra ryggradsdjur, och även DNA från bakterier. Dessa sekvenser kommer att falla bort i jämförelsen mot referensdatabasen och ställer därför normalt inte till med problem. Det kan dock hända att mycket, eller till och med majoritet av sekvenserna, kommer från organismer som inte tillhör målgruppen fisk, och då minskar mängden användbara data dramatiskt. Därför är det viktigt att redovisa hur mycket data som kom från målgruppen (fiskar) och kunde användas i analysen.

Utvärdering av resultat:

- Faunistik
- Analys
- Kontroller

Faunistik. Det bör finnas en diskussion om hur sannolika resultaten är, och hur de förhåller sig till an-

Centrala begrepp

Målartsanalys/metabarcoding. Om frågan är "finns den här arten på provtagningslokalen" kallar vi det målartsanalys. Utföraren designar ett primer-par som är specifikt för just den arten, och som "fångar upp" den artspecifika DNA-sekvensen om den förekommer i provet. Genom att använda sig av flera primer-par kan man söka efter flera arter samtidigt. Denna analys kräver ingen sekvensering och är därför både snabbare och billigare än metabarcoding.

När frågan är vilka arter som finns i ett område, eller undersökningen täcker fler arter som ska övervakas än vad som skulle vara praktiskt med målartsanalys, används metabarcoding. Mera generella primer-par kommer att fånga upp gener från många olika arter, det kan också vara arter som ligger utanför det egentliga intresset för undersökningen. Provet sekvenseras med någon NGS-teknik, vilket resulterar i ett stort antal sekvenser. Dessa matchas sedan mot bibliotek med gensekvenser av identifierade och kvalitetssäkrade arter (ett referensbibliotek). Finns en art inte i något referensbibliotek är det inte heller möjligt att koppla en gensekvens i provet till just den arten. När det gäller fiskar är biblioteken förhållandevis kompletta, och därför fungerar metoden generellt sett bra.

Ett problem med metabarcoding är att genkopior av en art som är ovanlig i provet kan "dränkas" av dominerande sekvenser av andra arter, och de kan därför vara svåra att upptäcka även om arten förekommer i miljön. Detta kan vara en orsak till s.k. falska negativa svar.

PCR-reaktion. PCR (Polymerase Chain Reaction) är en teknik för att i laboratoriet skapa ett stort antal kopior av en given DNA-sekvens. Detta krävs för att i ett senare skede kunna bestämma gensekvensen (som i metabarcoding). Det går också att övervaka själva PCR-processen, och en ökning av antalet kopior av en given sekvens under själva processen blir en direkt bekräftelse på förekomst av arten i provet. Det är detta som utnyttjas i målartsanalys; de två tekniska varianter av PCR som används i den här typen av analys är qPCR (q för quantitative) och ddPCR (dd för droplet digital).

Genetiska markörer. Även om det idag finns möjlighet att studera en arts hela genom är det onödigt inom miljöövervakningen där DNA-tekniker användas för att upptäcka, eller bestämma, arter. Istället fokuseras på de delar av genomet som vi vet fungerar för ändamålet och som är praktiskt användbara. Dessa gener kallas "markörer", och de flesta utgörs av en del av det DNA som finns i mitokondrierna. En vanlig genetisk markör för fisk är 12S, och för ryggradslösa djur är det vanligt att använda COI som artmarkör.

NGS. Från engelskans "next generation sequencing" är ett samlingsnamn för DNA-sekvenseringsteknologi med hög genomströmning. Miljoner eller miljarder DNA-strängar kan sekvenseras parallellt, vilket är en förutsättning för att kunna analysera hela biologiska samhällen samtidigt.

Primer. En kort enkelsträngad nukleinsyrasekvens (DNA-sekvens) som fungerar som startpunkt för PCR-reaktionen. Primern definierar den del av genen (markören) som ska kopieras i PCR-reaktionen. Kan designas på ett sådant sätt att det som kopieras är specifikt för en art (i målartsanalysen), eller görs mer generell så att många arter kopieras för en markör (metabarcoding).

dra befintliga data (provfiske, elfiske, allmän faunistisk kunskap, lokalens utseende, tidpunkten på året, m.m.) från samma område. Det är viktigt att ställa sig frågan om resultatet är rimligt?

Bioinformatisk analys. Det bör återspeglas hur pålitligt data anses vara, om mängden slutdata per prov bedöms som tillräcklig, och hur man tagit hänsyn till eventuell variation i datamängd mellan proverna. Hur har arter med få läsningar hanterats (dessa kan ju vara resultat av kontaminering under provtagningen eller laboratoriet, eller tillkomma med fågelspillning, med fiskeredskap eller liknande, se också nedan). Vad hittade man i de negativa kontrollerna och hur har den informationen hanterats i dataanalyserna? Är man säker på att referensdatabasen innehåller alla

fiskarter som kan vara aktuella för undersökningsområdet? Kan man med säkerhet bestämma alla sekvenser på artnivå eller finns det fall där olika arter kan sammanblandas?

Kontrollfunktioner. Här bör anges hur kontamination hanterats, och hur risken för falska positiva resultat beaktats. Alltså bör man återge eventuella tekniska artefakter som kan påvisas från lab-resultat, men också beakta möjligheten att en art som påträffas i DNA egentligen inte har förekomst i området (t.ex. DNA från spillning från en förbiflygande fågel som ätit fisk). Hur hanteras risken att det finns falska negativa svar i provet, det vill säga att metoden inte har lyckats hitta en art fast den finns i området (se också ovan under *Bioinformatisk analys*)?

Tabell 1. Sammanställning av ett antal variabler som vi menar bör finnas med som minimum i en rapport (även om det också finns mer som kan vara värdefullt att förmedla). Syftet är att ge läsaren tillräcklig information för att: 1) kunna upprepa en genomförd studie; 2) förstå analysarbetet; 3) tydliggöra på vilka grunder slutsatser baseras.

		Finns	Saknas	Ofullständigt		
Provtagning	Position (koordinater)	14	0			
	datum	15	1			
	vattendrag (strömmande, stilla, etc.)	2	11	3		
	vattentemperatur	12	4			
	volym vatten vid provtagning (filtrerat)	13	3			
	djup provtagning	2	13	1		
	antalet prov/replik	14	1	1		
	typ av filter	5	11			
	Laboratoriearbete	tid mellan provtagning och fixering	3	9	4	
		förvaring mellan provtagning/fixering och extraktion	4	7	5	
extraktionsmetod		4	1	11		
primers		8	3	4	°°	
PCR-amplifiering		5	6	5		
NGS-sekvensering		4	6	4	**	
negativ kontroll		13	1	2		
Analys/bioinformatik		mängd rådata per prov	4	10		**
	metod för kvalitetsfiltrering	2	8	4	**	
	mängd data kvar efter filtrering	3	8	3	**	
	taxonomi/referensdatabas	2	1	11	**	
	mängd relevanta data (fisk)	12	1	1	**	
Utvärdering	faunistik	9	1	6		
	informatik	7	3	4	**	
	kontrollfunktioner	9	3	2	**	

Kommentarer: Med "ofullständigt" menas att det till exempel när det gäller extraktion hänvisas till en vetenskaplig artikel där det finns flera olika protokoll.

** inte relevant i de två studierna som handlar om målartsanalys

°° I ett fall av målartsanalys får primern, som en del i ett utarbetat protokoll, anses vara en företagshemlighet och inte behöva redovisas.

Vad säger egentligen rapporterna?

Vi har gått igenom 14 rapporter som har undersökt fiskfaunan med metabarcoding, och två rapporter där man har letat efter en specifik art (målartsanalys, qPCR eller ddPCR). För varje rapport har vi bedömt i vilken grad den uppfyller de krav på information (ovan) som vi menar bör finnas för att kunna värdera tillförlitligheten i resultaten och för att kunna upprepa

undersökningen med samma metod och samma förutsättningar. Resultatet av genomgången redovisas i Tabell 1. Sammanställningen redovisar anonymiserade resultat från undersökningar beställda av myndigheter eller vattenvårdsförbund.

Ingen av rapporterna är fullständig när det kommer till den av oss efterfrågade informationen, men det finns ett fåtal som uppfyller merparten av kraven.

Att viss information saknas kanske inte betyder så mycket för resultatets tillförlitlighet, utan mer för möjligheten att upprepa undersökningen med samma förutsättningar. Det är mer problematiskt när viktig information om till exempel filtertyp saknas och bara anges i allmänna termer, när vi vet att typ av filter och porstorlek påverkar resultatet. Ytterligare en viktig faktor är extraktionsmetod; vissa rapporter refererar till vetenskapliga artiklar som innehåller flera olika protokoll, och det går därför inte att säga exakt vilket protokoll som använts. Om rapporten inte återger vare sig detaljer om filter eller extraktionsmetod är det omöjligt att bedöma resultatets kvalitet och undersökningen går inte att upprepa.

För de undersökningar som analyserar flera arter samtidigt är den bioinformatiska analysen avgörande. I flertalet rapporter saknas en kvalificerad genomgång av analys och tillvägagångssätt – saker som lägger grund för hur resultat tolkas. I vissa fall ges allmänna upplysningar om hur många arter som finns i de databaser som sekvenser har matchats mot för att avgöra arttillhörighet, men det ges inga fullständiga referenser eller beskrivningar av referensdatabaser som använts. Kopplat till detta saknas ibland kritiska resonemang om till exempel oväntade arter som har identifierats. Det är i inget fall klargjort om det är sanna förekomster, kontaminering eller fel som har uppkommit vid PCR, sekvensering eller vid matchningen mot databaser! Vi konstaterar att de flesta av undersökningarna inte skulle gå att repetera utifrån den information som angetts i rapporterna.

Hur får man ut maximalt av eDNA-tekniken?

Vi menar att den information som alltid bör anges i anslutning till eDNA-analyser av fiskförekomst saknas, eller är ofullständig, i flertalet rapporter vi hittat. Utan tillgång till denna information går det inte att göra en kvalificerad bedömning av resultatet. Det är viktigt för en beställare av eDNA-undersökningar att vara tydlig med frågeställningen: handlar det om att påvisa förekomsten av en (1) art, eller ska undersökningen visa vilka arter som finns i en miljö? Det är två helt olika frågor för teknik-

en att hantera. Med en tydlig kravspecifikation från beställaren motiveras utförare att tänka igenom och kvalitetssäkra undersökningens olika steg och innehållet i rapporterna får därigenom högre trovärdighet. Vi ser tekniken som extremt lovande och effektiv i flera sammanhang, men också som komplex och kunskapskrävande. För en beställare inom offentlig sektor finns uppenbara begränsningar för hur mycket kunskap som kan täckas, och det kan kanske vara en idé att få en oberoende granskning och tolkning av resultat och rapporter om den egna kompetensen inte räcker till. En utgångspunkt kan vara vår föreslagna lista över variabler, en annan kan vara att ta del av de studier och resultat som föreslår standardisering av protokoll för vissa specifika undersökningstyper. Det finns gott hopp om att tekniken levererar – bara vi noga orkar läsa instruktionsboken och kritiskt reflektera över resultaten. Sist men inte minst – vi kommer aldrig ifrån den biologiska kompetensen! Det krävs någon med faunistisk erfarenhet som kan avgöra resultatets rimlighet utifrån biologisk kunskap och erfarenheter i naturen. ●

Litteraturtips

- Bohman, P. 2018. eDNA i en droppe vatten. Vattenprovtagning av DNA från fisk, kräftor och musslor – en kunskapssammanställning. Aqua reports 2018:18. Institutionen för akvatiska resurser, Sveriges lantbruksuniversitet, Drottningholm Lysekil Öregrund. 184 s.
- Nicholson, A., McIsaac, D., MacDonald, C., Gec, P., Mason, B.E., Rein, W., Wrobel, J., de Boer, M., Milián-García, Y. & Hanner, R.E. 2020. An analysis of metadata reporting in freshwater environmental DNA research calls for the development of best practice guidelines. – Environmental DNA 2: 343–349.
- Taberlet, P., Bonin, A., Zinger, L. & Coissac, E. 2018. Environmental DNA. For biodiversity research and monitoring. Oxford University Press, Oxford. 253 s.
- Wahlberg, E. 2019. Kartläggning av tvåvingar med miljö-DNA – mer än bara en fluga. – Fauna och Flora 114(4): 20–26.

Per Sundberg, Marina Panova, Malin Strand & Mikael Svensson
E-post: per.sundberg@gu.se