

DOI 10.17516/1997-1389-0398

EDN: PQVEDZ

УДК 597.4/5:577.213.3

Environmental DNA (eDNA) in Fish Biodiversity Studies

Olesya V. Kolmakova*

*Institute of Biophysics SB RAS,
Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”
Krasnoyarsk, Russian Federation*

Received 08.09.2022, received in revised form 28.09.2022, accepted 14.10.2022, published online 07.11.2022

Abstract. In the last decade, identification of organisms by trace DNA (eDNA) shed into the environment has gained popularity. The main eDNA applications include monitoring of invasive species, conservation of rare species, and assessment of community status. In many countries, environmental practitioners and legislators have already incorporated the eDNA-based methods into routine monitoring schemes, including human impact assessment. In this review, we discuss the methodology, prospects and challenges associated with the use of eDNA for assessing biodiversity of fish communities.

Keywords: environmental DNA, fish, biodiversity, metabarcoding.

Acknowledgements. This study was supported by Federal Tasks for Institute of Biophysics SB RAS No. 0287-2021-0019.

Citation: Kolmakova O. V. Environmental DNA (eDNA) in fish biodiversity studies. J. Sib. Fed. Univ. Biol., 2023, 16(1), 5–23. DOI: 10.17516/1997-1389-0398



Экосистемная ДНК (эДНК) в исследованиях биоразнообразия рыб

О. В. Колмакова

*Институт биофизики СО РАН
Федеральный исследовательский центр
«Красноярский научный центр СО РАН»
Российская Федерация, Красноярск*

Аннотация. В последнее десятилетие набирает популярность идентификация организмов по ДНК, оставляемой ими в окружающей среде – эДНК. К основным областям применения эДНК относят мониторинг видов-вселенцев, сохранение редких видов, оценку состояния сообществ. Во многих странах специалисты-практики и законодатели в области охраны окружающей среды уже включили методы, основанные на эДНК, в рутинные схемы мониторинга, в том числе в комплекс мер оценки антропогенного воздействия на окружающую среду. В этом обзоре мы обсудим методологию, перспективы и проблемы, связанные с применением эДНК для оценки биоразнообразия рыбных сообществ.

Ключевые слова: экосистемная ДНК, акваДНК, ДНК окружающей среды, рыбы, биоразнообразие, метабаркодинг.

Благодарности. Работа выполнена по теме Госзадания ИБФ СО РАН № 0287-2021-0019.

Цитирование: Колмакова, О. В. Экосистемная ДНК (эДНК) в исследованиях биоразнообразия рыб / О. В. Колмакова // Журн. Сиб. федер. ун-та. Биология, 2023. 16(1). С. 5–23. DOI: 10.17516/1997-1389-0398

Введение

Изучение биоразнообразия имеет важнейшее значение для понимания принципов функционирования экосистем и охраны окружающей среды (Duffy et al., 2007; Hillebrand, Matthiessen, 2009). Вместе с тем на практике изучение биоразнообразия может быть весьма сложной задачей. Важным объектом изучения являются рыбы как терминальные консументы в трофических цепях и как объекты промысла (Helfman, 2007). Традиционно при исследовании биоразнообразия рыб используются различные стандартизированные инструменты для отлова и учёта. Сочетание нескольких типов снастей, таких как ставные (жаберные) сети, неводы и тралы, а также электролов (запрещенный

в Российской Федерации) позволяет отловить рыб разных размерных групп и населяющих различные места обитания (Gehrig et al., 2021). Однако даже при сочетании нескольких методов отлова многие виды могут оставаться не обнаруженными, и учётная выборка практически никогда полностью не отражает истинный состав сообщества. Существуют также дополнительные проблемы традиционного отбора проб: неправильная идентификация видов в полевых условиях, высокая стоимость организации и проведения работ, значительные требования к инфраструктуре и рабочей силе, потенциальное разрушение среды обитания при отлове, стресс и гибель рыб и других гидробионтов, а также невозможность обнаружить редкие или

«неуловимые» виды (Gehri et al., 2021; Czachur et al., 2022). Зачастую именно редко встречающиеся виды представляют особый интерес для контролирующих организаций, например, находящиеся под угрозой исчезновения или, напротив, виды-вселенцы на начальной стадии распространения в новые места обитания. Следовательно, ложноотрицательные результаты могут привести к ошибочным интерпретациям и нерациональным решениям в сфере охраны и рационального использования водных биоресурсов.

На рубеже XX и XXI веков молекулярно-генетические методы прочно вошли в арсенал исследователей окружающей среды и даже с переменным успехом вытесняют традиционные методы экологических исследований. Сначала, благодаря методам секвенирования ДНК, стало возможно заглянуть в богатый мир некультивируемых микроорганизмов и открыть тысячи новых видов – прорыв сравнимый с изобретением микроскопа (Shokralla et al., 2012). Затем те же методы приняли на вооружение исследователи более крупных, но порой трудноуловимых представителей флоры и фауны (Thomsen, Willerslev, 2015). Многоклеточные организмы оставляют в окружающей среде свою ДНК, благодаря чему об их присутствии можно узнать даже тогда, когда их уже и «след простыл». Организмы выделяют ДНК в окружающую среду вместе с отслоившимися тканями, гаметами и отходами жизнедеятельности (Gehri et al., 2021). Выделяться может свободная внеклеточная ДНК, но чаще это ДНК в клетках и их фрагментах (Saito, Doi, 2021), называемая в англоязычной литературе *environmental DNA* (eDNA), в смысловом переводе на русский язык «экосистемная ДНК» (эДНК), или «ДНК окружающей среды» (Кирильчик и др., 2018). Таким образом, эДНК – это генетический материал, собранный непосредственно

из проб окружающей среды без предварительного отлова отдельных организмов (Taberlet et al., 2018). В последние несколько лет исследователи стали принимать во внимание эРНК, которая также является источником информации о присутствии видов в окружающей среде (Yates et al., 2021).

В качестве пробы обычно берут образец воды из природного водоёма, поскольку в ней содержится эДНК как гидробионтов, так зачастую и наземных обитателей водосборного бассейна. Поэтому другое название, предложенное российскими учёными, – «акваДНК» (Никифоров и др., 2018). Не только вода, но и донные отложения, почва и поверхность растений могут служить местами находок эДНК, а в последнее время стало известно о возможности идентифицировать организмы по эДНК из воздуха (Clare et al., 2022; Johnson et al., 2021). И всё же большинство публикаций касается водной среды, и наиболее часто исследуемый объект – это рыбы ввиду их исключительной промыслово-хозяйственной важности. Данный обзор посвящён текущему состоянию дел в области исследований биоразнообразия рыб с помощью эДНК.

Ключевые этапы рабочего процесса

В исследованиях биоразнообразия метод эДНК используется в сочетании с метабаркодингом – параллельной амплификацией ДНК множества организмов из смешанной пробы с использованием универсальных праймеров и последующим высокопроизводительным секвенированием. С момента начала внедрения технологии около десяти лет назад опубликованы сотни исследований с применением самых различных методов отбора проб, выделения ДНК, амплификации маркерных участков, секвенирования и последующей обработки данных (Shu et al., 2020; Wang et al., 2021). В последнее время предпринима-

ются шаги для унификации методик, например инициативы по созданию eDNA Society [<https://ednasociety.org/en/>] в Японии с опубликованной методикой (The eDNA Society, 2019), европейское объединение исследователей COST Action DNAqua-Net [<https://dnaqua.net>] с собственным практическим руководством. В данном разделе мы проведём краткий обзор широко применяемых методик, особое внимание уделив наиболее критичным этапам, на которых нужно выбрать оптимальный подход среди нескольких применимых методов. Также мы обсудим последние тренды стандартизации мониторинга рыбных сообществ с помощью эДНК.

Отбор проб

Самым первым и наиболее важным этапом любого исследования природных экосистем является грамотно спланированный и качественно проведённый пробоотбор. На этапе подготовки необходимо определить место и время пробоотбора в зависимости от поставленных целей. Концентрация эДНК в воде зависит от сезона, причём в умеренной зоне общая схема выглядит так: минимальная концентрация зимой и максимальная в период нереста (Hayami et al., 2020). Необходимо учитывать такие факторы, как сезонная стратификация озёр, гидрологический режим, миграция рыб и даже «цветение» воды фитопланктоном, которое может ингибировать амплификацию ДНК (Bruce et al., 2021; Littlefair et al., 2021). Выбор станций для пробоотбора зависит от типа и морфологии водоёма, в особенности от расположения естественных преград для миграции эДНК, а также потенциальных источников контаминации: сточных вод, мест рыбной ловли и других видов человеческой деятельности (Harper et al., 2019; The eDNA Society, 2019). При отборе проб следует избегать взмучивания донных отложений,

так как эДНК в них может сохраняться гораздо дольше, чем в воде (Wood et al., 2020).

Объём и число проб могут серьёзно влиять на результат оценки биоразнообразия рыб. Тем не менее чётко определённого универсального значения этих показателей нет и быть не может. Необходимый объём проб зависит от типа водоёма: например, в чистых олиготрофных водах, таких как открытое море, концентрация эДНК ниже, поэтому нужны пробы большего объёма, чем в заливах (Kumar et al., 2022). Бессей с соавторами (Bessey et al., 2020) советуют отбирать настолько большой объём воды, насколько это возможно (вплоть до десятков литров). В то же время для континентальных вод объём 1–2 литра считается достаточным. Минимально необходимое число проб зависит от цели исследования, типа и размера водоёма, наличия разных местообитаний в пределах одного водоёма (Bruce et al., 2021). Для морских экосистем (Czachur et al., 2022) рекомендуют брать пробы в трёх повторностях на как можно большем количестве станций. Так, Бессей с соавторами (Bessey et al., 2020) сообщают, что равные по объёму аликвоты проб из одного и того же объёма морской воды содержат менее 60 % общих видов. Авторы рекомендуют предоставлять кривую аккумуляции видов, чтобы подтвердить эффективность исследования. Максимальное число проб ограничивается только финансовыми и временными возможностями исследователей. Отчёт британской Службы окружающей среды (Environment Agency) свидетельствует, что 10–20 станций пробоотбора достаточно для описания разнообразия видов в озере большого размера (Hänfling et al., 2016a).

Концентрирование эДНК

Сразу после отбора пробы или при первой возможности необходимо концентриро-

вать эДНК из объёма воды во избежание деградации генетического материала (Goldberg et al., 2016). Наиболее часто для этого используется фильтрация, реже спиртовое осаждение. Материал мембраны (нитрат целлюлозы, полиэфирсульфан, поливинилидендифторид, поликарбонат или стекловолокно) и размер пор (существенно различается, но обычно менее 1 мкм) ограничивают объем воды, который может быть пропущен через один фильтр (Goldberg et al., 2016). Сравнение разных типов фильтров показало преимущество стекловолоконных мембран над поликарбонатными (Eichmiller et al., 2016). Есть предложения использовать положительно заряженные фильтры для более эффективного удержания эДНК на поверхности фильтра (Zaiko et al., 2022).

Максимальный размер пор фильтра ограничивается тем, что при слишком большом размере пор клетки и другие ДНК-содержащие частицы могут проходить через фильтр вместе с фильтратом. Размер большинства частиц, содержащих эДНК рыб, составляет 1–10 мкм, поэтому теоретически потеря эДНК должна быть минимальной при размерах пор до 1 мкм (Bruce et al., 2021). Кумар с соавторами (Kumar et al., 2022) обнаружили, что фильтры с порами любого размера в пределах 0,2–3 мкм улавливают схожие концентрации эДНК и, соответственно, дают схожие оценки разнообразия рыб, однако поры меньшего размера могут забиваться быстрее, что важно учитывать при отборе проб воды с большим количеством взвешенного вещества. Аналогично в исследовании Зайко с соавторами (Zaiko et al., 2022) фильтры с большим размером пор (5 мкм) позволяли проводить фильтрацию больших объёмов воды быстрее по сравнению с порами меньшего размера, при этом сохранялась эффективность концентрирования эДНК и эРНК. Быстрая филь-

трация позволяет сократить деградацию генетического материала, что особенно важно в случае эРНК. Во избежание контаминации рекомендуется использование закрытого картриджа вместо мембранных фильтров (Wong et al., 2020), однако выбор размеров фильтров и типов мембран в этом случае ограничен. После фильтрации фильтр замораживают, сушат или консервируют и хранят до выделения ДНК (Mauvisseau et al., 2021). Длительное хранение фильтров не рекомендуется, так как уменьшается концентрация выделенной ДНК (Kumar et al., 2022).

Выделение ДНК

Для выделения ДНК чаще всего используются коммерческие наборы и гораздо реже методы разделения жидких фаз: с применением фенол-хлороформа или цетилтриметиламмоний бромида (Wang et al., 2021). Эффективность методов сильно различается как по концентрации выделенной ДНК, так и по степени чистоты экстракта. Оптимальное соотношение цена/выход ДНК у фенол-хлороформного метода экстракции (Goldberg et al., 2016), но некоторые исследователи отмечают недостаточную очистку от ингибиторов ПЦР при его использовании (Kumar et al., 2022). Тем не менее вне зависимости от разной эффективности методов выделения ДНК итоговый результат оценки разнообразия может оказаться схожим.

Подготовка библиотек для секвенирования

При создании метабаркодинговых библиотек для секвенирования происходит три основных процесса: ПЦР-амплификация баркодингового участка; присоединение к ампликонам уникальных для каждой пробы индексов, состоящих из нескольких нуклеотидов (это позволяет наносить множество об-

разцов на одну проточную ячейку – уникальный индекс поможет различить пробы при последующей биоинформатической обработке); пришивка адапторов для последующего прикрепления ампликона к проточной ячейке для секвенирования. Ключевым на этом этапе является выбор молекулярного маркера и олигонуклеотидных праймеров для его амплификации.

Для метабаркодинговых исследований применяются самые разные молекулярные маркеры, в основном участки мтДНК (COI, *cytb*, 12S рРНК, D-петля), которые подходят для разных таксонов и методов исследования (Wang et al., 2021). С другой стороны, высказываются мнения в поддержку использования маркеров ядерной ДНК, так как она менее подвержена количественным вариациям в зависимости от возраста и стадии развития организма (Jo et al., 2020). Оптимальный маркер обладает достаточным количеством переменных сайтов для различения видов, но в то же время содержит консервативные участки для отжига прямого и обратного праймеров. Исследователи и пользователи, применяющие в своей практике эДНК, признают, что требуется стандартизация метода (Zhang et al., 2020; Wang et al., 2021). В частности, в Японии создано Общество эДНК (eDNA Society, <https://ednasociety.org/en/>), целью которого является продвижение и стандартизация метода для устойчивого природопользования и охраны окружающей среды. Им рекомендуется для метабаркодинговых исследований разнообразия рыб использовать праймеры MiFish-U (Miya et al., 2015), предназначенные для амплификации участка 12S рРНК длиной примерно 170 пар нуклеотидов. MiFish-U является одной из наиболее часто и успешно применяемых пар праймеров, однако и она не является оптимальной для всех таксонов. В идеале маркер должен обладать

высокой специфичностью ко всем рыбам исследуемой группы, пропорционально амплифицироваться у разных видов и иметь высокую разрешающую способность (Zhang et al., 2020). Длина маркера также имеет значение: чем длиннее фрагмент, тем больше переменных сайтов и лучше таксономическая идентификация. Однако, с другой стороны, короткие баркоды успешней амплифицируются и медленнее деградируют в окружающей среде (Jo et al., 2017). Длина фрагмента также ограничена возможностями технологии секвенирования. Например, у наиболее часто применяемой Illumina MiSeq это около 450 пар нуклеотидов (Bruce et al., 2021). Наконец, наличие хороших баз данных маркерных последовательностей также играет важную роль для успеха баркодинга. Все эти требования могут быть недостижимы, если использовать только одну пару праймеров. Некоторые авторы по этой причине предлагают использовать сочетание двух или более праймеров с разными свойствами (Polanco et al., 2021).

В работе (Shu et al., 2020) была оценена эффективность 18 часто применяемых пар праймеров *in silico* путем выбора наиболее оптимальных по сочетанию следующих параметров: количество охватываемых видов, длина маркера, разрешающая способность и специфичность амплификации. На втором этапе исследователи сравнили 4 пары наиболее перспективных праймеров между собой в контролируемом эксперименте с 6 видами рыб в разных пропорциях. MiFish-U и 2 пары 16S рРНК праймеров показали наилучший результат, в том числе значимую положительную зависимость между числом прочтений секвенирования и биомассой видов. В другом исследовании (Zhang et al., 2020) были протестированы 22 пары праймеров *in silico*, а затем в метабаркодинговом исследовании *in situ*. 12S рРНК праймеры, в том числе

MiFish-U, превосходили все другие по детекции разнообразия рыб (числу амплифицированных видов). Альтернатива выбору одного маркерного участка была предложена Дейнер с соавторами (Deiner et al., 2017), которые рекомендовали митогеномный метабаркодинг рыб с помощью пары праймеров, позволяющей амплифицировать всю молекулу мтДНК. Впоследствии продукт амплификации был фрагментирован и отсековирован по стандартному протоколу. Преимуществом такого метода является высокое разрешение при идентификации видов.

Секвенирование

В подавляющем большинстве метабаркодинговых исследований используется технология секвенирования путём синтеза, осуществляемого на оборудовании производителя Illumina, поскольку она зарекомендовала себя наилучшим соотношением цены и качества (Bruce et al., 2021). В последнее время всё популярнее становится технология нанопорового секвенирования Oxford Nanopore на компактном приборе MinION по причине доступной цены оборудования, портативности и большой длины прочтения, что может быть значительным преимуществом в случае секвенирования длинных последовательностей или целого митогенома (Franco-Sierra, Díaz-Nieto, 2020). С другой стороны, технология нанопорового секвенирования характеризуется большим процентом ошибок и более высокой стоимостью секвенирования в пересчете на число нуклеотидов.

Биоинформатический анализ

По окончании секвенирования полученные сырые прочтения нуклеотидных последовательностей подвергаются биоинформатической обработке. Для этого используются биоинформатические конвейеры, как

изначально разработанные для микробиологических исследований, например QIIME 2 (Bolyen et al., 2019) и dada2 (Callahan et al., 2016), так и специализированные на метабаркодинге эДНК, такие как barque и OBITools (Mathon et al., 2021). Разработаны приложения для пользователей, не обладающих биоинформатическими навыками, например SLIM (Dufresne et al., 2019). SLIM имеет пользовательский интерфейс и позволяет пользоваться алгоритмами dada2, vsearch и др. Относительно мало информации доступно о том, какая программа лучше подходит для решения тех или иных задач. Маче с соавторами (Macé et al., 2022) сравнили несколько конвейерных программ для оценки внутривидового разнообразия по данным секвенирования эДНК и пришли к выводу, что dada2 является наилучшей.

Общий принцип биоинформатической обработки «сырых» нуклеотидных прочтений сводится к следующим этапам (в зависимости от используемого алгоритма этапы могут проходить в разном порядке):

- демультиплексирование последовательностей, то есть разделение всего пула прочтений на отдельные образцы, благодаря уникальным индексам;

- удаление последовательностей праймеров, адаптеров и индексов;

- фильтрация по качеству и длине прочтений;

- распределение прочтений на группы близких ОТЕ (операционные таксономические единицы, в англоязычном варианте – operation taxonomic units, OTU) или идентичных последовательностей ВПА (варианты последовательности ампликонов, amplicon sequence variants – ASV);

- удаление химерных последовательностей, которые спонтанно образуются из разных молекул ДНК в ходе амплификации;

создание таблицы ОТЕ или ВПА, отражающей число каждого вида последовательности в соответствующем образце;

таксономическая аннотация последовательностей на основе информации в специализированных базах данных.

Заметным препятствием на пути применения метода эДНК является неполнота баз данных, применяемых для таксономической аннотации рыб. Дело в том, что в баркодинговых исследованиях отдельных организмов в качестве «золотого стандарта» применялся участок митохондриального гена COI. Сдвиг основного маркера с COI на 12S рРНК потребовал дополнения информации об этих последовательностях в существующих базах данных, таких как Genbank, или создание новых, специализированных на метабаркодинге рыб. Перспективной в этом отношении является база митохондриальных геномов рыб MitoFish (Sato et al., 2018).

Оценка биомассы и численности рыб на основе данных метабаркодинга эДНК

Можно ли с помощью эДНК определить не только наличие/отсутствие видов рыб, но и дать количественную оценку их разнообразия? В первую очередь исследователей интересует численность и биомасса. Сочетание высокопроизводительного секвенирования с количественной ПЦР (кПЦР) позволяет провести приблизительную оценку численности и биомассы отдельных видов рыб. Мета-анализ, выполненный Ятес с соавторами (Yates et al., 2019), подтвердил, что концентрация видоспецифичной эДНК положительно коррелирует с биомассой в лабораторных исследованиях (82 % наблюдаемой вариации), но в меньшей степени в полевых исследованиях (57 % наблюдаемой вариации). Ушио с соавторами (Ushio et al., 2018) показали возможность количественной оценки копий эДНК

рыб с помощью использования внутренних стандартных ДНК, добавленных к образцам природной эДНК. В качестве стандартов использовались известные количества коротких фрагментов ДНК видов рыб, которые никогда не наблюдались в районе отбора проб. Расчётное число копий внутренних стандартов показало значительную положительную корреляцию с числами, определенными с помощью кПЦР, что позволяет предположить, что метабаркодинг с добавлением стандартной ДНК обеспечивает достоверную количественную оценку эДНК. Кроме того, для образцов, в которых наблюдается высокий уровень ингибирования ПЦР, этот метод может обеспечить более точную количественную оценку, чем кПЦР, потому что поправочные уравнения, созданные с использованием внутренних стандартных ДНК, будут учитывать эффект ингибирования ПЦР.

Количественная оценка разнообразия видов зависит от концентрации их эДНК во время отбора проб, которая определяется взаимодействием между процессами выделения, транспорта, ресуспендирования и распада эДНК в водоёме (Shogren et al., 2019; Trujillo-González et al., 2021). Также большую роль играют ошибки, случающиеся при отборе и обработке проб и интерпретации результатов. Например, амплификация маркерных участков значительно искажает изначальное соотношение эДНК разных видов в пробе, и хотя разработаны методы, позволяющие обходиться без ПЦР (shotgun секвенирование и целевой захват ДНК), используются они редко по причине высокой стоимости (Wang et al., 2021). В любом случае количественные результаты, выражаемые в виде числа прочтений каждого вида/гаплотипа/ОТЕ, нельзя напрямую соотносить с числом особей соответствующего вида, поскольку на итоговое число прочтений влияет большое количество

факторов. Тем не менее при грамотном использовании и интерпретации данные секвенирования дают примерное представление об относительной численности рыб. В этом разделе мы обсудим ключевые параметры, определяющие концентрацию эДНК, и ограничения этого метода для оценки биоразнообразия рыб.

Скорость выделения эДНК в окружающую среду

Скорость выделения эДНК в окружающую среду сильно варьирует в зависимости от многих факторов: вида рыбы, физиологического состояния (стресс/покой), уровня метаболизма (температура, жизненная стадия, сезонная активность, размер тела) (Rourke et al., 2022). Только что выловленные рыбы, помещённые в аквариум, выделяют больше эДНК, так как они более подвижны и находятся в стрессовом состоянии (Maquyama et al., 2014). Чем меньше и моложе животное, тем выше уровень метаболизма и больше ДНК на единицу массы тела оно выделяет. Поскольку уровень метаболизма рыб зависит от температуры окружающей среды и от количества и качества потребляемой пищи, это также сказывается на скорости выделения ДНК. Выделение ДНК значительно усиливается во время нереста, особенно в результате выделения половых продуктов в среду и возрастающей активности (Bruce et al., 2021). Более того, нельзя не учитывать неравномерность экскреции ДНК во времени: в некоторых экспериментах было показано, что в разные дни одна и та же рыба может выделять эДНК в количествах, различающихся на два порядка.

Неравномерность распределения эДНК

Рыбы распределены в водной среде неравномерно, часто собираются в косяки

и стайки, а также могут предпочитать одни участки водоёма другим или обитать на определённой глубине, в результате чего эДНК также имеет неравномерное распределение в пространстве (Rourke et al., 2022). Так, Хаями с соавторами (Hayami et al., 2020) обнаружили больше видов рыб на отмели, чем в центре водохранилища.

Движение водных масс также влияет на распределение эДНК в водоёме, особенно усложняется распределение ДНК в реках и других водоёмах с высокой скоростью течения, а также в приливно-отливной зоне. В некоторых исследованиях пик концентрации эДНК в реке наблюдался в 50–70 метрах ниже по течению от места нахождения косяка рыбы, тогда как в других работах обнаружено, что эДНК не детектируется на некотором удалении от её источника (Bruce et al., 2021). Большое влияние на скорость перемещения эДНК может иметь адсорбция эДНК на разных типах донных субстратов, где она может удерживаться и потом снова смываться водными массами (Fremier et al., 2019). В некоторых случаях за счет адсорбции на донном субстрате из воды исчезает больше эДНК, чем за счет деградации (Shogren et al., 2019).

Скорость деградации ДНК

От скорости деградации эДНК зависит, в течение какого времени возможна детекция видов (Holman et al., 2022). С одной стороны, благодаря тому, что эДНК разрушается, по её наличию можно судить об актуальном статусе вида в данной точке. С другой стороны, в некоторых случаях быстрая деградация препятствует детекции вида, населяющего водоём. Деградация происходит в основном в результате деятельности микроорганизмов и активности внеклеточных ферментов (Saito, Doi, 2021). Обнаружено, что деградация не всегда происходит с по-

стоянной скоростью, а скорее «скачкообразно», что может быть связано с изначальным разрушением клеток и освобождением ДНК, затем деградацией самой ДНК микроорганизмами. Основными факторами, влияющими на скорость деградации эДНК, являются в первую очередь температура и в меньшей степени солнечный свет (ультрафиолет) и химический состав воды (Holman et al., 2022). Щелочная среда, постоянная температура, высокая соленость и концентрация ионов уменьшают скорость деградации эДНК (Collins et al., 2018). Так, скорость деградации эДНК карпа значительно отличалась в дистрофных, эвтрофных и олиготрофных озёрах, что объясняется связыванием эДНК с растворённым органическим веществом, препятствующим ферментативной деградации (Eichmiller et al., 2016). Имеет значение даже вид организмов и расположение маркерного участка – в ядерной, митохондриальной или рибосомной ДНК, так как органеллы деградируют с разной скоростью (Collins et al., 2018). Обычно полная деградация эДНК происходит примерно за 2–7 дней, однако может быть и от нескольких часов до тысячелетий (Holman et al., 2022; Saito, Doi, 2021). Также стоит учитывать, что чем длиннее маркерный фрагмент, тем быстрее он будет деградировать, поэтому длинные фрагменты более точно свидетельствуют о текущей численности организмов (Jo et al., 2017), в то время как короткие фрагменты эДНК могут быть детектированы долгое время после перемещения или смерти организмов, что является примером ложноположительного результата.

Чтобы избежать ложноположительных результатов из-за длительной стабильности эДНК после перемещения или гибели организма, предлагается дополнительно одновременно исследовать эРНК (РНК окружающей

среды) (Pochon et al., 2017). эРНК считается менее устойчивой в окружающей среде молекулой, однако есть случаи обнаружения эРНК спустя несколько часов после изъятия организма из водной среды (Wood et al., 2020). В любом случае соотношение концентраций эРНК/эДНК в воде уменьшается с течением времени при деградации, что может помочь определить возраст геномного материала (Marshall et al., 2021).

Контаминация

и ложноположительные результаты

Ложные положительные результаты могут быть также вызваны кросс-контаминацией, которая может случиться на любом этапе работы, как при отборе проб, так и в ходе лабораторного анализа (Thomsen, Willerslev, 2015). Во избежание этого работы должны проводиться квалифицированным персоналом, обработка проб должна осуществляться в оборудованной по всем правилам лаборатории (положительное давление, сменная одежда операторов, правильная организация рабочего процесса с разделением зон на пре-ПЦР, ПЦР и пост-ПЦР) (Darling et al., 2021). Для контроля контаминации на основных этапах к набору проб добавляют отрицательный контроль (Goldberg et al., 2016). Также отдельное внимание необходимо уделять аккуратности таксономической идентификации видов: правильному выбору праймеров, автоматической аннотации на основании последовательностей ДНК, потенциальной гибридизации видов (Darling et al., 2021; Gehri et al., 2021).

Ингибирование

и ложноотрицательные результаты

Ещё одним типом ошибки анализа биоразнообразия на основе эДНК являются ложноотрицательные результаты. Так, содержа-

щиеся в природной воде гуминовые вещества могут ингибировать ПЦР, приводя к ложноотрицательным результатам (Thomsen, Willerslev, 2015). Детектировать ингибирование помогает добавление внутреннего положительного контроля, представляющего собой ДНК целевых организмов, непосредственно в образец выделенной эДНК перед амплификацией (Goldberg et al., 2016). Бороться с ингибиторами помогает разбавление образцов, тщательная очистка образцов ДНК или добавление белков, таких как бычий сывороточный альбумин (Harper et al., 2019). В некоторых случаях эДНК не детектируется из-за низкой концентрации. В таких случаях параллельное выделение эРНК может помочь детекции благодаря относительно высокой концентрации рРНК (Marshall et al., 2021).

Сравнение эДНК

со стандартными методами оценки биоразнообразия рыб

Результаты учёта биоразнообразия рыб, полученные с помощью метабаркодинга эДНК, сравнимы или даже превосходят по эффективности традиционные методы учёта с помощью орудий лова или подводной видеодокументации (Gehri et al., 2021; Hallam et al., 2021; Wang et al., 2021). Основным преимуществом эДНК является неинвазивность технологии, так как не применяется лов самих рыб, и вмешательство в их местообитание является минимальным. Кроме того, традиционные методы трудоёмкие, требуют специального разрешения, а морфологическая идентификация может привести к ошибкам, поэтому требует навыков профессионального ихтиолога (Czachur et al., 2022; Kumar et al., 2022). Снижение затрат при использовании эДНК позволит проводить исследования чаще, охватывать большие территории. Бонусом эДНК также является «побочный» улов

при условии применения универсальных или дополнительных праймеров: поскольку пул метагеномной эДНК содержит молекулы всех обитателей водоёма, то помимо рыб можно идентифицировать амфибий, водных беспозвоночных, простейших, планктон и даже наземных животных с прилегающих к водоёму территорий (Nguyen et al., 2020; Macher et al., 2021).

Рыбы часто распределены в пространстве неравномерно: собираются в косяки, предпочитают держаться в определённых местах обитания, прячутся от хищников. По этой причине многие виды рыб могут быть не обнаружены стандартными методами, если орудие лова не было расположено в точке наибольшего скопления рыб. В то же время они могут быть обнаружены с помощью пробы эДНК, взятой на расстоянии десятков или сотен метров от места расположения рыб. Молекулы эДНК перемешиваются в толще воды при движении водных масс, поэтому эДНК распределена в водной среде более равномерно, чем сами рыбы. В этом преимущество использования метода эДНК для оценки наличия/отсутствия видов. С другой стороны, по причине «мобильности» использование эДНК может давать ложноположительный результат. Например, эДНК может переноситься на далёкие расстояния с фекалиями хищников, а также при перемещении мёртвых рыб хищниками или падальщиками (Goldberg et al., 2016), то есть эДНК долгое время остаётся детектируемой после смерти организма (Gehri et al., 2021). По этой причине рекомендуется дополнять эДНК одновременным исследованием эРНК. Разные скорости выделения и деградации эДНК и эРНК могут привести к более точным результатам оценки биоразнообразия, чем при использовании только одной технологии. Комбинация эДНК/эРНК может помочь в сложных для интерпре-

тации случаях и дать более точные данные (Marshall et al., 2021). Первое исследование, применившее оба метода одновременно для изучения биоразнообразия рыб, показало, что чувствительность эРНК была эквивалентна чувствительности эДНК; однако его прогностическая значимость положительного результата была выше, чем у эДНК (Miyata et al., 2021). Кроме того, исследование эРНК позволило выявить случаи ложноположительного обнаружения видов по эДНК в результате загрязнения водоёма сточными водами с содержанием отходов рыбопродуктов.

Несмотря на большое преимущество применения эДНК, важная информация может быть упущена или искажена, если не дополнять метабаркодинг эДНК традиционными методами. Например, данные о половой, возрастной и размерной структуре популяций, а также о межвидовой гибридизации не могут быть получены при использовании метабаркодинга эДНК (Goldberg et al., 2016; Gehri et al., 2021). Кроме того, как мы уже обсуждали выше, даже в контролируемых условиях эксперимента часто не удаётся обнаружить зависимость количества прочтений эДНК от количества особей или их биомассы (Shu et al., 2020). С осторожностью следует полагаться на данные эДНК при мониторингах биоразнообразия с целью охраны окружающей среды. В то время как обнаружение видов-вселенцев с помощью эДНК может дать ранний сигнал об их присутствии (Goldberg et al., 2016), использование исключительно эДНК для мониторинга редких видов может скрыть фактическое сокращение их численности.

Подводя итог сказанному, нельзя ожидать, что метабаркодирование эДНК полностью заменит стандартные методы для оценки популяций рыб. Для тех видов, которые легко обнаружить визуальным учётом, эДНК может быть даже менее эффективным мето-

дом. Однако применение эДНК в комбинации с зарекомендовавшими себя традиционными методами может помочь исследованию, эффективному использованию и охране популяций рыб.

Особенности применения эДНК для оценки биоразнообразия рыб в различных типах водоёмов

Озёра

Озёра являются классическими водоёмами для проведения метабаркодинга эДНК (Hänfling et al., 2016b; Valdez-Moreno et al., 2019; Littlefair et al., 2021). Гидрология озёр позволяет эДНК распространяться в толще воды относительно предсказуемо, что облегчает моделирование динамики популяций на основе данных эДНК. Тем не менее при планировании мест отбора проб необходимо учитывать уникальную морфологию озера и тип стратификации (Littlefair et al., 2021). Оптимальным является взятие нескольких проб вдоль береговой линии, а также в центральной части озера в разных слоях в случае глубоких или стратифицированных озёр (Bruce et al., 2021).

Пруды

Пруды по большей части игнорируются в исследованиях биоразнообразия по причине своей многочисленности и «неуникальности», в то время как они являются отличным местом для сбора проб, поскольку ввиду небольшого объёма часто накапливают высокие концентрации эДНК, а также ввиду большого числа в совокупности могут обладать высоким биоразнообразием (Harper et al., 2019). К методическим особенностям работы с прудами относится мутность воды с высоким содержанием частиц отмершей высшей растительности и микроводорослей, что приводит к быстрому забиванию фильтров.

Реки

В проточных водоёмах надёжность метода эДНК может казаться сомнительной из-за высокой скорости перемещения носителя. Однако многократные исследования доказали возможность применения эДНК для оценки распределения сообществ рыб в реках. Так, на основе пространственно-временного мониторинга эДНК рыб Ляпорте с соавторами (Laporte et al., 2021) выделили 8 видовых сообществ, распределённых по речной системе с притоками, причём эти сообщества были устойчивыми даже в разные годы. Халлам с соавторами (Hallam et al., 2021) продемонстрировали, что применение метабаркодинга эДНК рыб выявляет больше пресноводных видов в реке Темзе, чем сочетание электролова, бортового траления, лова ручной сетью и береговым неводом, даже несмотря на обширные усилия по отбору проб с помощью традиционных методов. Авторы считают, что некоторая вариабельность в результатах, полученных разными методами, не повлияет на точность простых экологических моделей структуры сообщества и, таким образом, не должна рассматриваться как серьёзное препятствие для внедрения эДНК в рутинный мониторинг речных сообществ. Аналогично в небольшом ручье Олдс с соавторами (Olds et al., 2016) с большой достоверностью идентифицировали на 4 вида больше с помощью эДНК, чем с помощью электролова.

Исследователи не могут сойтись во мнении, насколько далеко может путешествовать эДНК от источника вниз по реке. В одних исследованиях концентрация эДНК плавно убывает при удалении от источника, в то время как в других на протяжении 9 км нет заметных трендов в изменении концентрации эДНК (Laporte et al., 2021). Моделирование траектории распространения эДНК кумжи показало, что она переносилась практически

без латерального смещения по прямой линии на протяжении 5 км (Laporte et al., 2020). Предполагается, что лучше всего отражают концентрацию эДНК при удалении от источника гидродинамические модели распространения ДНК, которые зависят от особенностей конкретной речной системы (Laporte et al., 2021), в первую очередь от скорости течения.

При отборе проб в реках рекомендуется отбирать пробы через примерно равные интервалы, но при этом учитывать расположение притоков (Bruce et al., 2021).

Моря

Основной сложностью изучения биоразнообразия морей является высокая логистическая стоимость традиционно применяемых программ мониторинга (Czachur et al., 2022). Данные о распределении морских рыб обычно основаны на информации об уловах, полученных в результате коммерческого рыболовства или экологических исследований, поэтому в основном касаются промысловых видов. В связи с этим данные о биоразнообразии морских рыб ограничены как во времени, так и в пространстве.

Метабаркодинг эДНК представляет решение проблем традиционного мониторинга, так как пробы можно брать прямо в прибрежной зоне, не выходя в открытое море (Czachur et al., 2022). Конечно, в этом случае могут быть не зарегистрированы виды, обитающие на больших глубинах или в открытом океане (Bruce et al., 2021). Оптимальной схемой отбора проб в морских системах является взятие большого количества проб равномерно по трансектам и на разных глубинах.

Применение эДНК для мониторинга рыб в России

В последние несколько лет в России появились первые исследования рыб с помо-

щью метабаркодинга эДНК. Первым из отечественных проектов стал стартовавший мониторинг ценных и исчезающих видов рыб Дальнего Востока (Туранов, 2020). Обсуждаются перспективы применения и апробируется метод эДНК для изучения гидробионтов Байкала (Kirilchik, 2018). Также иностранные исследователи выполняют работы в верховьях Волги (Schenekar et al., 2020).

Экономическая эффективность применения метода эДНК в российских условиях неоднозначна. Зарубежные исследования считают метабаркодинг эДНК дешевой альтернативой «научному лову» (Zhang et al., 2020). Спецификой нашей страны является относительно высокая стоимость реактивов для молекулярной генетики и услуг по секвенированию, из-за чего высокопроизводительное секвенирование дороже, чем в США и многих других странах. В то же время стоимость профессиональной рабочей силы относительно низкая. Тем не менее из-за обширной территории и нехватки специалистов-ихтиологов широкомасштабные исследования биоразнообразия, такие как проводятся в Канаде и Японии, возможны только с использованием эДНК и полностью оправданы с точки зрения затрат, поскольку, как никакое другое мероприятие, позволяют принимать рациональные решения для сохранения биоразнообразия в условиях растущего антропогенного пресса на окружающую среду. Для успешного применения эДНК в России понадобится дополнение генетических баз данных рыб отсутствующими последовательностями видов-эндемиков и местных популяций.

Список литературы / References

Кирильчик С. В., Макаров М. М., Аношко П. Н., Астахова М. С., Смолин И. Н., Дзюба Е. В. (2018) Апробация метода количественного анализа ДНК окружающей среды для оценки запасов и мониторинга популяций байкальского омуля. *Международный журнал прикладных*

Заключение

Неоспоримо, что в будущем эДНК войдёт в арсенал стандартных методов мониторинга водных экосистем, как вошли молекулярно-генетические методы в криминалистику, клиническую диагностику и другие сферы общественной жизни. Во многих странах уже работают коммерческие компании, оказывающие услуги по исследованию биоразнообразия водоёмов и их водосборных бассейнов, в особенности на предмет наличия охраняемых или инвазивных видов (EnviroDNA, Австралия; Naturemetrics, Великобритания; Genidaqs, США; eDNASolutions, Швеция и др.). Государственные органы охраны окружающей среды многих стран и другие природоохранные организации рекомендуют применять эДНК для рутинного мониторинга популяций рыб (Hänfling et al., 2016a; The eDNA Society, 2019; Bruce et al., 2021).

Мониторинг биоразнообразия рыб с помощью эДНК часто превосходит традиционные методы по количеству обнаруженных видов, при этом он менее трудоёмкий и помогает избежать отрицательных последствий для рыб и их мест обитания. С другой стороны, для получения количественной информации о численности и биомассе по эДНК необходимо учитывать биологию вида, а также знать возрастную-размерную структуру популяции (Matsuura et al., 2014; Rourke et al., 2022), а значит – дополнять метабаркодинг эДНК традиционными методами. Будущие исследования должны сосредоточиться на разработке количественных методов мониторинга биоразнообразия рыб по эДНК, а также гибких общепринятых стандартов методики.

и фундаментальных исследований, 6: 98–102 [Kirilchik S.V., Makarov M.M., Anoshko P.N., Astakhova M.S., Smolin I.N., Dzyuba E.V. (2018) Testing method quantitative eDNA analysis for stock assessment and monitoring of Baikal omul populations. *International Journal of Applied and Fundamental Research* [Mezhdunarodnyi zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovaniy], 6: 98–102 (in Russian)]

Никифоров А. И., Гаврилов Б. А., Круглова Д. К., Посохова Е. С., Рабазанов Н. И., Орлов А. М. (2018) Исследования с использованием выделенной из водной среды ДНК: состояние и перспективы. *Успехи современной биологии*, 138(1): 18–30 [Nikiforov A. I., Gavrilov B. A., Kruglova D. K., Posokhova E. S., Rabazanov N. I., Orlov A. M. (2018) A research using DNA extracted from aquatic environment: state and prospects a research using DNA extracted from aquatic environment: state and prospects. *Advances of Contemporary Biology* [Uspekhi sovremennoy biologii], 138(1): 18–30 (in Russian)]

Туранов С. В. (2020) ДНК из водной среды – сбор и выделение. Электронный ресурс [http://www.smakeev.com/userfiles/science/turanov_s_v_2020_zametka_pro_sbor_i_vydelenie_dnk_iz_vodnoy_sredy.pdf] [Turanov S.V. (2020) DNA from aquatic environment – collection and extraction. Electronic source [http://www.smakeev.com/userfiles/science/turanov_s_v_2020_zametka_pro_sbor_i_vydelenie_dnk_iz_vodnoy_sredy.pdf] (in Russian)]

Bessey C., Jarman S.N., Berry O., Olsen Y.S., Bunce M., Simpson T., Power M., McLaughlin J., Edgar G.J., Keesing J. (2020) Maximizing fish detection with eDNA metabarcoding. *Environmental DNA*, 2(4): 493–504

Bolyen E., Rideout J.R., Dillon M.R. et al. (2019) Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37(8): 852–857

Bruce K., Blackman R., Bourlat S.J., Hellström A.M., Bakker J., Bista I., Bohmann K., Bouchez A., Brys R., Clark K., Elbrecht V., Fazi S., Fonseca V., Hänfling B., Leese F., Mächler E., Mahon A.R., Meissner K., Panksep K., Pawlowski J., Schmidt Yáñez P., Seymour M., Thalinger B., Valentini A., Woodcock P., Traugott M., Vasselon V., Deiner K. (2021) *A practical guide to DNA-based methods for biodiversity assessment*. Sofia, Pensoft Publishers

Callahan B.J., McMurdie P. J., Rosen M.J., Han A.W., Johnson A.J. A., Holmes S.P. (2016) DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13(7): 581–583

Clare E.L., Economou C.K., Bennett F.J., Dyer C.E., Adams K., McRobie B., Drinkwater R., Littlefair J.E. (2022) Measuring biodiversity from DNA in the air. *Current Biology*, 32(3): 693–700.e5

Collins R.A., Wangensteen O.S., O’Gorman E. J., Mariani S., Sims D.W., Genner M.J. (2018) Persistence of environmental DNA in marine systems. *Communications Biology*, 1(1): 185

Czachur M.V., Seymour M., Creer S., von der Heyden S. (2022) Novel insights into marine fish biodiversity across a pronounced environmental gradient using replicated environmental DNA analyses. *Environmental DNA*, 4(1): 181–190

Darling J.A., Jerde C.L., Sepulveda A.J. (2021) What do you mean by false positive? *Environmental DNA*, 3(5): 879–883

Deiner K., Renshaw M.A., Li Y., Olds B.P., Lodge D.M., Pfrender M.E. (2017) Long-range PCR allows sequencing of mitochondrial genomes from environmental DNA. *Methods in Ecology and Evolution*, 8(12): 1888–1898

Duffy J.E., Cardinale B.J., France K.E., McIntyre P. B., Thébault E., Loreau M. (2007) The functional role of biodiversity in ecosystems: incorporating trophic complexity. *Ecology Letters*, 10(6): 522–538

Dufresne Y., Lejzerowicz F., Perret-Gentil L. A., Pawlowski J., Cordier T. (2019) SLIM: a flexible web application for the reproducible processing of environmental DNA metabarcoding data. *BMC Bioinformatics*, 20(1): 88

Eichmiller J. J., Miller L. M., Sorensen P. W. (2016) Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish. *Molecular Ecology Resources*, 16(1): 56–68

Franco-Sierra N. D., Díaz-Nieto J. F. (2020) Rapid mitochondrial genome sequencing based on Oxford Nanopore Sequencing and a proxy for vertebrate species identification. *Ecology and Evolution*, 10(7): 3544–3560

Fremier A. K., Strickler K. M., Parzych J., Powers S., Goldberg C.S. (2019) Stream transport and retention of environmental DNA pulse releases in relation to hydrogeomorphic scaling factors. *Environmental Science and Technology*, 53(12): 6640–6649

Gehri R.R., Larson W.A., Gruenthal K., Sard N.M., Shi Y. (2021) eDNA metabarcoding outperforms traditional fisheries sampling and reveals fine-scale heterogeneity in a temperate freshwater lake. *Environmental DNA*, 3(5): 912–929

Goldberg C.S., Turner C.R., Deiner K., Klymus K. E., Thomsen P.F., Murphy M.A., Spear S.F., McKee A., Oyler-McCance S. J., Cornman R. S., Laramie M. B., Mahon A. R., Lance R. F., Pilliod D. S., Strickler K. M., Waits L.P., Fremier A. K., Takahara T., Herder J.E., Taberlet P. (2016) Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(11): 1299–1307

Hallam J., Clare E.L., Jones J.I., Day J.J. (2021) Biodiversity assessment across a dynamic riverine system: A comparison of eDNA metabarcoding versus traditional fish surveying methods. *Environmental DNA*, 3(6): 1247–1266

Hänfling B., Lawson Handley L., Read D., Winfield I. (2016a) *Evidence. eDNA-based metabarcoding as a monitoring tool for fish in large lakes. Report – SC 140018/R*. Environment Agency

Hänfling B., Lawson Handley L., Read D. S., Hahn C., Li J., Nichols P., Blackman R. C., Oliver A., Winfield I. J. (2016b) Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Molecular Ecology*, 25(13): 3101–3119

Harper L. R., Buxton A. S., Rees H. C., Bruce K., Brys R., Halfmaerten D., Read D. S., Watson H. V., Sayer C. D., Jones E. P., Priestley V., Mächler E., Múrria C., Garcés-Pastor S., Medupin C., Burgess K., Benson G., Boonham N., Griffiths R. A., Lawson Handley L., Hänfling B. (2019) Prospects and challenges of environmental DNA (eDNA) monitoring in freshwater ponds. *Hydrobiologia*, 826(1): 25–41

Hayami K., Sakata M.K., Inagawa T., Okitsu J., Katano I., Doi H., Nakai K., Ichianagi H., Gotoh R. O., Miya M., Sato H., Yamanaka H., Minamoto T. (2020) Effects of sampling seasons and locations on fish environmental DNA metabarcoding in dam reservoirs. *Ecology and Evolution*, 10(12): 5354–5367

Helfman G. S. (2007) *Fish conservation: a guide to understanding and restoring global aquatic biodiversity and fishery resources*. Washington, Island Press

Hillebrand H., Matthiessen B. (2009) Biodiversity in a complex world: consolidation and progress in functional biodiversity research. *Ecology Letters*, 12(12): 1405–1419

Holman L. E., Chng Y., Rius M. (2022) How does eDNA decay affect metabarcoding experiments? *Environmental DNA*, 4(1): 108–116

Jo T., Arimoto M., Murakami H., Masuda R., Minamoto T. (2020) Estimating shedding and decay rates of environmental nuclear DNA with relation to water temperature and biomass. *Environmental DNA*, 2(2): 140–151

Jo T., Murakami H., Masuda R., Sakata M.K., Yamamoto S., Minamoto T. (2017) Rapid degradation of longer DNA fragments enables the improved estimation of distribution and biomass using environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 17(6): e25–e33

Johnson M.D., Cox R.D., Grisham B.A., Lucia D., Barnes M.A. (2021) Airborne eDNA reflects human activity and seasonal changes on a landscape scale. *Frontiers in Environmental Science*, 8: 563431

Kirilchik S. V. (2018) Environmental DNA as a new tool for assessing the biodiversity of Lake Baikal. *Limnology and Freshwater Biology*, 1: 71–73

Kumar G., Farrell E., Reaume A.M., Eble J.A., Gaither M.R. (2022) One size does not fit all: Tuning eDNA protocols for high- and low-turbidity water sampling. *Environmental DNA*, 4(1): 167–180

Laporte M., Bougas B., Côté G., Champoux O., Paradis Y., Morin J., Bernatchez L. (2020) Caged fish experiment and hydrodynamic bidimensional modeling highlight the importance to consider 2D dispersion in fluvial environmental DNA studies. *Environmental DNA*, 2(3): 362–372

Laporte M., Reny-Nolin E., Chouinard V., Hernandez C., Normandeau E., Bougas B., Côté C., Behmel S., Bernatchez L. (2021) Proper environmental DNA metabarcoding data transformation reveals temporal stability of fish communities in a dendritic river system. *Environmental DNA*, 3(5): 1007–1022

Littlefair J.E., Hrenchuk L.E., Blanchfield P.J., Rennie M.D., Cristescu M.E. (2021) Thermal stratification and fish thermal preference explain vertical eDNA distributions in lakes. *Molecular Ecology*, 30(13): 3083–3096

Macé B., Hocdé R., Marques V., Guerin P.-E., Valentini A., Arnal V., Pellissier L., Manel S. (2022) Evaluating bioinformatics pipelines for population-level inference using environmental DNA. *Environmental DNA*, 4(3): 674–686

Macher T.-H., Schütz R., Arle J., Beermann A.J., Koschorreck J., Leese F. (2021) Beyond fish eDNA metabarcoding: Field replicates disproportionately improve the detection of stream associated vertebrate species. *Metabarcoding and Metagenomics*, 5: 59–71

Marshall N. T., Vanderploeg H. A., Chaganti S. R. (2021) Environmental (e)RNA advances the reliability of eDNA by predicting its age. *Scientific Reports*, 11(1): 2769

Maruyama A., Nakamura K., Yamanaka H., Kondoh M., Minamoto T. (2014) The release rate of environmental DNA from juvenile and adult fish. *PLoS ONE*, 9(12): e114639

Mathon L., Valentini A., Guérin P.-E., Normandeau E., Noel C., Lionnet C., Boulanger E., Thuiller W., Bernatchez L., Mouillot D., Dejean T., Manel S. (2021) Benchmarking bioinformatic tools for fast and accurate eDNA metabarcoding species identification. *Molecular Ecology Resources*, 21(7): 2565–2579

Mauvisseau Q., Halfmaerten D., Neyrinck S., Burian A., Brys R. (2021) Effects of preservation strategies on environmental DNA detection and quantification using ddPCR. *Environmental DNA*, 3(4): 815–822

Miya M., Sato Y., Fukunaga T., Sado T., Poulsen J.Y., Sato K., Minamoto T., Yamamoto S., Yamanaka H., Araki H., Kondoh M., 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

Miyata K., Inoue Y., Amano Y., Nishioka T., Yamane M., Kawaguchi T., Morita O., Honda H. (2021) Fish environmental RNA enables precise ecological surveys with high positive predictivity. *Ecological Indicators*, 128: 107796

Nguyen B.N., Shen E.W., Seemann J., Correa A.M. S., O'Donnell J. L., Altieri A.H., Knowlton N., Crandall K.A., Egan S.P., McMillan W. O., Leray M. (2020) Environmental DNA survey captures patterns of fish and invertebrate diversity across a tropical seascape. *Scientific Reports*, 10(1): 6729

Olds B.P., Jerde C.L., Renshaw M.A., Li Y., Evans N.T., Turner C.R., Deiner K., Mahon A.R., Brueseke M.A., Shirey P.D., Pfrender M.E., Lodge D.M., Lamberti G.A. (2016) Estimating species richness using environmental DNA. *Ecology and Evolution*, 6(12): 4214–4226

Pochon X., Zaiko A., Fletcher L.M., Laroche O., Wood S.A. (2017) Wanted dead or alive? Using metabarcoding of environmental DNA and RNA to distinguish living assemblages for biosecurity applications. *PLoS ONE*, 12(11): e0187636

Polanco F.A., Richards E., Flück B., Valentini A., Altermatt F., Brosse S., Walser J.-C., Eme D., Marques V., Manel S., Albouy C., Dejean T., Pellissier L. (2021) Comparing the performance of 12S mitochondrial primers for fish environmental DNA across ecosystems. *Environmental DNA*, 3(6): 1113–1127

Rourke M.L., Fowler A.M., Hughes J.M., Broadhurst M.K., DiBattista J. D., Fielder S., Wilkes Walburn J., Furlan E.M. (2022) Environmental DNA (eDNA) as a tool for assessing fish biomass: A review of approaches and future considerations for resource surveys. *Environmental DNA*, 4(1): 9–33

Saito T., Doi H. (2021) Degradation modeling of water environmental DNA: Experiments on multiple DNA sources in pond and seawater. *Environmental DNA*, 3(4): 850–860

Sato Y., Miya M., Fukunaga T., Sado T., Iwasaki W. (2018) MitoFish and MiFish pipeline: a mitochondrial genome database of fish with an analysis pipeline for environmental DNA metabarcoding. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6): 1553–1555

Schenekar T., Schletterer M., Lecaudey L.A., Weiss S.J. (2020) Reference databases, primer choice, and assay sensitivity for environmental metabarcoding: Lessons learnt from a re-evaluation of an eDNA fish assessment in the Volga headwaters. *River Research and Applications*, 36(7): 1004–1013

Shogren A.J., Tank J.L., Egan S.P., Bolster D., Riis T. (2019) Riverine distribution of mussel environmental DNA reflects a balance among density, transport, and removal processes. *Freshwater Biology*, 64(8): 1467–1479

Shokralla S., Spall J.L., Gibson J.F., Hajibabaei M. (2012) Next-generation sequencing technologies for environmental DNA research: next-generation sequencing for environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21(8): 1794–1805

Shu L., Ludwig A., Peng Z. (2020) Standards for methods utilizing environmental DNA for detection of fish species. *Genes*, 11(3): 296

Taberlet P., Bonin A., Zinger L., Coissac E. (2018) *Environmental DNA*. Oxford University Press

The eDNA Society (2019) *Environmental DNA sampling and experiment manual, Version 2.1*.

Otsu, Japan

Thomsen P.F., Willerslev E. (2015) Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 183: 4–18

Trujillo-González A., Villacorta-Rath C., White N.E., Furlan E.M., Sykes M., Grossel G., Divi U.K., Gleeson D. (2021) Considerations for future environmental DNA accreditation and proficiency testing schemes. *Environmental DNA*, 3(6): 1049–1058

Ushio M., Murakami H., Masuda R., Sado T., Miya M., Sakurai S., Yamanaka H., Minamoto T., Kondoh M. (2018) Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing. *Metabarcoding and Metagenomics*, 2: e23297

Valdez-Moreno M., Ivanova N. V., Elías-Gutiérrez M., Pedersen S. L., Bessonov K., Hebert P. D. N. (2019) Using eDNA to biomonitor the fish community in a tropical oligotrophic lake. *PLoS ONE*, 14(4): e0215505

Wang S., Yan Z., Hänfling B., Zheng X., Wang P., Fan J., Li J. (2021) Methodology of fish eDNA and its applications in ecology and environment. *Science of the Total Environment*, 755: 142622

Wong M.K.-S., Nakao M., Hyodo S. (2020) Field application of an improved protocol for environmental DNA extraction, purification, and measurement using Sterivex filter. *Scientific Reports*, 10(1): 21531

Wood S.A., Biessy L., Latchford J.L., Zaiko A., von Ammon U., Audrezet F., Cristescu M.E., Pochon X. (2020) Release and degradation of environmental DNA and RNA in a marine system. *Science of the Total Environment*, 704: 135314

Yates M.C., Derry A.M., Cristescu M.E. (2021) Environmental RNA: a revolution in ecological resolution? *Trends in Ecology and Evolution*, 36(7): 601–609

Yates M.C., Fraser D.J., Derry A.M. (2019) Meta-analysis supports further refinement of eDNA for monitoring aquatic species-specific abundance in nature. *Environmental DNA*, 1(1): 5–13

Zaiko A., von Ammon U., Stuart J., Smith K.F., Yao R., Welsh M., Pochon X., Bowers H.A. (2022) Assessing the performance and efficiency of environmental DNA/RNA capture methodologies under controlled experimental conditions. *Methods in Ecology and Evolution*, 13(7): 1581–1594

Zhang S., Zhao J., Yao M. (2020) A comprehensive and comparative evaluation of primers for metabarcoding eDNA from fish. *Methods in Ecology and Evolution*, 11(12): 1609–1625