

Original article

분석조건별 담수어류의 환경 DNA 메타바코딩 효율 비교: 필터, 추출 키트, 프라이머 조합 및 PCR 방법

김근식 · 김근용¹ · 윤주덕*

국립생태원 멸종위기종복원센터, ¹아쿠아진텍(주)

Efficiency Comparison of Environmental DNA Metabarcoding of Freshwater Fishes according to Filters, Extraction Kits, Primer Sets and PCR Methods. Keun-Sik Kim (0000-0002-2081-2589), Keun-Yong Kim¹ (0000-0002-7647-3766) and Ju-Duk Yoon* (0000-0003-1667-327X) (Research Center for Endangered Species, National Institute of Ecology, Yeongyang 36531, Republic of Korea; ¹AquaGenTech Co., Ltd, Busan 48300, Republic of Korea)

Abstract Environmental DNA (eDNA) metabarcoding is effective method with high detection sensitivity for evaluating fish biodiversity and detecting endangered fish from natural water samples. We compared the richness of operational taxonomic units (OTUs) and composition of freshwater fishes according to filters (cellulose nitrate filter vs. glass fiber filter), extraction kits (DNeasy2[®] Blood & Tissue Kit vs. DNeasy2[®] PowerWater Kit), primer sets (12S rDNA vs. 16S rDNA), and PCR methods (conventional PCR vs. touchdown PCR) to determine the optimal conditions for metabarcoding analysis of Korean freshwater fish. The glass fiber filter and DNeasy2[®] Blood & Tissue Kit combination showed the highest number of freshwater fish OTUs in both 12S and 16S rDNA. Among the four types, the primer sets only showed statistically significant difference in the average number of OTUs in class Actinopterygii (non-parametric Wilcoxon signed ranks test, $p=0.005$). However, there was no difference in the average number of OTUs in freshwater fish. The species composition also showed significant difference according to primer sets (PERMANOVA, Pseudo-F = 6.9489, $p=0.006$), but no differences were observed in the other three types. The non-metric multidimensional scaling (NMDS) results revealed that species composition clustered together according to primer sets based on similarity of 65%; 16S rDNA primer set was mainly attributed to endangered species such as *Microphysogobio koreensis* and *Pseudogobio brevicorpus*. In contrast, the 12S rDNA primer set was mainly attributed to common species such as *Zacco platypus* and *Coreoperca herzi*. This study provides essential information on species diversity analysis using metabarcoding for environmental water samples obtained from rivers in Korea.

Key words: environmental DNA, metabarcoding, freshwater fish, filter, kit, primer, PCR, eDNA

서론

Manuscript received 9 September 2021, revised 14 September 2021,
revision accepted 15 September 2021

* Corresponding author: Tel: +82-54-680-7360, Fax: +82-54-680-7329
E-mail: grandblue@nie.re.kr

환경 DNA (environmental DNA, eDNA)는 토양, 물 또는 공기와 같은 다양한 환경 내에 잔존하는 DNA로 대상 종을 포획하지 않고 추출이 가능한 방법이며, 물 속에 서식하는

© The Korean Society of Limnology. All rights reserved.

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provide the original work is properly cited.

수생생물의 경우 다양한 대사 물질, 조직, 비늘 등의 피부세포 및 세포질에서 해리된 DNA인 환경 DNA가 발생하는 것으로 알려져 있다(Taberlet *et al.*, 2012; Kelly *et al.*, 2014). 수생 척추동물로서 처음으로 2008년 황소개구리(*Lithobates catesbeianus*)를 대상으로 환경 DNA 분석이 적용된 이후(Ficetola *et al.*, 2008; Kawato *et al.*, 2021), 어류를 대상으로 종의 존재 유무, 다양성 분석, 생체량 추정, 이입종 검출 등의 생태학적 특성 분석을 위한 다양한 연구들이 이루어진 바 있다(Minamoto *et al.*, 2012; Takahara *et al.*, 2012; Takahara and Doi, 2013; Bergman *et al.*, 2016; Fujii *et al.*, 2019).

전통적인 어류의 군집 분석의 경우 포획, 동정 등이 조사자의 능력에 따라 편향된 결과들을 보일 수 있으며, 미소서식지를 파괴하고, 일반적으로 조사하는 시간에 제한이 있기 때문에 한계를 가지고 있다(Oliver and Beattie, 1993; Fitzpatrick *et al.*, 2009; Ruppert *et al.*, 2019). 환경 DNA 분석은 기존의 전통적인 방법에 비해 더 저렴하고 높은 검출 감도로 많은 종을 검출할 수 있는 방법으로 알려져 있다(Fediajevaite *et al.*, 2021). 따라서 환경 DNA를 이용한 조사는 미소서식지를 훼손하지 않는 장점(Grealy *et al.*, 2015; Knudsen *et al.*, 2019)과 더불어 희귀종을 포함한 멸종위기종을 모니터링하는 데 있어 유용한 것으로 인식되고 있다(Schmelzle and Kinziger, 2016; Day *et al.*, 2019; Akamatsu *et al.*, 2020). 환경 DNA를 분석하는 방법에는 단일 종의 유무 및 정량적 분석을 위한 실시간 PCR 분석법과 군집 분석을 위한 메타바코딩(metabarcoding) 분석법으로 크게 나눌 수 있다. 이 중 메타바코딩은 생물다양성 모니터링에 광범위하게 적용되는 기술로(Taberlet *et al.*, 2018), 수체 내 존재하는 환경 DNA를 대상으로 범용 프라이머를 활용, PCR 증폭을 수행한 다음 차세대염기서열 분석법(Next Generation Sequencing, NGS)을 통해 확보한 대용량 염기서열을 기준으로 군집을 분석하는 방법이다. 이는 높은 검출 감도를 갖기 때문에 희귀종을 포함한 멸종위기종을 식별하는데 적합한 방법이다(Simpfendorfer *et al.*, 2016; Weltz *et al.*, 2017).

이처럼 생물다양성 분석에 저렴한 비용, 정확성, 종 식별 능력 등에 큰 장점을 가진 환경 DNA 메타바코딩 분석을 보다 효율적으로 수행하기 위해서는 시료 수집 및 처리와 관련한 기술적인 문제들에 대한 연구가 필요하다. 메타바코딩을 분석할 때 시료 수집 방법, 환경 DNA 추출 키트, DNA 농도, PCR 방법 및 횟수, 프라이머 조합을 포함한 NGS 분석용 라이브러리 준비 및 생물정보학 분석 등 다양한 방법의 조합을 조정하면 종 검출 가능성이 달라지게 되고, 이후의 생태학적 군집 분석에 영향을 미친다(Deiner *et al.*, 2015; Evans *et al.*, 2017; Vasselon *et al.*, 2017).

그 밖에도 다양한 화학적, 물리학적 특성으로 인해 메타바코딩을 이용해 서식 종을 확인하는 데 있어서 표준화된 하나의 방법만을 이용할 시 이상적인 결과를 얻어내는 데 문제가 있을 수 있다. 예를 들어 pH, 온도, 부식산(humic acid)의 존재 여부, 강수, 유량 등은 환경 DNA의 분해 및 검출 가능성에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(Stoeckle *et al.*, 2017; Tsuji *et al.*, 2017; Seymour *et al.*, 2018; Akre *et al.*, 2019). 따라서 환경 DNA 메타바코딩을 이용한 조사를 수행할 시에 적절한 실험 설계와 시료 수집 방법, 라이브러리 제작, 생물정보학 분석 등의 일련의 과정에 대한 선택 및 이에 대한 이해가 필요한 시점으로, 우선 다양한 방법의 효율성을 검증한 다음 대상 환경에 가장 적합한 방법을 이용할 필요가 있다(Goldberg *et al.*, 2016).

본 연구에서는 우리나라 지류하천에서 담수어류를 대상으로 적합한 메타바코딩 분석방법의 개발을 위해 우선 환경수 농축용 필터, 환경 DNA 추출 키트, 프라이머 조합 종류, PCR 방법을 달리하여 환경 DNA 메타바코딩 분석 효율을 비교하였다. 이와 같은 분석조건별 효율 비교를 통해 환경별 국내 담수어류의 환경유전자 검출 효율성 확보를 위한 기초 자료를 제시하는 것을 목적으로 하였다.

재료 및 방법

1. 시료 확보

이번 연구를 위한 하천수는 2020년 7월 20일 경상북도 영양군 영양읍 현리에 위치한 양평교 아래(반변천)에서 확보하였다. 하천수를 채집하기 전에 사람에 의한 1차 오염을 방지하기 위해 Carim *et al.* (2015)에 제시된 것과 같이 채수에 이용할 가습장화, 비커와 리빙박스는 50% 락스에 담아 잔류 DNA를 모두 제거한 다음 증류수를 이용해 세척하여 이용하였고, 실험용 장갑과 마스크를 착용한 상태로 수행하였다. 하천수 샘플링 방법은 하천을 횡단하며 4 L 비커를 이용해 60 L 리빙박스에 가득 채운 다음 잘 섞어 약 700 mL씩 3회에 걸쳐 2 L 멸균 채수병(New International Scientific Corp., Korea)에 담아 실험실로 운반하였다.

2. 환경 DNA 농축 및 추출

운반한 시료는 analytical test filter funnel cellulose nitrate (CN, $\Phi 0.45 \mu\text{m}$) (Thermo Fisher Scientific, USA)와 glass fiber-F 필터(GF-F, $\Phi 0.70 \mu\text{m}$) (Whatman, UK) 필터를 이용해 각각 750 mL씩 필터링하였다. CN 및 GF-F 필터를 대상으로 추출 키트는 각각 DNeasy[®] Blood & Tissue Kit (이

하 BT 키트(QIAGEN, Germany)와 DNeasy® PowerWater Kit(이하 PW 키트)(QIAGEN, Germany)를 이용하였다. BT 키트는 proteinase K 20 µL 및 ATL 버퍼 280 µL를 넣은 다음 직경 2.4 mm와 5.0 mm 스테인레스 구슬(OMNI International, Kennesaw GA, USA) 2~3개를 넣고 Bead Ruptor Elite(Omni International, USA)를 이용해 필터를 파쇄하였다. 이후 동량의 AL 버퍼를 넣은 후 56°C에서 12시간 동안 반응한 다음 제조사의 사용자 설명서에 따라 수행하였다. PW 키트 역시 제조사의 사용자 설명서에 따라 수행하였다.

3. PCR 증폭반응

프라이머 조합별 효율성 평가를 위해 메타바코딩 PCR 수행을 위한 범용성 프라이머 조합은 12S 리보솜 DNA (12S rDNA) 영역과 16S 리보솜 DNA (16S rDNA) 영역을 증폭할 수 있는 두 종류를 선택하였다. 12S 리보솜 DNA 영역 프라이머 조합 중 어류를 대상으로 범용성을 갖는 것으로 알려져 있는 *Miya et al.* (2015)의 MiFish 총 4개의 프라이머들을 이용하였다(Forward primers: MiFish-U-F: 5'-acactcttccctacacgacgctcttccgatct-NNNNNN-gtcggtaaaactgtgccagc-3', MiFish-E-F: 5'-acactcttccctacacgacgctcttccgatct-NNNNNN-gttggtaaatctctgtgccagc-3', Reverse primers: MiFish-U-R: 5'-gtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatct-NNNNNN-catagtgggtatctaataccagtttg-3', MiFish-E-R: 5'-gtgactggagttcagacgtgtgctcttccgatct-NNNNNN-catagtgggtatctaatactagtttg-3'). 해당 프라이머들은 동일한 농도로 혼합한 프라이머 조합(이하 12S)을 이용한 PCR을 수행하였다. 1차 PCR은 추출한 환경 DNA 2 µL, 각 프라이머 0.3 µM, Platinum™ II Hot-Start PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA)를 이용해 총량 12 µL로 수행하였다. 16S rDNA 영역 프라이머 조합은 *AquaAmp®* Fish META Universal PCR Kit (AquaGenTech Co., Ltd, Korea)를 이용하였으며(이하 16S), 제조사의 사용자 설명서에 따라 수행하였다. 1차 PCR은 환경 DNA 샘플별로 총 4번을 반복적으로 수행하였다. 일반 PCR(이하 N) 조건은 94°C에서 2분 동안 초기 변성 이후 변성반응은 94°C에서 15초, 결합반응은 60°C에서 15초, 신장반응은 68°C에서 15초를 30회 반복하였고, 이후 최종 신장반응은 68°C에서 1분간 수행하였다. 또한 PCR 조건별 비교를 위한 touchdown PCR(이하 T)을 수행하였으며, 위의 조건에서 결합반응만 1회당 0.4°C씩 감소하여 마지막 결합반응 온도는 48°C였으며, 최종 신장반응은 동일하게 수행하였다. DeNovix DS-11 FX (DeNovix, USA)를 이용해 증폭산물의 농도를 측정하고, 그 농도를 같게 맞추는 후 시료별로 모두 합쳤다.

4. 라이브러리 제작 및 NGS 분석

2차 PCR 증폭반응을 위해 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation Part # 15044223 Rev. B의 사용자 설명서를 참조하였으며, Herculase II Fusion DNA Polymerase (Agilent Technologies, USA)와 Nextera XT Index Kit V2 (Illumina, USA)를 이용하였다. 2차 PCR 반응은 95°C에서 3분 동안 초기 변성 이후 변성반응은 95°C에서 30초, 결합반응은 55°C에서 30초, 신장반응은 72°C에서 30초를 8회 반복하였고, 이후 최종 신장반응은 72°C에서 5분간 수행하였다. Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, USA)를 사용하여 염색하고, The VICTOR³ Multilabel Plate Reader (PerkinElmer, USA)를 사용하여 제작된 NGS 라이브러리의 농도를 측정하였다. 제작한 라이브러리의 크기를 확인하기 위해 2100 Bioanalyzer와 DNA 1000 Chip (Agilent Technologies, USA)을 이용하였다. 구축한 라이브러리를 대상으로 MiSeq® Platform (Illumina, USA)을 이용해 paired-end sequencing을 수행하여 NGS 원본데이터를 생산하였다. 생산한 NGS 원본데이터에서 QIIME 2 (Bolyen *et al.*, 2019)을 이용해 Cutadapt 1.15 (Martin, 2011)을 이용해 인덱스와 아답터 서열들을 제거하고 필터링하였다. 이후 UCLUST (Edgar, 2010)를 이용해 유사도 97%를 기준(cut-off)으로 reads의 집산화(clustering)를 수행하여 operational taxonomic units (OTUs)를 생산하였다. 생산한 OTUs의 분류학적 분류를 위해 유전자은행에 등록되어 있는 데이터베이스를 기준으로 BLASTn (Altschul, 1990)을 이용하였으며, coverage와 유사도를 90% 이상의 OTUs만을 이후 분석에 이용하였다.

5. 데이터 분석

프라이머 조합별(12S, 16S), 필터별(GF-F, CN), 추출 키트별(BT, PW), PCR 방법별(N, T)의 조합별 전체 reads 수와 OTUs 수를 산출하였고, 이후 어류에 해당하는 reads와 OTUs를 구분하기 위해 조기어강(Class Actinopterygii)을 기준으로 동일하게 산출하였다. 이후 담수어류 및 멸종위기종에 해당하는 OTUs 수 및 멸종위기종에 해당하는 OTUs의 reads 수를 산출하였고, 프라이머 조합의 종류에 따라 나타난 조기어강에 속하는 OTUs의 과(family)별 조성을 OTUs 수를 기준하여 비교하였다. 동일 종의 OTUs의 중복을 제거하고, 해당 reads를 더하는 필터링을 통해 어류 조성 데이터를 확보하였다. 분석방법별로 확인된 reads 및 OTUs 수는 비모수통계인 Wilcoxon Signed Rank Test를 수행하여 통계적 차이를 분석하였으며, 통계분석은 SPSS (PASW statistics 18, Chicago, US)를 활용하여 수행되었다. 시료별 shannon

diversity 및 어류 구성에 대한 차이를 파악하기 위해 PRIMER 6.0 (Clarke and Gorle, 2006)을 이용해 분석하였다. 각 시료에서 나타난 어류 종 구성에 대한 차이를 파악하기 위해 다차원척도법(NMDS, nonmetric multidimensional scaling)을 활용하였다. NMDS는 2차원 공간에 유사도 매트릭스 내의 자료의 연관성을 최대로 하는 형태로 구현된다(Field *et al.*, 1982). 분석 방법별 종 구성 차이를 파악하기 위한 유사도 매트릭스는 출현 어류 종별 reads 수 자료를 square-root로 변환 후, Bray-Curtis 유사도 지수를 통해 산출된 자료로 작성하였다. 결과의 유의성은 stress value로 표현되며, 0.2 미만일 경우 fair, 0.05 미만일 경우 excellent로 나타난다(Clarke and Warwick, 1994). 프라이어머 조합별(12S, 16S), 필터별(GF, CN), 추출 키트별(BT, PW), PCR 방법별(N, T) 출현 종조성의 통계적인 차이는 PERMANOVA (Permutational multivariate analysis of variance)를 이용해 분석하였다(Anderson *et al.*, 2005).

결과 및 고찰

분석 시료 중 CN 필터를 PW 키트로 추출한 샘플은 1차 PCR부터 증폭이 이루어지지 않아 결과에서 제외하였다. 나머지 시료들을 대상으로 NGS 분석을 수행한 결과 30,536,232 (GF. PW.12S.N)~44,408,092 bp (GF.BT.16S.N)를 확보할 수 있었으며, raw reads 수는 92,203 (CN.BT.16S.T)~1,645,577개 (GF.PW.12S.T)로 평균 read 수는 127,478개로 분석에 충분한 양을 확보하였다.

OTUs 분석에 이용된 reads 수는 44,313~89,695개로 GF.PW.16S.T가 가장 적었으며, CN.BT.12S.N이 가장 많았다(Table 1). 이 중 조기어강의 reads 비율은 84.7 (CN.BT.16S.T)~99.8% (CN.BT.12S.T)로 나타났다. 총 OTUs 수는 27 (CN.BT.16S.T)~44 (GF.BT.16S.N)개로 나타났으며, 이 중 조기어강의 OTUs 수는 GF.BT.12S.N가 35개로 가장 많았다. 담수어류의 OTUs 수는 GF.BT.12S.N가 33개로 가장 많았으며, GF.BT.16S.N이 32개, GF.PW.12S.N이 29개, CN.BT.12S.T가 28개 순으로 나타났다. 멸종위기종의 OTUs 수는 GF.BT.12S.N, GF.BT.16S.N가 4개로 동일하게 가장 많이 검출되었으며, GF.PW.16S.N이 1개로 가장 적게 검출되었다. 반면 멸종위기종에 해당하는 reads 수는 CN.BT.16S.T가 4208개로 가장 많았으며, GF.BT.16S.N이 3515개, CN.BT.16S.N이 2148개 순으로 나타났다. 동일 종의 OTUs의 중복을 제거하고, 해당 reads를 더하는 필터링을 수행한 결과 나타난 종 수는 GF.BT.12S.N, GF.BT.16S.N가 29종으로 동일하였고, GF.PW.16S.T가 25종, GF.PW.12S.N가 23종

Table 1. Number of reads and OTUs identified by metabarcoding analysis with different primer sets (12S: 12S rDNA, 16S: 16S rDNA)*, filters (GF: glass fiber F, CN: cellulose nitrate), extraction kits (BT: DNeasy® Blood & Tissue Kit, PW: DNeasy® Power Water Kit) and PCR methods (N: conventional PCR, T: touchdown PCR).

Samples	GF.BT.12S.N	GF.BT.16S.N	GF.PW.12S.N	GF.PW.16S.N	CN.BT.12S.N	CN.BT.16S.N	GF.PW.12S.T	GF.PW.16S.T	CN.BT.12S.T	CN.BT.16S.T
No. of reads	82223	54104	74677	52673	89695	51712	87845	47724	84302	44313
Actinopterygii (%)	80079 (97.4)	50628 (93.6)	73436 (98.3)	48802 (92.7)	88212 (98.3)	48192 (93.2)	87217 (99.3)	44601 (93.5)	84149 (99.8)	37525 (84.7)
No. of OTUs	42	44	36	32	27	32	31	35	32	27
Actinopterygii	35	33	32	23	25	23	29	28	30	19
Freshwater fish	33	32	29	22	23	23	27	25	28	18
Endangered fish	4	4	2	1	2	3	2	3	3	3
Shannon diversity	3.042	2.734	2.816	2.867	2.682	3.968	2.93	2.627	2.734	2.916
No. of reads of endangered fish species	1724	3515	516	469	356	2148	1176	785	1166	4208
No. of freshwater fish species	29	29	23	20	20	21	21	25	23	17

*. $P < 0.05$

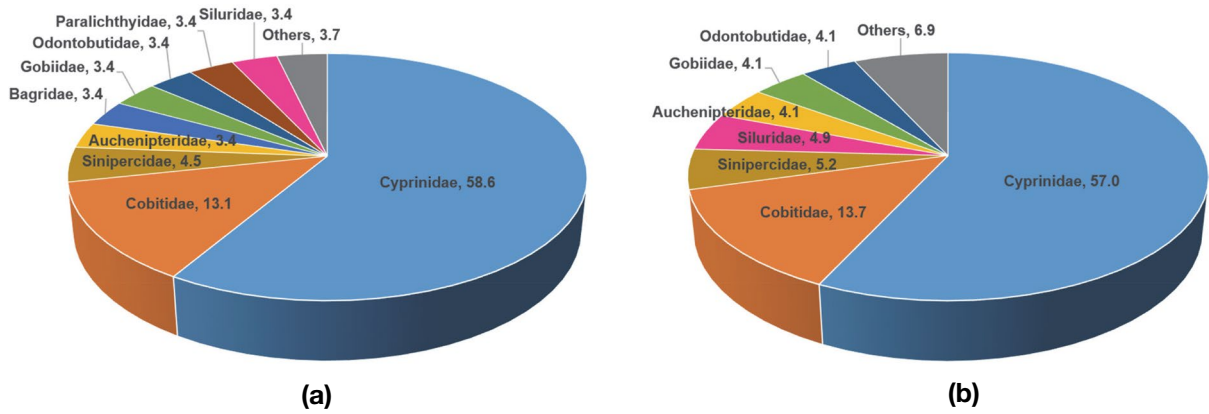


Fig. 1. Family compositions (%) of the Class Actinopterygii based on OTUs identified by metabarcoding analysis with different primer sets of 12S rDNA (a) and 16S rDNA (b).

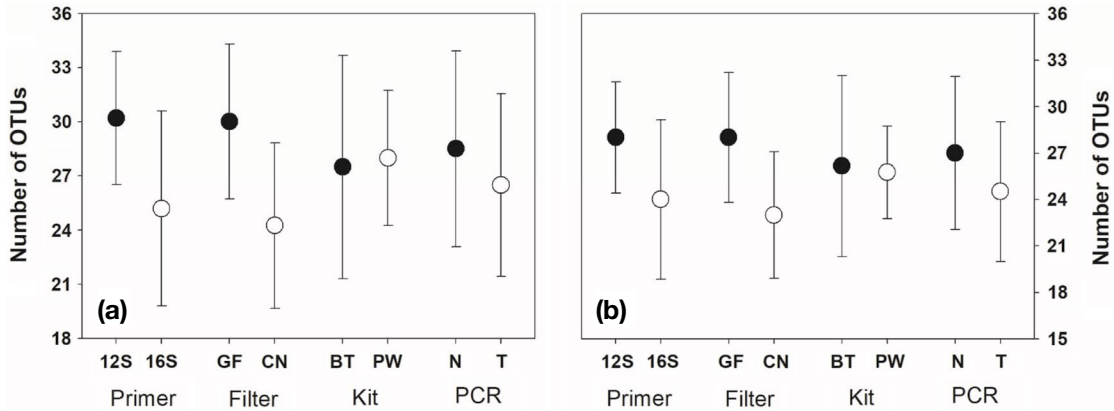


Fig. 2. Comparisons of the average number of OTUs identified by metabarcoding analysis with different primer sets (12S: 12S rDNA; 16S: 16S rDNA), filters (GF: glass fiber; CN: cellulose nitrate), extraction kits (BT: DNeasy[®] Blood & Tissue Kit, PW: DNeasy[®] Power Water Kit) and PCR methods (N: conventional PCR; T: touchdown PCR). (a) indicates the average number of OTUs of the Class Actinopterygii, and (b) is the average number of OTUs of freshwater fish. * indicates $p < 0.05$.

순으로 나타났다.

프라이머 조합의 종류에 따라 나타나는 OTUs의 과 (family) 조성 차이를 비교한 결과 12S에서만 검정우럭과 (family Centrarchidae)가 나타난 점이 가장 큰 차이였으나 (0.6%, data not shown), 과 조성에 있어서 두 프라이머 조합 들 간 큰 차이를 보이지는 않았다(Fig. 1). 분석 조건별 평균 OTUs 차이를 Fig. 2에 제시하였다. 프라이머 조합의 종류별 조기어강 평균 OTUs 수를 비교한 결과 12S는 30.2 ± 3.70 (mean \pm S.D.)개, 16S는 25.2 ± 5.40 개로 통계적으로 유의한 차이를 보였고(Non-parametric Wilcoxon Signed Ranks Test, $p = 0.005$)인 반면 담수어류 평균 OTUs 수를 비교한 결과 에서 12S는 28.0 ± 3.61 개, 16S는 24.0 ± 5.15 개로 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다($p > 0.05$). 필터 종류별 조

기어강 평균 OTUs 수 및 담수어류 평균 OTUs 수에서 GF-F가 각각 5.7종, 5.0종 많이 나타났지만 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다($p > 0.05$). 추출 키트별 분석결과 조기 어강 평균 OTUs 수는 PW가 0.5종 높았으나, 담수어류 평균 OTUs 수는 BT가 0.4종 높아 큰 차이를 보이지 않았다. PCR 조건별 분석결과에서는 일반적인 PCR 방식이 touchdown PCR에 비해 담수어류 OTUs 수에서 2.5종 높았으나 통계적으로 유의하지 않았다($p > 0.05$). 분석 조건별 어류 종 조성 차이 비교 결과 분석에 활용한 프라이머 조합의 종류(12S vs. 16S)에 따라 통계적인 차이가 있는 것으로 확인되었으나 (PERMANOVA, Pseudo-F=6.9489, $p = 0.006$), 추출 키트, 필터, PCR 방식별 종 조성에 대한 통계적 차이는 확인되지 않았다(PERMANOVA, $p > 0.05$).

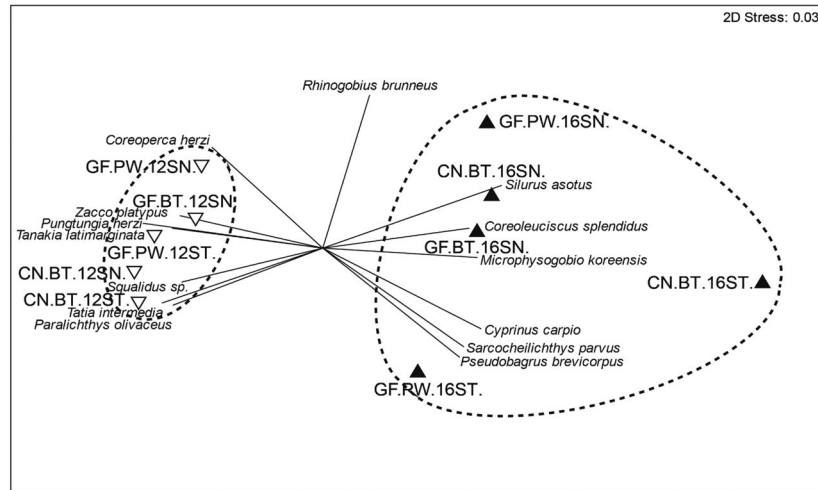


Fig. 3. Non-metric multidimensional scaling of samples based on Bray-Curtis similarities. Black and white triangles indicate results by different primer sets of 16S rDNA and 12S rDNA, respectively. The points are grouped based on the similarity 65%, and species correlation results with MDS axis also presented (only showed correlation >0.7).

NMDS 결과에서도 분석 방법별 종 조성은 유사도 65% 기준에서 프라이머 조합의 종류에 따라 묶이는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3). 산출된 NMDS axis와 출현종에 대한 Pearson 상관분석 결과 중 상관성 0.7 이상인 종들을 고려 시 16S에 기여하는 종들은 멸종위기종인 모래주사(*Microphysogobio koreensis*), 꼬치동자개(*Pseudobagrus brevicorpus*)와 쉬리(*Coreoleuciscus splendidus*), 메기(*Silurus asotus*), 잉어(*Cyprinus carpio*) 등이 확인되었으며, 12S에는 피라미(*Zacco platypus*), 꺾지(*Coreoperca herzi*), 돌고기(*Pungtungia herzi*), 물개류가 기여하는 것으로 확인되어 멸종위기종인 모래주사와 꼬치동자개는 12S에 비해 16S에서 더욱 검출확률과 양이 높은 것으로 나타난 반면 12S는 일반종인 피라미, 꺾지 등이 검출확률과 양이 높았다.

하천수 시료를 대상으로 막 여과지를 이용해 농축하는 방법은 환경 DNA를 농축하는 데 있어서 일반적으로 이용하는 방법으로(Tsuji *et al.*, 2019), 동일량의 하천수를 이용할 때에도 원심분리를 통한 침전방법에 비해 더욱 효율이 높은 것으로 보고된 바 있다(Kumar *et al.*, 2019). CN 필터는 환경 DNA 수율이 다른 필터들에 비해 우수하며(Hinlo *et al.*, 2017), GF-F의 경우 DNA와 단백질을 흡착하는 화학적 특성과 비교적 큰 유기물 입자로부터 환경 DNA 수율을 증가시킬 수 있다(Tsuji *et al.*, 2019). 반면 필터의 재질에 상관없이 공극의 크기가 동일할 때 유사한 결과를 보이기도 하며, GF-F 필터의 환경 DNA 수율이 낮은 반면 종 조성에 있어서는 CN 필터와 차이를 보이지 않는 사례도 있다(Djurhuus *et al.*, 2017). 본 연구결과에서는 필터의 종류에 따른 OTUs 수

의 차이 또는 종 조성에 유의한 차이는 나타나지 않았으나, 각 필터별 검출되는 종의 OTUs 종류에는 차이를 보임에 따라 하나의 시료를 대상으로 최대양의 OTUs를 생산하기 위해서는 두 종류의 필터를 모두 이용하는 것이 바람직할 것으로 판단된다.

환경 DNA 분석에 가장 많이 이용되는 추출 키트는 BT 키트이며, 그 다음으로 PW 키트로 알려져 있다(Shu *et al.*, 2020). Djurhuus *et al.* (2017)은 PW 키트가 BT 키트보다 DNA 추출 효율은 낮았지만, 유사한 OTUs를 검출할 수 있는 것으로 보고한 바 있다. PW 키트의 수율이 낮은 원인은 저해제(inhibitor)를 제거하는 과정에서 저해제와 결합한 DNA를 함께 제거하기 때문인 것으로 추정하고 있다(Schrader *et al.*, 2012). 반면 BT 키트는 다른 추출 키트들에 비해 DNA 추출 효율이 우수하고(Kumar *et al.*, 2019), 특히 GF-F 필터와 조합할 때 목적 종의 OTUs 검출량 또한 우수한 것으로 알려져 있다(Djurhuus *et al.*, 2017). 본 연구결과 필터별, 키트별 유의적인 차이를 보이지는 않았지만, 각 시료들의 OTUs 생산량을 비교해볼 때 GF-F 필터를 BT 키트로 추출한 시료들이 모든 프라이머 조합에서 가장 다양한 OTUs를 생산하는 것으로 나타나 동일한 결과를 얻을 수 있었다. 다만, 저해제가 많은 환경의 시료이거나, 침전물이 많은 시료의 경우 환경 DNA 검출량이 낮을 수 있으므로(Stoeckle *et al.*, 2017), 이때는 PW 키트를 사용하는 방법이 더욱 유리할 수 있다(Shu *et al.*, 2020).

목적하는 분류군만을 증폭시킬 수 있는 프라이머 조합의 특이성은 대상 분류군의 정보량을 대량으로 확보하기 위해

메타바코딩을 수행할 시 중요한 기준 중 하나이다(Collins *et al.*, 2019). 본 연구에서 12S와 16S 프라이머 조합을 이용한 메타바코딩 분석 결과 대부분 92% 이상의 reads가 목적 분류군인 경골어류에 해당하여 효율적이었으며, 특히 12S는 평균 $98.6 \pm 0.84\%$ 로 매우 효율적이었다. 환경 DNA는 물 속에서 비교적 짧은 길이로 더 많이 존재하기 때문에 PCR 증폭 산물의 길이가 긴 프라이머 조합의 경우 DNA 증폭 실패율이 더 높을 수 있는 것으로 보고된 바 있다(Bylemans *et al.*, 2018). 반면, 증폭 산물의 길이가 더 긴 프라이머 조합의 경우 더 많은 염기서열 정보를 비교할 수 있기 때문에 종을 구분하는 해상도는 더 높을 수 있다(Deiner *et al.*, 2017; Bylemans *et al.*, 2018). 본 연구결과 길이가 짧은 12S 프라이머 조합(약 170 bp)과 16S 프라이머 조합(약 400 bp)은 담수어류 OTUs 수에서는 유의한 차이를 보이지 않아 담수어류를 대상으로는 증폭 길이에 따른 프라이머 효율은 차이를 보이지 않았다. 반면 프라이머 조합별로 나타나는 종 별 OTUs와 조기어강 평균 종 수에서는 차이를 보였다. 메타바코딩은 PCR을 기반으로 수행하기 때문에 사용하는 프라이머 조합의 종류에 따라 편향성을 가지며(Zhang *et al.*, 2020), 프라이머와 일부 환경 DNA와의 불일치 또는 다른 증폭 효율로 인해 대상 분류군 또는 환경 DNA가 적은 종에 대해 위음성(false-negative)가 발생한다(Goldberg *et al.*, 2016). 따라서 각 시료를 대상으로 여러 번의 PCR을 수행하고, 시료를 함께 섞는 것이 이와 같은 편향성을 줄일 수 있는 방법 중 하나이며(Minamoto *et al.*, 2019), 더 나아가 여러 종류의 프라이머 조합을 함께 사용하는 것이 메타바코딩을 이용해 서식하는 많은 종의 환경 DNA에 대한 검출률을 증가시킬 수 있다(Evans *et al.*, 2015; Ficetola *et al.*, 2015; Shu *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2021). 따라서 메타바코딩을 수행할 때 단일 시료를 대상으로 여러 번의 PCR을 수행하고, 다양한 프라이머 조합을 이용해 동시에 분석하는 방법이 종 조성을 정확하게 파악하기에는 적절할 것으로 판단된다. PCR 방법별 비교 결과 일반적인 PCR 방법과 touchdown PCR 방법 간 차이를 보이지 않아 Clarke *et al.* (2017)의 결과와 동일하였으며, 향후 일반적인 PCR 방법과 낮은 결합 온도를 이용한 PCR 방법에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다.

메타바코딩 분석 결과 프라이머 조합 모두에서 *Tatia intermedia* (GenBank Acc. No.: MK078120)로 동정된 OTUs가 나타났다. 이 종은 남아메리카에 위치한 안데스 산맥부터 베네수엘라, 콜롬비아에서 브라질 남부까지 서식하는 것으로 알려져 있으나(Sarmento-Soares and Martins Pinheiro, 2008), 국내에 서식 또는 포획 기록은 없다. 이에 따라 OTUs의 염기서열을 이용해 web-기반의 BLASTn을 수행한 결과 *T. intermedia*의 유전자 염기서열과 같이 *Carassius gibelio*,

C. auratus, *C. carassius* 등의 염기서열과 query coverage, 유사도, E-value 값이 12S는 각각 98.0%, 99.5%, 8E-104였으며, 16S는 각각 100.0%, 99.7%, 5E-166으로 모두 동일하였다(data not shown). 12S 프라이머 조합의 경우 짧은 길이(약 170 bp)로 인해 *Sebastes*, *Takifugu*, *Anguilla* 등의 일부 속(genus)에서 종을 구분할 수 없는 것으로 보고된 바 있다(Yamamoto *et al.*, 2017; Takeuchi *et al.*, 2019). 반면, 16S 프라이머 조합의 예상 길이는 약 400 bp이며, 프라이머 서열을 제외하고 실제로 나타난 OTUs의 염기서열 길이가 369 bp로 12S에 비해 해상도가 높은 편임에도 불구하고 동일한 결과를 보였다. 목(order) 수준에서 차이가 나는 두 종 간 369 bp의 염기서열이 완벽하게 일치할 확률은 극히 낮으며, BLASTn 분석결과 *T. intermedia* 염기서열을 제외한 상위 50개 이상이 붕어 유전자와 일치 하는 것으로 볼 때 유전자은행에 등록되어 있는 *T. intermedia*의 미토콘드리아 유전체는 오기입으로 인해 나타난 결과로 판단된다. 이는 유전자은행에 등록되어 있는 유전자 또는 유전체를 이용할 때 연구자에 의한 검증이 필요한 것을 의미한다. 어류를 대상으로 메타바코딩을 이용한 종 동정의 정확성을 높이기 위해서는 높은 품질의 기준 데이터베이스가 필요하며, 실제 서식하는 어류를 대상으로 로컬 데이터베이스 확보가 필요하다(Wang *et al.*, 2021). 이미 영국, 프랑스, 중국 등은 담수어류에 대한 로컬 데이터베이스를 개발하여 적용하고 있다(Wang *et al.*, 2021). 이번 연구결과 역시 메타바코딩 이용한 종 동정의 오류를 방지하기 위해서는 국내 어류 표본을 기준으로 한 데이터베이스의 확보 필요성을 보여주고 있다.

본 연구는 메타바코딩 분석과 관련하여 필터, 추출 키트, 프라이머 조합의 종류, PCR 방법이 어류 종 다양성을 검출할 수 있는 효율을 비교 분석함으로써 우리나라 하천에서 확보한 시료를 대상으로 메타바코딩을 이용한 종 다양성 분석에 기초적인 정보를 제공하고 있다.

적 요

메타바코딩을 이용한 환경 DNA 분석은 검출 감도가 높아 어류의 생물다양성 평가 및 멸종위기종의 검출에 유용한 기술이다. 이번 연구는 메타바코딩을 이용해 우리나라 담수어류를 대상으로 높은 검출 효율을 보일 수 있는 적합한 분석방법을 확인하기 위해 4가지 분석조건별, 즉 필터(cellulose nitrate filter, glass fiber filter), 추출 키트(DNeasy[®] Blood & Tissue Kit, DNeasy[®] PowerWater Kit), 프라이머 조합(12S rDNA, 16S rDNA) 그리고 PCR 방법(conventional PCR, touchdown PCR)로 나타나는 Operational Taxonomic

Units (OTUs) 수와 종 조성을 비교하였다. Glass fiber filter와 DNeasy® Tissue & Blood Kit를 이용해 추출한 시료는 12S rDNA와 16S rDNA 프라이머 조합에서 담수어류 OTUs가 가장 많이 검출되었다. 모든 분석조건 중 프라이머 조합에서만 조기어강(Class Actinopterygii) 평균 OTUs 수에서 통계적으로 유의한 차이를 보였고(Non-parametric Wilcoxon Signed Ranks Test, $p=0.005$), 담수어류 평균 OTUs 수는 유의하지 않았다. 종 조성 비교 결과 역시 프라이머 조합에서 유의한 차이를 보였고(PERMANOVA, Pseudo-F=6.9489, $p=0.006$), 나머지 분석조건에서는 유의한 차이를 보이지 않았다. NMDS 분석 결과 종 조성은 유사도 65% 기준에서 프라이머 조합에 따라 묶였고, 16S rDNA 프라이머 세트는 주로 멸종위기종인 모래주사(*Microphysogobio koreensis*), 꼬치동자개(*Pseudogobio brevicorpus*)가 기여하였고, 12S rDNA 프라이머 세트는 주로 일반종인 피라미(*Zacco platypus*), 꺾지(*Coreoperca herzi*) 등이 기여한 것으로 나타났다. 본 연구는 국내 하천에서 채취한 시료에 대한 메타바코딩을 이용한 종 다양성 분석의 기초정보를 제공한다.

저자정보 김근식(국립생태원 멸종위기종복원센터 선임연구원), 김근용(주식회사 아쿠아진텍 대표이사), 윤주덕(국립생태원 멸종위기종복원센터 책임연구원)

저자기여도 개념설정: 김근식, 윤주덕, 현장조사 및 분석: 김근식, 김근용, 윤주덕, 자료분석: 김근식, 김근용, 원고작성: 김근식, 윤주덕

이해관계 이 논문에는 이해관계 충돌의 여지가 없습니다.

연구비 본 논문은 환경부의 재원으로 국립생태원의 지원을 받아 수행하였습니다(NIE-기반연구-2021-45).

REFERENCES

- Akamatsu, Y., G. Kume, M. Gotou, T. Kono, T. Fujii, R. Inui and Y. Kurita. 2020. Using environmental DNA analyses to assess the occurrence and abundance of the endangered amphidromous fish *Plecoglossus altivelis ryukyuensis*. *Biodiversity Data Journal* **8**: e39679. <https://doi.org/10.3897/bdj.8.e39679>
- Akre, T.S., L.D. Parker, E. Ruther, J.E. Maldonado, L. Lemmon and N.R. McInerney. 2019. Concurrent visual encounter sampling validates eDNA selectivity and sensitivity for the endangered wood turtle (*Glyptemys insculpta*). *PLoS ONE* **14**: e0215586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215586>
- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* **215**: 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Anderson, M.J. 2005. PERMANOVA: a FORTRAN Computer Program for Permutational Multivariate Analysis of Variance. Department of Statistics, University of Auckland, Auckland.
- Bergman, P.S., G. Schumer, S. Blankenship and E. Campbell. 2016. Detection of adult green sturgeon using environmental DNA analysis. *PLoS ONE* **11**: e0153500. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153500>
- Bolyen, E., J.R. Rideout, M.R. Dillon, N.A. Bokulich, C.C. Abnet, G.A. Al-Ghalith, H. Alexander, E.J. Alm, M. Arumugam, F. Asnicar, Y. Bai, J.E. Bisanz, K. Bittinger, A. Brejnrod, C.J. Brislawn, C.T. Brown, B.J. Callahan, A.M. Caraballo-Rodríguez, J. Chase, E.K. Cope, R. Da Silva, C. Diener, P.C. Dorrestein, G.M. Douglas, D.M. Durall, C. Duvallet, C.F. Edwardson, M. Ernst, M. Estaki, J. Fouquier, J.M. Gauglitz, S.M. Gibbons, D.L. Gibson, A. Gonzalez, K. Gorlick, J. Guo, B. Hillmann, S. Holmes, H. Holste, C. Huttenhower, G.A. Huttley, S. Janssen, A.K. Jarmusch, L. Jiang, B.D. Kaehler, K.B. Kang, C.R. Keefe, P. Keim, S.T. Kelley, D. Knights, I. Koester, T. Kosciulek, J. Kreps, M.G.I. Langille, J. Lee, R. Ley, Y.-X. Liu, E. Loftfield, C. Lozupone, M. Maher, C. Marotz, B.D. Martin, D. McDonald, L.J. McIver, A.V. Melnik, J.L. Metcalf, S.C. Morgan, J.T. Morton, A.T. Naimey, J.A. Navas-Molina, L.F. Nothias, S.B. Orchanian, T. Pearson, S.L. Peoples, D. Petras, M.L. Preuss, E. Pruesse, L.B. Rasmussen, A. Rivers, M.S. Robeson II, P. Rosenthal, N. Segata, M. Shaffer, A. Shiffer, R. Sinha, S.J. Song, J.R. Spear, A.D. Swafford, L.R. Thompson, P.J. Torres, P. Trinh, A. Tripathi, P.J. Turnbaugh, S. Ull-Hasan, J.J.J. van der Hooft, F. Vargas, Y. Vázquez-Baeza, E. Vogtmann, M. von Hippel, W. Walters, Y. Wan, M. Wang, J. Warren, K.C. Weber, C.H.D. Williamson, A.D. Willis, Z.Z. Xu, J.R. Zaneveld, Y. Zhang, Q. Zhu, R. Knight and J.G. Caporaso. 2019. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology* **37**: 852-857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>(2019)
- Bylemans, J., E.M. Furlan, D.M. Gleeson, C.M. Hardy and R.P. Duncan. 2018. Does size matter? An experimental evaluation of the relative abundance and decay rates of aquatic environmental DNA. *Environmental Science & Technology* **52**: 6408-6416. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01071>
- Carim, K., T. Wilcox, M. Young, K. McKelvey, M. Schwartz. 2015. Protocol for collecting eDNA samples from streams [Version 2.1]. Missoula, MT: U.S. Department of Agriculture Forest Service, Conservation NGCfWaF; 2015 July 2015.
- Clarke, K.R. and W.M. Warwick. 1994. Similarity-based testing for community pattern: the 2-way layout with no replication. *Marine Biology* **118**: 167-176. <https://doi.org/10.1007/>

- BF00699231
- Clarke, K.R. and R.N. Gorley. 2006. PRIMER v6: User Manual/Tutorial (Plymouth Routines in Multivariate Ecological Research). PRIMER-E, Plymouth.
- Clarke, L.J., J.M. Beard, K.M. Swadling and B.E. Deagle. 2017. Effect of marker choice and thermal cycling protocol on zooplankton DNA metabarcoding studies. *Ecology and Evolution* **7**: 873-883. <https://doi.org/10.1002/ece3.2667>
- Collins, R.A., J. Bakker, O.S. Wangensteen, A.Z. Soto, L. Corrigan, D.W. Sims, M.J. Genner and S. Mariani. 2019. Non-specific amplification compromises environmental DNA metabarcoding with COI. *Methods in Ecology and Evolution* **10**: 1985-2001. <https://doi.org/10.1111/2041-210x.13276>
- Day, K., H. Campbell, A. Fisher, K. Gibb, B. Hill, A. Rose and S.N. Jarman. 2019. Development and validation of an environmental DNA test for the endangered Gouldian finch. *Endangered Species Research* **40**: 171-182. <https://doi.org/10.3354/ESR00987>
- Deiner, K., J.C. Walser, E. Mächler and F. Altermatt. 2015. Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biological Conservation* **183**: 53-63. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2014.11.018>
- Deiner, K., M.A. Renshaw, Y. Li, B.P. Olds, D.M. Lodge and M.E. Pfrender. 2017. Long-range PCR allows sequencing of mitochondrial genomes from environmental DNA. *Methods in Ecology and Evolution* **8**: 1888-1898. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12836>
- Edgar, R.C. 2010. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**: 2460-2461. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq461>
- Evans, N.T., B.P. Olds, M.A. Renshaw, C.R. Turner, Y. Li, C.L. Jerde, A.R. Mahon, M.E. Pfrender, G.A. Lamberti and D.M. Lodge. 2015. Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources* **16**: 29-41. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12433>
- Evans, N.T., Y. Li, M.A. Renshaw, B.P. Olds, K. Deiner, C.R. Turner, C.L. Jerde, D.M. Lodge, G.A. Lamberti and M.E. Pfrender. 2017. Fish community assessment with eDNA metabarcoding: effects of sampling design and bioinformatic filtering. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **74**: 1362-1374. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2016-0306>
- Ficetola, G.F., C. Miaud, F. Pompanon and P. Taberlet. 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters* **4**: 423-425. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>
- Ficetola, G.F., J. Pansu, A. Bonin, E. Coissac, C. Giguët-Covex, M. De Barba, L. Gielly, C.M. Lopes, F. Boyer, F. Pompanon, G. Rayé and P. Taberlet. 2015. Replication levels, false presences and the estimation of the presence/absence from eDNA metabarcoding data. *Molecular Ecology Resources* **15**: 543-556. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12338>
- Field, J.G., K.R. Clarke and M. Warwick. 1982. A practical strategy for analyzing multi-species distribution patterns. *Marine Ecology Progress Series* **8**: 37-53. <https://doi.org/10.3354/meps008037>
- Fitzpatrick, M.C., E.L. Preisser, A.M. Ellison and J.S. Elkinton. 2009. Observer bias and the detection of low-density populations. *Ecological Applications* **19**: 1673-1679. <https://doi.org/10.1890/09-0265.1>
- Fujii, K., H. Doi, S. Matsuoka, M. Nagano, H. Sato and H. Yamana. 2019. Environmental DNA metabarcoding for fish community analysis in backwater lakes: a comparison of capture methods. *PLoS ONE* **14**: e0210357. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210357>
- Goldberg, C.S., C.R. Turner, K. Deiner, K.E. Klymus, P.F. Thomsen, M.A. Murphy, S.F. Spear, A. McKee, S.J. Oyler-McCance, R.S. Cornman, M.B. Laramie, A.R. Mahon, R.F. Lance, D.S. Pilliod, K.M. Strickler, L.P. Waits, A.K. Fremier, T. Takahara, J.E. Herder and P. Taberlet. 2016. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution* **7**: 1299-1307. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12595>
- Grealy, A.C., M.C. McDowell, P. Scofield, D.C. Murray, D.A. Fusco, J. Haile, G.J. Prideaux and M. Bunce. 2015. A critical evaluation of how ancient DNA bulk bone metabarcoding complements traditional morphological analysis of fossil assemblages. *Quaternary Science Reviews* **128**: 37-47. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2015.09.014>
- Hinlo, R., D. Gleeson, M. Lintermans and E. Furlan. 2017. Methods to maximise recovery of environmental DNA from water samples. *PLoS ONE* **12**: e0179251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179251>
- Kelly, R.P., J.A. Port, K.M. Yamahara, R.G. Martone, N. Lowell, P.F. Thomsen, M.E. Mach, M. Bennett, E. Prahler, M.R. Caldwell and L.B. Crowder. 2014. Harnessing DNA to improve environmental management. *Science* **344**: 1455-1456. <https://doi.org/10.1126/science.1251156>
- Knudsen, S.W., R.B. Ebert, M. Hesselsøe, F. Kuntke, J. Hassingboe, P.B. Mortensen, P.F. Thomsen, E.E. Sigsgaard, B.K. Hansen, E.E. Nielsen and P.R. Møller. 2019. Species-specific detection and quantification of environmental DNA from marine fishes in the Baltic Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **510**: 31-45. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2018.09.004>
- Kumar, G., J.E. Eble and M.R. Gaither. 2019. A practical guide to sample preservation and pre-PCR processing of aquatic environmental DNA. *Molecular Ecology Resources* **20**: 29-39. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13107>
- Martin, M. 2011. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet journal* **17**: 10-12. <https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200>

- Minamoto, T., H. Yamanaka, T. Takahara, M.N. Honjo and Z. Kawabata. 2012. Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology* **13**: 193-197. <https://doi.org/10.1007/s10201-011-0362-4>
- Minamoto, T., K. Hayami, M.K. Sakata and A. Imamura. 2019. Real-time polymerase chain reaction assays for environmental DNA detection of three salmonid fish in Hokkaido, Japan: Application to winter surveys. *Ecological Research* **34**: 237-242. <https://doi.org/10.1111/1440-1703.1018>
- Miya, M., Y. Sato, T. Fukunaga, T. Sado, J.Y. Poulsen, K. Sato, T. Minamoto, S. Yamamoto, H. Yamanaka, H. Araki, M. Kon-doh and W. Iwasaki. 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* **7**: <https://doi.org/10.1098/rsos.150088>
- Oliver, I. and A.J. Beattie. 1993. A possible method for the rapid assessment of biodiversity. *Conservation Biology* **7**: 562-568. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1993.07030562.x>
- Ruppert, K.M., R.J. Kline and M.S. Rahman. 2019. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation* **17**: e00547. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2019.e00547>
- Sarmento-Soares, L.M. and R.F. Martins-Pinheiro. 2008. A systematic revision of *Tatia* (Siluriformes: Auchenipteridae: Centromochlinae). *Neotropical Ichthyology* **6**: 495-542. <https://doi.org/10.1590/S1679-62252008000300022>
- Schmelzle, M.C. and A.P. Kinziger. 2016. Using occupancy modelling to compare environmental DNA to traditional field methods for regional-scale monitoring of an endangered aquatic species. *Molecular Ecology Resources* **16**: 895-908. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12501>
- Schrader, C., A. Schielke, L. Ellerbroek and R. John. 2012. PCR inhibitors-occurrence, properties and removal. *Journal of Applied Microbiology* **113**: 1014-1026. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05384.x>
- Seymour, M., I. Durance, B.J. Cosby, E. Ransom-Jones, K. Deiner, S.J. Ormerod, J.K. Colbourne, G. Wilgar, G.R. Carvalho and M. de Bruyn. 2018. Acidity promotes degradation of multi-species environmental DNA in lotic mesocosms. *Communications Biology* **1**: 4. <https://doi.org/10.1038/s42003-017-0005-3>
- Shu, L., A. Ludwig and Z. Peng. 2020. Standards for methods utilizing environmental DNA for detection of fish species. *Genes* **11**: 296. <https://doi.org/10.3390/genes11030296>
- Simpfendorfer, C.A., P.M. Kyne, T.H. Noble, J. Goldsbury, R.K. Basiita, R. Lindsay, A. Shields, C. Perry and D.R. Jerry. 2016. Environmental DNA detects critically endangered largemouth sawfish in the wild. *Endangered Species Research* **30**: 109-116. <https://doi.org/10.3354/esr00731>
- Stoeckle, B.C., S. Beggel, A.F. Cerwenka, E. Motivans, R. Kuehn R and J. Geist. 2017. A systematic approach to evaluate the influence of environmental conditions on eDNA detection success in aquatic ecosystems. *PLoS ONE* **12**: e0189119. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189119>
- Taberlet, P., E. Coissac, M. Hajibabaei and L.H. Rieseberg. 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology* **21**: 1789-1793. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x>
- Taberlet, P., A. Bonin, L. Zinger and E. Coissac. 2018. Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring. Oxford University Press, Oxford.
- Takahara, T., T. Minamoto, H. Yamanaka, H. Doi and Z. Kawabata. 2012. Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLoS ONE* **7**: e35868. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035868>
- Takahara, T., T. Minamoto and H. Doi. 2013. Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PLoS ONE* **8**: e56584. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056584>
- Tsuji, S., M. Ushio, S. Sakurai, T. Minamoto and H. Yamanaka. 2017. Water temperature-dependent degradation of environmental DNA and its relation to bacterial abundance. *PLoS ONE* **12**: e0176608. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176608>
- Tsuji, S., T. Takahara, H. Doi, N. Shibata and H. Yamanaka. 2019. The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis - A review of methods for collection, extraction, and detection. *Environmental DNA* **1**: 99-108. <https://doi.org/10.1002/edn3.21>
- Vasselon, V., I. Domaizon, F. Rimet, M. Kahlert and A. Bouchez. 2017. Application of high-throughput sequencing (HTS) metabarcoding to diatom biomonitoring: Do DNA extraction methods matter? *Freshwater Science* **36**: 162-177. <https://doi.org/10.1086/690649>
- Wang, S., Z. Yan, B. Hänfling, X. Zheng, P. Wang, J. Fan and J. Li. 2021. Methodology of fish eDNA and its applications in ecology and environment. *Science of the Total Environment* **755**: 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142622>
- Weltz, K., J.M. Lyle, J. Oviden, J.A.T. Morgan and D.A. Moreno. 2017. Application of environmental DNA to detect an endangered marine skate species in the wild. *PLoS ONE* **12**: e0178124. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178124>
- Zhang, S., J. Zhao and M. Yao. 2020. A comprehensive and comparative evaluation of primers for metabarcoding eDNA from fish. *Methods in Ecology and Evolution* **11**: 1609-1625. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13485>