

LITERATUR REVIEW: PEMANFAATAN METABARCODING DNA LINGKUNGAN UNTUK MENGANALISIS KEANEKARAGAMAN HAYATI IKAN

Diah Arum Anggraeni^{1*}, Yustinus Ulung Anggraito², Ning Setiati³

¹Program Studi Magister Ilmu Pengetahuan Alam, Pascasarjana, Universitas Negeri Semarang

²Program Studi Pendidikan Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang

³Program Studi Biologi, Fakultas Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam, Universitas Negeri Semarang

Corresponding: diaharum21@students.unnes.ac.id

Abstract

Background: Environmental DNA (eDNA) metabarcoding is a new method for assessing biodiversity in which samples are taken from the environment via water, sediment or air from which DNA is extracted, and then amplified using common or universal primers in a polymerase chain reaction and sequenced using next-generation DNA sequencing to produce thousands to millions of sequences. From this data, the presence of species can be determined, and overall biodiversity can be assessed.

Methods: The method used is a literature review using reputable national and international journals

Results: Based on the results of the literature review, the use of eDNA metabarcoding can be used to analyze fish biodiversity. eDNA metabarcoding can be analyzed with primary data, databases, and bioinformatic pipelines.

Conclusion: eDNA metabarcoding has been widely used to study fish communities in lakes and rivers, as well as coastal fish communities. Despite its considerable ability to detect fish species in large aquatic systems, many methods still need to be understood to improve the quality of primers, databases, and pipelines for analyzing fish biodiversity.

Keywords: Analysis, Fish Biodiversity, eDNA Metabarcoding

Abstrak

Latar Belakang: Metabarcoding DNA Lingkungan (eDNA) adalah metode baru untuk menilai keanekaragaman hayati di mana sampel diambil dari lingkungan melalui air, sedimen atau udara tempat DNA diekstraksi, dan kemudian diamplifikasi menggunakan primer umum atau universal dalam reaksi berantai polimerase dan diurutkan menggunakan generasi berikutnya. pengurutan untuk menghasilkan ribuan hingga jutaan sequens. Dari data ini, keberadaan spesies dapat ditentukan, dan keanekaragaman hayati secara keseluruhan dapat dinilai.

Metode: Metode yang digunakan yaitu literatur review menggunakan jurnal nasional dan internasional bereputasi.

Hasil: Berdasarkan hasil tinjauan literatur, pemanfaatan metabarcoding eDNA dapat digunakan untuk menganalisis keanekaragaman hayati ikan. Metabarcoding eDNA dapat dianalisis dengan data primer, database, dan pipeline bioinformatik

Kesimpulan: Metabarcoding eDNA telah banyak digunakan untuk mempelajari komunitas ikan di danau dan sungai, serta komunitas ikan pesisir. Meskipun kemampuannya cukup besar untuk mendeteksi spesies ikan di sistem perairan besar, masih banyak metode yang harus dipahami untuk meningkatkan kualitas primer, database, dan pipeline untuk menganalisis keanekaragaman hayati ikan.

Kata Kunci: Analisis, Keanekaragaman Hayati Ikan, Metabarcoding eDNA

PENDAHULUAN

Luas daratan dan lautan di bumi ini sekitar 510 juta kilometer persegi. Luas lautan sekitar 361 juta kilometer persegi, mencakup 71% dari total luas dunia. Ikan adalah vertebrata tertua, dan menghuni hampir semua lingkungan perairan di bumi, mulai dari danau, sungai, laut, dan samudera. Hilangnya keanekaragaman hayati ikan merupakan salah satu permasalahan dalam perikanan. Perubahan iklim, polusi, eutrofikasi, penangkapan ikan berlebihan, hilangnya habitat, dan spesies invasif dapat memperparah penurunan keanekaragaman hayati ikan dan menghambat atau mencegah pemulihan. Pemantauan ikan termasuk dalam penilaian status ekologi untuk European Water Framework Directive (WFD). Identifikasi morfologi ikan merupakan prosedur yang memakan waktu dan mahal, teknologi pemantauan yang akurat dan hemat biaya diperlukan oleh WFD (2000/60/EC) di Uni Eropa (Pawlowski et al., 2020).

Baru-baru ini, penggunaan DNA lingkungan (eDNA) yang ada di lingkungan perairan atau darat telah diusulkan sebagai alat yang berpotensi ampuh untuk pemantauan ikan non-invasif yang dilakukan WFD (Hering et al., 2018). Penggunaan eDNA pertama untuk mengidentifikasi keberadaan katak Amerika (*Rana catesbeiana*) pada tahun 2008 (Ficetola et al., 2008), dan pada tahun 2012 analisis metabarcoding eDNA pertama digunakan untuk mencatat keanekaragaman hayati ikan laut (Thomsen et al., 2012). Pendekatan metabarcoding eDNA melibatkan amplifikasi PCR dari rangkaian barcode pendek dari eDNA diikuti dengan penggunaan teknologi High-Throughput Sequencing (HTS). Saat ini, teknologi ini telah menjadi alat yang semakin populer untuk memantau keanekaragaman hayati ikan (Bylemans et al., 2018), dengan penelitian yang diterbitkan yang berfokus pada penerapan metode metabarcoding eDNA untuk pemantauan komposisi komunitas ikan di air tawar, laut (McElroy et al., 2020), dan lingkungan laut dalam (McClenaghan et al., 2020).

Dalam permasalahan terkait berkurangnya keanekaragaman hayati ikan serta adanya salah satu manfaat metabarcoding eDNA untuk memantau keanekaragaman hayati ikan, maka disusunlah tinjauan literatur ini untuk mengevaluasi penggunaan metabarcoding eDNA ikan melalui analisis literatur; meninjau

gen penanda, database, dan jalur bioinformatika.

MATERI DAN METODE

Kajian secara sistematis studi literatur dilakukan pada bulan September sampai dengan November 2023. Sumber pustaka pada artikel ini diambil berdasarkan artikel yang berhubungan dengan judul studi literatur yang akan diulas. Sumber pustaka tersebut berupa artikel-artikel hasil penelitian sebelumnya dari jurnal nasional dan internasional. Sumber pustaka tersebut berupa artikel yang diambil dari jurnal nasional dan internasional yang bereputasi. Pencarian artikel ini menggunakan Google scholar, ProQuest, dan Willey.

Pembuatan *literature review* ini diawali dengan melihat *trend* penelitian berbasis biologi molekuler pada bidang lingkungan, lalu dilanjutkan dengan pembuatan resume dan kerangka studi literatur secara umum yang memuat latar belakang, metode, dan hal-hal penting lain yang akan mendukung terkumpulnya informasi secara komprehensif untuk studi literatur ini. Tahap berikutnya adalah mulai menyusun studi literatur sesuai dengan kerangka yang telah disusun berdasarkan informasi-informasi yang telah diperoleh dari berbagai sumber pustaka yang kemudian dianalisis secara deskriptif dan dievaluasi serta dilanjutkan dengan pembuatan kesimpulan.

HASIL DAN PEMBAHASAN

Metabarcoding DNA lingkungan menggunakan primer universal untuk memperkuat barcode genetik dari eDNA dalam sampel lingkungan (misalnya air) menggunakan Polymerase Chain Reaction (PCR). Amplikon kemudian diurutkan menggunakan pengurutan throughput tinggi (misalnya platform Miseq dan Hiseq). Komposisi spesies kemudian dapat direkonstruksi menggunakan urutan DNA yang diambil, yang biasanya dibandingkan dengan database publik atau database referensi dengan komunitas spesies yang diharapkan, sehingga spesies dapat diidentifikasi.

Pilihan primer khusus untuk metabarcoding eDNA ikan.

Setelah dilepaskan ke lingkungan, eDNA makro-organisme dapat bertahan di air selama sehari-hari hingga satu bulan. Suhu air, kondisi hidrologi, pH, radiasi UV, salinitas, substrat, kekeruhan, dan kimia air semuanya

dapat mempengaruhi persistensi eDNA di lapangan. Dengan pemikiran ini, primer khusus untuk pengkodean eDNA metabar ikan harus terlebih dahulu memperkuat fragmen DNA pendek untuk memaksimalkan pemulihan DNA dari sampel lingkungan (Deiner et al., 2017). Kedua, primer khusus yang ideal harus memperkuat barcode dengan perpustakaan referensi taksonomi yang memadai (Collins et al., 2019). Selanjutnya, primer khusus harus spesifik untuk kelompok sasaran untuk menghindari amplifikasi yang tidak spesifik. Selain itu, primer khusus harus memperkuat DNA dari semua spesies yang diteliti dengan efisiensi yang sama untuk meminimalkan bias primer (Bylemans et al., 2018).

Database

Database referensi yang dianotasi secara taksonomi yang tidak lengkap dapat menjadi kendala utama terkait dengan metabarcoding eDNA ikan karena penentuan taksonomi amplicon dibuat dengan membandingkannya dengan database referensi. Deteksi spesies yang menyeluruh dan akurat memerlukan cakupan taksa yang diketahui secara komprehensif dalam database referensi (Andersen et al., 2019). Amplicon dapat dibandingkan dengan database referensi publik atau database lokal. Database referensi publik termasuk GenBank di Pusat Basis Data Informasi Bioteknologi Nasional (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), database Laboratorium Biologi Molekuler Eropa (EMBL) (<http://www.ebi.ac.uk/embl>), database Barcode Kehidupan (BOLD) (<http://v4.boldsystems.org>), dan database online Fish Barcode of Life Initiative (FISH-BOL) (<http://www.fishbol.org>). Jika tidak, urutan barcode juga dapat dipertahankan dari mitogenom lengkap, yang telah berkontribusi pada penambahan penanda eDNA yang berguna seperti area "barcode DNA" COI, 12S, 16S, dan Cytb. Mitogenom ini juga tersedia di database publik, misalnya, total 11,049 sekuens mtDNA lengkap dari 3531 spesies ikan dapat diambil dari database nukleotida GenBank, dan sekuens mtDNA lengkap dari 3,034 spesies tersedia di MITOFISH basis data (<http://mitofish.aori.utokyo.ac.jp/>).

Database lokal yang berisi barcode DNA dari fauna ikan lokal juga dapat digunakan untuk membantu identifikasi taksonomi yang lebih akurat. Basis data lokal dapat diperoleh melalui pengurutan sampel jaringan Sanger

atau dengan memperoleh pengurutan dari database publik menggunakan daftar periksa regional atau hasil awal dengan spesies target. Telah terbukti bahwa database referensi lokal berkualitas tinggi telah meningkatkan penugasan taksonomi secara signifikan.

Database publik dapat memberikan cakupan taksonomi yang lebih tinggi tetapi resolusi taksonomi yang lebih rendah untuk kode batang eDNA pendek, sehingga meningkatkan identifikasi spesies yang ambigu atau positif palsu. Sebaliknya, database lokal dapat meningkatkan efisiensi identifikasi spesies dan memastikan identifikasi spesies pada tingkat spesies, meskipun database tersebut hanya mencakup rangkaian genetik spesies lokal. Namun, spesies invasif pada tahap awal invasi atau spesies samar di suatu wilayah kemungkinan besar tidak akan terdeteksi dalam database lokal. Oleh karena itu, disarankan penggunaan gabungan database lokal dan publik untuk mengidentifikasi barcode eDNA. Hal ini mencakup pemeriksaan daftar spesies bersejarah dengan menggunakan database lokal, kemudian menyaring rangkaian spesies yang tidak teridentifikasi di database publik untuk pemeriksaan lebih lanjut terhadap spesies asing dan/atau spesies samar.

Pipeline Bioinformatika

Pemrosesan data sekuens bioinformatik juga merupakan salah satu dari tiga aspek penting metabarcoding eDNA, karena ketatnya bioinformatik dapat mempengaruhi perkiraan keanekaragaman hayati ikan (Evans et al., 2017). Diketahui bahwa standarisasi bioinformatika dalam "pipeline" dapat menjamin kualitas dan reproduktifitas temuan, namun beberapa tingkat penyesuaian juga diperlukan di seluruh penelitian. Untuk analisis metabarcoding eDNA ikan, mengubah data mentah yang dibaca menjadi daftar taksa melibatkan beberapa langkah jaminan kualitas, beberapa di antaranya diperlukan sementara yang lain bersifat opsional (Deiner et al., 2017). Biasanya, penyesuaian minimum untuk data HTS harus mencakup penggabungan dan pemangkasan urutan, pengaturan filter kualitas setidaknya di atas 20 atau 30, menghapus pembacaan singkat, menghapus chimera dan singleton, dan kemudian dereplikasi dan denoising urutan. Lebih khusus lagi, pembacaan mentah yang diperoleh dari pengurutan generasi berikutnya harus diproses terlebih dahulu dan dianalisis

menggunakan perangkat lunak seperti USEARCH, OBITools, Barque, Anacapa, atau QIIME 2. Pertama, pembacaan R1 dan R2 dirakit. Kedua, urutan primer dihilangkan dari kedua tepi bacaan yang telah dirakit. Ketiga, pembacaan berkualitas rendah dengan tingkat kesalahan yang diharapkan sebesar > 1% dan pembacaan yang terlalu pendek akan dihilangkan dengan pemfilteran kualitas. Keempat, pembacaan yang telah diproses

sebelumnya dihilangkan replikasinya. Kelima, pembacaan yang tidak direplikasi ditolak untuk menghasilkan varian urutan amplicon (ASV) yang menghapus semua urutan yang diduga bersifat chimeric dan salah. Pendekatannya berbeda ketika melakukan penentuan molecular operational taxonomic units (MOTU) dan penugasan taksonomi.

Tabel 1. Penelitian Penggunaan Metabarcoding pada Keanekaragaman Hayati Ikan

Judul	Nama dan Tahun	Hasil
Environmental DNA detection of rare and invasive fish species in two Great Lakes tributaries	Balasingham et al., (2018)	Deteksi spesies langka dan terancam punah atau invasif menggunakan aplikasi metabarcoding eDNA menggunakan penanda COI untuk mendeteksi tiga spesies ikan yang terancam punah, satu spesies ikan invasif, dan 78 spesies ikan asli dari dua anak sungai Great Lakes di AS
Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation	Pont et al., (2018)	Penggunaan eDNA untuk memberikan informasi kualitatif dan kuantitatif yang akurat tentang komunitas ikan di danau-danau besar, melalui perbandingan dengan kumpulan data
Detection of rare and invasive freshwater fish species using eDNA pyrosequencing: Lake Iznik ichthyofauna revised	Keskin et al., (2016)	Deteksi spesies langka dan terancam punah atau invasif menggunakan aplikasi metabarcoding eDNA menggunakan penanda Cytb untuk mendeteksi total dari 23 spesies ikan dari 18 lokasi pengambilan sampel di danau Iznik, Turki, termasuk delapan spesies ikan asli yang penting secara ekonomi, tiga spesies ikan invasif, dan lima spesies ikan yang sebelumnya tidak dilaporkan
Blind assessment of vertebrate taxonomic diversity across spatial scales by clustering environmental DNA metabarcoding sequences.	Marques et al.,(2020)	Pengelompokan MOTU telah terbukti secara efektif memperluas penggunaan metabarcoding eDNA dalam ekologi komunitas dan biogeografi, namun hal ini tidak selalu diperlukan. MOTU bergantung pada kumpulan target taksa, kelengkapan database referensi, dan panjang amplicon berurutan. Langkah ini sering dilakukan sebelum penugasan taksonomi, dimana beberapa pembacaan dikelompokkan berdasarkan kriteria yang mengidentifikasi kesamaan berdasarkan inisial awal
The ecologist's field guide to sequence-based identification of biodiversity	Creer et al., (2016).	Tingkat kriteria kesamaan bergantung pada tingkat keanekaragaman intraspesifik dari kelompok yang diteliti yang dapat diperkirakan dari database referensi yang ada, namun rentang batas yang umum digunakan adalah dari 97% hingga 99%. Beberapa algoritma pengelompokan yang umum digunakan termasuk USEARCH, RESEARCH, Algoritma pengelompokan Bayesian (CROP), dan wawasan kuantitatif tentang ekologi mikroba (QIIME).
MitoFish and mifish pipeline: A mitochondrial genome database of fish with an analysis pipeline for environmental DNA metabarcoding	Sato et al., (2018)	Pipeline MiFish di Server MitoFish adalah saluran yang mudah digunakan untuk menganalisis data metabarcoding mitogenomik ikan (yang mencakup data yang dihasilkan menggunakan primer MiFish) untuk memperkirakan komposisi spesies dan karakteristik ekologi lingkungan alami

PEMA: A flexible Pipeline for Environmental DNA Metabarcoding Analysis of the 16S/18S ribosomal RNA, ITS, and COI marker genes	Zafeiropoulos et al., (2020)	Pipeline for Environmental DNA Metabarcoding Analysis (PEMA) berfokus pada 16S dan 18S rRNA, serta data gen penanda ITS dan COI, dan merupakan kumpulan alat analisis metabarcoding utama dalam container yang memerlukan sedikit usaha untuk menyiapkan, menjalankan, dan menyesuaikannya dengan kebutuhan peneliti. Hal ini dapat melakukan pra-pemrosesan baca, pengelompokan MOTU, inferensi varian urutan amplicon, dan penetapan taksonomi dan memungkinkan pengguna untuk mengeksplorasi algoritma alternatif untuk langkah-langkah spesifik dari pipeline tanpa memerlukan eksekusi ulang yang lengkap, sehingga menghasilkan kinerja yang efisien waktu dan hasil yang akurat untuk analisis metabarcoding eDNA PEMA
Benchmarking bioinformatic tools for fast and accurate eDNA metabarcoding species identification	Mathon et al., (2021)	Sebuah pipeline dikembangkan untuk menganalisis fragmen 12S yang diperkuat oleh pasangan teleo primer, yang dibuat dari kotak peralatan yang ada (OBITools, Barque, dan QIIME 2) dan dapat memperoleh kinerja yang sebanding sebaik Barque untuk semua indeks (termasuk sensitivitas, F-measure, root-mean-square error (RMSE) pada pembacaan kelimpahan relatif, dan waktu eksekusi. Ini direkomendasikan sebagai alternatif yang lebih baik daripada pipeline yang sering digunakan (seperti pipeline berbasis QIIME2 dan pipeline OBITools) untuk menganalisis data metabarcoding eDNA ikan.

Penerapan metabarcoding eDNA ikan dalam sistem perairan

Metabarcoding eDNA bersifat non-invasif, hemat biaya, dan lebih sensitif dibandingkan metode pemantauan konvensional, metabarcoding eDNA telah banyak digunakan dalam pengelolaan perikanan dan pemantauan keanekaragaman ikan di ekosistem air tawar dan laut (Collins et al., 2021). Pemanfaatan ini mencakup pemantauan komposisi spesies ikan, struktur komunitas ikan, dan perubahan spasial dan temporal komunitas ikan di berbagai ekosistem perairan seperti kolam, sungai, danau, sungai, muara, dan teluk (Pont et al., 2018) menggunakan metabarcoding eDNA untuk berhasil menggambarkan pola kumpulan ikan memanjang di sungai besar (Sungai Rhone).

Meskipun metabarcoding eDNA memiliki keterbatasan tertentu dan tidak dapat sepenuhnya menggantikan metode survei ikan tradisional, metabarcoding ini dapat digunakan sebagai alat pelengkap yang penting untuk mengidentifikasi keanekaragaman ikan dan distribusi spasial ikan dengan cepat, mengurangi campur tangan pemantauan tradisional terhadap ekosistem perairan, memperpendek siklus survei, meningkatkan efisiensi deteksi, dan menyediakan data yang andal untuk respons cepat terhadap konservasi ekologi perairan

SIMPULAN

Tinjauan ini menunjukkan bahwa pendekatan metabarcoding eDNA telah banyak digunakan untuk mempelajari komunitas ikan di danau dan sungai, serta komunitas ikan pesisir. Meskipun kemampuannya cukup besar untuk mendeteksi spesies ikan di sistem perairan besar, masih banyak metode yang harus dipahami untuk meningkatkan kualitas primer, database, dan pipeline untuk menganalisis keanekaragaman hayati ikan.

DAFTAR PUSTAKA

- Andersen, J. C., Oboyski, P., Davies, N., Charlat, S., Ewing, C., Meyer, C., Krehenwinkel, H., Lim, J. Y., Noriyuki, S., Ramage, T., Gillespie, R. G., & Roderick, G. K. (2019). Categorization of species as native or nonnative using DNA sequence signatures without a complete reference library. *Ecological Applications*, 29(5), 1–11. <https://doi.org/10.1002/eap.1914>
- Balasingham, K. D., Walter, R. P., Mandrak, N. E., & Heath, D. D. (2018). Environmental DNA detection of rare and invasive fish species in two Great Lakes tributaries. *Molecular Ecology*, 27(1), 112–127. <https://doi.org/10.1111/mec.14395>

- Belle, C. C., Stoeckle, B. C., & Geist, J. (2019). Taxonomic and geographical representation of freshwater environmental DNA research in aquatic conservation. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 29(11), 1996–2009. <https://doi.org/10.1002/aqc.3208>
- Bohmann, K., Evans, A., Gilbert, M. T. P., Carvalho, G. R., Creer, S., Knapp, M., Yu, D. W., & de Bruyn, M. (2014). Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology and Evolution*, 29(6), 358–367. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2014.04.003>
- Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodríguez, A. M., Chase, J., ... Caporaso, J. G. (2019). Author Correction: Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2 (Nature Biotechnology, (2019), 37, 8, (852-857), 10.1038/s41587-019-0209-9). *Nature Biotechnology*, 37(9), 1091. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0252-6>
- Bylemans, J., Gleeson, D. M., Hardy, C. M., & Furlan, E. (2018). Toward an ecoregion scale evaluation of eDNA metabarcoding primers: A case study for the freshwater fish biodiversity of the Murray–Darling Basin (Australia). *Ecology and Evolution*, 8(17), 8697–8712. <https://doi.org/10.1002/ece3.4387>
- Collins, R. A., Bakker, J., Wangenstein, O. S., Soto, A. Z., Corrigan, L., Sims, D. W., & Mariani, S. (2019). *Methods Ecol Evol - 2019 - Collins - Non-specific amplification compromises environmental DNA metabarcoding with COI.pdf*.
- Collins, R. A., Trauzzi, G., Maltby, K. M., Gibson, T. I., Ratcliffe, F. C., Hallam, J., Rainbird, S., Maclaine, J., Henderson, P. A., Sims, D. W., Mariani, S., & Genner, M. J. (2021). Meta-Fish-Lib: A generalised, dynamic DNA reference library pipeline for metabarcoding of fishes. *Journal of Fish Biology*, 99(4), 1446–1454. <https://doi.org/10.1111/jfb.14852>
- Creer, S., Deiner, K., Frey, S., Porazinska, D., Taberlet, P., Thomas, W. K., Potter, C., & Bik, H. M. (2016). The ecologist's field guide to sequence-based identification of biodiversity. *Methods in Ecology and Evolution*, 7(9), 1008–1018. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12574>
- Czeglédi, I., Sály, P., Specziár, A., Preiszner, B., Szalóky, Z., Maroda, Á., Pont, D., Meulenbroek, P., Valentini, A., & Erős, T. (2021). Congruency between two traditional and eDNA-based sampling methods in characterising taxonomic and trait-based structure of fish communities and community-environment relationships in lentic environment. *Ecological Indicators*, 129(July). <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107952>
- Deiner, K., Bik, H. M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière-Roussel, A., Altermatt, F., Creer, S., Bista, I., Lodge, D. M., de Vere, N., Pfrender, M. E., & Bernatchez, L. (2017). Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology*, 26(21), 5872–5895. <https://doi.org/10.1111/mec.14350>
- Deng, J., Zhang, H., Wang, Q., Kong, F., Zhao, H., Zhang, L., & Jiang, W. (2023). An Optimized Environmental DNA Method to Improve Detectability of the Endangered Sichuan Taimen (*Hucho bleekeri*). *Fishes*, 8(7). <https://doi.org/10.3390/fishes8070339>
- Eren, A. M., Morrison, H. G., Lescault, P. J., Reveillaud, J., Vineis, J. H., & Sogin, M. L. (2015). Minimum entropy decomposition: Unsupervised oligotyping for sensitive partitioning of high-throughput marker gene sequences. *ISME Journal*, 9, 968–979. <https://doi.org/10.1038/ismej.2014.195>
- Evans, N. T., Li, Y., Renshaw, M. A., Olds, B. P., Deiner, K., Turner, C. R., Jerde, C. L., Lodge, D. M., Lamberti, G. A., & Pfrender, M. E. (2017). Fish community assessment with eDNA metabarcoding: Effects of sampling design and bioinformatic filtering. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 74(9), 1362–1374. <https://doi.org/10.1139/cjfas-2016-0306>
- Evans, N. T., Olds, B. P., Renshaw, M. A., Turner, C. R., Li, Y., Jerde, C. L., Mahon, A. R., Pfrender, M. E., Lamberti, G. A., & Lodge, D. M. (2016). Quantification of

- mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 16(1), 29–41. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12433>
- Ficetola, G. F., Miaud, C., Pompanon, F., & Taberlet, P. (2008). Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4(4), 423–425. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2008.0118>
- Gweon, H. S., Oliver, A., Taylor, J., Booth, T., Gibbs, M., Read, D. S., Griffiths, R. I., & Schonrogge, K. (2015). PIPITS: An automated pipeline for analyses of fungal internal transcribed spacer sequences from the Illumina sequencing platform. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(8), 973–980. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12399>
- Hänfling, B., Handley, L. L., Read, D. S., Hahn, C., Li, J., Nichols, P., Blackman, R. C., Oliver, A., & Winfield, I. J. (2016). Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Molecular Ecology*, 25(13), 3101–3119. <https://doi.org/10.1111/mec.13660>
- Hering, D., Borja, A., Jones, J. I., Pont, D., Boets, P., Bouchez, A., Bruce, K., Drakare, S., Hänfling, B., Kahlert, M., Leese, F., Meissner, K., Mergen, P., Reyjol, Y., Segurado, P., Vogler, A., & Kelly, M. (2018). Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive. *Water Research*, 138, 192–205. <https://doi.org/10.1016/J.WATRES.2018.03.003>
- Keskin, E., Unal, E. M., & Atar, H. H. (2016). Detection of rare and invasive freshwater fish species using eDNA pyrosequencing: Lake Iznik ichthyofauna revised. *Biochemical Systematics and Ecology*, 67, 29–36. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2016.05.020>
- Marques, V., Guérin, P. É., Rocle, M., Valentini, A., Manel, S., Mouillot, D., & Dejean, T. (2020). Blind assessment of vertebrate taxonomic diversity across spatial scales by clustering environmental DNA metabarcoding sequences. *Ecography*, 43(12), 1779–1790. <https://doi.org/10.1111/ecog.05049>
- Marques, V., Milhau, T., Albouy, C., Dejean, T., Manel, S., Mouillot, D., & Juhel, J. B. (2021). GAPeDNA: Assessing and mapping global species gaps in genetic databases for eDNA metabarcoding. *Diversity and Distributions*, 27(10), 1880–1892. <https://doi.org/10.1111/ddi.13142>
- 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. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13430>
- McClenaghan, B., Fahner, N., Cote, D., Chawarski, J., McCarthy, A., Rajabi, H., Singer, G., & Hajibabaei, M. (2020). Harnessing the power of eDNA metabarcoding for the detection of deep-sea fishes. *PLoS ONE*, 15(11 November), 4–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0236540>
- McElroy, M. E., Dressler, T. L., Titcomb, G. C., Wilson, E. A., Deiner, K., Dudley, T. L., Eliason, E. J., Evans, N. T., Gaines, S. D., Lafferty, K. D., Lambert, G. A., Li, Y., Lodge, D. M., Love, M. S., Mahon, A. R., Pfrender, M. E., Renshaw, M. A., Selkoe, K. A., & Jerde, C. L. (2020). Calibrating Environmental DNA Metabarcoding to Conventional Surveys for Measuring Fish Species Richness. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 8(August), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00276>
- Miya, M., Gotoh, R. O., & Sado, T. (2020). MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples. In *Fisheries Science* (Vol. 86, Issue 6). Springer Japan. <https://doi.org/10.1007/s12562-020-01461-x>
- Pawlowski, J., Apothéoz-Perret-Gentil, L., & Altermatt, F. (2020). Environmental DNA: What's behind the term? Clarifying the terminology and recommendations for its future use in biomonitoring. *Molecular Ecology*, 29(22), 4258–4264. <https://doi.org/10.1111/mec.15643>
- Pont, D., Rocle, M., Valentini, A., Civade, R., Jean, P., Maire, A., Roset, N., Schabuss, M., Zornig, H., & Dejean, T. (2018). Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers

- despite its downstream transportation. *Scientific Reports*, 8(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28424-8>
- Rees, H. C., Gough, K. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R. M., & Maddison, B. C. (2015). Applications and limitations of measuring environmental DNA as indicators of the presence of aquatic animals. *Journal of Applied Ecology*, 52(4), 827–831. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12467>
- Ruppert, K. M., Kline, R. J., & Rahman, M. S. (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>
- 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. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy074>
- Shu, L., Ludwig, A., & Peng, Z. (2021). Environmental DNA metabarcoding primers for freshwater fish detection and quantification: In silico and in tanks. *Ecology and Evolution*, 11(12), 8281–8294. <https://doi.org/10.1002/ece3.7658>
- Somervuo, P., Koskela, S., Pennanen, J., Henrik Nilsson, R., & Ovaskainen, O. (2016). Unbiased probabilistic taxonomic classification for DNA barcoding. *Bioinformatics*, 32(19), 2920–2927. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw346>
- Stoeckle, M. Y., Soboleva, L., & Charlop-Powers, Z. (2017). Aquatic environmental DNA detects seasonal fish abundance and habitat preference in an urban estuary. *PLoS ONE*, 12(4), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175186>
- Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., Møller, P. R., Rasmussen, M., & Willerslev, E. (2012). Detection of a Diverse Marine Fish Fauna Using Environmental DNA from Seawater Samples. *PLoS ONE*, 7(8), 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041732>
- Valentini, A., Taberlet, P., Miaud, C., Civade, R., Herder, J., Thomsen, P. F., Besnard, A., Coissac, E., & Boyer, F. (2019). *Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding To cite this version : HAL Id : hal-01419572.*
- Wangensteen, O. S., Palacín, C., Guardiola, M., & Turon, X. (2018). DNA metabarcoding of littoral hardbottom communities: High diversity and database gaps revealed by two molecular markers. *PeerJ*, 2018(5), 1–30. <https://doi.org/10.7717/peerj.4705>
- Zafeiropoulos, H., Viet, H. Q., Vasileiadou, K., Potirakis, A., Arvanitidis, C., Topalis, P., Pavloudi, C., & Pafilis, E. (2020). PEMA: A flexible Pipeline for Environmental DNA Metabarcoding Analysis of the 16S/18S ribosomal RNA, ITS, and COI marker genes. *GigaScience*, 9(3), 1–12. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giaa022>