



УДК 59.087, 591.9, 597/599

ДНК окружающей среды как инструмент изучения видового разнообразия и экологии птиц

С.А. Галкина¹, И.В. Демина^{1, 2}, Е.В. Платонова^{1, 2}, О.Д. Такки¹ и А.Г. Демин^{1*}

¹ Санкт-Петербургский государственный университет, Университетская наб. 7/9, 199034 Санкт-Петербург, Россия; e-mails: svetlana.galkina@spbu.ru, olga.takki@spbu.ru, a.demin@spbu.ru

² Биологическая станция «Рыбачий» Зоологического института Российской Академии Наук, 199034 Санкт-Петербург, Россия; e-mails: elena.platonova@zin.ru, clarisskullaby@gmail.com

Представлена 30 января 2025; после доработки 15 марта 2025; принята 29 апреля 2025.

РЕЗЮМЕ

Птицы играют ключевую роль в функционировании большинства крупных экосистем планеты и являются важными объектами биомониторинга. Традиционные методы их изучения нередко имеют ограничения, особенно при исследовании редких, скрытных, мигрирующих видов или видов, обитающих в труднодоступных местах. Сложности с организацией полевых наблюдений, плохие погодные условия и разница в квалификации специалистов могут существенно исказить получаемые данные или даже делать их анализ невозможным. ДНК окружающей среды (экологическая ДНК, эДНК, environmental DNA, eDNA) – это неинвазивный и высокопроизводительный инструмент оценки биоразнообразия, который постепенно входит в практику экологических исследований по всему миру. Наиболее впечатляющие результаты его применения связаны с изучением ихтиофауны, однако в последние несколько лет анализ эДНК также стал использоваться в орнитологии. Тем не менее, целенаправленные исследования птиц с применением эДНК проводятся сравнительно редко, что связано с отсутствием достаточной апробации методик. Актуальные данные (по состоянию на начало 2025 г.) позволяют утверждать, что эДНК может стать ценным инструментом для изучения биоразнообразия и экологии птиц. Методы, основанные на анализе эДНК, уже доказали свою эффективность в обнаружении водоплавающих и околоводных птиц, а также видов, не связанных с водной средой, например птиц-опылителей. В данной статье представлен обзор применения метода эДНК для детекции птиц в различных экосистемах – от тропических лесов до полярных широт, включая как водные, так и наземные среды. Рассматриваются основные направления использования метода, такие как идентификация отдельных видов и оценка разнообразия авифауны. Особое внимание уделяется меташтрихкодированию эДНК как наиболее перспективному подходу, способному значительно повысить производительность биомониторинговых исследований птиц.

Ключевые слова: биоразнообразие, ДНК окружающей среды, ДНК-штрихкоды, меташтрихкодирование, Aves, eDNA

Environmental DNA as a tool for studying bird species diversity and ecology

S.A. Galkina¹, I.V. Demina^{1, 2}, E.V. Platonova^{1, 2}, O.D. Takki¹ and A.G. Demin^{1*}

¹ Saint Petersburg University, Universitetskaya Emb. 7/9, 199034 Saint Petersburg, Russia; e-mails: svetlana.galkina@spbu.ru, olga.takki@spbu.ru, a.demin@spbu.ru

* Автор-корреспондент / Corresponding author

² *Rybachy Biological Station, Zoological Institute of Russian Academy of Sciences, 199034 Saint Petersburg, Russia; e-mails: elena.platonova@zin.ru, clarisslullaby@gmail.com*

Submitted January 30, 2025; revised March 15, 2025; accepted April 29, 2025.

ABSTRACT

Birds play a crucial role in ecosystems and are among the key targets for biomonitoring. However, traditional methods face limitations, particularly when monitoring small, secretive, migratory species or those in hard-to-reach places. Challenges related to managing field observations, adverse weather conditions, and variations in observer expertise can distort data or even render analysis impossible. Environmental DNA (eDNA) is a non-invasive, cost-effective, and high-throughput tool for biodiversity assessment that has been gaining popularity in bird monitoring. While its most notable successes are in ichthyofaunal studies, eDNA analysis has recently gained traction in ornithology. However, targeted eDNA studies on birds remain relatively rare due to insufficient methodological testing. As of early 2025, available data suggest that eDNA has significant potential for studying bird biodiversity and ecology. eDNA-based methods have proven effective in detecting a wide range of avian species, including waterfowl, near-water birds, and even species not directly associated with aquatic environments, such as pollinators. This article provides an overview of eDNA applications for bird detection across various ecosystems, from tropical forests to polar regions. It examines eDNA use in both aquatic and terrestrial environments, with a focus on species detection and biodiversity assessment. Particular attention is given to eDNA metabarcoding as the most promising approach for enhancing the efficiency of bird biomonitoring studies.

Key words: biodiversity, environmental DNA, DNA barcode, metabarcoding, Aves, eDNA

ВВЕДЕНИЕ

Птицы (класс Aves) – один из самых крупных таксонов вторичноротых, включающий более 40 отрядов (<http://www.worldbirdnames.org/ioc-lists/classification/>). Благодаря своей экологической пластичности, а также высоким темпам видообразования и расселения, птицы играют ключевую роль в функционировании большинства крупных экосистем планеты. Они являются основными регуляторами численности других животных, переносчиками различных компонентов биота от зеленых водорослей и семян до рыб и амфибий, а также опылителями цветковых растений. Птицы занимают высшие уровни многих трофических цепей, что делает их чрезвычайно чувствительными к изменениям в окружающей среде (Steele et al. 1984; Koskimies 1989; Gregory et al. 2005). Колебания численности популяций и видового состава авифауны рассматривается как важный индикатор благополучия среды или резких климатических сдвигов (Fraixedas et al. 2020). Уже более 100 лет изучение динамики сообществ птиц является одним из основных инструментов мониторинга состояния экосистем, а в последние годы – важным компонентом промышленного экологического мониторинга (Furness and

Greenwood 1993; Мокиевский и др. [Mokievsky et al.] 2020).

Традиционно в орнитологических исследованиях используются визуальные наблюдения, акустические записи, а также сбор и анализ погадок. Применение технических средств, таких как устройства для аэрофотосъемки, позволяет обследовать обширные территории при изучении крупных птиц (Chabot and Francis 2016; Yang et al. 2024). Методы кольцевания и мечения предоставляют ценную информацию о миграциях, поведении и продолжительности жизни. Гнездовой мониторинг используется для изучения популяционной структуры и успеха размножения. Однако классические методы часто оказываются чрезмерно трудоемкими, требуют значительных временных затрат и участия квалифицированных специалистов (Табл. 1). Даже с учетом бурного развития любительской орнитологии (бердвотчинга) в последние десятилетия охват мониторинговыми исследованиями труднодоступных территорий, таких как полярные и приполярные районы, остается незначительным. Выраженная суточная и сезонная активность птиц может привести к существенному недоучету видового разнообразия, особенно в случае редких или скрытных видов. Кроме того, на качество собираемых данных

Таблица 1. Мониторинг птиц: ключевые этапы. Значения стоимости каждого этапа (\$) и временных затрат (⌚) выражают предположительные минимальные затраты (по субъективной авторской оценке) и могут варьировать. Адаптировано из: Hird 2017.

Table 1. Key stages of bird monitoring. The cost (\$) and time (⌚) values represent estimated minimum expenses based on the author's subjective assessment and may vary. Adapted from Hird 2017.

	Традиционные методы Traditional methods	эДНК eDNA
Полевые исследования Field studies	Трудоемкий сбор информации (визуальные, акустические, прямые и не прямые наблюдения) Время: ⌚⌚⌚ Стоимость \$\$\$ Оборудование для наблюдения, регистрации, квалифицированный персонал Labor-intensive data collection (visual, acoustic, direct and indirect observations) Time: ⌚⌚⌚ Cost: \$\$\$ Surveillance equipment, data recording tools, qualified personnel	Сбор образцов с минимальными затратами усилий (почва, вода, воздух, экскременты) Время: ⌚ Стоимость \$ Простые методы сбора с помощью почвенных буров, совков, емкостей для воды, сбор может быть выполнен неквалифицированным персоналом Low-effort sample collection (soil, water, air, excrement) Time: ⌚ Cost: \$ Simple collection methods using soil augers, scoops, and water containers, may be performed by unskilled personnel
Хранение образцов Storage of samples	Время: ⌚⌚⌚ – ∞ Стоимость \$\$ Особые условия для хранения биологического материала в сухом или замороженном состоянии, компьютерные мощности для хранения аудио- или визуальных данных Time: ⌚⌚⌚ – ∞ Cost: \$\$ Special conditions for storing biological material in a dry or frozen state, computational resources for storage of audio and visual data	Время: ⌚ Стоимость \$ Хранение замороженных образцов субстратов Time: ⌚ Cost: \$ Storage of frozen samples of substrates
Обработка данных в лаборатории Data processing in the laboratory	Анализ изображений и звукозаписей для идентификации видов, размыв погадок Время: ⌚⌚ Стоимость: \$\$ Квалифицированные орнитологи, возможна автоматизация с помощью программ машинного обучения Analysis of images and acoustic recordings for species identification, dissolution of excrement Time: ⌚⌚ Cost: \$\$ Qualified ornithologists, automation possible with machine learning programs	Концентрирование и выделение эДНК, подготовка ДНК-библиотек и секвенирование Время: ⌚⌚ Стоимость \$\$\$ Квалифицированный лабораторный персонал, реактивы, создание стерильных условий работы Concentration and isolation of eDNA, preparation of DNA libraries and sequencing Time: ⌚⌚ Cost: \$\$\$ Trained laboratory personnel and reagents, sterile working conditions
Составление итогового отчета Preparation of the final report	Выявление видового разнообразия в соответствии с данными наблюдений, идентификация близких видов согласно субъективной оценке Время: ⌚ Стоимость: \$ Квалифицированный персонал Identification of species diversity based on observational data, and identification of related species through subjective assessment Time: ⌚ Cost: \$ Qualified personnel	Проведение биоинформатической обработки результатов и получение беспристрастных данных о видовом разнообразии в соответствии с представленностью ДНК различных видов птиц в образце Время: ⌚⌚⌚ Стоимость \$\$\$ Специализированное программное обеспечение, квалифицированный персонал Bioinformatic analysis of sequencing results, obtaining unbiased data on species diversity in accordance with the representation of DNA of different bird species in the sample Time: ⌚⌚⌚ Cost: \$\$\$ Specialized software, qualified personnel

сильно влияет регулярность наблюдений, и, бесспорно, погодные условия. Схожесть внешнего вида и вокализаций у близкородственных видов увеличивает вероятность ошибок при их идентификации. Следует также отметить инвазивность некоторых традиционных методов. Например, вызвать стресс у птиц или нарушить их естественное поведение могут кольцевание, обследование гнезд или забор крови для выделения ДНК (Le Maho et al. 1992).

Методология ДНК окружающей среды (экологическая или экосистемная ДНК, эДНК, англ. environmental DNA, eDNA) произвела революцию в биомониторинге, особенно для детекции редких организмов (Jerde et al. 2011; Villacorta-Rath et al. 2021; Polanco et al. 2021), животных, ведущих скрытый образ жизни (Piaggio et al. 2014; Yamamoto et al. 2017; Parsons et al. 2018; Fraija-Fernández et al. 2020; Niece and McRae 2021), а также при описании общего видового разнообразия водных экосистем (Lacoursière-Roussel et al. 2016; Macher et al. 2021; Lozano Mojica and Caballero 2021; Saenz-Agudelo et al. 2022; Suarez-Bregua et al. 2022; McDonald et al. 2023; Muff et al. 2023). Как правило, термин эДНК относится к ДНК, выделенной из образцов окружающей среды (почвы, воздуха, морской или пресной воды), и в какой-то степени противопоставляется термину «геномная ДНК», который обозначает ДНК, извлеченную непосредственно из тканей или клеток организма (Foote et al. 2012; Miaud et al. 2012; Taberlet et al. 2012a; Пинахина и Чекунова [Pinakhina and Chekunova] 2020). эДНК представляет собой смесь молекул дезоксирибонуклеиновой кислоты разного происхождения (прокариотической, ядерной, митохондриальной, пластидной), которые попадают в окружающую среду из клеток, тканей или выделений (покровные ткани, фекалии, моча, гаметы, слезы). эДНК можно использовать для обнаружения одного или нескольких видов с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с видоспецифичными праймерами, а также для одновременного выявления множества видов из одной или нескольких таксономических групп методом меташтрихкодирования (далее – методы эДНК). Принцип меташтрихкодирования состоит в том, что из общей смеси молекул в образце эДНК с помощью специально разработанных праймеров параллельно

амплифицируются штрихкодовые последовательности, специфичные для генетического материала множества организмов из определенной таксономической группы (рода, семейства, отряда, класса и т.п.) (Hebert et al. 2003, 2004; Miya 2022). Затем полученную смесь ампликонов секвенируют высокопроизводительными методами, а полученный массив нуклеотидных последовательностей биоинформатически соотносят с эталонными генетическими штрихкодами вида. В последние годы в практику исследований активно внедряется использование РНК окружающей среды (или эРНК), происхождение которой сходно с эДНК. Молекулы РНК отличаются более коротким сроком жизни, и, в связи с этим эРНК рассматривается как перспективный инструмент для прижизненной идентификации организмов, особенно в водных экосистемах (Miyata et al. 2021).

Эффективность использования эДНК как источника информации о присутствии интересующих групп организмов в анализируемой среде была неоднократно подтверждена в исследованиях, направленных на оценку биоразнообразия позвоночных животных. В частности, метод меташтрихкодирования оказался успешным для идентификации большого числа видов морских костистых рыб (Thomsen et al. 2012a), китообразных (Foote et al. 2012), черепах (Davy et al. 2015) и акул (Sigsgaard et al. 2016). В ряде случаев было доказано, что эДНК может быть довольно чувствительным инструментом, при этом уровни чувствительности достигли 95% и выше при концентрации целевой ДНК 11 молекул на литр или более (Furlan et al. 2016; Sigsgaard et al. 2016).

На сегодняшний день целенаправленные исследования птиц с использованием эДНК проводятся сравнительно редко (Beng and Corlett 2020; McDonald et al. 2023). Однако имеющиеся на начало 2025 года данные (Рис. 1) позволяют утверждать, что эДНК может стать одним из ценных инструментов для изучения биоразнообразия и экологии птиц (Schütz et al. 2020; Feist et al. 2022). В настоящем обзоре рассматриваются особенности использования эДНК в орнитологии с акцентом на методологические проблемы и ограничения, а также на уникальные возможности, которые этот подход открывает для мониторинга авифауны.

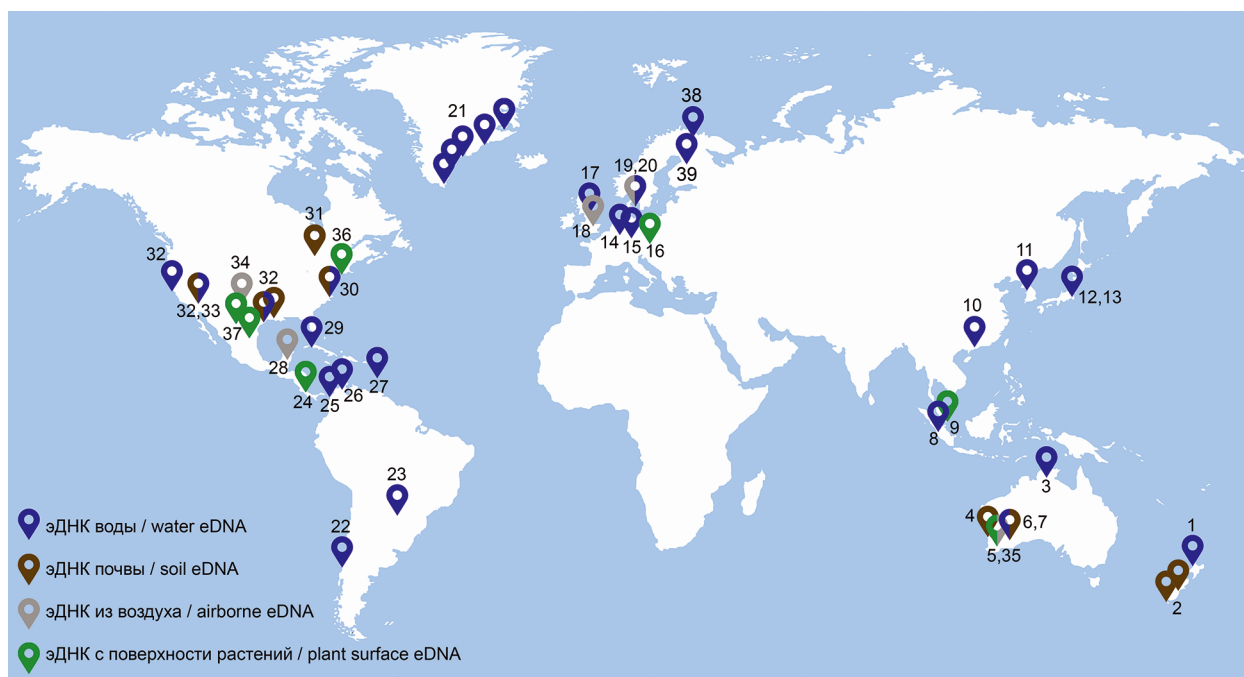


Рис. 1. Географическое распределение исследований по идентификации птиц на основе анализа эДНК, выделенной из различных субстратов. Места сбора образцов эДНК обозначены метками, нумерация меток соответствует следующим публикациям: 1 – David et al. 2021; 2 – Urban et al. 2023; 3 – Day et al. 2019; 4 – Guthrie et al. 2024; 5 – Newton et al. 2024; 6 – Ryan et al. 2022; 7 – McDonald et al. 2023; 8 – Roesma et al. 2021; 9 – Kirchgeorg et al. 2024; 10 – Wang et al. 2023; 11 – Sohn and Song 2024; 12 – Ushio et al. 2018b; 13 – Katayama et al. 2024; 14 – Schütz et al. 2020; 15 – Macher et al. 2021; 16 – Jönsson et al. 2023; 17 – Mariani et al. 2021; 18 – Clare et al. 2022; 19 – Lynggaard et al. 2022; 20 – Lynggaard et al. 2024; 21 – Jensen et al. 2023; 22 – Saenz-Agudelo et al. 2022; 23 – Ritter et al. 2022; 24 – Monge et al. 2020; 25 – Lozano and Caballero 2021; 26 – Polanco et al. 2021; 27 – Haderlé et al. 2024; 28 – Garrett et al. 2023; 29 – Pérez-Fleitas et al. 2023; 30 – Neice and McRae 2021; 31 – Tetzlaff et al. 2024; 32 – Feist et al. 2022; 33 – Palacios Mejia et al. 2021; 34 – Johnson et al. 2023; 35 – Newton et al. 2023; 36 – Allen et al. 2023; 37 – Walker et al. 2022; 38 – Honka et al. 2024a; 39 – Honka et al. 2024b.

Fig. 1. Geographical distribution of bird identification studies based on eDNA analysis isolated from different substrates. Sampling locations are marked with tags, with tag numbers corresponding to the respective references: 1 – David et al. 2021; 2 – Urban et al. 2023; 3 – Day et al. 2019; 4 – Guthrie et al. 2024; 5 – Newton et al. 2024; 6 – Ryan et al. 2022; 7 – McDonald et al. 2023; 8 – Roesma et al. 2021; 9 – Kirchgeorg et al. 2024; 10 – Wang et al. 2023; 11 – Sohn and Song 2024; 12 – Ushio et al. 2018b; 13 – Katayama et al. 2024; 14 – Schütz et al. 2020; 15 – Macher et al. 2021; 16 – Jönsson et al. 2023; 17 – Mariani et al. 2021; 18 – Clare et al. 2022; 19 – Lynggaard et al. 2022; 20 – Lynggaard et al. 2024; 21 – Jensen et al. 2023; 22 – Saenz-Agudelo et al. 2022; 23 – Ritter et al. 2022; 24 – Monge et al. 2020; 25 – Lozano and Caballero 2021; 26 – Polanco et al. 2021; 27 – Haderlé et al. 2024; 28 – Garrett et al. 2023; 29 – Pérez-Fleitas et al. 2023; 30 – Neice and McRae 2021; 31 – Tetzlaff et al. 2024; 32 – Feist et al. 2022; 33 – Palacios Mejia et al. 2021; 34 – Johnson et al. 2023; 35 – Newton et al. 2023; 36 – Allen et al. 2023; 37 – Walker et al. 2022; 38 – Honka et al. 2024a; 39 – Honka et al. 2024b.

ПРИНЦИПЫ РАБОТЫ С эДНК

При рассмотрении общих принципов изучения эДНК сразу отметим, что как только молекулы нуклеиновых кислот попадают в окружающую среду, они начинают фрагментироваться под действием физических и химических факторов, а также могут поглощаться микроорганизмами. Замедление этого процесса происходит благодаря ассоциации ДНК с органическими и неорганическими примесями, что способствует

ее защите от разрушающих факторов окружающей среды. На стабильность молекул ДНК влияют как абиотические факторы (температура, pH, соленость воды, ультрафиолетовое излучение, активность нуклеаз, концентрация кислорода), так и биотические факторы, прежде всего количество и видовой состав микроорганизмов, способных метаболизировать ДНК (Barnes et al. 2014). В связи с этим, решающее значение для успеха экспериментов с эДНК имеют скорость пробоотбора и время хранения проб субстрата

(Табл. 1). Увеличение числа биологических повторностей значительно повышает эффективность обнаружения видов, особенно небольшого размера, вплоть до 68.9% и 77.3% птиц и млекопитающих, соответственно (Macher et al. 2021).

За сбором образцов субстрата (почвы, воды, воздуха) (Dickie et al. 2018) следует этап пробоподготовки (Табл. 1), который для твердых образцов, таких как почва и фекалии, предусматривает процесс гомогенизации. Обычно это достигается путем механического дробления до однородного состояния либо растворением мелкодисперсных образцов, таких как ил или экскременты. Жидкие или газообразные субстраты фильтруют, что позволяет концентрировать частицы, с которыми связаны нуклеиновые кислоты. В отличие от почвы и воды, в воздушной среде концентрация генетического материала значительно ниже, его источники распределены неравномерно, а рассеивание эДНК происходит гораздо быстрее (Табл. 2). Для сбора проб воздуха применяют различные методики отбора: активный отбор, при котором воздух вытягивается с помощью вентиляторов в коллектор для фильтрации, и пассивный отбор, когда частицы биологического происхождения в ловушку приносит ветер (Banchi et al. 2020).

После процедуры лизиса нуклеиновые кислоты экстрагируют. Полученная эДНК, независимо от того, была ли она извлечена из почвы, воды или воздуха, подходит для идентификации организмов, которые обитали в субстрате или контактировали с ним в недавнее время. По количеству выделенной эДНК определенного вида можно судить о его относительной численности в экосистеме, что, в свою очередь, позволяет оценить динамику популяций на исследуемом участке (Ushio et al. 2018a; Tsuji et al. 2022). На всех этапах работы с эДНК необходимо соблюдать строгие меры предосторожности для предотвращения загрязнения (контаминации) образцов. Исследователи используют стерильные инструменты и реагенты, а также проводят все работы в специально оборудованных чистых помещениях, где минимизирована возможность загрязнения чужеродным генетическим материалом. Для выявления контаминации в анализ всегда включают негативные контрольные пробы.

Образцы эДНК анализируют с помощью количественной ПЦР (qPCR, цифровая ПЦР или

ПЦР в реальном времени) с видоспецифичными праймерами или методом меташтрихкодирования, который многократно повысил разрешающую способность анализа эДНК. Этот метод позволяет с высокой таксономической точностью реконструировать структуру сложных экосистем, таких как эстуарии рек и влажные тропические леса, по единичным фрагментам молекул ДНК (Sogin et al. 2006; Taberlet et al. 2012b, 2018; Harper et al. 2018; Mariani et al. 2021; Mena et al. 2021; Miya 2022).

ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ШТРИХКОДИРОВАНИЕ ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВИДОВ ПТИЦ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ эДНК

Благодаря большому числу копий митохондриальной ДНК в эукариотических клетках и доступности аннотированных нуклеотидных последовательностей митохондриальных геномов разных видов, в качестве генетических штрихкодов часто используются короткие фрагменты (~60–250 п.о.) таких генов, как *12S* и *16S* рибосомной РНК (рРНК), гена цитохрома С оксидазы I (*COI*), цитохрома b (*Cyt b*) или контрольной области (D-петля) (Thomsen et al. 2012b; Lacoursière-Roussel et al. 2016; Valsecchi et al. 2020; Wang et al. 2023). В некоторых исследованиях были апробированы праймеры для амплификации многокопийных последовательностей ядерной ДНК, в частности для кластера генов рРНК (Dysthe et al. 2018; Jo et al. 2022). Отметим, что небольшой размер последовательностей ДНК, используемых в качестве штрихкодов, позволяет анализировать сильно деградировавшую ДНК из образцов окружающей среды.

Подобно другим организмам, различные виды птиц могут быть одновременно обнаружены при проведении меташтрихкодирования эДНК с помощью универсальных праймеров, комплементарных определенным нуклеотидным последовательностям, консервативным среди далеко дивергировавших видов организмов. При анализе образцов эДНК с использованием праймеров MiFish/MiMammal, изначально разработанных для амплификации гена *12S* рРНК (длина вставки 171 п.о.) рыб и млекопитающих, иногда идентифицировали несколько видов птиц (Thomsen et al. 2012a, 2012b, 2016; Port et al. 2016). Позднее были разработаны

Таблица 2. Особенности использования эДНК из разных субстратов для целей орнитологии.**Table 2.** Features of using eDNA from various substrates in ornithological studies.

Субстрат Substrate	Сохранность ДНК DNA preservation	Концентрация эДНК eDNA concentration	Особенности Features	Применение Application
Вода Water	Низкая (часы–дни) Low (hours–days)	Средняя Medium	Перемешивание мешает локализации объектов, сильное фоновое загрязнение ДНК постоянных обитателей водоемов Water mixing disrupts the localization of objects, strong background DNA contamination from permanent inhabitants of water bodies	Мониторинг биоразнообразия на больших территориях, выявление редких видов, изучение миграции Monitoring biodiversity across large areas, identifying rare species, studying migration
Воздух Air	Очень низкая (минуты) Very low (minutes)	Очень низкая Very low	ДНК распространяется в виде аэрозолей, быстро разрушается ультрафиолетовым излучением, сезонная и временная изменчивость в концентрации ДНК DNA is dispersed in aerosols, rapidly degraded by UV radiation, seasonal and temporal variability in DNA concentration	Выявление недавнего присутствия, покрытие больших территорий, мониторинг миграции Detection of recent presence, large area coverage, migration monitoring
Почва и донные отложения Soil and sediments	Высокая (недели–годы–столетия) High (weeks–years–centuries)	Высокая High	ДНК накапливается через экскременты, разлагающиеся останки, возможна локализация присутствия, фоновое загрязнение ДНК почвенных организмов, высокое содержание органических веществ в почве препятствует экстракции и амплификации ДНК DNA accumulates through feces, decomposing remains, localization of presence is possible; background DNA contamination from soil organisms, high organic acid content hinders DNA extraction and amplification	Изучение гнездования, исторический анализ, исследование экосистем Nesting studies, historical analysis, ecosystem studies
Растения и другие поверхности Plants and other surfaces	Низкая (часы–дни) Low (hours–days)	Низкая Low	ДНК остается после контакта птиц с поверхностью, быстро разрушается под воздействием среды, количество эДНК зависит от структуры поверхности DNA remains after bird contact with a surface, rapidly degraded by environmental factors; the amount of eDNA depends on the surface structure	Выявление недавнего присутствия, изучение взаимодействий птиц и растений, анализ растительных экосистем Detection of recent presence, study of bird-plant interactions, analysis of plant ecosystems

праймеры MiBird и BirdT с целью меташтрих-кодирования эДНК птиц на платформе Illumina MiSeq (Ushio et al. 2018b).

Для идентификации конкретных видов крайне важно, чтобы целевые последовательности, нарабатываемые в ходе ПЦР, содержали достаточное число специфических нуклеотидных замен (англ. single nucleotide variant, SNV). В этом случае праймеры, разработанные для представителей таксономической группы, не всегда дают удовлетворительные результаты.

Так, несмотря на то, что праймеры для фрагмента гена *COI* длиной 648 п.о. были апробированы для идентификации более 260 видов птиц (Hebert et al. 2004), их использование не привело к удовлетворительным результатам при идентификации близких видов Pelecaniformes, Charadriiformes и Gruiformes (Schütz et al. 2020; Neice and McRae 2021). В таких случаях разрабатывают видоспецифичные праймеры, как, например, для выявления по эДНК видов, находящихся под угрозой исчезновения, вклю-

чая американского черного погоныша *Lateralus jamaicensis* Gmelin, 1789 (Rallidae, Gruiformes) (Neice and McRae 2021; Feist et al. 2022), обыкновенную колпицу *Platalea leucorodia* Linnaeus, 1758 (Threskiornithidae, Pelecaniformes), шилоклювку *Recurvirostra avosetta* Linnaeus, 1758 (Recurvirostridae, Charadriiformes) и травника *Tringa totanus* Linnaeus, 1758 (Scolopacidae, Charadriiformes) (Schütz et al. 2020). В таких исследованиях был установлен минимальный предел обнаружения вида по числу молекул ДНК в окружающей среде, который варьировал от 109 до 300 копий целевой ДНК на одну реакцию ПЦР (Day et al. 2019; Neice and McRae 2021).

Видовая идентификация птиц по эДНК в пробах воды

Анализ эДНК из образцов воды имеет несколько преимуществ по сравнению с эДНК из других источников (Табл. 2). Процедура отбора проб воды проще получения эДНК из воздуха (Lodge et al. 2012; Clare et al. 2021, 2022; Garrett et al. 2023) или из содержимого кишечника некоторых насекомых (кровососущих или копрофагов), используемых для мониторинга позвоночных (Kerley et al. 2018; Frolov et al. 2024). Также эДНК из водной среды более разнообразна, поскольку включает генетический материал не только гидробионтов, но и наземных организмов, попадающий в воду напрямую или с осадками. Однако стоит заметить, что в водной среде эДНК деградирует быстрее, чем, например, в почве (Dejean et al. 2011; Takahara et al. 2012), что ограничивает время хранения проб воды. Молекулы эДНК в воде сохраняются в среднем несколько суток (Dejean et al. 2011; Ильина и др. [Irina et al.] 2024). Из-за различий в скорости деградации эДНК в субстратах разной плотности (Табл. 2), для получения более полной информации о видовом составе экосистемы иногда применяют параллельный сбор образцов воды и донных отложений (Sakata et al. 2020; Palacios Mejia et al. 2021).

Идентификация птиц по эДНК в воде представляет собой более сложную задачу по сравнению с изучением постоянных обитателей водоемов, биологический материал которых поступает в воду напрямую и регулярно (Takahara et al. 2013). Публикации по этой тематике начали появляться только с 2018 г., когда было

экспериментально доказано, что генетический материал птиц, часто взаимодействующих с водой, сохраняется в этой среде и может быть проанализирован с высокой степенью точности (Ushio et al. 2018b). В первых работах метод меташтрихкодирования эДНК птиц был апробирован на образцах воды из искусственных водоемов в вольерах зоопарков, а также из небольших прудов (Ushio et al. 2018b; Schütz et al. 2020). Позднее, в водно-болотных угодьях на побережье Северной Каролины с помощью анализа эДНК методом ПЦР в реальном времени успешно регистрировали присутствие редких птиц со скрытым поведением (Neice and McRae 2021; Feist et al. 2022). Чувствительность метода эДНК в ряде случаев оказывается достаточной для обнаружения птиц по анализу воды из водоемов, используемых для питья, что было показано на примере гульдовой амадины (*Erythrura gouldiae* Gould, 1844), эндемика лесов саванны Северной Австралии (Day et al. 2019).

В ранних исследованиях по идентификации рыб и морских млекопитающих методами эДНК были случайно выявлены и некоторые виды птиц (примерно 2–4 вида птиц на исследование) (Thomsen et al. 2012a, 2012b, 2016; Port et al. 2016). Впоследствии обнаружение разных видов птиц как нецелевых таксонов в рамках так называемого «молекулярного прилова» (англ. molecular bycatch) при использовании универсальных праймеров, разработанных прежде всего для идентификации рыб (Macher et al. 2021; Mariani et al. 2021; Ritter et al. 2022), подтвердило перспективность применения эДНК для изучения общего биоразнообразия на уровне экосистемы без значительных дополнительных затрат. Комплексные исследования, использующие меташтрихкодирование эДНК из проб воды для одновременной оценки общего биоразнообразия позвоночных в конкретных экосистемах, включая видовое разнообразие птиц, проводятся как в пресноводных (Lozano Mojica and Caballero 2021; Macher et al. 2021; Roesma et al. 2021; Ritter et al. 2022; Haderlé et al. 2024), так и в морских экосистемах (Closek et al. 2019; Jensen et al. 2023). Анализируя эДНК в пробах воды из эстуария реки Сан-Диего (Колумбия), Поланко с коллегами (Polanco et al. 2021) показали изменения в составе сообществ при движении от эстуария реки к ее истоку. Авторами были

идентифицированы не только водные организмы (рыбы, амфибии, рептилии), но и наземные и летающие животные, включая птиц и млекопитающих. В частности, были выявлены два эндемичных подвида птиц (туканет *Aulacorhynchus albivitta lautus* Boissonneau, 1840 и масковый трогон *Trogon personatus sanctaemartae* Gould, 1842), а также редкий большой тинаму *Tinamus major* Gmelin, 1789 (Polanco et al. 2021). Другим примером является оценка биоразнообразия позвоночных в засушливых регионах по эДНК из образцов воды из небольших естественных прудов и искусственных поилок для скота в Австралии (McDonald et al. 2023), а также применение метабаркодирования эДНК для оценки видового разнообразия в городском парке Сеула (Южная Корея) (Sohn and Song 2024). В исследовании по мониторингу крокодилов, обитающих на территории болота Сапата (Куба), в пробах воды попутно был обнаружен генетический материал птиц, которые потенциально могут быть жертвами крокодилов (Pérez-Fleitas et al. 2023). Таким образом, учитывая все вышесказанное, анализ эДНК из водной среды, по всей вероятности, станет одним из самых эффективных инструментов для базового биомониторинга (Taberlet et al. 2018; Takahashi et al. 2023).

Следы полета: идентификация птиц по эДНК из образцов воздуха

Возможность обнаружения позвоночных с помощью эДНК, отфильтрованной из воздуха, была продемонстрирована совсем недавно (Clare et al. 2021; Serrao et al. 2021; Lodge 2024). эДНК 18 видов птиц впервые была выделена из проб воздуха в исследовании, проведенном на территории Копенгагенского зоопарка (Дания) (Lynggaard et al. 2022). Это стало важным шагом для изучения потенциала эДНК как инструмента для идентификации птиц в искусственных (Clare et al. 2022; Lynggaard et al. 2022) и в природных наземных экосистемах (Lynggaard et al. 2024). Как и в случае с другими позвоночными, успешность обнаружения птиц по эДНК в воздухе зависит от их численности и биомассы, а также от таких факторов, как расстояние (например, до вольеров) и направление потоков воздуха (Табл. 2) (Clare et al. 2022; Lynggaard et al. 2022). Тестирование метода в условиях сообщества смешанного леса подтвердило его высокую

чувствительность для применения в природной среде. С помощью меташтрихкодирования эДНК удалось идентифицировать 40 таксонов птиц, включая домашних и экзотических, содержащихся жителями близлежащих селений (Lynggaard et al. 2024). В этом исследовании было показано, что всего несколько дней отбора проб воздуха и несколько недель лабораторной работы позволяют выявить значительную часть наземных позвоночных, характерных для территории вокруг точки пробоотбора [около одной четверти от общего числа зарегистрированных видов, согласно данным Lynggaard et al. (2024)]. О возможностях методов эДНК можно судить по широкому диапазону выявляемых таксонов птиц, различающихся по своим экологическим, поведенческим и морфологическим особенностям. Подчеркнем, что эДНК в воздухе содержится в следовых количествах (Табл. 2). Для увеличения концентрации ДНК перспективным решением может быть использование пыли, отфильтрованной из воздуха пассивным методом. Например, в исследовании, проведенном в короткотравных прериях Техаса (США), этот подход позволил успешно идентифицировать представителей позвоночных, включая четыре таксона птиц (Johnson et al. 2023).

В качестве своеобразного природного фильтра для сбора эДНК было предложено использовать паучьи сети. Исследования показали, что материал паутины позволяет выявлять не только самих пауков и их жертв (Xu et al. 2015; Blake et al. 2016), но и других беспозвоночных, таких как членистоногие, нематоды и коловратки, а также грибные и бактериальные таксоны (Gregorič et al. 2022). Ньютон с коллегами (Newton et al. 2024) успешно использовали материал паучьих сетей для видовой идентификации позвоночных животных. В результате выделения эДНК из паутины, собранной в австралийских лесах, было зафиксировано 32 вида позвоночных, включая 16 видов птиц, что составило около 11% от общего числа видов птиц на этой территории (Newton et al. 2024). Однако использование паутины как источника эДНК имеет свои ограничения. Например, пищеварительные ферменты паука могут разрушать ДНК, а кровососущие насекомые, попадающие в сети, могут переносить ДНК позвоночных на значительные расстояния, что усложняет интерпре-

тацию результатов. Тем не менее, этот доступный метод представляет собой перспективный дополнительный инструмент для мониторинга биоразнообразия, включая идентификацию птиц (Newton et al. 2024).

эДНК почвы как инструмент для изучения биоразнообразия птиц

Анализ почвенной эДНК может эффективно применяться для выявления наземных позвоночных, включая птиц, особенно в районах, где нет водоемов или они недоступны для отбора проб (Katz et al. 2021). При этом следует учитывать, что факторы среды, влияющие на сохранность генетического материала в почве, могут отличаться от таковых в водной или воздушной средах (Табл. 2). Например, было показано, что температура оказывает минимальное влияние на деградацию эДНК наземных млекопитающих и птиц, тогда как в водных образцах повышение температуры сильнее ускоряет распад генетического материала (Guthrie et al. 2024). Важную роль в вопросе сохранности эДНК играет ультрафиолетовое излучение, фрагментирующее молекулы нуклеиновых кислот. Однако более высокая концентрация ДНК в почве на открытых солнечных участках по сравнению с образцами, собранными в тени (Guthrie et al. 2024), может быть связана с разной численностью микроорганизмов, разрушающих ДНК: их больше в тени, где влажность выше, что способствует ускоренной деградации генетического материала. На точность идентификации организмов влияют размер и поведение животного (Ryan et al. 2022). Метод анализа эДНК из почвы оказывается более эффективным для выявления крупных птиц, проводящих много времени на земле, что способствует накоплению доступной для анализа эДНК (Tetzlaff et al. 2024). Примерами служат выполненные исследования уязвимых видов, таких как киви (*Apteryx* sp.) и какапо (*Strigops habroptilus* Gray, 1845) в Новой Зеландии (Urban et al. 2023; Brav-Cubitt and Middleton 2024). В то же время, мелкие воробьиные птицы, обитающие в верхнем ярусе леса, успешнее регистрируются с помощью фотоловушек (Tetzlaff et al. 2024). Это подчеркивает важность комбинирования молекулярных и традиционных методов мониторинга для выявления максимального числа видов.

Поверхность растений как новый субстрат для идентификации птиц по эДНК

Птицы, контактируя с различными поверхностями, неизбежно оставляют на них следы своего биологического материала, содержащего ДНК. Смывы (например, с поверхностей листьев) или сборы липким роликом (например, с коры деревьев) позволяют получить образцы, пригодные для выделения эДНК. Такие субстраты целесообразно использовать, во-первых, для изучения сообществ древесных организмов, ведущих скрытый и/или ночной образ жизни, а также обитающих в верхних ярусах крон деревьев. В связи с последним, стоит упомянуть работу, в которой предложен протокол взятия проб эДНК с верхушек деревьев с помощью беспилотных летательных аппаратов, оснащенных специальными зондами. Такой способ позволяет получить образцы с высокой концентрацией эДНК (Kirchgeorg et al. 2024). Меташтрихкодирование эДНК позволило оценить биоразнообразие дубовой рощи в Нью Джерси и тропического леса, включая видовую идентификацию птиц, обитающих в высоких кронах деревьев (Allen et al. 2023; Kirchgeorg et al. 2024).

Другая перспективная область мониторинга методами эДНК – исследование конкретных популяций фруктоядных птиц путем анализа эДНК с остатков плодов различных растений. Ученым из Южной Америки удалось выделить ДНК красных ара (*Ara macao* Linnaeus, 1758) из надкусанных плодов тропического миндаля (Monge et al. 2020). Из этого материала удалось амплифицировать семь микросателлитных локусов. Предполагается, что такой неинвазивный способ отбора проб может быть применим в исследованиях популяционной генетики птиц.

Еще одно направление работ – выявление биотических взаимодействий птиц с растениями. Анализ эДНК, собранной с различных видов цветов в Папуа-Новой Гвинее, помог определить экосистемные связи между цветковыми растениями и птицами-опылителями (Jönsson et al. 2023). Ранее такой подход успешно использовался для выявления насекомых-опылителей и фитофагов (Thomsen and Sigsgaard 2019). Он может быть особенно полезен в случае с растениями, чье изучение традиционными методами затруднено из-за их удаленного ареала,

редких посещений опылителями или преобладания скрытных видов животных-опылителей (Walker et al. 2022). Было обнаружено, что размер соцветия оказывает наибольшее влияние на число таксонов, выявляемых с помощью эДНК (Thomsen and Sigsgaard 2019; Newton et al. 2023). Более крупные соцветия привлекают больше видов, в контакте с ними обнаружено значительно больше животных, чем на небольших соцветиях и отдельных цветках. Это подчеркивает важность адаптации методики отбора проб к морфологическим особенностям исследуемых растений. Для растений с мелкими цветками увеличение объема выборки (количества исследуемых цветков и растений) может повысить полноту выявления опылителей (Newton et al. 2023). Ограничением метода остается неспособность различать животных, просто контактировавших с цветами, и фактических опылителей. Для точной идентификации опылителей необходимы дополнительные эксперименты, включая отбор проб с ключевых репродуктивных структур цветка (рыльца, пыльники) и сбор проб с насекомых, содержащих пыльцу.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

эДНК птиц предоставляет уникальные возможности для неинвазивного изучения биоразнообразия сообществ и популяций птиц. Перспективные области применения методов эДНК в орнитологических исследованиях мы классифицируем следующим образом.

Оценка биоразнообразия:

- применение меташтрихкодирования для выявления полного видового состава сообществ, в том числе в труднодоступных местах (например, в верхних ярусах тропических лесов), а также в полярных регионах, пустынных и горных местностях, экваториальных лесах;
- использование эДНК для идентификации редких и скрытных видов, присутствие которых сложно выявить традиционными методами.

Популяционные исследования:

- неинвазивное изучение гаплотипического разнообразия для анализа структуры популяций, выявления групп резидентных и мигрирующих особей;

- оценка относительной численности и распределения птиц в пространстве для мониторинга динамики популяций, построение пространственно-временных моделей динамики популяций и сообществ.

Экологические исследования:

- исследование пищевых цепей и экосистемной роли птиц;
- анализ взаимодействий птиц с растениями (опыление, питание).

Природоохранная деятельность:

- внедрение методов эДНК в программы промышленного и экологического мониторинга с целью оценки воздействия антропогенных факторов на авифауну;
- мониторинг состояния границ ареалов и миграционных маршрутов птиц под воздействием климатических и антропогенных факторов;
- оценка эффективности природоохранных мероприятий;
- использование данных эДНК для разработки стратегий управления популяциями редких и уязвимых видов.

Развитие гражданской науки и просвещения:

- привлечение волонтеров к сбору проб для анализа эДНК, что может значительно расширить географию исследований;
- повышение осведомленности населения о значении сохранения биоразнообразия через вовлечение в проекты, связанные с эДНК.

На наш взгляд, в ближайшем будущем мы увидим **совершенствование методов отбора проб и анализа образцов эДНК:**

- улучшение методики пробоотбора с различных субстратов – воды, воздуха, почвы, поверхности растений (например, разработка более чувствительных ловушек для воздуха);
- конструирование и усовершенствование специализированных беспилотных летательных аппаратов для сбора проб из труднодоступных мест (например, кроны деревьев, скалы);
- использование для прижизненной идентификации птиц и оценки их активности свободной эРНК, которая, благодаря своей неустойчивости позволяет фиксировать только недавние биологические процессы;

- поиск и внедрение новых маркеров (генетических штрихкодов) с высоким таксономическим разрешением, подходящих для идентификации птиц на основе анализа эДНК;
- расширение имеющейся базы данных митохондриальных и ядерных нуклеотидных последовательностей, которые могут быть использованы в качестве ДНК-штрихкодов птиц, а также накопление данных о региональном гаплотипическом разнообразии для разработки локальных библиотек ДНК-штрихкодов;
- изучение возможностей оценки абсолютной численности птиц с использованием эДНК по аналогии с методами, применяемыми для изучения численности и биомассы рыб.

И в заключение подчеркнем, что орнитологический мониторинг в России играет важную роль в изучении биоразнообразия и экосистемных процессов, а также при оценке антропогенной нагрузки. Однако полевые исследования часто осложняются труднодоступностью и обширностью территорий, высокой стоимостью экспедиций и нехваткой квалифицированных специалистов. Методы косвенного изучения авифауны, среди которых наиболее передовым является анализ эДНК, открывают новые возможности для проведения научных исследований и реализации программ экологического мониторинга. Тем не менее, в отечественной науке методы эДНК наиболее востребованы в почвенной микробиологии, тогда как их использование в мониторинге фауны и экосистем пока недостаточно развито. Мы уверены, что в ближайшие годы эта ситуация должна измениться, и методы анализа эДНК займут достойное место не только в научной практике, но и в области рационального природопользования.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа поддержана грантом РФФ 22-74-10043.

ЛИТЕРАТУРА

- Allen M.C., Kwait R., Vastano A., Kisurin A., Zoccolo I., Jaffe B.D., Angle J.C., Maslo B. and Lockwood J.L. 2023. Sampling environmental DNA from trees and soil to detect cryptic arboreal mammals. *Scientific Reports*, **13**: 180. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-27512-8>
- Banchi E., Pallavicini A. and Muggia L. 2020. Relevance of plant and fungal DNA metabarcoding in aerobiology. *Aerobiologia*, **36**(1): 9–23. <https://doi.org/10.1007/s10453-019-09574-2>
- Barnes M.A., Turner C.R., Jerde C.L., Renshaw M.A., Chadderton W.L. and Lodge D.M. 2014. Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environmental Science and Technology*, **48**: 1819–1827. <https://doi.org/10.1021/es404734p>
- Beng K.C. and Corlett R.T. 2020. Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and conservation: opportunities, challenges and prospects. *Biodiversity and Conservation*, **29**: 2089–2121. <https://doi.org/10.1007/s10531-020-01980-0>
- Blake M., McKeown N.J., Bushell M.L. and Shaw P.W. 2016. DNA extraction from spider webs. *Conservation Genetics Resources*, **8**: 219–221. <https://doi.org/10.1007/s12686-016-0537-8>
- Brav-Cubitt T. and Middleton D.M.R.L. 2024. A real-time PCR assay for detecting trace amounts of kiwi (*Apteryx* spp.) DNA. *Conservation Genetics Resources*. <https://doi.org/10.1007/s12686-024-01371-5>
- Chabot D. and Francis C.M. 2016. Computer-automated bird detection and counts in high-resolution aerial images: a review. *Journal of Field Ornithology*, **87**(4): 343–359. <https://doi.org/10.1111/jof.12171>
- Clare E.L., Economou C.K., Faulkes C.G., Gilbert J.D., Bennett F., Drinkwater R. and Littlefair J.E. 2021. eDNAir: proof of concept that animal DNA can be collected from air sampling. *PeerJ*, **9**: e11030. <https://doi.org/10.7717/peerj.11030>
- Clare E.L., Economou C.K., Bennett F.J., Dyer C.E., Adams K., McRobie B., Drinkwater R. and Littlefair J.E. 2022. Measuring biodiversity from DNA in the air. *Current Biology*, **32**: 693–700.e5. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.11.064>
- Closek C.J., Santora J.A., Starks H.A., Schroeder I.D., Andruszkiewicz E.A., Sakuma K.M., Bograd S.J., Hazen E.L., Field J.C. and Boehm A.B. 2019. Marine vertebrate biodiversity and distribution within the central California Current using environmental DNA (eDNA) metabarcoding and ecosystem surveys. *Frontiers in Marine Science*, **6**: 732. <https://doi.org/10.3389/fmars.2019.00732>
- David B.O., Fake D.R., Hicks A.S., Wilkinson S.P., Bunce M., Smith J.S., West D.W., Collins K.E. and Gleeson D.M. 2021. Sucked in by eDNA – a promising tool for complementing riverine assessment of freshwater fish communities in Aotearoa New Zealand. *New Zealand Journal of Zoology*, **48**: 217–244. <https://doi.org/10.1080/03014223.2021.1905672>
- Davy C.M., Kidd A.G. and Wilson C.C. 2015. Development and validation of environmental DNA (eDNA) markers for detection of freshwater turtles. *PloS ONE*,

- 10(7): e0130965. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130965>
- Day K., Campbell H., Fisher A., Gibb K., Hill B., Rose A. and Jarman S.N. 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>
- Dejean T., Valentini A., Duparc A., Pellier-Cuit S., Pompanon F., Taberlet P. and Miaud C. 2011. Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. *PLoS ONE*, 6(8): e23398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023398>
- Dickie I.A., Boyer S., Buckley H.L., Duncan R.P., Gardner P.P., Hogg I.D., Holdaway R.J., Lear G., Makiola A., Morales S.E., Powell J.R. and Weaver L. 2018. Towards robust and repeatable sampling methods in eDNA-based studies. *Molecular Ecology Resources*, 18(5): 940–952. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12907>
- Dysthe J.C., Franklin T.W., McKelvey K.S., Young M.K. and Schwartz M.K. 2018. An improved environmental DNA assay for bull trout (*Salvelinus confluentus*) based on the ribosomal internal transcribed spacer I. *PLoS ONE*, 13(11): e0206851. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206851>
- Feist S.M., Guan X., Malmfeldt M.P. and Lance R.F. 2022. Two novel qPCR assays to enhance black rail (*Laterallus jamaicensis*) eDNA surveys in the United States. *Conservation Genetics Resources*, 14: 321–329. <https://doi.org/10.1007/s12686-022-01279-y>
- Foote A.D., Thomsen P.F., Sveegaard S., Wahlberg M., Kielgast J., Kyhn L.A., Salling A.B., Galatius A., Orlando L. and Gilbert M.T.P. 2012. Investigating the potential use of environmental DNA (eDNA) for genetic monitoring of marine mammals. *PLoS ONE*, 7: e41781. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041781>
- Fraija-Fernández N., Bouquieaux M.C., Rey A., Mendibil I., Cotano U., Irigoien X., Santos M. and Rodríguez-Ezpeleta N. 2020. Marine water environmental DNA metabarcoding provides a comprehensive fish diversity assessment and reveals spatial patterns in a large oceanic area. *Ecology and Evolution*, 10: 7560–7584. <https://doi.org/10.1002/ece3.6482>
- Fraixedas S., Linden A., Piha M., Cabeza M., Gregory R. and Lehtikoinen A. 2020. A state-of-the-art review on birds as indicators of biodiversity: Advances, challenges, and future directions. *Ecological Indicators*, 118: 106728. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2020.106728>
- Frolov A.V., Vishnevskaya M.S., Viljanen H., Montreuil O. and Akhmetova L.A. 2024. New data on trophic associations of dung beetles (Coleoptera, Scarabaeidae, Scarabaeinae) and lemurs (Primates, Lemuroidea) in Madagascar revealed by metabarcoding. *Biodiversity Data Journal*, 12: e130400. <https://doi.org/10.3897/BDJ.12.e130400>
- Furlan E.M., Gleeson D., Hardy C.M. and Duncan R.P. 2016. A framework for estimating the sensitivity of eDNA surveys. *Molecular Ecology Resources*, 16(3): 641–654. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12483>
- Furness R.W. and Greenwood J.J. 1993. Birds as monitors of environmental change. Springer, London, 356 p. <https://doi.org/10.1007/978-94-015-1322-7>
- Garrett N.R., Watkins J., Simmons N.B., Fenton B., Maeda-Obregon A., Sanchez D.E., Froehlich E.M., Walker F.M., Littlefair J.E. and Clare E.L. 2023. Airborne eDNA documents a diverse and ecologically complex tropical bat and other mammal community. *Environmental DNA*, 5: 350–362. <https://doi.org/10.1002/edn3.385>
- Gregorič M., Kutnjak D., Bačnik K., Gostinčar C., Pecman A., Ravnikar M. and Kuntner M. 2022. Spider webs as eDNA samplers: Biodiversity assessment across the tree of life. *Molecular ecology resources*, 22(7): 2534–2545. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13629>
- Gregory R.D., van Strien A., Vorisek P., Gmelig Meyling A.W., Noble D.G., Foppen R.P. and Gibbons D.W. 2005. Developing indicators for European birds. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 360(1454): 269–288. <https://doi.org/10.1098/rstb.2004.1602>
- Guthrie A.M., Cooper C.E., Bateman P.W., van der Heyde M., Allentoft M.E. and Nevill P. 2024. A quantitative analysis of vertebrate environmental DNA degradation in soil in response to time, UV light, and temperature. *Environmental DNA*, 6: e581. <https://doi.org/10.1002/edn3.581>
- Haderlé R., Bouveret L., Chazal J., Girardet J., Iglésias S., Lopez P.J., Millon C., Valentini A., Ung V. and Jung J.L. 2024. eDNA-based survey of the marine vertebrate biodiversity off the west coast of Guadeloupe (French West Indies). *Biodiversity Data Journal*, 12: e125348. <https://doi.org/10.3897/BDJ.12.e125348>
- Harper L.R., Handley L.L., Hahn C., Boonham N., Rees H.C., Gough K.C., Lewis E., Adams I.P., Brotherton P., Phillips S. and Hänfling B. 2018. Needle in a haystack? A comparison of eDNA metabarcoding and targeted qPCR for detection of the great crested newt (*Triturus cristatus*). *Ecology and Evolution*, 8: 6330–6341. <https://doi.org/10.1002/ece3.4013>
- Harrison J.B., Sunday J.M. and Rogers S.M. 2019. Predicting the fate of eDNA in the environment and implications for studying biodiversity. *Proceedings of the Royal Society, Biological sciences*, 286(1915): 20191409. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.1409>
- Hebert P.D.N., Cywinska A., Ball S.L. and de Waard J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B, Biological Sciences*, 270(1512): 313–321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hebert P.D., Stoeckle M.Y., Zemplak T.S. and Francis C.M. 2004. Identification of Birds through DNA

- Barcodes. *PLoS Biology*, **2**(10): e312. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020312>
- Hird S.M. 2017.** Evolutionary Biology Needs Wild Microbiomes. *Frontiers in Microbiology*, **8**: 725. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00725>
- Honka J., Kvist L., Øien I.J., Aarvak T., Siivonen S. and Aspi J. 2024a.** Environmental DNA reveals a presence of *Anser fabalis* (Bean Goose) and an absence of *Anser erythropus* (Lesser White-fronted Goose) in Finnish Northern Lapland. *Ornithological Applications*, **127**(1): 1–10. <https://doi.org/10.1093/ornithapp/duae060>
- Honka J., Kvist L., Olli S., Laaksonen T. and Aspi J. 2024b.** Optimised PCR assays for detecting elusive waterfowl from environmental DNA. *Ecology and Evolution*, **14**: e11224. <https://doi.org/10.1002/ece3.11224>
- Ilina A.V., Galkina S.A., Starikov D.A., Salhabeev R.G. and Dyomin A.G. 2024.** Study on exogenous DNA degradation in Ladoga lake water. *Biotehnologiya*, **40**(3): 100–108. [In Russian]. <https://doi.org/10.56304/S0234275824030116>
- Jensen M.R., Høgslund S., Knudsen S.W., Nielsen J., Møller P.R., Rysgaard S. and Thomsen P.F. 2023.** Distinct latitudinal community patterns of Arctic marine vertebrates along the East Greenlandic coast detected by environmental DNA. *Diversity and Distributions*, **29**: 316–334. <https://doi.org/10.1111/ddi.13665>
- Jerde C.L., Mahon A.R., Chadderton W.L. and Lodge D.M. 2011.** “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation letters*, **4**(2): 150–157. <https://doi.org/10.1111/j.1755-263X.2010.00158.x>
- Jo T.S., Tsuru K. and Yamanaka H. 2022.** Can nuclear aquatic environmental DNA be a genetic marker for the accurate estimation of species abundance? *Naturwissenschaften*, **109**(4): 38. <https://doi.org/10.1007/s00114-022-01808-7>
- Johnson M.D., Barnes M.A., Garrett N.R. and Clare E.L. 2023.** Answers blowing in the wind: Detection of birds, mammals, and amphibians with airborne environmental DNA in a natural environment over a yearlong survey. *Environmental DNA*, **5**(2): 375–387. <https://doi.org/10.1002/edn3.388>
- Jønsson K.A., Thomassen E.E., Iova B., Sam K. and Thomsen P.F. 2023.** Using environmental DNA to investigate avian interactions with flowering plants. *Environmental DNA*, **5**: 462–475. <https://doi.org/10.1002/edn3.393>
- Katayama N., Yamamoto S., Baba Y.G., Ito K. and Yamasako J. 2024.** Complementary role of environmental DNA for line-transect bird surveys: A field test in a Japanese rice landscape. *Ecological Indicators*, **166**: 112442. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2024.112442>
- Katz A.D., Harper L.R., Sternhagen E.C., Pearce S.E., Melder C.A., Sperry J.H. and Davis M.A. 2021.** Environmental DNA is effective in detecting the federally threatened Louisiana Pinesnake (*Pituophis ruthveni*). *Environmental DNA*, **3**: 409–425. <https://doi.org/10.1002/edn3.126>
- Kerley G., Landman M., Ficetola G.F., Boyer F., Bonnin A., Rioux D., Taberlet P. and Coissac E. 2018.** Diet shifts by adult flightless dung beetles *Circellium bacchus*, revealed using DNA metabarcoding, reflect complex life histories. *Oecologia*, **188**: 29961180. <https://doi.org/10.1007/s00442-018-4203-6>
- Kirchgeorg S., Chang J.J.M., Ip Y.C.I., Jucker M., Geckeler C., Lüthi M., van der Loo E., Mächler E., Franco-Sierra N.D., Herrera M.A.G., Pellissier L., Deiner K., Desiderato A. and Mintchev S. 2024.** eProbe: sampling of environmental DNA within tree canopies with drones. *Environmental Science and Technology*, **58**(37): 16410–16420. <https://doi.org/10.1021/acs.est.4c05595>
- Koskimies P. 1989.** Birds as a tool in environmental monitoring. *Annales Zoologici Fennici*, **26**(3): 153–166.
- Lacoursière-Roussel A., Dubois Y., Normandeau E. and Bernatchez L. 2016.** Improving herpetological surveys in eastern North America using the environmental DNA method. *Genome*, **59**(11): 991–1007. <https://doi.org/10.1139/gen-2015-0218>
- Le Maho Y., Karmann H., Briot D., Handrich Y., Robin J.P., Mioskowski E., Cherel Y. and Farni J. 1992.** Stress in birds due to routine handling and a technique to avoid it. *The American journal of physiology*, **263**(4 Pt 2): R775–R781. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1992.263.4.R775>
- Lodge D., Turner C., Jerde C., Barnes M.A., Chadderton L., Egan S.P., Feder J.L., Mahon A.R. and Pfrender M.E. 2012.** Conservation in a cup of water: estimating biodiversity and population abundance from environmental DNA. *Molecular Ecology*, **11**: 2555–2558. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05600.x>
- Lodge D.M. 2024.** Conservation in a litre of air. *Molecular Ecology Resources*, **24**(1): e13883. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13883>
- Lozano Mojica J.D. and Caballero S. 2021.** Applications of eDNA metabarcoding for vertebrate diversity studies in northern Colombian water bodies. *Frontiers in Ecology and Evolution*, **8**: 617948. <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.617948>
- Lynggaard C., Bertelsen M.F., Jensen C.V., Johnson M.S., Frøslev T.G., Olsen M.T. and Bohmann K. 2022.** Airborne environmental DNA for terrestrial vertebrate community monitoring. *Current Biology*, **32**(3): 701–707. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2021.12.014>
- Lynggaard C., Frøslev T.G., Johnson M.S., Olsen M.T. and Bohmann K. 2024.** Airborne environmental DNA captures terrestrial vertebrate diversity in nature. *Molecular Ecology Resources*, **24**(1): e13840. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13840>
- 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**: e66557. <https://doi.org/10.3897/mbmg.5.66557>
- Mariani S., Harper L.R., Collins R.A., Baillie C., Wangenstein O.S., McDevitt A.D., Heddell-Cowie M. and Genner M.J. 2021.** Estuarine molecular bycatch as a landscape-wide biomonitoring tool. *Biological Conservation*, **261**: 109287. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2021.109287>
- McDonald R., Bateman P.W., Cooper C., van der Heyde M., Mousavi-Derazmahalleh M., Hedges B.A., Guzik M.T. and Nevill P. 2023.** Detection of vertebrates from natural and artificial inland water bodies in a semi-arid habitat using eDNA from filtered, swept, and sediment samples. *Ecology and Evolution*, **13**: e10014. <https://doi.org/10.1002/ece3.10014>
- Mena J.L., Yagui H., Tejeda V., Bonifaz E., Bellemain E., Valentini A., Tobler M.W., Sánchez-Vendizú P. and Lyet A. 2021.** Environmental DNA metabarcoding as a useful tool for evaluating terrestrial mammal diversity in tropical forests. *Ecological Applications*, **31**(5): e02335. <https://doi.org/10.1002/eap.2335>
- Miaud C., Taberlet P. and Dejean T. 2012.** ADN “environnemental”: un saut méthodologique pour les inventaires de la biodiversité. *Sciences Eaux and Territoires*, **6**: 92–95. <https://doi.org/10.14758/SET-REVUE.2012.6.16>
- Miya M. 2022.** Environmental DNA metabarcoding: a novel method for biodiversity monitoring of marine fish communities. *Annual Review of Marine Science*, **14**: 161–185. <https://doi.org/10.1146/annurev-marine-041421-082251>
- Miyata K., Inoue Y., Amano Y., Nishioka T., Yamane M., Kawaguchi T., Morita O. and Honda H. 2021.** Fish environmental RNA enables precise ecological surveys with high positive predictivity. *Ecological Indicators*, **128**: 107796. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.107796>
- Monge O., Dumas D. and Baus I. 2020.** Environmental DNA from avian residual saliva in fruits and its potential uses in population genetics. *Conservation Genetics Resources*, **12**: 131–139. <https://doi.org/10.1007/s12686-018-1074-4>
- Mokievsky V.O., Tsetlin A.B., Azovsky A.I., Naumov A.D., Kosobokova K.N., Kuzishchin K.V., Sapozhnikov F.V., Vedenin A.A., Gavrilov M.V., Isachenko A.I., Ilyushin D.G., Simakova U.V., Zalota A.K., Shabalin N.V., Maksimova O.V., Glazov D.M., Mardashova M.V., Kalinina O.Yu., Valieva A.S., Zagretidinova D.R., Lazareva R.E. and Udovik D.A. 2020.** Species as biological indicators of the state of marine arctic ecosystems. NIR Foundation, Moscow, 383 p. [In Russian].
- Muff M., Jaquier M., Marques V., Ballesta L., Deter J., Bockel T., Hocdé R., Juhel J.B., Boulanger E., Guelati N., Fernández A.P., Valentini A., Dejean T., Manel S., Albouy C., Durville P., Mouillot D., Holon F. and Pellissier L. 2023.** Environmental DNA highlights fish biodiversity in mesophotic ecosystems. *Environmental DNA*, **5**(1): 56–72. <https://doi.org/10.1002/edn3.358>
- Neice A.A. and McRae S.B. 2021.** An eDNA diagnostic test to detect a rare, secretive marsh bird. *Global Ecology and Conservation*, **27**: e01529. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2021.e01529>
- Newton J.P., Bateman P.W., Heydenrych M.J., Kestel J.H., Dixon K.W., Prendergast K.S., White N.E. and Nevill P. 2023.** Monitoring the birds and the bees: Environmental DNA metabarcoding of flowers detects plant-animal interactions. *Environmental DNA*, **5**: 488–502. <https://doi.org/10.1002/edn3.399>
- Newton J.P., Nevill P., Bateman P.W., Campbell M.A. and Allentoft M.E. 2024.** Spider webs capture environmental DNA from terrestrial vertebrates. *iScience*, **27**(2): 108904. <https://doi.org/10.1016/j.isci.2024.108904>
- Palacios Mejia M., Curd E., Edalati K., Renshaw M.A., Dunn R., Potter D., Fraga N., Moore J., Saiz J., Wayne R. and Parker S.S. 2021.** The utility of environmental DNA from sediment and water samples for recovery of observed plant and animal species from four Mojave Desert springs. *Environmental DNA*, **3**(1): 214–230. <https://doi.org/10.1002/edn3.161>
- Parsons K.M., Everett M., Dahlheim M. and Park L. 2018.** Water, water everywhere: Environmental DNA can unlock population structure in elusive marine species. *Royal Society open science*, **5**: 180537. <https://doi.org/10.1098/rsos.180537>
- Pérez-Fleitas E., Milián-García Y., Sosa-Rodríguez G., Amato G., Rossi N., Shirley M.H. and Hanner R.H. 2023.** Environmental DNA-based biomonitoring of Cuban *Crocodylus* and their accompanying vertebrate fauna from Zapata Swamp, Cuba. *Scientific Reports*, **13**: 20438. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-47675-8>
- Piaggio A.J., Engeman R.M., Hopken M.W., Humphrey J.S., Keacher K.L., Bruce W.E. and Avery M.L. 2014.** Detecting an elusive invasive species: a diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, **14**(2): 374–380. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12180>
- Pinakhina D.V. and Chekunova E.M. 2020.** Environmental DNA: history of studies, current and perspective applications in fundamental and applied research. *Ecological Genetics*, **18**(4): 493–509. [In Russian]. <https://doi.org/10.17816/ecogen25900>
- Polanco F.A., Mutis Martinezguerra M., Marques V., Villa-Navarro F., Borrero Pérez G.H., Cheutin M.C., Dejean T., Hocdé R., Juhel J.B., Maire E., Manel S., Spescha S., Valentini A., Mouillot D.,**

- Albouy C. and Pellissier L. 2021. Detecting aquatic and terrestrial biodiversity in a tropical estuary using environmental DNA. *Biotropica*, **53**: 1606–1619. <https://doi.org/10.1111/btp.13009>
- Port J.A., O'Donnell J.L., Romero-Maraccini O.C., Leary P.R., Litvin S.Y., Nickols K.J., Yamahara K.M. and Kelly R.P. 2016. Assessing vertebrate biodiversity in a kelp forest ecosystem using environmental DNA. *Molecular Ecology*, **25**: 527–541. <https://doi.org/10.1111/mec.13481>
- Ritter C.D., Dal Pont G., Stica P.V., Horodesky A., Cozer N., Netto O.S.M., Henn C., Ostrensky A. and Pie M.R. 2022. Wanted not, wasted not: Searching for non-target taxa in environmental DNA metabarcoding by-catch. *Environmental Advances*, **7**: 100169. <https://doi.org/10.1016/j.envadv.2022.100169>
- Roesma D.I., Djong H.T., Janra M.N. and Aidil D.R. 2021. Freshwater vertebrates monitoring in Maninjau Lake, West Sumatra, Indonesia using environmental DNA. *Biodiversitas*, **22**(5): 2794–2802. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d220543>
- Ryan E., Bateman P., Fernandes K., van der Heyde M. and Nevill P. 2022. eDNA metabarcoding of log hollow sediments and soils highlights the importance of substrate type, frequency of sampling and animal size, for vertebrate species detection. *Environmental DNA*, **4**: 940–953. <https://doi.org/10.1002/edn3.306>
- Saenz-Agudelo P., Delrieu-Trottin E., DiBattista J.D., Martínez-Rincon D., Morales-González S., Pontigo F., Ramírez P., Silva A., Soto M. and Correa C. 2022. Monitoring vertebrate biodiversity of a protected coastal wetland using eDNA metabarcoding. *Environmental DNA*, **4**: 77–92. <https://doi.org/10.1002/edn3.200>
- Sakata M.K., Yamamoto S., Gotoh R.O., Miya M., Yamanaka H. and Minamoto T. 2020. Sedimentary eDNA provides different information on timescale and fish species composition compared with aqueous eDNA. *Environmental DNA*, **2**(4): 505–518. <https://doi.org/10.1002/edn3.75>
- Schütz R., Tollrian R. and Schweinsberg M. 2020. A novel environmental DNA detection approach for the wading birds *Platalea leucorodia*, *Recurvirostra avosetta* and *Tringa totanus*. *Conservation Genetics Resources*, **12**: 529–531. <https://doi.org/10.1007/s12686-020-01143-x>
- Serrao N.R., Weckworth J.K., McKelvey K.S., Dwyer J.C. and Schwartz M.K. 2021. Molecular genetic analysis of air, water, and soil to detect big brown bats in North America. *Biological Conservation*, **261**: 109252. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2021.109252>
- Sigsgaard E.E., Nielsen I.B., Bach S.S., Lorenzen E.D., Robinson D.P., Knudsen S.W., Pedersen M.W., Jaidah M.A., Orlando L., Willerslev E., Møller P.R. and Thomsen P.F. 2016. Population characteristics of a large whale shark aggregation inferred from seawater environmental DNA. *Nature Ecology and Evolution*, **1**(1): 4. <https://doi.org/10.1038/s41559-016-0004>
- Sogin M.L., Morrison H.G., Huber J.A., Mark Welch D., Huse S.M., Neal P.R., Arrieta J.M. and Herndl G.J. 2006. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored “rare biosphere”. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **103**(32): 12115–12120. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605127103>
- Sohn H. and Song Y. 2024. Monitoring of mammal and bird species in an urban ecological park using environmental DNA metabarcoding. *Urban Ecosystems*, **27**: 1–14. <https://doi.org/10.1007/s11252-024-01557-7>
- Steele B.B., Bayn R.L. and Val Grant C. 1984. Environmental monitoring using populations of birds and small mammals: Analyses of sampling effort. *Biological Conservation*, **30**(2): 157–172. [https://doi.org/10.1016/0006-3207\(84\)90064-8](https://doi.org/10.1016/0006-3207(84)90064-8)
- Suarez-Bregua P., Alvarez-Gonzalez M., Parsons K.M., Rotllant J., Pierce G.J. and Saavedra C. 2022. Environmental DNA (eDNA) for monitoring marine mammals: Challenges and opportunities. *Frontiers in Marine Science*, **9**: 987774. <https://doi.org/10.3389/fmars.2022.987774>
- Taberlet P., Coissac E., Hajibabaei M. and Rieseberg L.H. 2012a. Environmental DNA. *Molecular Ecology*, **21**(8): 1789–1793. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05542.x>
- Taberlet P., Coissac E., Pompanon F., Brochmann C. and Willerslev E. 2012b. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, **21**(8): 2045–2050. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05470.x>
- Taberlet P., Bonin A., Zinger L. and Coissac E. 2018. Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring. Oxford University Press, Oxford. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198767220.001.0001>
- Takahara T., Minamoto T., Yamanaka H., Doi H. and Kawabata Z. 2012. Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLoS ONE*, **7**(4): e35868. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035868>
- Takahara T., Minamoto T. and Doi H. 2013. Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PLoS ONE*, **8**(2): e56584. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056584>
- Takahashi M., Saccò M., Kestel J.H., Nester G., Campbell M.A., van der Heyde M., Heydenrych M.J., Juszkiewicz D.J., Nevill P., Dawkins K.L., Bessey C., Fernandes K., Miller H., Power M., Mousavi-Derazmahalleh M., Newton J.P., White N.E., Richards Z.T. and Allentoft M.E. 2023. Aquatic environmental DNA: A review of the macro-organismal biomonitoring revolution. *Science of the Total Environment*, **873**: 162322. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.162322>
- Tetzlaff S.J., Katz A.D., Wolff P.J. and Kleitch M.E. 2024. Comparison of soil eDNA to camera traps for assessing mammal and bird community composition and

- site use. *Ecology and Evolution*, **14**(7): e70022. <https://doi.org/10.1002/ece3.70022>
- Thomsen P., Kielgast J., Iversen L., Møller P., Rasmussen M. and Willerslev E. 2012a.** Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS ONE*, **7**: e41732. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041732>
- Thomsen P.F., Kielgast J.O.S., Iversen L.L., Wiuf C., Rasmussen M., Gilbert M.T.P., Orlando L. and Willerslev E. 2012b.** Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, **21**(11): 2565–2573. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x>
- Thomsen P.F., Møller P.R., Sigsgaard E.E., Knudsen S.W., Jørgensen O.A. and Willerslev E. 2016.** Environmental DNA from seawater samples correlate with trawl catches of subarctic, deepwater fishes. *PLoS ONE*, **11**: e0165252. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165252>
- Thomsen P.F. and Sigsgaard E.E. 2019.** Environmental DNA metabarcoding of wild flowers reveals diverse communities of terrestrial arthropods. *Ecology and Evolution*, **9**(4): 1665–1679. <https://doi.org/10.1002/ece3.4809>
- Tsuji S., Inui R., Nakao R., Miyazono S., Saito M., Kono T. and Akamatsu Y. 2022.** Quantitative environmental DNA metabarcoding shows high potential as a novel approach to quantitatively assess fish community. *Scientific Reports*, **12**: 21524. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-25274-3>
- Urban L., Miller L.K., Eason D., Vercoe D., Shaffer M., Wilkinson S.P., Jeunen G.-J., Gemmell N.J. and Digby A. 2023.** Non-invasive real-time genomic monitoring of the critically endangered kākāpō. *eLife*, **12**: RP84553. <https://doi.org/10.7554/eLife.84553.2>
- Ushio M., Murakami H., Masuda R., Sado T., Miya M., Sakurai S., Yamanaka H., Minamoto T. and Kondoh M. 2018a.** Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing. *Metabarcoding and Metagenomics*, **2**: e23297. <https://doi.org/10.3897/mbmg.2.23297>
- Ushio M., Murata K., Sado T., Nishiumi I., Takeshita M., Iwasaki W. and Miya M. 2018b.** Demonstration of the potential of environmental DNA as a tool for the detection of avian species. *Scientific Reports*, **8**(1): 4493. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22817-5>
- Valsecchi E., Bylemans J., Goodman S.J., Lombardi R., Carr I., Castellano L., Galimberti A. and Galli P. 2020.** Novel universal primers for metabarcoding environmental DNA surveys of marine mammals and other marine vertebrates. *Environmental DNA*, **2**(4): 460–476. <https://doi.org/10.1002/edn3.72>
- Villacorta-Rath C., Hoskin C.J., Strugnell J.M. and Burrows D. 2021.** Long distance (>20 km) downstream detection of endangered stream frogs suggests an important role for eDNA in surveying for remnant amphibian populations. *PeerJ*, **9**: e12013. <https://doi.org/10.7717/peerj.12013>
- Walker F.M., Sanchez D.E., Froehlich E.M., Federman E.L., Lyman J.A., Owens M. and Lear K. 2022.** Endangered nectar-feeding bat detected by environmental DNA on flowers. *Animals*, **12**: 3075. <https://doi.org/10.3390/ani12223075>
- Wang Z., Liu X., Liang D., Wang Q., Zhang L. and Zhang P. 2023.** VertU: universal multilocus primer sets for eDNA metabarcoding of vertebrate diversity, evaluated by both artificial and natural cases. *Frontiers in Ecology and Evolution*, **11**: 1164206. <https://doi.org/10.3389/fevo.2023.1164206>
- Xu C.C., Yen I.J., Bowman D. and Turner C.R. 2015.** Spider web DNA: a new spin on noninvasive genetics of predator and prey. *PloS one*, **10**(11): e0142503. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142503>
- Yamamoto S., Masuda R., Sato Y., Sado T., Araki H., Kondoh M., Minamoto T. and Miya M. 2017.** Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Scientific Reports*, **7**: 40368. <https://doi.org/10.1038/srep40368>
- Yang S., Francis R.J., Holding M. and Kingsford R.T. 2024.** Aerial photography and machine learning for estimating extremely high flamingo numbers on the Makgadikgadi Pans, Botswana. *Global Ecology and Conservation*, **53**: e03011. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2024.e03011>