

## 利用通用引子調查知本溼地魚類物種之環境 DNA 技術研究

高仰賢、呂佩倫\*

### 摘要

環境 DNA 是一種新穎的物種調查方式，不同於傳統調查方式需要經由肉眼確認物種，只需要從環境中採集樣本並藉由分子生物技術進行處理，即可完成物種調查。本實驗選用 MiFish-U 魚類通用引子進行實驗，將生物樣本（單一魚種和混合魚種樣本）及養魚水體樣本進行處理，再跑 PCR 進行序列擴增，進行 Sanger 定序後於 NCBI 上進行 BLAST 比對，即可得知此引子是否適用於環境 DNA 樣本。結果顯示，單一魚種樣本的魚肉或魚鰭 DNA 序列比對正確率高達 97% 到 100%，混合魚種樣本和養魚水體樣本雖有定序出正確的物種，但由於 Sanger 定序法的限制，有的魚種會無法定序出來。在目前的實驗採樣過程並無發現珍稀水生動物的足跡，推測可能是過去人為活動與干擾頻繁造成數量較少所以難以觀測。後續實驗將進行環境 DNA 樣本的 PCR 以及次世代定序還有序列分析，以建構出知本溼地的魚類物種調查資料。

**關鍵字：**環境 DNA、知本溼地、生物多樣性、水生生態系統

---

高仰賢，國立臺東大學生命科學系大學部校友。mm2434353181@gmail.com

呂佩倫(通訊作者)，國立臺東大學生命科學系副教授。Email: peiluen@nttu.edu.tw

## **Research on Environmental DNA Technology of Fish and Animals in Zhiben Wetland By Using Universal Primers**

Yang-Hsien Kao and Pei-Luen Lu\*

### **Abstract**

Environmental DNA (eDNA) is a novel method of species investigation. Unlike the traditional method of investigation, which needs to confirm the species with the naked eye, it only needs to collect samples from the environment and process them through molecular biotechnology to complete the species investigation. In this experiment, MiFish-U fish general primers were used for the experiment, biological samples (single fish species and mixed fish species samples) and fish culture water samples were processed, and then PCR was run for sequence amplification, Sanger sequencing was performed and BLAST was performed on NCBI. By comparison, we can know whether this primer is suitable for environmental DNA samples. The results show that the correct rate of fish meat or fin DNA sequence alignment of a single fish species sample is as high as 97% to 100%. Although the mixed fish species samples and fish culture water samples have sequenced the correct species, due to the limitation of the Sanger sequencing method, some fish species will not be sequenced. In the current experimental sampling process, no traces of rare aquatic animals have been found. It is speculated that the number may be small due to frequent human activities and disturbances in the past, so it is difficult to observe. Subsequent experiments will carry out PCR, next-generation sequencing and sequence analysis of environmental DNA samples to construct fish species survey data in Zhiben Wetland.

**Keywords:** Environmental DNA (eDNA), Zhiben Wetland, Biodiversity, Aquatic Ecosystem

---

Yang-Hsien Kao, alumni (undergraduate), Department of Life Science, National Taitung University. E-mail: [mm2434353181@gmail.com](mailto:mm2434353181@gmail.com)

Pei-Luen Lu (Corresponding Author), Associate Professor, Department of Life Science, National Taitung University. E-mail: [peiluen@nttu.edu.tw](mailto:peiluen@nttu.edu.tw)

## 前言

知本濕地地理位置特殊且又是一個天然湧泉草澤溼地，所以有許多保育類跟候鳥來知本濕地過境，國際鳥盟在 2004 年也將知本濕地劃為「重要野鳥類棲息地」(編號：IBA-TW040) (BirdLife International 2023)，同時此區域也是屬於卑南族卡大地布部落的傳統領域，濕地核心湖泊夢幻湖位於國際級重要濕地知本溼地，近年深受知本濕地光電開發案影響有消失的危機，所幸後來光電開發案於 2022 年九月終止(台東縣 102 年度國家重要濕地保育行動計畫 2014; 林金德, 2016; 林孟潔 2022)。

愈來愈多證據顯示，當物種消失會改變整個生態系統，且會加速生態系統的變化 (Hooper, 2012)，且有很多情形會影響生物多樣性，像是土地的開發 (Milder, 2008)、有毒氣體的排放 (Oleksyn et al, 1994)、全球氣候的變化 (Colombo, 2010)、外來種的入侵 (Butchart, 2010) 等等，雖然現在人類正在快速發展，極需要運用到地球上各個資源，但為了地球的永續經營，生態系統的保護與恢復已經成為人類應致力實現的目標 (Aronson, 2013)。物種在環境中所遺留下來的遺傳物質 (DNA 片段)，定義為環境 DNA (environmental DNA, eDNA)，在 eDNA 研究早期，1980 年代時，是用於檢測海洋沉積物的微生物群落，在 1990 年代時，用來檢測水中微生物與浮游植物的群落，在最近，eDNA 法用於入侵與瀕危物種的檢測與統計，且技術愈來愈成熟，eDNA 法也適用於愈來愈多領域中，像是野生生物 DNA 的檢測、生物多樣性及群落的結構、物種的歷史分布等等 (Díaz-Ferguson, 2014)。eDNA 方法被廣泛應用在各個環境中，且國內外已有許多成功的案例，如 Miya 及多位學者利用 MiFish-U 引子在沖繩美麗海水族館 (Okinawa Churaumi Aquarium) 進行了環境 DNA 採樣以及序列分析，總共從 180 種海洋魚類中檢測出 168 種 (Miya et al., 2015)，還有 Everts 學者對美洲牛蛙進行豐度的檢測 (Everts et al., 2021)，像是 eDNA 方法應用於陸生生態系統 (Andersen et al., 2012)、淡水生態系統 (Jerde et al., 2011; Thomsen et al., 2012a; Goldberg et al., 2013) 和海洋生態系統 (Foote et al., 2012; Yamamoto et al., 2016; Schenk et al., 2019)。水生生態系統包含有淡水及海洋生態系，藉由 eDNA 法的應用，只要是水生生物體 (魚類、哺乳類、藻類等)，或者需要在水附近生活的生物 (兩棲類)，皆能追蹤到牠們的存在，即使物種密度低也能偵測到，具有快篩的功能，對於外來入侵種防治具有及早發現的功能 (Jerde et al., 2011; Darling and Mahon 2011; Thomsen et al., 2012a,b)。環境 DNA 相較於傳統調查方法，能節省許多人力、工具、時間等成本，對於物種調查來說是一種很新穎的調查方式，更進階的是能對生物量的估算、外來種的入侵等進行鑑定。

eDNA 的濃度可用於估算物種的豐度 (Takahara, 2012)，故此 eDNA 濃度對於後續的實驗以及分析是相當重要的因子，但是 eDNA 會隨著時間降解，且時間愈長降解情況會愈顯著 (Pilliod et al, 2014)，所以須盡快將取得的樣品進行處理，以免影響後續的分析結果。本實驗是以環境 DNA 為主軸的實驗，環境 DNA 是透過生物掉落之組織細胞藉由分子生物技術 (DNA 抽取、PCR、序列分析) 來分析物種的方式，偵測範圍很廣，從微生物到大型海洋動物都可用此方式調查。透過次世代定序 (Next Generation Sequencing, NGS) 達成快速且大量的定序，並將序列與基因庫做序列對比，即可得知大量物種。此研究嘗試利用環境 DNA 來調查知本溼地之水生生物，由於選用的 MiFish-U 引子是針對魚類的通用引子，因此本實驗目前針對知本溼地的魚類進行調查。

## 材料與方法

### 一、研究地區

知本溼地屬於台東縣政府管轄，濕地範圍在台東平原最南端，知本溪口的北側，東沿射馬干溪(知本大排)至太平洋海岸，西至省道台 11 線公路至知本溪河岸堤防，南以沿知本溪河堤至知本溪出海口為界，北至射馬干溪與省道台 11 線公路交會點，面積約 149 公頃，如圖 1-4。本實驗預計取 9 個樣區，每樣區進行三重複實驗，樣區皆設置在湖泊或是河流當中(圖 5)。

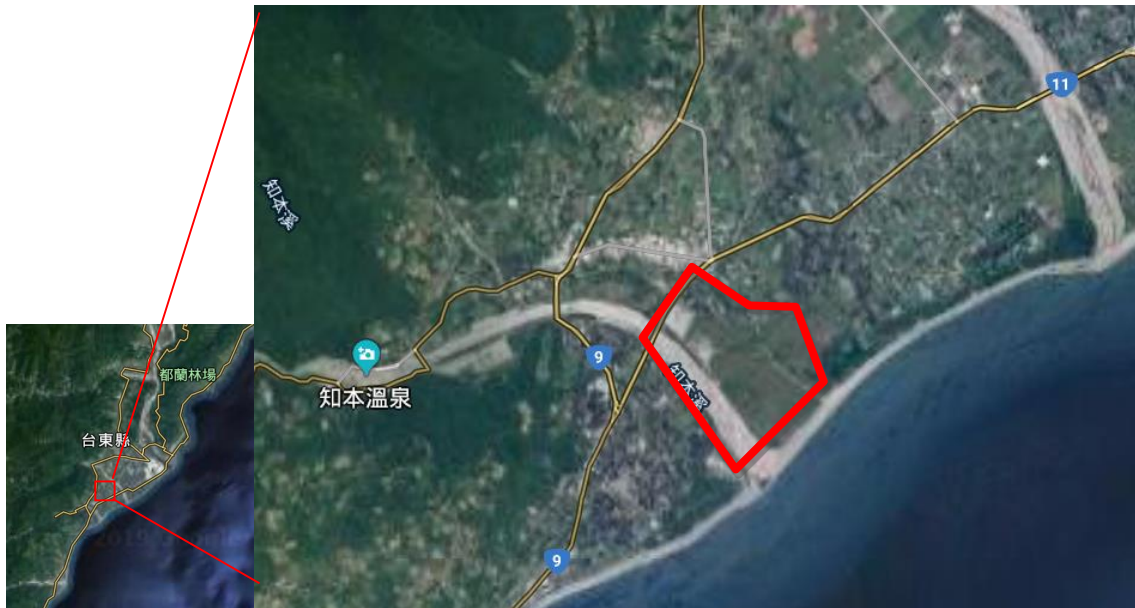


圖 1.知本溼地地理位置圖



圖 2.知本溼地核心湖體。



圖 3.知本溪下游。



圖 4.知本溪下游潰堤連接到出海口。



圖 5.研究樣區位置圖

## 二、野外採集樣本

樣本分為生物樣本、養魚水體樣本、環境 DNA 樣本

### (一) 生物樣本：

抽取魚類、蝦類以及兩棲類生物組織 (肌肉、魚鱗) 之 DNA，分為單一魚種和混合魚種樣本，以測試引子分辨不同物種的能力。

### (二) 養魚水體樣本：

將兩隻吉利慈鯛及一隻鰕虎科的魚類養在魚缸中，總共養三天，每一天都從魚缸中的水體用過濾環境 DNA 之濾膜進行過濾，並抽取出 DNA，為了要模擬環境 DNA 樣本，測試環境 DNA 法是否可行。

### (三) 環境 DNA 樣本：

本實驗參考 Johnson et al.(2019)方法，選擇 9 個水體採集地點，於 2020 年 4 月到 2021 年 3 月進行定期採樣(每月採集一次)。

每樣區準備 4L 的血清瓶(滅過菌)，在取樣的過程當中，必須避免裝入水體中的泥沙等物質，取樣完後盡快回到實驗室利用抽氣過濾裝置過濾，使用 47-mm diameter GF/F filter with pore size 0.7  $\mu\text{m}$  (GE Healthcare - Whatman)濾紙來當濾膜，過濾完水後可將濾膜保存於  $-20^{\circ}\text{C}$  冰箱直到要進行 DNA 抽取。

### 三、DNA 抽取

參考侯晨昕(2015)與陳柳豪(2016)方法，將濾紙、以及生物樣本組織剪碎後放入 2 mL 的微量離心管中，加入 800  $\mu$ L cell lysis buffer (要淹過濾膜、組織)，再加入 4  $\mu$ L Proteinase K，置於 56°C 水浴鍋煮 4 小時(每一小時搖晃一次)，煮完後加入 3  $\mu$ L Rnase 搖晃均勻，再置於 37°C 水浴鍋煮 15 分鐘後，放入 4°C 冰箱 5 分鐘，加入 200  $\mu$ L Protein Precipitation Buffer 放冰箱至隔夜。隔夜後離心 14800 g 3 分鐘後取上清液至新的 1.5 mL 微量離心管中，並加入 600  $\mu$ L 異丙醇輕輕搖晃，離心 14800 g 1 分鐘後取出上清液，加入 600  $\mu$ L 70%酒精輕輕搖晃，離心 16800 g 1 分鐘後取出上清液，利用小烏龜再次離心 10 秒，並將剩餘液體完全吸乾，利用真空離心機烘乾離心管約 20~30 秒(不可過乾)，加入 40  $\mu$ L DNA Dissolving Buffer 回溶 DNA，置於 56°C 水浴鍋煮 1 小時，最後將樣品保存於 -20°C 冰箱即可完成 DNA 的抽取。

### 四、PCR 序列擴增

進行 PCR 之前，須將 DNA 樣本進行濃度測定，測定完後將濃度記錄下來，再進行稀釋，將 DNA 濃度稀釋到 20 (ng/ $\mu$ L) 左右為最好，稀釋完後即可進行 PCR。

PCR 所使用的引子是 MiFish-U 魚類通用引子，並利用 KAPA HiFi HotStart PCR Kits 進行 PCR，KAPA HiFi Fidelity Buffer (5X) 加 5  $\mu$ L，KAPA dNTP Mix (10 mM) 加 0.75  $\mu$ L，MiFish-U Primer(1 $\mu$ M)加 2.5  $\mu$ L，KAPA HiFi HotStart DNA Polymerase (1 U/ $\mu$ L) 加 0.3  $\mu$ L，DNA Template (生物樣本、養魚水體樣本 DNA 濃度約 5 ng/ $\mu$ L、環境 DNA 樣本約 20 ng/ $\mu$ L) 加 2  $\mu$ L，dd H<sub>2</sub>O 加 14.45  $\mu$ L，總體積為 25  $\mu$ L。PCR 溫度條件為初始 DNA 變性 95 °C 5 分鐘，並 DNA 變性 98 °C 20 秒、DNA 黏合 68 °C 15 秒、DNA 延伸 72 °C 15 秒重複 35 個循環，最終 DNA 延伸 72 °C 5 分鐘，即完成 PCR 序列擴增。

### 五、電泳以及照膠

利用 1.5% agarose 進行膠體電泳，利用 100 bp 的 marker 當對比，在膠體凹槽處加入 5  $\mu$ L 的樣本 PCR 產物與 1  $\mu$ L 的 major blue 的混合物後進行電泳，以 100 伏特跑 30 分鐘，電泳完後照膠看各個條帶的狀況，條帶亮度良好的即可送定序進行序列分析。

### 六、送定序

將 PCR 產物送至明欣生物科技有限公司進行 Sanger 定序。

## 結果與討論

生物樣本以及養魚水體樣本定序比對結果顯示，單一魚種樣本的魚肉或魚鰭 DNA (如吳郭魚、臺灣石鱸、珍珠石斑魚鰭等) 都是對的序列，且比對正確率範圍為 97% 到 100% (圖 6)。混合魚種樣本僅有珍珠石斑和吉利慈鯛可比對出來，褐塘鱧沒有在比對中出現，在圖 7 的第 8 點中 (四種混合樣本)，沒有顯示出比對結果。養魚樣本僅有第一天與第三天可比對出物種，皆顯示為吉利慈鯛，而鰕虎沒有在序列比對中出現。在圖 6 及圖 7 中可以看到牛蛙和貪食沼蝦的樣本並無條帶出現，表示 MiFish-U 引子無法黏合至牛蛙以及貪食沼蝦的基因上，代表此引子有一定的專一性。

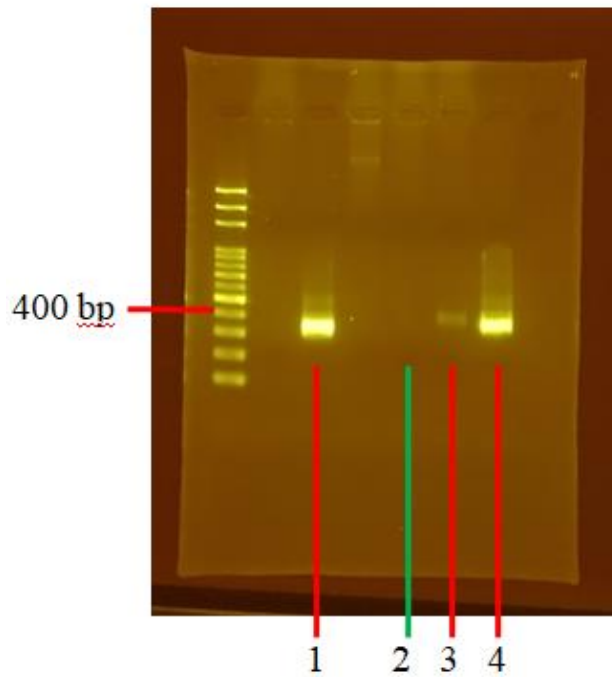


圖 6. 電泳照膠圖。Line1 吳郭魚 DNA。Line2 牛蛙 DNA，Line3 臺灣石鱸10 倍稀釋的 DNA，Line4 臺灣石鱸DNA。

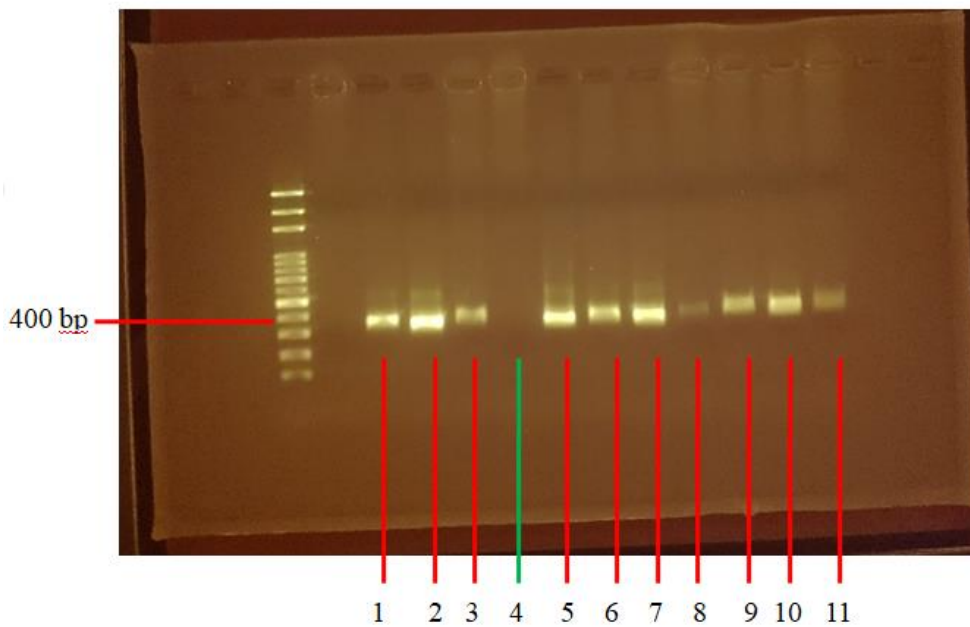


圖 7. 電泳照膠圖。Line 1 珍珠石斑 DNA，Line 2 吉利慈鯛 DNA，Line 3 褐塘鱧 DNA，Line 4 貪食沼蝦 DNA，Line 5 珍珠石斑+吉利慈鯛 DNA，Line 6 珍珠石斑+褐塘鱧 DNA，Line 7 吉利慈鯛+褐塘鱧 DNA，Line 8 珍珠石斑+褐塘鱧+吉利慈鯛+貪食沼蝦 DNA，Line 9 珍珠石斑魚鰭 DNA，Line 10 吉利慈鯛魚鰭 DNA，Line 11 褐塘鱧魚鰭 DNA。



實驗物種包含下列八種，吳郭魚(*Oreochromis niloticus*)、臺灣石鱸(*Acrossocheilus paradoxus*)、牛蛙(*Lithobates catesbeianus*)、貪食沼蝦(*Macrobrachium lar*)、珍珠石斑(*Parachromis managuensis*)、吉利慈鯛(*Coptodon zillii*)、褐塘鱧(*Eleotris fusca*)、鰕虎科(Gobiidae)。由目前實驗結果可以得知，MiFish-U 引子不論用於單一魚種 DNA、混合魚種 DNA、養魚水體 DNA，都可以辨識出物種，且單一魚種的比對正確率相當高。混合 DNA 用 Sanger 定序法容易會出現雜訊的狀況，導致無法比對出物種的情況發生，在含有吉利慈鯛 (*Coptodon zillii*) 的所有樣本中，會比對出吳郭魚 (*Oreochromis niloticus*) (圖 9-10)，而比較後發現這兩種魚經由 MiFish-U 所擴增的片段只有 5 個鹼基不同，這件事說明有可能因為序列差異很小，而辨識出錯誤的物種。因為牛蛙與貪食沼蝦的 DNA 無法經由 MiFish-U 引子辨識出來，可以得知此引子針對魚類的專一性很高。目前的實驗採樣過程並無發現珍稀水生動物的物種，推測可能是過去人為活動與干擾頻繁，包括溼地周邊的重度放牧牛羊與農耕情況，加上過去幾年知本光電開發案的事件，使目前的知本濕地湖水本體對於珍稀水生動物或本土動物無法有利生存，造成數量較少所以難以觀測，倘若環境改善，過去曾記載的本土物種或珍稀物種有可能回歸或存在。

**Oreochromis niloticus 12S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial**

Sequence ID: [MN255618.1](#) Length: 904 Number of Matches: 1

Range 1: 285 to 440 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
289 bits(156)	1e-73	156/156(100%)	0/156(0%)	Plus/Plus
Query 50	GC	GCGTAAAGAGTGGTTAGGAAGTCTTTCAA	ACTAAAGCCGAACGCCCTCAGAACTGTTATA	109
Sbjct 285	GC	GCGTAAAGAGTGGTTAGGAAGTCTTTCAA	ACTAAAGCCGAACGCCCTCAGAACTGTTATA	344
Query 110	CG	TACCCGAGGGTAAGAAGCCCCCTACGAAAGTGGCTTTATATCTCCGACCCACGAAA		169
Sbjct 345	CG	TACCCGAGGGTAAGAAGCCCCCTACGAAAGTGGCTTTATATCTCCGACCCACGAAA		404
Query 170	GCTGCGAAACAACTGGGATTAGATACCCCACTATG		205	
Sbjct 405	GCTGCGAAACAACTGGGATTAGATACCCCACTATG		440	

圖 9.吳郭魚樣本序列在 NCBI 比對率為 100%

<a href="#">Coptodon zillii mitochondrion, complete genome</a>							
<a href="#">Coptodon zillii mitochondrion, complete genome</a>							
<a href="#">Oreochromis aureus mitochondrion, complete genome</a>							
<a href="#">Oreochromis niloticus 12S ribosomal RNA gene, partial sequence; mitochondrial</a>							
<a href="#">Coptodon zillii</a>	246	246	63%	7e-61	95.48%	16551	<a href="#">MW194077.1</a>
<a href="#">Coptodon zillii</a>	241	241	63%	3e-59	94.84%	16619	<a href="#">KM658974.1</a>
<a href="#">Oreochromis au...</a>	235	235	63%	1e-57	94.19%	16628	<a href="#">NC_013750.1</a>
<a href="#">Oreochromis nil...</a>	231	231	63%	2e-56	93.59%	904	<a href="#">MN255618.1</a>

圖 10.珍珠石斑混合吉利慈鯛樣本的序列比對結果出現吳郭魚。

## 結論

藉由生物樣本的鑑定結果，MiFish-U 引子針對單一魚種比對正確率相當高，但是混合魚種樣本和養魚水體樣本經由 Sanger 定序法會有無法比對出來的問題，且 MiFish-U 引子針對魚類的專一性很高，可以適用於魚類調查。後續實驗將進行環境 DNA 樣本的 PCR、次世代定序及序列分析，以建構出知本溼地的魚類物種調查資料，並且在之後也利用環境 DNA 來調查鳥類物種。

## 致謝

此研究感謝呂佩倫老師實驗室與高仰賢一起陪伴做實驗的所有同學們，感謝教育部高教深耕計畫課程與國立臺東大學理工學院補助教師指導學生專題製作與論文競賽經費的支持。

## 參考文獻

### 一、中文部分

1. 台東縣102年度國家重要濕地保育行動計畫。知本濕地資源調查計畫期末修正報告，(2014)。
2. 林金德編著，《心知地名：Katratripulr 卡大地布部落文史紀錄》，臺東市：臺東縣原住民主體文化發展協會、臺東縣卡大地布文化發展協會，(2016)。
3. 林孟潔，知本光電開發行政訴訟案法院判卡大地布部落贏了！<https://udn.com/news/story/7321/6597603>，(2022)。Retrieved on March 11, 2023。
4. 侯晨昕，「建立一環境DNA偵測技術用於調查小盾鱧與環境參數之關係—以曾文水庫為例」，國立成功大學碩士論文，(2015)。
5. 陳柳豪，水文現象與環境參數影響 eDNA 偵測技術之探討。國立成功大學水利及海洋工程學系碩士論文，(2016)。

### 二、外文部分

1. Andersen, K., Bird, K. L., Rasmussen, M., Haile, J., BREUNING- MADSEN, H. E. N. R. I. K., Kjaer, K. H., ... & Willerslev, E.. Meta- barcoding of ‘dirt’DNA from soil reflects vertebrate biodiversity. *Molecular Ecology*, 21(8), 1966-1979. (2012).
2. BirdLife International (2023) Important Bird Areas factsheet: Chihben Wetlands. Downloaded from <http://www.birdlife.org> on 2/11/2021
3. Butchart ,SHM, Walpole, M et al. Global Biodiversity: Indicators of Recent Declines. *Science* 28 , vol. 328 no. 5982 1164-1168.(2010)
4. Colombo, AF., Joly, CA. Brazilian Atlantic Forest lato sensu: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change, *Braz. J. Biol.*, vol. 70, no. 3 (suppl.), p. 697-708.(2010).
5. Darling J A, Mahon A R (2011) From molecules to management: adopting DNA-based methods for monitor in biological invasions in aquatic environments. *Environ Res.* 111:978–988.
6. Díaz-Ferguson, ED., and GR. Moyer. History, applications, methodological issues and perspectives for the use environmental DNA (eDNA) in marine and freshwater environments. *Rev. Biol. Trop*, Vol. 62 (4): 1273-1284.(2014).

7. Everts, T., Halfmaerten, D., Neyrinck, S. et al. Accurate detection and quantification of seasonal abundance of American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) using ddPCR eDNA assays. *Sci Rep* 11, 11282 (2021).
8. Foote, A. D., Thomsen, P. F., Sveegaard, S., Wahlberg, M., Kielgast, J., Kyhn, L. A., ... & Gilbert, M. T. P.. Investigating the potential use of environmental DNA (eDNA) for genetic monitoring of marine mammals. *PloS one*, 7(8), e41781. (2012).
9. Goldberg, C. S., Sepulveda, A., Ray, A., Baumgardt, J., & Waits, L. P.. Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). *Freshwater Science*, 32(3), 792-800. (2013)
10. Hooper, DU, Adair, EC., Cardinale, BJ., et al. A global synthesis reveals biodiversity loss as a major driver of ecosystem change. *Nature* 486, 105–108. (2012).
11. Jerde, C. L., Mahon, A. R., Chadderton, W. L., & Lodge, D. M.. "Sight?unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters*, 4(2), 150-157. (2011)
12. Johnson MD, Cox RD, Barnes MA.. Analyzing airborne environmental DNA: A comparison of extraction methods, primer type, and trap type on the ability to detect airborne eDNA from terrestrial plant communities. *Environmental DNA* 1,176-189. (2019)
13. Milder, JC., Lassoie, J.P., and B.L. Bedford. Conserving Biodiversity and Ecosystem Function through Limited Development: an Empirical Evaluation, *Conservation Biology*, 22 (1), 70–79. (2008).
14. Miya, M., Sato, Y., Fukunaga, T., Sado, T., Poulsen, J. Y., Sato, K., et al. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *R. Soc. Open Sci.* 2:150088. (2015).
15. Oleksyn, J., and P.B. Reich. Pollution, Habitat Destruction, and Biodiversity in Poland, *Conservation Biology*, Volume 8, No. 4, 943-960. (1994).
16. Pilliod ,DS., Goldberg ,CS., Arkle , RS., L. P. Waits. Factors influencing detection of eDNA from a stream- dwelling amphibian, 14, (1), 109-116.(2014).
17. Schenk, J., Fontaneto, D. Biodiversity analyses in freshwater meiofauna through DNA sequence data. *Hydrobiologia* (2019).
18. Takahara T. et al. Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PloS one*,vol. 7,4.(2012).
19. Thomsen, P., Kielgast, J. O. S., Iversen, L. L., Wiuf, C., Rasmussen, M., Gilbert, M. T. P., ... & Willerslev, E.. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular ecology*, 21(11), 2565-2573. (2012a).
20. Thomsen, P. F., Kielgast, J., Iversen, L. L., M?ller, P. R., Rasmussen, M., & Willerslev, E.. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS one*, 7(8), e41732. (2012b).
21. Yamamoto, S., Minami, K., Fukaya, K., Takahashi, K., Sawada, H., Murakami, H., ... & Hongo, M.. Environmental DNA as a 'Snapshot'of fish distribution: a case study of Japanese Jack Mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan. *PloS one*, 11(3), e0149786. (2016).