

DOI: 10.5846/stxb202009162411

王萌, 金小伟, 林晓龙, 杜丽娜, 崔永德, 吴小平, 孙红英, 谢志才, 王新华, 王备新. 基于环境 DNA-宏条形码技术的底栖动物监测及水质评价研究进展. 生态学报, 2021, 41(18): 7440-7453.

Wang M, Jin X W, Lin X L, Du L N, Cui Y D, Wu X P, Sun H Y, Xie Z C, Wang X H, Wang B X. Advances in the macrozoobenthos biodiversity monitoring and ecosystem assessment using environmental DNA metabarcoding. Acta Ecologica Sinica, 2021, 41(18): 7440-7453.

基于环境 DNA-宏条形码技术的底栖动物监测及水质评价研究进展

王 萌¹, 金小伟², 林晓龙³, 杜丽娜⁴, 崔永德⁵, 吴小平⁶, 孙红英⁷, 谢志才⁵, 王新华³, 王备新^{1,*}

1 南京农业大学植物保护学院, 南京 210095

2 中国环境监测总站, 北京 100012

3 南开大学生命科学学院, 天津 300071

4 广西师范大学珍稀濒危动植物生态与环境保护教育部重点实验室, 桂林 541006

5 中国科学院水生生物研究所淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072

6 南昌大学生命科学学院, 南昌 330031

7 南京师范大学生命科学学院, 南京 210023

摘要:底栖动物是淡水生态系统中物种多样性最高的类群,也是应用最广泛的水质监测指示生物之一。传统的底栖动物监测以形态学为基础,耗时费力,无法满足流域尺度大规模监测的需求。环境 DNA-宏条形码技术是一种新兴的生物监测方法,其与传统方法相比优势在于采样方法简单、低成本、高灵敏度,不受生物样本和环境状况的影响,不依赖分类专家和鉴定资料,能够快速准确地对多个类群进行大规模、高通量的物种鉴定。然而,在实际应用中该方法的效果受诸多因素的影响,不同的方法、流程往往会产生差异较大的结果。鉴于此,着重分析总结了应用环境 DNA-宏条形码技术监测底栖动物的关键影响因素,包括样品采集与处理流程、分子标记选择、引物设计、PCR 偏好性、参考数据库的完整性及相应的优化。并基于此探讨了提高环境 DNA-宏条形码技术在底栖动物监测效率和准确率的途径,以期到底栖动物环境 DNA-宏条形码监测方案的制定提供可靠的参考。最后对该技术在底栖动物监测和水质评价中的最新发展方向进行了展望。

关键词:宏条形码;大型底栖无脊椎动物;生物多样性;条形码数据库;淡水生态系统

Advances in the macrozoobenthos biodiversity monitoring and ecosystem assessment using environmental DNA metabarcoding

WANG Meng¹, JIN Xiaowei², LIN Xiaolong³, DU Lina⁴, CUI Yongde⁵, WU Xiaoping⁶, SUN Hongying⁷, XIE Zhicai⁵, WANG Xinhua³, WANG Beixin^{1,*}

1 College of Plant Protection, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

2 China National Environmental Monitoring Center, Beijing 100012, China

3 College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China

4 Key Laboratory of Ecology of Rare and Endangered Species and Environmental Protection, Guangxi Normal University, Guilin 541006, China

5 State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China

6 College of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang 330031, China

7 College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China

基金项目:国家自然科学基金项目(41771255);江苏省科技项目(BE2018681)

收稿日期:2020-09-16; **网络出版日期:**2021-06-15

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: wangbeixin@njau.edu.cn

Abstract: Macrozoobenthos are the most diversified organisms in freshwater ecosystem, playing a vital role in maintaining the structural and functional integrity of freshwater ecosystem. They are one of the most significant bioindicators that have been widely used in water quality monitoring and assessment. Nowadays, anthropogenic disturbance, pollution and global warming lead to a remarkable decline of the macrozoobenthos biodiversity. Therefore, how to provide substantial data for macrozoobenthos biodiversity monitoring rapidly, accurately, and reliably has become a major issue in water environment management. However, the traditional morphology-based biomonitoring survey method can hardly fulfill current biomonitoring requirements due to being costly, time consuming, and labor intensive. Moreover, such method is highly dependent on experienced taxonomists and often results in low precision and unverifiable taxonomic data. Environmental DNA metabarcoding (eDNA metabarcoding), a newly emerged approach, is considered as a promising survey tool for aquatic biodiversity monitoring. Compared with traditional biomonitoring survey methods, eDNA metabarcoding remarkably outperforms morphology-based method by its low cost, straightforward workflow, and high sensitivity in species detection of macrozoobenthos. Particularly, it circumvents the taxonomy literature and expertise, providing rapid, accurate, and high-throughput identification simultaneously to a large variety of taxa regardless of the organism conditions and environmental disturbances, thus permitting the easy access of large scale biomonitoring programs for freshwater ecosystem. Currently, the application of eDNA metabarcoding in macrozoobenthos biodiversity monitoring is largely affected by several technical factors, such as the sampling protocols, primer selection, and the completeness of reference database. Particularly, different methods and procedures often lead to contrasting results. Hence much attention is drawn to the field workflow and laboratory methodologies to be standardized to allow results to be compared across studies. In this paper, we reviewed the recent published studies referring to macrozoobenthos biodiversity monitoring using eDNA metabarcoding to discuss its definition, advantages, applications and its methodologies used in macrozoobenthos biodiversity biomonitoring and assessment. Especially we discussed the vital technical factors that influences eDNA metabarcoding, including sample collection protocol, gene marker selection, primer design, PCR bias, the completeness of reference database, and their corresponding recommendations to be optimized. Based on the summary above, we give several helpful suggestions for improving the efficiency and accuracy of macrozoobenthos monitoring using eDNA metabarcoding. We expect that this review will provide reliable guidelines for developing a sound macrozoobenthos biomonitoring design using eDNA metabarcoding. At last, we gave perspectives regarding several emerging applications and innovative methodologies of eDNA metabarcoding can be used in ecology.

Key Words: metabarcoding; macroinvertebrates; biodiversity; barcode reference database; freshwater ecosystem

淡水大型底栖无脊椎动物简称底栖动物,是指生活史的全部或部分生活在水体底部,个体大小不能通过 500 μm 孔径网筛的无脊椎动物^[1]。常见的有节肢动物门昆虫纲的水生昆虫、软甲纲的淡水蟹、钩虾,软体动物门的蚌类、螺类,环节动物门的寡毛纲、蛭纲,以及扁形动物门的涡虫等^[1]。底栖动物是维护水生态系统结构与功能完整性的重要生物类群。它具有分布广泛,生活周期长,对水质变化敏感等特点,因此是水质监测与评价中应用最广泛的生物类群^[2]。近些年,日益增强的人类活动干扰、水污染和气候变化导致底栖动物多样性锐减,严重威胁水生态系统健康^[3]。如何科学、快速和准确地为淡水生物多样性和水质评价的研究与实践提供大量底栖动物数据,已是当前水生态环境管理关注的重要问题。

传统以形态学鉴定为基础的底栖动物监测方法存在成本高、耗时长、代表性低、专业性强和精确性不够高等缺陷。首先,以生物个体为目标的采样方法需要消耗较大的人力财力,并在采样空间方面存在局限性^[4]。其次,跨越数个不同动物门类的底栖动物形态学鉴定高度依赖分类专业人员,然而动物分类研究者数量正在不断减少。再者,采集到的水生昆虫绝大多数是幼体,科级水平以下的鉴定特征模糊甚至缺乏,往往难以准确鉴定到属和种,因此无法准确识别物种与胁迫因子间的专一响应关系,有可能降低评价等级的准确性和精确性^[5-6]。综上,传统监测方法的缺陷使其难以适应当前水质监测要求的大规模、高频率、高要求的管理需求,因此急需新的调查方法满足现阶段日益增长的对水生态环境和生物多样性的评估需求。

近年来,环境 DNA-宏条形码技术通过对环境样品中混合 DNA 进行高通量测序和比对,能够快速大规模地得到生物多样性鉴定信息和群落组成,极大得革新了生物多样性调查方法,现已被广泛应用于土壤和水生

态环境的生物多样性监测中^[7-10]。相比于传统方法,环境 DNA-宏条形码技术不需大量的人力物力,成本低、操作简便,因此更适合于大尺度的流域生物多样性监测^[11]。同时,该方法灵敏度高,即使在物种密度很低的情况下也能准确检测到目标物种的存在^[4]。此外,环境 DNA-宏条形码技术可以不依赖分类人员同时对跨门类物种进行监测,并且不受发育时期的限制,完成物种的准确鉴定^[4]。因此,环境 DNA-宏条形码技术被认为是现阶段实现水生态环境快速、大尺度和大样本物种监测最有发展前景的方法^[11]。

目前,环境 DNA-宏条形码技术对底栖动物的检测和鉴定仍存在部分问题和不足,制约其进一步在水质监测中的应用。主要问题有低丰度物种漏检、物种鉴定错误、采样流程与方法不统一以及生物量精确估测困难等^[11]。这些问题在技术层面体现在样品采集与处理流程、分子标记选择、引物设计、PCR 偏好性,以及参考数据库的完整性等因素^[12-14]。因此在推动环境 DNA-宏条形码技术应用底栖动物监测时应重点关注这些关键影响因素。近十年来,针对以上关键影响因素国内外开展了比较多的优化研究^[14-19]。然而其中大部分研究较为分散,部分结论不一致,且缺少系统性的分析和比较,制约了底栖动物环境 DNA-宏条形码监测技术方案的规范和优化,因此亟需对相关问题进行系统性的梳理与整合。鉴于此,本文对环境 DNA-宏条形码的概念和在底栖动物监测的应用进行了综述,重点针对影响环境 DNA-宏条形码技术用于底栖动物监测和水质评价的关键因素及其相应优化进行了分析总结,并基于此提出提高环境 DNA-宏条形码技术监测底栖动物效率和准确率的有效途径,期望为基于环境 DNA-宏条形码技术的底栖动物监测方案的标准化和规范化提供建议和参考,最后对该技术在底栖动物监测和水质评价中的最新发展方向进行了展望。

1 环境 DNA-宏条形码技术简介及在底栖动物监测中的应用

环境 DNA 概念最早于 1987 年提出,用于从沉积物中提取微生物的 DNA,2000 年左右开始引入生态学领域^[20]。环境 DNA (environmental DNA, eDNA) 是指从土壤、水和大气等环境样品中直接提取的不做任何分离得到的生物释放的游离 DNA 片段的总和^[20]。具体包括微生物、动物和植物不同物种本身以及向环境中释放的分泌物、唾液、精子、粪便和脱落的皮肤等一系列降解程度不同的各种 DNA 混合物^[20]。环境 DNA-宏条形码技术 (eDNA metabarcoding) 指从土壤、水等环境采样提取总 DNA 片段,使用通用引物进行 PCR 扩增并结合高通量测序,得到上百万条序列,再与已有数据库中的序列信息进行比较,从而一次性对环境样品中的多个物种或类群进行快速、大规模鉴定^[10]。该方法能够有效检测出传统方法未检测到的种类,同时能够对大部分物种进行属或种级别的准确鉴定。目前环境 DNA-宏条形码技术在水生生态系统中的应用主要集中在物种多样性调查^[21]、入侵和稀有物种检测^[22]以及目标生物相对丰度、种群大小、分布和发生动态检测等方面^[23]。2008 年,环境 DNA-宏条形码技术首次应用于入侵水生生物美国牛蛙 (*Rana catesbeiana*) 的监测^[22]。此后其他研究人员先后利用该技术对亚洲鲤科鱼类中的鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 和鳙 (*H. nobilis*)^[24]、蓝腮太阳鱼 (*Lepomis macrochirus*)^[25] 和新西兰泥蜗牛 (*Potamopyrgus antipodarum*)^[26] 等物种成功进行了监测。

2011 年, Hajibabaei 等^[27] 首次证明环境 DNA-宏条形码技术适用于底栖动物多样性监测。随后的研究进一步证明该技术对环境敏感类群蜉蝣目、毛翅目和襉翅目 (蜉蝣目 Ephemeroptera、襉翅目 Plecoptera 和毛翅目 Trichoptera 昆虫,简称 EPT 昆虫) 物种有良好的检出效果^[28-29]。Elbrecht 和 Leese^[30] 的模拟实验进一步证明环境 DNA-宏条形码技术对大部分底栖动物的检出率较高,总体检出率达 98%,其中 EPT 的检出率均为 100%。Beermann 等^[31] 对湿地摇蚊的研究表明,环境 DNA-宏条形码技术对摇蚊的检出率比传统调查方法高 70% 以上。当前,环境 DNA-宏条形码技术已经开始从独立样点或者特定物种监测向大尺度、大样本监测和评估转变 (表 1)^[32, 39]。基于环境 DNA-宏条形码技术的生物监测被称为“Biomonitoring 2.0”^[40], 该技术的广泛应用标志着生物多样性监测进入全新的分子时代。环境 DNA-宏条形码技术进行底栖动物多样性监测和水质评价具有广阔的发展前景,然而相比国外目前国内相关研究较少^[41-42], 因此需要更多的方法学和应用研究来推动我国基于环境 DNA-宏条形码的水质监测的发展。

表 1 环境 DNA-宏条形码技术监测淡水底栖动物典型研究示例
 Table 1 Examples of environmental DNA (eDNA) metabarcoding technique for biomonitoring of freshwater macrozoobenthos

研究类群 Taxa	标记基因 Gene markers	引物序列(方向:5'-3') Primer sequences (direction:5'-3')	实验目的 Main aims	参考文献 References
摇蚊 Chironomidae	COI, CytB	HCO2189; TAAACTTCAGGGTCACCAAAAAATCA (COI) LCO1490; GGTCACAAATCATAAAGATATTGG (COI) CBI; TAATCTTTTACCAATGAGCACAAATATC (CytB) CBS49R; TTCTACDGTGDCCHCCAAATCA (CytB)	eDNA 对生态指示物种的快速鉴定	[28]
底栖动物 Macrozoobenthos	COI	LCO1490; GGTCACAAATCATAAAGATATTGG HCO2198; TAAACTTCAGGGTCACCAAAAAATCA	eDNA 进行物种生物量的估测	[12]
底栖动物 Macrozoobenthos	COI	F1; GGTCACAAATCATAAAGATATTGG R1; CTTATRTTTRTTATIGGIGGRAAIGC F2; CCIGAYATRGCTTTCGICG R2; CTRATIGCICGICGCIARIAC	eDNA 在大规模监测项目中用于多样性指数的分析	[32]
底栖动物 Macrozoobenthos	16S rRNA	Ins_F; ACGCTGTATCCCTAARCTA Ins_R; RGACGAGAAGACCGCTATARA	16S rRNA 作为 eDNA 基因标记进行多样性评估	[14]
摇蚊 Chironomidae	COI	LCO1490; GGTCACAAATCATAAAGATATTGG COIA-R; CARAAWCTTATATTATTTCGDGG	eDNA 在监测物种季节性多样性的应用	[33]
底栖动物 Macrozoobenthos	COI	F; CCIGAYATRGCTTTCGICG R; CTRATIGCICGICGCIARIAC	评估 eDNA 对跨不同环境梯度河流分水岭物种变化的检测能力	[34]
钩虾 Gammaridae	COI	mICOlimF; GGWACWGGWTCACACWGTWTAYCCYCC HCO2198; TAAACTTCAGGGTCACCAAAAAATCA	通过 eDNA 检测入侵物种	[35]
摇蚊 Chironomidae	COI	BF2; GCHCHGAYATRGCTTTCGICG BR1; ARYATDGTATDGGCHCCDGC	通过 eDNA 监测杀虫剂控制下的湿地摇蚊多样性和群落组成变化	[36]
底栖动物 Macrozoobenthos	COI, SSU	TCNAGNAAYCAARRAYATYGG (COI-bc5') GGIGRTAIACITCAICC (COI-bc5') CCIGAYATRGCTTTCGICG (COI-bc3') TANACYTCNGGRTGNGCRARAAYCA (COI-bc3') SSU-F04; GCTTCTCTCAAAGATTAAAGCC (SSU) SSU-R22; GCCTGCTGCCCTTCCTTGG (SSU)	利用 eDNA 探究农药对河流底栖生物群落的影响	[37]
蜉蝣目、毛翅目、襀翅目 Ephemeroptera, Trichoptera, Plecoptera	COI	mICOlimF; GGWACWGGWTCACACWGTWTAYCCYCC jgHCO219; TANACYTCNGGRTGICCRARAAYCA	利用 eDNA 评估河网不同组成部分的多源性	[38]

eDNA: 环境 DNA Environmental DNA

2 环境 DNA-宏条形码技术在底栖动物监测中的关键技术问题及优化策略

环境 DNA-宏条形码技术对水生态环境监测的一般操作流程主要包括:样品采集、eDNA 提取、PCR 扩增、eDNA 高通量测序和序列生物信息学分析(图 1),技术层面上影响环境 DNA-宏条形码技术监测效率和准确性的关键因素主要在于不同的采样方法与流程、分子标记选择、引物设计、PCR 偏好性以及 DNA 条形码参考数据库的完整性等^[11-12](图 2)。

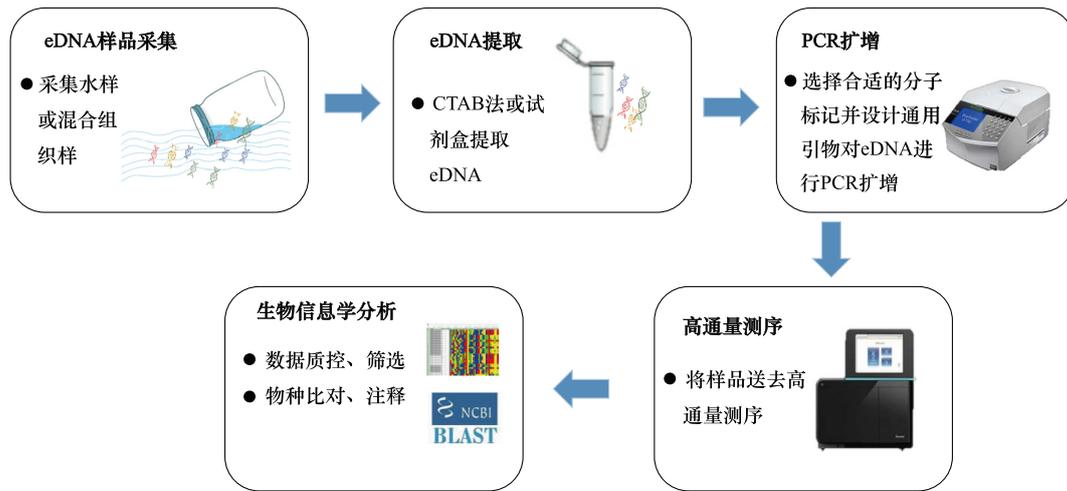


图 1 环境 DNA-宏条形码技术的一般操作流程

Fig.1 The basic workflow of environmental DNA (eDNA) metabarcoding

2.1 采样方法与处理流程

与 eDNA 样品采集方法相关的优化研究是环境 DNA-宏条形码研究的热点方向之一^[20, 40]。底栖动物的采样方法对最后的检测结果有着显著影响,目前水样法和混合组织样法是获取底栖动物 eDNA 的两种主要方法。

2.1.1 水样法

水样法指通过水环境样本进行 eDNA 的富集,现阶段水样 eDNA 的采集方法主要有两种:沉淀法和过滤法^[43]。沉淀法^[21]特点是不过滤水样,直接加入氯化钠和乙醇并结合离心操作获取 eDNA,更适用于原核生物细菌等的获取。过滤法则通过过滤水样将 eDNA 截留在滤膜上,效果取决于过滤孔径大小^[43]。无论在静水和流水中,对于底栖动物而言,采用过滤法 eDNA 捕获率最高^[43]。采集水样量也是影响物种检测准确度和检出率的重要因素。根据研究对象不同,每个重复水样的采集量从 15 mL 到 10 L 不等^[16, 44]。一般来说采集量大时样品代表性较好,但同时采样难度和后续工作量也显著增加,目前底栖动物 eDNA 的水样采集量一般是 1 L 或 2 L^[45]。当目标生物密度较低或调查江河、湖泊等大型水体时,应适当增加采样重复数以及单次水样取样量^[46],过少的水样量以及无重复样本都可能会导致物种检出率降低甚至数据无效。

水样法是淡水生态多样性监测的常用方法。然而由于水的流动性,流水中的 eDNA 会沿河网向下游扩散,从而影响下游真实的物种丰富度和多样性^[47]。因此水样法更适合流域尺度的物种多样性调查,但无法重建微观尺度下的生物多样性空间分布模式^[48]。此外,水环境样本的异质性和采样的随机性也常导致不稳定的检出结果^[49, 50]。近期一些研究表明水样中的底栖动物检测率仅有传统形态学采样方法的 1/3,且对一些关键指示生物的检测较为困难^[51]。

2.1.2 混合组织样法

混合组织样法是将全部个体或部分混合后进行研磨,然后基于均质化后的混合组织匀浆(bulk sample)进

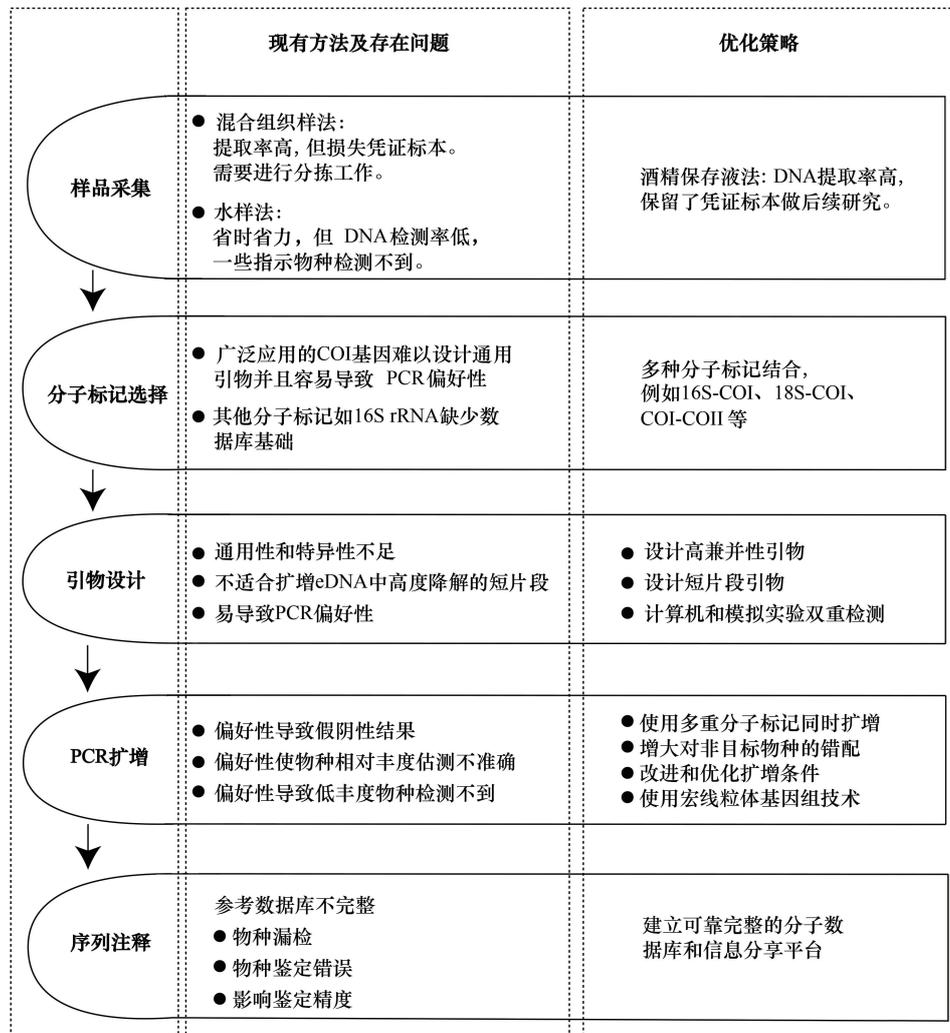


图 2 环境 DNA-宏条形码技术在底栖动物监测应用中的关键问题与优化策略

Fig.2 Critical factors influencing the application of environmental DNA metabarcoding in macrozoobenthos monitoring and their optimized strategies

行总 DNA 提取的方法。大部分底栖动物调查时先获得踢网样品, 然后进行分拣, 去除其中的杂质、底泥以及植物和藻类等非目标有机物后再对目标样品研磨均一化后提取 eDNA^[32, 52]。少数研究不进行分拣, 底栖动物样品和杂质混合在一起研磨后提取 eDNA^[15, 27, 37]。一般认为不进行分拣时样品成分往往较为复杂, 包含多种 PCR 抑制剂, 影响 DNA 的提取和 PCR 扩增效率^[18, 53]。但近期一些研究发现样品中的杂质不影响重要指示生物的检测^[54], 甚至未分拣的样品检测率高于分拣样品与水环境样本^[55]。

混合组织样法的优点在于 DNA 的提取率高, 但缺点是损失了相应的凭证标本, 导致无法进行后续研究。鉴于此, Hajibabaei 等^[52]提出了一种无损提取法 (non-destructive method), 即通过样品酒精保存液中提取 eDNA 来替代从组织混合样中提取 eDNA。该方法能够成功检测到大部分底栖物种, 其底栖动物检测率仅略低于混合组织样法 (87% vs 89%)^[17, 56-58]。研究表明 70%—96% 浓度的酒精保存液都适用于提取混合 DNA^[17, 57, 59], 且酒精浸泡后取样时间的长短对于物种检测率影响并不显著^[17]。早期酒精保存液法提取 eDNA 要先进行酒精的蒸发再进行 DNA 的提取^[52, 57], 步骤繁琐不利于大规模酒精样品的处理。近期一些研究者对此进行了优化, 一方面省略样品分拣, 对酒精保存液进行二次过滤来提取 eDNA, 显著缩减处理的时间和步骤^[59]; 另一方面通过一系列方法 (超声波、震荡、冷冻) 增加 DNA 的释放率, 进一步提高该方法的检测

率^[59]。酒精保存液法的优点在于保存了凭证标本的完整性,但其在物种检测率上仍低于混合组织样法^[17, 52]。此外,该方法容易造成少数物种漏检,尤其是外壳骨化强烈的物种如鞘翅目、带壳的软体动物以及带巢生活的一些毛翅目种类^[17, 59]。

综上,当进行一些重点指示生物如 EPT 昆虫多样性监测时,酒精保存液法对凭证标本无损伤、节省时间,是可替代组织样法一种方法。而当对整个底栖动物类群多样性做评估时建议采用常规的混合组织样方法进行监测^[17]。

2.2 分子标记选择

选取合适的分子标记与扩增引物是环境 DNA-宏条形码扩增成功的关键。理想的适用于环境 DNA-宏条形码监测的分子标记应同时具备高度保守区域和高度可变区域,前者便于通用引物设计,后者有助于物种识别^[60-61]。动物线粒体细胞色素氧化酶 COI 基因保守度适中,在不同物种之间有良好的解析度,并且现有数据库最为全面,是目前最常用的标记基因^[30]。然而 COI 作为分子标记也有着显而易见的缺陷,体现在 COI 基因作为一个蛋白编码基因,第三位密码子的突变率较高,在不同物种中差异较大,导致难以设计物种覆盖度较为全面的通用引物^[62]。此外,基于 COI 基因的引物容易引起一些优势物种的过度扩增,从而导致一些低丰度和难扩增物种检测不到^[13]和物种生物量估测不准确^[12, 63]。

鉴于以上 COI 基因的缺陷,一部分研究者致力于寻找能够替代 COI 基因的其他分子标记。此类研究主要集中在 16S rRNA、18S rRNA 等基因标记^[14, 61]。Elbrecht 等^[14]通过模拟实验验证 16S rRNA 相较 COI 基因在底栖动物中具有更高的检测率,尤其昆虫纲的检测率接近 100%。此外,16S rRNA 引物偏好性较小,对生物量的估测也更为准确,但其对除昆虫纲以外的其他底栖动物检测率不佳^[14, 64]。Ficetola 等^[64]比对 16S rRNA、18S rRNA 和 COI 基因标记在环境 DNA 监测中的效果发现,18S rRNA 通用性最强但分辨率较差,更适合对生物多样性做整体评估,而 COI 基因种级界定效果最佳。16S rRNA、18S rRNA 相较 COI 基因具有更广泛的物种覆盖度,然而缺少像 COI 基因一样强大而广泛的参考数据库,物种比对难以达到满意的精度^[14]。

综上所述,没有单独一个基因标记能够完美实现宏条形码技术监测对于物种覆盖度和解析度的要求。因此我们建议在进行 eDNA 监测时将 16S rRNA 或其他分子标记扩增的结果作为 COI 基因的补充^[14]。或者在 PCR 扩增时中采用多分子标记(multiple primers)的策略^[64-65](例如 16S-COI、18S-COI、COI-COI),兼顾物种的覆盖度和精确性^[66-67],并利用 COI 基因强有力的参考数据库进行物种的注释^[14]。

2.3 引物设计

引物的设计在 eDNA 监测中至关重要,合适的引物可以显著提高 eDNA 的扩增质量并减少引物的偏好性^[19]。现阶段引物设计的主要思路是设计 COI 基因的高简并性引物,增加通用性的同时尽可能地减少其引物偏好性。目前效果较好的有 Geller 等^[68]设计的 COI 基因通用引物 jgHCO2198 和 jgLCO1490,该引物适用于所有后生动物;Hajibabaei 等^[52]针对底栖动物设计的三组高简并性 COI 引物。目前由 Elbrecht 和 Leese^[30]设计的高兼并性 COI 引物 BF1/BF2 和 BR1/BR2 不仅对底栖动物检测率显著高于传统的 COI 引物和 16S rRNA,同时减少了其扩增偏好性。

引物设计的另一思路是采用短片段引物(mini-barcode)。由于环境 DNA-宏条形码研究中广泛存在高度降解的短片段 DNA 和高通量测序短的特点,短片段引物在底栖动物环境 DNA-宏条形码检测中更有优势^[35]。当前应用的有 Leray 等^[69]设计出的短片段引物(313 bp) mlCOLintF/mlCOLintR 和 Vamos 等^[70]设计出的短片段引物 fwh1 set、fwh2 set(扩增长度分别为 178 bp 和 205 bp)。相比传统通用引物(如 LCO1490/HCO2198)与较为成熟的高兼并性引物(如 BF1/BF2 和 BR1/BR)^[30],短片段引物所含信息相对较少,引物偏好性较高,但对于短片段 DNA 扩增效率更高。因此在样品保存较好、eDNA 降解程度小时,建议使用高兼并性 COI 引物如 BF1/BR1 和 BF2/BR2。如果样品 DNA 高度降解,使用短片段引物会使扩增更为有效。

引物设计好后更重要的是如何评价其扩增的效率和特异性。新设计的引物应通过模拟实验和电脑检测(e.g. In silicon PCR 软件)的双重验证后方可大规模地应用^[30, 60-61, 71]。MacDonald 等^[72]总结出在环境 DNA-

宏条形码研究中引物设计和评价的九个步骤,按步骤进行引物的设计和评价能够有效地降低阴性错误和阳性错误发生的概率。这 9 个步骤包括:(1) 定义 eDNA 实验涉及到的生物范围,并据此确定合适的基因标记,如 COI;(2) 建立物种类群的基因比对数据库;(3) 通过系统发育关系检验目标基因区别物种的能力;(4) 针对目标物种进行特异性引物的设计,注意引物序列中包含非目标生物的碱基错配;(5) 通过遗传距离分析找到容易混淆的近似种;(6) 通过模拟实验检验引物的特异性,评估假阳性和假阴性错误的风险;(7) 通过连续稀释的 DNA 样本检验引物的灵敏性;(8) 基于野外实验样品评估引物性能及 PCR 条件是否合适、有效;(9) 实施大范围的实验来制定具有使用限制和可能错误的标准调查原则。

2.4 PCR 偏好性

PCR 偏好性是由于引物和不同样品模板之间亲和力不同,某些亲和力强的样品模板在 PCR 的每轮循环中更容易被扩增,导致其在最终的 PCR 产物中过量表达的现象。引物和模板之间存在不同碱基数量的错配是造成 PCR 偏好性的重要原因,即引物和模板错配数量少比错配数目多的更容易扩增^[46]。此外,基因片段长度与碱基组成也影响引物结合效率(比如短片段更容易被扩增,GC 含量过高的模板不易扩增)^[19]。

PCR 偏好性是造成环境 DNA-宏条形码技术对低丰度物种检测率低^[28]和物种生物量估测错误^[12,30]的最主要因素。在生态研究中,生物多样性和生态系统功能的评估都离不开对物种相对丰度的准确的分析。然而,现阶段环境 DNA-宏条形码基于分子数据对物种的定量分析无法准确反映物种真实的生物量和相对丰度^[11]。尽管很多研究都证明环境 DNA-宏条形码扩增的序列数和生物量之间具有正相关的线性关系^[12, 23, 73-74],但这种线性关系只有在 PCR 偏好性没有显著影响时才成立^[75]。因此,控制和减轻 PCR 的偏好性是环境 DNA-宏条形码技术应用于水生态环境监测的主要挑战之一。建议可以采用以下方法来避免或减弱 PCR 偏好性。

(1) 使用多重分子标记同时扩增,即使用不同分子标记基因的保守区设计多对通用引物。不同引物配套使用,能够在一定程度上减轻 PCR 偏好性^[65, 67]。但此方法获得的种类往往较为复杂,给序列比对和多套数据整合等带来困难,同时也增加了假阳性率和监测成本。

(2) 引物设计上,增大对非目标物种的错配^[46]。同时,针对优势种设计封闭引物,减少不必要的 DNA 扩增,对低丰度物种设计更为特异性的引物。

(3) 在 PCR 扩增阶段,改进和优化扩增条件,包括降低引物量、适当增加模板量、减少循环次数以及适当提高退火温度等^[19]。或者采用降落 PCR(Touch-down PCR)和巢式 PCR 提高扩增的特异性^[19]。

(4) 使用宏线粒体基因组技术,直接从混合样品中获取总 DNA 并测序,避开 PCR 扩增环节^[19]

2.5 参考数据库

参考数据库的完整性和质量直接决定了运用环境 DNA-宏条形码技术进行物种鉴定的可靠性和准确度^[76]。虽然近年来 GenBank、BOLD(The Barcode of life Data System)等公共数据库收录了大量数据,但其中水生生物类群收录不足。除此之外,文库中收录的数据多为 COI、16S rRNA 等序列片段,而基于其他分子标记基因的数据收录较少^[12, 77]。数据库的不完善使得大量的环境 DNA-宏条形码数据不能得到注释或正确注释,造成物种漏检或鉴定错误,这是很多环境 DNA-宏条形码检测结果低于形态学检测结果的首要原因^[12]。此外,注释数据中超过 50%的数据只能鉴定到门或目,对物种的辨识度很低^[77],无法满足大多数水生生物多样性监测和水质监测需要鉴定到属或种的要求。

针对此问题,全球很多研究机构开始着手建立可靠完整的分子数据库和信息分享平台。澳大利亚专门建立了针对底栖动物的数据库 Aquatic Invertebrates of Australia^[78]。加拿大建立了 EPT 数据库,收录了 112 个 EPT 物种,2277 条 COI 序列^[79],近期又建立了包含 150 万条条形码数据和凭证标本的参考数据库^[80]。美国建立了收录 209 种毛翅目昆虫和超过 1000 多条条形码数据的参考库^[81]。同时,德国也建立了 EPT 数据库,收录了 363 个物种和 2000 多条序列^[82]。

目前我国条形码数据库发展相对较慢,尚未建立针对底栖动物的条形码数据库。虽然有 GenBank 和

BOLD 等公共数据库,但其数据在地理空间和物种覆盖度方面极不平衡,导致我国特有底栖动物种类鲜有收录,且已有的序列还存在着大量鉴定和标记错误^[83]。因此急需一个由专业分类学家通过准确鉴定和测序而建立的更为完备的,特别是包含我国种群数据的底栖动物条形码数据库。鉴于我国受限于缺乏条形码数据库的现状,2019年11月由南京农业大学水生昆虫团队首倡召开的中国底栖动物条形码数据库研讨会在南京举行。会议上确定由南京农业大学、南开大学、中国科学院水生生物研究所、中山大学、南京师范大学、广西师范大学等15所高校与科研院所的分类专家及团队共同携手参与构建中国首个具有自主知识产权的底栖动物条形码数据库。目前,数据库已完成昆虫纲(毛翅目、蜉蝣目、襁翅目、蜻蜓目等)、寡毛纲、软体动物门(腹足纲和瓣鳃纲)与软甲纲(溪蟹和钩虾)等合计400余种的条形码测序工作,收录共计1000余条形码序列。该条形码数据库的建立有利于摸清我国底栖动物多样性家底,并为我国底栖动物多样性保护研究和水生态的健康评价提供坚实的数据基础和技术保障。

3 基于环境 DNA-宏条形码技术的水质监测应用展望

3.1 环境 DNA 监测标准化及评价体系建设

当前底栖动物水质监测的取样及分析流程多样,然而不同方法获得的结果可比性较差。采集过程中不同水样的采集位置、过滤水量、重复次数以及后期实验室不同的 PCR 重复次数、测序深度等都会导致测定结果之间有较大差异^[67]。此外,采样过程中的防交叉污染,对照设立以及样品存放条件等都对结果有重要影响,然而这些标准至今仍未统一^[54]。采样方法与流程的标准化是底栖动物环境 DNA 监测结果具有可重复性与可比性的重要前提。因此探索有效的采样方法和流程并统一标准对今后开展基于环境 DNA 的水生态系统的大规模日常监测具有重要意义,后续应加强对底栖动物环境 DNA 方法标准化的研究。

环境 DNA-宏条形码技术监测在调查物种多样性中具有诸多优势,但在水质监测和评估方面尚未建立独有的评价体系。传统的水质监测和评价建立在形态学鉴定的基础上,检测的单位是生物个体,通过计算一系列以指示生物有无和丰度等为基础的生物指数来进行^[6]。而基于环境 DNA-宏条形码技术的分子监测得到的是大量 DNA 序列,以分子可操作单元(Molecular Operational Taxonomic Units, MOTUs)为单位。然而, MOTUs 的划分取决于主观设定的阈值,不同的阈值划分可导致 MOTUs 的数量和归类显著不同^[67]。其次,由于缺少较为完整的数据库, MOTUs 中只有小部分能精确注释到属或种进而与传统方法对接而被利用,使得大部分生物多样性监测和生态学研究结果停留在 MOTUs 阶段,难以将获得的多样性分布数据与现有的生物学和生态学指标结合起来,从而分析多样性现状、空间分布格局及胁迫因素的相关关系^[83]。此外,环境 DNA-宏条形码技术较形态学方法更易检测出稀有物种。这类物种可参考资料较少,未纳入传统的生物指数评价范围,无法用于生物指数的计算。因此,环境 DNA-宏条形码技术在水质监测的广泛应用尚需于建立起其独特的评价体系^[77]。

针对以上问题,可以考虑建立基于宏条形码数据的生物指数及评价体系。直接利用序列的相对丰度和 MOTUs 数计算的生物指数,已在细菌 microgAMBI^[84]、硅藻^[85-86]和海洋底栖动物 gAMBI 等^[87-88]中得到应用,并已显示出与传统手段相似的生态评价效果^[89]。同时,该方法可进一步与人工智能相结合,利用监督式机器学习(Supervised Machine Learning, SML),通过输入大量序列和 MOTUs 数样本训练模型进行分子生物指数计算^[85],进而用来评估水生态健康状况和预测水体质量^[90]。该方法能快速地从海量的宏条形码数据中重建生态网络,提升水质监测效率。未来,大数据和智能化技术为基础的分子生物指数将成为水环境生态管理的重要指标。

3.2 宏线粒体基因组技术

宏线粒体基因组技术采用免 PCR 扩增法(如短核苷酸链捕获探针法、全基因组鸟枪法等)直接对多物种混合样品进行高通量测序,并通过生物信息学分析获得样品中物种的线粒体全基因组,进而对物种类群进行注释^[91]。线粒体基因组比传统分子标记基因包含更长的序列片段,可大幅提高混合物种的鉴定灵敏度和分

辨率。该方法的有效性已在无脊椎动物中已得到验证^[92]。如 Tang 等^[93]开发出一套针对昆虫的基于高通量 Illumina 测序平台的宏线粒体基因组对混合物种相对丰度的分析流程,并利用该方法替代传统的 COI 条形码进行物种鉴定,研究显示物种鉴定的位点信息扩大了约 20 倍。目前该方法由于测序成本高,对下游生物信息分析技术要求较高等问题,仍处于探索阶段。但该方法解决了由于 PCR 扩增造成的物种偏倚性,同时获得更多信息位点,可更灵敏和准确地评估物种组成,进而实现各物种生物量乃至相对丰度的分析^[92],因此,宏线粒体基因组技术无疑是未来宏条形码技术发展的重要方向之一。

3.3 环境 RNA 的应用

环境 DNA-宏条形码相对于传统生物调查方法的劣势在于无法区分物种的生活个体和死亡个体,也无法判定检测到的物种所处发育阶段以及群体的性别比例等信息。近年来出现的环境 RNA (Environmental RNA, eRNA) 技术以环境中的 RNA 为研究对象,能够弥补这一劣势,不仅能够判断物种存在与否,还能更好地反映物种在环境中的活跃程度^[94]。

少数结合 eDNA 和 eRNA 技术同时进行监测的研究发现,eDNA 和 eRNA 两者得到的 MOTUs 数以及物种数有较大差异^[95]。研究表明 eDNA 对真菌有更高的检测率,而 eRNA 对后生动物有更高的检测率,其中 19.5% 的 OTUs 为 eDNA 特有,17.7% 为 eRNA 特有^[95]。由于只在 eRNA 数据中出现的 OTUs 有可能是某些生物代谢过量表达或者反转录和建库过程中出现的假序列,因此一些研究者倡导联合使用 eDNA 和 eRNA 的数据,以期更好地对生态环境进行评估^[94, 96]。由于 RNA 在环境中相对于 DNA 更容易降解,其特殊的样品采集、保存、处理以及反转录等操作都会增加调查的难度和成本。但该方法对活体的检测能力能够进一步促进对生物环境和群落结构的认知,是一项非常有潜力的环境分析方法。

参考文献 (References):

- [1] 梁彦龄,王洪铸.底栖动物//刘建康.高级水生生物学.北京:科学出版社,1999:241-242.
- [2] Resh V H, Norris R H, Barbour M T. Design and implementation of rapid assessment approaches for water resource monitoring using benthic macroinvertebrates. *Australian Journal of Ecology*, 1995, 20(1):108-121.
- [3] Dudgeon D, Arthington A H, Gessner M O, Kawabata Z I, Knowler D J, L ev eque C, Naiman R J, Prieur-Richard A H, Soto D, Stiassny M L J, Sullivan C A. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological Reviews*, 2006, 81(2):163-182.
- [4] Deiner K, Bik H M, M achler E, Seymour M, Lacoursi ere-Roussel A, Altermatt F, Creer S, Bista I, Lodge D M, de Vere N, Pfrender M E, Bernatchez L. Environmental DNA metabarcoding: transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology*, 2017, 26(21):5872-5895.
- [5] Bailey R C, Norris R H, Reynoldson T B. Taxonomic resolution of benthic macroinvertebrate communities in bioassessments. *Freshwater Science*, 2001, 20(2):280-286.
- [6] Lenat D R. A biotic index for the southeastern United States: derivation and list of tolerance values, with criteria for assigning water-quality ratings. *Journal of the North American Benthological Society*, 1993, 12(3):279-290.
- [7] 于水强,王文娟, Li B L. 环境 DNA 技术在地下生态学中的应用. *生态学报*, 2015, 35(15):4968-4976.
- [8] 李飞龙,杨江华,杨雅楠,张效伟.环境 DNA 宏条形码监测水生态系统变化与健康状态. *中国环境监测*, 2018, 34(6):37-46.
- [9] Bienert F, de Danieli S, Miquel C, Coissac E, Poillot C, Brun J J, Taberlet P. Tracking earthworm communities from soil DNA. *Molecular Ecology*, 2012, 21(8):2017-2030.
- [10] 陈炼,吴琳,刘燕,徐海根.环境 DNA metabarcoding 及其在生态学中的应用. *生态学报*, 2016, 36(15):4573-4582.
- [11] Bush A, Compson Z G, Monk W A, Porter T M, Steeves R, Emilson E, Gagne N, Hajibabaei M, Roy M, Baird D J. Studying ecosystems with DNA metabarcoding: lessons from biomonitoring of aquatic macroinvertebrates. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2019, 7:434.
- [12] Elbrecht V, Leese F. Can DNA-based ecosystem assessments quantify species abundance? Testing primer bias and biomass—sequence relationships with an innovative metabarcoding protocol. *PLoS One*, 2015, 10(7):e0130324.
- [13] Elbrecht V, Vamos E E, Meissner K, Aroviita J, Leese F. Assessing strengths and weaknesses of DNA metabarcoding-based macroinvertebrate identification for routine stream monitoring. *Methods in Ecology and Evolution*, 2017, 8(10):1265-1275.
- [14] Elbrecht V, Taberlet P, Dejean T, Valentini A, Usseglio-Polatera P, Beisel J N, Coissac E, Boyer F, Leese F. Testing the potential of a ribosomal 16S marker for DNA metabarcoding of insects. *PeerJ*, 2016, 4:e1966.

- [15] Dowle E J, Pochon X, Banks J C, Shearer K, Wood S A. Targeted gene enrichment and high-throughput sequencing for environmental biomonitoring: a case study using freshwater macroinvertebrates. *Molecular Ecology Resources*, 2016, 16(5):1240-1254.
- [16] 姜维, 王启军, 邓捷, 赵虎, 孔飞, 张红星. 以川陕哲罗鲑为目标物种的水样环境 DNA 分析流程的优化. *应用生态学报*, 2016, 27(7):2372-2378.
- [17] Carew M E, Coleman R A, Hoffmann A A. Can non-destructive DNA extraction of bulk invertebrate samples be used for metabarcoding? *PeerJ*, 2018, 6(6):e4980.
- [18] Beentjes K K, Speksnijder A G C L, Schilthuisen M, Hoogeveen M, Pastoor R, van der Hoorn B B. Increased performance of DNA metabarcoding of macroinvertebrates by taxonomic sorting. *PLoS One*, 2019, 14(12):e0226527.
- [19] 李哈溪, 黄雪娜, 李世国, 战爱斌. 基于环境 DNA-宏条形码技术的水生生态系统入侵生物的早期监测与预警. *生物多样性*, 2019, 27(5):491-504.
- [20] Taberlet P, Coissac E, Hajibabaei M, Rieseberg L H. Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 2012, 21(8):1789-1793.
- [21] Thomsen P F, Kielgast J, Iversen L L, Møller P R, Rasmussen M, Willerslev E. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS One*, 2012, 7(8):e41732.
- [22] Ficetola G F, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 2008, 4(4):423-425.
- [23] Pilliod D S, Goldberg C S, Arkle R S, Waits L P. Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2013, 70(8):1123-1130.
- [24] Jerde C L, Chadderton W L, Mahon A R, Renshaw M A, Corush J, Budny M L, Mysorekar S, Lodge D M. Detection of Asian carp DNA as part of a Great Lakes basin-wide surveillance program. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2013, 70(4):522-526.
- [25] Takahara T, Minamoto T, Doi H. Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PLoS One*, 2013, 8(2):e56584.
- [26] 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*, 2013, 32(3):792-800.
- [27] Hajibabaei M, Shokralla S, Zhou X, Singer G A C, Baird D J. Environmental barcoding: a next-generation sequencing approach for biomonitoring applications using river benthos. *PLoS One*, 2011, 6(4):e17497.
- [28] Carew M E, Pettigrove V J, Metzeling L, Hoffmann A A. Environmental monitoring using next generation sequencing: rapid identification of macroinvertebrate bioindicator species. *Frontiers in Zoology*, 2013, 10(1):45.
- [29] Mächler E, Deiner K, Steinmann P, Altermatt F. Utility of environmental DNA for monitoring rare and indicator macroinvertebrate species. *Freshwater Science*, 2014, 33(4):1174-1183.
- [30] Elbrecht V, Leese F. Validation and development of COI metabarcoding primers for freshwater macroinvertebrate bioassessment. *Frontiers in Environmental Science*, 2017, 5:11.
- [31] Beermann A J, Zizka V M A, Elbrecht V, Baranov V, Leese F. DNA metabarcoding reveals the complex and hidden responses of chironomids to multiple stressors. *Environmental Sciences Europe*, 2018, 30(1):26.
- [32] Gibson J F, Shokralla S, Curry C, Baird D J, Monk W A, King I, Hajibabaei M. Large-scale biomonitoring of remote and threatened ecosystems via high-throughput sequencing. *PLoS One*, 2015, 10(10):e0138432.
- [33] Bista I, Carvalho G R, Walsh K, Seymour M, Hajibabaei M, Lallias D, Christmas M, Creer S. Annual time-series analysis of aqueous eDNA reveals ecologically relevant dynamics of lake ecosystem biodiversity. *Nature Communications*, 2017, 8:14087.
- [34] Emilson C E, Thompson D G, Venier L A, Porter T M, Swystun T, Chartrand D, Capell S, Hajibabaei M. DNA metabarcoding and morphological macroinvertebrate metrics reveal the same changes in boreal watersheds across an environmental gradient. *Scientific Reports*, 2017, 7:12777.
- [35] Blackman R C, Constable D, Hahn C, Sheard A M, Durkota J, Hänfling B, Handley L L. Detection of a new non-native freshwater species by DNA metabarcoding of environmental samples—first record of *Gammarus fossarum* in the UK. *Aquatic Invasions*, 2017, 12(2):177-189.
- [36] Theissinger K, Kästel A, Elbrecht V, Makkonen J, Michiels S, Schmidt S I, Allgeier S, Leese F, Brühl C A. Using DNA metabarcoding for assessing chironomid diversity and community change in mosquito controlled temporary wetlands. *Metabarcoding and Metagenomics*, 2018, 2:e21060.
- [37] Andújar C, Arribas P, Gray C, Bruce C, Woodward G, Yu D W, Vogler A P. Metabarcoding of freshwater invertebrates to detect the effects of a pesticide spill. *Molecular Ecology*, 2018, 27(1):146-166.
- [38] Mächler E, Little C J, Wüthrich R, Alther R, Fronhofer E A, Gounand I, Harvey E, Hürlemann S, Walser J C, Altermatt F. Assessing different components of diversity across a river network using eDNA. *Environmental DNA*, 2019, 1(3):290-301.
- [39] Elbrecht V, Steinke D. Scaling up DNA metabarcoding for freshwater macrozoobenthos monitoring. *Freshwater Biology*, 2019, 64(2):380-387.

- [40] Baird D J, Hajibabaei M. Biomonitoring 2.0: a new paradigm in ecosystem assessment made possible by next-generation DNA sequencing. *Molecular Ecology*, 2012, 21(8):2039-2044.
- [41] Cai W, Ma Z X, Yang C Y, Wang L, Wang W Z, Zhao G G, Geng Y P, Yu D W. Using eDNA to detect the distribution and density of invasive crayfish in the Honghe-Hani rice terrace World Heritage site. *PLoS One*, 2017, 12(5):e0177724.
- [42] 李苗, 单秀娟, 王伟继, 吕丁, 戴芳群, 丁小松, 吴欢欢. 中国对虾生物量评估的环境 DNA 检测技术的建立及优化. *渔业科学进展*, 2019, 40(1):12-19.
- [43] Deiner K, Walser J C, Mächler E, Altermatt F. Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biological Conservation*, 2015, 183:53-63.
- [44] Yang J H, Zhang X W, Xie Y W, Song C, Zhang Y, Yu H X, Burton G A. Zooplankton community profiling in a eutrophic freshwater ecosystem-lake tai basin by DNA metabarcoding. *Scientific Reports*, 2017, 7(1):1773.
- [45] Rees H C, Maddison B C, Middleditch D J, Patmore J R M, Gough K C. REVIEW: the detection of aquatic animal species using environmental DNA—a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*, 2014, 51(5):1450-1459.
- [46] Wilcox T M, McKelvey K S, Young M K, Jane S F, Lowe W H, Whiteley A R, Schwartz M K. Robust detection of rare species using environmental DNA: the importance of primer specificity. *PLoS One*, 2013, 8(3):e59520.
- [47] Deiner K, Fronhofer E A, Mächler E, Walser J C, Altermatt F. Environmental DNA reveals that rivers are conveyor belts of biodiversity information. *Nature Communications*, 2016, 7:12544.
- [48] Carraro L, Mächler E, Wüthrich R, Altermatt F. Environmental DNA allows upscaling spatial patterns of biodiversity in freshwater ecosystems. *Nature Communications*, 2020, 11(1):3585.
- [49] Pilliod D S, Goldberg C S, Arkle R S, Waits L P. Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources*, 2014, 14(1):109-116.
- [50] Tréguier A, Paillisson J M, Dejean T, Valentini A, Schlaepfer M A, Roussel J M. Environmental DNA surveillance for invertebrate species: advantages and technical limitations to detect invasive crayfish *Procambarus clarkii* in freshwater ponds. *Journal of Applied Ecology*, 2014, 51(4):871-879.
- [51] Hajibabaei M, Porter T M, Robinson C V, Baird D J, Shokralla S, Wright M T G. Watered-down biodiversity? A comparison of metabarcoding results from DNA extracted from matched water and bulk tissue biomonitoring samples. *PLoS One*, 2019, 14(12):e0225409.
- [52] Hajibabaei M, Spall J L, Shokralla S, van Konyenburg S. Assessing biodiversity of a freshwater benthic macroinvertebrate community through non-destructive environmental barcoding of DNA from preservative ethanol. *BMC Ecology*, 2012, 12:28.
- [53] Majaneva M, Diserud O H, Eagle S H C, Hajibabaei M, Ekrem T. Choice of DNA extraction method affects DNA metabarcoding of unsorted invertebrate bulk samples. *Metabarcoding and Metagenomics*, 2018, 2:e26664.
- [54] Nichols S J, Kefford B J, Campbell C D, Bylemans J, Chandler E, Bray J P, Shackleton M, Robinson K L, Carew M E, Furlan E M. Towards routine DNA metabarcoding of macroinvertebrates using bulk samples for freshwater bioassessment: effects of debris and storage conditions on the recovery of target taxa. *Freshwater Biology*, 2020, 65(4):607-620.
- [55] Pereira-da-Conceicao L, Elbrecht V, Hall A, Briscoe A, Barber-James H, Price B. Metabarcoding unsorted kick-samples facilitates macroinvertebrate-based biomonitoring with increased taxonomic resolution, while outperforming environmental DNA. *Environmental DNA*, 2020: 1-19.
- [56] Erdozain M, Thompson D G, Porter T M, Kidd K A, Kreutzweiser D P, Sibley P K, Swystun T, Chartrand D, Hajibabaei M. Metabarcoding of storage ethanol vs. conventional morphometric identification in relation to the use of stream macroinvertebrates as ecological indicators in forest management. *Ecological Indicators*, 2019, 101:173-184.
- [57] Martins F M S, Galhardo M, Filipe A F, Teixeira A, Pinheiro P, Paupério J, Alves P C, Beja P. Have the cake and eat it: optimizing nondestructive DNA metabarcoding of macroinvertebrate samples for freshwater biomonitoring. *Molecular Ecology Resources*, 2019, 19(4):863-876.
- [58] Gauthier M, Konecny-Dupré L, Nguyen A, Elbrecht V, Detry T, Douady C, Lefebvre T. Enhancing DNA metabarcoding performance and applicability with bait capture enrichment and DNA from conservative ethanol. *Molecular Ecology Resources*, 2020, 20(1):79-96.
- [59] Zizka V M A, Leese F, Peinert B, Geiger M F. DNA metabarcoding from sample fixative as a quick and voucher-preserving biodiversity assessment method. *Genome*, 2019, 62(3):122-136.
- [60] Marquina D, Andersson A F, Ronquist F. New mitochondrial primers for metabarcoding of insects, designed and evaluated using in silico methods. *Molecular Ecology Resources*, 2019, 19(1):90-104.
- [61] Zhan A B, MacIsaac H J. Rare biosphere exploration using high-throughput sequencing: research progress and perspectives. *Conservation Genetics*, 2015, 16(3):513-522.

- [62] Deagle B E, Jarman S N, Coissac E, Pompanon F, Taberlet P. DNA metabarcoding and the cytochrome c oxidase subunit I marker: not a perfect match. *Biology Letters*, 2014, 10(9):20140562.
- [63] Piñol J, Mir G, Gomez-Polo P, Agustí N. Universal and blocking primer mismatches limit the use of high-throughput DNA sequencing for the quantitative metabarcoding of arthropods. *Molecular Ecology Resources*, 2015, 15(4):819-830.
- [64] Ficetola G F, Boyer F, Valentini A, Bonin A, Meyer A, Dejean T, Gaboriaud C, Usseglio-Polatera P, Taberlet P. Comparison of markers for the monitoring of freshwater benthic biodiversity through DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 2020, doi:10.1111/mec.15632.
- [65] Gibson J, Shokralla S, Porter T M, King I, van Konynenburg S, Janzen D H, Hallwachs W, Hajibabaei M. Simultaneous assessment of the macrobiome and microbiome in a bulk sample of tropical arthropods through DNA metasytematics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2014, 111(22):8007-8012.
- [66] Zhang G K, Chain F J J, Abbott C L, Cristescu M E. Metabarcoding using multiplexed markers increases species detection in complex zooplankton communities. *Evolutionary Applications*, 2018, 11(10):1901-1914.
- [67] Alberdi A, Aizpurua O, Gilbert M T P, Bohmann K. Scrutinizing key steps for reliable metabarcoding of environmental samples. *Methods in Ecology and Evolution*, 2018, 9(1):134-147.
- [68] Geller J, Meyer C, Parker M, Hawk H. Redesign of PCR primers for mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I for marine invertebrates and application in all-taxa biotic surveys. *Molecular Ecology Resources*, 2013, 13(5):851-861.
- [69] Leray M, Yang J Y, Meyer C P, Mills S C, Agudelo N, Ranwez V, Boehm J T, Machida R J. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in Zoology*, 2013, 10:34.
- [70] Vamos E E, Elbrecht V, Leese F. Short COI markers for freshwater macroinvertebrate metabarcoding. *Metabarcoding and Metagenomics*, 2017, 1:e14625.
- [71] Zhan A B, Bailey S A, Heath D D, Macisaac H J. Performance comparison of genetic markers for high-throughput sequencing-based biodiversity assessment in complex communities. *Molecular Ecology Resources*, 2014, 14(5):1049-1059.
- [72] MacDonald A J, Sarre S D. A framework for developing and validating taxon-specific primers for specimen identification from environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 2017, 17(4):708-720.
- [73] Thomsen P F, Kielgast J, Iversen L L, Wiuf C, Rasmussen M, Gilbert M T P, Orlando L, Willerslev E. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 2012, 21(11):2565-2573.
- [74] Evans N T, Olds B P, Renshaw M A, Turner C R, Li Y Y, Jerde C L, Mahon A R, Pfrender M E, Lamberti G A, Lodge D M. Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 2016, 16(1):29-41.
- [75] Piñol J, Senar M A, Symondson W O C. The choice of universal primers and the characteristics of the species mixture determine when DNA metabarcoding can be quantitative. *Molecular Ecology*, 2019, 28(2):407-419.
- [76] Hajibabaei M, Baird D J, Fahner N A, Beiko R, Golding G B. A new way to contemplate Darwin's tangled bank: how DNA barcodes are reconnecting biodiversity science and biomonitoring. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2016, 371(1702):20150330.
- [77] 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. Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive. *Water Research*, 2018, 138:192-205.
- [78] Carew M E, Nichols S J, Batovska J, St Clair R, Murphy N P, Blacket M J, Shackleton M E. A DNA barcode database of Australia's freshwater macroinvertebrate fauna. *Marine and Freshwater Research*, 2017, 68(10):1788-1802.
- [79] Zhou X, Adamowicz S J, Jacobus L M, DeWalt R E, Hebert P D N. Towards a comprehensive barcode library for arctic life-Ephemeroptera, Plecoptera, and Trichoptera of Churchill, Manitoba, Canada. *Frontiers in Zoology*, 2009, 6:30.
- [80] deWaard J R, Ratnasingham S, Zakharov E V, Borisenko A V, Steinke D, Telfer A C, Perez K H J, Sones J E, Young M R, Levesque-Beaudin V, Sobel C N, Abrahamyan A, Bessonov K, Blagoev G, deWaard S L, Ho C, Ivanova N V, Layton K K S, Lu L Q, Manjunath R, McKeown J T A, Milton M A, Miskie R, Monkhouse N, Naik S, Nikolova N, Pentinsaari M, Prosser S W J, Radulovici A E, Steinke C, Warne C P, Hebert P D N. A reference library for Canadian invertebrates with 1.5 million barcodes, voucher specimens, and DNA samples. *Scientific Data*, 2019, 6:308.
- [81] Zhou X, Robinson J L, Geraci C J, Parker C R, Flint Jr O S, Etnier D A, Ruitter D, DeWalt R E, Jacobus L M, Hebert P D N. Accelerated construction of a regional DNA-barcode reference library: caddisflies (Trichoptera) in the Great Smoky Mountains National Park. *Journal of the North American Benthological Society*, 2011, 30(1):131-162.
- [82] Morinière J, Hendrich L, Balke M, Beermann A J, König T, Hess M, Koch S, Müller R, Leese F, Hebert P D N, Hausmann A, Schubart C D,

- Haszprunar G. A DNA barcode library for Germany's mayflies, stoneflies and caddisflies (Ephemeroptera, Plecoptera and Trichoptera). *Molecular Ecology Resources*, 2017, 17(6):1293-1307.
- [83] 刘山林. DNA 条形码参考数据集构建和序列分析相关的新兴技术. *生物多样性*, 2019, 27(5):526-533.
- [84] Aylagas E, Borja Á, Tangherlini M, Dell'Anno A, Corinaldesi C, Michell C T, Irigoien X, Danovaro R, Rodríguez-Ezpeleta N. A bacterial community-based index to assess the ecological status of estuarine and coastal environments. *Marine Pollution Bulletin*, 2017, 114(2):679-688.
- [85] Apothéloz-Perret-Gentil L, Cordonier A, Straub F, Iseli J, Esling P, Pawlowski J. Taxonomy-free molecular diatom index for high-throughput eDNA biomonitoring. *Molecular Ecology Resources*, 2017, 17(6):1231-1242.
- [86] Visco J A, Apothéloz-Perret-Gentil L, Cordonier A, Esling P, Pillet L, Pawlowski J. Environmental monitoring: inferring the diatom index from next-generation sequencing data. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(13):7597-7605.
- [87] Aylagas E, Rodríguez-Ezpeleta N. Analysis of illumina MiSeq metabarcoding data: application to benthic indices for environmental monitoring// Bourlat S J, ed. *Marine Genomics*. New York: Humana Press, 2016:237-249.
- [88] Lejzerowicz F, Esling P, Pillet L, Wilding T A, Black K D, Pawlowski J. High-throughput sequencing and morphology perform equally well for benthic monitoring of marine ecosystems. *Scientific Reports*, 2015, 5:13932.
- [89] Borja A. Testing the efficiency of a bacterial community-based index (microgAMBI) to assess distinct impact sources in six locations around the world. *Ecological Indicators*, 2018, 85:594-602.
- [90] Cordier T, Esling P, Lejzerowicz F, Visco J, Ouadahi A, Martins C, Cedhagen T, Pawlowski J. Predicting the ecological quality status of marine environments from eDNA metabarcoding data using supervised machine learning. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(16):9118-9126.
- [91] 郎丹丹, 唐敏, 周欣. 传粉网络构建的定性定量分子研究:应用与展望. *生物多样性*, 2018, 26(5):445-456.
- [92] Zhou X, Li Y Y, Liu S L, Yang Q, Su X, Zhou L L, Tang M, Fu R B, Li J G, Huang Q F. Ultra-deep sequencing enables high-fidelity recovery of biodiversity for bulk arthropod samples without PCR amplification. *GigaScience*, 2013, 2(1):4.
- [93] Tang M, Hardman C J, Ji Y Q, Meng G L, Liu S L, Tan M H, Yang S Z, Moss E D, Wang J X, Yang C X, Bruce C, Nevard T, Potts S G, Zhou X, Yu D W. High-throughput monitoring of wild bee diversity and abundance via mitogenomics. *Methods in Ecology and Evolution*, 2015, 6(9):1034-1043.
- [94] Laroche O, Wood S A, Tremblay L A, Lear G, Ellis J I, Pochon X. Metabarcoding monitoring analysis: the pros and cons of using co-extracted environmental DNA and RNA data to assess offshore oil production impacts on benthic communities. *PeerJ*, 2017, 5:e3347.
- [95] Pochon X, Zaiko A, Fletcher L M, Laroche O, Wood S A. Wanted dead or alive? Using metabarcoding of environmental DNA and RNA to distinguish living assemblages for biosecurity applications. *PLoS One*, 2017, 12(11):e0187636.
- [96] Pawlowski J, Esling P, Lejzerowicz F, Cedhagen T, Wilding T A. Environmental monitoring through protist next-generation sequencing metabarcoding: assessing the impact of fish farming on benthic foraminifera communities. *Molecular Ecology Resources*, 2014, 14(6):1129-1140.