

DOI: 10.5846/stxb202112283679

严丽君, 王普, 施启龙, 刘佳, 施云娥, 池利昆. 动物食性分析在生态学中的应用研究进展——基于 DNA 宏条形码技术. 生态学报, 2023, 43(8): 3007-3019.

Yan L J, Wang P, Shi Q L, Liu J, Shi Y E, Chi L K. Applications of animal diet analysis based on DNA metabarcoding in ecological research. Acta Ecologica Sinica, 2023, 43(8): 3007-3019.

动物食性分析在生态学中的应用研究进展 ——基于 DNA 宏条形码技术

严丽君*, 王 普, 施启龙, 刘 佳, 施云娥, 池利昆

云南师范大学, 昆明 650092

摘要: 动物食性分析是动物营养生态学的重要研究手段, 可用于解析动物与环境因素的关联性、捕食者与猎物之间的关系, 以及动物物种多样性等科学问题。近年来, 基于新一代测序技术的 DNA 宏条形码技术被广泛应用到生态学多个研究领域, 极大地促进了生命科学交叉学科的发展。其中, DNA 宏条形码技术在动物食性分析中具有高分辨、高效率、低样本量等优势, 具有重要的应用前景。综述了基于 DNA 宏条形码技术的动物食性分析在生态学中的应用研究进展, 并进一步总结了 DNA 宏条形码技术原理和食性分析方法, 着重探讨了基于 DNA 宏条形码技术的动物食性分析在珍稀濒危动物保护、生物多样性监测、农业害虫防治等生态学研究领域中的应用, 并对 DNA 宏条形码技术在动物食性分析中存在的问题及应用前景进行小结与展望。

关键词: DNA 宏条形码; 高通量测序; 食性分析; 物种鉴定; 生物多样性; 生物防治

Applications of animal diet analysis based on DNA metabarcoding in ecological research

YAN Lijun*, WANG Pu, SHI Qilong, LIU Jia, SHI Yune, CHI Likun

Yunnan Normal University, Kunming 650092, China

Abstract: The animal diet analysis is an important research method in animal nutrition ecology, which can be used to analyze the relationship between animals and environmental factors, the relationship between predators and prey, and the diversity of animal species. In recent years, DNA metabarcoding based on next-generation sequencing technology has been widely used in many fields of ecological research, which greatly promoted the interdisciplinary development of life science. Due to the advantages of high resolution, high efficiency and relatively low sample size, diet analysis based on DNA metabarcoding has been widely applied in many prospects. Here, we summarized the principles and methods of DNA metabarcoding and diet analysis, reviewed its application in ecological research. In detail, the applications of diet analysis in biodiversity monitoring, the rare and endangered animal protection, and the agricultural pest control were summarized. In addition, the deficiencies and prospects of DNA metabarcoding in animal diet analysis were also discussed.

Key Words: DNA metabarcoding; high-throughput sequencing; diet analysis; species identification; biodiversity; biological control

食物是动物与环境关系的纽带, 在生态系统中物种通过直接或间接地取食与被取食关系交织形成食物链

基金项目: 国家自然科学基金项目(32160240); 云南省应用基础研究计划项目(202001AT070062)

收稿日期: 2021-12-28; 网络出版日期: 2022-12-22

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: yanlijunhappy@126.com

甚至食物网,不同物种间复杂的相互作用促进和保障了生态系统功能的正常运转,进而维持着自然生态系统的稳定性和生物多样性。动物食性分析是动物生态学研究的重要方法之一,也为研究动物营养生态学,评估物种的生存状况、栖息地选择及生态系统功能,了解动物与环境关系、捕食者与猎物关系以及探讨其在生物群落中的地位等提供了一手资料^[1-2]。尤其,对珍惜濒危物种进行食性分析,可为评估濒危物种种群生存繁殖现状和资源管理等提供理论保护依据^[3]。

动物食性分析方法较多,其分析结果的准确性直接关系到食性相关的理论研究,同时也关乎其研究结果在动物保护实践中的应用。随着科学家对动物食性分析技术的不断改进,动物食性分析方法也从传统的形态观察发展到以 DNA 条形码技术为核心的分子鉴定^[4]。Hebert 等 2003 年首次提出了生命 DNA 条形码概念,即应用一段标准的 DNA 序列来高效识别物种^[5],并率先验证了这种方法的可行性,提出使用线粒体细胞色素氧化酶 (COI) 基因作为动物种类鉴定的标准 DNA 条形码^[6]。自国际生命条形码计划 (iBOL) 提出以后,全球研究学者们相继开展了针对各种生物 (包括动物、植物、古植物和微生物等) 的条形码数据库构建工作,并集中收录在生命条形码数据系统 (BOLD) 中,目前该数据库中收录的条形码序列多达 460 余万,被广泛用于各类生物物种的鉴定。

随着分子生物学技术的快速发展,DNA 测序技术在短短十年内由传统的一代 Sanger 测序已快速发展到二代高通量测序 (如 Roche 454, Illumina Hiseq, Ion PGM 等) 及三代单分子测序 (PacBio SMRT, Helicos tSMS, Oxford Nanopore Sequencing), 为生命体遗传信息的解析带来了新机遇。基于 DNA 的动物食性分析技术也从传统的 Sanger 测序拓展到高通量测序,使得基于高通量测序的 DNA 宏条形码技术被广泛用于动物食性分析的相关研究中,极大地促进了应用生态学研究领域的发展。本文回顾了常见动物食性分析方法的优缺点、DNA 宏条形码技术的优势及面临的困难和挑战,并结合食性分析在生态学中的应用现状,重点对该技术在生物多样性监测、珍稀濒危动物保护、农业害虫防治等生态研究中的应用前景进行综述,以期在动物物种识别、多样性监测、珍惜濒危物种保护、有害生物预防等应用生态学研究领域提供参考。

1 动物食性分析常用方法

动物食性分析研究是从营养的角度来探讨动物与自然环境之间的关联性。在传统食性分析方法中,研究者们最初通过直接观测动物的觅食行为来分析动物的食性,由此可得到大量有关动物的食性信息。但该方法存在耗时耗力等缺点,且无法对一些分季节活动或夜间行动的动物进行有效观测。因此,针对不同的动物,研究者们往往采用其它更有效的分析方法来进行研究,各种食性分析方法也应运而生,例如,食物残渣观察法、粪便分析技术、同位素分析法、胃容物分析法等^[7-9]。随着分子生物学和测序技术的不断发展,基于 DNA 的分子生物学技术也被广泛用于动物食性分析中。

1.1 直接观察法

直接观察法是通过肉眼在一定距离下观察动物取食种类,将被取食物种记录下来从而确定食物的组成^[10-11]。或者通过望远镜、红外相机、摄像机等设备与无线电技术相结合来观察动物的取食种类及数量偏好等^[9]。该方法非常耗时,多用于驯养动物的食性分析,通过提供定量和定类的食物给研究动物,再根据剩余食物的数量和种类来确定动物食性的组成^[12]。该方法的优点在于操作简易,让动物在近自然状态下取食,便于直接观察动物的取食行为,对动物不造成损伤,不干扰动物的觅食行为和活动方式,是一种较为可靠的分析方法^[13]。直接观察法在食植性动物中应用较多,在肉食性、杂食性动物中应用较少。由于该方法主要通过人为观测进行判断,距离远时很难准确辨别动物正在取食的植物种类^[14]。此外,该方法容易受环境多因素干扰,使观察动物取食行为存在诸多困难。例如,很难接近野生或隐蔽警惕性高的动物,一些珍稀濒危物种也很难被直接观察到^[15]。

1.2 利用法

利用法是一种宏观的食性分析方法^[11]。利用法一般有剪枝估重法、取食地点检查法和啃食调查法三种,

其中取食地点检查法和啃食调查法最为常用^[12]。利用法不会对研究对象造成影响,属于非损伤性方法,但会受到一些因素的影响,存在一定的误差。例如,被取食植物种类存在季节性差异,动物的取食方式多样,动物的分布区和取食区域不一致,加之,在与其它动物生态位重叠的情况下,对研究对象的啃食痕迹很难辨别,啃食痕迹在植物的生长季节容易消失^[11]等均会造成追踪误差。近年来,利用法极少单独使用,有时被用于调查有蹄类对植物群落的利用和对森林的危害,偶尔也用于辅助其它方法检测动物的食性^[12,16]。

1.3 胃容物分析法

胃容物分析法以胃内食物残渣的形态学显微鉴定结果为依据,是分析有蹄类动物食性的经典方法^[12]。该方法关键在于采集足够的植物样本和动物胃内容物中的植物组织进行比较,可确定到种属^[13],被广泛应用于草食动物^[13,17]。此法属于损伤性取样,适用于意外死亡、病死或冻死的个体,不适用于珍稀濒危物种^[18]。胃容物分析法的步骤一般分为取样、冲洗筛选、鉴别分类和结果分析^[12]。此法较直接观察法的优点是不需对物种进行跟踪,不以采食地点作为主要依据,且操作及设备简单,成本较低,对物种解剖得到胃样即可进行分析^[13,19]。该方法已被用于黑鹿^[20]、鬃羚^[21]、松鼠^[22]、跳鼠^[23]等食植性动物的食性分析。然而,由于该法工作量较大,操作复杂,无法确定动物自由生活条件下所取食的全部食物种类,对形态学相近的食物分辨率低,早期在啮齿动物营养生态学研究中的应用较多,目前已很少使用。

1.4 稳定同位素技术

动物体内的同位素组成通常反映和整合了它们在一段时间内的饮食,从几个小时到几年甚至到一生。当动物的生活环境发生变化或迁移到一个新的环境时,动物的同位素组成也会随之变化。因此,动物的稳定同位素特征能够真实地反映某一时期动物的食物来源、栖息地、分布和活动轨迹^[24]。稳定同位素技术通过碳、氮稳定同位素放射性标记技术对动物食性进行研究^[25]。该技术自 20 世纪 60 年代取得突破性进展以来,已被广泛用于生态学中的食性研究^[26]。该法的分析依据是稳定同位素的值在捕食者与食物间存在差异,碳稳定同位素可指示食物来源及海域差异,氮稳定同位素可以判定物种在食物链中的地位和营养层次^[27]。稳定同位素技术可以反映动物长期的食性信息^[28],甚至可通过古化石确定灭绝物种的食性信息^[29],目前,该方法已被成功用于水生生物^[30]、食草动物^[31-32]的食性研究及动物跨时间尺度的食性分析^[33-34],为动植物食物网关系及生态群落结构的研究提供了理想的工具。

1.5 粪便显微鉴定法

粪便显微鉴定法是一种利用显微组织学技术对动物粪便进行分析,通过对粪便中植物角质层留有的表皮细胞印迹进行鉴定从而确定植物的组成和种类^[12]。该法因取样容易,分析结果可靠,成本较低,对动物无损伤等优点在动物食性分析中得以普遍应用,尤其在珍稀濒危动物的食性研究中应用较多^[16]。许多研究认为粪便显微分析法可准确鉴定动物的食物组成,甚至比胃容物分析法更为准确^[12],已被用于啮齿动物^[35-36]、大型食草动物的食性分析^[37-40]。但该法也存在耗时耗力,对镜检者的经验要求高,动物对不同植物的消化作用不同而导致可供辨别的植物表皮细胞存在一定偏差等缺点^[11,41-43]。目前该方法主要用于植食性动物的食性分析,在肉食性、杂食性脊椎动物及昆虫等无脊椎动物中的食性分析较罕见。

1.6 传统粪便 DNA 分析技术

传统粪便 DNA 分析技术始于 20 世纪 90 年代,其原理是利用遗传信息载体 DNA 来分析动物的食性^[44]。基于粪便 DNA 的食性分析方法有两种:基于 PCR 鉴定和基于序列鉴定。基于 PCR 鉴定是利用分子生物学手段提取动物粪便 DNA,通过 PCR 扩增和电泳来检测猎物。1992 年,PCR 鉴定首次被用于棕熊的食性分析^[45],掀起了基于 PCR 鉴定的食性分析热潮。该方法可以定量分析动物的食性组分,但需要事先了解捕食者的潜在猎物,据此设计特异性 PCR 引物,不适用于取样量大的研究。基于序列鉴定是在 PCR 的基础上进行一代 Sanger 测序,通过一段或几段基因序列,来鉴定物种,从而确定动物的食性。该法具有干扰少,可获得性高、非损伤性取样、容易辨认等优点^[46],在野生动物的食性分析中有广泛的应用^[47]。此法也存在局限性,例如,该法取样为粪便,而粪便中的遗传物质极易受环境等因素的干扰产生降解,容易导致 PCR 扩增失败,或

者提取的 DNA 片段较短,从而影响结果的准确性,且在检测的过程中要使用专用的试剂盒进行操作,价格昂贵,工作量大^[48],这些因素都在一定程度制约了该方法的应用。

1.7 DNA 宏条形码技术

DNA 宏条形码技术是在测序技术高速发展的基础上快速兴起的食性分析新技术,也是传统粪便 DNA 技术的进一步拓展和延伸。该方法是以高通量测序技术为标准,通过获取生物特异性 DNA 条形码序列对生物进行物种识别和鉴定。其原理是通过通过对粪便、胃内容物、肠内容物等进行取样并提取 DNA,然后在聚合酶链式反应中使用通用引物进行 PCR 扩增,并使用高通量测序技术进行测序,以产生数千至数百万条 DNA 条形码,通过条形码进行物种鉴定,可以确定物种及其取食的范围,并评估总体生物多样性^[49]。它是一种跨学科的方法,将传统的生态学与深入的分子生物学方法及先进的计算工具有机结合,目前已被广泛运用到动物食性分析、生态环境监测、物种保护、资源管理、生物量估测、生态评估、入侵生物防护和治理等方面,在生物多样性研究领域中具有重要的作用^[50-56]。Egeter 等^[57]利用高通量测序技术对褐家鼠(*Rattus norvegicus*)、小鼠(*Mus musculus*)和普通刺猬(*Erinaceus europaeus*)摄食蛙的种类进行研究,发现与形态学显微分析相比,高通量测序技术将胃内容物中蛙的检测率从 2% 提升到 70%。Sonsthagen 等^[58]使用 DNA 宏条形码技术从太平洋海象粪便样本中识别到其潜在的重要猎物类群,为北极海象饮食变化提供了重要信息。杨雄威等^[59]用 DNA 宏条形码技术检测了华南野猪的食性,探讨了野猪食性与其肠道微生物的关系。DNA 宏条形码技术由于不受动物摄食种类的限制,可广泛用于脊椎动物和无脊椎动物、植食性动物、肉食性动物和杂食性动物的食性分析,该方法的出现将取代传统的粪便 DNA 分析方法,弥补一代测序方法的缺陷和不足,是目前应用最为广泛的食性分析技术。

2 DNA 宏条形码技术在动物食性分析中的应用

基于 DNA 宏条形码技术的动物食性分析基本流程为:样本采集、基本形态鉴定后对样本物种进行描述和记录→提取样本中食物残留 DNA→选择分辨率高且通用性好的 DNA 条形码引物进行基因片段的 PCR 扩增→高通量测序得到 DNA 序列→对数据进行整理、筛选、比对,并与相关的数据库进行比对→物种鉴定、统计→确定食性^[60]。在该流程中,DNA 提取多基于经典的 CTAB 法^[61],有时会采用商业试剂盒提取。对于 PCR 的目标基因,动物常用线粒体细胞色素 C 氧化酶 I 基因(COI)^[6]及部分 rDNA^[62],植物常用 ITS, *matK*, *trnH-psbA*, *rbcl*, *trnL* 等^[63-67],鉴定时常用两个或多个基因片段组合。测序时普遍采用 Roche 454 或 Illumina 等测序平台进行高通量测序,所得到的数据经过数据拆分、去引物序列、双末端序列(Paired-End Reads)拼接、标签序列的质量和长度过滤、截取等步骤,再去除嵌合体^[68],获得最终需要的序列,再基于该序列进行数据库比对、分析及物种鉴定^[69-71]。

DNA 宏条形码技术与其他动物食性分析方法相比,其研究对象更为广泛。既可用于脊椎动物的食性分析,也可用于无脊椎动物如水蛭、蜜蜂等动物的食性分析。该技术和以往的技术相比,最大的优势在于分析不受取样类型的限制。根据研究对象的不同,动物的摄食取样可为胃内容物、肠道内容物、花粉、血液、粪便、食团等(图 1),这里重点对不同取样类型的动物食性相关研究现状进行综述。

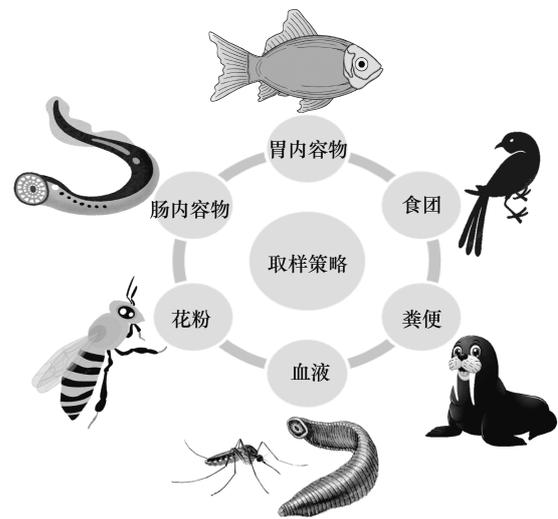


图 1 基于 DNA 宏条形码技术的动物食性分析常见取样策略
Fig.1 The commonly used sampling strategies for animal diet analysis based on DNA metabarcoding

2.1 胃内容物取样

在动物食性分析中,对胃内容物进行取样检测食性组成在鱼类中研究较多。Clarke 等^[62]使用 18S 核糖体 DNA 和 COI 基因通过高通量测序确定了四种蛇鼻鱼和一种深海鱼胃内容物的物种组成,发现前四种鱼以两足类、幼足类和桡足类动物为主食,而后一种鱼则以虹吸类动物为主食。五种鱼类的胃内容物中都存在腔肠动物和其他胶状猎物的 DNA,这表明,迄今为止,这些类群在低等鱼类饮食中的重要性被低估。该研究确定了中低等鱼类在海洋中的营养地位和作用,并为生态系统的功能研究提供了重要参考。孙鹏等^[72]利用 DNA 宏条形码技术分析不同龄组黑鲷的食性异同,在黑鲷胃内容物中鉴定出 41 属 62 种饵料生物,与传统食性分析方法相比,该法在黑鲷的食性分析中显示了较高的灵敏性。

2.2 肠内容物取样

与胃内容物取样相似,研究者也通过取样肠内容物作为动物食性分析的样本进行研究。例如,为了解白令海东部北极七鳃鳗的摄食情况,Shink 等^[73]采用肠道内容物对北极七鳃鳗的食物组成进行分析,通过 DNA 宏条形码技术鉴定了 10 个鳍刺鱼类群,首次报道了六个北极七鳃鳗的捕食类群。该研究证实了北极七鳃鳗是一种肉食性动物,并突显了基于肠道内容物取样的 DNA 宏条形码技术在动物食性分析相关研究中的应用价值。Brandl 等^[74]利用肠内容物 DNA 宏条形码技术检测了四种隐底栖礁鱼的食性,结果揭示了隐底栖礁鱼类物种之间强烈的生态分化由饮食结构、生理特点、猎物可获得性等因素共同驱动,该研究为基于肠内容物取样的 DNA 宏条形码食性分析提供了很好的范例。

2.3 花粉取样

随着人类对地球生态环境的干扰加剧,生态环境正面临着传粉者减少这一问题,加深对传粉者栖息地整个植物传粉网络的了解十分必要。通过对传粉昆虫身体或蜂蜜中的残余花粉取样,利用 DNA 宏条形码技术可以解析昆虫采蜜的种类和取食偏好。Galliot 等^[75]在春季对六个山区半天然草场中采集花粉、花蜜活跃的昆虫进行捕捉,并收集昆虫身体上携带的花粉,基于宏条形码技术,使用 ITS2 和 rDNA 序列对花粉所属植物物种进行鉴定。结果表明 82% 的昆虫携带花粉,44% 的昆虫携带两属以上植物的花粉。该研究表明以花粉为样本的 DNA 宏条形码可准确提供植物-昆虫网络信息。Milla 等^[76]利用 DNA 宏条形码技术探究了澳大利亚东部和西部六个生物区 15 份蜂蜜样本的花粉源,结果表明,基于花粉的 DNA 宏条形码技术是检测蜜源植物和蜜蜂饮食结构的一种强大而稳健的方法,对蜜蜂花卉资源的实时监测具有重要的应用价值。

2.4 血液取样

以吸血动物吸取的血液 DNA 为样本,基于 DNA 宏条形码技术对摄食物种进行检测,是一种新颖的取样监测方法。该方法可以收集很难获得的血液组织样本,特别适用于监测具有挑战性的陆生哺乳动物的生物多样性,具有广泛的应用前景。例如,对于胆小、昼伏夜出、具危险性或栖息在人难以接近的地方等难以监测的脊椎动物,Kent 和 Norris^[77]开发了一套基于脊椎动物特异性引物的宏条形码技术,用于鉴定蚊子野外采集血液的哺乳动物宿主。该方法可从一只蚊子身上检测出多种哺乳动物的血液,这种诊断分析方法极有价值,为基于血液的物种鉴定开启了研究的大门。蜱是蜱媒传染病的重要来源,有研究利用 DNA 宏条形码对野外采集的 61 只蜱的取食血液进行属级和种级鉴定,结果表明 DNA 宏条形码可作为一种有价值的、可靠的方法用于鉴别病媒中未知的血媒^[78]。此外,有研究表明哺乳动物的血液 DNA 在吸血水蛭的身体里大概可以保留 4 个月^[79],吸血陆生水蛭摄取的脊椎动物血液是一个可靠的物种多样性 DNA 来源,越来越多地被用于检测不同生境的生物多样性^[80-81]。

2.5 粪便取样

粪便取样是基于 DNA 宏条形码技术的动物食性分析使用最为广泛的取样方法。对野生动物或珍稀濒危动物而言,粪便取样是最适合的非损伤性取样方式,可在样本中提取到不同生物类型的 DNA,有效确定肉食性、植食性及杂食性动物的食性组成^[82]。粪便是否新鲜是 DNA 质量的关键,直接关系到 DNA 提取及 PCR 扩增效果。粪便的采集部位也是粪便 DNA 质量的影响因素,把粪便的核心、中层和最外层进行混合后物种的检

出率明显提高,特别是对于食入量少的动物^[83]。Erickson 等^[84]研究表明同一份粪便样本不用重复取样,样本间差异不显著。基于粪便取样的 DNA 宏条形码技术可为无法直接观察取食行为的动物食性分析提供新思路,在珍惜濒危动物的食性研究中有广泛的应用前景。Guillerault 等^[85]对欧洲鲶鱼(*Silurus glanis*)进行食性分析,经粪便 DNA 宏条形码鉴定出有 11 种鱼类是欧洲鲶鱼的猎物,表明该物种在生物多样性中伴有重要的角色,为物种的引入和保护提供了科学依据。陆琪等^[86]利用 DNA 宏条形码技术有效分析了四川卧龙保护区雪豹的食性,发现野生大型有蹄类动物是雪豹最主要的食物。刘刚等^[87]基于粪便取样,利用 DNA 宏条形码技术,对易危物种大鸨(*Otis tarda*)进行了食性分析,为保护部门有效保护和恢复大鸨栖息地提供了依据,同时为分子食性分析方法用于其他动物的觅食生态学研究提供了示范。

2.6 食团取样

尽管非损伤性粪便取样是目前使用最多的动物食性分析取样策略,但对某些动物并不适用。例如,在海鸟的栖居地,经常有大量的排泄物。通常情况下,海鸟不会产生固体状的粪便,而是喷出液体状的粪便,这使得采集一次完整性的粪便样本变得困难。鸟类经过漫长的演化而具有特定的消化系统,它们能够将食物不经过咀嚼囫圇吞下,但是骨骼、毛发等难以消化的东西,鸟类会以食团的方法将其吐出,而不像其它脊椎动物以粪便的方式排出。因此,鸟类吐出的食团就可作为分析他们食性的样本。Oehm 等^[88]对鸬鹚的食团、粪便及吐出的鱼类样本进行取样研究,发现从食团中获取到的物种信息最全面。相比之下,从粪便中获得的饮食信息最少,也最不稳定。Hacker 等^[89]对取自中国青藏高原的 45 个鸟类食团进行宏条形码分析,检测到了 4 种猛禽及 11 种猎物,该方法对其他猛禽具有广泛的适用性,并证实了基于食团取样的 DNA 宏条形码技术在非入侵式研究鸟类食性及生物多样性方面具有重要潜力。

3 动物食性分析在生态学中的常见应用

动物的摄食过程是生态系统中能量传递的基础,物种的食性关系是生态系统结构的重要组成部分^[90]。目前,鉴于 DNA 宏条形码技术灵敏性高、成本低、取样范围广等优点,其已被广泛用于脊椎动物和无脊椎动物的食性分析,能实现对入侵物种、濒危物种和稀有物种进行快速检测,对动物的生活习性和活动范围有更深入的了解,在生态学研究领域中发挥着重要的作用。

3.1 珍稀濒危动物保护

物种灭绝会导致生态系统失衡,食物链间的相互联系被打断。因此,及时分析珍稀濒危动物的食性对保护方案的设计尤为重要。对濒危或稀有动物而言,通过直接观测法获取其食性数据极为困难, DNA 宏条形码技术可以解决这一瓶颈,通过粪便取样和高通量测序可以快速获取这类物种的食性数据^[91-92],在珍惜濒危动物的保护研究中发挥着重要作用。

Quéméré 等^[93]用 DNA 宏条形码技术对濒危物种金冠狐猴(*Propithecus tattersalli*)进行食性分析,揭示了金冠狐猴的饮食结构和饮食多样性,为该物种的生态保护提供了理论依据;Gebremedhin 等^[94]利用 DNA 宏条形码技术通过粪便取样对埃塞俄比亚特有的珍稀濒危野山羊开展食性分析,发现其与家养山羊的饮食结构存在较大重叠,导致两物种间食物竞争,随着家养山羊数量的日益增多,对濒危的野山羊造成了严重威胁,可据此制定相关保护策略,对该物种进行重点保护;加州田鼠是北美最濒危的哺乳动物之一,田鼠对芦苇有强烈的营养依赖,芦苇是其首选的摄食种类。为此, Castle 等^[95]利用粪便 DNA 宏条形码方法对野生觅食田鼠的食物组成进行分析,以确定野生觅食田鼠的食性是否受植物物种多样性的影响,该研究有助于提高加州濒危田鼠保护计划的成功率,包括圈养繁殖和栖息地恢复;盲洞鳗(*Ophisternon candidum*)是澳大利亚西北部发现的一种稀有的地下水栖息物种, White 等^[96]利用宏条形码技术对该物种进行食性分析,有效地检测出其觅食行为和生活习性,为该物种的保护提供了重要依据;欧洲池龟是欧洲湿地的一种标志性淡水物种,在瑞士被列为极度濒危物种, Ducotterd 等^[97]对欧洲池龟的饮食进行了非损伤性粪便取样分析,结果表明该物种属于广谱的食植性动物,对生态环境中的其它物种不构成威胁,这为重新引入该物种的国家保护计划提供了生态安全依据。

由此可见,基于 DNA 宏条形码技术的动物食性分析在各国珍稀、濒危动物的物种监测和保护中发挥着重要的作用,在未来的发展中必不可缺。

3.2 生物多样性监测

受人类活动的影响,全球生物多样性已严重退化,其中以动物多样性衰退最为显著。物种的减少和灭绝在全球范围内不断加剧,这使得人类必须以更快、更科学、更精准的技术手段去认识自然和监测生物多样性。开展生物多样性调查,对制定生物保护和管理战略至关重要。传统的生物多样性调查耗时、费力,且往往不能监测到早期的外来入侵物种或警觉性高的动物种,而宏条形码技术的发展为可靠的生物多样性监测带来了新机遇^[98]。基于 DNA 宏条形码技术的动物食性分析是一种灵敏度高的方法,有潜力迅速评估当地的生物多样性和受威胁物种的状况^[99]。

物种组成和饮食信息数据可以帮助我们更好地理解研究区域的生态系统及食物网的结构和功能,对了解物种共存机制、保护生物多样性具有重要意义。邵昕宁等^[100]对四川甘孜藏族自治州新龙县和石渠县的野生食肉动物粪便样本进行采集,对其中的 7 种食肉动物进行了食性分析,结果显示该区域有豹猫 (*Prionailurus bengalensis*)、赤狐 (*Vulpes vulpes*) 两种中小型食肉动物,有狼、棕熊、豹等 5 种大型食肉动物。狼、狗、棕熊主要以偶蹄目动物为主要食物源,豹猫和赤狐主要以啮齿目和兔形目等小型哺乳动物为食,豹和雪豹则主要以偶蹄目动物为食。该研究突出了粪便 DNA 和宏条形码技术在食肉动物多样性调查及食性分析中的高效应用,为今后生物多样性调查和食物网研究提供了技术参考和指导。

基于无脊椎动物的食物 DNA 取样,利用 DNA 宏条形码技术进行分析,是调查脊椎动物物种多样性的一种高效方法。Abrams 等^[101]利用红外相机捕捉、DNA 宏条形码技术对水蛭的猎物进行哺乳动物多样性检测,结果表明,两种检测方法所得数据相同,对水蛭开展食性分析可作为研究和监测热带雨林哺乳动物物种多样性的有效手段,其精准性类似于红外相机捕捉,而高效率、低成本等优点更优于红外相机捕捉,可应用于野生动物种群管理的长期调查中。Lynggaard 等^[102]利用 Metabarcoding 技术对来自墨西哥和加拿大的 12 种水蛭开展了食性分析,检测出脊椎动物、无脊椎动物等多种类型的猎物,该研究表明淡水水蛭可作为动物生物多样性研究的重要监测工具。Ji 等^[103]利用 30468 只水蛭吸血的血液 DNA 来检测云南哀崂山保护区脊椎动物的多样性,展示了使用无脊椎动物衍生的 DNA 来评估自然保护区脊椎动物分布情况的可行性。

3.3 农业害虫防治

随着世界人口的日益增长,粮食紧缺的问题显著突出,增加粮食产量是解决问题的方法之一。粮食除了在种植和储存的过程有损失外,还受生物因素的影响,虫害对作物的损害是导致产量减少的生物因素之一^[104]。伴随着农业技术的改变和发展,农业害虫的种群分布和活动范围也在变化,这些都对害虫的监测和治理提出了新挑战^[105-106]。以农药为代表的化学防治,是消灭害虫最常用的方式,但大量采用化学防治会污染环境和农产品,生物防治则可以减少这些副作用。农业害虫的捕食性天敌可在农田、林区和农作物中有效控制害虫种群的发展和蔓延。自然界中农业害虫天敌种类多、分布广,对害虫的种类和数量具有控制作用,利用此性质对害虫进行防治是生物防治的重要组成部分^[107]。

通过 DNA 宏条形码技术厘清害虫与农作物的关系、天敌与猎物间的捕食关系并运用于害虫防控,是生物防治的代表,可最终确定自然害虫调节的关键生态驱动因素。基于 DNA 宏条形码的动物食性分析技术在农业害虫防治中的意义在于:第一,构建捕食性天敌的 DNA 宏条形码数据库,可以使人们快速、准确地进行天敌物种鉴定;第二,利用 DNA 宏条形码对捕食性天敌进行研究,可以快速鉴别隐存种、以及发育阶段不同的物种;第三,对天敌进行食性结构和活动区域的探索,有利于农业、林业、牧业等害虫的生物治理。钟文涛^[104]基于宏条形码技术对不同生境中拟环纹豹蛛的天然食性进行了分析,揭示了拟环纹豹蛛在生物害虫防控中的重要作用,为保蛛控虫提供了新的理论依据和科学信息。Sow 等^[108]利用宏条形码技术解析了拟寄生生物与作物害虫宿主的相互关系,结果表明宏条形码技术与传统饲养方法相结合,可更好地理解拟寄生生物与宿主间的相互关系,为经典生物防控技术的发展提供有效的物种信息。Cohen 等^[109]对常见的一种食虫蝙蝠

(*Pipistrelus kuhlii*) 进行食性分析,发现其食用 27 种害虫,这种蝙蝠提供了重要的害虫防控服务,在当地的农业生态系统中发挥着重要的作用。Whitby^[110] 等研究了美国玉米田间红蝙蝠 (*Lasiurus borealis*) 和大棕蝙蝠 (*Eptesicus fuscus*) 的饮食,证实了甲虫(鞘翅目)和飞蛾(鳞翅目)分别是大棕蝙蝠和红蝙蝠最常见的猎物,提出由于大棕蝙蝠和红蝙蝠的害虫防治服务并没有完全重叠,因此,要使蝙蝠的虫害防治服务呈现最大化,一个多样化的蝙蝠群落是必不可少的。

鸟类在许多农业生态系统中提供害虫控制服务,在其它生态系统中则有中性或负面的生态影响(损害)。Garfinkel^[111] 等以食虫鸟类对邻近伊利诺斯州草原的玉米和大豆作物的间接影响展开研究,通过宏条形码技术对鸟类的粪便 DNA 进行检测发现许多鸟类粪便样本中含有农业益虫节肢动物和已知玉米害虫的 DNA,但很少有大豆害虫的 DNA,该研究首次证明了鸟类可以为玉米田提供大量的、有经济价值的服务(玉米害虫防控),但间接对大豆作物造成损害。该研究从食性分析的角度证实了鸟类对农业生态系统的双重影响。

4 小结与展望

采用 DNA 宏条形码技术对动物食性进行分析可以基于条形码设计通用引物,对较短的、易降解的 DNA 片段扩增和测序,对样品的要求较低,取样方式多样;通过序列的种类数与序列的相对丰度可分别实现物种种类定性和半定量分析^[112],所得数据准确性高,平台间可共享数据结果,具有高通量、高灵敏度、高效、低样本量要求等优点^[113]。据中国学者对 1996—2019 年间基于 DNA 分子生物学食性研究领域的最新文献统计分析,发现 2014 年以后,基于 DNA 宏条形码技术的食性分析迎来了高速发展期,研究规模和范围也不断扩大,在生物多样性监测、濒危物种保护及农业害虫防治等分子生态研究领域发展中发展活跃^[114]。DNA 宏条形码技术有时也会与稳定同位素技术相结合,取长补短,前者反映动物短期的摄食情况,后者反映动物长期的摄食情况,共同用于生物群落中复杂食物网及营养动力学研究^[115]。然而,受生物和技术因素影响,该方法仍存在一定的局限性:(1)生物因素。受动物消化过程的影响,样品组织在不同局部检测出的物种数目可能存在差别。此外,在取样和样本处理等过程中,会存在交叉污染或引入污染等问题,在后续高通量测序中形成干扰^[116];(2)技术因素。对于 DNA 严重降解的样品,PCR 扩增失败率高,从而影响物种的检出率^[117]。此外,在动物食性分析中,目标 DNA 有时种类繁多,通用引物对某些物种可能会失灵,在片段扩增时会导致数据丢失或失真等情况,从而影响结果的完整性。对于研究较少的自然区域,可能存在较多未知物种,当地物种的数据库往往匮乏或不全,从而影响物种鉴定^[113],这些技术方面的因素均会影响宏条形码对动物食性分析的准确性。

目前,DNA 宏条形码技术仍是分子生态学领域动物食性分析相关研究中最常用的技术,鉴于其显著的优势和不断发展完善,该技术现有的一些缺陷和瓶颈很可能会得到解决,在未来十年内持续保持迅猛的发展势头^[54]。随着测序技术的快速发展,新的三代长读长测序仪器,如太平洋生物科学 Sequel 平台,可以通过长高保真的 DNA 条形码提高物种的分类分辨率^[118-119]。三代长读长纳米孔测序设备由于成本低,移动便携,也越来越受欢迎。由牛津纳米孔技术公司(ONT)生产的便携式 DNA 三代测序仪(MinION)已被用于细菌^[121]、蓝藻^[122]、真菌^[123]、病毒^[124]、节肢动物^[125]等生物物种的快速检测和分析,在生态监测、物种多样性评估、临床诊断、群落系统发育结构研究中开始崭露头角,但在动物、植物等高等真核生物中的研究还相对较少^[126]。Menegon 等^[120]基于 MinION 测序仪搭建了野外便携式物种 DNA 检测实验室并模拟热带环境检测其 DNA 条形码研究性能,发现其可以准确识别两栖类、爬行类及哺乳动物等不同的脊椎动物物种,为野外快速开展 DNA 条形码研究开辟了新思路^[120]。Pomerantz 等在厄瓜多尔乔科奥雨林这一生物多样性热点地区测试了基于 MinION 测序仪的实时 DNA 条形码技术在生物物种鉴定中的可行性,结果表明纳米孔测序可以快速准确地识别物种,是快速和便携式 DNA 条形码的一种经济有效方法,为加速边远地区生物多样性的研究和保护带来新希望^[127]。Baloglu 等^[128]对纳米孔测序用于 DNA 宏条形码技术的可行性进行了研究,结果表明在提高测序准确率后,纳米孔测序可以用于宏条形码分析,这为宏条形码技术的测序方式提供了新选择。Semmour 等^[129]利用基于三代纳米孔测序的 DNA 宏条形码技术研究了比利时北海部分区域的浮游动物群落组成,证

明该方法可以高分辨地检测浮游动物。尽管三代测序技术在过去十年内发展迅猛,但目前基于三代测序的物种鉴定大多还需要 PCR 这一环节,基于三代测序的 DNA 宏条形码技术也刚出现,其准确性还有待在各个生物类群中检验。随着科学家们对三代测序技术的不断改进及数据分析处理软件的不革新,相信基于三代测序无 PCR 扩增的 DNA 宏条形码技术必将能实现,目前 PCR 这一环节所存在的问题便会引刃而解,基于该技术的动物食性分析也将在生态学各研究领域持续发光发热,期待更多的科学家将其充分利用,探索更多深奥且富有意义的自然科学问题。

参考文献(References):

- [1] Duffy J E, Cardinale B J, France K E, McIntyre P B, Thébault E, Loreau M. The functional role of biodiversity in ecosystems: incorporating trophic complexity. *Ecology Letters*, 2007, 10(6): 522-538.
- [2] Sheppard S K, Harwood J D. Advances in molecular ecology: tracking trophic links through predator-prey food-webs. *Functional Ecology*, 2005, 19(5): 751-762.
- [3] 铁军. 神农架川金丝猴 (*Rhinopithecus Roxellana*) 栖息地植物构成和食源植物评价研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2009.
- [4] 颜亨梅, 钟文涛. 动物捕食性天敌摄食分析方法的研究进展. *生命科学研究*, 2021, 25(01): 1-8.
- [5] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, deWaard J R. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2003, 270(1512): 313-321.
- [6] Hebert P D N, Ratnasingham S, De Waard J R. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2003, 270(S1): S96-S99.
- [7] 张洪海. 食肉动物食性研究方法评价. *东北林业大学学报*, 1999, 27(4): 53-56.
- [8] 李学友, 杨士剑, 杨洋. 灵长类动物食性研究的主要方法及其评价. *林业调查规划*, 2007, 32(5): 23-27.
- [9] 尹华宝, 余冠军, 王贵林, 周友兵, 武梅梅. 食肉目动物食性研究方法. *安徽大学学报: 自然科学版*, 2008, 32(1): 90-94.
- [10] 郑生武, 皮南林. 马麝的生态研究. *动物学报*, 1979, 25(2): 176-186.
- [11] 司晓艳, 赵天飙, 毛永强, 毕俊怀, 战永波. 食草动物食性研究方法的评价. *医学动物防制*, 2007, 23(12): 957-959.
- [12] 郑荣泉, 鲍毅新. 有蹄类食性研究方法及其研究进展. *生态学报*, 2004, 24(7): 1532-1539.
- [13] 雍仲禹, 郭聪, 张美文, 王勇, 李波. 啮齿动物食性研究的意义及方法评述. *生态学杂志*, 2011, 30(11): 2637-2645.
- [14] Wallmo O C, Gill R B, Carpenter L H, Reichert D W. Accuracy of field estimates of deer food habits. *The Journal of Wildlife Management*, 1973, 37(4): 556-562.
- [15] 滕丽微, 刘振生, 宋延龄, 李善元, 符明利. 海南大田国家级自然保护区赤鹿的食性. *动物学报*, 2004, 50(4): 511-518.
- [16] 刘燕. 内蒙古中部蒙古野驴 (*Equus hemionus hemionus*) 食性与繁殖行为研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2016.
- [17] 侯楚, 尚国珍, 吴学琴, 曹伊凡, 陈家辉, 边疆晖. 高原鼠兔胃与结肠内容物食性分析方法的比较. *兽类学报*, 2019, 39(6): 662-669.
- [18] Anthony R G, Smith N S. Comparison of rumen and fecal analysis to describe deer diets. *The Journal of Wildlife Management*, 1974, 38(3): 535-540.
- [19] 武正军, 李义明, 王彦平. 洗胃法与剖胃法在四种蛙食性分析中的对比. *动物学报*, 2007, 53(2): 364-372.
- [20] 欧善华, 盛和林, 陆厚基. 黑鹿和毛冠鹿的食性. *上海师范学院学报: 自然科学版*, 1981, (1): 111-115.
- [21] 宋延龄, 巩会生, 曾治高, 王学志, 朱乐, 赵纳勋. 鬃羚食性的研究. *动物学杂志*, 2005, 40(5): 50-56.
- [22] 周宏力, 张晓岚. 大、小兴安岭松鼠的食性. *东北林业大学学报*, 2003, 31(03): 44-46.
- [23] 娜日苏, 苏和, 武晓东, 格根图. 放牧制度对五趾跳鼠食性的影响. *中国草地学报*, 2009, 31(4): 116-120.
- [24] Wang J Z, Lin G H, Huang J H, Han X G. Applications of stable isotopes to study plant-animal relationships in terrestrial ecosystems. *Chinese Science Bulletin*, 2004, 49(22): 2339-2347.
- [25] 李云凯, 贡艺, 陈新军. 稳定同位素技术在头足类摄食生态学中的应用. *应用生态学报*, 2014, 25(5): 1541-1546.
- [26] 孙明, 王彬, 李玉龙, 王爱勇, 董婧, 麻天宇, 班艳丽. 基于碳氮稳定同位素技术研究辽东湾海蜇的食性和营养级. *应用生态学报*, 2016, 27(4): 1103-1108.
- [27] 高世科, 于雯雯, 张硕. 基于稳定同位素方法的吕泗渔场近岸海域夏季主要生物营养级. *应用生态学报*, 2020, 31(1): 301-308.
- [28] 易现峰, 张晓爱. 稳定性同位素技术在生态学上的应用. *生态学杂志*, 2005, 24(3): 306-314.
- [29] Touzeau A, Amiot R, Blichert-Toft J, Flandrois J P, Fourel F, Grossi V, Martineau F, Richardin P, Lécuyer C. Diet of ancient Egyptians inferred from stable isotope systematics. *Journal of Archaeological Science*, 2014, 46: 114-124.
- [30] Martineau C, Vincent W F, Frenette J J, Dodson J J. Primary consumers and particulate organic matter: isotopic evidence of strong selectivity in

- the estuarine transition zone. *Limnology and Oceanography*, 2004, 49(5): 1679-1686.
- [31] Halley D J, Minagawa M. African buffalo diet in a woodland and bush-dominated biome as determined by stable isotope analysis. *African Zoology*, 2005, 40(1): 160-163.
- [32] 刘贵河, 王国杰, 汪诗平, 韩建国, 宛新荣, 郝树广. 内蒙古荒漠草原主要草食动物食性及其营养生态位. *生态学报*, 2013, 33(3): 856-866.
- [33] Feranec R S, MacFadden B J. Evolution of the grazing niche in Pleistocene mammals from Florida: evidence from stable isotopes. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 2000, 162(1-2): 155-169.
- [34] Sponheimer M, Robinson T, Ayliffe L, Passey B, Roeder B, Shipley L, Lopez E, Cerling T, Dearing D, Ehleringer J. An experimental study of carbon-isotope fractionation between diet, hair, and feces of mammalian herbivores. *Canadian Journal of Zoology*, 2003, 81(5): 871-876.
- [35] 曹伊凡, 林恭华, 卢学峰, 苏建平. 柯氏鼠兔的食性分析. *动物学杂志*, 2009, 44(1): 58-62.
- [36] Voth E H, Maser C, Johnson M L. Food habits of *Arborimus albipes*, the white-footed, in Oregon. *Northwest Science*, 1983, 57(1): 1-7.
- [37] Arceo G, Mandujano S, Gallina S, Perez-Jimenez L A. Diet diversity of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in a tropical dry forest in Mexico. *Mammalia*, 2005, 69(2): 159-168.
- [38] 曹伊凡, 苏建平, 连新明, 张同作, 崔庆虎. 可可西里自然保护区藏羚羊的食性分析. *兽类学报*, 2008, 28(1): 14-19.
- [39] 单继红, 吴建平. 食草动物食性研究的主要方法及其评价. *野生动物杂志*, 2005, 26(3): 47-49.
- [40] 吴建平, 单继红, 王志平. 小兴安岭通河林区斑羚冬季食性分析. *动物学杂志*, 2005, 40(4): 40-44.
- [41] Westoby M, Rost G R, Weis J A. Problems with estimating herbivore diets by microscopically identifying plant fragments from stomachs. *Journal of Mammalogy*, 1976, 57(1): 167-172.
- [42] Vavra M, Holeček J L. Factors influencing microhistological analysis of herbivore diets. *Journal of Range Management*, 1980, 33(5): 371-374.
- [43] Monro R H. An appraisal of some techniques used to investigate the feeding ecology of large herbivores with reference to a study on impala in the northern Transvaal. *African Journal of Ecology*, 1982, 20(2): 71-80.
- [44] Traugott M, Kamenova S, Ruess L, Seeber J, Plantegenest M. Chapter three-empirically characterising trophic networks: what emerging DNA-based methods, stable isotope and fatty acid analyses can offer. *Advances in Ecological Research*, 2013, 49: 177-224.
- [45] Höss M, Kohn M, Pääbo S, Knauer F, Schröder W. Excrement analysis by PCR. *Nature*, 1992, 359(6392): 199.
- [46] 魏辅文, 饶刚, 李明, 方盛国, 冯祚建. 分子粪便学及其应用—可靠性、局限性和展望. *兽类学报*, 2001, 21(2): 143-152.
- [47] 黄乃莹, 刘艳华. 分子粪便学在野生动物食性研究中的应用. *野生动物学报*, 2022, 43(1): 266-269.
- [48] Vallet D, Petit E J, Gatti S, Levréro F, Ménard N. A new 2CTAB/PCI method improves DNA amplification success from faeces of Mediterranean (Barbary macaques) and tropical (lowland gorillas) primates. *Conservation Genetics*, 2008, 9(2): 677-680.
- [49] Pérez-Burillo J, Trobajo R, Vasselon V, Rimet F, Bouchez A, Mann D G. Evaluation and sensitivity analysis of diatom DNA metabarcoding for WFD bioassessment of mediterranean rivers. *Science of the Total Environment*, 2020, 727: 138445.
- [50] Valentini A, Pompanon F, Taberlet P. DNA barcoding for ecologists. *Trends in Ecology & Evolution*, 2009, 24(2): 110-117.
- [51] Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Brochmann C, Willerslev E. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 2012, 21(8): 2045-2050.
- [52] Ji Y Q, Ashton L, Pedley S M, Edwards D P, Tang Y, Nakamura A, Kitching R, Dolman P M, Woodcock P, Edwards F A, Larsen T H, Hsu W W, Benedick S, Hamer K C, Wilcove D S, Bruce C, Wang X Y, Levi T, Lott M, Emerson B C, Yu D W. Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. *Ecology Letters*, 2013, 16(10): 1245-1257.
- [53] Bohmann K, Evans A, Gilbert M T P, Carvalho G R, Creer S, Knapp M, Yu D W, de Bruyn M. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution*, 2014, 29(6): 358-367.
- [54] Ruppert K M, Kline R J, Rahman M S. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: a systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation*, 2019, 17: e00547.
- [55] 罗亚皇, 刘杰, 高连明, 李德铎. DNA 条形码在生态学研究中的应用与展望. *植物分类与资源学报*, 2013, 35(6): 761-768.
- [56] 裴男才, 陈步峰. 生物 DNA 条形码: 十年发展历程、研究尺度和功能. *生物多样性*, 2013, 21(5): 616-627.
- [57] Egeter B, Bishop P J, Robertson B C. Detecting frogs as prey in the diets of introduced mammals: a comparison between morphological and DNA-based diet analyses. *Molecular Ecology Resources*, 2015, 15(2): 306-316.
- [58] Sonsthagen S A, Jay C V, Cormman R S, Fischbach A S, Grebmeier J M, Talbot S L. DNA metabarcoding of feces to infer summer diet of Pacific walrus. *Marine Mammal Science*, 2020, 36(4): 1196-1211.
- [59] 杨雄威. 华南野猪 (*Sus scrofa chirodontus*) 的食性和肠道微生物多样性初步研究[D]. 贵阳: 贵州大学, 2021.
- [60] Pompanon F, Deagle B E, Symondson W O C, Brown D S, Jarman S N, Taberlet P. Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. *Molecular Ecology*, 2012, 21(8): 1931-1950.

- [61] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 1987, 19(1): 11-15.
- [62] Clarke L J, Trebilco R, Walters A, Polanowski A M, Deagle B E. DNA-based diet analysis of mesopelagic fish from the southern Kerguelen axis. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 2020, 174: 104494.
- [63] China Plant BOL Group, Li D Z, Gao L M, Li H T, Wang H, Ge X J, Liu J Q, Chen Z D, Zhou S L, Chen S L, Yang J B, Fu C X, Zeng C X, Yan H F, Zhu Y J, Sun Y S, Chen S Y, Zhao L, Wang K, Yang T, Duan G W. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(49): 19641-19646.
- [64] 高连明, 刘杰, 蔡杰, 杨俊波, 张挺, 李德铢. 关于植物 DNA 条形码研究技术规范. *植物分类与资源学报*, 2012, 34(6): 592-606.
- [65] García-Robledo C, Erickson D L, Staines C L, Erwin T L, Kress W J. Tropical plant-herbivore networks: reconstructing species interactions using DNA barcodes. *PLoS One*, 2013, 8(1): e52967.
- [66] Kajtoch Ł, Kubisz D, Heise W, Mazur M A, Babik W. Plant-herbivorous beetle networks: molecular characterization of trophic ecology within a threatened Steppic environment. *Molecular Ecology*, 2015, 24(15): 4023-4038.
- [67] Sullins D S, Haukos D A, Craine J M, Lautenbach J M, Robinson S G, Lautenbach J D, Kraft J D, Plumb R T, Reitz J H, Sandercock B K, Fierer N. Identifying the diet of a declining prairie grouse using DNA metabarcoding. *The Auk*, 2018, 135(3): 583-608.
- [68] Quince C, Lanzen A, Davenport R J, Turnbaugh P J. Removing noise from pyrosequenced amplicons. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12: 38.
- [69] Shehzad W, Riaz T, Nawaz M A, Miquel C, Poillot C, Shah S A, Pompanon F, Coissac E, Taberlet P. Carnivore diet analysis based on next-generation sequencing: application to the leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) in Pakistan. *Molecular Ecology*, 2012, 21(8): 1951-1965.
- [70] Kartzinel T R, Pringle R M. Molecular detection of invertebrate prey in vertebrate diets: trophic ecology of Caribbean island lizards. *Molecular Ecology Resources*, 2015, 15(4): 903-914.
- [71] 周天成, 胡思敏, 林先智, 刘胜, 黄晖. 基于 18S rDNA 条形码技术的珊瑚礁区塔形马蹄螺 (*Tectus pyramis*) 食性分析. *海洋科学*, 2020, 44(2): 99-107.
- [72] 孙鹏, 凌建忠, 张辉, 唐保军, 姜亚洲. 基于高通量测序的象山港海域黑鲷 (*Acanthopagrus schlegelii*) 食性分析. *生态学报*, 2021, 41(3): 1221-1228.
- [73] Shink K G, Sutton T M, Murphy J M, López J A. Utilizing DNA metabarcoding to characterize the diet of marine-phase Arctic lamprey (*Lethenteron camtschaticum*) in the eastern Bering Sea. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2019, 76(11): 1993-2002.
- [74] Brandl S J, Casey J M, Meyer C P. Dietary and habitat niche partitioning in congeneric cryptobenthic reef fish species. *Coral Reefs*, 2020, 39(2): 305-317.
- [75] Galliot J N, Brunel D, Bérard A, Chauveau A, Blanchetête A, Lanore L, Farruggia A. Investigating a flower-insect forager network in a mountain grassland community using pollen DNA barcoding. *Journal of Insect Conservation*, 2017, 21(5): 827-837.
- [76] Milla L, Sniderman K, Lines R, Mousavi-Derazmahalleh M, Encinas-Viso F. Pollen DNA metabarcoding identifies regional provenance and high plant diversity in Australian honey. *Ecology and Evolution*, 2021, 11(13): 8683-8698.
- [77] Kent R J, Norris D E. Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by a multiplexed polymerase chain reaction targeting cytochrome B. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2005, 73(2): 336-342.
- [78] Garipey T D, Lindsay R, Ogden N, Gregory T R. Identifying the last supper: utility of the DNA barcode library for bloodmeal identification in ticks. *Molecular Ecology Resources*, 2012, 12(4): 646-652.
- [79] Schnell I B, Thomsen P F, Wilkinson N, Rasmussen M, Jensen L R D, Willerslev E, Bertelsen M F, Gilbert M T P. Screening mammal biodiversity using DNA from leeches. *Current Biology*, 2012, 22(8): R262-R263.
- [80] Schnell I B, Bohmann K, Schultze S E, Richter S R, Murray D C, Sinding M H S, Bass D, Cadle J E, Campbell M J, Dolch R, Edwards D P, Gray T N E, Hansen T, Hoa A N Q, Noer C L, Heise-Pavlov S, Pedersen A F S, Ramamonjisoa J C, Siddall M E, Tilker A, Traeholt C, Wilkinson N, Woodcock P, Yu D W, Bertelsen M F, Bunce M, Gilbert M T P. Debugging diversity—a pan-continental exploration of the potential of terrestrial blood-feeding leeches as a vertebrate monitoring tool. *Molecular Ecology Resources*, 2018, 18(6): 1282-1298.
- [81] Drinkwater R, Jucker T, Potter J H T, Swinfield T, Coomes D A, Slade E M, Gilbert M T P, Lewis O T, Bernard H, Struebig M J, Clare E L, Rossiter S J. Leech blood-meal invertebrate-derived DNA reveals differences in Bornean mammal diversity across habitats. *Molecular Ecology*, 2021, 30(13): 3299-3312.
- [82] Waits L P, Paetkau D. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *The Journal of Wildlife Management*, 2005, 69(4): 1419-1433.
- [83] 刘刚, 宁宇, 夏晓飞, 龚明昊. 高通量测序技术在野生动物食性分析中的应用. *生态学报*, 2018, 38(9): 3347-3356.
- [84] Erickson D L, Reed E, Ramachandran P, Bourg N A, McShea W J, Ottesen A. Reconstructing a herbivore's diet using a novel *rbcL* DNA mini-barcode for plants. *AoB Plants*, 2017, 9(3): plx015.

- [85] Guilleraut N, Bouletreau S, Iribar A, Valentini A, Santoul F. Application of DNA metabarcoding on faeces to identify European catfish *Silurus glanis* diet. *Journal of Fish Biology*, 2017, 90(5): 2214-2219.
- [86] 陆琪, 胡强, 施小刚, 金森龙, 李晟, 姚蒙. 基于分子宏条形码分析四川卧龙国家级自然保护区雪豹的食性. *生物多样性*, 2019, 27(9): 960-969.
- [87] 刘刚, 李皓, 吴自有, 李惠鑫, 文菀玉, 周景英, 魏秀宏, 岳伟, 白洁, 钱英, 龚明昊. 基于 DNA 条形码分析大鸨繁殖期动物性食物. *动物学杂志*, 2021, 56(3): 405-416.
- [88] Oehm J, Thalinger B, Eisenkölbl S, Traugott M. Diet analysis in piscivorous birds: what can the addition of molecular tools offer? *Ecology and Evolution*, 2017, 7(6): 1984-1995.
- [89] Hacker C E, Hoening B D, Wu L J, Cong W, Yu J J, Dai Y C, Li Y, Li J, Xue Y D, Zhang Y, Ji Y R, Cao H N, Li D Q, Zhang Y G, Janecka J E. Use of DNA metabarcoding of bird pellets in understanding raptor diet on the Qinghai-Tibetan Plateau of China. *Avian Research*, 2021, 12(1): 42.
- [90] 张宝琳, 孙道元, 吴耀泉. 灵山岛浅海岩礁区刺参 (*Apostichopus japonicus*) 食性初步分析. *海洋科学*, 1995, (3): 11-13.
- [91] Kajtoch Ł. A DNA metabarcoding study of a polyphagous beetle dietary diversity: the utility of barcodes and sequencing techniques. *Folia Biologica: Kraków*, 2014, 62(3): 223-234.
- [92] Srivathsan A, Ang A, Vogler A P, Meier R. Fecal metagenomics for the simultaneous assessment of diet, parasites, and population genetics of an understudied primate. *Frontiers in Zoology*, 2016, 13: 17.
- [93] Quéméré E, Hibert F, Miquel C, Lhuillier E, Rasolondraibe E, Champeau J, Rabarivola C, Nusbaumer L, Chatelain C, Gautier L, Ranirison P, Crouau-Roy B, Taberlet P, Chikhi L. A DNA metabarcoding study of a primate dietary diversity and plasticity across its entire fragmented range. *PLoS One*, 2013, 8(3): e58971.
- [94] Gebremedhin B, Flagstad Ø, Bekele A, Chala D, Bakkestuen V, Boessenkool S, Popp M, Gussarova G, Schröder-Nielsen A, Nemomissa S, Brochmann C, Stenseth N C, Epp L S. DNA metabarcoding reveals diet overlap between the endangered walia ibex and domestic goats-implications for conservation. *PLoS One*, 2016, 11(7): e0159133.
- [95] Castle S T, Allan N, Clifford D, Aylward C M, Ramsey J, Fascetti A J, Pesapane R, Roy A, Statham M, Sacks B, Foley J. Diet composition analysis provides new management insights for a highly specialized endangered small mammal. *PLoS One*, 2020, 15(10): e0240136.
- [96] White N E, Guzik M T, Austin A D, Moore G I, Humphreys W F, Alexander J, Bunce M. Detection of the rare Australian endemic blind cave eel (*Ophisternon candidum*) with environmental DNA: implications for threatened species management in subterranean environments. *Hydrobiologia*, 2020, 847(15): 3201-3211.
- [97] Ducotterd C, Crovadore J, Lefort F, Guisan A, Ursenbacher S, Rubin J F. The feeding behaviour of the European pond turtle (*Emys orbicularis*, L. 1758) is not a threat for other endangered species. *Global Ecology and Conservation*, 2020, 23: e01133.
- [98] Suarez-Mendez M, Planes S, Garcia-Vazquez E, Ardura A. Early alert of biological risk in a coastal lagoon through eDNA metabarcoding. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2020, 8: 9.
- [99] Lopes C M, De Barba M, Boyer F, Mercier C, Galiano D, Kubiak B B, Maestri R, da Silva Filho P J S, Gielly L, Coissac E, de Freitas T R O, Taberlet P. Ecological specialization and niche overlap of subterranean rodents inferred from DNA metabarcoding diet analysis. *Molecular Ecology*, 2020, 29(16): 3143-3153.
- [100] 邵昕宁, 宋大昭, 黄巧雯, 李晟, 姚蒙. 基于粪便 DNA 及宏条形码技术的食肉动物快速调查及食性分析. *生物多样性*, 2019, 27(5): 543-556.
- [101] Abrams J F, Hørig L A, Brozovic R, Axtner J, Crampton-Platt A, Mohamed A, Wong S T, Sollmann R, Yu D W, Wilting A. Shifting up a gear with iDNA: from mammal detection events to standardised surveys. *Journal of Applied Ecology*, 2019, 56(7): 1637-1648.
- [102] Lynggaard C, Ocegüera-Figueroa A, Kvist S, Gilbert M T P, Bohmann K. The potential of aquatic bloodfeeding and nonbloodfeeding leeches as a tool for iDNA characterisation. *Molecular Ecology Resources*, 2022, 22(2): 539-553.
- [103] Ji Y Q, Baker C C M, Popescu V D, Wang J X, Wu C Y, Wang Z Y, Li Y H, Wang L, Hua C L, Yang Z X, Yang C Y, Xu C C Y, Diana A, Wen Q Z, Pierce N E, Yu D W. Measuring protected-area effectiveness using vertebrate distributions from leech iDNA. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 1555.
- [104] 钟文涛. 基于分子生物技术的狼蛛摄食分析及控虫效能评价[D]. 长沙: 湖南师范大学, 2019.
- [105] 汪恩国, 刘伟明. 水稻“双季”改“单季”害虫种群数量变动规律与数学模型研究. *农学报*, 2014, 4(3): 14-19, 38-38.
- [106] 曾娟, 杜永均, 姜玉英, 刘万才. 我国农业害虫性诱监测技术的开发和应用. *植物保护*, 2015, 41(4): 9-15, 45-45.
- [107] 白茜茜. DNA 条形码在环京津捕食性天敌昆虫物种界定中的应用[D]. 保定: 河北大学, 2018.
- [108] Sow A, Brévault T, Benoit L, Chapuis M P, Galan M, Coeur d'acier A, Delvare G, Sembène M, Haran J. Deciphering host-parasitoid interactions and parasitism rates of crop pests using DNA metabarcoding. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 3646.

- [109] Cohen Y, Bar-David S, Nielsen M, Bohmann K, Korine C. An appetite for pests; synanthropic insectivorous bats exploit cotton pest irruptions and consume various deleterious arthropods. *Molecular Ecology*, 2020, 29(6): 1185-1198.
- [110] Whitby M D, Kieran T J, Glenn T C, Allen C. Agricultural pests consumed by common bat species in the United States corn belt; the importance of DNA primer choice. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 2020, 303: 107105.
- [111] Garfinkel M B, Minor E S, Whelan C J. Birds suppress pests in corn but release them in soybean crops within a mixed prairie/agriculture system. *The Condor*, 2020, 122(2): duaa009.
- [112] Clare E L. Molecular detection of trophic interactions; emerging trends, distinct advantages, significant considerations and conservation applications. *Evolutionary Applications*, 2014, 7(9): 1144-1157.
- [113] 王雪芹, 王光华, 乔飞, 高其康, Heong K L, 祝增荣, 程家安. 高通量测序及其在食物网解析中的应用进展. *生态学报*, 2017, 37(8): 2530-2539.
- [114] 张宇洋, 董建宇, 孙昕, 张秀梅. 基于 DNA 分子生物学食性研究领域的文献计量分析. *水产科学*, 2022, 41(1): 160-172.
- [115] Hambäck P A, Weingartner E, Dalén L, Wirta H, Roslin T. Spatial subsidies in spider diets vary with shoreline structure: complementary evidence from molecular diet analysis and stable isotopes. *Ecology and Evolution*, 2016, 6(23): 8431-8439.
- [116] 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.
- [117] Brandon-Mong G J, Gan H M, Sing K W, Lee P S, Lim P E, Wilson J J. DNA metabarcoding of insects and allies: an evaluation of primers and pipelines. *Bulletin of Entomological Research*, 2015, 105(6): 717-727.
- [118] Heeger F, Bourne E C, Baschien C, Yurkov A, Bunk B, Spröer C, Overmann J, Mazzoni C J, Monaghan M T. Long-read DNA metabarcoding of ribosomal RNA in the analysis of fungi from aquatic environments. *Molecular Ecology Resources*, 2018, 18(6): 1500-1514.
- [119] Tedersoo L, Tooming-Klunderud A, Anslan S. PacBio metabarcoding of Fungi and other eukaryotes: errors, biases, and perspectives. *New Phytologist*, 2018, 217(3): 1370-1385.
- [120] Menegon M, Cantaloni C, Rodriguez-Prieto A, Centomo C, Abdelfattah A, Rossato M, Bernardi M, Xumerle L, Loader S, Delledonne M. On site DNA barcoding by nanopore sequencing. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0184741.
- [121] Kerkhof L J, Dillon K P, Häggblom M M, McGuinness L R. Profiling bacterial communities by MinION sequencing of ribosomal operons. *Microbiome*, 2017, 5(1): 116.
- [122] Curren E, Yoshida T, Kuwahara V S, Leong S C Y. Rapid profiling of tropical marine cyanobacterial communities. *Regional Studies in Marine Science*, 2019, 25: 100485.
- [123] Wurzbacher C, Larsson E, Bengtsson-Palme J, Van den Wyngaert S, Svantesson S, Kristiansson E, Kagami M, Nilsson R H. Introducing ribosomal tandem repeat barcoding for fungi. *Molecular Ecology Resources*, 2019, 19(1): 118-127.
- [124] Butt S L, Taylor T L, Volkening J D, Dimitrov K M, Williams-Coplin D, Lahmers K K, Miller P J, Rana A M, Suarez D L, Afonso C L, Stanton J B. Rapid virulence prediction and identification of Newcastle disease virus genotypes using third-generation sequencing. *Virology Journal*, 2018, 15(1): 179.
- [125] Krehenwinkel H, Pomerantz A, Henderson J B, Kennedy S R, Lim J Y, Swamy V, Shoobridge J D, Graham N, Patel N H, Gillespie R G, Prost S. Nanopore sequencing of long ribosomal DNA amplicons enables portable and simple biodiversity assessments with high phylogenetic resolution across broad taxonomic scale. *GigaScience*, 2019, 8(5): giz006.
- [126] Krehenwinkel H, Pomerantz A, Prost S. Genetic biomonitoring and biodiversity assessment using portable sequencing technologies; current uses and future directions. *Genes*, 2019, 10(11): 858.
- [127] Pomerantz A, Peñafiel N, Arteaga A, Bustamante L, Pichardo F, Coloma L A, Barrio-Amoros C L, Salazar-Valenzuela D, Prost S. Real-time DNA barcoding in a rainforest using nanopore sequencing: opportunities for rapid biodiversity assessments and local capacity building. *GigaScience*, 2018, 7(4): giy033.
- [128] Baloğlu B, Chen Z W, Elbrecht V, Braukmann T, MacDonald S, Steinke D. A workflow for accurate metabarcoding using nanopore MinION sequencing. *Methods in Ecology and Evolution*, 2021, 12(5): 794-804.
- [129] Semmouri I, De Schampheleere K A C, Willems S, Vandegheuchte M B, Janssen C R, Asselman J. Metabarcoding reveals hidden species and improves identification of marine zooplankton communities in the North Sea. *ICES Journal of Marine Science*, 2021, 78(9): 3411-3427.