DOI: 10.20103/j.stxb.202210152929
肖泽华, 董姗姗, 张振华,章嫡妮, 宋志平.环境 DNA 在两栖动物监测中的应用研究进展.生态学报,2023,43(19):7861-7873.
Xiao Z H, Dong S S, Zhang Z H, Zhang D N, Song Z P.Advances in the application of environmental DNA in amphibians monitoring.Acta Ecologica Sinica,2023,43(19):7861-7873.

环境 DNA 在两栖动物监测中的应用研究进展

肖泽华[1,2], 董姗姗[1,*], 张振华[1],章嫡妮[1], 宋志平[2]
1 生态环境部南京环境科学研究所 国家环境保护生物多样性与生物安全重点实验室,南京 210042
2 复旦大学 生物多样性科学研究所,上海 200438

摘要:两栖动物是我国受威胁程度最高的动物类群,加强两栖动物资源调查和多样性监测,是开展两栖动物保护和濒危物种拯救行动的关键性基础工作。传统的两栖动物监测主要以形态学和声学为基础,耗时费力,且难以发现一些隐蔽性较强的稀有物种。基于环境 DNA(environmental DNA, eDNA)的调查方法以其快速、灵敏、高效、无创等独特优势,为两栖动物多样性监测及保护提供了新的工具。综述了 eDNA 在两栖动物多样性监测、外来入侵和珍稀濒危物种调查、物种丰度或生物量估测等研究领域的应用进展,分析了两栖动物 eDNA 产生、扩散、迁移和降解的动态变化特征及其关键影响因子,探讨了 eDNA 应用于两栖动物监测研究的局限性并提出了优化建议,同时对未来的研究方向进行了展望,以充分挖掘 eDNA 在两栖动物监测中的应用潜力,为两栖动物多样性保护和管理提供新的思路。

关键词:两栖动物; 环境 DNA; 生物监测; 生物多样性; 宏条形码

Advances in the application of environmental DNA in amphibians monitoring

XIAO Zehua[1,2], DONG Shanshan[1,*], ZHANG Zhenhua[1], ZHANG Dini[1], SONG Zhiping[2]
1 *State Environmental Protection Key Laboratory on Biodiversity and Biosafety*, *Nanjing Institute of Environmental Science*, *Ministry of Ecology and Environment*, *Nanjing* 210042, *China*
2 *Institute of Biodiversity Science*, *Fudan University*, *Shanghai* 200438, *China*

Abstract: Amphibians have a unique life history and are extremely sensitive to habitat changes. They are important indicator groups for monitoring environmental quality changes and assessing ecosystem health. Amphibians have become the most threatened animal group in China due to habitat loss and degradation, environmental pollution, climate change, overharvesting, invasion of alien species, and biological internal factors. Strengthening of resource survey and population monitoring of amphibians constitutes the fundamental work for amphibian diversity protection and endangered species rescue. Traditional amphibian monitoring is mainly based on morphology and acoustics, which is time-consuming, laborious, and highly dependent on professional classification knowledge and investigation experience. Furthermore, it is difficult to find some rare species given their strong concealment. The investigation method based on environmental DNA (eDNA) has unique advantages. It is fast, sensitive, efficient, non-invasive, low cost, and independent of traditional classification experience, *etc*. This can make up for the shortcomings of the traditional investigation methods and provide a new tool for amphibian diversity monitoring and protection. eDNA has been successfully applied in amphibian research, such as monitoring alien invasive species, rare and endangered species protection, biodiversity assessment, and species abundance or biomass estimation. However, in practical application research, due to different application environments, target

基金项目:国家重点研发计划(2020YFC1806305-02);国家自然科学基金(31901231);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(GYZX220203)
收稿日期:2022-10-15; **网络出版日期**:2023-05-16
* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: dongss306@163.com

organisms, sampling protocols, and primer selection, the experiment results were extremely varied. Although previous studies have promoted the progress of this technology, they could not provide systematic guidance for amphibian investigation and monitoring, and there is still uncertainty in the complex ecological processes of eDNA from amphibians. In this review, we summarized the application of eDNA in amphibian monitoring. We analyzed the critical factors that should be considered in its application, including the shedding and capture of eDNA, the selection of sampling location and time, the transport and deposition of eDNA, and the degradation of eDNA, as well as the associated biotic and abiotic factors. In addition, we discussed the limitations of the application of eDNA and provided several optimization suggestions for improving the efficiency and accuracy of the amphibian monitoring base on eDNA. Finally, we looked toward future research directions to fully exploit the application potential of eDNA in amphibian monitoring and provide new ideas for amphibian diversity protection and management.

Key Words: amphibian; environmental DNA; biological monitoring; biodiversity; metabarcoding

两栖动物是脊椎动物在进化过程中从水生到陆生的过渡类群,在水生和陆地生态系统之间具有关键功能作用。两栖类生活史独特,对生境变化极其敏感,是监测环境质量变化和评价生态系统健康的重要指示类群[1—2]。近几十年来,由于栖息地退化或丧失、环境污染、气候变化、过度捕捉、外来物种入侵以及生物内在因素等多种原因[3],两栖动物受到严重威胁。据统计,2021 年全球有 41%的两栖动物被列为濒危物种,受威胁程度居脊椎动物之首[4—5]。我国分布的 475 种两栖动物中,受威胁的有 176 种,占两栖动物物种总数的 37.05%,是受威胁程度最高的动物类群[6]。中国两栖动物区系具有复杂性和独特性等特点,加强两栖动物资源调查和生物多样性监测,是开展两栖动物保护和濒危物种拯救行动的关键性基础工作[7—9]。

目前,针对两栖动物多样性和物种丰度的调查监测,主要基于形态和鸣声的样线、样方等调查,这些调查方法通常需要耗费大量的人力物力,效率较低、选择性强,且需要调查经验丰富、专业性强的分类学专家对物种进行分类鉴定[8, 10—11]。另外,由于两栖动物的隐蔽性较强,生活习性差异大,采用传统调查方法可能难以发现一些珍稀濒危物种[12—13],从而影响了两栖动物的科学管理与保护决策的制定。近年来,基于环境 DNA (environmental DNA, eDNA)的技术以其快速、高效和无创等独特优势,广泛应用于外来入侵物种调查、濒危物种监测及生物多样性分析等研究领域[14—17]。环境 DNA 是指从环境样品(如水体、空气、土壤、沉积物等)中提取的 DNA 总和,包含生物体经由皮肤、尿液、粪便等释放到环境中的细胞内 DNA,也包括细胞死亡后裂解释放到环境中的游离 DNA[18—19]。由于绝大多数的两栖动物皮肤裸露无法完全离开水环境,它们与环境介质接触过程中,其体表粘液及排泄物会携带自身的 DNA 片段释放到环境中,通过水环境样本的采集、检测与分析可以实现对两栖动物的调查监测[20—22]。近十年来,国内外学者利用 eDNA 在入侵和稀有两栖动物调查、多样性监测及空间分布分析等方面已开展了一些研究[23—26]。基于 eDNA 的技术可成为辅助传统调查方法的有力工具,提高两栖动物多样性调查和监测的能力,为两栖动物的保护与管理提供技术支撑。

值得注意的是,尽管过去十年很多研究都证实了 eDNA 作为生物监测方法的灵敏性和可靠性,但 eDNA 的来源、持久性及其变化的物理过程仍存在不确定性。已有研究发现,eDNA 在水环境介质中的浓度和分布是由 eDNA 的产生、降解、迁移和散布等一系列动态变化过程共同决定的[15],在这过程中会受到生物因素(如:生物种类、生活史阶段、行为活动和生物量等)和非生物因素(如:温度、UV、pH、水流等)直接或间接的影响[27—28]。而且,两栖类不同于鱼类、浮游和底栖等生物类群,其独特的生殖发育特征和生活习性要求在制定 eDNA 采集策略时,必须综合考虑生活史阶段以及可能影响 eDNA 时空分布的生物和环境因素。因此,如何科学地对调查样点进行样品采集,并将检测到的生物信息进行分析和解释是将 eDNA 应用于两栖动物调查及多样性监测研究的关键。

本文综述了基于 eDNA 的技术在外来入侵和珍稀濒危两栖动物调查、多样性监测、物种丰度或生物量估测中的应用研究进展,分析了两栖动物 eDNA 产生、扩散、迁移和降解的动态变化特征及其关键影响因子,探

讨了 eDNA 应用于两栖动物监测研究的局限性并提出了优化建议,同时对未来的研究方向进行了展望,以期为两栖动物多样性保护、管理和决策提供新的思路。

1　eDNA 在两栖动物调查与监测中的应用

1.1　外来入侵生物调查

外来物种入侵是造成两栖动物受威胁的主要因素之一,早期监测预警对于入侵物种的有效防控和清除非常重要。但在入侵的早期阶段,外来物种的种群密度较低,采用传统野外调查方法耗时、效率低、经济成本高,且难以及时发现。而基于 eDNA 的技术以其高灵敏度和高效性极大地增加了入侵早期阶段发现的可能性[29—32]。美洲牛蛙(*Lithobates catesbeianus*)作为世界 100 种恶性外来入侵物种之一,具有繁殖力强、食性广泛、栖息环境多样等特点,严重威胁本土两栖类、鱼类和昆虫等类群的生物多样性[33—34]。2008 年,Ficetola 等[23]将 eDNA 应用于牛蛙种群的调查监测,将 eDNA 与 DNA 条形码相结合,对受控环境和自然水体的水样进行检测,发现在种群密度较低的情况下仍然能够检测到牛蛙的存在,有效提高了低丰度物种的检出概率。此后,研究人员以牛蛙为模式生物,通过控制实验研究蝌蚪和幼蛙生物量与 eDNA 浓度的关系,分析静水环境中牛蛙自然种群 eDNA 随季节的变化模式[35—36],探究温度、紫外线辐射和 pH 等环境因素对 eDNA 产生和降解的影响[37](表 1),研究结果提示两栖类 eDNA 检测应充分考虑其生活史阶段,在其行为较活跃的时间段(如:繁殖期)开展调查采样更利于 eDNA 的捕获。同时,研究人员不断开发和优化 eDNA 提取方法、检测引物和探针以及 PCR 检测技术,以提高外来入侵物种 eDNA 检测的准确性和靶向性[36, 39]。

1.2　珍稀濒危物种监测

许多两栖动物因其大小、行为、隐蔽色和独特的微生境等难以通过传统调查方法发现[12, 24],特别是一些珍稀濒危物种,如 *Phytotriades auratus*、*Anodonthyla vallani* 等濒危蛙类常栖息于树洞水体中,传统调查无法在不破坏其栖息生境的情况下进行,研究人员利用基于 eDNA 的技术通过抽取树洞中的少量水体成功检测到了目标物种,并对其分布状况进行了评估[40—42]。早期基于 eDNA 技术对濒危或稀有两栖动物的监测研究多是通过与传统调查方法结果的比较,验证 eDNA 检测的灵敏性和可靠性[24, 43—46,58],或是探究影响 eDNA 时空分布的生物和非生物因素[47—48],为两栖动物 eDNA 研究的创新转变奠定了基础。近几年,更多研究将 eDNA 与两栖动物的物种占域模型(occupancy model)、生境适宜度模型(habitat suitability model)和气候适应模型(climatic suitability model)等相结合,为两栖动物的监测与保护研究提供了更全面、精确的技术支持[49—50,59—61](表 1)。例如:Renan 等[8]采用 eDNA 方法寻找巴勒斯坦油彩蛙(*Latonia nigriventer*)在适宜生境中的新种群,同时基于 eDNA 数据通过生境适宜度模型对与物种分布相关的景观因子进行分类,并预测其潜在栖息地,研究显示将基于 eDNA 的技术与生境适宜度模型相结合可以对极度濒危和难以发现的两栖动物进行有效监测,为两栖动物保护和管理提供指导。

1.3　生物多样性分析

生物多样性调查监测是获得物种及其群落组成和时空分布变化的重要手段,可以为生物多样性及重要生物资源的保护与管理策略的制定提供关键数据[55]。eDNA 与宏条形码技术(metabarcoding)相结合,能够快速大规模地得到物种多样性信息和群落组成,为两栖动物多样性调查监测提供了新工具(表 1)。eDNA-宏条形码技术应用于群落物种丰富度调查的有效性首先在受控条件下得到证实,如:Thomsen 等[62]通过设置水生生态系统中宇宙试验,利用二代测序技术从提取的水样 DNA 中检测到了所有的两栖类和鱼类群体。类似的研究还有 Evans 等[63]设置了包含 8 种鱼类和 1 种两栖类的人工生物群落,采用 eDNA-宏条形码技术检测物种种类及相对丰度,发现所有物种均能检测到,且物种丰度与检出序列丰度之间明显正相关,进一步验证了该技术的准确性。在基于 eDNA-宏条形码技术调查自然环境中两栖动物多样性时,研究者通常将 eDNA 与传统调查方法相结合,并从调查效率、准确性、灵敏性和成本效益等方面开展两者间的比较研究[25, 55,60, 64—65]。如:Sasso 等[57]应用 eDNA-宏条形码技术在巴西东南部热带雨林的四条溪流中开展两栖动物群落调查,并与连续五年

表 1 环境 DNA 在两栖动物监测中的应用研究示例

Table 1 Examples of application of environmental DNA (eDNA) in amphibians monitoring

应用 Application	技术 Technology	物种 Species	基因标记 Gene markers	主要内容 Main contents	参考文献 References
外来或入侵物种 Exotic or invasive species	PCR	美洲牛蛙 (*Lithobates catesbeianus*)	*Cytb*	利用基于 eDNA 的技术对受控环境和自然水体中的牛蛙进行检测,发现在种群密度较低的情况下仍然能够检测到牛蛙的存在。 采用 eDNA 方法对法国西南部地区的牛蛙种群进行调查,并与传统基于视觉和听觉的调查结果相比较,发现 eDNA 的灵敏度远高于传统调查方法,eDNA 适用于外来入侵物种的早期监测。	[23, 38]
	qPCR	欧洲蝾螈 (*Lissotritonv. vulgaris*)	*Cytb*	比较基于 eDNA 的方法与传统调查方法之间目标物种检出率和成本的差异。	[32]
	qPCR	美洲牛蛙 (*Lithobates catesbeianus*)	mitochondrial sequence	在国家公园中,利用 eDNA 进行牛蛙种群监测及清除成效评估。	[34]
	ddPCR	美洲牛蛙 (*Lithobates catesbeianus*)	16S rRNA, *Cytb*	测试并比较了两种引物和探针的有效性和特异性,检测并量化三个池塘中牛蛙 eDNA 浓度的季节性波动,用于监测牛蛙入侵的早期阶段,并量化丰度的时间变化。	[36]
	qPCR	美洲牛蛙 (*Lithobates catesbeianus*)	mitochondrial sequence	以牛蛙蝌蚪为模式生物,在控制条件下探究温度、紫外线 B (UV-B) 辐射和 pH 对 eDNA 降解的影响。	[37]
	qPCR	美洲牛蛙 (*Lithobates catesbeianus*)	16S rRNA	设计并比较了美洲牛蛙 DNA 特异性检测引物和探针及其 eDNA 提取方法,用于在潜在广泛的地理范围内对牛蛙入侵进行基于 eDNA 的主动监测。	[39]
濒危或保护物种 Endangered or protected species	qPCR	巴勒斯坦油彩蛙 (*Latonia nigriventer*)	12S rRNA	将 eDNA 与栖息地适宜性模型相结合,应用于极度濒危物种的发现及预测,提高了新种群的发现率,为未来保护管理计划的制定提供指导。	[8]
	qPCR	*Phytotriades auratus*; *Anodonthyla vallani*	*Cytb*; *COI*	在脆弱栖息地利用 eDNA 进行濒危物种的分布调查,表明该方法在揭示树栖生境(脆弱、微体积)中的物种存在具有巨大潜力。	[40—42]
	qPCR	*Ascaphus montanus*; *Dicamptodon aterrimus*	*Cytb*	比较了 eDNA 方法和传统调查方法对两栖动物的监测结果,评估不同采样方案、采样位置和时间以及目标生物距离对水中 eDNA 浓度的影响。	[43]
	qPCR	*Cryptobranchus alleganiensis alleganiensis*	*Cytb*	同时使用 eDNA 和传统调查方法进行濒危物种的检测,并用多种模型比较两种检测方法的灵敏性。 通过整合历史数据、eDNA 检测数据、现场数据和遥感数据,在相对广泛的地理区域内快速评估种群变化以及影响物种分布的因素。	[44—45]
	qPCR	日本爪鲵 (*Onychodactylus japonicus*)	12S rRNA	同时采用 eDNA 和传统调查方法进行濒危物种的检测,发现基于 eDNA 的方法可以通过采集表层水样来确定栖息在水生生态系统中大型生物的分布。	[46]
	qPCR	*Dicamptodon aterrimus*	*Cytb*	通过室内控制实验和野外溪流生物放置实验,评估 eDNA 的产生率、降解率和运输动态。发现 eDNA 的检出率和浓度取决于个体的生产速率、环境条件、种群密度及其停留时间。	[47]
	qPCR	日本大鲵 (*Andrias japonicus*)	NADH-1	利用 eDNA 和传统调查方法进行本土濒危物种与外来物种的分布调查,结果表明基于 eDNA 的调查方法更节约时间和精力,且该方法在繁殖期更有效。	[48]
	qPCR	*Rana sierrae*	NADH-2	利用 eDNA 调查国家森林内濒危物种的分布状况,建立气候适宜性模型,基于模型预测目标物种的潜在栖息地并利用 eDNA 进行验证。	[49]

续表

应用 Application	技术 Technology	物种 Species	基因标记 Gene markers	主要内容 Main contents	参考文献 References
	qPCR	*Siren intermedia texana*	*COI*	通过与传统调查方法相比,发现基于 eDNA 的技术对物种的检测率更高。	[50]
	qPCR	*Rana chiricahuensis*; *Ambystoma mavortium stebbinsi*; *Lithobates catesbeianus*; *Hyla wrightorum*; *Pseudacris ornata*; *Ambystoma bishopi*	mitochondrial sequence	在 3 个具有环境梯度变化的湿地中对 6 种两栖动物进行 eDNA 调查和传统调查,基于物种占域模型评估环境因素对 eDNA 检测的影响。	[51]
	qPCR	*Litoria lorica*; *Litoria nannotis*	*COI*	通过检测不同生物量种群的 eDNA 运输距离,表明 eDNA 是探测溪流中稀有两栖动物的有力工具。	[52]
	qPCR	*Babina subaspera*; *Odorrana splendida*; *Odorrana amamiensis*	NADH-5	通过 3 个不同季节 eDNA 检测方法与传统声学调查方法的比较,发现在利用 eDNA 开展物种分布调查时,有必要考虑物种的生态特征。	[53]
	qPCR	*Rana sierrae*; *Rana boylii*	NADH-2	设计并测试了湖泊和溪流生态系统中不同的 eDNA 采样方案,包括调整采样时间、空间距离及样本量等,以提高 eDNA 对稀有物种及其分布监测的准确性。	[54]
物种多样性 Species diversity	Metabarcoding	无尾目(Anura)	12S rRNA	利用 eDNA 调查到了传统方法没有发现的濒危两栖动物,强调了 eDNA-宏条形码技术对低密度种群生物多样性监测的有效性,特别是在生物多样性热点地区。	[9]
	qPCR+Metabarcoding	无尾目(Anura); 有尾目(Caudata)	*Cytb* +12S rRNA	将 eDNA(qPCR+ metabarcoding)检测结果与传统调查结果相比较,并基于物种占域模型评估不同方法调查的灵敏性,以进一步优化 eDNA 的检测方案。	[22]
	Metabarcoding	无尾目(Anura)	16S rDNA; 12S rRNA	通过将 eDNA 与传统调查方法的结果和成本进行比较,发现基于 eDNA 的物种多样性调查方法更适合生物多样性较高地区的大规模调查。	[25, 55]
	Metabarcoding	无尾目(Anura)	12S rRNA	通过将 eDNA 与传统样线法相比,验证了对于无尾目多样性监测的可靠性,并分析了物种生物学特性和水体理化性质对调查结果的影响。	[26]
	Metabarcoding	无尾目(Anura)	12S rRNA	仅通过一次 eDNA 调查就检测到了调查区域所有已知目标物种,并发现 eDNA 读取数据与生物自身因素关系密切。	[56]
	Metabarcoding	无尾目(Anura)	12S rRNA	采用 eDNA-宏条形码技术在巴西热带雨林的溪流中开展两栖动物群落调查,并与连续五年的传统调查结果进行比较,发现结果高度相似,表明 eDNA-宏条形码技术可以作为评估热带雨林生态系统中两栖动物多样性的有效工具。	[57]

的传统调查结果进行比较,研究显示 eDNA-宏条形码技术从为期 4 天采集的水样中检测到的结果与传统调查结果高度相似,表明该技术可以作为评估热带雨林生态系统中两栖动物多样性的有力工具。Lopes 等[9]基于 eDNA-宏条形码对巴西雨林和草原地区 30 种处于不同保护等级的两栖动物进行调查,成功检测到 4 个衰退物种,2 个局部地区消失物种和 1 个近 50 年来未出现物种的 DNA 痕迹,提示 eDNA-宏条形码技术对于低密度种群的监测比传统方法可能更加有效。

1.4 物种丰度或生物量评估

物种丰度是描述生物多样性的一个基本参数,丰度评估可以为生态学和保护生物学研究提供更完整的信息,特别是在稀有和濒危物种的保护及管理等方面起着重要作用[66]。然而,在自然环境下,特别是在水生生态系统中,网捕、电捕和陷阱等传统调查方法很难在不伤害生物或破坏栖息地的情况下操作,而声纳调查适用范围有限,物种丰度的评估是十分困难的[19]。利用 eDNA 开展物种丰度或生物量调查可以很好的弥补传统调查方法的一些缺陷。已开展的研究中多以鱼类为调查对象,通过定量 PCR 检测或高通量测序量化 eDNA 浓度与物种丰度或生物量之间的关系,或者评估物种的相对丰度或生物量变化趋势[67—73]。目前,eDNA 技术应用于两栖动物丰度或生物量估测的研究还相对较少,大多是在人工控制条件下,通过建立不同密度的人工种群,验证 eDNA 测序数据与两栖动物种群密度或生物量的相关性[62, 66],也有研究将传统调查方法与 eDNA 检测结果相比较,评估基于 eDNA 浓度估测溪流中两栖动物相对丰度和生物量的准确性,研究显示 eDNA 对于低密度物种的检出率更优于传统调查方法[43](表 1)。但由于两栖动物特殊的生活习性和生活史特征,利用 eDNA 技术对两栖类物种丰度或生物量进行准确的评估仍存在较大挑战[63, 74—76]。在实际调查中,应根据两栖动物的生物学特性制定合适的采样策略,同时充分考虑可能影响 eDNA 产生、运输和降解等生态过程的各种因素,这对于两栖动物丰度或生物量的估测至关重要。

2 eDNA 的时空变化及其应用于两栖动物监测中的关键考虑

2.1 eDNA 的产生与捕获

了解两栖动物释放到环境中的遗传物质的来源以及影响 eDNA 产生的环境因素,将有助于我们更高效的捕获目标物种的 eDNA[28]。两栖动物主要以尿液、粪便、皮肤分泌物以及脱落的组织和细胞等形式将遗传物质释放到环境中[23]。eDNA 的数量和来源可能受到各种生物和非生物因素的影响[37],生物因素包括:物种种类[11, 62]、个体大小和/或生物量[35, 77]、食物摄取和消化状况[78—79]、行为活动以及生活史阶段[11, 80]等。例如:已有研究发现牛蛙 eDNA 浓度随季节的变化趋势与其生长发育过程密切相关,浓度高峰期与繁殖期相重合[36]。影响 eDNA 产生的环境因素包括:温度[47,81]、pH[37, 51]、电导率[51, 82]和可获取的食物量[13, 78]等。不同来源的 eDNA 粒径大小可能不同,通过研究 eDNA 大小的分布范围可以指导我们选择合适的捕获方式、过滤器孔径以及采集的样本量[15, 28, 81, 83], 进而优化 eDNA 的采样策略。目前,已开展的相关研究多以鱼类为对象,例如:通过检测三种海洋鱼类 eDNA 粒径的大小推测其来源(细胞内或细胞外 DNA)[84],或者通过检测鲤鱼 eDNA 粒径的分布范围(1—10 μm),确定最佳的过滤器孔径和过滤水样体积,以提高 eDNA 捕获效率[85]。两栖动物的生活史特征较其他生物类群更为复杂、多变,其 eDNA 来源也存在更多的不确定性,但尚未发现针对两栖动物 eDNA 来源与捕获关系的相关研究。因此,未来的研究应进一步量化两栖动物 eDNA 来源与捕获的关系,这将提高我们应用 eDNA 进行两栖动物监测的能力。

2.2 采样地点与时间的选择

在常见的淡水生态系统(湿地、溪流、湖泊、池塘等)应用 eDNA 进行两栖动物调查监测时,存在空间和时间上的不确定性,因为检测到的 eDNA 可能是由较远地方运输而来的,或者在未捕获前就降解了[86]。两栖类的生境主要涉及静水和流水水域,由于受到水流运动、基质、坡度等因素的影响,不同类型的水生生态系统中 eDNA 扩散的距离范围可能不同,如:Brys 等[87]发现在静水水域中,两栖动物的活动区域比较固定,eDNA 扩散范围十分有限,而 Villacorta-Rath 等[52]的研究结果显示,在溪流中两种濒危蛙类的 eDNA 可以在种群下游

20 km 外的地方检测到。研究结果间存在的巨大差异,为静水和流水生态系统中 eDNA 采样点的设置提供了借鉴经验:静水水域中,应根据调查的具体范围和物种特征,在较广泛的地点采集水样以弥补 eDNA 扩散范围有限的制约,提高检测率,确定物种分布范围;流水水域中,在不确定物种丰度和具体位置的情况下,要充分考虑流水生态系统的水文条件以确定合适的采样间隔,在发现阳性采样点后进行精准采样或结合传统调查,以提供较准确、丰富的调查结果[43,86]。

两栖动物 eDNA 浓度可能会受到季节的影响,如在繁殖季节,雄性间的竞争和配子的大规模释放等行为会增加 eDNA 浓度,检出率也会随之增加[79, 88]。而且不同物种的繁殖季节也不相同,部分两栖动物只在特定生活史阶段留在水中,通过了解目标物种的生活史特征和行为习性来确定取样时间,可以大大提高 eDNA 的检出率[52,79]。例如,Fukumoto 等[48]采用 eDNA 技术对日本原生种日本大鲵(*Andrias japonicus*)和入侵当地的中国大鲵(*Andrias davidianus*)调查发现,在秋季至冬季之间大鲵进入繁殖高峰期后是 eDNA 监测的最佳时间段。类似的,de Souza 等[60]基于 eDNA 对两种处于濒危的两栖和爬行动物监测发现,季节对这两个物种的 eDNA 检出率有很大影响,生物的行为活动与 eDNA 检测概率显著相关。上述案例都强调了在物种活跃期 eDNA 检出率较高,这与传统调查的时间基本重合,但也有研究表明,基于 eDNA 技术的灵敏性,在传统调查的最佳时间段之外,采用 eDNA 技术也可以对濒危和入侵物种进行有效监测,克服了季节因素对传统调查方法的限制[19, 24]。鉴于两栖动物独特的生活史和生态学特征,在利用 eDNA 开展两栖动物多样性监测时,应充分考虑物种间生境/微生境、习性和繁殖季节的差异,并在不同季节/月份间重复采样,以提高 eDNA 的检出率。

2.3　eDNA 的运输与沉积

eDNA 在不同类型水生生态系统中的扩散和运输方式不同。在静水水域中,eDNA 主要受重力沉降的作用而垂直运输,粪便或脱落组织上附着的 DNA 更容易沉积在水体下层,水平扩散的范围有限,且 eDNA 在水体下层往往能存留更长时间,而水体表层的 eDNA 在生物转移后会快速消失[87, 89—90]。因此,针对静水水域建议从上层水取样且采样点应均匀覆盖水体或包括尽可能多的微生境,以提高对目标生物检测的时效性和准确率[86]。例如,Li 等[26]通过对 71 个池塘或湖泊进行多次调查并重复采样,发现在两栖动物(无尾目)活动的岸边位置取样获得的结果完全可以反映两栖动物的丰富度。此外,有的地区在春季或秋季会发生较大的温度波动,此时不建议采集 eDNA 样本,因为整个湖泊的水体可能会受温差的作用出现明显的垂直和水平运动[91],进而对 eDNA 的运输产生不可预测的影响,导致结果没有代表性甚至造成假阳性或假阴性[86]。

流水生态系统的树枝状或网状结构使其能够包含广泛的地理区域、栖息地类型以及多样的生物群落,已有研究表明,来自整个河网水系的 eDNA 将会被运输到下游,生态学家和管理者可以通过下游汇集的 eDNA 来评估推断更大空间尺度上的生物多样性和群落动态[92—93]。值得注意的是,eDNA 在向下游移动过程中,湍流和重力沉降等作用可能会使 eDNA 附着颗粒在底部的沉积物中存留、通过底流输送或重新悬浮到水体中[94]。如:Shogren 等[95]通过控制实验研究发现 eDNA 在水底覆盖生物膜的流水系统中存在的时间较短,生物膜介导的滞留作用会增加 eDNA 降解速率,且较短 eDNA 片段(<100 bp)与较长片段(>600 bp)相比能够运输更远的距离和更长的时间。eDNA 在流水生态系统中的时空分布受到河流的水文动力、基质类型、水体理化性质等因素的影响,其存留和再悬浮动力学是一个随机过程[86]。已有研究将基于水文的 eDNA 运输模型与再现真实河流比例特征的虚拟河网相结合,模拟研究河网中 eDNA 采样点数量和位置、目标生物的空间分布以及 eDNA 衰减速率和测量误差对 eDNA 浓度分布的影响,发现由于水文因素影响,即使目标生物分布均匀且忽略 eDNA 衰减,eDNA 也会出现不均匀的分布模式[96]。两栖动物独特的生物学特征和生活习性可能是影响 eDNA 在流水生态系统中迁移散布的主要因素之一。Pilliod 等[43]基于 eDNA 对爱达荷州中部 13 条河流中的两种两栖动物调查显示,eDNA 浓度与两栖动物的种群密度、生物量和空间占有率密切相关。对影响两栖动物 eDNA 在流水水域中散布因素的进一步研究发现,两栖类 eDNA 的检出率和浓度主要受到生物个体的自身因素,eDNA 产生和降解速率以及温度、光照等环境因子的影响。

湖泊和河流地表水中 eDNA 携带的物种及其丰度信息通常反映了近期的生物状况,而表层沉积物 eDNA

可能反映了长期积累的生物信息[97]。例如,Shaw 等[64]比较分析了水样和表面沉积物 eDNA 中鱼类的物种丰富度,发现水样中检测到的物种丰富度与采样时实际调查的物种信息更加一致。沉积物中 eDNA 的存留时间一般比水环境中的更长,首先,由于 eDNA 在沉积物中不断累积,较高的起始浓度会延长 eDNA 存续时间[13];其次,沉积物吸附的 DNA 片段的降解速率相对更慢[90]。沉积物样本可以作为水样的有力补充,以提高 eDNA 检测的准确性和灵敏性。如:Fremier 等[98]在五条具有不同水文地貌的河流中研究高首鲟(*Acipenser transmontanus*) eDNA 的运输、沉降和存留规律,结果显示 eDNA 会在坡度较小、流速较慢或河底地势低洼区滞留沉积,建议在以上区域加大采样力度,或进一步考虑采集河床沉积物样本以增加 eDNA 捕获量。不同环境来源的 eDNA 所携带的生物信息可能不同[99],在基于 eDNA 开展生物监测时,应针对目标生物特性充分考虑其 eDNA 空间分布特征以及环境样本类型对 eDNA 检出效率的影响,制定合适的取样策略。

2.4 eDNA 的降解

eDNA 的降解首先表现为脱落的生物物质通常会从多细胞组织碎片降解为单个细胞或分离的细胞器(如线粒体),通过外源酶或自发的化学反应进一步降解为游离(细胞外) DNA,最后降解为不同长度的 DNA 碎片[84, 86, 96, 100—101]。eDNA 降解的程度可能会影响 eDNA 捕获方式和后续的检测分析手段[83—84, 101]。例如,Jo 等[102]发现长 DNA 片段比短 DNA 片段更易降解,且长 DNA 片段更能准确的反映鱼类生物量,表明长的 eDNA 片段更能代表调查区域该生物信息时效性。通过选择检测的片段长度,我们可以从 eDNA 中提取相关的时间尺度信息。eDNA 的降解是影响生物检测率的主要因素之一,降解速率决定了 eDNA 从产生到消失的时间。不同物种 eDNA 降解速率会有显著差异,如:鲤鱼 eDNA 的降解系数为 0.014—0.105/h[83];蝾螈的降解系数为 0.068—0.079/h[47];而牛蛙的降解系数为 0.050—0.340/h[37, 85]。

eDNA 的降解速率可能受到温度、水理化性质、紫外线辐射、微生物、细胞外酶以及 DNA 结构特征等生物和非生物因素的影响[13, 51,81]。eDNA 降解是多种生物和非生物因素综合作用的结果,例如,温度升高会加速 eDNA 降解,增加微生物数量和代谢活性,增强其降解能力,但同时较高的温度也能够促进生物 eDNA 的产生[13]。一项在受控条件下定量监测温度、pH 和 UV-B 对牛蛙蝌蚪 eDNA 降解影响的研究显示,较高温度(25—35 ℃)、较低 pH 值(4—7)和较强光照会加快 eDNA 的降解,这与该环境条件下微生物的活性增强也有关[37]。大部分研究证实微生物活性与 eDNA 的降解率呈正相关关系[15, 87, 51,86, 96],但也有例外,如 Barnes 等[83]的研究发现 eDNA 降解率随生化需氧量、叶绿素和总 eDNA(即来自任何生物体)浓度的增加而下降。此外,游离 DNA 很容易和腐殖质相结合,与腐殖物质结合的 DNA 比游离 DNA 更不容易被降解,在腐殖质含量高的水体中 eDNA 的存续时间可能会更长[103—104]。因此,在开展 eDNA 研究的同时,考虑环境因素对 eDNA 检测的影响,量化 eDNA 的降解速率将有助于解释 eDNA 的监测结果。

3 eDNA 应用于两栖动物监测的局限性

eDNA 的应用与发展为两栖动物多样性保护与研究提供了新的途径[105]。但在其应用过程中仍存在一系列不足,如:污染、抑制剂、非特异性扩增等造成的假阳性或假阴性[81];参考数据库的完整性问题[106];eDNA 时空分布变化以及不同的采样策略对检测结果的影响[13, 87];与传统调查结果可能会有较大出入等。两栖动物具有独特的生活史和生态学特征,相对于鱼类、底栖和浮游等生物类群,eDNA 应用于两栖动物调查监测存在特殊的局限性。大部分两栖动物只在胚胎孵化和幼体生长时期生活在水里,成体以后的微生境多以半水栖为主,在水体中的时间有限。而且,大多数的两栖类会经历冬眠,在这期间动物的新陈代谢和活跃度降低,不适于 eDNA 样本的采集。

针对以上问题,在利用水环境 DNA 开展两栖动物调查监测时,应根据目标物种的生境类型、繁殖季节、发育特征、活动习性等生物学信息,制定合适的采样方案;对采样现场和室内检测过程涉及的实验设备、器材进行严格的消毒灭菌, 设置阴性对照和空白对照来检测污染问题;通过必要的生物学重复和技术重复提高低丰度物种的检出率;优化 PCR 扩增条件和扩增程序、提高引物特异性和灵敏度,采用对抑制剂耐受性更强的数

字 PCR 等检测技术手段;结合公共数据库信息,完善本土两栖动物 DNA 条形码数据库及物种信息库;综合考虑不同生态系统类型的水文过程和地貌特征对 eDNA 扩散和运输的影响,以及生物和非生物因子对 eDNA 降解的影响,模拟并建立监测结果与物种时空分布之间的相关性,提高监测结果的准确度。

4　研究展望

eDNA 技术作为生物调查监测的有力工具,如何优化和拓展其在两栖动物多样性保护与管理中的应用是我们今后研究的重点。eDNA 技术主要操作流程包括环境样本采集、保存、eDNA 富集、提取、检测和数据分析等,尽管目前每个步骤所采用的方法都在不断改进和完善,但尚未形成标准化的操作流程和方法,导致不同方法获得的结果可比性较差,有必要研究制定 eDNA 技术的标准化操作规程和方法,规范其在两栖动物调查监测中的应用;eDNA 在环境介质中的时空变化将直接影响检测结果的准确性,建立两栖动物 eDNA 产生、降解、扩散、运输动态模型,可以更好地识别 eDNA 潜在的产生、聚集、高降解和低降解区域,优化 eDNA 采样策略,提高不同环境条件下的检出率以及基于 eDNA 估测物种丰度或生物量的能力[28, 37, 54];物种生态位模型、占域模型、生境适宜度模型等为有效预测和分析两栖动物分布变化、扩散规律、种群动态趋势提供了理论依据,将 eDNA 技术与模型研究相结合可以进一步拓展该技术在保护生物学、入侵生物学等生态学领域的应用,为两栖动物监测及多样性保护提供有力技术支撑。

参考文献(References):

[1] Zhao T, Wang B, Shu G C, Li C, Jiang J P. Amphibian species contribute similarly to taxonomic, but not functional and phylogenetic diversity: inferences from amphibian biodiversity on Emei Mountain. Asian Herpetological Research, 2018, 9(2): 110-118.

[2] Houlahan J E, Findlay C S, Schmidt B R, Meyer A H, Kuzmin S L. Quantitative evidence for global amphibian population declines. Nature, 2000, 404(6779): 752-755.

[3] Hoffmann M, Hilton-Taylor C, Angulo A, Böhm M, Brooks T M, Butchart S H, Carpenter K E, Chanson J, Collen B, Cox N A, Darwall W R, Dulvy N K, Harrison L R, Katariya V, Pollock C M, Quader S, Richman N I, Rodrigues A S, Tognelli M F, Vié J C, Aguiar J M, Allen D J, Allen G R, Amori G, Ananjeva N B, Andreone F, Andrew P, Aquino Ortiz A L, Baillie J E, Baldi R, Bell B D, Biju S D, Bird J P, Black-Decima P, Blanc J J, Bolaños F, Bolivar-G W, Burfield I J, Burton J A, Capper D R, Castro F, Catullo G, Cavanagh R D, Channing, Chao N L, Chenery A M, Chiozza F, Clausnitzer V, Collar N J, Collett L C. The impact of conservation on the status of the world's vertebrates. Science: New York, N Y, 2010, 330(6010): 1503-1509.

[4] IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. (2022-1) [2022-10]. https://www.iucnredlist.org/resources/summary-statistics

[5] Ethier J P, Fayard A, Soroye P, Choi D, Mazerolle M J, Trudeau V L. Life history traits and reproductive ecology of North American chorus frogs of the genus *Pseudacris*(Hylidae). Frontiers in Zoology, 2021, 18(1): 40.

[6] 江建平, 谢锋. 中国生物多样性红色名录 脊椎动物 第 4 卷 两栖动物 上. 北京: 科学出版社, 2021: 36-38.

[7] 江建平, 谢锋, 臧春鑫, 蔡蕾, 李成, 王斌, 李家堂, 王杰, 胡军华, 王燕, 刘炯宇. 中国两栖动物受威胁现状评估. 生物多样性, 2016, 24(5): 588-597.

[8] Renan S, Gafny S, Perl R G B, Roll U, Malka Y, Vences M, Geffen E. Living quarters of a living fossil-Uncovering the current distribution pattern of the rediscovered Hula painted frog (*Latonia nigriventer*) using environmental DNA. Molecular Ecology, 2017, 26(24): 6801-6812.

[9] Lopes C M, Baêta D, Valentini A, Lyra M L, Sabbag A F, Gasparini J L, Dejean T, Haddad C F B, Zamudio K R. Lost and found: frogs in a biodiversity hotspot rediscovered with environmental DNA. Molecular Ecology, 2021, 30(13): 3289-3298.

[10] Wheeler Q D, Raven P H, Wilson E O. Taxonomy: impediment or expedient? Science, 2004, 303(5656): 285.

[11] Goldberg C S, Pilliod D S, Arkle R S, Waits L P. Molecular detection of vertebrates in stream water: a demonstration using Rocky Mountain tailed frogs and Idaho giant salamanders. PLoS One, 2011, 6(7): e22746.

[12] Price S J, Eskew E A, Cecala K K, Browne R A, Dorcas M E. Estimating survival of a streamside salamander: importance of temporary emigration, capture response, and location. Hydrobiologia, 2012, 679(1): 205-215.

[13] Yates M C, Cristescu M E, Derry A M. Integrating physiology and environmental dynamics to operationalize environmental DNA (eDNA) as a means to monitor freshwater macro-organism abundance. Molecular Ecology, 2021, 30(24): 6531-6550.

[14] Sansom B J, Sassoubre L M. Environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates to model freshwater mussel eDNA transport in a river. Environmental Science & Technology, 2017, 51(24): 14244-14253.

[15] Jo T, Murakami H, Yamamoto S, Masuda R, Minamoto T. Effect of water temperature and fish biomass on environmental DNA shedding, degradation, and size distribution. Ecology and Evolution, 2019, 9(3): 1135-1146.

[16] Zhang S, Lu Q, Wang Y Y, Wang X M, Zhao J D, Yao M. Assessment of fish communities using environmental DNA: effect of spatial sampling design in lentic systems of different sizes. Molecular Ecology Resources, 2020, 20(1): 242-255.

[17] 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, 2021, 30(13): 3189-3202.

[18] Taberlet P, Coissac E, Hajibabaei M, Rieseberg L H. Environmental DNA. Molecular Ecology, 2012, 21(8): 1789-1793.

[19] 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.

[20] Schmelzle M C, Kinziger A P. Using occupancy modelling to compare environmental DNA to traditional field methods for regional-scale monitoring of an endangered aquatic species. Molecular Ecology Resources, 2016, 16(4): 895-908.

[21] Ficetola G F, Manenti R, Taberlet P. Environmental DNA and metabarcoding for the study of amphibians and reptiles: species distribution, the microbiome, and much more. Amphibia-Reptilia, 2019, 40(2): 129-148.

[22] Moss W E, Harper L R, Davis M A, Goldberg C S, Smith M M, Johnson P T J. Navigating the trade-offs between environmental DNA and conventional field surveys for improved amphibian monitoring. Ecosphere, 2022, 13(2): e3941.

[23] Ficetola G F, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P. Species detection using environmental DNA from water samples. Biology Letters, 2008, 4(4): 423-425.

[24] Rees H C, Bishop K, Middleditch D J, Patmore J R M, Maddison B C, Gough K C. The application of eDNA for monitoring of the Great Crested Newt in the UK. Ecology and Evolution, 2014, 4(21): 4023-4032.

[25] Bálint M, Nowak C, Márton O, Pauls S U, Wittwer C, Aramayo J L, Schulze A, Chambert T, Cocchiararo B, Jansen M. Accuracy, limitations and cost efficiency of eDNA-based community survey in tropical frogs. Molecular Ecology Resources, 2018, 18(6): 1415-1426.

[26] Li W H, Hou X L, Xu C X, Qin M S, Wang S P, Wei L, Wang Y P, Liu X, Li Y M. Validating eDNA measurements of the richness and abundance of anurans at a large scale. Journal of Animal Ecology, 2021, 90(6): 1466-1479.

[27] Eichmiller J J, Best S E, Sorensen P W. Effects of temperature and trophic state on degradation of environmental DNA in lake water. Environmental Science & Technology, 2016, 50(4): 1859-1867.

[28] Barnes M A, Turner C R. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. Conservation Genetics, 2016, 17(1): 1-17.

[29] Dougherty M M, Larson E R, Renshaw M A, Gantz C A, Egan S P, Erickson D M, Lodge D M. Environmental DNA (eDNA) detects the invasive rusty crayfish *Orconectes rusticus* at low abundances. Journal of Applied Ecology, 2016, 53(3): 722-732.

[30] Balasingham K D, Walter R P, Mandrak N E, Heath D D. Environmental DNA detection of rare and invasive fish species in two Great Lakes tributaries. Molecular Ecology, 2018, 27(1): 112-127.

[31] Geerts A N, Boets P, Van den Heede S, Goethals P, Van der heyden C. A search for standardized protocols to detect alien invasive crayfish based on environmental DNA (eDNA): A lab and field evaluation. Ecological Indicators, 2018, 84: 564-572.

[32] Smart A S, Weeks A R, van Rooyen A R, Moore A, McCarthy M A, Tingley R. Assessing the cost-efficiency of environmental DNA sampling. Methods in Ecology and Evolution, 2016, 7(11): 1291-1298.

[33] Gobel N, Laufer G, Cortizas S. Changes in aquatic communities recently invaded by a top predator: evidence of American bullfrogs in Aceguá, Uruguay. Aquatic Sciences, 2019, 81(1): 8.

[34] Kamoroff C, Daniele N, Grasso R L, Rising R, Espinoza T, Goldberg C S. Effective removal of the American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) on a landscape level: long term monitoring and removal efforts in Yosemite Valley, Yosemite National Park. Biological Invasions, 2020, 22(2): 617-626.

[35] Dejean T, Valentini A, Duparc A, Pellier-Cuit S, Pompanon F, Taberlet P, Miaud C. Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. PLoS One, 2011, 6(8): e23398.

[36] Everts T, Halfmaerten D, Neyrinck S, De Regge N, Jacquemyn H, Brys R. Accurate detection and quantification of seasonal abundance of American bullfrog (*Lithobates catesbeianus*) using ddPCR eDNA assays. Scientific Reports, 2021, 11: 11282.

[37] Strickler K M, Fremier A K, Goldberg C S. Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. Biological Conservation, 2015, 183: 85-92.

[38] Dejean T, Valentini A, Miquel C, Taberlet P, Bellemain E, Miaud C. Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. Journal of Applied Ecology, 2012, 49(4): 953-959.

[39] Lin M X, Zhang S, Yao M. Effective detection of environmental DNA from the invasive American bullfrog. Biological Invasions, 2019, 21(7): 2255-2268.

[40] Torresdal J D, Farrell A D, Goldberg C S. Environmental DNA detection of the golden tree frog (*Phytotriades auratus*) in bromeliads. PLoS One, 2017, 12(1): e0168787.

[41] Brozio S, Manson C, Gourevitch E, Burns T J, Greener M S, Downie J R, Hoskisson P A. Development and application of an eDNA method to detect the critically endangered Trinidad golden tree frog (*Phytotriades auratus*) in bromeliad phytotelmata. PLoS One, 2017, 12(2): e0170619.

[42] Mullin K E, Barata I M, Dawson J, Orozco-terWengel P. First extraction of eDNA from tree hole water to detect tree frogs: a simple field method piloted in Madagascar. Conservation Genetics Resources, 2022, 14(1): 99-107.

[43] 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.

[44] Wineland S M, Arrick R F, Welch S M, Pauley T K, Mosher J J, Apodaca J J, Olszack M, Holmes J N, Waldron J L. Environmental DNA improves Eastern Hellbender (*Cryptobranchus alleganiensis alleganiensis*) detection over conventional sampling methods. Environmental DNA, 2019, 1(1): 86-96.

[45] Pitt A L, Shinskie J L, Tavano J J, Hartzell S M, Delahunty T, Spear S F. Decline of a giant salamander assessed with historical records, environmental DNA and multi-scale habitat data. Freshwater Biology, 2017, 62(6): 967-976.

[46] Katano I, Harada K, Doi H, Souma R, Minamoto T. Environmental DNA method for estimating salamander distribution in headwater streams, and a comparison of water sampling methods. PLoS One, 2017, 12(5): e0176541.

[47] 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.

[48] Fukumoto S, Ushimaru A, Minamoto T. A basin-scale application of environmental DNA assessment for rare endemic species and closely related exotic species in rivers: a case study of giant salamanders in Japan. Journal of Applied Ecology, 2015, 52(2): 358-365.

[49] Bedwell M E, Hopkins K V S, Dillingham C, Goldberg C S. Evaluating Sierra Nevada yellow-legged frog distribution using environmental DNA. The Journal of Wildlife Management, 2021, 85(5): 945-952.

[50] Ruppert K M, Davis D R, Rahman M S, Kline R J. Development and assessment of an environmental DNA (eDNA) assay for a cryptic *Siren* (Amphibia: Sirenidae). Environmental Advances, 2022, 7: 100163.

[51] Goldberg C S, Strickler K M, Fremier A K. Degradation and dispersion limit environmental DNA detection of rare amphibians in wetlands: increasing efficacy of sampling designs. Science of the Total Environment, 2018, 633: 695-703.

[52] Villacorta-Rath C, Hoskin C J, Strugnell J M, Burrows D. Long distance (>20 km) downstream detection of endangered stream frogs suggests an important role for eDNA in surveying for remnant amphibian populations. PeerJ, 2021, 9: e12013.

[53] Takahara T, Iwai N, Yasumiba K, Igawa T. Comparison of the detection of 3 endangered frog species by eDNA and acoustic surveys across 3 seasons. Freshwater Science, 2020, 39(1): 18-27.

[54] Bedwell M E, Goldberg C S. Spatial and temporal patterns of environmental DNA detection to inform sampling protocols in lentic and lotic systems. Ecology and Evolution, 2020, 10(3): 1602-1612.

[55] Li W H, Song T J, Hou X L, Qin M S, Xu C X, Li Y M. Application of eDNA metabarcoding for detecting Anura on a tropical island. Diversity, 2021, 13(9): 440.

[56] Lopes C M, Sasso T, Valentini A, Dejean T, Martins M, Zamudio K R, Haddad C F B. eDNA metabarcoding: a promising method for anuran surveys in highly diverse tropical forests. Molecular Ecology Resources, 2017, 17(5): 904-914.

[57] Sasso T, Lopes C M, Valentini A, Dejean T, Zamudio K R, Haddad C F B, Martins M. Environmental DNA characterization of amphibian communities in the Brazilian Atlantic forest: potential application for conservation of a rich and threatened fauna. Biological Conservation, 2017, 215: 225-232.

[58] Goldberg C S, Strickler K M, Pilliod D S. Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. Biological Conservation, 2015, 183: 1-3.

[59] Schmidt B R, Kéry M, Ursenbacher S, Hyman O J, Collins J P. Site occupancy models in the analysis of environmental DNA presence/absence surveys: a case study of an emerging amphibian pathogen. Methods in Ecology and Evolution, 2013, 4(7): 646-653.

[60] de Souza L S, Godwin J C, Renshaw M A, Larson E. Environmental DNA (eDNA) detection probability is influenced by seasonal activity of organisms. PLoS One, 2016, 11(10): e0165273.

[61] Buxton A, Diana A, Matechou E, Griffin J, Griffiths R A. Reliability of environmental DNA surveys to detect pond occupancy by newts at a national scale. Scientific Reports, 2022, 12:1295.

[62] Thomsen P F, Kielgast J, Iversen L L, Wiuf C, Rasmussen M, Orlando L, Willerslev E. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. Molecular Ecology, 2012, 21(11): 2565-2573.

[63] 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.

[64] Shaw J L A, Clarke L J, Wedderburn S D, Barnes T C, Weyrich L S, Cooper A. Comparison of environmental DNA metabarcoding and conventional fish survey methods in a river system. Biological Conservation, 2016, 197: 131-138.

[65] Valentini A, Taberlet P, Miaud C, Civade R, Herder J, Thomsen P F, Bellemain E, Besnard A, Coissac E, Boyer F, Gaboriaud C, Jean P, Poulet N, Roset N, Copp G H, Geniez P, Pont D, Argillier C, Baudoin J M, Peroux T, Crivelli A J, Olivier A, Acqueberge M, Le Brun M, Møller P R, Willerslev E, Dejean T. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. Molecular Ecology, 2016, 25(4): 929-942.

[66] Nichols J D, Williams B K. Monitoring for conservation. Trends in Ecology & Evolution, 2006, 21(12): 668-673.

[67] Hänfling B, Handley L L, Read D S, Hahn C, Li J L, Nichols P, Blackman R C, Oliver A, Winfield I J. Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. Molecular Ecology, 2016, 25(13): 3101-3119.

[68] Doi H, Inui R, Akamatsu Y, Kanno K, Yamanaka H, Takahara T, Minamoto T. Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish. Freshwater Biology, 2017, 62(1): 30-39.

[69] Lamb P D, Hunter E, Pinnegar J K, Creer S, Davies R G, Taylor M I. How quantitative is metabarcoding: a meta-analytical approach. Molecular Ecology, 2019, 28(2): 420-430.

[70] Handley L L, Read D S, Winfield I J, Kimbell H, Johnson H, Li J L, Hahn C, Blackman R, Wilcox R, Donnelly R, Szitenberg A, Hänfling B. Temporal and spatial variation in distribution of fish environmental DNA in England's largest lake. Environmental DNA, 2019, 1(1): 26-39.

[71] Di Muri C, Lawson Handley L, Bean C W, Li J L, Peirson G, Sellers G S, Walsh K, Watson H V, Winfield I J, Hänfling B. Read counts from environmental DNA (eDNA) metabarcoding reflect fish abundance and biomass in drained ponds. Metabarcoding and Metagenomics, 2020, 4: 97-112.

[72] Boivin-Delisle D, Laporte M, Burton F, Dion R, Normandeau E, Bernatchez L. Using environmental DNA for biomonitoring of freshwater fish communities: comparison with established gillnet surveys in a boreal hydroelectric impoundment. Environmental DNA, 2021, 3(1): 105-120.

[73] Spear M J, Embke H S, Krysan P J, Vander Zanden M J. Application of eDNA as a tool for assessing fish population abundance. Environmental DNA, 2021, 3(1): 83-91.

[74] Griffiths R A, Foster J, Wilkinson J W, Sewell D. Science, statistics and surveys: a herpetological perspective. Journal of Applied Ecology, 2015, 52(6): 1413-1417.

[75] Ficetola G F, Barzaghi B, Melotto A, Muraro M, Lunghi E, Canedoli C, Lo Parrino E, Nanni V, Silva-Rocha I, Urso A, Carretero M A, Salvi D, Scali S, Scarì G, Pennati R, Andreone F, Manenti R. N-mixture models reliably estimate the abundance of small vertebrates. Scientific Reports, 2018, 8: 10357.

[76] Zinger L, Donald J, Brosse S, Gonzalez M A, Iribar A, Leroy C, Murienne J, Orivel J, Schimann H, Taberlet P, Lopes C M. Advances and prospects of environmental DNA in neotropical rainforests//A J. Dumbrell, E C. Turner, T M. Fayle eds. Advances in Ecological Research, Elsevier, 2020, 62, 331-373.

[77] Lacoursière-Roussel A, Dubois Y, Normandeau E, Bernatchez L. Improving herpetological surveys in eastern North *America* using the environmental DNA method. Genome, 2016, 59(11): 991-1007.

[78] Klymus K E, Richter C A, Chapman D C, Paukert C. Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp*Hypophthalmichthys molitrix*. Biological Conservation, 2015, 183: 77-84.

[79] Stewart K A. Understanding the effects of biotic and abiotic factors on sources of aquatic environmental DNA. Biodiversity and Conservation, 2019, 28(5): 983-1001.

[80] Maruyama A, Nakamura K, Yamanaka H, Kondoh M, Minamoto T. Correction: the release rate of environmental DNA from juvenile and adult fish. PLoS One, 2019, 14(2): e0212145.

[81] Goldberg C S, Turner C R, Deiner K, Klymus K E, Thomsen P F, Murphy M A, Spear S F, McKee A, Oyler-McCance S J, Cornman R S, Laramie M B, Mahon A R, Lance R F, Pilliod D S, Strickler K M, Waits L P, Fremier A K, Takahara T, Herder J E, Taberlet P. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. Methods in Ecology and Evolution, 2016, 7(11): 1299-1307.

[82] Chambers D L. Increased conductivity affects corticosterone levels and prey consumption in larval amphibians. Journal of Herpetology, 2011, 45(2): 219-223.

[83] Barnes M A, Turner C R, Jerde C L, Renshaw M A, Chadderton W L, Lodge D M. Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. Environmental Science & Technology, 2014, 48(3): 1819-1827.

[84] Sassoubre L M, Yamahara K M, Gardner L D, Block B A, Boehm A B. Quantification of environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates for three marine fish. Environmental Science & Technology, 2016, 50(19): 10456-10464.

[85] Turner C R, Barnes M A, Xu C C Y, Jones S E, Jerde C L, Lodge D M. Particle size distribution and optimal capture of aqueous macrobial eDNA. Methods in Ecology and Evolution, 2014, 5(7): 676-684.

[86] Harrison J B, Sunday J M, Rogers S M. Predicting the fate of eDNA in the environment and implications for studying biodiversity. Proceedings Biological Sciences, 2019, 286(1915): 20191409.

[87] Brys R, Haegeman A, Halfmaerten D, Neyrinck S, Staelens A, Auwerx J, Ruttink T. Monitoring of spatiotemporal occupancy patterns of fish and amphibian species in a lentic aquatic system using environmental DNA. Molecular Ecology, 2021, 30(13): 3097-3110.

[88] Spear S F, Groves J D, Williams L A, Waits L P. Using environmental DNA methods to improve detectability in a hellbender (*Cryptobranchus alleganiensis*) monitoring program. Biological Conservation, 2015, 183: 38-45.

[89] Kamoroff C, Goldberg C S. An issue of life or death: using eDNA to detect viable individuals in wilderness restoration. Freshwater Science, 2018, 37(3): 685-696.

[90] Turner C R, Uy K L, Everhart R C. Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. Biological Conservation, 2015, 183: 93-102.

[91] Boehrer B, Schultze M. Stratification of lakes. Reviews of Geophysics, 2008, 46(2): RG2005.

[92] Seymour M, Deiner K, Altermatt F. Scale and scope matter when explaining varying patterns of community diversity in riverine metacommunities. Basic and Applied Ecology, 2016, 17(2): 134-144.

[93] Seymour M, Durance I, Cosby B J, Ransom-Jones E, Deiner K, Ormerod S J, Colbourne J K, Wilgar G, Carvalho G R, de Bruyn M, Edwards F, Emmett B A, Bik H M, Creer S. Acidity promotes degradation of multi-species environmental DNA in lotic mesocosms. Communications Biology, 2018, 1: 4.

[94] de Anna P, Le Borgne T, Dentz M, Tartakovsky A M, Bolster D, Davy P. Flow intermittency, dispersion, and correlated continuous time random walks in porous media. Physical Review Letters, 2013, 110(18): 184502.

[95] Shogren A J, Tank J L, Egan S P, August O, Rosi E J, Hanrahan B R, Renshaw M A, Gantz C A, Bolster D. Water flow and biofilm cover influence environmental DNA detection in recirculating streams. Environmental Science & Technology, 2018, 52(15): 8530-8537.

[96] Deiner K, Bik H M, Mächler E, Seymour M, Lacoursière-Roussel A, Altermatt F, Creer S, Bista I, Lodge D M, de Vere N, Pfrender M E, Bernatchez L. Environmental DNA metabarcoding: transforming how we survey animal and plant communities. Molecular Ecology, 2017, 26(21): 5872-5895.

[97] Carraro L, Stauffer J B, Altermatt F. How to design optimal eDNA sampling strategies for biomonitoring in river networks. Environmental DNA, 2021, 3(1): 157-172.

[98] Fremier A K, Strickler K M, Parzych J, Powers S, Goldberg C S. Stream transport and retention of environmental DNA pulse releases in relation to hydrogeomorphic scaling factors. Environmental Science & Technology, 2019, 53(12): 6640-6649.

[99] 雷姚, 周春花, 欧阳珊, 吴小平. 不同环境样本类型对蚌类环境 DNA 监测的差异研究. 水生生物学报. (2022-9-29) [2023-01-06]. http://kns.cnki.net/kcms/detail/42.1230.Q.20220927.1154.006.html

[100] Bylemans J, Furlan E M, Gleeson D M, Hardy C M, Duncan R P. Does size matter? An experimental evaluation of the relative abundance and decay rates of aquatic environmental DNA. Environmental Science & Technology, 2018, 52(11): 6408-6416.

[101] Wilcox T M, Zarn K E, Piggott M P, Young M K, McKelvey K S, Schwartz M K. Capture enrichment of aquatic environmental DNA: a first proof of concept. Molecular Ecology Resources, 2018, 18(6): 1392-1401.

[102] Jo T, Murakami H, Masuda R, Sakata M K, Yamamoto S, Minamoto T. Rapid degradation of longer DNA fragments enables the improved estimation of distribution and biomass using environmental DNA. Molecular Ecology Resources, 2017, 17(6): e25-e33.

[103] Stotzky G. Persistence and biological activity in soil of insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and of bacterial DNA bound on clays and humic acids. Journal of Environmental Quality, 2000, 29(3): 691-705.

[104] Pietramellara G, Ascher J, Borgogni F, Ceccherini M T, Guerri G, Nannipieri P. Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance. Biology and Fertility of Soils, 2009, 45(3): 219-235.

[105] Pawlowski J, Kelly-Quinn M, Altermatt F, Apothéloz-Perret-Gentil L, Beja P, Boggero A, Borja A, Bouchez A, Cordier T, Domaizon I, Feio M J, Filipe A F, Fornaroli R, Graf W, Herder J, van der Hoorn B, Iwan Jones J, Sagova-Mareckova M, Moritz C, Barquín J, Piggott J J, Pinna M, Rimet F, Rinkevich B, Sousa-Santos C, Specchia V, Trobajo R, Vasselon V, Vitecek S, Zimmerman J, Weigand A, Leese F, Kahlert M. The future of biotic indices in the ecogenomic era: integrating (e)DNA metabarcoding in biological assessment of aquatic ecosystems. Science of the Total Environment, 2018, 637/638: 1295-1310.

[106] Cordier T, Alonso-Sáez L, Apothéloz-Perret-Gentil L, Aylagas E, Bohan D A, Bouchez A, Chariton A, Creer S, Frühe L, Keck F, Keeley N, Laroche O, Leese F, Pochon X, Stoeck T, Pawlowski J, Lanzén A. Ecosystems monitoring powered by environmental genomics: a review of current strategies with an implementation roadmap. Molecular Ecology, 2021, 30(13):2937-2958.