

文章编号: 1674-5566(2023)03-0564-11

DOI:10.12024/jsou.20221104019

环境 DNA 技术在水生生物监测中的挑战、突破和发展前景

李晨虹^{1,2}, 凌岚馨^{1,2}, 谭娟^{1,3}, 林晓龙^{1,2}, 王辉^{1,2}, 孙冰皎⁴, 李 璿⁴

(1. 上海海洋大学 环境 DNA 技术与水生态健康评估工程中心, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 海洋动物系统分类与进化上海高校重点实验室, 上海 201306; 3. 上海市环境科学研究院, 上海 200233; 4. 中国环境监测总站, 北京 100102)

摘要: 近年来, 人类活动影响导致水生态系统平衡遭到破坏, 水生生物多样性锐减, 水生态健康状况堪忧。快速、有效地监测水生生物是评价水生态健康, 科学开展水生态环境保护和管理的必要前提。环境 DNA (environmental DNA, eDNA) 技术是一种运用分子生物学方法, 从环境样品中提取 DNA 并进行测序和分析来反映物种信息的技术。由于该技术只需采集环境样品(水、土壤、沉积物等)便能获得大量物种信息, 具有非入侵性、灵敏性及低成本等特点, 近年来备受关注。但是, 已有的研究实践表明, 目前 eDNA 技术仍然面临一些挑战, 阻碍了其常态化、业务化应用。从生物多样性调查、入侵和濒危物种监测、食性研究等方面列举了 eDNA 技术在水生生物监测中的应用实例, 并总结目前 eDNA 技术在采样效率、假阳性和假阴性、来源不确定性、数据库缺失和定量结果不准确等 5 个方面所面临的问题和挑战; 进一步探讨研究者针对这些问题所提出的相应解决方案和技术突破。最后, 对 eDNA 技术未来的发展前景进行了展望, 以期为研究人员使用 eDNA 技术提供启发。

关键词: eDNA 技术; 应用; 挑战; 突破; 展望

中图分类号: X 835 **文献标志码:** A

水是生命之源, 是人类赖以生存和发展不可缺少的物质资源之一。然而, 随着社会经济的发展, 水生态系统遭受到越来越严重的破坏, 生物多样性锐减。生物多样性是维持生态平衡的基础, 在保障各类生态系统功能及其服务中起着关键作用, 是生态系统响应环境变化的重要指标。因此, 对水生生物进行监测是开展水生态环境保护的基本前提^[1]。传统的水生生物监测主要是现场采集生物个体, 利用形态学方法对所获样本进行研究, 耗时长、成本高, 而且对水生生物及其生境破坏程度大, 准确度受限于分类学专业知识, 而目前分类学专业人才稀缺已经成为国际共识^[2-3]。

环境 DNA (environmental DNA, eDNA) 是指从环境样本中直接获取的 DNA, 包括动植物、微生物在空气、土壤、水体等环境中释放的 DNA^[4]。eDNA 技术是指利用各种分子技术如 PCR 技术从这些环境样品中富集目的基因片段进行定性

或定量分析的方法^[5-6]。相较于传统调查方法, eDNA 技术因其众多优点而愈发受到研究者^[7]的重视, 如: 耗时少, 成本低; 采样方便, 不需要专业的分类学鉴定知识; 创伤性低, 不会破坏生态环境; 应用广泛, 如保护生物学、入侵生态学等; 不依赖动物样本, 不受禁捕的限制, 可以大量采样等。

作为一项极具推广应用前景的新型生物监测技术, 目前该技术发展现状距离实现常态化应用还面临着一些瓶颈, 比如假阴性、假阳性问题、标准化技术规范缺乏、本土数据库不完善、eDNA 来源不确定性、利用 eDNA 对生物精确定量亟待突破等。本文根据已有的研究成果综述了 eDNA 技术在水生生物监测领域的应用, 深入分析了 eDNA 技术正面临的挑战及研究者已做出的相应技术突破, 最后展望了 eDNA 技术发展的前景(表 1), 以期为推动 eDNA 技术在水生态监测领

收稿日期: 2022-11-09 修回日期: 2022-12-27

基金项目: 国家重点研发计划专项(2022YFC2601301)

作者简介: 李晨虹(1973—), 男, 教授, 研究方向为环境 DNA。E-mail: chli@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydx.com>

域的发展和技术常态化应用提供一些见解。

表 1 eDNA 技术的优点、应用、挑战及突破点

Tab. 1 Advantages, applications, challenges and breakthroughs of eDNA technology

类型 Types	优点 Advantages	应用 Applications	挑战 Challenges	突破点 Breakthroughs
内容 Contents	相对传统调查成本较低; 对分类学鉴定专业知识要求较低; 对生态环境侵入性低、影响较小; 无需获得动物样本,可在禁渔期进行大量采样; 可应用于保护生物学、入侵生态学等学科研究。	生物多样性调查; 生物量估算; 入侵生物、濒危物种监测; 食性及食物网研究。	采样、过滤效率有待提高; 假阴性和假阳性; eDNA 来源及物种存活情况未知; 缺少完备的数据库; 定量结果易受多种因素影响。	设备创新、流程优化; 控制污染、开发新引物; eRNA 技术; 建立完善的区域性数据库; 研究 eDNA 在水体中的动态。

1 eDNA 技术的应用

1.1 生物多样性调查

目前,eDNA 技术已广泛应用于生物多样性调查。大量研究表明,eDNA 技术与传统方式调查结果具有一致性,甚至较传统调查获得的种类更为全面。李晓玲等^[8]利用 eDNA 技术对东海鱼类进行物种多样性分析,检测到历史记录的大部分鱼类,也检测到尖突吻鲷 (*Rhynchoplates oxyrhynchus*) 等一些未曾报道或报道较少的鱼类,为东海鱼类多样性研究提供补充。蒋佩文等^[9]分别利用 eDNA 技术和底拖网对珠江河口鱼类展开多样性调查,其中 eDNA 技术检测到 175 种鱼类,而底拖网仅采集到 47 种鱼类。吕嘉诚等^[10]利用 eDNA 宏条形码技术和显微鉴定计数法调查柴河浮游藻类的群落组成和分布,发现显微鉴定计数法检测到了 6 门 16 目 18 科 24 属的浮游藻类,而通过 eDNA 技术检测到了来自 9 门 25 目 33 科 43 属的浮游藻类。

1.2 生物量估算

已有研究表明,eDNA 的浓度和生物丰度之间成正相关关系。2012 年,TAKAHARA 等^[11]和巴日斯^[12]率先利用 eDNA 技术在野外和实验室条件下对鲤进行生物量评估,结果显示 eDNA 的浓度与鲤的数量呈正比例关系。闫卉果等^[13]利用 eDNA 技术,得到了岩原鲤 (*Procypris rabaudi*) eDNA 浓度与其数量的相关性曲线,且在移除源生物后,eDNA 浓度与时间呈负相关,证明 eDNA 技术可以有效反映出岩原鲤在不同采样点的生物量及时空分布。高天翔等^[14]以褐菖鲉为研究对象,探讨基于养殖池内褐菖鲉的养殖密度与其 eDNA 浓度的关系,发现褐菖鲉养殖密度与其 eDNA 浓度呈线性相关关系,为基于 eDNA 技术

的褐菖鲉 (*Sebastes marmoratus*) 生物量评估奠定了基础。牟铭等^[15]在实验室可控条件下,以凡纳滨对虾 (*Penaeus vannamei*) 和墨吉对虾 (*Penaeus merguensis*) 为研究对象探究 eDNA 技术检测种群相对数量的准确性,结果表明水体中 eDNA 组成与其高通量测序 reads 数间呈明显线性关系。这些研究结果表明,eDNA 技术对于评估物种生物量具有良好的应用前景。

1.3 生物入侵、濒危物种监测

生物入侵早期或者濒危物种都具备同一特点,即数量少。在此情景下,eDNA 技术较传统监测方法更为有效。陈晓等^[16]利用 eDNA 技术和传统方法对苏州地区小管福寿螺的发生情况进行了检测,结果显示,eDNA 技术检测到的小管福寿螺 (*Pomacea canaliculata*) 发生率远高于传统观察法。eDNA 技术亦可对珍稀濒危物种进行有效监测。徐念等^[17]利用 eDNA 技术开展长江中下游生物多样性监测,发现了长江江豚的序列。采用 eDNA 技术,即使在生物数量比较少的阶段,也能有效检测出目标物种,表明了 eDNA 技术在生物入侵和濒危物种监测上具有重大的应用价值。

1.4 食性研究

传统的食性分析主要依赖于基于形态学鉴定的消化残留物观察法和肠道解剖法。基于 eDNA 技术研究动物的食性,避免了在已经消化、难以分辨的食物残渣中分析物种这一难题,可作为一种高效、实用的方法。周天成等^[18]通过扩增塔形马蹄螺 (*Tectus pyramis*) 消化道的 DNA 并进行测序分析,发现其消化道中有孔虫、真菌,后生物是最重要的类群,推测其属于沉积物碎屑食性生物。研究某一地区的动物食性,有利于识别该地区营养生态位,重建食物网,对于研究生态稳定具有重要意义^[19],而 eDNA 技术对此显示出

巨大的潜力。

2 eDNA 技术面临的困境

尽管 eDNA 技术在生物多样性保护和生态监测领域中的有效性和灵敏性已得到证实,但其仍面临着一系列挑战,如:假阳性无处不在;水体中有的生物检测不到;检测到的却不知道是什么;测到了但也无法确定水中是否真的存在该生物;水样过滤、eDNA 提取和分子标记等尚未有统一标准;种群定量效果差等。这一系列问题使部分研究者对 eDNA 技术的认可度不高,从获取 eDNA 监测数据到实际支撑管理应用还有很多技术要突破。

2.1 采样效率有待提高

目前,关于 eDNA 技术,不同研究者实验操作方法各不相同,导致研究结果之间可比性差^[20]。水生生物调查常用的手段是采集水样进行过滤,但存在过滤速度慢和样品不易保存等问题。研究^[21-22]表明,滤膜材质及孔径大小对检测结果有一定影响。一般而言,滤膜孔径越小,捕获的 eDNA 越多,检测出的物种越多,但随之而来的是过滤时间更久。水样过滤后到运输至实验室进行 eDNA 提取前,滤膜上的 eDNA 会随时间而逐渐降解,将滤膜存储于干冰中可以有效防止 eDNA 降解,但考虑到野外采样的特殊性,采样过程中携带干冰并不方便。因此,如何选择合适的滤膜及其孔径以平衡物种检出效率和过滤时间,并且对滤膜进行有效保存是值得深入探究的。

2.2 假阴性和假阳性

应用 eDNA 技术最常面临的问题是假阴性和假阳性问题。当目标物种存在却未被检测到即假阴性,当检测到环境中不存在的物种或是死亡生物即假阳性^[5, 23-24]。造成假阴性的原因通常包括:目标物种 eDNA 浓度过低(包括样品中生物 eDNA 释放量本身过低,以及运输过程中降解导致的 eDNA 损失等)、样品本身的理化特性(如海水的高盐度)抑制后续 PCR 扩增^[25]、引物通用性不高,分辨率低(例如,在鱼类多样性调查中, MiFish 引物被认为是扩增效果最好的通用引物,虽然其能够扩增出 90% 的鱼类线粒体 12S rRNA 的部分序列,但该引物分辨率不高,种属区分度有限^[26-27])等。此外,由于 PCR 扩增具有随机性,即使是同一个样本,平行扩增之间得到的结

果也可能不同,某些低丰度物种极有可能检测不到^[28]。这些因素都会造成假阴性结果。

假阳性结果主要是由于污染所致。若在采样过程中,未能做好防污染措施,极有可能造成样本之间互相污染。且后续 DNA 提取、PCR 扩增等实验中,过程繁琐、所需试剂繁多,极大增加了污染的风险,也会造成假阳性结果。就解决假阴性的问题而言,设计分辨率高的引物、开发多位点标记等是提高 eDNA 检测效率的主要途径;而就假阳性而言,制定标准化的技术规范是关键举措之一。

2.3 eDNA 来源、物种存活情况未知

eDNA 在水体中容易降解,其释放量、分布易受到各种因素影响,如 eDNA 来源、水动力条件、水温、pH、光照等,且还会受人类活动的影响^[29-35]。这些因素会给检测结果带来一定误差。例如,凌岚馨等^[36]在利用 eDNA 技术开展崇明岛内河鱼类多样性调查时发现,eDNA 技术检出了非本地鱼类:尼罗罗非鱼和大口黑鲈。这两种鱼在国内属于养殖类品种,而在崇明岛内河中检测出的原因极有可能是采样点附近存在养殖场或者居民区,通过养殖废水或生活污水排放至河道从而造成错误的检测结论。可见 eDNA 来源未知会影响本土物种调查结果的真实性。李苗等^[37]以中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)为研究对象,探究 eDNA 在水体中的存留时间。研究表明,与长片段 eDNA 相比,短片段 eDNA 在水体中存留时间更久,其完全降解需要 30 d。物种死亡降解后仍能在该区域被检测到,这会造成对物种真实的存活状况难以进行有效判断。

2.4 数据库缺失

eDNA 技术调查结果准确性存在争议的另一关键是本土数据库的缺失。线粒体基因常作为 eDNA 研究的通用分子标记。以鱼类多样性调查为例,常用分子标记有细胞色素 *b* (Cytochrome *b*, *Cytb*) 基因、12S rRNA、16S rRNA 和细胞色素 *c* 氧化酶 I (*CO I*) 基因等^[38-41]。不同的学者常用这些不同的标记开展 eDNA 研究,导致研究者建立的数据库也各不相同,无法共享。由于数据库的不完善,检测结果常出现未知分类操作单元 (Operational taxonomic units, OTUs)。陈治等^[42]以青岛海底世界软骨鱼缸为研究区域,探讨了 eDNA 技术对鱼类多样性调查的准确性,结果显

示,由于参考序列缺失,在经过 3% 阈值剔除后,有 4 个最高相似度 $\leq 98\%$ 的 OTUs 无法具体明确到种,只能大致确定其所在的阶元。一些研究学者也致力于构建本土数据库,如中国淡水大型底栖无脊椎动物条形码数据库^[43],但数据库容量仍不足。

2.5 定量结果易受多因素影响

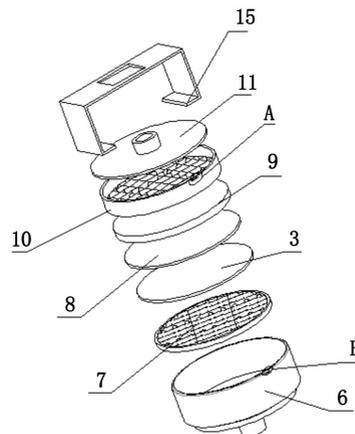
监测种群动态是进行物种有效管理的关键。目前利用 eDNA 技术对物种进行定量研究都依赖定量 PCR (Quantitative polymerase chain reaction, qPCR) 的方法,通过 eDNA 拷贝数估算种群生物量。例如,闫卉果等^[13]使用梯度稀释质粒标准品作为模板,拟合出岩原鲤 12S rRNA 基因 qPCR 标准曲线,根据 qPCR 的阈值循环数 (C_t) 推算样品拷贝数,再根据拷贝数和岩原鲤个数得到岩原鲤 DNA 浓度与其个体数量的相关性曲线,从而推算该物种的相对密度。由于物种释放的 eDNA 浓度受到物种本身(个体大小、是否处于繁殖期)、采样季节(温度、光照等)、技术方法(采样过程是否标准、eDNA 提取、PCR 引物设计)等因素影响,得到的结果也只能对特定的 DNA 进行定量,无法还原物种实际的丰度^[44-46]。YATES 等^[47]整理了实验数据,检验 eDNA 与两个丰度指标(生物量及密度)之间的相关性,并使用混合效应元分析,量化了实验室和自然环境中这种相关性的强度。结果发现,与自然环境相比,实验室环境下,eDNA 浓度与这两个丰度指标的相关性更强,而在自然环境中的相关性较弱。因此,使用 eDNA 进行物种丰度评估时,仍需谨慎对待。

3 eDNA 技术的突破

3.1 设备创新、流程优化

通常,eDNA 技术应用于水环境样本都是将水样过滤至滤膜上,进行 eDNA 富集,但水样浑浊时滤膜容易堵塞,耗时长。王月等^[48]以试验水缸的水样为研究对象,通过对 PCR 体系不断优化比较了 4 种免 DNA 提取 PCR 直扩方法的效果。结果显示,诺唯赞高保真酶扩增效果最好,TaKaRa 免提取试剂盒不能扩增出目标片段。但由于野外 eDNA 浓度普遍偏低,免 DNA 提取方法并不适用,仍需过滤水样至滤膜上,因此,如何提高过滤效率是野外监测亟待解决的关键问题之一。GOVINDARAJAN 等^[49]开发了一种全新的大

容量 eDNA 采样器,由 12 个泵及 12 个滤器组成,过滤速度达到 2 L/min,且一次性可以运行 2 个泵,极大地减少了过滤时间,提高了采样效率。鉴于滤膜易堵塞问题,本课题组发明了一种用于 eDNA 的过滤器(图 1,专利号:202210754981.3),利用滤棉加滤膜组合结构,同样过滤 1 L 水,该过滤器比原有单一滤膜节省 13 min,且过滤提取的 eDNA 总量是单一滤膜提取的 4 倍,提高了采样效率和检测结果的准确性。



部件包括:3. 滤膜;6. 滤器底座;7. 滤膜支架;8. 防静电隔网;9. 滤棉;10. 限位压网;11. 滤器上盖;15. 防爆卡和 AB 限位卡。

Including: 3. Filter membrane; 6. Filter holder; 7. Filter supporter; 8. Anti-static mesh; 9. Thick filter; 10. Immobilizing ring; 11. Cap; 15. Fastening clip and A/B fastening clip.

图 1 用于 eDNA 的过滤器

Fig. 1 A filtering system for environmental DNA

目前,人工被动 eDNA 采样器受到研究者的极大关注。被动采样避免了携带过滤设备、过滤时间过长的问题。KIRTANE 等^[50]设计了一种被动 eDNA 采样器 (PEDS),由一个装满吸附剂的小袋组成,小袋悬浮在水中,随着时间的推移收集 eDNA。试验结果证实,PEDS 是一种有效的 eDNA 捕获装置。BESSEY 等^[51]将固定膜浸没在水柱中,证明了被动收集 eDNA 的可行性,认为该方法低成本且更具扩展性。YAO 等^[52]和 RIVERA 等^[53]测试了水生生物膜将鱼类 eDNA 截留在大型湖泊中的能力,结果证实水生生物膜作为 eDNA 被动采样器是有效的,表明了从生物膜中有效监测鱼类群落的可能性。

自动化采样近年来逐渐受到重视,尤其对于在深海等偏远地区采集样本十分有益。自动化

设备与环境样本处理器相结合,可以执行滤水、DNA 提取和 PCR 分析,实现远程 eDNA 分析^[52-54]。现场快速检测技术的发展能够更加有效监测和管理入侵及濒危物种。DOI 等^[55]开发了一种利用“超快速移动 PCR 平台”的现场 eDNA 检测方法,对湖泊中的鲢(*Hypthalmichthys molitrix*)进行检测。结果显示,该方法可在 30 min 内完成测量并且能够保持较高的灵敏度。

由于 eDNA 技术流程缺乏统一标准,研究者致力于比较不同方法下 eDNA 检测效果,以期优化该流程。王月等^[48]通过微滴式数字 PCR 定量技术,优化了鱼类 eDNA 样本的捕获、保存方法。结果显示,在同一孔径、不同材质的 6 种滤膜中,eDNA 捕获量最高的是混合纤维素膜;滤膜在 -20 °C 冷冻保存及利用 Longmire's buffer 保存液保存的效果最好。WILLIAMS 等^[56]的研究结果也显示,Longmire's 溶液可以有效保存 eDNA,减缓 eDNA 降解速度。陈治等^[22]建立和优化了舟山近海高浊度水样 eDNA 的获取方法,认为苯扎氯铵对 eDNA 降解有明显的抑制作用,这与 TAKAHARA 等^[57]的研究结果一致。

3.2 控制污染、开发新引物

针对假阳性问题建议,众多学者对 eDNA 技术流程的各个步骤分别进行优化。首先在采样过程中,采样工具应及时清洗并消毒,设置阴性对照,一次性用品如口罩、手套等及时更换^[58-59]。实验室污染难以有效避免,尤其是 eDNA 在 PCR 扩增后,检测结果出现假阳性的频率更高。MIYA 等^[60]建议为 eDNA 专门建立无菌实验室,进行 PCR 扩增时,eDNA 提取、PCR 前准备(体系配置)、PCR 扩增及后续实验应在 3 个不同的实验室进行操作,每个实验室都需要单独的实验仪器、实验服等。并且,遵循单向原则依次进入实验室,且实验人员当天只能进行一个 eDNA 实验。WANG 等^[61]设计了内嵌式条形码,发现在建库的第一步为样品加上条形码标记可以有效区分后续实验中产生的交叉污染,减少 eDNA 实验的假阳性结果。

出现假阴性常见的原因即样本中含有 PCR 抑制物质或者引物通用性不高。目前最常使用的减轻 PCR 抑制的方法是添加缓冲剂,如牛血清白蛋白、Dax-8 等^[62-63],或稀释模板 DNA(对于目标物种自身浓度过低时并不适用,更易造成假阴

性结果),具体选择哪种方法要根据样本类型等确定。基于保守区域设计的通用引物能够同时检测出多个物种,但由于其分辨率不高,即使扩增出目标片段也无法确定具体物种或者出现错误 OTU。设计 eDNA 引物既要考虑引物的通用性,又要考虑该引物扩增出的片段在不同物种之间的遗传多样性^[55]。引物的适用性取决于扩增的目标物种及研究区域的生物多样性组成。不同的引物对同一个样本扩增出的结果可能会显示出不同的分类范围,因此,可以结合使用多个引物集来增加分类覆盖率和物种检出概率^[41, 64-66]。尽管如此,目前合适的分子标记和相应的扩增引物并不多。我们认为开发出新的通用性强、分辨率高、特异性合适的引物是当务之急。

3.3 eRNA

eDNA 在水流或者其他介质的传播下,会造成错误的检测结果,如检测到的 eDNA 并非源自在研究区域生活的物种,而是由其他地域流入该区域或者死亡个体遗留的 eDNA。最近,eRNA 技术逐渐被广泛提及。由于 RNA 不如 DNA 稳定,易降解,且 eRNA 的降解速度比 eDNA 更快^[67],因此,在环境中存留的时间更短。WOOD 等^[68]调查了两种海洋无脊椎动物的 eDNA 和 eRNA 脱落率和降解情况,发现去除生物体后,水中的 eRNA 在 13 h 后无法检测到,而同一样本中的 eDNA 在 94 h 后检测不到。虽然 eRNA 相较于 eDNA 而言降解速度更快,可检测性更低,但 eRNA 可以帮助研究者更好地推测出物种存活情况,且不易造成因非本地生物群和污水污染而造成的假阳性结果^[52]。将 eRNA 这一特征与定量 RT-PCR 方法结合,可以在生物分布时间和空间检测上提高灵敏度,为入侵物种管理和濒危物种保护提供新的思路。TSURI 等^[69]在有斑马鱼(*Danio rerio*)生活的水族箱水中检测到了 6 个 mRNA 靶点,其中一些是组织特异性的,证明了 eRNA 除了可以用于检索物种存在与否之外,还可以用于其他信息的研究,证实了以 mRNA 为靶点的 eRNA 分析在评估水生脊椎动物生理状态方面的可行性。虽然目前关于 eRNA 检测水生生物的研究仍然较少,技术上有待突破,但由于可提供生物的生理、生殖状态等信息,eRNA 技术发展前景不可估量,可成为生物多样性保护的有力工具。

3.4 完善数据库

进行 eDNA 研究,参考数据库必不可少。目前已建立了全球基因数据库,如 NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank)、国际生命条形码数据库 (<http://www.boldsystems.org>)、鱼类 DNA 条形码数据库 (www.fishbol.org)、哺乳动物 DNA 条形码数据库 (<http://www.mammaliabol.org>) 和鸟类 DNA 条形码数据库 (<http://www.barcodingbirds.org>) 等^[59],这些数据库的数据在不断更新和完善。还有学者在致力于建设本土基因库,如海南岛淡水鱼类 eDNA 宏条形码参考数据库^[70],但仍旧不够完整。因此,建议可以从以下方面进行改进:一是统一分子标记,选择检测效果最优的通用引物进行数据库的补充,避免各研究者建立的数据库无法共享;二是建立完整的脊椎动物线粒体数据库,针对同一类群,无论研究者选择何种标记,都有该参考数据库进行验证,保证不同研究结果之间具有对比性;三是积极建立本土数据库,提高本地物种数据库的有效性和完整性,加强全球资源共享。

3.5 研究 eDNA 动态机制、研发新技术

eDNA 浓度易受生物和非生物因素影响,将其作为物种生物量的估算工具一直存在争议,因此,需要加强 eDNA 动态机制的研究,建立 eDNA 浓度与生物、非生物因子之间的量化关系,以此提高 eDNA 定量检测结果的准确性^[71]。目前,几项新技术正在被开发用来实现量化目标群体这一目的。第一种是内标 DNA 法,即在提取 eDNA 前向样本中加入一定量的内标 DNA,与样本一起提取并扩增,根据内标 DNA 的丰度来推测样本的丰度。内标 DNA 可以是细菌,或者合成的嵌合 DNA^[72-75]。SATO 等^[76]采用该方法对日本沿海水域的人工珊瑚礁及其周围站点的海洋鱼类进行调查,生成了多种鱼类的丰度数据,认为该方法使得同时检测多个物种的 eDNA 浓度成为可能。第二种技术是细胞体积校正系数法 (Correction factor, CF)^[77]。CF 是通过物种细胞体积和细胞含有的基因拷贝数之间建立联系得到校正系数,实现 eDNA 宏条形码物种丰度的绝对定量^[75]。THOMAS 等^[78]利用该方法对鱼类和斑海豹 (*Phoca vitulina*) 进行定量评估,研究结果表明,该方法是评估和纠正 DNA 原条形码研究偏差的有效工具。第三种技术是核 DNA

(nuDNA)。由于线粒体 DNA 片段在细胞中的丰富性,大多数 eDNA 研究都以其作为遗传标记。然而,最近一些研究报道了多拷贝核 DNA 片段在 eDNA 分析中的应用,如核糖体 RNA 基因中的内部转录间隔区 (ITS),认为其比线粒体 eDNA (mt-eDNA) 具有更高的检测能力和更快的降解速度^[34,79-81]。JO 等^[82]整理了以往的研究并重新分析了 mt-eDNA 和 nu-eDNA 浓度之间的关系,并用斑马鱼进行了一个水族箱实验,以比较跨遗传区域的关系。已有的数据显示多拷贝 nu-eDNA 与物种丰度之间的关系比 mt-eDNA 更准确。此外,水族箱实验证实在中性条件下,多拷贝 nu eDNA 的降解速度比 mt eDNA 快,从而降低了假阳性及物种丰度被高估的可能。虽然还需要进行更多的 nu-eDNA 研究来支持该结论,但可以推断 nu-eDNA 在提高物种丰度评估的准确性方面有巨大潜力。

4 eDNA 技术的发展前景

传统的水生态监测研究主要依赖于形态学鉴定方法,耗时长、成本高、准确度低。随着二代测序和三代测序技术的发展,eDNA 技术以其高效、精准等优点而越来越被广泛应用,成为新一代生物多样性监测工具。尽管 eDNA 技术目前还面临着一系列问题有待突破,但其在未来仍有广泛的应用前景。正如前文所提到的自动化采样装置、现场快速监测设备、eRNA 技术等,一旦这些设备被广泛应用或技术被验证推广后,eDNA 技术一定可以在最大限度上发挥潜力,产生更多有益于生态环境保护的生物多样性信息。我们期望在未来:eDNA 技术假阳性的问题能够完全解决;灵敏性问题基本解决,远远优于传统调查方法;基因数据库将得到完善,分类准确率和效率高于传统方法,甚至帮助发现新物种;结合水动力模型和 DNA 动态模型能更好地判断 DNA 的来源,甚至可以通过现场快速检测精确定位活体位置;虽无法精确对种群数量进行定量,但可以提供相对数量、有效群体大小、遗传多样性等更多信息;eDNA 技术不断发展创新,推动产业化,甚至可以结合人工智能、机器学习算法等实现智能化检测。我们有理由相信,在未来,eDNA 技术一定会成为主流生态监测方法之一。

参考文献:

- [1] 高天翔, 陈治, 王晓艳. 近海鱼类多样性调查新方法: 环境 DNA 分析技术[J]. 浙江海洋大学学报(自然科学版), 2018, 37(1): 1-7.
GAO T X, CHEN Z, WANG X Y. Environmental DNA, a new method for fish diversity investigation in the coastal waters[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2018, 37(1): 1-7.
- [2] 姜维, 赵虎, 邓捷, 等. 环境 DNA 分析技术: 一种水生生物调查新方法[J]. 水生态学杂志, 2016, 37(5): 1-7.
JIANG W, ZHAO H, DENG J, et al. Detection of aquatic species using environmental DNA [J]. Journal of Hydroecology, 2016, 37(5): 1-7.
- [3] 马鸿娟, STEWART K, 马利民, 等. 环境 DNA 及其在水生生态系统保护中的应用[J]. 生态学杂志, 2016, 35(2): 516-523.
MA H J, STEWART K, MA L M, et al. Environmental DNA and its application in protecting aquatic ecosystems[J]. Chinese Journal of Ecology, 2016, 35(2): 516-523.
- [4] THOMSEN P F, WILLERSLEV E. Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity [J]. Biological Conservation, 2015, 183: 4-18.
- [5] 秦传新, 左涛, 于刚, 等. 环境 DNA 在水生生态系统生物量评估中的研究进展[J]. 南方水产科学, 2020, 16(5): 123-128.
QIN C X, ZUO T, YU G, et al. Advances in research of environmental DNA (eDNA) in biomass assessment of aquatic ecosystems [J]. South China Fisheries Science, 2020, 16(5): 123-128.
- [6] FICETOLA G F, MIAUD C, POMPANON F, et al. Species detection using environmental DNA from water samples[J]. Biology Letters, 2008, 4(4): 423-425.
- [7] DOI H, INUI R, AKAMATSU Y, et al. Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish[J]. Freshwater Biology, 2017, 62(1): 30-39.
- [8] 李晓玲, 刘洋, 王丛丛, 等. 基于环境 DNA 技术的夏季东海鱼类物种多样性研究[J]. 海洋学报, 2022, 44(4): 74-84.
LI X L, LIU Y, WANG C C, et al. Study on fish species diversity in the East China Sea in summer based on environmental DNA technology[J]. Haiyang Xuebao, 2022, 44(4): 74-84.
- [9] 蒋佩文, 李敏, 张帅, 等. 基于环境 DNA 宏条码和底拖网的珠江河口鱼类多样性[J]. 水生生物学报, 2022, 46(11): 1701-1711.
JIANG P W, LI M, ZHANG S, et al. Investigating the fish diversity in pearl river estuary based on environmental DNA metabarcoding and bottom trawling[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2022, 46(11): 1701-1711.
- [10] 吕嘉诚, 林渊源, 李爱军, 等. 基于环境 DNA 宏条形码的柴河浮游藻类研究[J]. 环境科学导刊, 2022, 41(6): 1-7.
LYU J C, LIN Y Y, LI A J, et al. Study on the planktonic algae in Chai River based on environment DNA metabarcoding [J]. Environmental Science Survey, 2022, 41(6): 1-7.
- [11] TAKAHARA T, MINAMOTO T, YAMANAKA H, et al. Estimation of fish biomass using environmental DNA [J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35868.
- [12] 巴日斯. 环境 DNA 及其在水生生态系统保护中的应用研究[J]. 资源节约与环保, 2018(3): 17, 25.
BA R S. Environmental DNA and its application in aquatic ecosystem protection [J]. Resources Economization & Environmental Protection, 2018(3): 17, 25.
- [13] 闫卉果, 董智玲, 马婷婷, 等. 基于环境 DNA 的岩原鲤检测及生物量评估[J]. 水产学报, 2022, 46(6): 1018-1026.
YAN H G, DONG Z L, MA T T, et al. Detection and biomass assessment of *Procypris rabaudi* based on environmental DNA[J]. Journal of Fisheries of China, 2022, 46(6): 1018-1026.
- [14] 高天翔, 陈治, 王晓艳, 等. 褐菖鲈养殖密度与其 eDNA 的相关关系探讨[J]. 水生生物学报, 2022, 46(7): 1007-1015.
GAO T X, CHEN Z, WANG X Y, et al. Correlation between the density of cultured *Sebastiscus marmoratus* and its environmental DNA[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2022, 46(7): 1007-1015.
- [15] 牟铭, 李昂, 赵新宁, 等. 人工模拟条件下环境 DNA 宏条形码技术的定量分析初探[J]. 渔业科学进展, 2021, 42(5): 24-30.
MU M, LI A, ZHAO X N, et al. Preliminary study on the quantitative analysis of environmental DNA metabarcoding under ideal conditions [J]. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(5): 24-30.
- [16] 陈晓, 方靖怡, 王萌, 等. 利用环境 DNA-宏条形码技术监测苏州地区小管福寿螺的入侵[J]. 植物保护, 2021, 47(6): 58-65.
CHEN X, FANG J Y, WANG M, et al. Monitoring of the invasive species *Pomacea canaliculata* via environmental DNA metabarcoding in Suzhou City[J]. Plant Protection, 2021, 47(6): 58-65.
- [17] 徐念, 熊美华, 邵科, 等. 长江中下游环境 DNA 宏条形码生物多样性检测技术初步研究[J]. 环境科学研究, 2020, 33(5): 1187-1196.
XU N, XIONG M H, SHAO K, et al. Preliminary study on environmental DNA metabarcoding for detecting biodiversity in the middle and lower reaches of the Yangtze River[J]. Research of Environmental Sciences, 2020, 33(5): 1187-1196.
- [18] 周天成, 胡思敏, 林先智, 等. 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[J]. 海洋科学, 2020, 44(2): 99-107.

- ZHOU T C, HU S M, LIN X Z, et al. Study on the feeding habits of *Tectus pyramis* in the coral reef ecosystem based on 18S rDNA barcoding[J]. *Marine Sciences*, 2020, 44(2): 99-107.
- [19] 赵彦伟, 陈家琪, 董丽, 等. 环境 DNA 技术在水生态领域应用研究进展[J]. *农业环境科学学报*, 2021, 40(10): 2057-2065.
- ZHAO Y W, CHEN J Q, DONG L, et al. Advances in the application of environmental DNA in aquatic ecosystems[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2021, 40(10): 2057-2065.
- [20] 王玉蓉, 文茄汀, 张建民. eDNA 技术及其在河流生态系统的研究进展[J]. *水力发电学报*, 2020, 39(5): 90-98.
- WANG Y R, WEN J T, ZHANG J M. Review on application of environmental DNA technology in river ecosystems[J]. *Journal of Hydroelectric Engineering*, 2020, 39(5): 90-98.
- [21] MINAMOTO T, NAKA T, MOJI K, et al. Techniques for the practical collection of environmental DNA: filter selection, preservation, and extraction[J]. *Limnology*, 2016, 17(1): 23-32.
- [22] 陈治, 宋娜, 源利文, 等. 舟山近海水样环境 DNA 获取方法的建立[J]. *水生生物学报*, 2020, 44(1): 50-58.
- CHEN Z, SONG N, YUAN L W, et al. The eDNA collection method of Zhoushan coastal waters[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(1): 50-58.
- [23] 李晗溪, 黄雪娜, 李世国, 等. 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[J]. *生物多样性*, 2019, 27(5): 491-504.
- LI H X, HUANG X N, LI S G, et al. Environmental DNA (eDNA)-metabarcoding-based early monitoring and warning for invasive species in aquatic ecosystems[J]. *Biodiversity Science*, 2019, 27(5): 491-504.
- [24] 李萌, 尉婷婷, 史博洋, 等. 环境 DNA 技术在淡水底栖大型无脊椎动物多样性监测中的应用[J]. *生物多样性*, 2019, 27(5): 480-490.
- LI M, WEI T T, SHI B Y, et al. Biodiversity monitoring of freshwater benthic macroinvertebrates using environmental DNA[J]. *Biodiversity Science*, 2019, 27(5): 480-490.
- [25] WILSON I G. Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63(10): 3741-3751.
- [26] 葛玉双, 程起群. 环境 DNA 及其在水生生物多样性调查中的应用[J]. *渔业信息与战略*, 2020, 35(1): 55-62.
- GE Y S, CHENG Q Q. Environmental DNA and its application in aquatic biodiversity[J]. *Fishery Information & Strategy*, 2020, 35(1): 55-62.
- [27] 赵明, 赵梦迪, 马春艳, 等. 环境 DNA 在水域生态中的研究进展[J]. *中国水产科学*, 2018, 25(4): 714-720.
- ZHAO M, ZHAO M D, MA C Y, et al. Studies on the application of the environmental DNA in aquatic ecosystem[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(4): 714-720.
- [28] CAREW M E, PETTIGROVE V J, METZELING L, et al. Environmental monitoring using next generation sequencing: rapid identification of macroinvertebrate bioindicator species[J]. *Frontiers in Zoology*, 2013, 10(1): 45.
- [29] ANDRUSZKIEWICZ A E, ZHANG W G, LAVERY A, et al. Environmental DNA shedding and decay rates from diverse animal forms and thermal regimes[J]. *Environmental DNA*, 2021, 3(2): 492-514.
- [30] JANE S F, WILCOX T M, MCKELVEY K S, et al. Distance, flow and PCR inhibition: eDNA dynamics in two headwater streams[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2015, 15(1): 216-227.
- [31] EICHMILLER J J, BEST S E, SORENSEN P W. Effects of temperature and trophic state on degradation of environmental DNA in lake water [J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(4): 1859-1867.
- [32] STRICKLER K M, FREMIER A K, GOLDBERG C S. Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms [J]. *Biological Conservation*, 2015, 183: 85-92.
- [33] SEYMOUR M, DURANCE I, COSBY B J, et al. Acidity promotes degradation of multi-species environmental DNA in lotic mesocosms[J]. *Communications Biology*, 2018, 1: 4.
- [34] JO T, ARIMOTO M, MURAKAMI H, et al. Estimating shedding and decay rates of environmental nuclear DNA with relation to water temperature and biomass[J]. *Environmental DNA*, 2020, 2(2): 140-151.
- [35] MORRISSEY E M, MCHUGH T A, PRETESKA L, et al. Dynamics of extracellular DNA decomposition and bacterial community composition in soil [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2015, 86: 42-49.
- [36] 凌岚馨, 范共, 胡云, 等. 环境 DNA 技术与传统捕捞揭示崇明岛内河鱼类多样性[J]. *上海海洋大学学报*, 2022, 31(6): 1434-1444.
- LING L X, FAN G, HU Y, et al. Integrating environmental DNA technology and traditional fish survey to reveal the diversity of fishes in the rivers on the Chongming Island[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2022, 31(6): 1434-1444.
- [37] 李苗, 单秀娟, 王伟继, 等. 环境 DNA 在水体中存留时间的检测研究: 以中国对虾为例[J]. *渔业科学进展*, 2020, 41(1): 51-57.
- LI M, SHAN X J, WANG W J, et al. Studying the retention time of *Fenneropenaeus chinensis* eDNA in water[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 51-57.
- [38] 张爱菊, 郝雅宾, 郭爱环, 等. 基于高通量测序技术的鱼类环境 DNA 研究中通用引物的筛选验证[J]. *浙江农业学报*, 2019, 31(10): 1615-1623.
- ZHANG A J, HAO Y B, GUO A H, et al. Universal primer screening and verification for fish environmental DNA research based on high-throughput sequencing technology [J]. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2019, 31(10): 1615-1623.

- [39] MINAMOTO T, YAMANAKA H, TAKAHARA T, et al. Surveillance of fish species composition using environmental DNA[J]. *Limnology*, 2012, 13(2): 193-197.
- [40] JERDE C L, CHADDERTON W L, MAHON A R, et al. Detection of Asian carp DNA as part of a Great Lakes basin-wide surveillance program[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2013, 70(4): 522-526.
- [41] MIYA M, SATO Y, FUKUNAGA T, et al. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species[J]. *Royal Society Open Science*, 2015, 2(7): 150088.
- [42] 陈治, 高天翔. 环境 DNA 技术用于鱼类多样性调查的准确性初探[J]. *农业与技术*, 2022, 42(15): 105-109.
CHEN Z, GAO T X. The accuracy of environmental DNA technology in fish diversity survey [J]. *Agriculture and Technology*, 2022, 42(15): 105-109.
- [43] 王萌, 苑艺, 于海燕, 等. 中国淡水大型底栖无脊椎动物条形码数据库构建[J]. *中国环境监测*, 2022, 38(1): 36-44.
WANG M, YUAN Y, YU H Y, et al. Construction of barcode library of freshwater macroinvertebrate in China[J]. *Environmental Monitoring in China*, 2022, 38(1): 36-44.
- [44] BENG K C, CORLETT R T. Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and conservation: opportunities, challenges and prospects[J]. *Biodiversity and Conservation*, 2020, 29(7): 2089-2121.
- [45] CAPO E, SPONG G, NORMAN S, et al. Droplet digital PCR assays for the quantification of brown trout (*Salmo trutta*) and Arctic char (*Salvelinus alpinus*) from environmental DNA collected in the water of mountain lakes [J]. *PLoS One*, 2019, 14(12): e0226638.
- [46] NORDSTROM B, MITCHELL N, BYRNE M, et al. A review of applications of environmental DNA for reptile conservation and management[J]. *Ecology and Evolution*, 2022, 12(6): e8995.
- [47] YATES M C, FRASER D J, DERRY A M. Meta-analysis supports further refinement of eDNA for monitoring aquatic species-specific abundance in nature [J]. *Environmental DNA*, 2019, 1(1): 5-13.
- [48] 王月, 刘焕章, 李莎, 等. 基于微滴式数字 PCR 方法的鱼类环境 DNA 样本处理与保存技术优化[J]. *水生生物学报*, 2022, 46(3): 332-341.
WANG Y, LIU H Z, LI S, et al. Optimization of fish environmental DNA sample processing and preservation technology based on droplet digital PCR [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, 46(3): 332-341.
- [49] GOVINDARAJAN A F, MCCARTIN L, ADAMS A, et al. Improved biodiversity detection using a large-volume environmental DNA sampler with in situ filtration and implications for marine eDNA sampling strategies[J]. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 2022, 189: 103871.
- [50] KIRTANE A, ATKINSON J D, SASSOUBRE L. Design and validation of passive environmental DNA samplers using granular activated carbon and montmorillonite clay [J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(19): 11961-11970.
- [51] BESSEY C, NEIL JARMAN S, SIMPSON T, et al. Passive eDNA collection enhances aquatic biodiversity analysis[J]. *Communications Biology*, 2021, 4(1): 236.
- [52] YAO M, ZHANG S, LU Q, et al. Fishing for fish environmental DNA: ecological applications, methodological considerations, surveying designs, and ways forward [J]. *Molecular Ecology*, 2022, 31(20): 5132-5164.
- [53] RIVERA S F, RIMET F, VASSELON V, et al. Fish eDNA metabarcoding from aquatic biofilm samples: methodological aspects[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2022, 22(4): 1440-1453.
- [54] HANSEN B K, JACOBSEN M W, MIDDELBOE A L, et al. Remote, autonomous real-time monitoring of environmental DNA from commercial fish[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 13272.
- [55] DOI H, WATANABE T, NISHIZAWA N, et al. On-site environmental DNA detection of species using ultrarapid mobile PCR [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2021, 21(7): 2364-2368.
- [56] WILLIAMS K E, HUYVAERT K P, PIAGGIO A J. No filters, no fridges: a method for preservation of water samples for eDNA analysis[J]. *BMC Research Notes*, 2016, 9: 298.
- [57] TAKAHARA T, TAGUCHI J, YAMAGISHI S, et al. Suppression of environmental DNA degradation in water samples associated with different storage temperature and period using benzalkonium chloride [J]. *Limnology and Oceanography: Methods*, 2020, 18(8): 437-445.
- [58] GOLDBERG C S, TURNER C R, DEINER K, et al. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species[J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2016, 7(11): 1299-1307.
- [59] XING Y C, GAO W R, SHEN Z X, et al. A review of environmental DNA field and laboratory protocols applied in fish ecology and environmental health [J]. *Frontiers in Environmental Science*, 2022, 10: 725360.
- [60] MIYA M, GOTOH R O, SADO T. MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples[J]. *Fisheries Science*, 2020, 86(6): 939-970.
- [61] WANG Y, YUAN H, HUANG J M, et al. Inline index helped in cleaning up data contamination generated during library preparation and the subsequent steps[J]. *Molecular Biology Reports*, 2022, 49(1): 385-392.
- [62] 文遥, 李德亮, 刘小燕, 等. 环境 DNA 技术在水生外来动物入侵研究中的应用[J]. *智慧农业导刊*, 2021, 1(3): 46-55.

- WEN Y, LI D L, LIU X Y, et al. Application of environmental DNA technology in the study of invasion of exotic aquatic animals [J]. *Journal of Smart Agriculture*, 2021, 1(3): 46-55.
- [63] NORRIS L, LAWLER N, HUNKAPILLER A, et al. Detection of the parasitic nematode, *Pseudocapillaria tomentosa*, in zebrafish tissues and environmental DNA in research aquaria [J]. *Journal of Fish Diseases*, 2020, 43(9): 1087-1095.
- [64] ZHANG S, ZHAO J D, YAO M. A comprehensive and comparative evaluation of primers for metabarcoding eDNA from fish [J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2020, 11(12): 1609-1625.
- [65] EVANS N T, LI Y Y, RENSHAW M A, et al. Fish community assessment with eDNA metabarcoding: effects of sampling design and bioinformatic filtering [J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2017, 74(9): 1362-1374.
- [66] SHAW J L A, CLARKE L J, WEDDERBURN S D, et al. Comparison of environmental DNA metabarcoding and conventional fish survey methods in a river system [J]. *Biological Conservation*, 2016, 197: 131-138.
- [67] KAGZI K, HECHLER R M, FUSSMANN G F, et al. Environmental RNA degrades more rapidly than environmental DNA across a broad range of pH conditions [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2022, 22(7): 2640-2650.
- [68] WOOD S A, BIESSY L, LATCHFORD J L, et al. Release and degradation of environmental DNA and RNA in a marine system [J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 704: 135314.
- [69] TSURI K, IKEDA S, HIROHARA T, et al. Messenger RNA typing of environmental RNA (eRNA): a case study on zebrafish tank water with perspectives for the future development of eRNA analysis on aquatic vertebrates [J]. *Environmental DNA*, 2021, 3(1): 14-21.
- [70] 陈治, 蔡杏伟, 张清凤, 等. 海南岛淡水鱼类环境 DNA 宏条形码参考数据库的初步构建及比较分析 [J]. *南方水产科学*, 2022, 18(3): 1-12.
- CHEN Z, CAI X W, ZHANG Q F, et al. Preliminary construction and comparative analysis of environmental DNA metabarcoding reference database of freshwater fishes in Hainan Island [J]. *South China Fisheries Science*, 2022, 18(3): 1-12.
- [71] 陶洁, 曹阳, 左其亭. 环境 DNA 技术在河流生态系统中的应用研究进展 [J]. *水资源保护*, 2021, 37(6): 150-156.
- TAO J, CAO Y, ZUO Q T. Research progression on the application of environmental DNA technology on river ecosystem [J]. *Water Resources Protection*, 2021, 37(6): 150-156.
- [72] SMETS W, LEFF J W, BRADFORD M A, et al. A method for simultaneous measurement of soil bacterial abundances and community composition via 16S rRNA gene sequencing [J]. *Soil Biology and Biochemistry*, 2016, 96: 145-151.
- [73] TKACZ A, HORTALA M, POOLE P S. Absolute quantitation of microbiota abundance in environmental samples [J]. *Microbiome*, 2018, 6(1): 110.
- [74] LIU X R, LI J, YU L, et al. Simultaneous measurement of bacterial abundance and composition in response to biochar in soybean field soil using 16S rRNA gene sequencing [J]. *Land Degradation & Development*, 2018, 29(7): 2172-2182.
- [75] 李小闯, 霍守亮, 张含笑, 等. 环境 DNA 宏条形码技术在蓝藻群落监测中的应用 [J]. *环境科学研究*, 2021, 34(2): 372-381.
- LI X C, HUO S L, ZHANG H X, et al. Application of environmental DNA metabarcoding in monitoring cyanobacterial community [J]. *Research of Environmental Sciences*, 2021, 34(2): 372-381.
- [76] SATO M, INOUE N, NAMBU R, et al. Quantitative assessment of multiple fish species around artificial reefs combining environmental DNA metabarcoding and acoustic survey [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 19477.
- [77] VASSELON V, BOUCHEZ A, RIMET F, et al. Avoiding quantification bias in metabarcoding: application of a cell biovolume correction factor in diatom molecular biomonitoring [J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2018, 9(4): 1060-1069.
- [78] THOMAS A C, DEAGLE B E, EVESON J P, et al. Quantitative DNA metabarcoding: improved estimates of species proportional biomass using correction factors derived from control material [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2016, 16(3): 714-726.
- [79] MINAMOTO T, UCHII K, TAKAHARA T, et al. Nuclear internal transcribed spacer-1 as a sensitive genetic marker for environmental DNA studies in common carp *Cyprinus carpio* [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2017, 17(2): 324-333.
- [80] DYSTHE J C, FRANKLIN T W, MCKELVEY K S, et al. An improved environmental DNA assay for bull trout (*Salvelinus confluentus*) based on the ribosomal internal transcribed spacer I [J]. *PLoS One*, 2018, 13(11): e0206851.
- [81] MARSHALL N T, VANDERPLOEG H A, CHAGANTI S R. Environmental (e) RNA advances the reliability of eDNA by predicting its age [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 2769.
- [82] JO T S, TSURI K, YAMANAKA H. Can nuclear aquatic environmental DNA be a genetic marker for the accurate estimation of species abundance? [J]. *The Science of Nature*, 2022, 109(4): 38.

Challenge, breakthrough and future perspectives of environmental DNA technology in monitoring aquatic organisms

LI Chenhong^{1,2}, LING Lanxin^{1,2}, TAN Juan^{1,3}, LIN Xiaolong^{1,2}, WANG Hui^{1,2}, SUN Bingjiao⁴, LI Zhao⁴
(1. *Engineering Research Center of Environmental DNA and Ecological Water Health Assessment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*; 2. *Shanghai Universities Key Laboratory of Marine Animal Taxonomy and Evolution, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China*; 3. *Shanghai Academy of Environmental Sciences, Shanghai 200233, China*; 4. *China National Environmental Monitoring Centre, Beijing 100102, China*)

Abstract: In recent years, impact of human activities has led to the destruction of balance of the water ecosystem, sharp reduction of biodiversity of aquatic organisms and degradation of water ecological health. Rapid and effective monitoring aquatic organisms is a prerequisite for evaluating water ecological health and carrying out protection and management of water ecological environment. Environmental DNA (eDNA) technology is a technology that uses molecular biology methods to extract DNA from environmental samples, sequence and analyze it to infer species information. Because this technology can obtain a large amount of species information only by collecting environmental samples (water, soil, sediment, etc.), with the characteristics of non-invasive, high sensitivity and low cost, it has attracted much attention in recent years. However, existing research practice shows that the current eDNA technology still faces some challenges, hindering it from becoming a standard and routine application. In this review, applications of the eDNA technology in aquatic organism monitoring are illustrated from different aspects: biodiversity investigation, invasive and endangered species monitoring, diet analyses, etc. The problems and challenges faced by eDNA technology are summarized in five aspects, including sampling efficiency, false positive and false negative, uncertainty of eDNA source, missing data in database and unsatisfying quantitative methods. The solutions and technical breakthroughs to these problems are further discussed. Finally, future perspectives of the eDNA technology are discussed, in order to provide inspiration for future work using eDNA technology.

Key words: environmental DNA technology; applications; challenges; breakthroughs; perspectives