

DOI:10.3880/j.issn.1004-6933.2021.06.022

环境 DNA 技术在河流生态系统中的应用研究进展

陶 洁^{1,2,3,4}, 曹 阳¹, 左其亭^{1,2,3,4}

(1. 郑州大学水利科学与工程学院, 河南 郑州 450001;

2. 郑州市水资源与水环境重点实验室, 河南 郑州 450001;

3. 河南省地下水污染防治与修复重点实验室, 河南 郑州 450001;

4. 郑州大学黄河生态保护与区域协调发展研究院, 河南 郑州 450001)

摘要:利用 CiteSpace 文献数据可视化软件分析了环境 DNA 技术在河流生态系统中的应用研究发文数量、发文趋势、关键词频次和突现状况;对环境 DNA 技术在河流生态中的应用研究重点进行了综述,主要包括生物入侵和珍稀物种检测与监测、生物量估测、生物多样性检测与分析 and 产卵繁殖调查等,指出环境 DNA 技术未来在河流生态系统中的应用应着重在环境 DNA 浓度与影响因素的量化关系、公共数据库的丰富、通用引物的设计以及环境 DNA 技术全过程标准的制定等方面。

关键词:环境 DNA;河流生态系统;生物多样性;生物入侵;物种监测;文献计量

中图分类号:TV213.4;X171.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1004-6933(2021)06-0150-07

Research progression on the application of environmental DNA technology on river ecosystem//TAO Jie^{1,2,3,4}, CAO Yang¹, ZUO Qiting^{1,2,3,4} (1. School of Water Conservancy Engineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China; 2. Zhengzhou Key Laboratory of Water Resource and Environment, Zhengzhou 450001, China; 3. Henan Provincial Key Laboratory of Groundwater Pollution Prevention and Remediation, Zhengzhou 450001, China; 4. Yellow River Institute for Ecological Protection & Regional Coordination Development, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: CiteSpace literature data visualization software is used to analyze the number of publications, publication trends, keyword frequency and emergence status of research on the application of environmental DNA (eDNA) technology on river ecosystems. This article reviews the key points of eDNA technology application research on river ecology, including biological invasion, rare species detection and monitoring, biomass estimation, biodiversity detection and analysis, spawning and reproduction investigation, etc. to point out that future research on the application of eDNA technology on river ecosystem should focus on the quantification of relationship between the eDNA concentration and influencing factors, the enrichment of public databases, the design of universal primers, and the formulation of the whole process standard of eDNA technology, etc.

Key words: environmental DNA; river ecosystem; biodiversity; biological invasion; species monitoring; bibliometrics

水利水电工程建设运行、污染物超标排放、水生生物过度捕捞等一系列人类活动^[1],改变了原有河流生态系统的生态平衡和水生栖息环境,导致河流生物多样性减少,影响了河流生态系统的健康。河流生物多样性是反应河流健康的重要指标^[2],其传统检测方法,如网捕、电钓等都是通过在调查点捕获样本或者制作成标本再进行鉴定,不但费时费力,对检测物种也不友好。

基于这种情况,环境 DNA (environmental DNA, eDNA) 技术应运而生,被认为能够有效弥补传统技术的缺陷。eDNA 是从生物体 (包括皮肤、黏液、鳞屑、尿液、粪便、唾液、配子或遗体等) 脱落的细胞内或细胞外的,并悬浮在环境基质 (如水、土壤或空气) 中的 DNA^[3-7]。eDNA 的产生依赖于生物体的生物量、年龄、摄食活动以及生理、生活史和空间使用^[4],而 eDNA 技术可以从环境基质中捕获产生的

基金项目:国家自然科学基金(51709238)

作者简介:陶洁(1986—),女,副教授,博士,主要从事水文水资源研究。E-mail: taojie2015@zzu.edu.cn

通信作者:左其亭(1967—),男,教授,博士,主要从事水文水资源研究。E-mail: zuoqt@zzu.edu.cn

DNA,并将其进行保存、提取、扩增和测序^[8],进而根据测序结果,判断物种种属。这种新型的检测方法已被证明在生物检测中的巨大潜力,经过10多年的发展,它在检测入侵物种、濒危或受到威胁的本土物种以及其他难以用传统方法检测的低密度的物种等方面都有可靠的应用,也被广泛应用在物种分布和丰度的估测等多个领域^[9-10]。

由于其高效性、准确性和低成本性,eDNA技术在获取河流的物种信息和解决河流生态相关问题等方面起到了巨大的作用。本文通过查询河流生态系统领域与eDNA技术相关的文献,采用文献计量分析方法对发文状况、主要研究领域、未来研究热点等进行统计分析,综合阐述了eDNA技术在河流生态系统中的应用研究现状,并提出未来重点研究方向。

1 检索方法与结果

1.1 检索方法与数据来源

CiteSpace 文献数据可视化软件是一款文献计量分析软件,可以对检索到的论文中的作者、关键词、标题、摘要和被引文献等进行分析,能有效地寻找到研究领域的热点和发展前沿^[11]。本文采用该软件对关键词的聚类图、频次以及突现状况进行分析。

研究数据来自中国知网(CNKI)和科睿唯安信息服务公司下属的SCI-Expanded数据库。自1991年起,SCI出版物都增加了摘要,因此在主题搜索中,可以同时从标题、摘要和关键词中收集相关信息并通过分析标题、摘要和关键词可以得到合理详细的主题重点。在数据收集的过程中,为了确保原始数据的准确性和全面性,需要进行检索方法的优化和检索策略的调整,并排除无关的文献。在知网数据库中以“环境DNA”“eDNA”为主题进行高级检索,主题词之间以“或”相连,检索完后,选择“中文文献”来限定范围;在SCI-Expanded数据库中以“environmental DNA”“eDNA”为主题进行检索,主题词之间以“or”相连;由于eDNA技术是Ficetola等^[3]于2008年首次应用到水生生物检测中的,故将中外数据库的检索时间跨度均设为“2008—2019年”。

1.2 结果分析

1.2.1 论文发表数量和趋势

对获取文献进行整理和精准匹配,同时从标题、摘要和关键词中搜集信息,去除与河流生态系统无关文献,知网检索到的国外作者发文归到国外,SCI-Expanded数据库中检索到的国内作者发文归到国

内,最终检索得到46篇国内作者发表的文献和758篇国外作者发表的文献。对国内外发文量进行年度统计(图1),国外eDNA发文数量在2008—2013年呈平稳趋势,2014年之后逐年稳步提升;国内eDNA的发文量的趋势和国外相同,虽然发文量很低,但近几年来呈明显上升趋势。2013年之后该领域受到了学术界的广泛关注,在一定程度上与其检测监测的优越性有关。

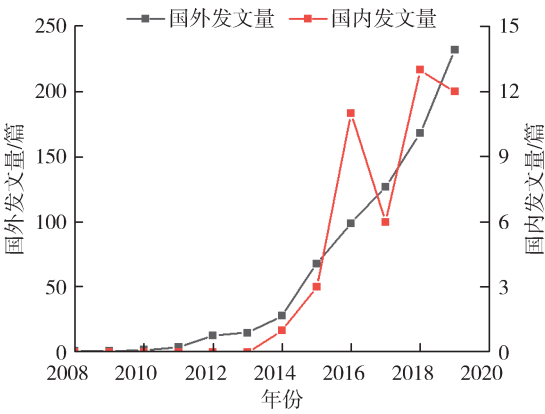


图1 eDNA的发文量

Fig.1 The publication volume of eDNA

1.2.2 关键词频次分析

图2为CiteSpace关键词共现网络图,关键词出



图2 关键词共现网络

Fig.2 Keywords co-occurrence network diagram

现次数越多则字体越大。除了“环境 DNA”和“environmental DNA”“eDNA”这些关键词的不同之外,国内 eDNA 技术研究过程中出现频次较高的关键词有:生物多样性(或物种多样性)、水生生物、生物监测(或物种监测)、水生生态系统、coi(指的是线粒体 DNA 上的一段蛋白质编码基因,主要被生物科学领域用作系统发育研究或 DNA 条形码研究)等;国外的有:diversity(多样性)、conservation(保护)、temperature(温度)、abundance(丰度)、metabarcoding(宏条形码)等。

网络共现图中存在一些节点,代表被分析的对象,其中频次越高则节点就越大,节点之间的连线表示共现关系,连线越粗表示共现关系越强。国内(图 2(a))由于在此方面研究的文献较少,所以节点的大小不够明显,但从国内外发文关键词频次(表 1 和表 2)可知,国内外在研究方向上基本相同,主要集中在生物多样性和物种入侵方面,但是与国内相比,国外的研究呈现更加多元化的趋势,不仅仅局限于 eDNA 在生物本身的应用,还关注其影响因素、提取方法和 PCR 技术(又名聚合酶链式反应,是一种用于放大扩增特定 DNA 片段的分子生物学技术)等,具体包括:光照、时间和温度等对 eDNA 浓度的影响机理研究,为防止样品污染而改进提取方法的研究,能带来测序速度和准确率提高的 PCR 技术更新研究。

表 1 国内发文前 15 个关键词出现频次

关键词	频次	首次出现时间
eDNA	35	2014 年
生物多样性	14	2015 年
生物监测	8	2016 年
检测技术	3	2017 年
高通量测序	3	2017 年
metabarcoding(宏条形码)	3	2016 年
水生生物	2	2018 年
生态学	2	2014 年
水生生态系统	2	2018 年
coi	2	2015 年
分布	2	2017 年
生物量评估	2	2018 年
古 DNA	2	2017 年
中国对虾	2	2019 年
定量	2	2019 年

1.2.3 关键词突现分析

通过对关键词的突现性分析,可以了解不同时间阶段 eDNA 技术的应用研究情况。表 3 和表 4 显示了关键词突变的出现时间以及持续时间。2014—2015 年是国内关于 eDNA 技术研究的开始阶段,主要聚焦在河流生态方面,随着研究的深入逐渐过渡

表 2 国外发文前 15 个关键词出现频次

Table 2 The frequency of top 15 keywords in foreign papers

关键词	频次	首次出现时间
environmental DNA(eDNA)	588	2011 年
diversity(多样性)	261	2009 年
conservation(保护)	109	2008 年
abundance(丰度)	88	2013 年
tool(工具)	75	2015 年
temperature(温度)	68	2015 年
water(水)	66	2012 年
quantification(定量)	61	2014 年
occupancy(入侵)	59	2014 年
metabarcoding(宏条形码)	54	2015 年
PCR(PCR 技术)	53	2014 年
sample(样品)	51	2014 年
fish(鱼类)	50	2015 年
persistence(持久性)	49	2015 年
invasive species(入侵物种)	47	2014 年

表 3 2008—2019 年国内引文爆发最强的 7 个关键词突现点

Table 3 The emergence points of top 7 keywords with the strongest burst of citations in domestic papers from 2008 to 2019

关键词	开始时间	强度	突现开始时间	突现结束时间
生态学	2014 年	1.2173	2014 年	2015 年
coi	2014 年	0.7760	2015 年	2016 年
生物监测	2014 年	0.6912	2016 年	2016 年
高通量测序	2014 年	1.4799	2017 年	2017 年
古 DNA	2014 年	1.1422	2017 年	2017 年
水生生物	2014 年	0.8417	2018 年	2019 年
物种监测	2014 年	0.7125	2018 年	2019 年

表 4 2008—2019 年国外引文爆发最强的 15 个关键词突现点

Table 4 The emergence points of top 15 keywords with the strongest burst of citations in foreign papers from 2008 to 2019

关键词	开始时间	强度	突现开始时间	突现结束时间
dna barcoding(DNA 条形码)	2008 年	2.7664	2008 年	2014 年
plant(植物)	2008 年	2.3674	2008 年	2012 年
diversity(多样性)	2008 年	2.6110	2009 年	2012 年
great lake(五大湖)	2008 年	2.4716	2011 年	2015 年
ancient dna(古 DNA)	2008 年	4.1741	2012 年	2015 年
sediment(沉积物)	2008 年	2.4315	2012 年	2015 年
barcode(条形码)	2008 年	2.3309	2012 年	2017 年
water sample(水样)	2008 年	3.6873	2014 年	2017 年
occupancy(入侵)	2008 年	3.0395	2014 年	2015 年
sliver carp(银鲤)	2008 年	2.8215	2015 年	2017 年
presence/absence(存在/缺失)	2008 年	3.7106	2016 年	2016 年
real-timePCR(实时 PCR)	2008 年	2.6269	2016 年	2017 年
genetics(基因学)	2008 年	2.6269	2016 年	2017 年
room temperature(室温)	2008 年	2.3129	2017 年	2019 年
sensitivity(敏感性)	2008 年	2.9722	2018 年	2019 年

到微观领域对 eDNA 的测序技术方面,这对水生生物和物种监测研究成为 2018—2019 年的研究热点

起到了一定的推动作用。相比国内,国外 eDNA 技术的研究要早许多,也不局限于物种监测方面,并且逐渐从 eDNA 技术本身过渡到对河流环境中 DNA 的运输、产生和降解及其敏感性的研究。只有深入了解外在因素对 eDNA 的影响机理,才能通过 eDNA 技术得到更加精确的检测结果。

2 研究进展

2.1 eDNA 研究技术手段

eDNA 在河流生态系统研究中最常用的两种技术是条形码(barcoding)和宏条形码(metabarcoding)技术。条形码和宏条形码的主要区别在于:条形码主要用特异性引物来对单个 DNA 片段进行测序,主要针对单一物种^[12-14],检测精度较高;宏条形码则是使用通用引物同时检测来自多个营养水平的各种物种的数百万个 DNA 片段,主要针对复杂群落^[15-16]。DNA 条形码对于探测入侵的、稀有的和低密度的物种尤其有用,即使是在研究者难以进入的栖息地,也可以绘制它们的栖息地和物种分布图并且设计相应的保护策略。eDNA 宏条形码也已经成功地用于描述过去和现在的生物多样性模式以及研究珍稀濒危物种的产卵生态^[17-19]和监测生态系统健康和动态^[20-21]。

2.2 eDNA 技术应用研究的主要内容

2.2.1 物种检测和监测

自从在法国天然池塘水体中成功提取出了美国牛蛙(一种原产于北美的入侵两栖物种)的 eDNA^[3],eDNA 技术便提高了研究者们对河流生态系统研究的兴趣,并被广泛应用于入侵物种检测、珍稀物种监测等领域^[22-23],这些应用研究证明了 eDNA 技术有着传统调查方法所缺少的灵敏度、精度和效率。Valentini 等^[24]利用 eDNA 技术对骨鱼和两栖动物群体进行检测,得出的结果为该技术和传统方法相比,检出率相同或更高且效率更高。吴昀晟等^[25]利用 eDNA 技术对长江流域的江豚进行监测;Shelton 等^[26]通过 eDNA 的浓度对美国华盛顿州斯卡吉特湾濒危的大鳞大马哈鱼进行物种监测;Jo 等^[27]通过 eDNA 技术对日本兵库县东南部的 3 个外来鱼类和 3 个濒危的本土鱼类进行不同季节的分布检测与监测。以上应用对入侵物种的早期发现、濒危物种管理与监测和濒危物种等的有效保护提供了很大帮助。

eDNA 技术解决了传统技术在检测和监测入侵、未知和濒危物种时费时、费力等问题,对物种分布的长期监测、珍稀濒危物种的保护和入侵物种的预防以及政府政策的制定都能起到很大的作用。

2.2.2 物种生物量估测

准确了解物种在河流环境中的生物量有助于维持河流生态系统的健康。研究表明,eDNA 浓度与环境中的生物量正相关,因此,eDNA 浓度可以在一定程度上反映物种的生物量^[28-30]。Takahara 等^[31]利用 eDNA 技术来检测实验室和池塘试验以及淡水湖泊实地调查的 eDNA 浓度,对比进行鲤鱼生物量估测,得出 eDNA 浓度能反映目标物种生物量,并可据此推测自然环境中的鲤鱼分布情况。Dougherty 等^[32]利用传统诱捕小龙虾的方法和 eDNA 技术对美国中西部地区内陆湖中入侵的锈斑小龙虾(*Orconectes rusticus*)进行了监测及相对丰度估测,结果表明 eDNA 技术检测物种的成功率随该物种相对丰度的增加而增加。Doi 等^[33]在日本濑户内海西部 Suonada 湾的 Saba 河进行了 eDNA 试验,得出 eDNA 浓度与香鱼的生物量呈显著正相关关系。

虽然能够通过 eDNA 技术检测 eDNA 浓度来快速评估物种的生物量,但是通过 eDNA 浓度对生物量的准确估计仍然具有挑战性,并取决于多种因素,如个体释放到水中的 DNA 数量、河流的运输率和 eDNA 随时间和温度的稳定性等^[34]。此外,行为和季节也会影响物种的检测和利用 eDNA 浓度对丰度的估测。因此,在应用定量 eDNA 方法之前,需要对这些误差进行量化。

2.2.3 生物产卵繁殖调查

掌握河流水生生物的繁殖活动对于物种多样性的保护和管理非常重要。eDNA 技术可以通过检测水体中 eDNA 的浓度分布来确定生物产卵的空间范围。Bylemans 等^[17]通过 eDNA 技术对濒危的澳洲麦氏鲈进行产卵活动监测。Maruyama 等^[18]使用 qPCR 技术(实时荧光定量 PCR 技术)对日本受威胁的本地三唇马口鱼的繁殖迁移进行了非侵入性监测。Antognazza 等^[19]以 qPCR 技术为基础,提出了鲱鱼(*Alosa*)的 eDNA 检测方法,并在英格兰西部 Teme 河上进行了检测,确定了鲱鱼产卵期的持续时间和空间分布范围,并对鲱鱼的空间分布进行了评估。

更有研究者发现繁殖时期 eDNA 在水体中的浓度会显著增加,并且只在一定的空间范围内显著变化。基于此,了解物种在何时何地发生繁殖行为,明确繁殖期与非繁殖期 eDNA 浓度与生物资源量的定量关系,可以更精确地了解其如何影响生物量的预测。

2.2.4 生物多样性检测

在全球气候变化和人类活动的影响下,生物多样性正在快速地丧失,全球正经历第六次生物多样

性危机^[35]。保护生物多样性是一项全球性的挑战,它需要大量不同时空尺度上的物种分布和数量数据。传统方法调查生物多样性往往存在效率低下、生物损伤、环境破坏等缺点,eDNA 技术提供了一种新的方法来评估生物多样性,只需要少量的水样便能可靠地检测出水环境中的目标生物,包括入侵的、濒危的和当地的物种^[36-40]。Lacoursière-Roussel 等^[41]通过 eDNA 技术检测北极两个港口采集到的水样,成功鉴定出了 181 个物种。Jo 等^[42]进行的鱼类多样性调查显示,eDNA 技术检测的平均种数为 19(±4.4)种,略高于常规调查得到的 10(±4.8)种,但在对韩国特有物种和外来物种的鉴定中显示,通用引物(Mi-Fish 引物集)并不适用,此外,一些常规方法捕获的濒危物种也没有被 eDNA 技术检测到,所以需要对通用引物进行开发或补充,以便 eDNA 技术能识别更多的韩国本地淡水鱼。在 eDNA 技术的支持下,分析生物多样性也变得更加便捷,但需要更丰富的引物集来和 DNA 序列进行配对,才能识别更多的物种。

生物多样性检测依赖于精确快速的基因测序技术,目前它已经发展到第三代。第三代基因测序技术^[43-44]采用单分子读取技术,并且不需要进行 PCR 扩增处理,具有更高的通量和测序效率,操作过程更简便,测序速度更快,读长更长,可达几千个碱基,可进一步节省测序成本,同时克服了传统检测分析中错误频率较高的问题,这对于提高 eDNA 技术在物种检测方面的检出率有很大帮助。

此外,eDNA 技术在河流水质评价和水污染评价^[45-46]、病原体的检测^[47-49]等方面也有应用,如 eDNA 序列的种类、浓度大小及变化速率、浓度分布等可以反映出指示生物的多样性和物种丰度及其变化、指示物种的群落分布及结构变化、食物链食物网的能量流动、动植物的相互作用以及其在维持生态系统功能和提供生态系统服务中的作用等^[50-51];在病原体检测方面,eDNA 技术可监测河流环境中物种携带的病原体,这能起到很好的疾病预防作用。

3 研究展望

eDNA 技术是集高效、精准和标准化为一体的新一代生物物种和多样性检测和监测工具,相较于传统调查方法具有明显优势,随着第三代基因测序技术的发展,eDNA 技术检测和监测结果更加精确,在河流生态环境和物种保护中也发挥着更广泛的作用。然而作为一种新技术,未来 eDNA 技术在河流生态系统中的应用研究应着重在以下几个方面:

a. 开展生物及非生物因素对 eDNA 浓度的影

响机理研究。虽然 eDNA 技术在物种生物量估测和生物多样性分析等方面具有巨大的潜力,但因为生物及非生物因素的影响,该技术大面积应用还存在一定的局限性。例如,eDNA 的产生率和降解率直接影响着河流中的 eDNA 浓度,eDNA 的持久性、转移和沉降等间接影响着河流中的 eDNA 浓度,所以未来应该建立 eDNA 浓度与生物、非生物因子之间的量化关系,以有效提高 eDNA 定量检测结果的准确性。

b. 因地制宜地丰富公共数据库,开发设计适合当地的通用引物。虽然通用引物能同时检测出许多物种,但由于物种的生理特征和环境因素的不同,会导致通用引物的检测出现检测不出或结果错误的状况,且目前对河流生态系统的群体质量信息掌握不够。因此加强通用引物设计和数据库扩展对检测当地河流生物群体信息、生物多样性、物种入侵以及制定物种保护政策非常重要。

c. 开展 eDNA 采样、保存、运输、提取、分析等全过程标准研究和制定。统一的标准是确保样本本研究过程和结果具有可对比性的重要条件。

d. 将传统调查方法和 eDNA 技术结合。eDNA 技术作为新兴技术,还有着其不完善的地方,而传统调查方法虽然缺点明显,但是它的调查过程更直观、识别率更高,并且不为地域所限,将两者有效结合,可以互相弥补,显著提升河流物种检测和监测精度。但是在具体使用过程中如何结合需要进一步探索。

e. 拓展 eDNA 技术的应用研究范围。除了应用在河流生物入侵检测和监测等方面,未来 eDNA 技术应加强在食物网、检测物种体内病原体、能量流动等方面的应用研究,便于更全面地了解河流生态系统进程,掌握河流健康动态。

参考文献:

- [1] 毛劲乔,戴会超. 重大水利水电工程对重要水生生物的影响与调控[J]. 河海大学学报(自然科学版),2016,44(3):240-245. (MAO Jingqiao, DAI Huichao. Effects of large water conservancy and hydropower projects on major aquatic species and regulation [J]. Journal of Hohai University(Natural Sciences),2016,44(3):240-245. (in Chinese))
- [2] 徐宗学,武玮,殷旭旺. 渭河流域水生态系统群落结构特征及其健康评价[J]. 水利水电科技进展,2016,36(1):23-30. (XU Zongxue, WU Wei, YIN Xuwang. Community structure characteristics and health assessment of aquatic ecosystem in Weihe Basin, China[J]. Advances in Science and Technology of Water Resources,2016,36

- (1);23-30. (in Chinese))
- [3] 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.
 - [4] BARNES M A, TURNER C R. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics [J]. *Conservation Genetics*, 2016, 17(1): 1-17.
 - [5] REES H C, MADDISON B C, MIDDLEDITCH D J, et al. REVIEW: the detection of aquatic animal species using environmental DNA: a review of eDNA as a survey tool in ecology [J]. *Journal of Applied Ecology*, 2014, 51(5): 1450-1459.
 - [6] DEINER K, BIK H M, MÄCHLER E, et al. Environmental DNA metabarcoding: transforming how we survey animal and plant communities [J]. *Molecular Ecology*, 2017, 26(21): 5872-5895.
 - [7] 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.
 - [8] DEINER K, WALSER J, MÄCHLER E, et al. Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA [J]. *Biological Conservation*, 2015, 183: 53-63.
 - [9] LACOURSIÈRE-ROUSSEL A, ROSABAL M, BERNATCHEZ L. Estimating fish abundance and biomass from eDNA concentrations: variability among capture methods and environmental conditions [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2016, 16(6): 1401-1414.
 - [10] JI Y Q, ASHTON L, PEDLEY S M, et al. Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding [J]. *Ecology Letters*, 2013, 16(10): 1245-1257.
 - [11] 翟慧敏, 程启先, 李书覃, 等. 海绵城市理念演变的知识图谱可视化分析 [J]. *水资源保护*, 2020, 36(2): 34-40. (ZHAI Huimin, CHENG Qixian, LI Shuqin, et al. Visual analysis of knowledge map of sponge city concept evolution [J]. *Water Resources Protection*, 2020, 36(2): 34-40. (in Chinese))
 - [12] WANG L, ZHUANG Y, ZHANG H, et al. DNA barcoding species in *Alexandrium tamarense* complex using ITS and proposing designation of five species [J]. *Harmful Algae*, 2014, 31: 100-113.
 - [13] HEBERT P D N, GREGORY T R. The promise of DNA barcoding for taxonomy [J]. *Systematic Biology*, 2005, 54(5): 852-859.
 - [14] 陈信忠, 郭书林, 龚艳清. 鱼类 DNA 条形码技术的应用进展 [J]. *水产科学*, 2017, 36(6): 834-842. (CHEN Xinzong, GUO Shulin, GONG Yanqing. Progress on application of fish DNA barcoding: a review [J]. *Fisheries Science*, 2017, 36(6): 834-842. (in Chinese))
 - [15] DEINER K, BIK H M, MÄCHLER E, et al. Environmental DNA metabarcoding: transforming how we survey animal and plant communities [J]. *Molecular Ecology*, 2017, 26(21): 5872-5895.
 - [16] 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 Hanxi, HUANG Xuena, LI Shiguo, 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. (in Chinese))
 - [17] BYLEMANS J, FURLAN E M, HARDY C M, et al. An environmental DNA-based method for monitoring spawning activity: a case study, using the endangered Macquarie perch (*Macquaria australasica*) [J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2017, 8(5): 646-655.
 - [18] MARUYAMA A, SUGATANI K, WATANABE K, et al. Environmental DNA analysis as a non-invasive quantitative tool for reproductive migration of a threatened endemic fish in rivers [J]. *Ecology and Evolution*, 2018, 8(23): 11964-11974.
 - [19] ANTOGNAZZA C M, BRITTON J R, POTTER C, et al. Environmental DNA as a non-invasive sampling tool to detect the spawning distribution of European anadromous shads (*Alosa* spp.) [J]. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 2019, 29(1): 148-152.
 - [20] MORUETA-HOLME N, BLONDER B, SANDEL B, et al. A network approach for inferring species associations from co-occurrence data [J]. *Ecography*, 2016, 39(12): 1139-1150.
 - [21] JACKSON M C, WEYL O L F, ALTERMATT F, et al. Recommendations for the next generation of global freshwater biological monitoring tools [J]. *Advances in Ecological Research*, 2016, 55: 615-636.
 - [22] DEJEAN T, VALENTINI A, MIQUEL C, et al. Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus* [J]. *Journal of Applied Ecology*, 2012, 49(4): 953-959.
 - [23] JERDE C L, MAHON A R, CHADDERTON W L, et al. "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA [J]. *Conservation Letters*, 2011, 4(2): 150-157.
 - [24] VALENTINI A, TABERLET P, MIAUD C, et al. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding [J]. *Molecular Ecology*, 2016, 25(4): 929-942.
 - [25] 吴昫晟, 唐永凯, 李建林, 等. 环境 DNA 在长江江豚监测中的应用 [J]. *中国水产科学*, 2019, 26(1): 124-132. (WU Yunsheng, TANG Yongkai, LI Jianlin, et al. The application of environmental DNA in the monitoring of the Yangtze finless porpoise, *Neophocaena phocaenoides*

- asaerorientalis* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2019, 26(1): 124-132. (in Chinese))
- [26] SHELTON A O, KELLY R P, O'DONNELL J L, et al. Environmental DNA provides quantitative estimates of a threatened salmon species [J]. Biological Conservation, 2019, 237: 383-391.
- [27] JO T, FUKUOKA A, UCHIDA K, et al. Multiplex real-time PCR enables the simultaneous detection of environmental DNA from freshwater fishes: a case study of three exotic and three threatened native fishes in Japan [J]. Biological Invasions, 2020, 22(2): 455-471.
- [28] PILLIOD D S, GOLDBERG C S, ARKLE R S, et al. Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples [J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2013, 70(8): 1123-1130.
- [29] HÄNFLING B, HANDLEY L L, READ D S, et al. Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods [J]. Molecular Ecology, 2016, 25(13): 3101-3119.
- [30] LACOURSIÈRE-ROUSSEL A, CÔTÉ G, LECLERC V, et al. Quantifying relative fish abundance with eDNA: a promising tool for fisheries management [J]. Journal of Applied Ecology, 2016, 53(4): 1148-1157.
- [31] TAKAHARA T, MINAMOTO T, YAMANAKA H, et al. Estimation of fish biomass using environmental DNA [J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35868.
- [32] DOUGHERTY M M, LARSON E R, RENSHAW M A, et al. Environmental DNA (eDNA) detects the invasive rusty crayfish *Orconectes rusticus* at low abundances [J]. Journal of Applied Ecology, 2016, 53(3): 722-732.
- [33] 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.
- [34] DEINER K, ALTERMATT F. Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river [J]. PLoS One, 2014, 9(2): e88786.
- [35] CARDINALE B J, DUFFY J E, GONZALEZ A, et al. Biodiversity loss and its impact on humanity [J]. Nature, 2012, 486(7401): 59-67.
- [36] DEINER K, FRONHOFER E A, MÄCHLER E, et al. Environmental DNA reveals that rivers are conveyor belts of biodiversity information [J]. Nature Communications, 2016, 7: 12544.
- [37] PORT J A, O'DONNELL J L, ROMERO-MARACCINI O C, et al. Assessing vertebrate biodiversity in a kelp forest ecosystem using environmental DNA [J]. Molecular Ecology, 2016, 25(2): 527-541.
- [38] BISTA I, CARVALHO G R, WALSH K, et al. Annual time-series analysis of aqueous eDNA reveals ecologically relevant dynamics of lake ecosystem biodiversity [J]. Nature Communications, 2017, 8: 14087.
- [39] PONT D, ROCLE M, VALENTINI A, et al. Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation [J]. Scientific Reports, 2018, 8: 10361.
- [40] BOUSSARIE G, BAKKER J, WANGENSTEEN O S, et al. Environmental DNA illuminates the dark diversity of sharks [J]. Science Advances, 2018, 4(5): eaap9661.
- [41] LACOURSIÈRE-ROUSSEL A, HOWLAND K, NORMANDEAU E, et al. eDNA metabarcoding as a new surveillance approach for coastal Arctic biodiversity [J]. Ecology and Evolution, 2018, 8(16): 7763-7777.
- [42] JO H, CHANG M, SEUNG-HYUN W, et al. Application of environmental DNA for monitoring of freshwater fish in Korea [J]. Korean Journal of Ecology and Environment, 2020, 53(1): 63-72.
- [43] GOREN A, OZSOLAK F, SHORESH N, et al. Chromatin profiling by directly sequencing small quantities of immunoprecipitated DNA [J]. Nature Methods, 2010, 7(1): 47-49.
- [44] MCCARTHY A. Third generation DNA sequencing: pacific biosciences' single molecule real time technology [J]. Chemistry & Biology, 2010, 17(7): 675-676.
- [45] PAWLOWSKI J, ESLING P, LEJZEROWICZ F, et al. Environmental monitoring through protist next-generation sequencing metabarcoding: assessing the impact of fish farming on benthic foraminifera communities [J]. Molecular Ecology Resources, 2014, 14(6): 1129-1140.
- [46] STOECK T, FRÜHE L, FORSTER D, et al. Environmental DNA metabarcoding of benthic bacterial communities indicates the benthic footprint of salmon aquaculture [J]. Marine Pollution Bulletin, 2018, 127: 139-149.
- [47] HASHIZUME H, SATO M, SATO M O, et al. Application of environmental DNA analysis for the detection of *Opisthorchis viverrini* DNA in water samples [J]. Acta Tropica, 2017, 169: 1-7.
- [48] HALL E M, CRESPI E J, GOLDBERG C S, et al. Evaluating environmental DNA-based quantification of ranavirus infection in wood frog populations [J]. Molecular Ecology Resources, 2016, 16(2): 423-433.
- [49] MOSHER B A, HUYVAERT K P, CHESTNUT T, et al. Design-and model-based recommendations for detecting and quantifying an amphibian pathogen in environmental samples [J]. Ecology and Evolution, 2017, 7(24): 10952-10962.
- [50] THOMSEN P F, SIGSGAARD E E. Environmental DNA metabarcoding of wild flowers reveals diverse communities of terrestrial arthropods [J]. Ecology and Evolution, 2019, 9(4): 1665-1679.
- [51] HARRER L E F, LEVI T. The primacy of bears as seed dispersers in salmon-bearing ecosystems [J]. Ecosphere, 2018, 9(1): e02076.