

环境DNA赋能中国陆生脊椎动物多样性监测——机遇与挑战

季吟秋^{1*}, 吴春莹¹, 朱光福², Douglas Yu^{1,3}, 姚蒙^{4*}, 车静^{1*}

1. 中国科学院昆明动物研究所遗传进化与动物模型全国重点实验室, 云南省高黎贡山生物多样性重点实验室, 昆明 650223

2. 云南大学生态与环境学院, 昆明 650500

3. School of Biological Sciences, University of East Anglia, Norwich NR4 7TJ, UK

4. 基因功能研究与操控全国重点实验室, 北京大学生命科学学院, 北京 100871

* 联系人, E-mail: jiyiniqu@hotmail.com; yaom@pku.edu.cn; chej@mail.kiz.ac.cn

2026-02-10 收稿, 2026-04-07 修回, 2026-06-01 接受, 2026-06-09 网络版发表

国家自然科学基金(32271739, 32325034)、云南省重点研发计划(202503AP140029)、云南省兴滇英才支持计划高端外国专家专项(t20221806-218)、云岭学者专项、中国科学院中国生物多样性监测与研究网络项目和成都大熊猫繁育基地(CAZG2026C07)资助

摘要 面对中国广袤且地形复杂的自然保护地, 传统监测手段在获取覆盖广域空间且涵盖全谱系的群落尺度数据时仍面临巨大挑战. 环境DNA(environmental DNA, eDNA)宏条形码技术为解决这一难题提供了新途径, 可实现非侵入式、高通量的物种检测, 并同时解析群落层面的广谱多样性信息. 本文聚焦陆生脊椎动物群落eDNA宏条形码, 系统评估其在赋能中国自然科学保护地监测中的潜力与关键挑战. 首先, 本文梳理了可用于陆生群落监测的多样化采样介质, 包括水体、土壤、空气及生物媒介eDNA等, 并分析其空间与生态信息特性. 随后, 通过对全球相关文献的系统性评估, 本文提出全流程“最佳实践”框架, 涵盖野外采样操作规范(如重复采样与阴性对照)、实验室全流程质控(如物理隔离、双端标签策略)、生物信息分析(如引物验证、过滤策略)以及下游统计建模(如占据模型的合理应用), 揭示当前研究现状与高标准之间的差距. 结合中国自然科学保护地的国情, 本文指出本土研究仍面临参考数据库覆盖不足等瓶颈, 并提出通过整合标准化eDNA操作、概率化统计推断及传统监测证据, 构建适用于复杂环境的eDNA常态化监测评估体系. 这一体系的完善, 将为国家公园及其他自然保护地提供长期、标准化的技术支撑, 使陆生脊椎动物eDNA监测逐步从试验性探索转向系统化应用.

关键词 环境DNA, 陆生脊椎动物, 宏条形码, 群落监测, 质控标准

人类活动引起的栖息地丧失、生境恶化及气候变化等一系列效应, 正导致全球生物多样性的持续下降^[1], 已严重威胁生态系统稳定性及其对人类社会的可持续支撑^[2]. 在此背景下, 精准识别并理解物种在时空尺度上的动态响应, 已成为制定高效生物多样性保护与恢复策略的根本前提^[3]. 长期生态学研究(long-term ecological research, LTER)通过积累连续观测数据, 为评估群落稳定性、种间互作及干扰响应提供了

关键基础^[4]. 以珍·古道尔(Jane Goodall)在贡贝溪流的长周期野外研究为例, 这类基于长期定点观测的研究能够为单一物种的种群动态提供高质量的时间序列数据^[5]. 然而, 这种依赖高强度、定点式的人工监测模式, 难以支撑大尺度生物多样性评估. 在全球生物多样性加速丧失的背景下, 传统野外调查(如目视调查、陷阱捕获等)往往受限于采样频率、空间覆盖及观察者偏差等问题, 难以快速获取覆盖全谱系、群落尺度的高

引用格式: 季吟秋, 吴春莹, 朱光福, 等. 环境DNA赋能中国陆生脊椎动物多样性监测——机遇与挑战. 科学通报, 2026, 71: 6685–6701

Ji Y, Wu C, Zhu G, et al. Environmental DNA: opportunities and challenges for terrestrial vertebrate diversity monitoring in China (in Chinese). Chin Sci Bull, 2026, 71: 6685–6701, doi: [10.1360/CSB-2026-0204](https://doi.org/10.1360/CSB-2026-0204)

分辨率数据。

这一挑战在中国以国家公园为主体的自然保护地体系建设中尤为突出,特别是在陆生脊椎动物的调查与监测实践中。中国脊椎动物多样性核心分布区多集中于西南山地等生物多样性热点地区,这些区域具有显著的环境异质性和巨大的垂直海拔梯度,孕育了大量分布范围狭窄、隐匿性强或具夜行性的物种^[6]。在这种复杂的生境背景下,传统监测手段面临严峻的物理与技术瓶颈:实地样线调查通常难以进入偏远核心区,导致数据在空间上存在系统性偏差;目前广泛使用的红外相机技术虽在中大型兽类监测上成效显著^[7],但对两栖类、爬行类以及树栖和小型隐匿性哺乳动物的探测能力仍然有限^[8]。这种对不同类群检测效率的差异,使得全面评估生态系统完整性面临巨大挑战。

环境DNA(environmental DNA, eDNA)技术的出现,为突破上述传统监测局限提供了新的分子生态学途径。该技术通过获取生物体释放并遗留于各类介质中的遗传信息,在无需直接观察或捕获个体的情况下实现物种探测^[9]。随着分子技术的不断发展,将eDNA与高通量测序技术相结合,可以实现从单一环境样本中同时鉴定多个物种乃至多个类群,从而显著提高对群落水平生物多样性信息的检测能力,并使在传统调查难以实施的区域开展标准化、高覆盖的生物多样性普查成为可能^[10]。

目前,基于水体eDNA的生物多样性监测在鱼类等水生类群中已形成相对完善的技术体系,并在水域生态系统评估中得到广泛应用^[11-13]。相比之下,陆生脊椎动物监测中的eDNA应用由于受到信号源稀疏性、介质异质性以及分子降解与迁移模式不确定性的重重限制,仍面临显著的方法学挑战。这种高度不确定性对采样方案的设计严密性与结果解读提出了更高要求,也成为该技术从试验性探索向常态化监测转型的关键瓶颈。鉴于此,本文旨在系统梳理适用于陆生脊椎动物eDNA监测的多样化介质及其适用边界;在汇总全球研究经验基础上,构建涵盖野外采样、实验室操作、生物信息分析及生态统计建模的全流程质量控制基准;并结合中国自然科学保护地的实际需求,探讨如何通过这一体系提升数据可靠性,为中国生物多样性监测网络提供可操作的技术支撑。

1 eDNA的主要技术路径与研究领域

eDNA技术的引入,使生物多样性监测从基于个体

或痕迹的直接观测延伸至对环境分子信号的捕捉。然而,该技术体系并非单一、通用的标准化流程,而是随调查对象、研究目标及采样介质的不同而分化为多种技术路径。因此,在将eDNA技术应用于陆生脊椎动物监测之前,有必要厘清各技术路径的适用情境,特别是在多物种普查中,不同检测策略之间的差异及其取舍。

1.1 检测维度:从单物种追踪到目标类群普查

按照监测目标的不同,eDNA技术大致可分为两类:针对单一物种的特异性检测,以及面向类群层面的多物种调查。

单物种靶向检测即针对单一或少数目标物种的特异性检测。其核心在于“先验性”,即研究者需预先明确监测对象,并为其设计物种特异性的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)引物与探针^[14]。PCR对目标DNA信号进行指数级扩增,可实现远超传统目视调查的检测灵敏度。凭借这一优势,靶向检测已成为入侵生物预警和濒危物种保护的重要工具。例如,Jerde等人^[15]在芝加哥水道系统通过eDNA侦测到亚洲鲤鱼的早期入侵信号,直接推动了五大湖区管理政策的修订;对于斑鳖(*Rafetus swinhoei*)等极危物种,该技术亦能提供关键的存续证据^[16]。在技术手段上,除常规PCR、实时荧光定量PCR(qPCR)和微滴数字PCR(ddPCR)外,近年来基于CRISPR-Cas系统的核酸检测方法^[17]也展现出巨大潜力。该方法依托Cas蛋白对靶序列的精准识别与切割,在保持高灵敏度的同时,凭借其恒温扩增特性,为野外快速检测提供了新的可能。总体而言,靶向检测流程成熟、成本较低,适用于大尺度筛查或长时间序列监测,但其固有局限在于无法兼顾目标物种以外的群落多样性信息。

目标类群的广谱调查:可获取特定类群(如脊椎动物)的多样性数据。目前主要存在以下三种技术策略:

(1) DNA宏条形码(DNA metabarcoding)。目前基于eDNA开展多物种调查最常用的方法。与单物种靶向检测类似,该技术同样依赖PCR扩增,但其核心差异在于采用针对特定类群的通用引物(如脊椎动物的12S rRNA通用引物),从而可在单一样本中同时解析多个物种的组成信息^[10,18-22]。在相对有限的资源投入下,该技术可获取高通量的物种组成数据,并显著降低对传统分类学鉴定的依赖,因此成为当前开展广谱调查最具可行性的技术选择。然而,该技术不可避免地受引物扩

增偏好的影响,且物种注释准确性高度依赖于参考数据库的完整性。

(2) 宏基因组(shotgun metagenomics)该方法不依赖PCR扩增,而是直接对环境样本中的总DNA进行鸟枪法测序,理论上具有较高的无偏性,可保留原始DNA的相对丰度信息^[23~25]。但在脊椎动物监测中,其面临严峻的“信噪比”问题:样本中大量序列(>80%)难以注释;且可识别序列以微生物DNA为主,脊椎动物序列通常不足1%。因此,即便显著提高测序深度,能够获取的有效信息仍十分有限,导致成本高昂而数据利用率低^[26],成为其在脊椎动物监测中的主要瓶颈。

(3) 捕获富集宏基因组(target enrichment metagenomics)该策略通过特异性RNA/DNA探针的杂交捕获,从环境样本中富集目标序列(如完整线粒体基因组或部分核基因组),在避免PCR扩增偏好的同时显著提高目标DNA的检测效率^[27,28]。相较宏条形码,该技术可获得更丰富的遗传信息,具备开展种群遗传学分析的潜力。然而,其实验成本高、流程复杂,并高度依赖高质量参考基因组,而许多野生动物仍缺乏相关数据。因此,该技术目前主要用于古DNA研究(如沉积物eDNA重构古生态^[29]),或特定珍稀物种的种群遗传监测^[30],尚难以支撑大规模常规监测。

1.2 研究领域:从水生到陆生

在eDNA技术发展的早期,对脊椎动物等大型生物的监测主要集中在水生生态系统^[12,14]。自Ficetola等人^[31]于2008年首次通过水样检测两栖动物以来,水域脊椎动物(尤其是鱼类)的eDNA研究发展迅速,成为该领域最活跃的研究方向^[14,20,32]。这一发展不仅得益于水体良好的扩散与混合特性,使有限水样可整合较大空间尺度的生物信息,更与水生生态系统中传统调查方法长期存在的低效率、高偏差、高成本密切相关。在此背景下,eDNA作为一种非侵入、灵敏的替代手段,被迅速纳入水生生物多样性监测,并逐步形成相对成熟的技术流程与应用框架^[11,33~36]。

相较之下,陆生脊椎动物eDNA监测起步较晚,其发展节奏在很大程度上受限于介质类型多样性及DNA信号来源与迁移过程的复杂性。随着研究的推进,采样介质逐渐突破水陆界限,形成多介质并行、相互补充的格局。一方面,水体仍是获取陆生脊椎动物信息的重要载体——动物在饮水、涉水、排泄或洗浴过程中向水体输入DNA,使水体在较大空间尺度上起到生物信

息“汇聚器”的作用,在哺乳动物等陆生类群的检出效率及区域物种组成刻画上展现优势^[37~45]。另一方面,为弥补缺水或局域环境的监测盲区,研究者开始探索多种非水介质,包括土壤^[46~48]、空气^[49~52]、蛛网^[53~55]、粪便^[56~59]以及无脊椎动物源DNA(invertebrate-derived DNA, iDNA;如吸血蚂蝗、食腐昆虫等)^[60~63]。这些介质中DNA的来源多样,反映物种活动的时空尺度各异,但为陆生脊椎动物的检测提供了更多可能的途径。

综上,从水域到陆域的拓展体现了eDNA技术在采样介质与应用场景上的适用性延展。水体凭借天然整合能力仍是解析大尺度陆生脊椎动物群落的关键介质;而土壤、空气及生物载体的引入则补充了缺水环境中的信息空白。介质多样化使研究者可根据目标类群的行为生态与调查的空间尺度,设计灵活且具成本效益的监测方案。然而,不同介质在eDNA信号来源、保留时间及迁移特性上差异显著,系统理解这些介质的固有属性与适用边界,是构建科学严谨的陆生脊椎动物监测体系的关键前提。

2 陆生脊椎动物eDNA的采样介质

陆生脊椎动物eDNA监测的核心在于如何从复杂陆地环境中有效获取微量遗留分子信号。相比相对均质的水生系统,陆地生态系统在空间结构和理化条件上高度异质,因此不存在适用于所有研究目标和空间尺度的统一采样介质。不同介质的eDNA信号在时空特征上差异显著:如水体可汇聚并反映广域群落信息,而土壤更多记录局域生境中的物种活动痕迹。因此,理解不同介质的信号形成机制及适用边界,是合理设计陆生脊椎动物eDNA研究的基础。本章将采样介质划分为环境介质与生物介质两大类,并系统梳理其应用特征。

2.1 环境介质

环境介质是指不依赖特定生物或其附属产物、直接从无机环境采集的样本类型,主要包括水体、土壤、积雪、空气与沉积物。不同环境介质在eDNA信号来源与时空代表性上存在系统差异,由此决定了其在陆生脊椎动物监测中的适用场景。

水体是目前应用最广的环境介质。流动水体(如河流、溪流)可通过水文过程整合集水区不同位置的分子信号,非常适用于区域尺度的物种名录构建和群落组成评估。例如近期在高黎贡山约30000 km²区域的

研究显示,通过系统采集溪流eDNA能够有效评估广域脊椎动物群落格局,展示其在大尺度调查中的潜力^[39].但汇聚效应也意味着单点信号难以对应物种的精确空间位置^[64,65],近年来已有研究尝试将eDNA数据与水文模型结合,以提升对信号来源区域的推断精度^[66,67].

相比之下,静水系统(如湖泊、水塘及人工饮水点)的eDNA信号通常反映局地尺度,更适用于局域群落或特定物种活动的评估.尤其在干旱或半干旱地区,水源是野生动物高度集中的地点.非洲稀树草原的研究表明,通过天然或人工水坑的eDNA可有效检出访问水源的哺乳动物群落,其结果与红外相机数据高度一致^[68].对比不同水环境还发现,静水系统中脊椎动物的检测概率高于流动水体,这可能与静水中eDNA更新较慢、易于积累有关,而流动水体的稀释与运输则会削弱信号强度^[69].

土壤作为陆地生态系统的基质,理论上是最直接的陆生动物eDNA沉积库.已有研究通过表层土壤eDNA分析,获得了与红外相机监测相当的多样性结果^[48].然而,土壤作为常规群落监测介质仍面临多重限制^[70]:其理化性质复杂,有机成分会增加eDNA信号解读的难度;eDNA在土壤中水平迁移有限,单点样本通常仅反映极小范围信息,导致群落调查需较高采样密度.此外,其检出效率受物种与地表接触方式影响,使其在广域、多物种调查中的通用性受到限制.因此,土壤eDNA目前更多被用于精细尺度的微生境分析或针对特定穴居物种的定向监测.

积雪是一种季节性环境介质,适用于高纬度或高海拔地区的冬季调查,主要用于特定陆生脊椎动物的存在确认,常结合足迹采样对大型或稀有物种进行分子验证^[71~73].由于信号高度依赖动物活动路径,其采样逻辑更接近于痕迹追踪而非系统化的环境抽样,因此不适用于群落层面的普查.

空气eDNA是近年兴起的前沿方向,通过非接触方式捕获空气气溶胶中的DNA信号.研究表明,主动(动力抽气过滤)与被动(吸附介质自然沉降)采样在受控环境或特定生境中均具可行性^[50~52].近期研究显示,在北京大学校园内通过被动吸附短期连续采集,可检出数十种鸟类和哺乳动物^[52].然而,在开阔野外环境中,空气eDNA信号的扩散与保留易受风场、紫外辐射及降水等因素影响,其时空代表性仍存在较大不确定性,因此在常规化陆生脊椎动物监测中的适用性尚需进一步验证.

最后,沉积物主要体现为长期生物多样性信息的保存介质.如湖泊或洞穴沉积物能长期保存DNA,为重建历史群落变化提供依据^[74].但由于其时间整合尺度长,沉积物eDNA往往难以反映现时物种分布,且涉及古DNA提取与复杂实验流程,因此不适合作为现代常规监测介质.

2.2 生物介质

生物介质是指利用生物个体或其衍生物作为eDNA信息的载体,通过生物的产物或行为过程实现对目标脊椎动物的间接取样,在一定程度上可突破复杂生境对人工采样可达性的限制.

在现有研究中,iDNA是生物介质应用的典范,其核心理念是将无脊椎动物视为生态系统中的“生物采样器”,利用其摄食过程中富集的脊椎动物DNA进行监测.自Schnell等人^[60](2012)证实吸血蚂蝗可用于森林哺乳动物监测以来,该方法在区域尺度上逐步展现出潜力.例如哀牢山的大规模蚂蝗采样首次在自然保护区尺度构建了陆生脊椎动物多样性图谱,展示了iDNA在复杂地形中实现标准化、广覆盖普查的可行性^[62].除吸血类媒介外,食腐苍蝇^[61,75~79]、食粪甲虫^[80~82]等也被用于iDNA研究.尽管iDNA对探测隐秘物种具有一定优势,但其数据解读需充分考虑媒介生态学特性:不同媒介的摄食策略会直接影响可检出的物种谱系,部分蚊种对特定类群具有偏好^[83,84],而旱地蚂蝗的取食对象主要取决于地表遭遇率,因此对树栖或飞行类物种的探测能力有限^[62].此外,媒介体内DNA的留存时间从数月(如蚂蝗)^[60]到数天(如蚊蝇)^[85]不等,导致信号反映的时间窗口不同.无脊椎动物的活动强度还受气候、季节等物候条件影响,因此iDNA的监测效率和数据代表性需结合媒介生态背景综合考量.

相较于iDNA,粪便作为生物活动产生的DNA载体,其功能定位明显不同.粪便eDNA的核心价值在于解析捕食关系与营养结构,为理解生态系统的能量流动提供独特视角.例如,已有研究表明,通过宏条形码分析食肉动物粪便,可有效揭示同域共存捕食者的食物重叠与分化格局,以及人兽冲突背景下的食物利用模式,为保护管理提供依据^[59,86,87].然而,粪便样本高度依赖目标物种样品的可发现性与采集机会,难以实现标准化和均匀覆盖的采样,因此在区域尺度多样性调查中的应用受到限制.

此外,一些由生物活动产生的痕迹介质也逐渐受

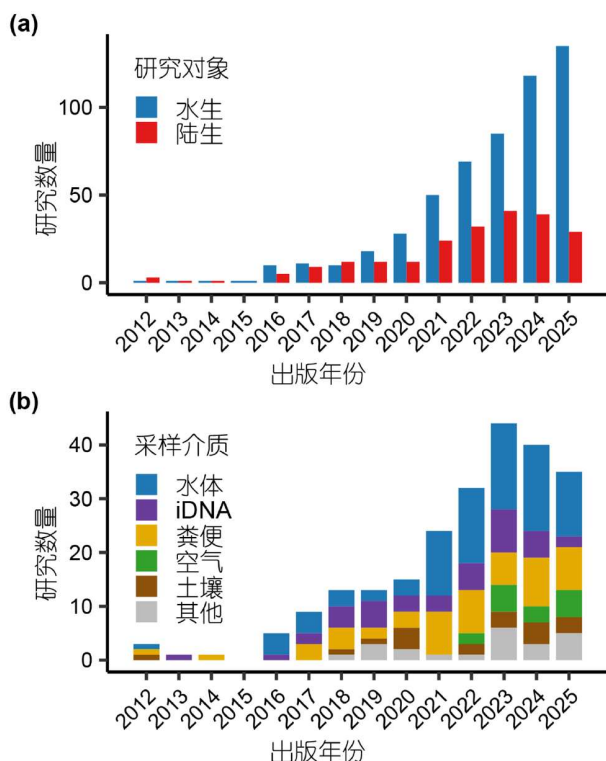


图2 (网络版彩色)全球脊椎动物eDNA研究的年度数量及陆生采样介质趋势。(a) 全球陆生(红)与水生(蓝)脊椎动物eDNA研究年度数量趋势。(b) 仅陆生脊椎动物研究中使用不同采样介质的年度分布情况

Figure 2 (Color online) Annual number of global vertebrate eDNA studies and trends in terrestrial sampling media. (a) Annual trends in the number of global terrestrial (red) and aquatic (blue) vertebrate eDNA studies. (b) Annual usage of different sampling media in terrestrial vertebrate studies only

从地理分布看,欧洲团队贡献最多(79篇),其次为北美洲(50篇)和亚洲(49篇),大洋洲、南美洲及非洲分别为26、15和3篇,反映出陆生脊椎动物eDNA研究在全球不同地区的发展水平仍存在明显差距。

在采样介质方面,水体(99篇)凭借其天然整合能力仍是获取陆生动物eDNA信号的主流载体(图2(b))。粪便、食丸及肠胃内容物的研究数量次之(53篇),但研究多聚焦偏食性与食物网分析,而非物种多样性监测。iDNA(39篇)已成为目前聚焦群落尺度多样性监测的第二大类载体,体现出研究者利用无脊椎动物取食特征辅助陆域监测的趋势。空气作为新兴介质,研究数量虽仅15篇,但已超过起步更早的土壤(12篇),显示出其发展潜力。总体而言,陆生eDNA的采样介质虽日趋多样,但不同研究在质控标准执行上的差异显著。下文将围绕关键技术环节,系统评估现有研究在控制偏差方面的实际执行情况。

3.2 野外采样阶段:漏检与污染风险的源头

陆生脊椎动物eDNA监测的首要挑战在于信号捕捉的高度不确定性,这主要源于种群密度普遍较低、动物行为差异以及环境异质性等多重因素的共同作用。由于陆生种群在单位空间内的生物量通常远低于水生生物,其在环境中遗留的DNA信号总体较为微弱,且信号汇入环境介质的方式也与水生生物存在显著差异:水生生物的信号可直接且持续地释放融入水体,而陆生动物向水体的信号输入则高度依赖饮水、涉水等行为,在时空上呈现明显的随机性与不连续性;在土壤、空气等非水介质中,这种微弱信号则受eDNA复杂迁移模式的影响,常呈斑块状分布,进一步加剧了采样尺度与点位选择对检测结果的影响。在此背景下,采样设计是否设置充足的独立重复成为检测可靠性的关键。据文献统计,约50%的研究未在样点尺度实施独立重复采样。部分研究虽通过合并子样本来缓解微尺度异质性,但若缺乏真正的平行样本就难以有效估计检测概率,从而限制占据模型等层级统计方法对假阴性校正的效能。因此,科学的采样设计应在提升空间代表性的同时,保留必要的独立重复,并系统记录采样相关信息,以支持后续基于概率的分析框架。

除了防控假阴性,采样阶段另一关键挑战是防范污染引发的假阳性。陆生脊椎动物eDNA通常以极低丰度存在,野外环境、采样器材及人员操作引入的微量外源DNA极易在后续PCR扩增中被指数级放大,造成物种误报。文献统计显示,在纳入分析的222篇研究中,仅约29%设置了野外阴性对照,反映多数研究未对采样全过程的污染风险实施系统监控。这意味着若污染发生于采样端,即便后续实验分析再严谨,也难以在后期有效追溯。因此,建立覆盖采样全过程的污染防控体系是eDNA监测的基本底线。这不仅包括同步设置野外阴性对照,更需严格的现场操作规范,例如优先使用一次性耗材,并在样点间对重复使用的器材实施严格去污。

目前,采用含次氯酸钠的漂白剂进行浸泡或擦拭,是公认有效且可操作性较强的去污手段。已有研究表明,在受控条件下,较低浓度(如0.5%有效氯)的漂白剂在充分反应时间内可有效降解游离DNA^[90],但在野外环境中,污染来源复杂,DNA可能以细胞或组织形式存在,且处理时间有限,低浓度处理难以保证去污效果。因此,实际操作中通常根据污染风险采用分级处理:常规表面去污可使用市售漂白剂按1:10稀释(10%,

v/v); 而对直接接触环境样品或污染风险较高的器材, 可采用更高比例(如30%~50%, v/v)^[91,92]进行短时间浸泡或反复擦拭, 以提高去污效率。需注意的, 高浓度次氯酸钠对金属器材具有腐蚀性, 对于精密或高价值设备可辅以专用DNA清除剂。无论采用何种方式, 处理后均应使用无菌水或乙醇充分冲洗, 以避免残留氧化剂影响后续样本。

此外, 样本保存同样是影响eDNA数据质量的重要环节。无论介质类型, 保存方法需在DNA稳定性、运输可行性与野外条件限制之间权衡。尤其在缺乏冷链的偏远山地, 使用核酸保存液(如Longmire's或RNAlater)或无水乙醇对保证样本质量甚为关键。但需注意乙醇挥发可能导致含水量变化, 影响保存效果。因此, 在大规模监测前应开展预实验, 确定适用于目标区域的最优采样与保存方案, 是保障数据可靠的必要步骤。

综上, 野外采样不仅是eDNA数据获取的起点, 也预先限定了后续分析的信息边界。采样中是否设置独立重复, 决定了阴性结果能否可靠判读为真实缺失或检测失败; 而野外对照与规范操作的缺失, 则会削弱对潜在污染的追溯与防控。这类关键质控信息具有不可逆性, 一旦缺失便无法在后续环节补救。即便是使用占据模型进行统计校正, 其有效性也高度依赖于采样阶段所保留的重复观测与质控信息。

3.3 实验室流程质控: 从物理隔离到扩增策略

实验室阶段是eDNA研究中质控意识最为集中但实践执行仍显薄弱的环节。文献统计显示, 尽管超过80%的研究设置了实验阴性对照, 但仅约32%明确在eDNA专用洁净实验室内进行PCR前操作, 而正压与空气过滤等高等级控制条件在多数研究中报告不足。由于气溶胶污染具有隐蔽性和累积性, 物理隔离与空气净化不足极易引入背景噪声导致假阳性。因此, 最佳实践应借鉴古DNA研究规范^[93], 强调PCR前、后操作的严格空间隔离与单向工作流, 配备专用设备, 并通过紫外照射与化学去污降低残留DNA风险。尤其需注意, PCR产物作为主要污染源, 必须在与DNA提取及PCR前处理完全隔离的区域操作, 以防产物通过气溶胶回流至前期流程。

除物理隔离外, 对照体系是识别和评估实验室污染的关键工具。DNA提取对照与PCR阴性对照应贯穿每个实验批次并同步进入测序。然而统计显示, 仅约48%的研究将对照纳入测序并明确报告其污染状况,

其余研究对照信息不透明或未测序, 严重削弱了污染识别能力, 也限制了研究间的可比性。此外, 引入已知组成的阳性对照可用于验证实验体系有效性并为识别扩增偏差与错误序列提供参照。需注意, 陆生eDNA样本常富含PCR抑制因子, 其整体性抑制可能导致扩增失败并产生假阴性。为此, 可引入合成DNA内标检测抑制效应, 并在必要时进行去抑制处理或适度稀释模板; 但对低丰度eDNA而言, 模板稀释可能增加漏检风险, 需权衡使用。

与其他调查手段不同, eDNA监测存在PCR扩增阶段的技术性未检出风险。即便DNA被成功采集, PCR的随机性仍可能导致低丰度物种检测失败。PCR重复不仅提高结果稳定性, 也是区分“采样未获取”与“扩增未检出”的必要手段。最新的eDNA占据模型^[94]正是基于这一逻辑, 将采样与PCR视为两个独立检测过程, 分别估算检测概率, 因此要求每个样本保留多个独立PCR检测结果。然而, 现有研究中虽约68%设置了PCR重复, 但近一半在扩增后合并产物, 仅得到单一扩增数据。这使得扩增失败的可能性无法被准确估计, 从而让低丰度物种的检测概率被高估。

为在实验操作层面保留这些关键重复信息, 识别序列的引入时机尤为关键。无论学术术语如何定义(如标签tag、索引index), 只要在首次PCR扩增中引入以区分不同技术重复, 其功能即相当于“标签”。在下一步PCR建库策略^[95]中, 扩增引物5'端直接连接测序接头与索引序列, 可在单次PCR中同时完成目标片段扩增与建库, 从而用索引区分技术重复; 在两步PCR体系中, 则必须在首次PCR中引入唯一标签组合, 以保留扩增阶段的独立观测值^[96]。若识别标记仅在后续建库阶段添加, 一旦PCR后处理发生交叉污染或重组错配, 相关误差将难以溯源并在数据分析中识别和剔除。因此, 采用双端标签设计, 其核心作用不仅在于区分技术重复, 也可降低后续实验引入的假阳性风险^[96,97]。

总体而言, 实验室阶段的质控核心不仅在于硬件条件的完善, 还在于通过规范的对照设置、识别序列的设计与管理及技术重复安排, 最大限度地保留能够区分不同误差来源的关键信息, 使假阳性与假阴性结果在后续分析中能够被有效识别。

3.4 引物选择、生物信息处理与物种注释的可靠性

引物选择、生信处理与物种注释是决定eDNA数据可靠性的关键环节。其中引物选择作为实验设计的

起点,从理论上限定了可被识别的物种范围.因此在实际应用中,首先需评估引物与研究区域内目标类群的匹配度:若存在系统性扩增偏好或错配,将直接导致群落组成的系统性漏检.这种因引物匹配不足造成的“观察缺失”发生于实验最前端,难以通过后期生信分析弥补.同时,引物扩增条码区的物种分辨率也很重要.即便目标DNA成功扩增,若该片段在近缘种间高度保守,仍难以实现可靠的物种区分.因此,在正式监测前基于本地参考序列对引物进行验证与优化,并采用多引物组合策略以降低漏检风险,已成为当前最佳实践的共识^[9,22].此外,当监测目标之外的非研究对象DNA以高浓度背景形式存在并占用测序资源时,可通过阻断引物(blocking primers)抑制非靶标DNA扩增^[98],但同时存在误阻断序列相似的目标类群的风险.随着测序成本持续下降,增加测序深度以缓解非靶标序列的干扰,在多数情况下可能比采用阻断引物更为可行.

在生信处理环节,对原始测序数据进行预处理是所有后续分析的前提,包括碱基质量筛选、去除接头、序列拼接及长度过滤等.完成初步处理后,如何在剔除假阳性噪声的同时保留真实低丰度物种信息,成为该环节的核心挑战.当前研究的分歧主要体现在过滤策略的选择上,可概括为两类.一类是常规阈值过滤策略,通常先通过DADA2^[99]、OBITools^[100]等工具进行算法去噪或归类,以校正扩增与测序错误,随后构建操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs)或扩增子序列变体(amplicon sequence variants, ASVs),再基于reads数或相对丰度设定阈值进行进一步清洗.另一类是以DAMe^[101]为代表的过滤策略,其在构建OTUs或ASVs之前,便通过设定序列在PCR重复中的最低出现频次及单次PCR内的最低拷贝数来筛除噪声.该策略基于“随机扩增错误或微量污染在多次PCR重复中一致出现概率极低”的假设,在前期污染控制符合最佳实践的前提下,能更有效地平衡检测灵敏度与假阳性风险^[102].文献统计显示,受限于实验流程的规范化程度,常规阈值过滤在现有研究中仍占主流(约68%).然而,这类策略通常缺乏对实验体系背景噪声的自适应性,经验阈值的直接套用既可能导致错误序列未被充分清除,也可能误删真实低丰度物种信号.相比之下,DAMe类策略通过引入技术重复的多维约束,更有利于区分随机错误与真实信号,但其判别优势在系统性污染较严重时也会受到限制,最终效果仍取决于前期实验质量与背景噪声特征.

在序列单元的构建策略上,传统的97%相似度聚类用于短片段eDNA序列处理时可能将近缘种错误合并为同一分类单元.因此,若采用OTU聚类,应结合研究区域参考序列评估所选阈值是否能有效区分目标物种,避免因阈值设定不当造成物种“过分合并”.文献统计显示,约67%的研究已采用更高相似度阈值(如99%)或具有单碱基分辨率的ASV策略.相较于通过固定相似度阈值的聚类方法,ASV能够完整保留遗传多样性,并可结合LULU^[103]等算法合并来自同一物种的冗余序列单元,从而在不损失分辨率的前提下降低分析复杂度.

物种注释作为连接分子序列与生态学解释的关键环节,目前尚缺乏统一的标准方案.文献统计显示,超过半数研究采用BLAST进行序列比对,其次为OBITools中的ecotag,而能够在概率框架下量化分类置信度的工具(如PROTAX)^[102,104,105]应用比例仍较低(<7%),且仅有少数研究将区域物种名录作为先验信息加以整合.这表明当前物种注释在很大程度上仍依赖人工筛查与经验判断.多数研究采取“先分配后人工校验”的模式,即根据区域物种名录或公共数据库(如GBIF等)中的分布信息对注释结果进行审查.然而在应对长期、大规模监测所产生的海量数据时,该模式不仅效率低下,也容易受公共DNA数据库(如GenBank)中误注^[106]、区域特有物种缺失或人为疏忽的影响,而引入新的注释错误.因此,对于长期监测,最佳实践应优先采用能够量化注释不确定性的概率框架工具,并结合区域物种名录约束,从而降低低可信度结果被直接记录为物种的风险.同时,还应警惕核基因组线粒体假基因(Numts)^[107]等伪信号被误计入物种多样性.

值得强调的是,生信处理的核心目标并非完全消除假阳性信号,而是尽可能剔除由实验扩增与测序过程产生的错误序列.低丰度但真实存在的污染序列可以在后续基于建模方法加以辨认,而实验性错误序列一旦保留,通常无法在统计分析中识别与修正.为此,设置已知组成的阳性对照,并结合PCR重复信息,是剔除错误序列、保留真实低丰度信号的关键策略^[89].通过这样的分层质控,生信环节才能为后续统计分析校正假阳性与假阴性偏差提供高质量的输入.

3.5 统计分析与生态学解读

陆生脊椎动物eDNA数据处理的终点并非物种名录的简单罗列,而应是在不完全观测条件下对物种真实分布的概率化推断.然而,据文献统计,仅9%(20/222

篇)的研究引入了占据模型,且多局限于只能校正假阴性的传统框架,针对eDNA特性发展、并基于多物种联合分析的模型^[94]应用仍极为有限。这反映出领域内对“未检出不代表不存在”这一关键问题的系统性重视仍显不足。

占据模型的核心价值在于为eDNA普遍存在的假阴性和假阳性偏差提供统一推断框架^[108,109]。一方面,检测失败可能导致真实存在的物种未被观测到,形成假阴性偏差;另一方面,实验室操作不当或生态过程(如捕食行为)带来的外源DNA则可能形成假阳性偏差。通过引入重复观测结构和分层建模(图3),占据模型可同时估计这两类偏差,从而显著降低这些不确定性对生态推断的干扰。

需要指出的是,占据模型的有效性高度依赖于输入数据的质量。模型的核心价值在于处理严格规范流程下不可避免的随机性与不确定性(如物种的偶发性

检出或极微弱的背景信号),而非修正因操作不当或系统性污染导致的实验误差。若数据源头存在显著质量缺陷,即便形式上满足重复观测的结构要求,模型推断结果仍可能缺乏可靠的生态学意义,甚至产生误导性结论。本质而言,统计推断的稳健性在很大程度上受限于底层数据质量,复杂的模型框架往往难以从存在系统性偏差的数据中提取出准确的物种分布信号。

同时,还需警惕模型在结构层面的误用。占据模型推断依赖于明确的分层重复观测结构:采样重复反映野外采样是否成功获取目标DNA信号,而DNA提取、PCR等技术重复则反映实验过程中对该信号的检测概率。两类重复对应于不同阶段,在模型中承担不同角色,不能简单等同,否则模型估计将失去对真实占据过程的解释力。此外,样点数量有限或环境协变量信息不足时,占据概率数值也难以支撑稳健推断。已有文献在不满足上述前提的情况下直接套用占据模型,导致单一

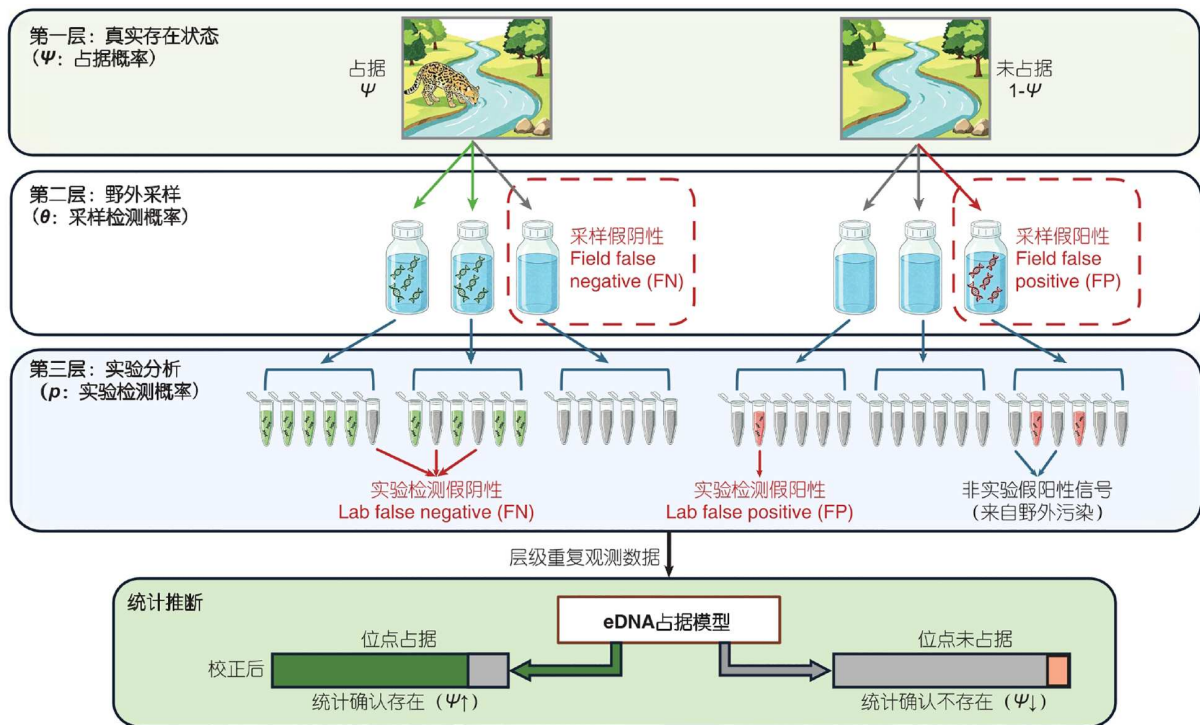


图3 (网络版彩色)eDNA占据模型的分层统计推断示意图。图中展示了从真实占据状态在采样层与实验层逐级传递过程中产生的误差累积。通过引入多层级重复观测,模型能够在统计层面同时估计并校正各级假阴性/假阳性偏差(相关数学推断原理详见文献^[108]),从而在底层输出还原后的物种真实占据概率(ψ)。图中部分图形元素由生成式人工智能工具Google Gemini辅助生成,作者完成整体设计、内容修订与最终审核

Figure 3 (Color online) Schematic of hierarchical statistical inference in the eDNA occupancy model. The figure illustrates the error accumulation during the step-by-step propagation of the true occupancy state through the sampling and laboratory levels. By introducing multi-level replicated observations, the model can simultaneously estimate and correct false negative/false positive biases at each level within a statistical framework (see Ref. ^[108] for detailed mathematical inference principles), thereby outputting the recovered true species occupancy probability (ψ) at the base level. Some elements in the figure were generated with the assistance of generative AI tools (Google Gemini), while the authors completed the overall design, content revision, and final verification

样本检出的物种仍获得高占据概率,这类结果在方法学上缺乏可靠支撑,也可能误导保护决策。

此外,统计分析的单位选择亦可能引入错误。例如,部分研究将OTU直接作为物种单元用于生态分析。由于eDNA短条码和聚类方法的共同影响,OTU与物种并非一一对应:一方面,种内遗传变异及聚类阈值的设定可能将同一物种划分为多个OTU(图S1(a));另一方面,条码分辨力的局限又可能将近缘物种合并为单一OTU(图S1(b))。在此情况下,若直接以OTU层面的统计结果推断物种层面的生态格局,可能引起系统性偏差。

类似地,将测序reads数直接或经对数转换后用作相对丰度指标,仅在引物对目标类群无显著扩增偏好,且样本间技术噪声得到有效控制的前提下才具备解释基础。考虑到eDNA信号的高度空间异质性,将reads数直接等同于丰度往往缺乏稳健支撑。相比之下,更审慎的策略是将reads数作为观测强度输入适配的统计模型,通过模型对其生态含义进行约束性解释,而非在分子层面直接赋予其丰度意义。

在最佳实践中,统计模型不应被视为数据分析阶段的事后修正工具,而应从研究设计阶段就被前置考虑。通过围绕模型假设合理布设样点、构建独立重复结构,并在数据层面提供经过充分质控的可靠输入,统计建模才能真正发挥其校正检测概率、量化不确定性的优势,使eDNA监测从“是否检出”的描述性工具,发展为能够支撑概率化生态推断的科学方法。

在实际监测中,上述重复结构的构建还需在检测可靠性与资源投入之间进行权衡。需要强调的是,采样重复与实验重复并非针对特定目标物种的可选优化,而是支撑检测概率估计与模型推断的基本前提。具体重复水平则应依据研究目标与系统特征进行调整:在目标物种稀有或检测概率较低的情境下,增加采样或PCR重复有助于降低假阴性风险;而在信号较强或目标为常见物种时,则可在保证模型可识别性的前提下适度降低重复强度。鉴于不同区域环境异质性、目标类群及技术条件差异显著,统一的重复数量标准难以适用,更可行的策略是在研究初期通过预实验评估检测概率及其变异性,并据此优化采样与实验设计,使有限资源在统计效率与监测覆盖之间取得平衡。

综上所述,eDNA研究中假阳性与假阴性的风险贯穿于野外采样、实验室操作、生物信息处理及统计分析的各个环节。数据可靠性并非源自某一个步骤的技术先进与否,而在于整个流程的系统性集成以及关键

质控标准的同步满足。文献量化结果显示,尽管部分关键质控与分析手段已被证明对提升数据可靠性具有决定性作用,但其在现有研究中的采纳率仍然有限。高质量的陆生eDNA监测,应以严谨的采样设计为前提,以规范化、可追溯的操作为基础,以严格去污、物理隔离等硬件环境为支撑,再辅以生信去噪与概率化统计建模的协同应用,并在数据与分析层面保持充分透明。唯有在这一整合框架下,eDNA技术才能从探索性研究,逐步发展为支撑长期生态监测与生物多样性保护决策的可靠工具。

4 中国陆生脊椎动物eDNA监测的机遇与挑战

从全球研究格局来看,中国在eDNA领域虽起步稍晚,但近年来在亚洲乃至全球范围内展现出高度的研究活跃度。据文献统计,截至2025年,国内已发表脊椎动物eDNA宏条形码研究196篇,约占亚洲总量的66%,位居区域首位。然而,其研究结构呈现显著的“水强陆弱”特征:其中仅27篇关注陆生脊椎动物,占比不足14%,远低于全球29.1%的平均水平。从发表时间看,剔除仅涉及食性分析的研究,国外早在2012年即开始探索陆生群落的eDNA监测,而国内真正意义上的多样性调查研究直到2021年后才逐步出现。这种结构性失衡与起步的滞后,客观反映了陆域环境复杂性对分子监测造成的技术障碍,也意味着eDNA技术在中国生物多样性保护最为迫切的陆域监测领域,仍未在主流监测体系中获得充分认可与发挥。

尽管整体数量有限,近年来国内已陆续出现具有国际前沿代表性的研究,在研究设计、流程规范与统计分析框架上展现出较高的成熟度。例如,在中国云南哀牢山开展的蚂蝗iDNA研究^[62],通过系统化样本采集,在近700 km²的自然保护区尺度上重建了陆生脊椎动物群落组成,为在复杂山地环境中开展广域eDNA普查提供了关键实证。而近期在高黎贡山约30000 km²范围内实施的溪流eDNA研究^[39],则进一步引入适配eDNA数据特性的多物种占据模型,通过分别估算采样和实验阶段的检测概率,实现了对物种检测双重偏差的概率化校正。除上述以监测为导向的研究外,国内亦有在西南山地及三江源地区开展的食肉动物粪便DNA研究,在区域尺度上验证了物种鉴定结果与红外相机监测的高度一致,并拓展至食性结构分析^[86,87]。总体而言,尽管此类高标准研究目前仍属少数,但其方法论上的成熟度,已初步勾勒出中国陆生脊椎动物eDNA监测

由“跟随验证”向“标准输出”转变的潜在路径,为正在推进中的国家公园体系建设中的常态化监测提供了重要参考。

然而,要将eDNA技术在中国自然科学保护地实现规模化应用仍面临多重瓶颈。

首先是参考序列库在条码选择、地理来源与类群覆盖上的系统性不足。在国际生命条形码计划(International Barcode of Life, iBOL)的推动下,当前公共数据库中储备最丰富的动物条码主要集中于COI基因^[110]。然而,在环境样本中,COI引物易优先扩增无脊椎动物和微生物,从而淹没脊椎动物信号,限制其检测灵敏度。因此,脊椎动物eDNA研究更倾向于使用12S或16S rRNA基因。据文献统计,在全球陆生脊椎动物的eDNA研究中,12S和16S的使用率分别为75.2%和47.7%,而COI的使用率仅为22%(且多用于广谱真核生物扩增)。在现实中,12S/16S的序列储备远低于COI,导致高需求条码与高覆盖数据库之间存在显著错位。以中国西南山地等热点地区为例,实测统计显示公开数据库对区域内记录物种的12S序列覆盖率仅60%~70%^[39],仍有三分之一以上的物种处于“分子本底空白”状态。此外,现有参考序列在地理来源上亦存在不足,部分数据源于非本地标本,而种内地理分化可能导致eDNA序列与参考序列之间的匹配相似度低于常规鉴定阈值(如97%~99%),从而降低注释准确性。因此,构建覆盖多条码、整合凭证标本与地理分布信息的本土化参考数据库,是推动中国陆生脊椎动物eDNA实现规模化应用的首要任务。

其次是“eDNA生态学”基础研究在中国本土的明显缺位。中国横跨多个气候带,不同生境下eDNA的空间代表性差异显著,但目前针对eDNA在复杂生境中的迁移与衰减过程的系统研究极其有限。在缺乏这些基础认知的情况下,样点布设、采样频次以及对统计分析至关重要的环境协变量范围,都难以获得具有普适性的科学依据。因此,当前中国陆生eDNA监测所面临的核心挑战,并非分析工具本身的缺乏,而是先进分析框架与薄弱的底层数据支撑,以及对eDNA本身复杂性认知不足之间的脱节。

除需要弥补这些底层数据与生态过程认知的不足外,中国陆生脊椎动物eDNA监测的突破更在于多种观测手段的协同应用。这种整合的核心,是充分发挥不同方法的优势互补:eDNA技术凭借其对全谱系类群的高灵敏检测能力,能够覆盖红外相机等传统方法

在两栖类、爬行类、小型哺乳类等隐蔽物种上的监测盲区;而基于影像或实地观察的物理证据,则可以为难以注释或存在争议的分子信号提供关键参考和验证。通过引入层级建模,将多种观测数据整合到统一的概率框架中,利用物理证据为分子信号提供校正与约束,从而更可靠地评估物种存在状态。这种由“数据叠加”向“证据互补”的转变,不仅能有效弥补底层数据缺失带来的推断风险,也将推动eDNA从一种前沿的分子检测手段,逐步融入主流保护决策依赖的综合监测体系中。

5 结论与展望

eDNA宏条形码技术作为分子生态学的重要发展,为提升中国陆生脊椎动物监测的空间覆盖、类群完整性、精准度及标准化提供了新的可能。本综述通过梳理全球研究现状发现,eDNA技术从水生向陆生的拓展,并非简单的应用场景延伸,而是伴随着采样介质多样化、实验流程因地制宜的系统化调整以及结果解释方式转变的整体过程。尽管该技术在提高隐秘物种的检出率、覆盖偏远区域方面具有明显优势,但其科学价值的实现必须建立在全流程质控体系之上。单纯的技术更迭并不能直接转化为科学决策依据,只有在充分认识观测结果存在局限性的前提下,对检测偏差进行系统控制与解释,eDNA数据才能支持稳健的群落层面推断。

在此基础上,未来中国陆生脊椎动物eDNA监测的进一步发展,将深度受益于自动化与智能化的工程革命。研发适配中国复杂山地环境的自动化或半自动化采样平台、野外现场eDNA自动处理站,以及基于微流控技术的模块化实验室流程,将是推动该技术从实验室科研转向野外常态化业务的核心驱动力。同时,人工智能技术不仅将赋能生物信息的自动注释与参考数据库的智能校补,还可用于在大规模监测数据中识别异常模式与趋势变化,为后续的管理响应提供决策线索。通过构建AI驱动的监测分析云平台,可以实现从样本采集到结果产出的全过程数字化管理,推动监测结果由阶段性汇总向更具时效性的连续评估转变。这种智能化的转型,要求我们在系统设计上更加清晰地界定每一环节的不确定性来源,从而在提升监测效率的同时确保科学产出的严谨性。

从宏观治理层面看,eDNA技术能否在中国生物多样性保护中形成长期价值,取决于数据体系与管理规

范的同步完善。当前, 陆生脊椎动物条形码与参考基因组在地理和类群上的覆盖不足, 仍是制约群落层面推断的重要瓶颈。未来亟需在国家层面推动高质量参考序列的系统积累, 并建立跨研究团队、跨管理部门的数据整合机制, 以减少重复投入带来的资源浪费和信息割裂造成的障碍。在此基础上, 应明确区分探索性研

究与常态化业务监测的不同目标, 逐步形成适用于自然保护地体系的eDNA操作与解读规范。只有当方法边界清晰、数据来源透明、推断步骤可复核时, 陆生脊椎动物eDNA监测才能真正融入生物多样性保护决策体系, 并在全球生物多样性治理进程中提供具有实践意义的中国经验。

参考文献

- 1 Keck F, Peller T, Alther R, et al. The global human impact on biodiversity. *Nature*, 2025, 641: 395–400
- 2 Mace G M, Barrett M, Burgess N D, et al. Aiming higher to bend the curve of biodiversity loss. *Nat Sustain*, 2018, 1: 448–451
- 3 Gonzalez A, Vihervaara P, Balvanera P, et al. A global biodiversity observing system to unite monitoring and guide action. *Nat Ecol Evol*, 2023, 7: 1947–1952
- 4 Magurran A E, Baillie S R, Buckland S T, et al. Long-term datasets in biodiversity research and monitoring: assessing change in ecological communities through time. *Trends Ecol Evol*, 2010, 25: 574–582
- 5 Goodall J. The Chimpanzees of Gombe: Patterns of Behavior. Cambridge: Harvard University Press, 1986
- 6 Tang Z, Wang Z, Zheng C, et al. Biodiversity in China's mountains. *Front Ecol Environ*, 2006, 4: 347–352
- 7 Sheng L, Dajun W, Zhishu X, et al. Camera-trapping in wildlife research and conservation in China: review and outlook. *Biodiv Sci*, 2014, 22: 685
- 8 Burton A C, Neilson E, Moreira D, et al. REVIEW: wildlife camera trapping: a review and recommendations for linking surveys to ecological processes. *J Appl Ecol*, 2015, 52: 675–685
- 9 Taberlet P, Bonin A, Zinger L, et al. Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring. Oxford: Oxford University Press, 2018
- 10 Deiner K, Bik H M, Mächler E, et al. Environmental DNA metabarcoding: transforming how we survey animal and plant communities. *Mol Ecol*, 2017, 26: 5872–5895
- 11 Yao M, Zhang S, Lu Q, et al. Fishing for fish environmental DNA: ecological applications, methodological considerations, surveying designs, and ways forward. *Mol Ecol*, 2022, 31: 5132–5164
- 12 Takahashi M, Saccò M, Kestel J H, et al. Aquatic environmental DNA: a review of the macro-organismal biomonitoring revolution. *Sci Total Environ*, 2023, 873: 162322
- 13 Altermatt F, Couton M, Carraro L, et al. Utilizing aquatic environmental DNA to address global biodiversity targets. *Nat Rev Biodivers*, 2025, 1: 332–346
- 14 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 Appl Ecol*, 2014, 51: 1450–1459
- 15 Jerde C L, Mahon A R, Chadderton W L, et al. “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conserv Lett*, 2011, 4: 150–157
- 16 Seimon T A, Van Long N, Le M, et al. Development and application of a portable environmental DNA test for the detection of *Rafetus swinhoei* in Viet Nam. *Environ DNA*, 2024, 6: e70011
- 17 Williams M, O'Grady J, Ball B, et al. The application of CRISPR-Cas for single species identification from environmental DNA. *Mol Ecol Resour*, 2019, 19: 1106–1114
- 18 Yu D W, Ji Y, Emerson B C, et al. Biodiversity soup: metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. *Methods Ecol Evol*, 2012, 3: 613–623
- 19 Ji Y, Ashton L, Pedley S M, et al. Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. *Ecol Lett*, 2013, 16: 1245–1257
- 20 Miya M. Environmental DNA metabarcoding: a novel method for biodiversity monitoring of marine fish communities. *Annu Rev Mar Sci*, 2022, 14: 161–185
- 21 Gillespie R G, Bik H M, Hickerson M J, et al. Insights into Ecological & Evolutionary Processes via community metabarcoding. *Mol Ecol*, 2023, 32: 6083–6092
- 22 Ruppert K M, Kline R J, Rahman M S. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: a systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Glob Ecol Conservation*, 2019, 17: e00547
- 23 Curto M, Verissimo A, Riccioni G, et al. Improving whole biodiversity monitoring and discovery with environmental DNA metagenomics. *Mol Ecol Resour*, 2025, 25: e14105

- 24 Ji Y, Huotari T, Roslin T, et al. SPIKEPIPE: a metagenomic pipeline for the accurate quantification of eukaryotic species occurrences and intraspecific abundance change using DNA barcodes or mitogenomes. *Mol Ecol Resour*, 2020, 20: 256–267
- 25 Tang M, Hardman C J, Ji Y, et al. High-throughput monitoring of wild bee diversity and abundance via mitogenomics. *Methods Ecol Evol*, 2015, 6: 1034–1043
- 26 Stat M, Huggett M J, Bernasconi R, et al. Ecosystem biomonitoring with eDNA: metabarcoding across the tree of life in a tropical marine environment. *Sci Rep*, 2017, 7: 12240
- 27 Gnirke A, Melnikov A, Maguire J, et al. Solution hybrid selection with ultra-long oligonucleotides for massively parallel targeted sequencing. *Nat Biotechnol*, 2009, 27: 182–189
- 28 Slon V, Hopfe C, Weiß C L, et al. Neandertal and Denisovan DNA from Pleistocene sediments. *Science*, 2017, 356: 605–608
- 29 Murchie T J, Monteath A J, Mahony M E, et al. Collapse of the mammoth-steppe in central Yukon as revealed by ancient environmental DNA. *Nat Commun*, 2021, 12: 7120
- 30 Jensen M R, Sigsgaard E E, Liu S, et al. Genome-scale target capture of mitochondrial and nuclear environmental DNA from water samples. *Mol Ecol Resour*, 2021, 21: 690–702
- 31 Ficetola G F, Miaud C, Pompanon F, et al. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biol Lett*, 2008, 4: 423–425
- 32 Thomsen P F, Willerslev E. Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biol Conserv*, 2015, 183: 4–18
- 33 Valentini A, Taberlet P, Miaud C, et al. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Mol Ecol*, 2016, 25: 929–942
- 34 Hänfling B, Lawson Handley L, Read D S, et al. Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Mol Ecol*, 2016, 25: 3101–3119
- 35 Buxton A, Matechou E, Griffin J, et al. Optimising sampling and analysis protocols in environmental DNA studies. *Sci Rep*, 2021, 11: 11637
- 36 Sanches T M, Schreier A D, Doi H. Optimizing an eDNA protocol for estuarine environments: balancing sensitivity, cost and time. *PLoS One*, 2020, 15: e0233522
- 37 Deiner K, Fronhofer E A, Mächler E, et al. Environmental DNA reveals that rivers are conveyor belts of biodiversity information. *Nat Commun*, 2016, 7: 12544
- 38 Lyet A, Pellissier L, Valentini A, et al. eDNA sampled from stream networks correlates with camera trap detection rates of terrestrial mammals. *Sci Rep*, 2021, 11: 11362
- 39 Ji Y, Diana A, Li X, et al. High quality, granular, timely, trustworthy and efficient vertebrate species distribution data across a 30,000 km² protected area complex. *Ecol Lett*, 2025, 28: e70302
- 40 Harper L R, Lawson Handley L, Carpenter A I, et al. Environmental DNA (eDNA) metabarcoding of pond water as a tool to survey conservation and management priority mammals. *Biol Conserv*, 2019, 238: 108225
- 41 Sales N G, Kaizer M C, Coscia I, et al. Assessing the potential of environmental DNA metabarcoding for monitoring Neotropical mammals: a case study in the Amazon and Atlantic Forest, Brazil. *Mammal Rev*, 2020, 50: 221–225
- 42 Reji Chacko M, Altermatt F, Fopp F, et al. Catchment-based sampling of river eDNA integrates terrestrial and aquatic biodiversity of alpine landscapes. *Oecologia*, 2023, 202: 699–713
- 43 McDonald R, Bateman P W, Cooper C, et al. Detection of vertebrates from natural and artificial inland water bodies in a semi-arid habitat using eDNA from filtered, swept, and sediment samples. *Ecol Evol*, 2023, 13: e10014
- 44 Cantera I, Coutant O, Jézéquel C, et al. Low level of anthropization linked to harsh vertebrate biodiversity declines in Amazonia. *Nat Commun*, 2022, 13: 3290
- 45 Wu C, Li J, Bai R, et al. Integrative multi-method survey for terrestrial vertebrate inventories. *Zool Res Diversity Conserv*, 2025, 2: 153–164
- 46 Andersen K, Bird K L, Rasmussen M, et al. Meta-barcoding of ‘dirt’ DNA from soil reflects vertebrate biodiversity. *Mol Ecol*, 2012, 21: 1966–1979
- 47 Walker D M, Leys J E, Dunham K E, et al. Methodological considerations for detection of terrestrial small-body salamander eDNA and implications for biodiversity conservation. *Mol Ecol Resour*, 2017, 17: 1223–1230
- 48 Tetzlaff S J, Katz A D, Wolff P J, et al. Comparison of soil eDNA to camera traps for assessing mammal and bird community composition and site use. *Ecol Evol*, 2024, 14: e70022
- 49 Lynggaard C, Frøslev T G, Johnson M S, et al. Airborne environmental DNA captures terrestrial vertebrate diversity in nature. *Mol Ecol Resour*, 2024, 24: e13840
- 50 Lynggaard C, Bertelsen M F, Jensen C V, et al. Airborne environmental DNA for terrestrial vertebrate community monitoring. *Curr Biol*, 2022, 32: 701–707.e5
- 51 Clare E L, Economou C K, Bennett F J, et al. Measuring biodiversity from DNA in the air. *Curr Biol*, 2022, 32: 693–700.e5

- 52 Lin R, Yan Z, Yao M. Robust passive sampling of airborne environmental DNA to monitor plants and animals. *Methods Ecol Evol*, 2025, 16: 2118–2130
- 53 Newton J P, Nevill P, Bateman P W, et al. Spider webs capture environmental DNA from terrestrial vertebrates. *iScience*, 2024, 27: 108904
- 54 Berard A, Pradel J, Charbonnel N, et al. Spider webs, soil or leaf swabs to detect environmental DNA from terrestrial vertebrates: what is the best substrate? *Mol Ecol Resour*, 2025, 25: E70037
- 55 Newton J P, Allentoft M E, Bateman P W, et al. Airborne DNA and spider webs outperform other eDNA sources for monitoring terrestrial vertebrates. *Mol Ecol Resour*, 2026, 26: e70067
- 56 Shehzad W, Riaz T, Nawaz M A, et al. Carnivore diet analysis based on next-generation sequencing: application to the leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) in Pakistan. *Mol Ecol*, 2012, 21: 1951–1965
- 57 Harris R B, Jiak Z, Yinqiu J, et al. Evidence that the Tibetan fox is an obligate predator of the plateau pika: conservation implications. *J Mammalogy*, 2014, 95: 1207–1221
- 58 De Barba M, Miquel C, Boyer F, et al. DNA metabarcoding multiplexing and validation of data accuracy for diet assessment: application to omnivorous diet. *Mol Ecol Resour*, 2014, 14: 306–323
- 59 Shao X, Lu Q, Liu M, et al. Generalist carnivores can be effective biodiversity samplers of terrestrial vertebrates. *Front Ecol Environ*, 2021, 19: 557–563
- 60 Schnell I B, Thomsen P F, Wilkinson N, et al. Screening mammal biodiversity using DNA from leeches. *Curr Biol*, 2012, 22: R262–R263
- 61 Calvignac-Spencer S, Merkel K, Kutzner N, et al. Carrion fly-derived DNA as a tool for comprehensive and cost-effective assessment of mammalian biodiversity. *Mol Ecol*, 2013, 22: 915–924
- 62 Ji Y, Baker C C M, Popescu V D, et al. Measuring protected-area effectiveness using vertebrate distributions from leech iDNA. *Nat Commun*, 2022, 13: 1555
- 63 Lee P S, Sing K W, Wilson J J, et al. Reading mammal diversity from flies: the persistence period of amplifiable mammal mtDNA in blowfly guts (*Chrysomya megacephala*) and a new DNA mini-barcode target. *PLoS One*, 2015, 10: e0123871
- 64 Bai R, Ji Y, Hu W, et al. Seasonal differences and downstream transport of terrestrial vertebrate eDNA: insights from integrated camera-trap survey and water eDNA metabarcoding. *Glob Ecol Conservation*, 2025, 62: e03854
- 65 Deiner K, Altermatt F, Gilbert T. Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. *PLoS One*, 2014, 9: e88786
- 66 Carraro L, Altermatt F. eDITH: an R-package to spatially project eDNA-based biodiversity across river networks with minimal prior information. *Methods Ecol Evol*, 2024, 15: 806–815
- 67 Goralczyk M, Lyet A, Naidoo R, et al. Combining eDNA metabarcoding, hydrology-based modeling and camera trap datasets to assess the potential of river DNA in monitoring terrestrial mammals. *Environ DNA*, 2025, 7: e70089
- 68 Farrell M J, Govender D, Hajibabaei M, et al. Environmental DNA as a management tool for tracking artificial waterhole use in savanna ecosystems. *Biol Conserv*, 2022, 274: 109712
- 69 Zhang S, Zhao J, Yao M. Urban landscape-level biodiversity assessments of aquatic and terrestrial vertebrates by environmental DNA metabarcoding. *J Environ Manage*, 2023, 340: 117971
- 70 Zinger L, Donald J, Brosse S, et al. Advances and prospects of environmental DNA in neotropical rainforests. In: *Advances in Ecological Research*. New York: Elsevier, 2020. 331–373
- 71 Kinoshita G, Yonezawa S, Murakami S, et al. Environmental DNA collected from snow tracks is useful for identification of mammalian species. *Zool Sci*, 2019, 36: 198–207
- 72 Hellström M, Kruger E, Näslund J, et al. Capturing environmental DNA in snow tracks of polar bear, Eurasian lynx and snow leopard towards individual identification. *Front Conserv Sci*, 2023, 4: 1250996
- 73 Franklin T W, McKelvey K S, Golding J D, et al. Using environmental DNA methods to improve winter surveys for rare carnivores: DNA from snow and improved noninvasive techniques. *Biol Conserv*, 2019, 229: 50–58
- 74 Ficetola G F, Poulenard J, Sabatier P, et al. DNA from lake sediments reveals long-term ecosystem changes after a biological invasion. *Sci Adv*, 2018, 4: eaar4292
- 75 Lee P, He T, Dong M, et al. Comparative study on blowfly-derived DNA and camera trapping in assessing mammalian diversity in subtropical forests. *Forests*, 2023, 14: 2180
- 76 Rodgers T W, Xu C C Y, Giacalone J, et al. Carrion fly-derived DNA metabarcoding is an effective tool for mammal surveys: evidence from a known tropical mammal community. *Mol Ecol Resour*, 2017, 17: e133
- 77 Jahan M, Lagostina L, Gräßle T, et al. Fly iDNA suggests strict reliance of the causative agent of sylvatic anthrax on rainforest ecosystems. *Environ DNA*, 2024, 6: e401
- 78 Gogarten J F, Hoffmann C, Arandjelovic M, et al. Fly-derived DNA and camera traps are complementary tools for assessing mammalian biodiversity. *Environ DNA*, 2020, 2: 63–76

- 79 Fernandes K, Bateman P W, Saunders B J, et al. Use of carrion fly iDNA metabarcoding to monitor invasive and native mammals. [Conservation Biol](#), 2023, 37: e14098
- 80 Saranholi B H, França F M, Vogler A P, et al. Testing and optimizing metabarcoding of iDNA from dung beetles to sample mammals in the hyperdiverse Neotropics. [Mol Ecol Resour](#), 2024, 24: e13961
- 81 Drinkwater R, Williamson J, Clare E L, et al. Dung beetles as samplers of mammals in Malaysian Borneo—a test of high throughput metabarcoding of iDNA. [PeerJ](#), 2021, 9: e11897
- 82 Frolov A, Vishnevskaya M, Viljanen H, et al. New data on trophic associations of dung beetles (Coleoptera, Scarabaeidae, Scarabaeinae) and lemurs (Primates, Lemuroidea) in Madagascar revealed by metabarcoding. [Biodiv Data J](#), 2024, 12: e130400
- 83 Hopken M W, Reyes-Torres L J, Scavo N, et al. Temporal and spatial blood feeding patterns of urban mosquitoes in the San Juan Metropolitan Area, Puerto Rico. [Insects](#), 2021, 12: 129
- 84 Saranholi B H, Rodriguez-Castro K G, Carvalho C S, et al. Comparing iDNA from mosquitoes and flies to survey mammals in a semi-controlled Neotropical area. [Mol Ecol Resour](#), 2023, 23: 1790–1799
- 85 Calvignac-Spencer S, Leendertz F H, Gilbert M T P, et al. An invertebrate stomach's view on vertebrate ecology. [BioEssays](#), 2013, 35: 1004–1013
- 86 Shao X, Lu Q, Xiong M, et al. Prey partitioning and livestock consumption in the world's richest large carnivore assemblage. [Curr Biol](#), 2021, 31: 4887–4897.e5
- 87 Lu Q, Cheng C, Xiao L, et al. Food webs reveal coexistence mechanisms and community organization in carnivores. [Curr Biol](#), 2023, 33: 647–659.e5
- 88 Aucone E, Kirchgeorg S, Valentini A, et al. Drone-assisted collection of environmental DNA from tree branches for biodiversity monitoring. [Sci Robot](#), 2023, 8: eadd5762
- 89 Zinger L, Bonin A, Alsos I G, et al. DNA metabarcoding—need for robust experimental designs to draw sound ecological conclusions. [Mol Ecol](#), 2019, 28: 1857–1862
- 90 de Silva Wijeyeratne A, Gweon H S. Evaluating the effectiveness of sodium hypochlorite for genomic DNA decontamination. [Environ DNA](#), 2025, 7: e70057
- 91 Wilcox T M, McKelvey K S, Young M K, et al. Understanding environmental DNA detection probabilities: a case study using a stream-dwelling char *Salvelinus fontinalis*. [Biol Conserv](#), 2016, 194: 209–216
- 92 Goldberg C S, Turner C R, Deiner K, et al. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. [Methods Ecol Evol](#), 2016, 7: 1299–1307
- 93 Shapiro B A, Hofreiter M. Ancient DNA: Methods and Protocols. New York: Humana Press Springer, 2012
- 94 Diana A, Matechou E, Griffin J, et al. eDNAPlus: a unifying modeling framework for DNA-based biodiversity monitoring. [J Am Stat Assoc](#), 2025, 120: 120–134
- 95 Ni J, Pan J, Wang Y, et al. An integrative protocol for one-step PCR amplicon library construction and accurate demultiplexing of pooled sequencing data. [Mar Life Sci Technol](#), 2023, 5: 564–572
- 96 Bohmann K, Elbrecht V, Carøe C, et al. Strategies for sample labelling and library preparation in DNA metabarcoding studies. [Mol Ecol Resour](#), 2022, 22: 1231–1246
- 97 Schnell I B, Bohmann K, Gilbert M T P. Tag jumps illuminated – reducing sequence-to-sample misidentifications in metabarcoding studies. [Mol Ecol Resour](#), 2015, 15: 1289–1303
- 98 Vestheim H, Jarman S N. Blocking primers to enhance PCR amplification of rare sequences in mixed samples – a case study on prey DNA in Antarctic krill stomachs. [Front Zool](#), 2008, 5: 12
- 99 Callahan B J, McMurdie P J, Rosen M J, et al. DADA2: high-resolution sample inference from Illumina amplicon data. [Nat Methods](#), 2016, 13: 581–583
- 100 Boyer F, Mercier C, Bonin A, et al. obitools: a unix-inspired software package for DNA metabarcoding. [Mol Ecol Resour](#), 2016, 16: 176–182
- 101 Zepeda-Mendoza M L, Bohmann K, Carmona Baez A, et al. DAME: a toolkit for the initial processing of datasets with PCR replicates of double-tagged amplicons for DNA metabarcoding analyses. [BMC Res Notes](#), 2016, 9: 255
- 102 Axtner J, Crampton-Platt A, Horig L A, et al. An efficient and robust laboratory workflow and tetrapod database for larger scale environmental DNA studies. [GigaScience](#), 2019, 8: 1–7
- 103 Frøslev T G, Kjølter R, Bruun H H, et al. Algorithm for post-clustering curation of DNA amplicon data yields reliable biodiversity estimates. [Nat Commun](#), 2017, 8: 1188
- 104 Somervuo P, Koskela S, Pennanen J, et al. Unbiased probabilistic taxonomic classification for DNA barcoding. [Bioinformatics](#), 2016, 32: 2920–2927
- 105 Zito A, Rigon T, Dunson D B. Inferring taxonomic placement from DNA barcoding aiding in discovery of new taxa. [Methods Ecol Evol](#), 2023,

- 14: 529–542
- 106 James Harris D. Can you bank on GenBank? *Trends Ecol Evol*, 2003, 18: 317–319
- 107 Song H, Buhay J E, Whiting M F, et al. Many species in one: DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 13486–13491
- 108 Diana A, Matechou E, Griffin J E, et al. An RShiny app for modelling environmental DNA data: accounting for false positive and false negative observation error. *Ecography*, 2021, 44: 1838–1844
- 109 Guillera-Aroita G, Lahoz-Monfort J J, van Rooyen A R, et al. Dealing with false-positive and false-negative errors about species occurrence at multiple levels. *Methods Ecol Evol*, 2017, 8: 1081–1091
- 110 Ratnasingham S, Hebert P D N. BOLD: the barcode of Life Data System (<http://www.barcodinglife.org>). *Mol Ecol Notes*, 2007, 7: 355–364
-

补充材料

图S1 基于脊椎动物12S条码参考序列的遗传差异分布

本文以上补充材料见网络版csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责

Summary for “环境DNA赋能中国陆生脊椎动物多样性监测——机遇与挑战”

Environmental DNA: opportunities and challenges for terrestrial vertebrate diversity monitoring in China

Yinqiu Ji^{1*}, Chunying Wu¹, Guangfu Zhu², Douglas Yu^{1,3}, Meng Yao^{4*} & Jing Che^{1*}

¹ Key Laboratory of Genetic Evolution and Animal Models, and Yunnan Key Laboratory of Biodiversity and Ecological Conservation of Gaoligong Mountain, Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650223, Yunnan, China

² School of Ecology and Environmental Science, Yunnan University, Kunming 650500, China

³ School of Biological Sciences, University of East Anglia, Norwich NR4 7TJ, UK

⁴ State Key Laboratory of Genetic Engineering, School of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China

* Corresponding authors, E-mail: jiyinqiu@hotmail.com; yaom@pku.edu.cn; chej@mail.kiz.ac.cn

Environmental DNA (eDNA) metabarcoding has emerged as a powerful molecular approach for non-invasive, high-throughput biodiversity monitoring, enabling the detection of multiple taxa from trace genetic material shed into the environment. While initially developed and validated in aquatic ecosystems—where water acts as a natural integrator of biological signals across space—the method has undergone rapid expansion into terrestrial environments, where greater environmental heterogeneity and lower DNA availability impose new methodological challenges.

Focusing on terrestrial vertebrate communities, this review synthesizes the technical development of eDNA metabarcoding from aquatic to terrestrial applications, emphasizing the diversification of sampling media. These can be broadly categorized into environmental media (e.g., water, soil, air, and sediment) and biological media (invertebrate-derived DNA, iDNA, and feces), each characterized by distinct mechanisms of DNA accumulation, transport, and persistence. Flowing water integrates biodiversity signals across catchments, enabling regional-scale community assessments, whereas localized media such as soil and air provide finer-resolution snapshots of species presence but are constrained by spatial representativeness and DNA retention. Biological samplers, including hematophagous leeches and carrion flies, further extend detection capacity in complex or inaccessible terrains, particularly for cryptic and nocturnal species.

A central limitation of terrestrial eDNA applications lies in the high susceptibility to both false-positive and false-negative detections, arising from contamination, stochastic DNA capture, amplification biases, and incomplete reference databases. These sources of error are cumulative and often irreversible if not addressed at early stages. Based on a systematic review of 222 peer-reviewed studies on terrestrial vertebrate eDNA metabarcoding published between 2012 and 2025, we evaluate the implementation of quality control (QC) practices and identify critical gaps between current practice and best-practice standards.

Rather than prescribing uniform protocols, we propose a comprehensive QC framework spanning four key stages. First, field sampling design must incorporate independent spatial replication and field negative controls to distinguish true absence from detection failure, yet approximately half of existing studies lack adequate replication. Second, stringent laboratory procedures—including physical separation of pre- and post-PCR workflows, contamination control, and early-stage dual-indexing strategies—are essential for preserving the integrity of technical replicates and enabling error tracing. Third, optimized bioinformatic pipelines should balance noise removal and taxonomic resolution through denoising approaches (e.g., ASVs) and probabilistic taxonomic assignment, while accounting for uncertainties in reference databases. Fourth, statistical inference, particularly occupancy modeling based on hierarchical replication structures, provides a robust framework to account for imperfect detection, although it remains underutilized (<10% of studies).

We conclude that, when implemented under rigorous QC standards, eDNA metabarcoding is sufficiently mature to support routine biodiversity monitoring in complex terrestrial systems. In the context of China's rapidly expanding national park network, its application will require parallel development of regionally comprehensive reference sequence databases and integration with conventional monitoring approaches within probabilistic frameworks. Such advances will enable scalable, standardized, and scientifically robust biodiversity assessments, supporting evidence-based conservation and management.

eDNA, terrestrial vertebrates, metabarcoding, community monitoring, quality control

doi: [10.1360/CSB-2026-0204](https://doi.org/10.1360/CSB-2026-0204)