J. Lake Sci.(湖泊科学), 2027, 39(2):000-000
DOI 10.18307/2027.0232
©2027 *by Journal of Lake Sciences*

环境 DNA 宏条形码方法跨实验室鱼类监测结果的一致性评估*

罗明洁[1]，张丽娟[1,2]，刘训杰[2,3]，孙晶莹[5]，杨雅楠[6]，杨江华[5]，张　咏[6]，张效伟[1,2,4**]
（1：云南大学生态与环境学院&云南省高原山地生态与退化环境修复重点实验室，昆明 650500）
（2：国家环境保护长江中下游水生态健康重点实验室，南京大学环境学院，南京 210023）
（3：湖南省地质实验测试中心，长沙 410014）
（4：植被结构功能与建造全国重点实验室，云南大学，昆明 650500）
（5：南京易基诺环保科技有限公司，南京 210019）
（6：江苏省环境监测中心，南京 210019）

摘　要：环境DNA（environmental DNA，eDNA）宏条形码已成为水生生物监测的颠覆性技术手段，但不同实验室间结果的一致性仍缺乏系统评估。本研究联合三家实验室，在统一标准化框架下对同批次淡水样品独立处理与测序，并通过阳性样本验证流程可靠性。结果表明，阳性样本中三家实验室均无假阴性，假阳性序列占比<0.5%；环境样本中实验室间物种检出重叠率≥80%，α多样性变异系数<0.05；实验室共检出物种的相对丰度相关系数≥0.94。尽管群落组成存在显著差异（PERMANOVA, R^2=0.35, P=0.005），但优势物种丰度模式高度一致。本研究证实，在关键环节标准化前提下，eDNA宏条形码可实现跨实验室间物种检出与多样性估计的一致，但群落结构比较需谨慎考虑实验室差异。
关键词：环境 DNA；实验室比对；鱼类多样性监测；技术标准化

Assessing the inter-laboratory consistency of environmental DNA metabarcoding for fish monitoring*

Luo Mingjie[1], Zhang Lijuan[1,2], Liu Xunjie[2,3], Sun Jingying[5], Yang Yanan[6], Yang Jianghua[5], Zhang Yong[6] & Zhang Xiaowei[1,2,4**]
（1：*School of Ecology and Environmental Sciences, Yunnan University & Yunnan Key Laboratory for Plateau Mountain Ecology and Restoration of Degraded Environments, Kunming 650500, Yunnan, P.R.China;*
2：State Key Laboratory of Water Pollution Control and Green Resource Recycling, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210023, P.R.China;
3：*Geological Experiment and Testing Center of Hunan Province, Changsha, 410014, P.R.China*;
4：*State Key Laboratory of Vegetation Structure, Function and Construction, Yunnan University, Kunming 650500, Yunnan, P.R.China*;
5：*Nanjing E-genomics Technology Co.,Ltd. 210019, Nanjing, P.R.China*;
6：*Jiangsu Provincial Environmental Monitoring Center, Nanjing, P.R.China*）

Abstract: Environmental DNA (eDNA) is an important tool for monitoring and studying aquatic biodiversity. However, the consistency of eDNA results among different laboratories has not been well evaluated. In this study, three independent laboratories processed and sequenced identical freshwater samples using a unified standardized framework, and positive controls were included to verify the reliability of the experimental workflow. The results showed no false negatives in positive

* 2026-03-18 收稿；2026-05-27 收修改稿；2026-06-03 录用。
国家重点研究计划项目 (2022YFC3202101)资助。
** 通信作者；E-mail：zhangxw@ynu.edu.cn。

control samples across all laboratories, and false-positive sequences accounted for less than 0.5%. For field environmental samples, the overlap rate of species detection among laboratories was ≥ 80%, and the coefficient of variation for α-diversity was below 0.05. The relative abundance of commonly detected species exhibited strong cross‐laboratory correlations ($r \geq 0.94$). Significant differences in microbial community composition were detected by PERMANOVA ($R^2 = 0.35$, $P = 0.005$), whereas the abundance patterns of dominant species were highly consistent across laboratories. This study confirms that standardized key procedures enable consistent cross-laboratory performance of eDNA metabarcoding in species detection and biodiversity estimation. Laboratory-specific effects may alter microbial community structure results, and thus, comparisons of inter-laboratory community structure should be interpreted with caution.

Keywords: Environmental DNA; Inter-laboratory comparison; fish diversity monitoring; standardization

1 研究背景

环境 DNA（environmental DNA, eDNA）结合宏条形码方法已成为水生生物多样性监测与研究的革命性技术[1-2]。水生生物持续向水体释放脱落组织、粘液及排泄物等遗传物质，通过采集水样并结合高通量测序，即可在无干扰的条件下获取群落水平的遗传信息，尤其适用于河流、湖泊及近岸海域等水生生态系统的生态监测与动态评估[3-5]。环境 DNA 的核心优势首先在于经济可行性：随着高通量测序（HTS）成本骤降，1 GB 数据价格已从 2010 年的数千元降至 2025 年不足 30 元，使得环境 DNA 长时间序列、大范围以及高频率动态监测成为可能[6-8]；其次是非入侵性：采样过程不干扰生物，具有无损伤、非侵入性的特点[9-11]；第三是能够以高概率检测到稀有、隐蔽和难以捕捉的物种[12-14]；第四是多类群整合：环境 DNA 可同步监测多个动物类群（鱼类、两栖、昆虫等）与多个浮游植物类群，为全面评估生物多样性提供全面的生态视角[15-16]。最后是技术流程可以标准化，可实现数据的可重复性与可追溯性[17]。

环境 DNA 技术标准化建设是其实现成熟应用的关键路径。目前该技术方法多由不同实验室团队独立研发，分析链条长，步骤多，涵盖现场采样、滤膜保存、DNA 提取、PCR 扩增、高通量测序和生物信息分析等多个环节[18-19]。每一环节的细微差异如采样体积（1 L vs. 30 L）、保存液选择、滤膜材质（PES vs. GF）、引物选择、测序深度、OTU/ASV 阈值等均可能引入技术偏差[20-22]，导致环境 DNA 监测结果呈现出差异。这些技术噪声的干扰可能掩盖真实的生态信号，使得跨研究、跨时空和跨区域的数据难以拼接，无法形成可累积的长时序、大尺度监测体系。因此，环境 DNA 由“研究工具”迈向“管理工具”的核心瓶颈已不再是方法验证，而是覆盖现场采样-分子实验-数据处理全流程的标准化，将技术变量与生态变量分离，确保监测结果的可重复、可监管和可审计[23]。只有完成这一跨越，环境 DNA 才能真正服务于大尺度生物多样性评估和监管决策[23]。

环境 DNA 技术的标准化建设已成为国际共识，多个国际组织和国家已启动系统的标准化工作。欧盟 2016 年建立了 DNAqua-Net（欧洲水生生态系统生物评估的基因工具研发网络）[24]，并发布系列技术规范，以解决当前欧洲环境 DNA 研究“方法碎片化”、数据不可比较的痛点；美国地质调查局 2015 年发布《环境 DNA 采样方案》[25]，该方案已成为美国国家水生环境 DNA 战略（National Aquatic eDNA Strategy）的采样基础模块；此外，MIEM（Minimum Information for Reporting of Environmental Metabarcoding Data）指南于 2024 年底发布，围绕环境宏条形码工作流程的各个环节（从实验室物理布局到数据归档）提供了一套信息清单[26]。中国在环境 DNA 标准化方面进展尤为迅速。中国环境科学学会于 2023 年发布《淡水生物监测环境 DNA 宏条形码法》（T/CSES 81—2023）[27]，这是我国首个环境 DNA 宏条形码领域的团体标准，对采样-实验-质控-数据-报告全流程给出共识性操作规范。同年，江苏省发布地方标准《淡水生物环境 DNA 监测技术方法》（DB32/T 4539—2023）[28]，为地方层面的环境 DNA 监测实施提供了具体技术指引。2024 年以来，中国 eDNA 标准化体系持续扩展：北京市发布了《淡水大型底栖无脊椎动物环境 DNA 监测技术规范》（DB11/T 2358—2024）[29]，四川省发布了《水生态监测环境 DNA 荧光定量 PCR 法》（T/SEEPLA 08—2024）[30]。2025 年，基于环境 DNA 的外来入侵水生动物分布评估技术指南已进入国家生态环境标准征求意见阶段，同时《基于环境 DNA 的长江水生生物监测与完整性评价技术导则》

（T/CQSES 27—2025）也已正式发布[31]。这些标准的密集出台表明，中国正在快速构建覆盖方法流程和生态评价的多层次环境 DNA 标准体系。

欧美地区已在各自技术标准框架下开展了跨实验室环境 DNA 结果比对的研究，验证了标准化流程对提升跨实验室可比性的有效性。Riccioni 等[32]在阿尔卑斯山淡水鱼类环境 DNA 比对研究中发现，两家实验室在模拟群落和自然湖泊样本中均获得了良好的结果可重复性。Vasselon 等组织了涉及 14 个国家的硅藻 DNA 宏条形码的能力验证和跨实验室方法比对，结果表明标准化流程能够支撑跨实验室间的可重复和可靠数据产出[33]。此外，针对海洋底栖生物和鲑鱼养殖环境监测的跨实验室研究也得出类似结论：标准化流程下不同实验室可获得高度可比的生态评估结论[34]。虽然我国标准体系已初步形成，但是尚未开展在中国本土标准化框架内的“同标准、同样本、多中心”的系统性验证[17,23]。因此，在我国现行的环境 DNA 标准体系框架下评估不同实验室间监测的结果一致性，既是验证现有标准有效性的关键环节，也是推动标准由“文本规范”真正转化为“管理工具”的实证基础。

本研究旨在回应上述需求，在江苏省地方标准《淡水生物环境 DNA 监测技术方法》（DB32/T 4539—2023）框架下，评估不同实验室之间的环境 DNA 检测结果的一致性，为构建可比较、可审查的环境 DNA 监测标准化体系提供实证支持与科学基础。本次研究联合三家具有环境 DNA 检测经验的实验室，对同批次采集的同一站点水样进行独立处理与测序，并采用统一生物信息学分析流程进行分析，具体内容包括：（1）通过阳性样本验证此次实验流程的可靠性；（2）评估实验室内部的重复性；（3）比较三家实验室之间在物种检出，α 多样性指数和物种组成等方面的一致性。我们预期，在标准规定的核心参数一致前提下，实验室间检出物种重叠度和 α 多样性应具有较高一致性，但稀有物种检出可能受局部差异影响。

2 研究方法

2.1 阳性样本

本次研究以鳙（*Aristichthys nobilis*）、棒花鱼（*Abbottina rivularis*）、银鲫（*Carassius gibelio*）、短颌鲚（*Coilia brachygnathus*）、兴凯刺鳑鲏（*Acheilognathus chankaensis*）与鯊（*Hemiculter leucisculus*）6 种鱼类为对象，分别提取各物种组织的 DNA，并将其 DNA 等质量混合构建成阳性样本。该阳性样本用于评估环境 DNA 宏条形码过程中的假阴性与假阳性检出情况，即检测该体系能否正确识别阳性样本的所有物种，以及是否出现非目标物种的 DNA 序列。

2.2 环境 DNA 样本采集

三个实验室于 2022 年 8 月同时在江苏省南京市江心洲夹江（118.713 E，32.034 N）（长江支流）进行环境 DNA 野外样本采集（图 1），本研究未对现场过滤方式作出强制性统一规定，允许各实验室采用其常规的过滤设备。实验室 1 与实验室 3 选用混合纤维素酯（MCE）膜和相同的真空泵进行过滤，每张滤膜过滤水体积为 500 ml，每 6 个滤膜合并为一个样本，每个样本合计过滤 3 L 水，共 7 个重复样本。实验室 2 选用 MCE 膜蝶式一体化过滤器进行过滤（图 1b），每个过滤器过滤水体积为 3 L，有 6 个重复样本。此外，每个实验室都设置有采样阴性对照样本。各实验室采样人员采集样品后，将样品运送至各实验室独立进行后续分子实验。

2.3 DNA 提取和 PCR 扩增

DNA 提取依据各自使用的试剂盒制造商说明进行（见表 1）。所有实验室均使用鱼类通用引物 Teleo2 (Forward-AAACTCGTGCCAGCCACC；Reverse-GGGTATCTAATCCCAGTTTG)[35]对 12S rRNA 基因片段进行扩增。除采集的野外样本与采样阴性对照样品外，PCR 过程中设置 3 个 PCR 阴性对照。每个样本设置 3 个 PCR 重复，以增加序列检出概率。各实验室 PCR 反应试剂、PCR 循环数和 PCR 热循环温度等参数见表 1。扩增反应结束后，PCR 产物通过 2%琼脂糖加 GelRed 荧光染料凝胶进行电泳检测，将同一样本的重复 PCR 产物混合，用 VAHTS DNA clean beads 磁珠（Vazyme，中国）进行片段选择和 PCR 产物纯化。纯化后的产物用 Qubit 荧光定量 (Thermo Fisher，美国) 进行浓度测定，然后所有样本等质量混合，用于高通量测序文库构建。各实验室均独立按照制造商操作说明完成建库，三个实验室统一要求每个样本测序深度大于 1 万条。

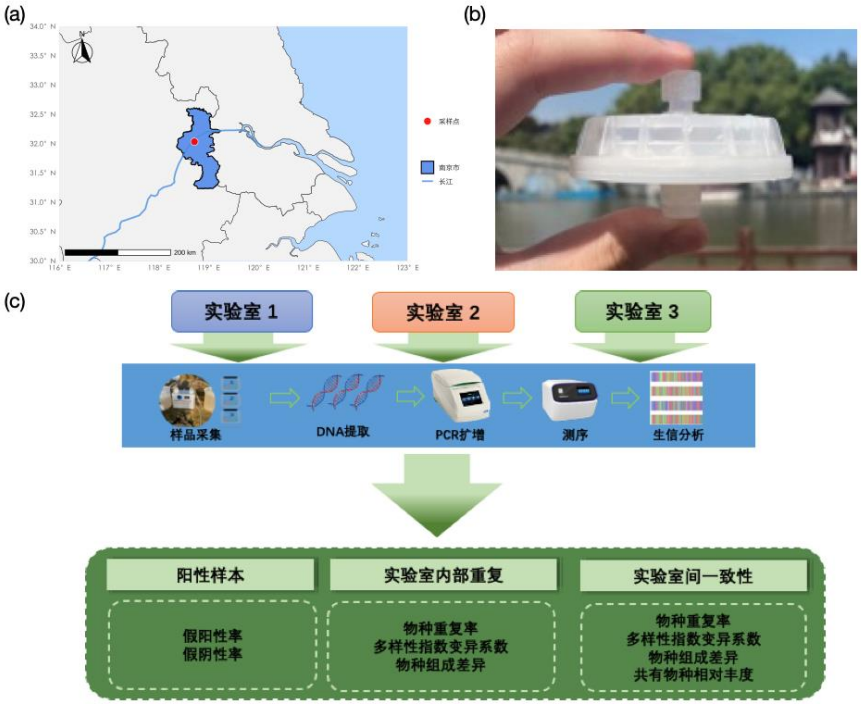

图 1 跨实验室比对 eDNA 采样点

(a) 示意图，红色圆点为采样点，蓝色多边形为南京市，蓝色曲线为长江。（b）一体式蝶式过滤器 (c) 总体技术路线

Fig. 1 Sampling site for the inter-laboratory comparison of eDNA-based fish monitoring (a) Schematic map of the sampling site. The red dot indicates the sampling location, and the blue polygon delineates Nanjing City. The blue curve represents the Yangtze River. (b) Integrated butterfly-type filter. (c) General technical roadmap

表 1 各实验室主要参数

Tab.1 Key Parameters in Each Laboratory

实验参数	实验室 1	实验室 2	实验室 3
过滤水体积	3 L	3 L	3 L
DNA 提取试剂盒	Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kits	易基诺环境 DNA 提取试剂盒 MT060	Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kits
PCR 引物	Teleo2	Teleo2	Teleo2
DNA 聚合酶	Takara Taq 酶	Vazyme Taq 酶	Takara Taq 酶
PCR 变性温度	95 ℃	95 ℃	95 ℃
PCR 退火温度	56.3 ℃	56.3 ℃	56.3 ℃
PCR 延长温度	72 ℃	72 ℃	72 ℃
PCR 循环数	31	35	35
建库试剂盒	VAHTS Universal DNA Library Prep Kit for Illumina V3	VAHTS Universal DNA Library Prep Kit for Ion Torrent V2	Ion Plus Fragment Library Kit
测序平台	Illumina Novaseq 6000	Ion Torrent Proton	Ion Torrent S5 Plus

2.4 生物信息学分析

测序数据质量用 FastQC（https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/）与 MultiQC[36]进行查看。 Illumina 与 Ion Torrent 原始测序数据均用 Fastp 0.20.1[37]去除接头序列和剪掉低质量末端碱基（Q 值 ＜20）；Illumina 测序数据使用 vsearch (v 2.14.1) [38] --fastq_mergepairs 命令将各样本双端序列合

并。合并后的 Illumina 序列和 Ion Torrent 序列用 barcode_splitter 0.18.6 (https://bitbucket.org/princeton_genomics/barcode_splitter)用于识别样本标签并根据标签拆分样本，允许样本标签有 2 个错配碱基。然后使用 cutadapt 4.9[39]识别并剪去标签和正反向引物序列，允许引物序列有 0.1 的错配率。用 vsearch --fastq_filter 去掉含有 N 的序列，并将 fastq 文件转为 fasta 文件后合并各样本序列文件为一个序列文件。随后用 vsearch --derep_fulllength 命令去除重复序列，vsearch --fastx_filter 命令保留最小长度 120 bp, 最大长度 250 bp 序列。过滤完的序列通过 vsearch --uchime_denovo 命令去除 chimera。使用 swarm[40]以 1 bp 差异进行 OTU 聚类，并将聚类结果转为 OTU 表格。最后使用 R 包 LULU 进一步合并冗余的 OTUs [41]。用 vsearch --search_global 命令将 OTU 序列与从 NCBI 整理的本地物种条形码数据库比对分析，物种水平的注释相似性阈值设置为 98%。最后，为了平衡技术噪音和保留可靠生态信号，保留了各样本中序列相对丰度大于 0.1%的物种用于后续分析[42]。

2.5 统计分析

所有统计分析均在 R4.3.1 环境中完成。为识别稳定且真实存在的物种信号，仅保留在任意实验室中至少 3 个重复样本中出现的物种用于后续群落分析。物种重复率指在至少 3 个重复样本或三个实验室中出现的物种数占该实验室检出总物种数的比例。采用 R 包 vegan 2.6.4（https://vegandevs.github.io/vegan/）进行群落生态学分析，具体包括：计算各实验室内部及实验室间的 Shannon 多样性指数、Simpson 多样性指数和 Pielou 均匀度指数；基于 Bray-Curtis 距离进行非度量多维尺度分析（NMDS），以可视化实验室内部及实验室间重复样本的物种组成差异；同时，采用置换多元方差分析（PERMANOVA）检验不同实验室间鱼类群落组成的差异显著性。此外，使用 R 包 iNEXT[43]分析测序深度与检出物种数之间的关系，评估各实验室的物种检出充分性。

3 结果

3.1 各实验室阳性样本结果

阳性样本中的 6 种鱼类鳙（*Hypophthalmichthys nobilis*）、棒花鱼（*Abbottina rivularis*）、银鲫（*Carassius gibelio*）、短颌鲚（*Coilia brachygnathus*）、兴凯刺鳑鲏（*Acheilognathus chankaensis*）与鳌（*Hemiculter leucisculus*）在三个实验室均被成功检出，未观察到假阴性结果（图 2a）；且 6 种鱼类检出序列数占阳性样本总序列数的比例均大于 99.5%(图 2b)，假阳性序列占阳性样本总序列数的比例分别为 0.44%、0.45%和 0.06%，检出假阳性序列物种为鲤（*Cyprinus carpio*）和河川沙塘鳢（*Odontobutis potamophila*）。

3.2 环境 DNA 样本实验室内部重复性

实验室 1、实验室 2 和实验室 3 物种重复率分别为 100%，88%和 82%。各实验室内 α 生物多样性指数(Shannon 指数，Simpson 指数，均匀度)的变异系数（标准差/平均值）皆小于 0.16（图 3 ab）。其中实验室 3 的各生物多样性指数变异系数最小（≤ 0.08）；实验室 2 各生物多样性指数各变异系数均在 0.12 左右；实验室 1 的 Shannon 指数和均匀度指数变异系数稍高（0.153 和 0.135）。Bray-Curtis 距离表明实验室内部样本之间的差异小于实验室之间的差异（图 3 c、d）。

3.3 环境 DNA 样本实验室间结果

三个实验室共同检出的物种为 16 种，分别占各实验室检出总物种数的 80%，88.8%和 94% (图 4 a、b)。三个实验室之间 Shannon，Simpson 和均匀度指数的变异系数（C_V）为 0.05、0.02 和 0.03。基于测序深度（样本序列数）的 iNEXT 稀释与外推分析结果表明，三个实验室的物种丰富度均随测序深度的增加而逐渐升高（图 4c），其中实验室 1 和实验室 2 的曲线整体趋于平缓，表明当前测序深度已覆盖大部分可检测的物种，各实验室物种丰富度估计值的 95%置信区间高度重叠，表明三个实验室在观测物种数上高度一致。基于 Bray-Curtis 距离的 NMDS 分析结果均显示实验室之间的物种组成呈现出分离的趋势（图 3c），PERMANOVA 结果进一步显示，不同实验室间群落组成存在显著差异（$R^2 = 0.35$，$P = 0.005$），组内离散度检验结果不显著（$P = 0.47$）；此外，基于 Jaccard 距离的 NMDS 分析（附图 2）同样显示实验室间物种组成存在显著差异（PERMANOVA $R^2 = 0.51$, $P = 0.001$）, 说明组间差异主要来源于群落结构

本身的变化，而非组内离散度的差异。然而，实验室间共有物种序列相对丰度相关系数高达 0.94-0.98（图 5）。

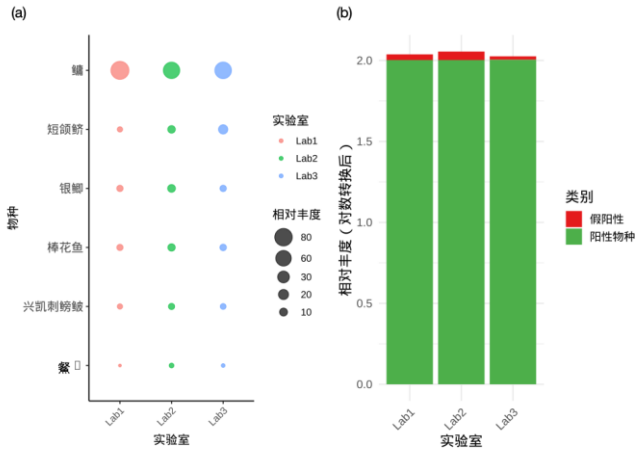

图 2 三家实验室阳性样本物种检出情况 (a)阳性样本物种相对丰度气泡图，X 轴为三个不同实验室，Y 轴为 6 个阳性物种。不同颜色代表不同实验室，气泡大小代表该物种在该实验室中的序列相对丰度。（b）假阳性序列数和阳性物种 DNA 序列数（log10 转换后）检出情况。绿色代表为真实阳性物种序列丰度，红色代表假阳性序列丰度。

Fig.2 Detection of species in positive samples by three laboratories (a) Relative abundance bubble chart of species detected in positive samples. The X-axis represents the three different laboratories, and the Y-axis denotes the six positive control species. Colors indicate different laboratories, and bubble size reflects the relative abundance of each species in each laboratory. (b) Proportion of false positive and true positive sequence counts (log_{10}-transformed) in the total sequence count of each sample. Green represents true positive species, while red denotes false positive sequences

4 讨论

本研究从阳性样本假阳性与假阴性情况、环境 DNA 样本的物种重叠、多样性指数与物种组成差异四个方面评估了不同实验室之间环境 DNA 结果的一致性。阳性样本结果显示所有预期物种在三个实验室均被检出，且对应序列数占比大于 99.5%（图 2），证明了此次环境 DNA 宏条形码比对试验的结果具有极高可靠性。环境 DNA 样本在不同实验室间物种检出重叠性方面，出现频次大于 3 的物种占比为 82-100%；多样性指数有着较高的一致性，虽然实验室之间的物种组成显示出了部分差异，但是实验室共同检出物种的相对丰度高度一致。

4.1 标准稳健性验证

在统一标准框架下，本研究各实验室根据自身实际条件灵活选择了现场过滤方法、DNA 提取试剂、DNA 聚合酶和测序平台。但三个实验室在物种检出重叠度、α 多样性及共有物种丰度相关性上均表现出一致性（图 5）。这一结果表明，该标准所规定的技术框架具有较强的稳健性，在本次组合条件下，核心指标表现出较高的一致性。这一发现具有重要的实践意义：一方面，它验证了标准在采样环节“留白”的合理性，有助于降低标准执行的硬件门槛，增强其在资源有限地区的可操作性；另一方面，它为后续标准的修订提供了科学依据—哪些环节可以保留弹性，哪些环节需要进一步细化标准。

4.2 影响跨实验室一致性的因素

我们的结果显示实验室之间的物种组成差异是存在的（图 3cd）。可能因为基于样本间距离矩阵的分析对于低丰度或偶发物种的出现与否高度敏感；即使只有少数稀有物种在不同实验室间存在检出差异，也可能导致群落组成在统计上表现为显著不同[44]。相比之下，共有物种通常为群落中的优势或中等丰度物种，其 eDNA 信号强度较高，受实验流程中随机误差和扩增偏好性的影响相对较小，从而在不同实验室间表现出高度一致的相对丰度模式。实验室 1（Illumina NovaSeq 6000），测序深度最深，在 NMDS 排

序图中与其他两个实验室（Ion Torrent 平台）分离最明显（图 3c），且其独有物种检出数较多（图 4a、b）。这与已有的研究结论一致，Illumina 测序平台碱基质量更高，能获得更多可以鉴定为物种水平的序列，且更深测序深度会系统性增加物种检出概率，从而放大 β 多样性差异；相比之下，Ion Torrent 平台较高的测序错误率可能导致部分真实序列被过滤，增加物种假阴性风险[45-47]。因此，本研究中测序平台与深度的选择可能是驱动实验室间群落组成差异的首要因素。此外，也有研究显示 DNA 聚合酶是宏条形码方法中影响物种检出和物种相对丰度的因素之一[48]；但不同的高通量测序文库制备方案对群落结果未产生显著影响[49]。此结果表明，eDNA 宏条形码在不同信息层级上表现出不同程度的一致性：在优势物种具有较高一致性，而在稀有物种检出和物种组成方面则对实验室差异更为敏感。

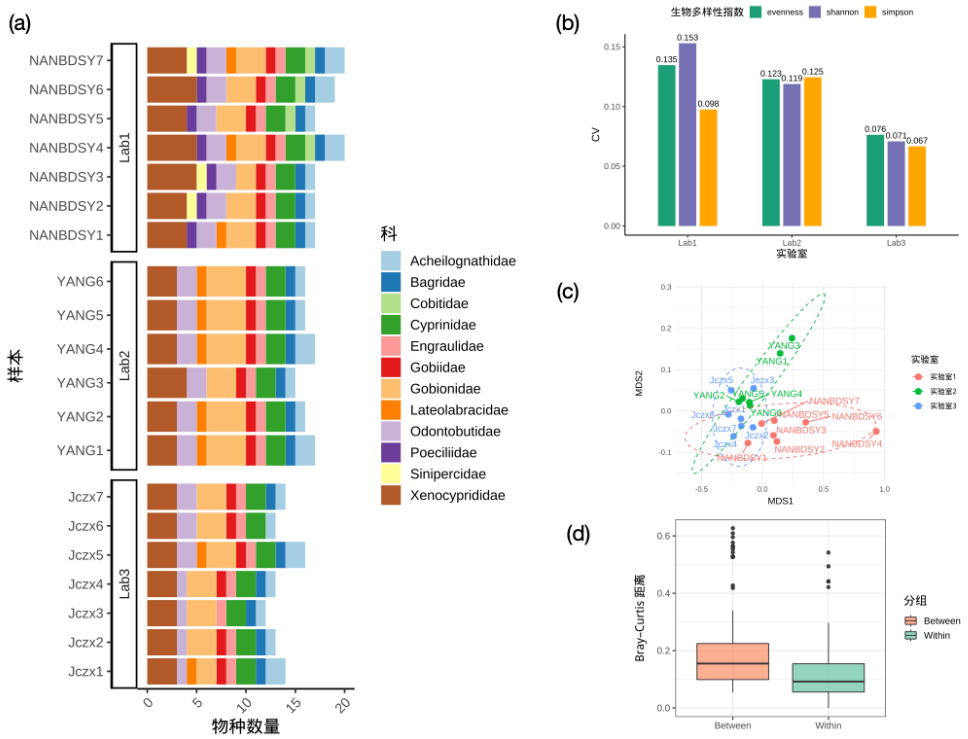

图 3 实验室内重复样本检出类群（科）、多样性指数与物种组成差异 (a)各样本的物种检出情况，每个柱状图代表每个样本，X 轴为物种数量。不同颜色代表不同的科。（b）三个实验室三种多样性指数的变异系数值，变异系数值越小，代表该实验室重复样本之间差异越小。(c)各实验室所有重复样本物种相对丰度 Bray-Curtis 组成差异，每一个点为一个重复样本，不同颜色代表了不同实验室。(d) 实验室之间和实验内部的 Bray-Curtis 距离比较，橙色为实验室之间距离，绿色为实验室内部距离。

Fig.3 Taxonomic composition and within-laboratory α diversity coefficients of variation. (a) Family detection per sample. Each bar represents one sample, with the X-axis indicating the number of species detected. Colors denote different families. (b) Coefficients of variation for three α diversity indices across the three laboratories. Lower values indicate smaller variation among replicate samples within a laboratory. (c) Bray–Curtis dissimilarity of species relative abundance among replicate samples from each laboratory. Each point represents a replicate sample; different colors indicate different laboratories. (d) Comparison of Bray–Curtis dissimilarities between and within laboratories. Orange denotes between-laboratory distances; green denotes within-laboratory distances

4. 3 本研究不足之处与结论适用范围

首先，采样地理范围单一，本研究采样地点仅 1 个（南京江心洲夹江），该水体为长江支流，未能覆盖不同营养状态、水文条件及物种丰富度梯度（如贫营养湖泊、上游溪流等）。因此，结论对高异质性水体或低生物量环境的适用性尚需验证。其次，稀有物种评估受限，本研究聚焦于相对丰度大于 0.1%的优

势物种，由于稀有物种信号易受测序深度等波动影响，需要在更一致的测序条件下进行评估。第三，多变量混合，如前所述，本研究同时存在多个技术变量，无法完全分离各自独立贡献。此外，阳性样本中检出的假阳性物种序列（鲤和河川沙塘鳢）可能源于提取或扩增过程中的微量污染，但其序列占比极低（<0.5%），对本研究结果的可靠性影响可忽略。

基于上述研究不足，本研究的主要结论适用于以下条件与范围：第一，监测目标类群为淡水鱼类，扩增片段为 12S rRNA 基因；第二，水体类型为生物量中等或以上、环境 DNA 浓度充足的水体；第三，监测指标限定为物种检出、α 多样性指数（Shannon、Simpson 及均匀度），以及优势和中等丰度物种的相对丰度；第四，标准化程度要求类似 DB32/T 4539—2023。

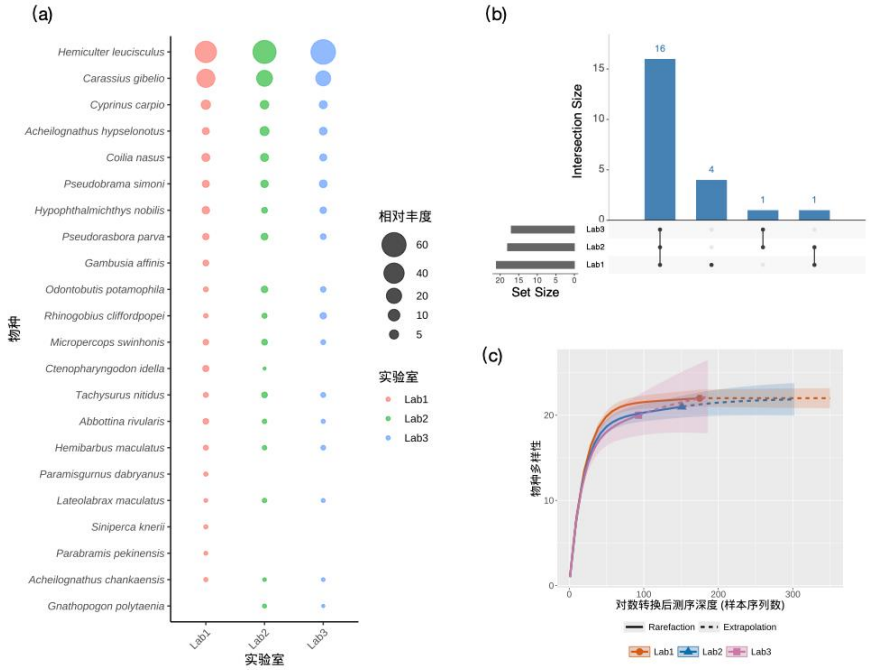

图 4 实验室间环境 DNA 样本物种多样性检出情况 (a) 三个实验室检出鱼类的相对丰度气泡图。不同颜色代表不同实验室，点大小代表物种在该实验室中的平均相对丰度。(b) 三个实验室的检出物种的交集 upset 图，蓝色柱状图代表各交集物种数量，灰色柱状代表各实验室及其物种数，黑色线和点代表交集。(c) 三个实验室基于测序深度的物种丰富度 iNEXT 稀释与外推曲线。实线表示稀释曲线，虚线表示外推曲线，阴影区域表示 95%置信区间。

Figure 4 Detection of species in field samples by 3 laboratories (a) Relative abundance bubble plot of fish species detected by the three laboratories. Colors represent different laboratories, and bubble size indicates the mean relative abundance of each species in each laboratory. (b) Upset plot showing intersections of species detected by the three laboratories. Blue bars indicate the number of species in each intersection; gray bars represent the total number of species detected by each laboratory; black lines and dots indicate specific intersections. (c) Species-richness-based iNEXT rarefaction and extrapolation curves for the three laboratories, with sequencing depth as the reference. Solid lines represent rarefaction curves, dashed lines represent extrapolation curves, and shaded areas indicate 95 % confidence intervals

建议未来在更广泛的地理尺度、多类群及不同生物量条件下开展系统性验证，以进一步推广本研究结论。同时，对于以 β 多样性为核心的评估应用，推荐在标准后续修订中明确测序平台与测序深度的一致性要求。未来研究可以与传统捕捞调查结合进行验证，能更精确地量化两种方法在物种检出类群，物种数量和物种组成上的一致性。最后，环境 DNA 技术并非取代传统调查方法，而是提供一种互补的视角，以更低代价提供更全面的群落概览[50-51]。

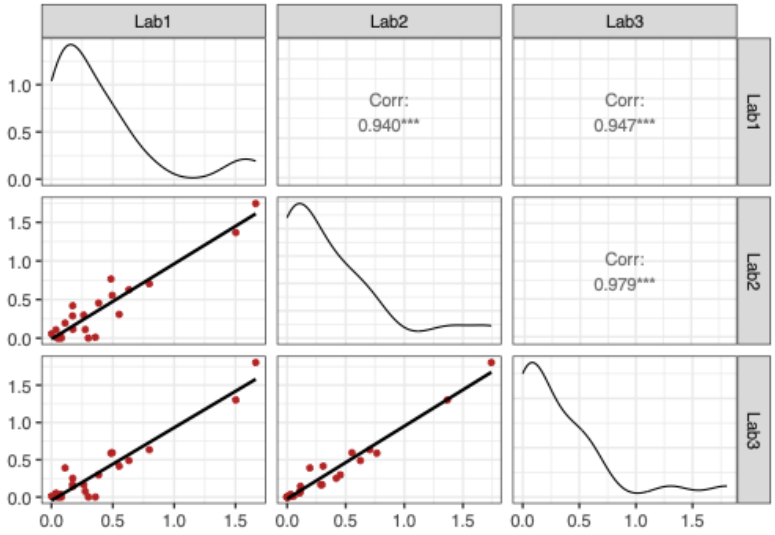

图 5 成对实验室间的物种相对丰度关系。左下三个图每个点代表一个物种，黑色实线代表两个实验之间物种相对丰度（对数转换后）线性拟合模型。对角线三个曲线图为数据密度分布情况。右上三个图为相关系数

Fig.5 Pairwise comparisons of species relative abundance between 3 laboratories. The lower-left scatter plots represent pairwise comparisons of species relative abundance （logged） between the laboratories, with each point corresponding to one species and the black line indicating the fitted linear model. The middle diagonal density plots show the distribution of species relative abundance for each laboratory. The upper-right panels display the correlation coefficients between the laboratories

5 结论

本研究在同一技术标准框架下，组织三家实验室开展环境 DNA 宏条形码跨实验室比对，主要得出以下两方面的结论。第一，现行标准框架在核心监测指标层面具有跨实验室可重复性。 不同实验室在物种检出重叠度（≥80%）、α 多样性（Shannon、Simpson 及均匀度指数的变异系数均小于 0.05）以及共有物种相对丰度（相关系数≥0.94）上均表现出高度一致性。同时，标准在部分环节保留的弹性空间未对上述核心结果产生显著干扰，验证了现行标准的稳健性与广泛适用性。第二，β 多样性及稀有物种检出对实验室差异更为敏感，这一发现为标准修订提供了明确启示。 优势种与中等丰度物种在不同实验室间表现高度一致，而群落结构分析（NMDS、PERMANOVA）中观察到的显著差异主要由低丰度稀有物种的随机检出驱动。建议在后续标准修订中，基于 β 多样性的生态评估同时呈现“优势物种”与“全部物种”两类分析结果，以降低稀有物种随机噪声对生态判读的干扰。综上，本研究为环境 DNA 标准的推广与优化提供了实证支撑：既验证了现有标准在核心指标上的跨实验室可重复性，也指出了标准进一步完善的具体方向。

6 附录

附图I~II见电子版（DOI：10.18307/2027.0232）。

7 参考文献

[1] Ji YQ, Ashton L, Pedley SM *et al*. Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity *via* metabarcoding. *Ecology Letters*, 2013, **16**(10): 1245-1257. DOI: 10.1111/ele.12162.

[2] Bohmann K, Evans A, Gilbert MTP *et al*. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution*, 2014, **29**(6): 358-367. DOI: 10.1016/j.tree.2014.04.003.

[3] Rees HC, Maddison BC, Middleditch DJ *et al*. REVIEW: The detection of aquatic animal species using environmental DNA–a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*, 2014, **51**(5): 1450-1459. DOI: 10.1111/1365-2664.12306.

[4] Hänfling B, Lawson Handley L, Read DS *et al*. Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Molecular Ecology*, 2016, **25**(13): 3101-3119. DOI: 10.1111/mec.13660.

[5] Antognazza CM, Britton RJ, Read DS *et al*. Application of eDNA metabarcoding in a fragmented lowland river: Spatial and methodological comparison of fish species composition. *Environmental DNA*, 2021, **3**(2): 458-471. DOI: 10.1002/edn3.136.

[6] Ficetola GF, Manenti R, Taberlet P. Environmental DNA and metabarcoding for the study of amphibians and reptiles: Species distribution, the microbiome, and much more. *Amphibia-Reptilia*, 2019, **40**(2): 129-148. DOI: 10.1163/15685381-20191194.

[7] Itakura H, Wakiya R, Yamamoto S *et al*. Environmental DNA analysis reveals the spatial distribution, abundance, and biomass of Japanese eels at the river-basin scale. *Aquatic Conservation*: *Marine and Freshwater Ecosystems*, 2019, **29**(3): 361-373. DOI: 10.1002/aqc.3058.

[8] Lecaudey LA, Schletterer M, Kuzovlev VV *et al*. Fish diversity assessment in the headwaters of the Volga River using environmental DNA metabarcoding. *Aquatic Conservation*: *Marine and Freshwater Ecosystems*, 2019, **29**(10): 1785-1800. DOI: 10.1002/aqc.3163.

[9] Antognazza CM, Britton JR, Potter C *et al*. Environmental DNA as a non-invasive sampling tool to detect the spawning distribution of European anadromous shads (*Alosa* spp.). *Aquatic Conservation*: *Marine and Freshwater Ecosystems*, 2019, **29**(1): 148-152. DOI: 10.1002/aqc.3010.

[10] Moran AJ, Prosser SWJ, Moran JA. DNA metabarcoding allows non-invasive identification of arthropod prey provisioned to nestling Rufous hummingbirds (*Selasphorus rufus*). *PeerJ*, 2019, **7**: e6596. DOI: 10.7717/peerj.6596.

[11] Leempoel K, Hebert T, Hadly EA. A comparison of eDNA to camera trapping for assessment of terrestrial mammal diversity. *Proceedings Biological Sciences*, 2020, **287**(1918): 20192353. DOI: 10.1098/rspb.2019.2353.

[12] Carvalho S, Aylagas E, Villalobos R *et al*. Beyond the visual: Using metabarcoding to characterize the hidden reef cryptobiome. *Proceedings Biological Sciences*, 2019, **286**(1896): 20182697. DOI: 10.1098/rspb.2018.2697.

[13] Franklin TW, McKelvey KS, Golding JD *et al*. Using environmental DNA methods to improve winter surveys for rare carnivores: DNA from snow and improved noninvasive techniques. *Biological Conservation*, 2019, **229**: 50-58. DOI: 10.1016/j.biocon.2018.11.006.

[14] Shelton AO, Kelly RP, O'Donnell JL *et al*. Environmental DNA provides quantitative estimates of a threatened salmon species. *Biological Conservation*, 2019, **237**: 383-391. DOI: 10.1016/j.biocon.2019.07.003.

[15] Sawaya NA, Djurhuus A, Closek CJ *et al*. Assessing eukaryotic biodiversity in the *Florida* Keys National Marine Sanctuary through environmental DNA metabarcoding. *Ecology and Evolution*, 2019, **9**(3): 1029-1040. DOI: 10.1002/ece3.4742.

[16] Zhang Y, Pavlovska M, Stoica E *et al*. Holistic pelagic biodiversity monitoring of the Black Sea *via* eDNA metabarcoding approach: From bacteria to marine mammals. *Environment International*, 2020, **135**: 105307. DOI: 10.1016/j.envint.2019.105307.

[17] Yang HL, Zhang H, Du H. A framework for standardizing the processes of eDNA monitoring and an accessible vision of the future. *J Lake Sci*, 2023, **35**(1): 12-31. DOI: 10.18307/2023.0100. [杨海乐, 张辉, 杜浩. eDNA 监测方法标准化框架及未来图景. 湖泊科学, 2023, **35**(1): 12-31.]

[18] Barnes MA, Turner CR, Jerde CL *et al*. Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environmental Science & Technology*, 2014, **48**(3): 1819-1827. DOI: 10.1021/es404734p.

[19] Goldberg CS, Turner CR, Deiner K *et al*. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*, 2016, **7**(11): 1299-1307. DOI: 10.1111/2041-210X.12595.

[20] Kelly RP, Closek CJ, O'DonnelL JL *et al.* Genetic and Manual Survey Methods Yield Different and Complementary Views of an Ecosystem. *Frontiers in Marine Science*, 2016, **3**: 283.

[21] Zinger L, Bonin A, Alsos IG *et al*. DNA metabarcoding—Need for robust experimental designs to draw sound ecological conclusions. *Molecular Ecology*, 2019, **28**(8): 1857-1862. DOI: 10.1111/mec.15060.

[22] Sanches TM, Schreier AD. Optimizing an eDNA protocol for estuarine environments: Balancing sensitivity, cost and time. *PLoS One*, 2020, **15**(5): e0233522. DOI: 10.1371/journal.pone.0233522.

[23] Theroux S, Sepulveda A, Abbott CL *et al*. What is eDNA method standardisation and why do we need it *Metabarcoding and Metagenomics*, 2025, **9**: e132076. DOI: 10.3897/mbmg.9.132076.

[24] Leese F, Altermatt F, Bouchez A *et al.* DNAqua-Net: Developing new genetic tools for bioassessment and monitoring of aquatic ecosystems in Europe. *Research Ideas and Outcomes*, 2016, **2**: e11321. DOI: 10.3897/rio.2.e11321.

[25] Laramie MB, Pilliod DS, Goldberg CS. Environmental DNA Sampling Protocol—Filtering Water to Capture DNA from Aquatic Organisms. Reston: Geological Survey, 2015.

[26] Klymus KE, Baker JD, Abbott CL *et al*. The MIEM guidelines: Minimum information for reporting of environmental metabarcoding data. *Metabarcoding and Metagenomics*, 2024, **8**: e128689. DOI: 10.3897/mbmg.8.128689.

[27] 中国环境科学学会. 淡水生物监测环境 DNA 宏条形码法：T/CSES 81—2023. 北京：中国标准出版社，2023.

[28] 江苏省市场监督管理局. 淡水生物环境 DNA 监测技术方法：DB32/T 4539—2023. 北京：中国标准出版社，2023.

[29] 北京市市场监督管理局. 淡水大型底栖无脊椎动物环境 DNA 监测技术规范：DB11/T 2358—2024. 2024.

[30] 四川省生态环境政策法规研究会. 水生态监测 环境 DNA 荧光定量 PCR 法：T/SEEPLA 08—2024. 2024.

[31] 重庆市环境科学学会. 基于环境 DNA 的长江水生生物监测与完整性评价技术导则：T/CQSES 27—2025. 北京：中国标准出版社，2025.

[32] Riccioni G, Domaizon I, Gandolfi A *et al*. Alpine freshwater fish biodiversity assessment: An inter-calibration test for metabarcoding method set up: EDNA metabarcoding test for fish biodiversity. *Advances in Oceanography and Limnology*, 2022, **13**(1). DOI: 10.4081/aiol.2022.10017.

[33] Vasselon V, Rivera SF, Ács É *et al*. Proficiency testing and cross-laboratory method comparison to support standardisation of diatom DNA metabarcoding for freshwater biomonitoring. *Metabarcoding and Metagenomics*, 2025, **3**: 1-23. DOI: 10.3897/mbmg.9.133264.

[34] Dully V, Balliet H, Frühe L *et al*. Robustness, sensitivity and reproducibility of eDNA metabarcoding as an environmental biomonitoring tool in coastal salmon aquaculture–An inter-laboratory study. *Ecological Indicators*, 2021, **121**: 107049. DOI: 10.1016/j.ecolind.2020.107049.

[35] Taberlet P, Bonin A, Zinger L *et al*. Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring. Oxford: Oxford University Press, 2018.[AI 获取英文图书信息,请点击这里查看后再点击封面照片确认]

[36] Ewels P, Magnusson M, Lundin S *et al*. MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 2016, **32**(19): 3047-3048. DOI: 10.1093/bioinformatics/btw354.

[37] Chen SF, Zhou YQ, Chen YR *et al*. Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 2018, **34**(17): i884-i890. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty560.

[38] Rognes T, Flouri T, Nichols B *et al*. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 2016, **4**: e2584. DOI: 10.7717/peerj.2584.

[39] Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet Journal*, 2011, **17**(1): 10. DOI: 10.14806/ej.17.1.200.

[40] Mahé F, Czech L, Stamatakis A *et al*. Swarm v3: Towards tera-scale amplicon clustering. *Bioinformatics*, 2021, **38**(1): 267-269. DOI: 10.1093/bioinformatics/btab493.

[41] Frøslev TG, Kjøller R, Bruun HH *et al*. Algorithm for post-clustering curation of DNA amplicon data yields reliable biodiversity estimates. *Nature Communications*, 2017, **8**: 1188. DOI: 10.1038/s41467-017-01312-x.

[42] McColl-Gausden EF, Weeks AR, Coleman RA *et al*. Multispecies models reveal that eDNA metabarcoding is more sensitive than backpack electrofishing for conducting fish surveys in freshwater streams. *Molecular Ecology*, 2021, **30**(13): 3111-3126. DOI: 10.1111/mec.15644.

[43] Hsieh TC, Ma KH, Chao A. iNEXT: An R package for rarefaction and extrapolation of species diversity (Hill numbers). *Methods in Ecology and Evolution*, 2016, **7**(12): 1451-1456. DOI: 10.1111/2041-210X.12613.

[44] Hu YJ, Satten GA. A rarefaction-without-resampling extension of PERMANOVA for testing presence–absence associations in the microbiome. *Bioinformatics*, 2022, **38**(15): 3689-3697. DOI: 10.1093/bioinformatics/btac399.

[45] Shirazi S, Meyer RS, Shapiro B. Revisiting the effect of PCR replication and sequencing depth on biodiversity metrics in environmental DNA metabarcoding. *Ecology and Evolution*, 2021, **11**(22): 15766-15779. DOI: 10.1002/ece3.8239.

[46] Divoll TJ, Brown VA, Kinne J *et al*. Disparities in second-generation DNA metabarcoding results exposed with accessible and repeatable workflows. *Molecular Ecology Resources*, 2018, **18**(3): 590-601. DOI: 10.1111/1755-0998.12770.

[47] Veillat L, Boyer S, Querejeta M *et al*. Benchmarking three DNA metabarcoding technologies for efficient detection of non-native cerambycid beetles in trapping collections. *NeoBiota*, 2024, **96**: 237-259. DOI: 10.3897/neobiota.96.130195.

[48] Nichols RV, Vollmers C, Newsom LA *et al*. Minimizing polymerase biases in metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 2018, **18**(5): 927-939. DOI: 10.1111/1755-0998.12895.

[49] Zaiko A, Greenfield P, Abbott C *et al*. Towards reproducible metabarcoding data: Lessons from an international cross-laboratory experiment. *Molecular Ecology Resources*, 2022, **22**(2): 519-538. DOI: 10.1111/1755-0998.13485.

[50] Keck F, Blackman RC, Bossart R *et al*. Meta-analysis shows both congruence and complementarity of DNA and eDNA metabarcoding to traditional methods for biological community assessment. *Molecular Ecology*, 2022, **31**(6): 1820-1835. DOI: 10.1111/mec.16364.

[51] Veron P, Rozanski R, Marques V *et al*. Environmental DNA complements scientific trawling in surveys of marine fish biodiversity. *ICES Journal of Marine Science*, 2023, **80**(8): 2150-2165. DOI: 10.1093/icesjms/fsad139.