《农田土壤 eDNA 分析技术规范》
编制说明

一、工作简况

（一）任务来源

1. 标准制定背景：本文件拟作为中国土壤学会团体标准制定，标准名称为《农田土壤 eDNA 分析技术规范》。农田土壤含有细菌、真菌及多类土壤动物遗传物质，环境 DNA（eDNA）分析可为土壤生物多样性调查、农田生态质量评价及长期监测提供分子检测手段。现有工作在采样重复、样品冷链、DNA 提取纯化、标记基因选择、序列质控及生物信息分析方面存在流程与结果表达口径不一致的实际问题，有必要建立贯通采样至报告的技术规范。
2. 提出与归口单位：本标准由中国土壤学会提出并归口管理。
3. 编制依据：标准文本依据 GB/T 1.1-2020 的结构和起草规则编制，并参考 GB/T 30989、GB/T 35537、GB/T 35890、GB/T 40226-2021、GB/T 41689-2022 及土壤环境监测相关规范，重点规范农田土壤 eDNA 采集、提取、PCR 扩增、测序分析和质量控制的衔接要求。

（二）协作/起草单位

按照草案前言，本标准起草单位为：南京农业大学、中国科学院南京土壤研究所、中国科学院城市环境研究所、中国科学院生态环境研究中心、华东师范大学、南京大学、江苏省生态地质调查大队、江苏省海洋地质调查院。

（三）主要工作过程

1、成立标准编制项目组

2025 年 6 月，南京农业大学联合中国科学院南京土壤研究所、中国科学院城市环境研究所、中国科学院生态环境研究中心、华东师范大学、南京大学、江苏省生态地质调查大队和江苏省海洋地质调查院等单位，开展《农田土壤 eDNA 分析技术规范》编制工作。编制组明确技术路线、主要内容与人员分工，形成标准编制基本框架。

2、资料收集与技术研究

2025 年 6 月—2026 年 6 月，结合已有研究成果及相关标准，针对旱地、水稻田、设施农田、果园和茶园等典型农田类型，研究采样深度、样品采集量、独立平行样设

置及低温保存条件，梳理样品采集、运输和交接环节，形成农田土壤 eDNA 采样与保存技术方案，为标准相关条款提供依据。

同期，围绕 eDNA 提取纯化、扩增及测序分析开展技术方法研究。针对腐殖酸和多酚等抑制物的影响，对 TENP 缓冲液预处理、超声辅助破壁、复合酶解、高温化学裂解和 DNA 纯化等环节进行比选论证，整理 DNA 得率、纯度、完整性及加标回收率等评价指标；结合细菌、真菌、脊椎动物和无脊椎动物的检测特点，筛选整理 16S rDNA、ITS、12S rDNA 和 COI 等分子标记及引物，完善 PCR 扩增、测序质控和物种注释的衔接要求，形成 eDNA 分析的基本技术流程，为标准技术条款的制定提供依据。

3、标准起草与立项

2026 年 10 月，结合前期研究与方法比选成果，按照 GB/T 1.1—2020 的要求，将采样保存、DNA 提取纯化、PCR 扩增、测序分析、质量控制和结果报告等技术内容编写为标准条款，配套编制采样记录表及不同目标类群的引物信息附录，形成《农田土壤 eDNA 分析技术规范》标准草案，并按照中国土壤学会团体标准制定程序提交立项申请。2026 年 10 月 22 日，根据立项函评专家评审同意立项，标准编制工作启动。

4、征求意见与完善

标准立项后，根据立项函评专家修改完善标准草案，完成征求意见初稿。2026 年 10 月 25 日，向 12 家有关高校及单位的专家征集意见，共收到反馈意见 31 项，其中采纳 31 项、部分采纳 0 项、未采纳 0 项。2026 年 11 月 5 日，编制组根据征集意见对标准文本逐条修订，完成征求意见稿和编制说明，提交中国土壤学会。

（四）起草组成员及主要分工

1. 孙明明：项目总负责人，负责标准总体技术路线、框架设计、主要技术内容统筹及编制工作组织协调，把控标准技术要求的科学性、规范性与适用性，负责全过程质量控制。
2. 王广昊、王丹蕊、张文：负责农田土壤 eDNA 样品采集、保存、运输与交接等技术条款编制，重点完善不同农田类型的采样点布设、采样深度、样品重复设置及低温保存运输要求，参与样品采集记录表编制及相关技术内容整理。
3. 吴世茂、刘鹏、付玉豪：负责农田土壤 eDNA 提取与纯化技术条款编制，重点围绕土壤样品预处理、细胞裂解、DNA 提取、杂质去除及纯化效果评价等环节，明确关键技术参数及操作要求，参与 DNA 提取效率和纯化效果评价方法的整理与优化。

4. 王超、陈林、朱冬：负责 PCR 扩增、高通量测序及相关技术条款编制，重点完善细菌、真菌、脊椎动物和无脊椎动物等目标类群的分子标记与引物选择、PCR 扩增条件、文库构建、测序策略及测序数据质量要求，参与相关技术方法的比对与优化。
5. 李弘哲、何尔凯、张宴：负责测序数据处理、物种注释、结果统计及结果报告等技术条款编制，重点完善不同目标生物类群的参考数据库选择、序列质控、分类注释及结果判定方法，参与质量控制指标、数据记录表及附录内容的编制与整理。
6. 胡建、姜夏烨、徐明钻：负责标准术语和定义、规范性引用文件及相关标准资料梳理，参与标准结构、技术条款、计量单位、规范性用语和前后对应关系校核，协助完善标准编制说明及意见处理材料。

二、标准编制原则及主要内容确定依据

（一）编制原则

1. 结果适度解释原则。农田土壤 eDNA 既包括存活生物释放的遗传物质，也可能包含死亡生物残留核酸和吸附于矿物表面的胞外 DNA；扩增及测序过程还受到引物偏好和数据库覆盖程度影响。因此，标准强调以检出类群、序列相对丰度和多样性指数等指标表征群落信息，不将结果直接解释为活体数量或绝对丰度。eDNA 序列反映 DNA 信号而非活体个体数；相对序列丰度不等于绝对数量，物种级注释应考虑引物偏好、数据库覆盖和人工复核。
2. 实验室间可比性原则。明确样品编号、采样深度、重复类型、提取体系、目标标记、PCR 程序、测序深度和生物信息学数据库版本等关键元数据的记录要求。对于使用不同试剂盒、仪器或分析软件的实验室，应保留方法选择和适用性验证信息，确保横向比较具有可解释的技术基础。
3. 合规与协调原则。按照 GB/T 1.1—2020 组织结构、用语及规范性引用，保持与现行土壤监测、DNA 提取及高通量测序相关文件协调，不替代已有通用要求。
4. 全流程一致性原则。覆盖采样布点、采集保存、DNA 提取纯化、PCR 扩增、测序、生物信息学分析、质控与报告，统一样品编号、对照设置、参数记录和判定口径。
5. 目标类群适用性原则。对细菌、真菌、脊椎及无脊椎动物分别采用适宜分子标记和数据库，避免将单一扩增标记或相似性阈值套用于所有类群。

6. 科学性和可操作性原则。以常见农田土壤样品及常规分子生物学仪器设备为对象，给出可执行的基本流程，允许对土壤基质差异及引物体系作经验证的调整。
7. 全过程质量控制原则。设置现场、前处理、提取、纯化和 PCR 等关键节点的空白及阳性对照、平行样、回收率和测序质量指标，确保结果可追溯。

（二）标准主要内容及条款依据

本标准为新制定的中国土壤学会团体标准，无对应旧版标准，不涉及新旧版本技术条款的比较。标准针对农田土壤环境 DNA（eDNA）分析的技术特点，按照“土壤采样与保存—eDNA 提取与纯化—PCR 扩增与测序—数据分析—质控与结果报告”的技术流程，规定各环节的操作方法、技术要求和质量控制措施，形成较为完整的农田土壤 eDNA 分析技术体系。各章节主要内容及确定依据如下。

1. 范围（第 1 章）：规定基于 eDNA 技术开展典型土壤生物类群监测的试剂耗材、样点布设、土壤样品采集与预处理、DNA 提取、PCR 扩增、测序与数据分析和质量控制等内容，适用于农田类型土壤中细菌、真菌、脊椎和无脊椎动物等典型土壤生物类群的环境 DNA 监测。上述设置明确了标准的适用范围和技术边界，主要用于农田土壤生物类群的 eDNA 监测，不涉及生物个体数量的直接测定。
2. 规范性引用文件（第 2 章）：引用 GB/T 30989—2014、GB/T 35537—2017、GB/T 35890、GB/T 40226—2021、HJ/T 166、GB 19489、GB/T 6682 等文件，为高通量测序、数据格式、环境微生物宏基因组检测、土壤采样、生物安全和实验用水提供通用依据。
3. 术语、定义和缩略语（第 3 章）：设置环境 DNA、土壤生物、12S rDNA、16S rDNA、ITS、COI、宏条形码、分类单元、OTU、阴性对照和阳性对照等术语，统一不同实验室在样品形态、处理过程和结果表达方面的技术口径。其中特别明确 eDNA 包括吸附于土壤矿物颗粒表面的胞外 DNA 以及微生物和土壤动物直接释放的 DNA，检测结果不等同于活体生物计数。
4. 试剂与材料（第 4 章）：规定分析纯及以上试剂、符合 GB/T 6682 一级水要求的实验用水，以及 PBS、RNase I、EDTA、75%乙醇、提取纯化辅助试剂、PCR 扩增试剂、质控辅助试剂和土壤 eDNA 提取专用试剂等。TENP 缓冲液组成、pH 和使用前除菌要求予以明确；提取与纯化辅助试剂以功能描述为主，不限定特定品牌。

5. 仪器和设备（第 5 章）：规定高压蒸汽灭菌器、生物安全柜、电子天平、恒温振荡器、涡旋振荡器、低温离心机、低温保存设备、pH 计、PCR 仪、移液枪、水平电泳系统、凝胶成像系统、核酸荧光定量仪、超声水浴处理器和恒温孵育器等。
6. 土壤采集、保存、运输和交接（第 6 章）：一般农田采集 0～20 cm 耕层土壤，果园、茶园等可采集 0～20 cm 或 0～40 cm 土层；同一试验处理单元设置不少于 3 个生物学重复，每个采样点位采集不少于 3 份独立现场平行样，每份 DNA 样品设置不少于 3 个 PCR 技术重复；单份常规 eDNA 提取样品采样量不少于 500 mg（鲜重），游离 eDNA 富集分析不少于 2 g（鲜重），开展提取效率验证、重复提取或备份保存时，每份样品采集量宜不少于 5 g（鲜重）。样品采集后立即低温避光暂存，野外暴露时间不超过 30 min，−80 ℃保存，冻融次数控制在 3 次以内。
7. 土壤 eDNA 样品提取与纯化（第 7 章）：规定称量与均质预处理、超声辅助破壁、复合酶解破壁、高温化学裂解、离心沉淀和粗提液获得流程；DNA 纯化采用两种商品化土壤 DNA 纯化试剂盒进行比较，宜选择不同纯化原理或不同品牌的试剂盒，并通过 DNA 纯度、完整性、扩增效率及加标回收率等指标评价纯化效果；每批次设置加标回收对照和提取空白对照，提取回收率宜不低于 50%，批内相对标准偏差宜≤25%。
8. PCR 扩增（第 8 章）：按目标类群规定引物选择原则和推荐引物，细菌宜选用 16S rDNA V3～V4 区通用引物，真菌宜选用 ITS 区通用引物，脊椎动物宜选用 12S rDNA 通用引物，无脊椎动物宜选用 COI 基因通用简并引物；规定 PCR 反应体系、循环程序、扩增判定、产物检测与纯化、文库构建、测序平台与读长及最低测序数据量。
9. 结果分析（第 9 章）：规定序列质控过滤、拼接、OTU 聚类和物种注释流程，并按 16S rDNA、ITS、COI、12S rDNA 分别规定数据库、相似性阈值、去嵌合体、非目标序列处理和报告原则；同一点位 3 个现场平行样品仅保留在≥2 个平行中检出的物种，物种相对序列丰度采用平行样品的几何平均值。
10. 质量控制（第 10 章）：从样品采集与保存、样品前处理、DNA 提取与纯化、PCR 扩增四个环节设置空白对照、平行样、器具消毒、DNA 质量指标、阴阳性对照和技术平行要求，并规定结果判定规则。

11. 结果报告（第 11 章）：要求报告基本信息、方法信息、质控结果、结果数据、数据可及性和局限性说明，明确本方法输出为物种相对丰度，不等同于物种绝对数量，明确 eDNA 检测结果反映目标生物类群的 DNA 检出信息及相对序列丰度，不等同于物种绝对数量，也不能直接作为活体生物数量的判定依据。
12. 附录 A～B：附录 A 为资料性附录，提供样品基本信息记录表和样品保存、运输和交接记录表；附录 B 为资料性附录，提供土壤典型生物环境 DNA 监测引物信息。附录设置用于统一记录口径，并为不同目标类群提供可操作的引物选择依据。

（三）重要技术参数的设置思路

1. 低温原则：样品采集后立即置于低温冰盒避光暂存，野外暴露时间不超过 30 min；运输全程采用低温冷链；运回实验室后快速转接并存放于−80 ℃。核心目的是抑制微生物群落结构改变和 eDNA 降解，减少冻融造成的核酸损失。
2. 采样深度与采样量：无特殊要求时，旱地、水浇地、设施农田和水稻田宜采集 0～20 cm 耕作层土壤，果园、茶园等可采集 0～20 cm 或 0～40 cm 土层，如需分层研究可按 0～10 cm、10～20 cm、20～40 cm 分层采集。单份 eDNA 提取样品采样量不少于 500 mg（鲜重），游离 eDNA 富集分析不少于 2 g，备份保存宜不少于 5 g，以兼顾提取效率、重复提取和复检需求。
3. 平行样与重复设置：同一试验处理单元设置不少于 3 个生物学重复，每个采样点位采集不少于 3 份独立现场平行样，每份 DNA 样品设置不少于 3 个 PCR 技术重复。≥2 个平行出现特异性目标条带判定为扩增阳性，仅 1 个平行阳性时应重新扩增。该设置用于评估采样重复性、扩增稳定性和假阳性风险。
4. 提取体系与破壁策略：采用 TENP 缓冲液（含 PVPP）均质预处理去除腐殖酸和多酚等 PCR 抑制物，超声辅助破壁 3 min，细菌样本添加溶菌酶、真菌样本添加 NovoZym 234 进行复合酶解破壁，随后 68 ℃高温化学裂解 60 min。该组合在细胞裂解效率与 eDNA 完整性之间取得平衡，避免强烈机械研磨对核酸的剪切损伤。
5. 纯化与提取效率验证：采用两种不同纯化原理或不同品牌的商品化土壤 DNA 纯化柱，纯化后 OD260/280 宜为 1.8～2.0，OD260/230 宜≥1.8，加标回收率宜≥50%，平行纯化浓度和纯度变异系数宜≤20%。每批次至少设置 1 个加标回收对

照和 1 个提取空白对照，样品数量超过 20 个时每 20 个样品至少设置 1 个加标回收对照，用于评价提取、抑制物去除和试剂效率。

6. 引物选择与扩增参数：按目标类群分别推荐 16S rDNA V3～V4 区（515F/806R）、ITS 区（fITS7/ITS2R）、12S rDNA（12S-V5-F/12S-V5-R）和 COI 基因（Fol-degen-for/Fol-degen-rev）通用引物，退火温度分别为 55～58 ℃、52～55 ℃、54～58 ℃和 54～56 ℃。上述条件定位为推荐起始参数，实际退火温度应根据引物、聚合酶、PCR 仪和模板条件优化确定；使用附录 B 以外引物时应提供序列、目标基因、退火温度、扩增片段长度、特异性验证及适用性说明。

7. 测序数据量与质控阈值：细菌 16S 宜≥20,000 条有效序列/样品，真菌 ITS 宜≥10,000 条，脊椎动物 12S 和无脊椎动物 COI 宜≥5,000 条；原始数据 Q20 宜≥90%，Q30 宜≥80%；阴性对照有效序列数应低于样品中位数的 1%或≤100 条，阳性对照应检出目标物种。上述阈值用于保障群落解析分辨率和污染识别能力。

三、试验验证分析、技术经济论证、预期综合效益

（一）主要试验验证综述报告

标准关键参数需要由代表性农田土壤样品的方法验证结果予以支撑。现有编制材料已经形成采样、提取、纯化、扩增、测序和生物信息分析的技术框架，但未提供完整的验证地点、样本类型、样本量、重复数、原始数据和统计结果。因此，本编制说明对现有材料能够支持的验证内容进行归纳，不虚构具体效应量或统计结论；正式报批前应将完整验证结果作为技术佐证材料补充。

1. 采样量与提取效率验证：比较 500 mg、2 g、5 g 等不同采样量在常规农田土、高黏粒土、高有机质土等代表性基质中的 DNA 得率、纯度和 PCR 抑制情况，用于验证采样量设置合理性。

2. 提取与纯化方法比较：比较 TENP 缓冲液均质预处理、超声辅助破壁、复合酶解破壁和高温化学裂解组合与常规提取方法在 DNA 得率、完整性、腐殖酸去除和加标回收率方面的差异，用于验证提取流程和纯化效果判定指标。

3. 引物与退火温度验证：围绕 16S rDNA、ITS、12S rDNA 和 COI 推荐引物，比较不同退火温度、模板量和循环数对扩增特异性、目标条带清晰度和非特异性扩增的影响，用于验证引物选择原则和扩增参数范围。

4. 测序数据量与质控阈值验证：比较不同测序数据量对细菌、真菌、脊椎动物和无脊椎动物群落多样性指数和物种检出数的影响，评价 Q20/Q30、有效序列数和阴性对照序列数阈值的适用性。

5 生物信息分析阈值验证：比较 97% OTU 聚类阈值与各标记物种级注释阈值对物种注释数量和假阳性率的影响，评价单序列剔除和去嵌合体步骤的必要性。

6. 质量控制适用性验证：采用已知菌株 DNA、质粒或合成基因片段作为阳性对照，采用灭菌超纯水和灭菌石英砂作为阴性与采样空白，评价空白、平行样、加标回收和阴阳性对照控制要求在不同农田土壤基质中的适用性，并据此建立实验室内部控制范围。

（二）技术经济论证

1. 技术成本：本标准采用常规土壤 DNA 提取试剂盒、通用 PCR 仪、水平电泳系统、核酸荧光定量仪和高通量测序平台等成熟技术，不要求所有实施单位同时配置全部设备。中小规模样品可采用常规提取加 Sanger 验证，大规模样品可采用高通量测序，从而为不同实验室提供分层技术路线。
2. 耗材与试剂可获得性：PBS、RNase I、EDTA、TENP 缓冲液组分、PCR 试剂、琼脂糖、核酸染料和 DNA Marker 等均为科研和检测实验室常用材料，市场供应成熟；标准未限定特定品牌和型号，有利于控制实施成本。
3. 工作效率：统一样品采集、低温保存、提取纯化、PCR 扩增、测序和记录要求，可减少因方法不一致导致的重复摸索、样品损失和返工，提高批量样品处理的一致性。
4. 技术成熟度：标准所采用的主要方法均为土壤 eDNA 研究和环境微生物监测中常用技术，实施单位可根据样品规模和设备条件选择路线。正式技术经济论证中仍建议补充典型批次的耗材、工时及设备使用成本，以形成更完整的成本依据。

（三）预期效益

1. 科学与技术效益：推动农田土壤 eDNA 分析由不同实验室自定义流程向可记录、可验证、可比较的标准化流程转变，为土壤生物多样性监测、农田生态系统健康评价和土壤微生物生态学研究提供统一技术基础。
2. 质量管理效益：建立空白、平行、加标回收、阴阳性对照、技术重复和测序数据量等质量控制链条，提升结果可追溯性和异常处置能力。

3. 应用效益：通过不同农田类型采样深度、提取方法和引物体系的推荐参数，提高标准在旱地、水浇地、设施农田、水稻田、果园和茶园等场景中的可实施性。
4. 经济效益：统一流程和记录要求有望减少重复试验、重复采样和样品损失，降低跨单位方法比对与协作沟通成本。现有材料不足以支持具体百分比或金额，因此本说明不设置未经验证的量化经济收益指标。

四、与国际、国外同类标准技术内容对比情况

（一）相关技术文件

现有编制材料中引用的 GB/T 40226—2021《环境微生物宏基因组检测 高通量测序法》和 GB/T 41689—2022《土壤质量 土壤样品直接提取 DNA 的方法》分别关注环境微生物宏基因组检测和土壤 DNA 直接提取，与本标准规定的“采样—提取—扩增—测序—生物信息分析—质量控制”全链条技术规范对象不同，不能直接替代本标准。现有编制材料未提供与农田土壤 eDNA 分析完全对应的国际或国外完整标准，正式报批前应继续检索 ISO、ASTM、EN/BS 及环境 DNA 监测相关文件，形成检索记录。本标准直接针对农田土壤中细菌、真菌、脊椎动物和无脊椎动物 eDNA 的检测与监测，关注 eDNA 完整性、腐殖酸和多酚抑制物去除、引物特异性、测序数据量和污染控制，覆盖多类农田土壤并设置参数适配原则，同时规范空白、平行样、加标回收和阴阳性对照构成的全流程质控体系。

（二）本标准的技术特点

1. 与仅针对土壤 DNA 直接提取的通用方法相比，本标准将采样布点、分目标标记扩增、建库测序、分类注释和结果报告纳入同一框架；与主要面向水生环境的 eDNA 方法相比，重点考虑农田土壤的空间异质性及腐殖质抑制等问题。此处的技术差异是适用对象和流程覆盖范围的比较，并不意味着本标准已通过系统试验证明性能优于所有同类方法。
2. 与环境微生物宏基因组检测相关文件相比，本标准重点采用基于特定扩增标记的多类群监测思路，其数据反映目标标记覆盖的物种组成，并非宏基因组测序获得的全部遗传功能信息。标准编制需明确上述方法学边界，避免将标记基因相对序列丰度解释为微生物功能基因的绝对含量。
3. 本标准突出农田场景与多类群 eDNA 监测，既对样点和冷链样品管理提出要求，也对 16S、ITS、12S、COI 标记选择、核酸提取、PCR、测序、物种注释、质量

控制和结果报告作出规定。与仅规定某一技术环节的文件相比，重点在于将各环节的质量控制和记录要求衔接起来。

五、采用国际标准情况及未采用原因说明

本标准草案未声明等同采用或修改采用某项完整国际标准，而是依据农田土壤 eDNA 监测对象和国内应用需求进行自主编制。已有相关国家标准可以支持土壤 DNA 提取和高通量测序等环节，但与本标准所覆盖的多类群靶标扩增及农田监测全流程并非完全相同。因此建议采用相关标准作为规范性依据，专门规定农田 eDNA 分析的衔接事项。国际标准采用情况最终应以正式检索和报批文件为准。

六、与法律法规、现行相关标准的协调关系

（一）法律法规协调

本标准属于推荐性团体标准，编制与实施应符合《中华人民共和国标准化法》《团体标准管理规定》等要求，不得替代生态环境、农业农村等领域现行强制性规定。样品采集、运输及实验室处置应符合相应质量与安全管理要求。

（二）与相关标准的衔接

1. GB/T 30989：提供高通量基因测序技术的通用参照。
2. GB/T 35537：提供高通量基因测序结果质量评价要求。
3. GB/T 35890：提供高通量测序数据序列格式规范。
4. GB/T 40226—2021：提供环境微生物高通量测序有关技术依据。
5. GB/T 41689—2022：提供土壤样品 DNA 直接提取方法依据。
6. 土壤环境监测技术规范：用于衔接土壤采样与现场记录等要求；草案仍列 HJ/T 166，报批时应核对现行版本并统一引用。

现有标准提供通用技术依据，本标准重点补充农田多类群 eDNA 检测的具体流程和结果解释，二者在技术边界上以互补为主。

七、重大分歧意见的处理经过和依据

（一）立项函评与征求意见阶段意见处理

1. 关于标准适用范围和研究对象的意见： 专家建议进一步明确农田土壤 eDNA 监测的适用范围，统一标准名称、正文及附录中的相关表述，并将“典型微生物类群”修改为“典型土壤生物类群”。起草组采纳意见，在第 1 章明确标准适

用于农田土壤中细菌、真菌、脊椎动物和无脊椎动物等生物类群的 eDNA 监测，并对第 6 章采样要求及附录 A 中的土地利用类型进行相应调整。

2. 关于样品采集与保存运输的意见： 专家建议细化不同农田类型的采样深度、采样量和重复设置要求，统一样品冻融次数，并完善保存、运输及交接记录。起草组采纳意见，在第 6 章补充 0～20 cm 耕作层及特殊土层的采样要求，明确不同分析用途下的样品采集量、生物学重复与现场平行样设置，统一冻融次数要求，并对附录 A 中的样品保存运输信息进行调整。
3. 关于 DNA 提取与纯化的意见： 专家建议明确纯化试剂盒的选择原则、纯化效果判定指标及 eDNA 提取效率验证方法，同时核查 TENP 缓冲液配方的一致性。起草组采纳相关意见，在第 7.2 节补充试剂盒选型原则及 DNA 纯度、完整性、扩增效果等评价指标，在第 7.3 节增加外源 DNA 加标回收率验证方法，并对相关试剂配方进行核对。部分技术参数仍需结合方法验证进一步确认。
4. 关于 PCR 扩增与测序分析的意见： 专家建议完善不同目标生物类群的引物选择、PCR 反应体系、扩增程序、文库构建及测序质量要求。起草组采纳意见，在第 8 章补充 16S rDNA、ITS、12S rDNA 和 COI 等标记的选择原则，细化 PCR 扩增、产物纯化、文库构建、测序平台、读长及最低测序数据量等技术要求，并在附录 B 中完善引物信息及其与正文扩增程序的对应关系。
5. 关于生物信息学分析与物种注释的意见： 专家提出不同分子标记不宜采用完全相同的物种注释规则，应分别明确参考数据库、相似性阈值、非目标序列处理和结果报告原则。起草组采纳意见，在第 9.1.3 节分别规定细菌、真菌、脊椎动物和无脊椎动物的参考数据库及分类注释要求，并在第 9.1.2 节区分 OTU 聚类阈值与物种级注释阈值，以提高分析结果的合理性和可比性。
6. 关于质量控制和结果记录的意见： 专家建议完善 DNA 纯度指标、样品与 PCR 平行设置、阴阳性对照及全过程可追溯要求。起草组采纳意见，在第 7 章和第 10 章补充 DNA 提取回收率、纯度及重复性评价要求，完善采样空白、前处理空白、提取空白、PCR 阴性对照和阳性对照等质量控制内容，并在附录 A 中增加样品编号与平行样对应关系、采样人员及交接信息等记录项目。
7. 关于标准文本规范性和前后一致性的意见： 专家建议统一术语、缩略语、技术参数、计量单位及正文与附录的交叉引用，删除重复表述。起草组采纳意见，在第 3.2 节补充 Tris-HCl、SDS、$MgCl_2$、PVPP、PES 及 DEPC 等缩略语，对第

6 章采样量单位、第 10 章消毒剂浓度以及附录 A、B 中的相关内容进行修改，并对正文条款和附录格式进行校核。对于仍需进一步统一的个别技术表述，将在标准定稿前继续核查完善。

（二）当前尚需进一步论证的事项

根据专家征求意见及标准修订情况，现阶段大部分意见已在标准正文和附录中作出相应修改，但部分技术内容仍需进一步核实和完善。

1. 关键技术参数的验证依据。 第 7 章已补充 DNA 纯化效果评价和 eDNA 提取效率验证方法，第 8 章明确了 PCR 扩增及测序相关参数，但提取回收率、扩增效率、最低测序数据量等指标仍需结合不同农田土壤类型的实际检测结果，进一步完善试验或文献依据。
2. 部分技术条款的前后一致性。 第 4.2.8 节与第 7.1 节涉及的 TENP 缓冲液配方及使用条件仍需核对；第 6.1.2 节与第 6.1.8 节的采样深度要求应进一步衔接；第 3 章术语和定义中的重复表述，以及第 1 章个别不准确用语，仍需在定稿前统一修改。
3. 样品保存和质量控制要求。 第 6 章和第 10 章已对样品保存、冻融次数及质量控制作出规定，但部分保存条件和记录要求仍需进一步协调，特别是附录 A.2 中的运输温度、暂存条件及相应记录项目，应与正文保持一致。
4. 数据分析方法的适用性。 第 9 章已针对不同目标生物类群分别规定物种注释数据库和分类阈值，但 97%相似性 OTU 聚类方法对不同分子标记的适用性，以及平行样物种筛选规则等内容，仍需结合实际数据分析结果进一步论证。

（三）总体说明

本次征求意见共收到 5 家单位提出的 31 项意见，主要涉及标准适用范围、样品采集与保存、DNA 提取与纯化、PCR 扩增与测序、生物信息学分析、质量控制及文本规范性等方面。起草组对相关意见进行了梳理，并在标准修订稿中补充和完善了相应技术内容。根据现有征求意见汇总表，31 项意见均按采纳处理。

总体来看，专家意见主要集中于技术要求的细化、关键参数的合理性及标准条款的协调统一，未涉及对标准制定方向和总体技术路线的根本性否定。现阶段部分技术参数的验证依据及个别条款的一致性仍需进一步完善，可通过补充试验验证、核实技术依据和统一文本表述等方式解决。目前未发现影响标准总体框架和核心技术流程的重大分歧。

八、涉及专利的有关说明

本标准涉及 DNA 提取纯化、PCR 扩增、高通量测序以及生物信息学分析等通用技术，草案未将某一商业品牌或特定专利设备规定为唯一实施途径。标准前言已设置可能涉及专利的风险提示。现有材料未附专利检索结果或必要专利声明，报批前应按归口组织的知识产权管理要求开展检索和核验。若发现实施本标准不可避免地涉及有效专利，应履行相应声明和许可程序。

九、标准实施要求、组织和技术措施及过渡期建议

（一）组织实施

1. 标准发布后，建议由中国土壤学会组织面向科研院所、高校、检测机构及相关应用单位开展标准宣贯与技术培训，重点讲解农田土壤 eDNA 样品采集与保存、DNA 提取与纯化、PCR 扩增、高通量测序、生物信息学分析及全过程质量控制等技术要求，提高标准的理解程度和规范化应用水平。
2. 由标准主要起草单位及相关技术人员组成技术咨询与实施支持团队，围绕农田土壤样品采集、eDNA 提取效率、PCR 扩增条件、测序数据处理、物种注释及质量控制等关键环节，为标准实施单位提供技术指导，协助解决实际应用中遇到的技术问题。
3. 鼓励具备土壤分子生物学、环境 DNA 检测及高通量测序技术基础的科研院所、高校和检测机构开展标准试点应用及实验室间比对，重点评价不同农田土壤类型下 eDNA 提取效率、PCR 扩增效果、测序结果及物种注释的一致性，逐步积累方法重复性、稳定性及质量控制等方面的验证数据，为标准推广应用提供技术支撑。
4. 建立标准实施情况跟踪与反馈机制，持续收集不同农田类型、土壤条件、检测设备及目标生物类群下的标准应用情况，重点关注样品采集与保存、eDNA 提取与纯化、测序数据分析及质量控制等环节的实施效果，及时总结应用经验和存在的问题，为标准后续复审、技术参数优化及修订完善提供依据。

（二）技术保障

1. 配套完善标准操作程序（SOP）、农田土壤 eDNA 样品采集与交接记录表、DNA 提取与纯化记录表、PCR 扩增及测序质量控制记录表和结果报告模板，明确各环节的操作要求、关键参数及记录内容，便于实施单位规范开展农田土壤 eDNA 监测工作。

2. 组织不同农田类型及代表性土壤样品的方法比对与验证，重点考察土壤理化性质对 eDNA 提取效率、DNA 纯化效果和 PCR 扩增结果的影响，进一步完善样品预处理、DNA 提取与纯化、扩增条件及质量控制等技术要求，提高标准在不同农田土壤条件下的适用性。
3. 围绕 DNA 提取与纯化、PCR 扩增、高通量测序及生物信息学分析等关键技术环节，建立可追溯的试验操作和质量控制记录。通过设置采样空白、提取空白、PCR 阴性对照、阳性对照、平行样及加标回收对照等，评价检测过程的稳定性和可靠性，必要时组织实验室间比对，验证不同实验室检测结果的一致性。
4. 建立标准实施案例和常见问题记录机制，针对土壤样品保存不当、DNA 提取效率偏低、腐殖酸等物质造成 PCR 扩增抑制、扩增结果不稳定、测序数据质量不足及物种注释偏差等问题，整理相应的原因分析和处理方法，为实施单位提供技术参考。

（三）过渡期建议

1. 建议标准发布之日起设置 6 个月过渡期，供实施单位完成标准操作文件更新、技术人员培训、仪器设备状态确认，以及农田土壤 eDNA 提取、PCR 扩增和测序分析等方法的实验室内部验证，为标准正式实施做好准备。
2. 过渡期内，可将实验室现有土壤 eDNA 分析流程与本标准规定的方法进行对照，重点比较 DNA 提取效率与纯化效果、PCR 扩增结果、测序数据质量、物种注释结果及质量控制指标的一致性，及时发现并解决方法衔接过程中存在的问题。
3. 建议标准实施日期由中国土壤学会结合标准发布安排确定。标准正式实施后，相关科研院所、高校、检测机构及其他应用单位可根据科研项目、监测任务和实验室质量管理要求，逐步采用本标准开展农田土壤 eDNA 分析工作。

（四）配套实施建议

1. 配套文件： 建议同步提供农田土壤 eDNA 样品采集记录表、样品保存运输与交接记录表、DNA 提取与纯化记录表、PCR 扩增及测序质量控制记录表和结果报告模板，并结合实际应用逐步完善不同目标生物类群的分析方法及典型质量控制案例。
2. 能力建设： 鼓励相关实验室完善土壤样品低温保存、DNA 提取与纯化、PCR 扩增、核酸质量检测及高通量测序等基础条件，建立样品分区管理、试剂耗材批

次管理、仪器设备运行记录和生物信息学分析参数记录制度，提高检测结果的准确性和可追溯性。

3. 后续标准化： 可根据农田土壤 eDNA 分析技术的发展和实际应用需求，进一步研究不同土壤类型的 eDNA 提取与纯化方法、不同生物类群的分子标记选择、物种注释及生物多样性评价等相关技术要求，逐步完善农田土壤 eDNA 监测与分析的配套技术体系。

十、其他应予说明的事项

1. 数据管理：原始测序数据、质控记录、样品编号和数据库版本应按项目或实验室管理要求保存，明确数据访问、修改与再分析责任。必要时按照科研数据共享规定提供可复核的数据及元信息，但涉及具体位置和敏感物种的信息应按照适用管理要求处理。
2. 适用范围：重点面向农田土壤的多类群 eDNA 监测，不应自然外推为一切陆地环境或所有物种均可获得相同准确度。
3. 附录性质：现有草案的附录 A 和 B 均为资料性附录，分别用于样品记录及引物信息；报批时应同步核对正文交叉引用。
4. 数据解释：序列检出、相对序列丰度和物种注释不等同于活体数量、绝对丰度或物种生态功能，应在结果报告中说明局限性。
5. 复审与修订：实施后可根据测序平台、引物与数据库技术进展及实验室间验证结果，按照中国土壤学会要求开展复审。