

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20171025001

http://www.yykxjz.cn/

单秀娟, 李苗, 王伟继. 环境DNA(eDNA)技术在水生生态系统中的应用研究进展. 渔业科学进展, 2018, 39(3): 23–29
Shan XJ, Li M, Wang WJ. Application of environmental DNA technology in aquatic ecosystem. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(3): 23–29

环境 DNA(eDNA)技术在水生生态系统中的应用研究进展*

单秀娟^{1,2} 李苗^{1,3} 王伟继^{1,2①}

(1. 农业部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东省渔业资源与生态环境重点实验室 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306)

摘要 环境 DNA(Environmental DNA, eDNA)是指从皮肤、黏液、唾液、精子、分泌物、卵、粪便、尿液、血液、根、叶、果实、花粉和腐烂体等释放出来的、普遍存在的、游离的 DNA 分子。环境 DNA 技术是指从环境样品(土壤、沉积物和水体等)中直接提取 DNA 片段后利用测序技术进行定性或定量分析的方法。近年来随着分子生物学的发展,环境 DNA 技术已经成为一种新的水生生物调查方法,其主要被用来进行生物入侵的防治、濒危物种的保护、生物多样性的评价以及生物量的评估等。作者综述了环境 DNA 技术的发展历程、操作流程、在水生生态系统中的应用、优势以及存在的问题,同时对环境 DNA 在生态学领域中的应用前景进行了展望。

关键词 环境 DNA; 物种监测; 生物多样性; 生物量评估

中图分类号 S931 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)03-0023-07

水生生态系统是人类赖以生存和发展的重要自然资源之一。随着科学技术的不断进步和经济的飞速增长,人类对水生生态系统的开发力度不断加大,对水生生态系统的生物多样性造成的破坏也日益严重。掌握物种的分布是生物多样性研究的必要基础,同时对于生物地理学、保护生物学和生态学等也是非常重要的(Ficetola *et al.*, 2008; Lodge *et al.*, 2012)。传统的物种分布分析主要是利用现场调查,采用形态学的方法进行物种鉴定,对于取样容易、个体较大的物种来说效果较好。然而,在许多环境中、在某些特定生命阶

段和密度非常低的群体中,其现场取样非常困难(Dejean *et al.*, 2011),且形态学的鉴定方法对标本的完整性以及对分类鉴定人员的专业素质要求较高,这使生物多样性分析结果不佳。因此,急需寻找一种经济高效的物种鉴定和调查方法,为水生生态系统生物多样性的研究和保护提供技术支撑。

近年来,随着分子生物学研究的迅速发展,物种鉴定方法已由传统的形态学分类向分子生物学过渡,尤其是 DNA 分类技术-环境 DNA(Environmental DNA, eDNA)技术发展和应用。环境 DNA 是指从皮肤、黏

* 国家重点基础研究发展计划项目(2015CB453303)、中央级公益性科研院所基本科研业务费(20603022016003)、山东省泰山学者专项基金和青岛海洋科学与技术国家实验室“鳌山人才”培养计划项目(2017ASTCP-ES07)共同资助 [This work was supported by the National Basic Research Program of China(2015CB453303), Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, YSFRI, CAFS (20603022016003), Special Funds for Taishan Scholar Project of Shandong Province, and Aoshan Talents Cultivation Program Supported by Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology (2017ASTCP-ES07)]. 单秀娟, E-mail: shanxj@ysfri.ac.cn

① 通讯作者: 王伟继, 研究员, E-mail: wangwj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2017-10-25, 收修改稿日期: 2018-01-30

液、唾液、精子、分泌物、卵、粪便、尿液、血液、根、叶、果实、花粉和腐烂体等释放出来的游离的 DNA 分子(Bohmann *et al*, 2014)。环境 DNA 技术是指从环境样品(土壤、沉积物和水体等)中直接提取 DNA 片段后利用测序技术进行定性或定量分析的方法(Ficetola *et al*, 2008; Haile *et al*, 2009)。迄今为止, 经过 10 余年的发展, 环境 DNA 技术在生物学领域开始应用。作者从环境 DNA 技术的发展历程、环境 DNA 技术的主要操作流程、环境 DNA 技术在水域生态学领域中的应用和环境 DNA 技术未来的发展方向 4 个主要方面进行了综述, 以期对水生生态系统生物多样性的研究提供基础。

1 环境 DNA 技术的发展历程

环境 DNA 技术最早出现在环境微生物学领域, 其被用于分离和纯化沉积物中微生物的 DNA(Ogram *et al*, 1987), 但环境 DNA 技术真正得到认可及应用却是在 2000 年之后(Rondon *et al*, 2000; Yoccoz, 2012)。利用环境 DNA 技术监测和保护大型水生生物, 始于用源自于古老沉积物中的 DNA 去评价生物多样性(Willerslev *et al*, 2003); 而关于水样 DNA 的第 1 次研究则是利用从水样中提取的 DNA 去监测水域中是否存在入侵物种美国牛蛙 [*Rana catesbeiana*=*Lithobates catesbeianus*](Ficetola, 2008)。之后, 随着环境 DNA 技术的日益成熟, 其应用由最初的定性研究(物种监测)发展到现在的定量研究(生物量评估), 研究对象也变得多样化(两栖动物、鱼类、哺乳动物、爬行动物和腹足动物等)。此外, 第 2 代测序技术的发展使环境 DNA 技术由当初的单个物种鉴定过渡到整个动物群的鉴定(Rees *et al*, 2014)。总而言之, 环境 DNA 技术的出现为水生生态系统生物多样性的研究开辟了一条新的道路。

2 环境 DNA 技术主要操作流程

水环境 DNA 的分析主要有 4 个步骤: 水样的采集及保存→水样 DNA 的提取→DNA 检测→结果分析。通常由于研究目的不同以及采样环境的差异, 不同的研究人员在采集水样、提取 DNA 以及对 DNA 进行分析这 3 个过程中采取了不同的方法。

2.1 水样的采集及保存

目前, 环境 DNA 技术日趋成熟, 研究的范围越来越广, 取样环境也越来越丰富。据以往的研究, 水样来源于养殖池、小溪、湖泊、河流和海洋等各种人工和天然水体。水样采集方法根据需要可以分为直接

采集法和过滤法。直接采集法是指水样采集后不进行过滤, 将水样直接进行保存来完成环境 DNA 的收集(Thomsen *et al*, 2012)。过滤法是指将水样进行过滤之后把环境 DNA 截留在滤膜上, 保存滤膜从而实现 DNA 采集(Pilliod *et al*, 2013), 其根据过滤地点的不同又可以分为在线过滤(采集水样的同时直接对其进行过滤)、采样后过滤(收集水样和过滤分开进行, 但都是在野外完成的)和水样采集-保存-实验室过滤(在野外进行水样采集与保存, 之后在实验室进行过滤)。目前, 通常使用的滤膜主要有聚碳酸酯膜(Takahara *et al*, 2012)、硝酸纤维膜(Goldberg *et al*, 2011)、玻璃纤维膜(Jerde *et al*, 2011)和尼龙膜(Thomsen *et al*, 2012a)等, 孔径一般在 0.22~1.5 μm 之间。研究表明, 不同的滤膜具有不同的 DNA 回收率, 其中混合纤维滤膜的回收效果最佳(Liang *et al*, 2013)。滤膜的保存则采取冷冻保存(-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存)和脱水保存(一般使用 3 mol/L 的醋酸钠和无水乙醇混合液或 95% 的乙醇进行脱水)2 种方法。

根据已有的研究, 由于水体性质的不同, 水样的采集量一般集中在 15 ml~10 L 之间, 以 1~2 L 的采样量为最多(Rees *et al*, 2014)。目标种的检出率还取决于物种的生活习性、生活环境以及种群密度大小等因素。因此, 为了提高目标种的检出率, 研究人员在采集水样时应注意:(1)在同一采样位置的同一水体深度设置不同的水量梯度, 针对不同水体中的不同物种, 寻求最佳的采样量;(2)在同一水体中设置不同的水深梯度, 寻找最佳的采样位置;(3)在同一位置的同一水深进行多次采样, 以增加物种的检出率;(4)野外采集的样品应该及时进行保存, 防止 DNA 的降解导致的实验误差。

2.2 水样 DNA 提取

由于水样中含有的 DNA 量极少且成分复杂, 因此, 水样中环境 DNA 的提取没有一个统一的标准, 为了提取高质量的水样 DNA, 大多数研究者都采用 DNA 提取试剂盒与传统方法相结合的方式提取水环境中的 DNA。采用的方法主要有: 酒精沉淀法、过滤法及酚-氯仿-异戊醇法等(Costas *et al*, 2007; Deiner, Altermat, 2014; Deiner *et al*, 2015)。针对不同的研究对象应该采取不同的提取方法, 以达到最佳的提取效果。Deiner 等(2015)通过比较 3 种不同的环境 DNA 提取方法发现, 对于真核生物, 应该提取细胞色素 C 氧化酶 I 基因(CO I 基因), 采用过滤与 Qiagen's DNeasy Blood & Tissue Kit 相结合的方法, 而对于水环境中的真菌, 则应该采用沉淀与 MO BIO's PowerWater DNA Isolation Kit 相结合的方法(Deiner *et al*, 2015)。

2.3 水样 DNA 分析

通过对水样 DNA 分析, 得到环境 DNA 组成情况, 进而依据环境 DNA 的组成情况进行物种监测、生物多样性评价和生物量评估等。该阶段首先需要进行的的就是针对不同的目标种选取 DNA 识别片段来设计引物。为了实验结果的精确性, 要求所选取的 DNA 片段必须能够有效区分不同物种, 尤其是那些亲缘关系比较近的物种。大量研究表明, 在 DNA 浓度较低的情况下, 细胞中的线粒体 DNA(Mitochondrial DNA, mtDNA)拷贝数要比核 DNA 大得多、含有更多的保守序列, 从而更容易被检测得到, 且基因组数据库中包含大量 mtDNA 的序列信息, 更有利于在研究过程中对环境 DNA 序列进行对比与分类。因此, mtDNA 更适合被用来进行动物识别。

根据调查目的的差异, 设计不同的引物。可以参考 NCBI 数据库中的序列, 也可以利用测序技术来获取目标种的 mtDNA 序列。如果是进行物种监测, 就需要针对目标种设计高特异性引物; 如果是进行生物多样性评估, 则需要设计通用性的引物, 要求此引物尽可能多的扩增物种的识别片段。另外, 环境 DNA 容易降解, 一般选取低于 100 bp 的片段。还可以利用荧光定量 PCR 测得目标种 DNA 片段的量, 据此来进行生物量估测; 通过二代测序还可以同时得到多种物种的 DNA 序列, 以此来进行生物多样性评估(Thomsen *et al.*, 2012b)。

通过凝胶电泳检测 PCR 的结果, 从而推测采样点是否存在目标种, PCR 的结果以阴性、阳性记录。阴性表明环境样品中不存在目标种的 DNA, 阳性则表明环境样品中存在目标种的 DNA。在定量 PCR 中则是以阳性对照为基准设置荧光阈值, 当未知浓度样品的扩增量超过荧光阈值时标记为阳性, 反之记为阴性。如果是利用通用引物扩增之后进行测序, 扩增所得 DNA 片段与目标种相匹配, 则结果记为阳性, 反之则为阴性。一般通过设置 3~10 个平行样本的方法来确保结果的准确性, 通过设置阴阳性对照排除假阳性与假阴性扩增以及交叉污染。

3 环境 DNA 技术在水域生态学领域中的应用

3.1 目标种的鉴别

生物入侵的防治、濒危物种和稀有物种的保护问题, 已成为世界上急需解决的问题之一, 环境 DNA 技术的出现, 使目标种的鉴别变得高效且成本低廉, 它主要是通过检验水样中是否含有目标种释放的 DNA 来断定水域中是否存在该物种。

3.1.1 外来入侵物种的监测 外来入侵物种是生物多样性丧失和全球同质化的主要原因之一(Dejean *et al.*, 2011), 它们可能会与土著种通过竞争成为优势种或者是外来疾病的传播者。一旦外来物种入侵成功, 不但控制成本高而且根除的可能性很小(Howald *et al.*, 2007)。如果在入侵早期将其监测到, 可以提高根除的成功率, 降低控制成本和对生态系统的影响。近年来, 环境 DNA 被用来监测水生生态系统的生物入侵, 在美国牛蛙(*Ficetola et al.*, 2008)、亚洲鲤鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*)(Jerde *et al.*, 2013)、大西洋鲑(*Cyprinus carpio*)(Takahara *et al.*, 2012)、蜗牛(*Potamopyrgus antipodarum*)(Goldberg *et al.*, 2013)、克氏螯虾(*Procambarus clarkii*)(Tréguier *et al.*, 2014)、墨笔鱼(*Pseudorasbora parva*)(Davison *et al.*, 2017)、小龙虾(*Orconectes rusticus*)(Larson *et al.*, 2017)等证实了其可行性。

3.1.2 濒危物种和稀有物种的监测 传统调查方法在物种处于濒危状态及低密度时难以监测到。同时, 拖网、电捕鱼等传统方法具有侵入性的缺点(大量生物被捕获、被干扰导致死亡甚至破坏其栖息地), 对生态系统的干扰较大。环境 DNA 技术的应用避免了这一系列问题。目前, 通过环境 DNA 已经实现了对欧白鲑(*Coregonus albula*)(Winfield *et al.*, 2008)、美国隐鳃鲐(*Cryptobranchus a. alleganiensis*)(Olson *et al.*, 2012)、欧洲泥鳅(*Misgurnus fossilis*)(Sigsgaard *et al.*, 2015)、王鲑(*Oncorhynchus tshawytscha*)(Laramie *et al.*, 2015)、澳洲麦氏鲈(*Macquaria australasica*)(Piggott, 2017)等物种的监测, 证实了环境 DNA 监测方法在濒危物种和稀有物种的监测中极具潜力。

3.2 生物多样性评价

所有的生物多样性保护方法基本上取决于生物监测, 以相关的时间尺度上获得有关物种分布和种群规模的精确数据(Thomsen *et al.*, 2015)。因而, 用于评估和监测水生生物多样性的方法和技术(特别是针对稀有物种)对于有效和及时的管理生物多样性至关重要(Valentini *et al.*, 2016)。然而, 传统的监测技术存在一些问题, 如正确识别隐秘物种或幼年生命阶段的某些物种相当困难。近年来, 因学科发展限制, 分类学专家亟需补充(Wheeler *et al.*, 2004)非标准化抽样以及一些调查技术存在的侵入性。因此, 迫切需要发展高效快速的用于生物多样性监测的技术和方法。

环境 DNA 与第 2 代测序技术(Next-generation sequencing, NGS)可以同时监测水生生态系统多个物种, 实现对物种生物量的准确估计, 是生物多样性研

究的有力工具。Thomsen 等(2012a、2012b)使用 2 个鱼类的通用引物组,利用 NGS 技术进行测序,结果显示来自 8 次 PCR 重复的产物可以回收 15 个物种特异性序列,与 9 个常规测量方法的结果相比,记录的鱼种数目最多(Thomsen *et al.*, 2012a、2012b)。

随着测序成本的降低,NGS 将会是监管机构和生态学家越来越感兴趣的领域,它将通过量化水生生态系统的物种丰富度来开辟新的生态系统监测途径。

3.3 生物量评估

掌握物种的生物量对于评估生态系统的生产量和物质循环至关重要(Begon *et al.*, 2005)。生物量是一个基本的生物学参数,但其通常很难被精确地估测,尤其是水生生物(例如鱼类)(Takahara *et al.*, 2012)。

传统方法对生态系统破坏较大。Takahara 等(2012)率先尝试了利用环境 DNA 的方法对日本的淡水湖—Iba-naiko 湖中的普通鲤鱼进行了资源量评估。研究表明,水体中环境 DNA 的浓度与鲤鱼的生物量呈正相关关系,并且利用环境 DNA 浓度估测的生物量数据能够反映出自然环境中鲤鱼的潜在分布情况,且水温对鲤鱼的分布和环境 DNA 估测方法的准确性没有影响。此后,相关研究者又利用此方法对水生生态系统中的两栖动物、海洋鱼类、淡水鱼类(Pilliod *et al.*, 2014; Kelly *et al.*, 2014; Doi *et al.*, 2017; Lacoursière *et al.*, 2016)等水生生物进行了生物量估测,但研究结果表明水温对鱼类的生长、代谢和免疫功能具有一定的影响(Engelsma *et al.*, 2003; Ruyet *et al.*, 2004; Takahara *et al.*, 2011),进而会对环境 DNA 的释放速率产生影响(Lacoursière *et al.*, 2016),以至于间接的影响生物量估测的准确性。另外,pH、光照和微生物等也会影响环境 DNA 的释放速率与降解速率(Mann *et al.*, 2009; Barnes *et al.*, 2014; Strickler *et al.*, 2015; Tsuji *et al.*, 2016),影响生物量估测的准确性,因此,利用环境 DNA 估测生物量的方法还需要进行深入的研究。

环境 DNA 技术虽然在生物量估测方面的应用还需进一步研究,但其为以后的生物量评估提供了新的思路。

3.4 环境 DNA 技术在其他方面的应用

近年来,环境 DNA 技术发展迅速,其应用开始拓展到(1)动物摄食、食物网、能量流动(Yoccoz, 2012);(2)种群的遗传多样性。Sigsgaard 等(2016)首次应用环境 DNA 测序的技术收集了世界上体型最大的鱼类—鲸鲨的整个种群的遗传学信息,为确定其最佳的种群管理方式奠定了基础;(3)海洋生物群落季节性变化。Sigsgaard 等(2017)用环境 DNA 技术对海

洋生物群落的季节性变化进行了调查,并与传统的调查方法做出了对比。

4 总结及前景展望

4.1 环境 DNA 技术的优势

环境 DNA 技术作为一种新的水生生物监测和调查方法,在目标种监测、生物多样性调查和生物量估测等方面的广泛应用,与传统的网捕、电捕鱼等方法相比,环境 DNA 技术具有显著的优势。

4.1.1 灵敏度高 在对低密度种群、珍稀物种及一些隐存种进行监测调查时,传统方法很难监测到目标种,但利用环境 DNA 的方法则可以很容易的监测到。

4.1.2 经济高效,省时省力 环境 DNA 方法通常比传统方法需要更少的物力、财力、人力以及时间。Jerde 等(2011)通过对入侵物种亚洲鲤鱼的调查研究表明,同一区域内同一分布点,电捕鱼需要耗费工时 93 d,而环境 DNA 技术仅仅需要 0.174 d (Jerde *et al.*, 2011)。

4.1.3 对生态系统干扰低 传统的网捕、电捕等调查方法在捕获目标种的同时会对其他生物造成伤害,甚至会破坏生态系统,而环境 DNA 技术只需要对采集的水样进行分析便可以得到结果,对生物及生态系统干扰较低。

4.1.4 对调查人员的要求降低 传统方法要求研究人员具备较高的分类鉴定能力(肖金花等, 2004)。环境 DNA 技术只需要分子生物学的方法即可,运用 DNA 条形码技术使物种分类鉴定更加快速高效(任保青等, 2010)。

4.1.5 采样受限小 传统方法通常会受到天气、环境等因素的影响,而环境 DNA 方法由于其采样方法的简单、要求低,受外界影响因素更小(Thomsen *et al.*, 2015)。

4.1.6 标准化 尽管环境 DNA 技术仍然需要方法优化,但可以以非常标准化的方式在给定类型的栖息地中获取环境样本(Deiner *et al.*, 2015; Takahara *et al.*, 2015)。传统方法则较为困难,其结果取决于调查人员的专业素质和采样经验。

4.2 环境 DNA 技术存在的问题

环境 DNA 技术与传统调查方法相比更具优势,但就目前的研究现状而言,环境 DNA 技术在某些方面仍然存在一系列问题与不足。

4.2.1 环境 DNA 的提取以及分析方法需进一步优化 目前各研究者在样品的采集与保存、DNA 的提

取以及分析的过程中所采取的方法不尽相同,导致研究结果之间的对比性较差,以至于环境 DNA 技术的各个环节中仍然存在争议。往后需要对比各种不同的方法进行统一标准。

4.2.2 检测结果精度的有待提高 尽管环境 DNA 技术的灵敏度较传统方法更高,但其检测结果在时间尺度和空间尺度上的精度却较低。

4.2.3 污染问题 样品的采集、运输和保存等过程存在交叉污染,实验室分析过程存在试剂污染,这些都可能对实验结果造成影响。

4.2.4 影响环境 DNA 产生和降解的因素有待进一步考证 目前的研究现状还不确定环境因子是如何影响环境 DNA 的产生速率和降解速率,而这直接关系到环境中最终存在的 DNA 的量,也就决定了 DNA 定量研究的准确性。

4.3 环境 DNA 技术的前景展望

环境 DNA 技术作为一种快速、准确的物种监测方法,与 NGS 的结合,展现出了其在水生生态系统保护中的巨大潜能。在未来的研究中应该聚焦于以下几个方面:(1)实现物种的生物量定量评估,建立环境 DNA 与生物量关系之间的模型;(2)确定影响环境 DNA 产生与降解速率的因素,阐明其环境 DNA 的影响机理;(3)分析生物多样性热点地区的环境 DNA,提高环境 DNA 在生物多样性保护中的应用;(4)将环境 DNA 技术进行拓展,应用到食物网、能量流动、种群遗传学信息收集研究等。

参 考 文 献

- Barnes MA, Turner CR, Jerde CL, *et al.* Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(3): 1819–1827
- Begon M, Townsend CR, Harper JL. *From individuals to ecosystems*. Hoboken: Blackwell Publishers, 2005
- Bohmann K, Evans A, Gilbert MT, *et al.* Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution*, 2014, 29(6): 358–367
- Costas BA, Mcmanus G, Doherty M, *et al.* Use of species-specific primers and PCR to measure the distributions of planktonic ciliates in coastal waters. *Limnology & Oceanography Methods*, 2007, 5(6): 163–173
- Davison PI, Copp GH, Créach V, *et al.* Application of environmental DNA analysis to inform invasive fish eradication operations. *Science of Nature*, 2017, 104(3–4): 35
- Deiner K, Altermatt F. Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88786
- Deiner K, Walser JC, Mächler E, *et al.* Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biological Conservation*, 2015, 183: 53–63
- Dejean T, Valentini A, Duparc A, *et al.* Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23398
- Doi H, Inui R, Akamatsu Y, *et al.* Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish. *Freshwater Biology*, 2017, 62(1)
- Engelsma MY, Hougee S, Nap D, *et al.* Multiple acute temperature stress affects leucocyte populations and antibody responses in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Fish & Shellfish Immunology*, 2003, 15(5): 397–410
- Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, *et al.* Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 2008, 4(4): 423–425
- Goldberg CS, Pilliod DS, Arkle RS, *et al.* Molecular detection of vertebrates in stream water: a demonstration using Rocky Mountain tailed frogs and Idaho giant salamanders. *PLoS One*, 2011, 6(7): e22746
- Goldberg CS, Sepulveda A, Ray A, *et al.* Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). *Freshwater Science*, 2013, 32(3): 792–800
- Haile J, Froese DG, Macphee RDE, *et al.* Ancient DNA reveals late survival of mammoth and horse in interior Alaska. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2009, 106(52): 22352–22357
- Howald G, Donlan CJ, Galván JP, *et al.* Invasive rodent eradication on islands. *Conservation Biology*, 2007, 21(5): 1258–1268
- Jerde CL, Mahon AR, Chadderton WL, *et al.* “Sight-unseen” detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters*, 2011, 4(2): 150–157
- Kelly RP, Port JA, Yamahara KM, *et al.* Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86175
- Lacoursière-Roussel A, Rosabal M, Bernatchez L. Estimating fish abundance and biomass from eDNA concentrations: Variability among capture methods and environmental conditions. *Molecular Ecology Resources*, 2016, 16(6): 1401–1414
- Laramie MB, Pilliod DS, Goldberg CS. Characterizing the distribution of an endangered salmonid using environmental DNA analysis. *Biological Conservation*, 2015(183): 29–37
- Larson ER, Renshaw MA, Gantz CA, *et al.* Environmental DNA (eDNA) detects the invasive crayfishes *Orconectes rusticus*, and *Pacifastacus leniusculus*, in large lakes of North America. *Hydrobiologia*, 2017(800): 1–13
- Liang Z, Keeley A. Filtration recovery of extracellular DNA from environmental water samples. *Environmental Science*

- & Technology, 2013, 47(16): 9324–9331
- Lodge DM, Turner CR, Jerde CL, *et al.* Conservation in a cup of water: estimating biodiversity and population abundance from environmental DNA. *Molecular Ecology*, 2012, 21(11): 2555–2558
- Mann EE, Rice KC, Boles BR, *et al.* Modulation of eDNA release and degradation affects *Staphylococcus aureus* biofilm maturation. *PLoS One*, 2009, 4(6): e5822
- Ogram A, Saylor GS, Barkay T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 1987, 7(2–3): 57–66
- Olson ZH, Briggler JT, Williams RN. An eDNA approach to detect eastern hellbenders (*Cryptobranchus a. alleganiensis*) using samples of water. *Wildlife Research*, 2012, 39(7): 629–636
- Piggott MP. An environmental DNA assay for detecting Macquarie perch, *Macquaria australasica*. *Conservation Genetics Resources*, 2017, 9(2): 1–3
- Pilliod DS, Goldberg CS, Arkle RS, *et al.* Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2013, 70(8): 1123–1130
- Pilliod DS, Goldberg CS, Arkle RS, *et al.* Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources*, 2014, 14(1): 109–116
- 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*, 2015, 51(5): 1450–1459
- Ren BQ, Chen ZD. DNA barcoding plant life. *Chinese Bulletin of Botany*, 2010, 45(1): 1–12[任保青, 陈之端. 植物 DNA 条形码技术. *植物学报*, 2010, 45(1): 1–12]
- Rondon MR, August PR, Bettermann AD, *et al.* Cloning the soil metagenome: A strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, 66(6): 2541–2547
- Ruyet PL, Mahé K, Bayon NL, *et al.* Effects of temperature on growth and metabolism in a Mediterranean population of European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Aquaculture*, 2004, 237(1–4): 269–280
- Sigsgaard EE, Carl H, Moller PR, *et al.* Monitoring the near-extinct European weather loach in Denmark based on environmental DNA from water samples. *Biological Conservation*, 2015, 183: 46–52
- Sigsgaard EE, Nielsen IB, Bach SS, *et al.* Population characteristics of a large whale shark aggregation inferred from seawater environmental DNA. *Nature Ecology & Evolution*, 2016, 1(1): 4
- Sigsgaard EE, Nielsen IB, Carl H, *et al.* Seawater environmental DNA reflects seasonality of a coastal fish community. *Marine Biology*, 2017, 164(6): 128
- Strickler KM, Fremier AK, Goldberg CS. Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation*, 2015, 183: 85–92
- Takahara T, Yamanaka H, Suzuki AA, *et al.* Stress response to daily temperature fluctuations in common carp, *Cyprinus carpio* L. *Hydrobiologia*, 2011, 675(1): 65
- Takahara T, Minamoto T, Yamanaka H, *et al.* Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35868
- Takahara T, Minamoto T, Doi H. Effects of sample processing on the detection rate of environmental DNA from the Common Carp (*Cyprinus carpio*). *Biological Conservation*, 2015, 183: 64–69
- Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, *et al.* Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 2012a, 21(11): 2565–2573
- Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, *et al.* Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS One*, 2012b, 7(8): e41732
- Thomsen PF, Willerslev E. Environmental DNA—an emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 2015, 183: 4–18
- Tsuiji S, Yamanaka H, Minamoto T. Effects of water pH and proteinase K treatment on the yield of environmental DNA from water samples. *Limnology*, 2016, 18(1): 1–7
- Valentini A, Taberlet P, Miaud C, *et al.* Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 2016, 25(4): 929–942
- Wheeler QD, Raven PH, Wilson EO. Taxonomy: Impediment or expedient? *Science*, 2004, 303(5656): 285
- Willerslev E, Hansen AJ, Binladen J, *et al.* Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. *Science*, 2003, 300(5620): 791–795
- Winfield IJ, Fletcher JM, James JB. Assessment of the vendace population of bassenthwaite lake including observations on vendace spawning grounds final report. *Anesthesia & Analgesia*, 115(1), 209–210
- Xiao JH, Xiao H, Huang DW. DNA barcoding: New approach of biological taxonomy. *Acta Zoologica Sinica*, 2004, 50(5): 852–855[肖金花, 肖晖, 黄大卫. 生物分类学的新动向—DNA 条形码编码. *动物学报*, 2004, 50(5): 852–855]
- Yoccoz NG. The future of environmental DNA in ecology. *Molecular Ecology*, 2012, 21(8): 2031–2038

Application of Environmental DNA Technology in Aquatic Ecosystem

SHAN Xiujuan^{1,2}, LI Miao^{1,3}, WANG Weiji^{1,2①}

(1. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture; Shandong Provincial Key Laboratory of Fishery Resources and Eco-Environment, Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071; 3. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

Abstract An accurate grasp of species distribution is a requirement for biodiversity studies, and understanding species' biomass is crucial to assessing ecosystem productivity and material cycles. Traditional bioassays and biomass assessments are based on data from trawl surveys. However, trawl surveys often do not provide a true reflection of species distribution and resource status because of differences in the living habits and resource status of different species. To accurately grasp species distribution and resource status, it is imperative to identify cost-effective aquatic organism survey methods to provide technical support for the research and protection of aquatic ecosystem biological diversity. In recent years, the rapid development of molecular biology research has transformed species identification methods from traditional morphological classifications to molecular biology-based techniques, especially the development and application of environmental DNA technology. Environmental DNA is a ubiquitous free radical released from the skin, mucus, saliva, sperm, secretions, eggs, feces, urine, blood, roots, leaves, fruits, pollen, and decaying bodies of DNA molecules. Environmental DNA technology refers to the method of qualitatively or quantitatively analyzing DNA fragments directly from environmental samples (such as soils, sediments, and water bodies) using sequencing techniques. Environmental DNA technology has become a novel method of aquatic organism survey, which is mainly used in processes such as the prevention and control of biological invasion, protection of endangered species, and evaluation of biodiversity and biomass. Here, we review the development of environmental DNA technology, the operational flow, and its application in aquatic ecosystems, as well as the advantages and existing problems. In addition, we project the prospect of environmental DNA in the field of ecology. We hope that this review will provide novel ideas and methods for the research and protection of the biological diversity of aquatic ecosystems to ensure that aquatic resources can be fully utilized.

Key words Environmental DNA; Species monitoring; Biodiversity; Biomass assessment

① Corresponding author: WANG Weiji, E-mail: wangwj@ysfri.ac.cn