

环境 DNA 及其在水生生态系统保护中的应用

马鸿娟^{1*} STEWART Kathryn¹ 马利民¹ 任文伟^{1,2} 赵建夫¹

(¹同济大学环境科学与工程学院, 上海 200092; ²世界自然基金会(WWF)北京代表处, 上海 200083)

摘要 环境 DNA (environmental DNA, eDNA) 是指可以从环境样品 (如水、土壤、空气、冰芯等) 中直接提取到的 DNA 片段总和。eDNA 技术是在确定调查物种或种群的特异性基因识别片段的基础上, 利用各种分子手段检测从环境介质中所提取 eDNA 包含识别片段的情况, 进而确定取样环境中生物的分布状况, 包括 eDNA 获取、eDNA 分析和结果分析 3 个阶段, 是近年来新出现的一种生物调查方法。与传统方法相比, eDNA 技术具有灵敏度高、省时省力、对调查对象无损伤等优点, 不要求调查者具有传统的生物识别及鉴定经验。目前 eDNA 技术已被应用于目标物种 (如入侵物种、濒危物种及其他稀有物种) “有无” 的检测、生物量的估测、水体生物多样性的调查等, 在水生生态系统的保护中具有广泛的应用前景, 但目前仅在少数发达国家展开应用, 亟待进一步推广。目前研究者们所用的 eDNA 方法各不相同, 有待对现有方法进行完善并建立技术标准; 作为一种调查方法, 其时间及空间精确度有待进一步评价; 利用 eDNA 技术估测生物量的准确度还较低, 建议首先提高对 eDNA 产生与降解动力学的认识, 再进一步寻求提高其准确度的方法。

关键词 环境 DNA; 生物监测; 生物多样性

Environmental DNA and its application in protecting aquatic ecosystems. MA Hong-juan^{1*}, STEWART Kathryn¹, MA Li-min¹, REN Wen-wei^{1,2}, ZHAO Jian-fu¹ (¹College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China; ²WWF-Beijing Office, Shanghai 200083, China).

Abstract: Environmental DNA (eDNA) refers to DNA that can be directly extracted from environmental samples (such as soil, water, air and ice core). As such, eDNA has been utilized as a new biological survey method which is comprised of capturing eDNA, gene analysis and result analysis and can be used to monitor the distribution of organisms by detecting species-specific target DNA. Compared with traditional biological survey methods, eDNA has been demonstrated to be more sensitive, efficient, effective and noninvasive, and importantly does not depend on ecological or natural history expertise from researchers. To date, the eDNA method has seen myriad applications such as (1) the presence/absence of rare species (invasive and endangered species), (2) the estimation of population biomass, and (3) the monitoring of aquatic ecosystem biodiversity, among others. Despite having shown brilliant potential for conservation management and the protection of ecosystems, this method has only been applied in some advanced countries and warrants expansion worldwide. eDNA methods vary from different researchers and need to be improved to standards. As a survey method, its temporal and spatial precision should also be further evaluated. The accuracy of harnessing eDNA to estimate biomass is still low; we recommend researchers understand the dynamics of eDNA generation and degradation firstly and then search the method to improve the accuracy.

Key words: environmental DNA; biological monitoring; biodiversity.

准确掌握生物在环境中的分布、丰富度、群落形态是有效保护生物的基础(Lodge *et al.*, 2012)。但生态系统构成复杂,有些物种因体型小、数量少、隐蔽性强等原因难以被观察到,有些生物则在特定的生长发育阶段极难鉴定种属,如昆虫等变态发育的物种在幼虫阶段很难通过传统的鉴别方法识别(岳巧云等, 2011),这使得生物多样性的调查极为困难。传统的检测手段还处于“眼观耳听”的阶段,其调查结果的准确性严重依赖于调查者本身,缺乏可靠性。且利用拖网、围网、电捕鱼、实地考察等传统方法搜集生物多样性的数据,不仅耗时费力,调查代价不菲,有些还会对研究对象造成伤害(Bohmann *et al.*, 2014)。近年来,出现了一种灵敏度高、效率高且对调查物种无损伤的调查工具:环境 DNA(environmental DNA, eDNA)技术,有望改变这一现状(Kelly *et al.*, 2014a)。

环境 DNA 是指可以从环境样品(如水、土壤、空气、冰芯等)中直接提取到的 DNA 片段的总和,是来自微生物、动物、植物等不同物种 DNA 的混合物,既包含生物体经由皮肤、尿液、粪便、粘液等释放到环境中表皮细胞中的胞内 DNA,也包括细胞死亡后裂解释放到环境中的胞外 DNA(Taberlet *et al.*, 2012; Rees *et al.*, 2014)。eDNA 技术是在确定调查物种或种群的特异性基因识别片段的基础上,利用各种分子手段检测从环境介质中提取 eDNA 中包含识别片段的情况,进而确定取样环境中生物的分布状况。

近年来,该技术在水生生物入侵的早期检测、水体生物多样性调查等方面得到广泛的应用。本文将从 eDNA 技术的发展历史、利用 eDNA 技术调查水生生物的方法、eDNA 技术与传统水生生物检测方法的对比、eDNA 技术在水生生态系统保护中的应用 4 个方面展开介绍,最后讨论其未来的发展方向。

1 eDNA 技术的发展历史

环境 DNA 的研究最早出现在微生物领域,指不需对微生物进行分离培养,而直接从环境介质中获取的 DNA。1987 年, Ogram 等(1987)成功从海洋泥沼中提取出微生物 DNA。之后,学者们利用该项技术开展了一系列关于微生物的研究,主要包括 3 个方面:检测环境中的微生物种类(Campbell *et al.*, 2013);通过分析所得微生物基因序列推断其重要的生化作用及相关应用(Yin *et al.*, 2015);获取不可

培养微生物的基因序列(Kim *et al.*, 2010)。

利用 eDNA 技术检测大型水生生物始于利用古老沉积物中的 DNA 复现古生物史(Willerslev *et al.*, 2003)。2008 年,法国研究者(Ficetola *et al.*, 2008)利用从水中提取 eDNA 检测水域中是否有人入侵物种美国牛蛙(*Rana catesbeiana*),开启了 eDNA 技术在水生生物实时监测中的研究与应用。研究者们利用 eDNA 技术检测入侵物种及一些难以观测物种的存在状况。2012 年,研究者开始尝试利用 eDNA 技术对研究水域中某一物种生物量进行估测(Thomsen *et al.*, 2012a),并首次将此技术应用于检测海洋中的哺乳动物(Foote *et al.*, 2012)及动物的种类(Thomsen *et al.*, 2012a)。但目前利用该技术仍不能对物种个体进行绝对定量。近年来,研究者们开始关注温度、光照强度、生物需氧量等环境因素对水中 eDNA 的影响以及 eDNA 在水体中的动力学过程(Piaggio *et al.*, 2013; Barnes *et al.*, 2014; Pilliod *et al.*, 2014)。

总体而言,2008 年至今,eDNA 技术在水生生态系统的应用经历了由定性(是否存在的判断)到相对定量(水体中某一生物的生物量估测),由检测单一物种到同时检测多种物种,再到调查研究水域内生物多样性的发展。应用范围方面,水体范围已由一开始的淡水水域(池塘、河流、湖泊等)扩展至海洋,调查物种也由小型底栖动物扩展至两栖动物、哺乳动物等。

2 利用 eDNA 技术检测水体中生物的方法

如图 1 所示,eDNA 技术的工作流程为:eDNA 获取、eDNA 分析、结果分析。通过采集水样,提取 DNA 完成 eDNA 的获取;通过 PCR-电泳-测序、定量 PCR、二代测序等方法获得识别片段的序列及浓度;再通过序列比对等进行种属分析,分析所得序列信息所包含的物种信息。

2.1 eDNA 的获取

eDNA 的获取可分为 3 步:样品采集、样品保存及 eDNA 提取。

eDNA 技术的应用范围十分广泛,研究者们已经从多种水体中进行 eDNA 采样,包括实验室内水箱(Collins *et al.*, 2013)、人工池塘及天然池塘(Dejean *et al.*, 2011)、湖泊(Thomsen *et al.*, 2012b)、小溪(Wilcox *et al.*, 2013)、河流(Mahon *et al.*, 2013)、海洋(Thomsen *et al.*, 2012a)等。采样方法根据在提取

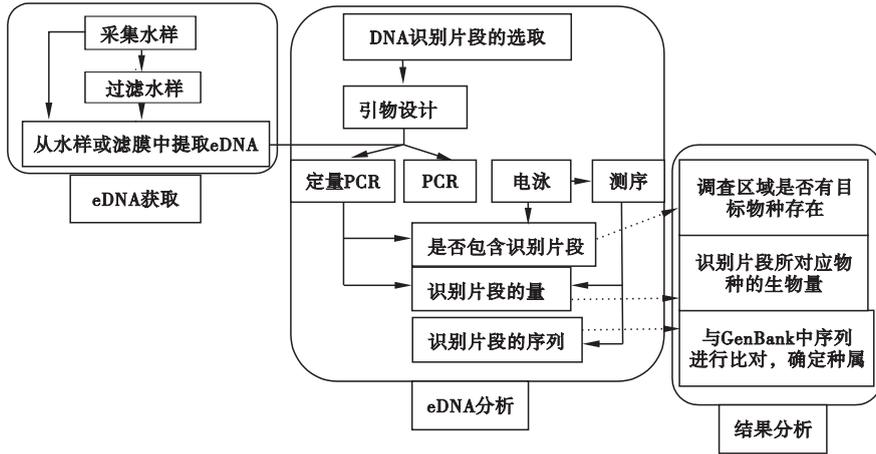


图1 eDNA 技术流程

Fig.1 Work flow of eDNA

eDNA 前是否对水样进行过滤可分为过滤法及直接采水样法 2 种。过滤法是对水样进行过滤从而将 eDNA 截留在滤膜上, 保存滤膜从而实现 eDNA 的收集 (Pilliod *et al.*, 2013)。直接采水样法则不对水样进行过滤, 而是直接对水样进行保存而实现对 eDNA 的收集 (Thomsen *et al.*, 2012b)。其中, 过滤法根据过滤地点的不同可分为 3 种: 在线过滤, 指在收集水样时直接对其进行线上过滤, 如利用蠕动泵抽取水样时, 将过滤设备连接在管线中, 记录水样体积后, 只需将滤膜保存带回即可; 采样后过滤, 指先利用蠕动泵、采样器等采样工具进行水样收集, 再单独进行过滤, 2 步分开进行, 但都在野外; 水样采集-保存-实验室过滤则是完成水样收集后, 采取适当的措施将水样保存, 带回实验室后再进行过滤, 研究表明在线过滤法的检测效果最好 (Pilliod *et al.*, 2013)。滤膜的选用主要包括孔径和材质两方面, 已用过的滤膜有硝酸纤维素滤膜、玻璃纤维滤膜、聚碳酸酯滤膜、尼龙膜等, 孔径由 0.22 ~ 1.5 μm 不等。以鲤科鱼类为例, 研究表明, 有效 eDNA 片段富集区域为 1 ~ 10 μm (Turner *et al.*, 2014), 笔者推荐选取孔径小于 1 μm 的滤膜。已有研究发现, 不同种类的滤膜 DNA 的回收率不同, 其中以混合纤维素滤膜最佳 (Liang *et al.*, 2013), 但实际应用中还没有研究者使用。

不同采样量所对应结果的准确度与水体中目标物种的密度有关。已有研究中, 每个水样的采样量从 15 mL 到 10 L 不等, 其中采用最多的采样量为 1 ~ 2 L (Rees *et al.*, 2014)。实验室条件下, 以非洲宝石鱼 (*Hemichromis letourneuxi*) 为例, 鱼的密度每

增加 2.53 条 $\cdot \text{m}^{-3}$, 每 1 L 水样的检测成功率将增加 4.86 倍 (Moyer *et al.*, 2014)。所以在目标物种密度较低时, 研究者有必要通过增加采样次数保证 eDNA 的检测准确度, 但具体的次数需要根据不同的水体、不同目标物种、不同环境条件而定, 具体次数有待研究。

在同一水体的不同深度进行采样会导致实验结果的变化。Moyer 等 (2014) 在 1.4 m 深的试验用池塘中的表面、中部、底部分别进行采样, 发现表面和底部的检测成功率较高, 但在低生物密度的情况下也均不具备 100% 成功率。实际应用中, 研究者们为增加该方法的准确度, 通常综合不同位点的实验结果进行最后的分析判断 (Takahara *et al.*, 2012; Goldberg *et al.*, 2013)。但是目前仍没有研究者评估野外条件下, 不同深度采样点的设置对采样结果造成的影响。

野外采样建议冷藏运输。在提取 eDNA 前, 需要对样品进行妥善保存。水样的保存多为加 3 mol $\cdot \text{L}^{-1}$ 乙酸及 100% 的乙醇; 过滤法则是将所得滤膜直接存储在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Rees *et al.*, 2014)。

eDNA 的提取主要借助于各商业公司的 DNA 提取试剂盒, 目前被使用的试剂盒有: DNEasy 提取试剂盒 (Qiagen, Inc., Valencia, California, USA) (Dejean *et al.*, 2012)、QIAamp 微生物 DNA 提取试剂盒 (Qiagen, Inc., Valencia, California, USA) (Piaggio *et al.*, 2013)、MoBio 水样 DNA 强力提取试剂盒 (MoBio Laboratories, Inc., Carlsbad, California, USA) (Olson *et al.*, 2012); 基因组 DNA 快速提取试剂盒 (Zymo Research Corporation, Irvine, California, USA) (Collins

et al., 2013)。

尽管目前 eDNA 技术已被用于多种水体中多种生物的检测,但仍没有一套成熟的研究方法。不同研究所使用的方法也不尽相同,使得各研究成果之间不具有可比性。因此有待对不同方法进行全面综合的比较,建立完善的 eDNA 技术。

2.2 eDNA 的分析

该阶段的目的是获取水样中 eDNA 的组成状况。首先需要针对调查对象选取 DNA 识别片段,设计引物。为保证实验结果能够准确地反映水体中目标物种的存在状况,所选取的识别片段必须足够区分不同的物种,又不至于误将同一物种误判为多种,尤其是生活在同一地区且亲缘关系较近的物种。好的识别片段应同时拥有好的种间差异性和种内同一性。另一方面,为保证能够获得足够的 DNA 进行分析,应选取在细胞中本身含量较多的 DNA 序列。从这两方面考虑,细胞器 DNA 具有明显的优势。核 DNA 不仅数量少,且因其进化速度快,同一物种内个体间差异均十分显著。相比之下,对动物而言,每个细胞中线粒体 DNA 远多于核 DNA,且含有较多的可用于区分物种的保守序列。对植物而言,叶绿体 DNA 亦是如此。因此常选用细胞色素 b (Cytochrome b) 基因及细胞色素 c 氧化酶 I 基因 (COI 基因) 的片段作为动物的识别片段,选用 *rbcL* 基因与 *matK* 基因的片段作为植物的识别片段。由于水体中 DNA 片段易被降解,一般选用较短的片段,多低于 100 bp。

调查目的不同,引物设计策略也不相同。若目标物种只有 1 种,则只需针对该物种设计特异性高的引物。引物对目标物种的特异性越强,则在 PCR 时非目标物种的竞争性越小。引物的特异性主要与引物与非目标物种的不匹配程度有关,不匹配碱基数越多,特异性越强,假阳性结果和假阴性结果都会降低 (Wilcox *et al.*, 2013)。设计引物时应尽量保证引物与目标物种亲缘关系较近的物种基因不匹配程度最大化。常用的引物设计工具有 Primer 3、Primer Express、Primer-BLAST 等。其中,Primer-BLAST 是一款优秀的在线特异性引物设计软件 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>)。它可以通过用户所提供的目标序列选取可以用于合成该序列的引物,也可以通过将设计引物序列与 GenBank 中储存的 DNA 序列进行比对,检查所设计引物可能合成的其他 DNA 序列及对应物种信息,检查其特异性 (Ye

et al., 2012)。in silicon PCR 也可以用于检测设计引物的特异性 (Yu *et al.*, 2011)。

若目标物种为某一类生物,如所有鱼类,则需要设计通用引物 (universal primers),该引物应能够扩增尽可能多物种的识别片段。ecoPrimers 通过建立目标基因库与非目标基因库,先选取可以尽可能多扩增目标基因库的引物,再检测这些引物对非目标基因库基因的扩增情况,若非目标基因库中可扩增序列超过设定值后将该引物剔除,获得具有足够通用性,又保有一定特异性的通用引物。该软件也是一款在线引物设计工具 (<http://www.grenoble.prabi.fr/trac/ecoPrimers>) (Riaz *et al.*, 2011)。

利用特异性引物进行 PCR,可以判断出样品中是否包含目标物种的 DNA 识别片段,再进行测序便可得到该片段的序列。或者利用定量 PCR 便可获得包含该序列的量。用通用引物进行二代测序 (Thomsen *et al.*, 2012a),可以通过一次实验得到多种物种 DNA 序列。

PCR 结果通过电泳进行检测,结果以阳性、阴性进行记录。阳性说明 eDNA 样品中包含目标物种的 DNA,代表取样水域中有该物种生存,阴性结果说明 eDNA 样品中不包含来自目标物种的 DNA,代表取样水域中没有目标物种生存。定量 PCR 则是当扩增量超过荧光阈值时,标记为阳性,否则为阴性。若加以测序,当扩增成功并且所得 DNA 片段的序列与目标物种匹配时,则标记为阳性,否则为阴性。

一般通过多次重复试验以确保实验的准确性,通常每个样品做 3~10 个平行样。认为多次重复样品中只要有一次是阳性结果,则最终结果标记为阳性,即只有所有样品为阴性时才标记为阴性 (Jerde *et al.*, 2013; Mahon *et al.*, 2013)。有些研究者为避免产生错误的结果,若一个样品对照试验的结果不一致,便增加重复试验予以确认 (Goldberg *et al.*, 2013)。

为避免出现错误的实验结果,严格地控制试验条件以避免交叉污染是非常重要的。可通过设置野外空白对照、运输储存空白对照、DNA 提取空白对照、PCR 空白对照等一系列空白对照检测实验过程的是否受到污染 (Jerde *et al.*, 2011; Olson *et al.*, 2012)。

2.3 结果分析

若电泳或 qPCR 的结果为阳性,则说明调查水

体中有特异性引物所对应的物种存在。测序后,用BLAST可将所得序列与GenBank所储存的序列进行比对,BLAST可依据与该序列的相似度给出一系列DNA序列以及它们的物种信息。可依此对物种“有无”的结果进行进一步的验证。若利用通用引物进行二代测序,可以得到一系列的序列,同样利用BLAST可以分析各个序列所代表的物种信息,进而得到水体中包含物种的信息。利用qPCR可以得到样品中识别片段的含量,可用于进一步分析调查水域中目标物种的生物量。

3 eDNA技术与传统水生生物检测方法对比

与传统方法相比,eDNA技术具有灵敏度高、省时省力、对调查对象无损伤、不要求调查者具有传统的生物识别及鉴定经验的优点。Dejean等(2012)利用eDNA技术与传统的“耳听眼观”方法同时调查天然水体中是否存在美国牛蛙(*Rana catesbeiana*),发现eDNA技术在所有传统方法曾观察到美国牛蛙存在的水体中检测成功率是100%,甚至在一些传统方法没有观察到美国牛蛙的地方也观察到其存在。在芝加哥一项入侵物种亚洲鲤鱼(*Hypophthalmichthys molitrix*, *H. nobilis*)存在情况的调查研究中,同一区域内,eDNA技术发现一个存在点每人仅耗费工时0.174 d,而利用电捕鱼则需耗费工时93 d,是eDNA技术的数百倍(Jerde et al., 2011)。这些优势在于检测数目较少、行为分散的物种时尤为明显。需要注意的是,并不是所有情况下eDNA技术都具有较高的灵敏度。一项海洋生物多样性检测研究中,传统的声学检测方法表现出较高的灵敏度(Foote et al., 2012)。传统的调查方法如电捕鱼、拖网等要求捕获水体中的生物,难免会对水体中的生物造成一定伤害;而eDNA技术只需采集水样并对其进行分析便可得到水域中的生物分布信息,不会对物种造成任何伤害。由于eDNA技术仅依靠分子生物学的方法便可完成生物调查,使调查人员不需拥有丰富的物种识别经验,一方面增强了调查结果的可靠性,另一方面使得生物调查的工作更容易进行。

虽然eDNA技术的灵敏度要高于传统的调查方法,但其检测结果的精确度不论从时间上还是空间上都较低。时间上,eDNA在释放到环境中后会持续存在一定的时间。在自然条件下,eDNA在生物源移除后可持续存在几小时到一个多月不等(Foote

et al., 2012; Takahara et al., 2012; Goldberg et al., 2013),意味着在水体中检测到目标物种的DNA只能说明在调查水体中存在该物种,或者该物种在一段时间内可能出现过。该持续时间与eDNA的释放速率及降解速率有关,受生物种类、BOD、溶解氧、叶绿素含量、光照强度等影响。实验室条件下,eDNA的持续时间随着生物量的增加而增加(Dejean et al., 2011),eDNA的降解速率随着BOD、叶绿素、eDNA总量的升高而降低(Barnes et al., 2014),强光照条件下eDNA持续时间要短于弱光照条件(Pilloid et al., 2014),温度、pH、溶解氧等的影响尚不明确。空间上,在流动水体中,生物释放的eDNA会随着水流迁移一段时间,且迁移距离与物种有关。相同试验条件下,长刺水蚤(*Daphnia longispina*)的迁移距离大于12.3 km,而白乳玉螺(*Unio tumidus*)的迁移距离则小于9.1 km(Deiner et al., 2014),表明在流动水体中,在某处检测出目标物种的eDNA,其存在范围可扩展至上游约10 km。传统的调查方法则可以准确地记录其存在时间及位置。

由此来看,eDNA技术无法完全替代传统的生物调查方法,但却可以作为一种重要的补充工具,用于快速调查目标物种的分布。

4 eDNA技术在水生生态系统保护中的应用

4.1 检测目标物种的有无

通过判断水体中是否有目标物种释放的DNA可以判断水体中是否有该物种的存在。eDNA技术在此方面已有较多的应用,如入侵物种、濒危物种及其他稀有物种的检测。

生物入侵是造成生物多样性丧失、生态系统退化、生态系统功能损伤等全球问题的重要原因之一,早期发现和快速采取措施是应对生物入侵的关键环节(Pysek et al., 2010)。但早期入侵阶段,生物量较小,用传统的生物检测方法不仅工作量大,且易低估入侵程度。eDNA技术则可在生物量较低时便可检测到目标物种的存在,对物种入侵的早期检测意义重大,同时也可用于入侵物种去除效果的监测。eDNA技术已被用于检测美国牛蛙(Ficetola et al., 2008)、缅甸蟒蛇(*Python bivittatus*) (Piaggio et al., 2013)、亚洲鲤鱼(Jerde et al., 2011) (Mahon et al., 2013)、大鳍鳞鳃太阳鱼(*Cyprinus carpio*) (Takahara et al., 2012)、泥螺(*Potamopyrgus antipodarum*) (Goldberg et al., 2013)等物种的入侵。其中应用最

为成熟的是利用 eDNA 技术检测亚洲鲤鱼在北美五大湖的入侵情况,已用于指导亚洲鲤鱼的去除工作(Jerde *et al.*, 2013)。

淡水及海洋生态系统中已有上千种生物濒临灭绝(IUCN, 2014),有效地保护这些物种需要其分布的详细资料。当物种在某一栖息地数量较少时,传统的物理检测方法很难检测到,易导致因缺乏保护措施而造成物种灭绝的悲剧。另一方面,网捕、电捕鱼等传统生物调查方法易造成生物损伤。eDNA 技术灵敏度高、省时省力、对调查生物无损伤等优点使其非常适合用于检测水体中的濒危物种(Thomsen *et al.*, 2012b)。eDNA 技术可灵敏地检测哺乳动物(Foote *et al.*, 2012)、两栖动物(Pilliod *et al.*, 2014)、鱼类(Minamoto *et al.*, 2012)、爬行动物(Piaggio *et al.*, 2013)、节肢动物(Thomsen *et al.*, 2012b)、腹足动物(Golderberg *et al.*, 2013)等多种生物是否存在于水体中,表明其在濒危物种分布调查方面具有极大的应用潜力。

4.2 生物量的估测

研究表明,水体中 eDNA 的量与生物量存在正相关,研究者们依此检测水体中生物的种群密度(Goldberg *et al.*, 2011; Takahara *et al.*, 2012; Kelly *et al.*, 2014b)。Takahara 等(2012)利用 eDNA 技术对日本 Iba-naiko 湖中的鲤鱼进行生物量的评估。首先在实验室条件和半野外条件的池塘里模拟野外环境,研究 eDNA 和鲤鱼数量的相关关系,发现 eDNA 浓度与鱼的数量呈正相关,并建立线性方程。然后,在 Iba-naiko 湖中取样,用样品的 eDNA 的量估测鲤鱼在湖中的数量以及分布。但实验室条件与野外条件不论在温度变化、pH、湍流度、光照、微生物种类等方面均有差别,而这些都是影响 eDNA 产生速度与降解速度的重要因素,因此实验室条件下所得线性方程在野外条件下适用性有待进一步研究,测试结果的准确性也有待考证。

为了提高利用 eDNA 估测水生生物生物量的准确度,必须在量的程度上阐明温度、pH、光照等环境条件对 eDNA 的释放速率及降解因素的影响,并确保最后测得的目标物种的 DNA 量可以如实反映其在自然环境中的量;做到有效规避动物尸体、捕食者粪便等物释放出目标物种 DNA 而带来的误检。

尽管利用 eDNA 技术评估物种生物量的准确度以及在未来的适用性还有待进一步验证,但其研究方法能为未来在改进生物量评估手段上提供很好的

思路。

4.3 生物多样性评估

第二代测序工具的出现使得从一个 eDNA 样品中同时检测多种生物的 DNA 成为可能,已被用于水生生态系统生物多样性的检测。

二代测序采用“边合成边测序”的策略,通过捕捉 DNA 链延伸过程中末端合成所激发的荧光,将其转化为一个测序峰值获得互补链序列信息。使用芯片进行测序,可以同时对数百万个 DNA 链进行测序,实现大规模平行测序。样品中某种 DNA 被测序的次数可以反映该序列在样品中的丰度,因此该技术亦具有定量功能(王兴春等, 2012)。这些都对利用 eDNA 进行生物多样性调查至关重要。大规模的平行测序使得可以在单次反应中检测到多种生物的 DNA 序列,通过与 GenBank 中的基因序列对比而鉴定调查区域中生存的物种;而定量功能使我们可以通过分析某一物种 DNA 被测序的次数间接地分析该物种在采样水域的相对丰度。但目前二代测序仅被用于物种种类检测,还未被用于定量研究。

Thomsen 等(2012a)从海水中取样,利用第二代测序工具成功检测出 9 个目的 15 种鱼类以及 4 种鸟类,其中一些鱼类从未被传统的调查方法检出。研究者同时利用鱼笼、垂钓、拖网、多面刺网、潜水等 9 种传统方法进行调查,发现 eDNA 方法能够检测出的生物种类多于其中任何一种传统方法。Kelly 等(2014b)利用一段 106 bp 的 12S 核糖体 DNA 作为标记片段,成功检测到海洋中的硬骨鱼类,但没有检测到已知存在的软骨鱼类及海龟。

这种方法极大地简化了水生生态系统的生物多样性调查工作,可以快速检测出系统中的物种组成及变化,因此也可用于评价目标生态系统的健康状况。

5 总结及展望

eDNA 技术通过检测生物向环境中释放的 DNA 而对环境中生物的存在状况进行分析,该方法起源于微生物领域的研究,2008 年后才被用于水生生态系统中生物的实时监测。eDNA 技术包括 eDNA 获取、eDNA 分析、结果分析 3 部分。与传统的生物调查方法相比,eDNA 技术提高了生物调查的灵敏度,降低了生物调查造成的生物损伤,使生物调查不再受调查人员生物识别及鉴定水平的限制,但时间及空间精确度均较低。eDNA 技术已被用于检测入侵

物种、濒危物种,且被用于指导入侵物种的去除。另外,eDNA技术也可用于生物量的估测、水体生物多样性的调查等。作为一项新技术,还有许多工作需要完成:

(1)eDNA获取及分析方法的标准化及优化。目前研究者们使用的eDNA获取方法及分析方法各不相同,使得不同研究结果及调查结果之间缺乏可对比性。需要对比不同方法,从中选优并建立相应的标准。优化方向主要有:有效地规避样品间交叉污染,尽可能完整地获取水样中的eDNA,使所取样品应尽可能全面、真实地反映物种在水体中的分布情况,进一步降低该方法的成本。相关滤膜材料的更新、制冷技术的发展、DNA提取方法的进步等都有可能推动采样方法的进一步优化。eDNA分析方法的优化则依赖于PCR技术、DNA测序技术的进一步发展。

(2)eDNA技术时间及空间精确度的准确评价。一种生物监测方法不仅需要能够检测出结果,还需要知道该结果的精确程度。目前的研究成果所体现的时间精确度与空间精确度随着研究物种、研究水体及研究环境条件的不同而变化,研究者们应用时应对该技术的精确程度予以关注,对其进行准确评价。

(3)eDNA产生和降解的动力学研究。eDNA的产生及降解情况共同决定了最终存在于环境中的eDNA的量。对eDNA产生及降解动力学变化的理解将有助于eDNA技术的优化及依据eDNA的存在情况对环境中的生物分布情况进行更加准确全面的分析。

(4)利用eDNA技术检测水生生物量的进一步探索。利用eDNA技术检测水生生物量的研究仍处于探索阶段。研究者们只初步证实环境中eDNA的量与生物量呈正相关,但并未建立相关性很好的线性方程,这可能与eDNA的产生及降解动力学的认识不足有关。自然环境的多变使得实验室中很难进行完全模拟,增加了研究难度。如何准确地建立环境中eDNA的量与生物量之间的定量关系是该方面应用的一大难题。

(5)应用的进一步推广。eDNA技术在检测物种有无、生物量及生态系统中物种组成等方面的应用表明,其可以用于检测生态系统结构、物种变化等,可作为生态系统健康状态的评价手段,为生态系统保护政策、保护措施的制定、实施提供科学的依

据。另外,目前eDNA技术的应用仍集中在美国、法国、丹麦、瑞典等发达国家,但许多发展中国家却面临着更加严峻的生物多样性退化形势,作为一种省时省力低耗费的生物监测技术,eDNA亟待在世界范围内进行推广。

参考文献

- 王兴春,杨致荣,王敏,等. 2012. 高通量测序技术及其应用. *中国生物工程杂志*, **32**(1): 109-114.
- 岳巧云,邱德义,黄艺文,等. 2011. DNA条形码技术在未知昆虫幼虫种类鉴定中的应用. *中国卫生检验杂志*, **21**(3): 615-617.
- Barnes MA, Turner CR, Jerde CL, *et al.* 2014. Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environmental Science and Technology*, **48**: 1819-1827.
- Bohmann K, Evans A, Gilbert MTP, *et al.* 2014. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution*, **29**: 358-367.
- Campbell BJ, Polson SW, Allen LZ, *et al.* 2013. Diffuse flow environments within basalt- and sediment-based hydrothermal vent ecosystems harbor specialized microbial communities. *Frontiers in Microbiology*, **4**: 182.
- Collins RA, Armstrong KF, Holyoake AJ, *et al.* 2013. Something in the water: Biosecurity monitoring of ornamental fish imports using environmental DNA. *Biological Invasions*, **15**: 1209-1215.
- Deiner K, Altermatt F. 2014. Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. *PLoS ONE*, **9**: e88786.
- Dejean T, Valentini A, Duparc A, *et al.* 2011. Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. *PLoS ONE*, **6**: e23398.
- Dejean T, Valentini A, Miquel C, *et al.* 2012. Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: The example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*. *Journal of Applied Ecology*, **49**: 953-959.
- Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, *et al.* 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, **4**: 423-425.
- Foote AD, Thomsen PF, Sveegaard S, *et al.* 2012. Investigating the potential use of environmental DNA (eDNA) for genetic monitoring of marine mammals. *PLoS ONE*, **7**: e41781.
- Goldberg CS, Pilliod DS, Arkle RS, *et al.* 2011. Molecular detection of vertebrates in stream water: A demonstration using rocky mountain tailed frogs and Idaho giant salamanders. *PLoS ONE*, **6**: e22746.
- Goldberg CS, Sepulveda A, Ray A, *et al.* 2013. Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). *Freshwater Science*, **32**: 792-800.
- IUCN. 2014. The IUCN Red List of Threatened Species. Version

- 2014-2 <<http://www.iucnredlist.org>>. Downloaded on 19 December 2014.
- Jerde CL, Mahon AR, Chadderton WL, *et al.* 2011. "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters*, **4**: 150–157.
- Jerde CL, Chadderton WL, Mahon AR, *et al.* 2013. Detection of Asian carp DNA as part of a Great Lakes basin-wide surveillance program. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **70**: 522–526.
- Kelly RP, Port JA, Yamahara KM, *et al.* 2014a. Harnessing DNA to improve environmental management. *Science*, **344**: 1455–1456.
- Kelly RP, Port JA, Yamahara KM, *et al.* 2014b. Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm. *PLoS ONE*, **9**: e86175.
- Kim JH, Feng ZY, Bauer JD, *et al.* 2010. Cloning large natural product gene clusters from the environment: Piecing environmental DNA gene clusters back together with TAR. *Biopolymers*, **93**: 833–844.
- Liang ZB, Keeley A. 2013. Filtration recovery of extracellular DNA from environmental water samples. *Environmental Science & Technology*, **47**: 9324–9331.
- Lodge DM, Turner CR, Jerde CL, *et al.* 2012. Conservation in a cup of water: Estimating biodiversity and population abundance from environmental DNA. *Molecular Ecology*, **21**: 2555–2558.
- Mahon AR, Jerde CL, Galaska M, *et al.* 2013. Validation of eDNA surveillance sensitivity for detection of Asian carps in controlled and field experiments. *PLoS ONE*, **8**: e58316.
- Minamoto T, Yamanaka H, Takahara T, *et al.* 2012. Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology*, **13**: 193–197.
- Moyer GR, Díaz-Ferguson E, Hill JE, *et al.* 2014. Assessing environmental DNA detection in controlled lentic systems. *PLoS ONE*, **9**: e103767.
- Ogram A, Sayler G, Barkay T. 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods*, **7**: 57–66.
- Olson ZH, Briggler JT, Williams RN. 2012. An eDNA approach to detect eastern hellbenders (*Cryptobranchus a. alleganiensis*) using samples of water. *Wildlife Research*, **39**: 629–636.
- Piaggio AJ, Engeman RM, Hopken MW, *et al.* 2013. Detecting an elusive invasive species: A diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, **14**: 374–380.
- Pilliod DS, Goldberg CS, Arkle RS, *et al.* 2013. Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **70**: 1123–1130.
- Pilliod DS, Goldberg CS, Arkle RS, *et al.* 2014. Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources*, **14**: 109–116.
- Pysek P, Richardson DM. 2010. Invasive species, environmental change and management, and health. *Annual Review of Environmental and Resources*, **35**: 25–55.
- Riaz T, Shehzad W, Viari A, *et al.* 2011. ecoPrimers: Inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic Acids Research*, **39**: e145.
- Rees HC, Maddison BC, Middleditch DJ, *et al.* 2014. The detection of aquatic animal species using environmental DNA: A review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*, **51**: 1450–1459.
- Takahara T, Minamoto T, Yamanaka H, *et al.* 2012. Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLoS ONE*, **7**: e35868.
- Taberlet P, Coissac E, Hajibabaei M, *et al.* 2012. Environmental DNA. *Molecular Ecology*, **21**: 1789–1793.
- Thomsen P, Kielgast J, Iversen L, *et al.* 2012a. Detection of a diverse marine fauna using eDNA from seawater samples. *PLoS ONE*, **7**: e41732.
- Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, *et al.* 2012b. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, **21**: 2565–2573.
- Turner CR, Barnes MA, Xu CY, *et al.* 2014. Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods in Ecology and Evolution*, **5**: 676–684.
- Wilcox TM, McKelvey KS, Young MK, *et al.* 2013. Robust detection of rare species using environmental DNA: The importance of primer specificity. *PLoS ONE*, **8**: e59520.
- Willerslev E, Hansen AJ, Binladen J, *et al.* 2003. Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments. *Science*, **300**: 791–795.
- Ye J, Coulouris G, Zaretskaya I, *et al.* 2012. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, **13**: 134.
- Yin XP, Ma LF, Pei XL. 2015. Creation of functionally diverse chimerical alpha-glucosidase enzymes by swapping homologous gene fragments retrieved from soil DNA. *Indian Journal of Microbiology*, **55**: 114–117.
- Yu B, Zhang CB. 2011. In silico PCR analysis. *Methods in Molecular Biology*, **760**: 91–107.

作者简介 马鸿娟,女,1992年生,硕士研究生,主要从事分子生物学、保护生态学方面的研究。E-mail: tjmahongjuan@163.com

责任编辑 魏中青