

DOI: 10.12264/JFSC2023-0312

利用环境 DNA 技术探测南海西沙鲸类物种多样性

麦俊晓^{1,2}, 张帅², 郑若丹^{2,3}, 王腾², 赖晓芳¹, 蒋佩文², 王文欣^{2,3}, 陈作志², 李敏²

1. 江苏海洋大学海洋科学与水产学院, 江苏 连云港 222005;
2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 农业农村部外海渔业可持续利用重点实验室, 广东省渔业生态环境重点实验室, 广东 广州 510300;
3. 上海海洋大学海洋科学学院, 上海 200020

摘要: 本研究通过提取南海西沙海域水体样本的环境 DNA, 利用鲸类线粒体 12S rRNA 和 16S rRNA 通用引物进行扩增和高通量测序, 并结合目视观测的结果探讨环境 DNA 技术在鲸类物种多样性研究中的应用前景。结果显示, 4 种通用引物在鲸类鉴定方面具有一定的有效性, 利用 4 种通用引物在西沙海域 19 个站点的样品中检测到 5 种鲸类, 分别为热带斑海豚(*Stenella attenuata*)、长吻飞旋海豚(*Stenella longirostris*)、弗氏海豚(*Lagenodelphis hosei*)、小布氏鲸(*Balaenoptera edeni edeni*)和短鳍领航鲸(*Globicephala macrorhynchus*), 采样过程中观测到的 3 种鲸类分别为: 热带斑海豚、长吻飞旋海豚和瑞氏海豚(*Grampus griseus*)。两种方法检获的优势物种一致, 利用环境 DNA 技术检测到了未被观测到的物种。结合引物 Cet-12S 和 Marver3 的检测结果可以涵盖所有站点($n=17$)和所有鲸类物种($n=5$), 表明针对不同基因片段的引物结合使用有利于检测效果的提高。对于检出的鲸类序列和物种数, 4 种引物之间不存在显著差异, 其中 Cet-12S 检出的鲸类序列数和物种数占比最高, 分别为 33.0%和 21.1%, 而其他引物检出的鲸类序列数和物种数占比仅为 0.2%~0.6%和 2.0%~4.1%。此外, Cet-12S 非特异扩增的序列数和物种数显著低于其他 3 种引物, 是特异性较高的鲸类环境 DNA 通用引物。相较目视观测, 环境 DNA 技术具有灵敏度高、效率高且成本低等优势, 适用于鲸类的物种多样性研究。本研究丰富了西沙海域的鲸类物种多样性信息, 为鲸类保护和研究提供了技术参考。

关键词: 环境 DNA; 通用引物; 鲸类; 物种多样性; 西沙; 南海

中图分类号: S931

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2023)12-1566-11

海洋作为地球上生物多样性最丰富的生态系统, 在地球碳循环、水循环和气候调节方面发挥着重要作用^[1-2]。然而随着气候变化、人类涉海活动的增加, 海洋生物面临多重威胁, 如环境污染、栖息地衰退、人类活动干扰等, 海洋生物多样性衰退严重^[3-4]。在海洋生态和生物多样性保护中, 鲸类(cetacean)物种多样性保护被视为一项重要任务。鲸类对海洋生态系统的能量流动、营养循

环以及碳循环产生着深远影响^[5-7], 同时被认为是海洋生态环境的指示性物种和旗舰物种, 然而由于鲸类数量稀少、繁殖率低、生长周期长, 其物种多样性一经破坏往往难以恢复。因此监测鲸类物种多样性不仅对鲸类的生存和繁衍至关重要, 对整个海洋生态系统的稳定和可持续性也具有重要意义。

传统的鲸类调查监测方法有搁浅记录调查^[8-9]

收稿日期: 2023-11-20; 修订日期: 2023-12-12.

基金项目: 农业农村部渔业发展补助资金项目(珍贵濒危水生野生动物栖息地调查); 中国海油海洋环境与生态保护公益基金会海洋环保项目(CF-MEEC/TR/2023-15); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2021SD18).

作者简介: 麦俊晓(1999-), 男, 硕士研究生, 研究方向为鲸豚多样性. E-mail: 1070310021@qq.com

通信作者: 李敏, 副研究员, 研究方向为海洋生物多样性及珍稀濒危动物保护. E-mail: limin@scsfri.ac.cn

以及船基调查^[10-12]。基于搁浅记录的调查往往依靠管理部门和公众报告, 搁浅信息来源不稳定, 且数据积累周期长, 时间成本高; 而船基调查虽然在近岸鲸类物种的种群生态研究上是一种公认的有效的方法, 但该方法在外海和远洋鲸类动物多样性调查中局限性较大, 如受调查人员经验、远洋多变天气的影响很大、调查成本高, 再者部分物种活动能力强且具有深潜习惯^[11], 利用传统方法难以对鲸类进行全面而高效的监测, 因此亟需构建更为高效、经济且可持续的监测方法。

近年来, 环境 DNA (environment DNA, eDNA) 技术在物种多样性研究方面的应用引起了广泛关注, 为鲸类监测提供了新的可能性。环境 DNA 是指从存在于环境中的 DNA 分子, 来源包括动物的皮肤、黏液、唾液、精子、分泌物、卵、粪便、尿液、血液等^[13], 可用于物种特异性检测^[14-17]和非特异性检测^[18-21], 已经成为物种多样性研究中的重要手段。目前, 国内外已经开展了关于小布氏鲸^[22]、长江江豚 (*Neophocaena asiaorientalis*)^[23]、虎鲸 (*Orcinus orca*)^[24] 和港湾鼠海豚 (*Phocoena phocoena*)^[25] 等鲸类的环境 DNA 研究, 但总体来看, 该技术在鲸类研究中仍处于起步阶段。中国海域的鲸类物种多样性丰富, 栖息着约 35 种鲸类^[9,11], 但国内基于环境 DNA 技术的鲸类物种多样性研究报道较少。本研究旨在验证鲸类环境 DNA 通用引物的有效性, 并以西沙海域水样为例进行研究, 了解鲸类物种组成信息, 为鲸类物种多样性监测新方法的构建提供可靠的技术支持以及为鲸类研究提供物种多样性信息和分布基线信息。

1 材料与方法

1.1 样品采集和目视观测

为了筛选出可用于鲸类环境 DNA 检测的通用引物, 首先用多种鲸类肌肉提取的基因组 DNA 作为模板进行引物有效性验证。提取 DNA 所用的 5 份肌肉样本取自实验室保存的鲸类肌肉样本, 包括印太江豚 (*Neophocaena phocaenoides*)、中华白海豚 (*Sousa chinensis*)、伪虎鲸 (*Pseudorca crassidens*)、热带斑海豚 (*Stenella attenuata*) 和长吻

飞旋海豚 (*Stenella longirostris*)。

环境 DNA 样品采自 2022 年 6 月, 采样区域为西沙群岛的中南部海域 (图 1), 共设置了 19 个采样点。结合鲸类物种需在水面换气的习性和样品采集的简便性, 设置水体采样深度为水下 1 m (表层), 采样工具为采水器和水桶, 采集前需用当前站位的海水冲洗, 为尽可能多地获得鲸类的 DNA, 每个站点采集 2 次, 每次采集 5 L, 然后置于采样桶中等待过滤, 过滤前使用当前站位的海水冲洗过滤装置, 抽滤泵型号为津腾 GM-0.5A, 抽气速度为 30 L/min, 电机功率为 160 W。滤膜选取直径为 47 mm、孔径为 0.45 μm 的硝酸纤维滤膜 (Whatman, 德国), 每张滤膜过滤 1 L 水样, 每份水样过滤 4 张滤膜作为平行样品, 抽滤完毕将滤膜装入 2 mL 无菌冻存管中并置于液氮中保存。

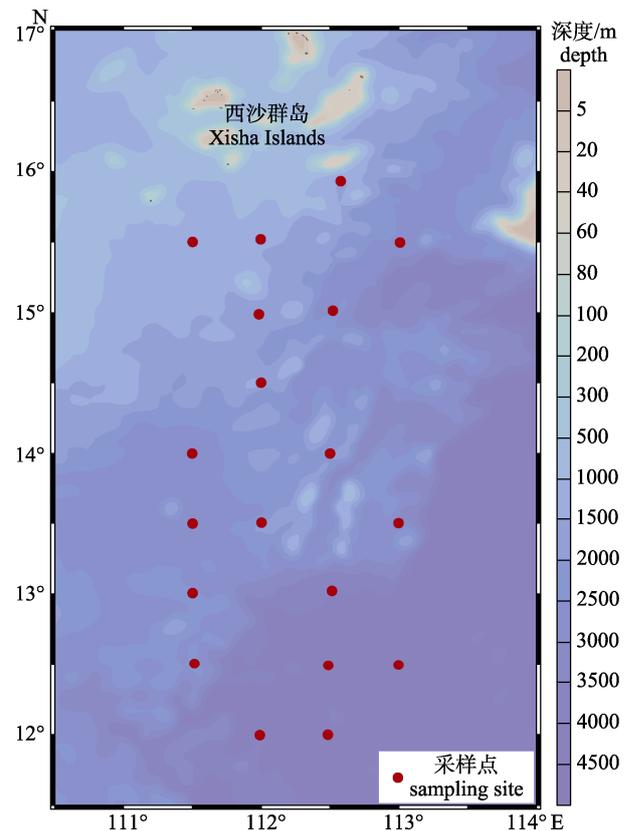


图 1 鲸类环境 DNA 样品采集位点

Fig. 1 Collection sites for cetacean eDNA samples

在水样采集过程中, 由专门的观察员负责观测并记录鲸类的出现次数, 观测要素为视野内鲸类种类、群体数量, 并使用数码相机尽可能多地

拍摄鲸类照片,观测完毕后利用照片对鲸类种类进行形态学鉴定,鉴定标准参考王丕烈^[26],每个采样点观察时间为 1 h。

1.2 引物验证

本研究所用的 4 对引物中,引物 Marver1 和 Marver3 是 Valsecchi 等^[27]发布的 2 对哺乳动物通用引物,而 Cet-12S 和 Cet-16S 是基于南海鲸类线粒体序列,针对 12S rRNA 序列和 16S rRNA 序列

设计的引物(表 1)。使用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(天根,北京)对鲸类肌肉进行 DNA 提取,提取步骤遵循试剂盒说明书进行,将 5 种肌肉 DNA 各取 25 μ L 混合后作为混合肌肉 DNA 样品,剩余每种 DNA 各平均分成 3 份作为平行样品并置于-20 $^{\circ}$ C 冰箱冷冻保存。实验过程中所用的实验仪器、循环使用的耗材在实验结束后均使用紫外线和高压灭菌锅进行灭菌。

表 1 本研究所用的引物
Tab. 1 Primers used in this study

引物 primer	目标片段 target fragment	扩增长度/bp amplification length	序列 sequence
Cet-12S	线粒体 12S rRNA mitochondrial 12S rRNA	196	F: 5'-CCAGCCACCGCGGTCATACGAT-3' R: 5'-GGGTATCTAATCCCAGTTTG-3'
Marver1	线粒体 12S rRNA mitochondrial 12S rRNA	202	F: 5'-CGTGCCAGCCACCGCG-3' R: 5'-GGGTATCTAATCCYAGTTTG-3'
Cet-16S	线粒体 16S rRNA mitochondrial 16S rRNA	227	F: 5'-AAGACGAGAAGACCCTATGGAGCTT-3' R: 5'-GCTGTTATCCCTAGGGTAACTT-3'
Marver3	线粒体 16S rRNA mitochondrial 16S rRNA	245	F: 5'-AGACGAGAAGACCCTRTG-3' R: 5'-GGATTGCGCTGTTATCCC-3'

PCR 反应体系总体积为 50 μ L: 2 \times Pro Taq Master Mix (dye plus), 25 μ L; 正向、反向引物各 2 μ L; ddH₂O, 16 μ L; DNA 模板, 5 μ L。引物 Cet-12S、Marver1 和 Marver3 所用的降落 PCR 程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s, 18 个循环; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s, 10 个循环; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s, 10 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。引物 Cet-16S 所用的降落 PCR 程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 61 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s, 18 个循环; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s, 10 个循环; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 59 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 s, 10 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

利用 4 对引物与 5 种肌肉 DNA 分别进行 PCR 扩增并进行一代测序,验证引物在单物种中的检测效果;利用 4 对引物分别与混合肌肉 DNA 样品进行 PCR 扩增并进行高通量测序,验证引物在混合 DNA 中的检测效果。实验过程中均添加阴性对照,并使用 2% TBE 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检验,选取条带清晰的 PCR 产物进行测序,其中高通量测序所用的引物需在 5'端添加长度为

12 个碱基的 barcode 序列。

1.3 环境 DNA 检测

每个站点取 3 张滤膜作为平行样品,环境 DNA 的提取流程、所用引物、扩增体系及程序与肌肉样品保持一致,选取电泳条带清晰的 PCR 产物混合后进行高通量测序。为防止交叉污染,环境样品和肌肉样品的实验均在不同的实验室进行。

1.4 生物信息学分析

利用 DNASTar 软件包中的 SeqMan 软件^[28]对一代测序所得的序列进行人工校对和拼接,然后在 NCBI 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)进行序列比对,确定序列归属。

对于高通量测序数据,首先利用 Fastp 软件^[29] (<https://github.com/OpenGene/fastp>)进行滑窗质量剪裁,然后利用 Cutadapt 软件^[30] (<https://github.com/marcelm/cutadapt/>)和 Usearch 软件^[31] (<http://www.drive5.com/usearch/>)进行引物序列去除和序列过滤,最后使用 DADA2 (<https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial.html>)^[32]去噪并生成 ASV。

在确定物种序列相似度方面,环境 DNA 研究中通常保留相似度大于等于 95%~99%的序列^[33-36],

由于鲸类物种之间的线粒体序列变异度小, 因此本研究保留相似度大于等于 99% 的序列。此外, 剔除序列数据中陆生动物、微生物以及未知序列, 仅保留海洋动物的序列。

1.5 统计学分析

利用 Excel 对测序结果的序列数和物种数进行统计, 利用 Mann-Whitney U 检验对鲸类与其他海洋动物的序列数以及物种数进行差异性分析, 显著性水平设置为 $P < 0.05$ 。对于鲸类序列和目视观测结果, 将序列数和观测次数大于 50% 的物种定义为优势种。

2 结果与分析

2.1 引物验证结果

单物种肌肉 DNA 检测结果显示, 所有引物均可在物种水平上鉴定出长吻飞旋海豚、热带斑海豚以及伪虎鲸, 但无法区分印太江豚与长江江豚、中华白海豚与大西洋驼背豚(*Sousa teuszii*)。此外, 16S 引物无法在种的水平上区分中华白海豚和宽吻海豚(*Tursiops truncatus*) (表 2)。混合肌肉 DNA 检测结果显示, 使用 Cet-12S、Marver1、

Marver3 均可检测到 5 种鲸类, 而使用 Cet-16S 仅能检测到除中华白海豚外的其他 4 种, 所有序列相似度均在 99% 以上。综上, 4 对通用引物在鲸类鉴定方面具有一定的有效性, 可用于后续实验。

2.2 环境 DNA 检测结果

利用 4 种引物在 17 个采样站点共获得鲸类序列(reads) 5994 (0.6%) 条, 聚类后 ASV 数为 25 (2.9%) 条, 比对后共检测到鲸类 5 种(2.1%); 获得其他海洋动物 227 种(97.9%), 序列数为 1042312 (99.4%), ASV 数为 826 (97.1%)。其中 Cet-12S 和 Marver3 的检测结果涵盖了 5 种鲸类以及 17 个检出鲸类的站点(图 2)。鲸类包括 4 种齿鲸: 热带斑海豚、弗氏海豚(*Lagenodelphis hosei*)、长吻飞旋海豚、短鳍领航鲸(*Globicephala macrorhynchus*) 和 1 种须鲸: 小布氏鲸(*Balaenoptera edeni edeni*) (图 3)。使用 12S 引物检测到的其他海洋动物均为鱼类, 使用 16S 引物除鱼类外还检测到珊瑚、海胆、海星和水母的序列。与目视观察结果相比, 利用环境 DNA 未检测到瑞氏海豚(*Grampus griseus*) (图 4)。在环境 DNA 结果中, 优势种为热带斑海豚, 与目视观测结果相符(图 5)。

表 2 不同通用引物的物种鉴定结果

Tab. 2 Species identification results of different universal primers

引物名称 primer	DNA 模板 DNA template	比对结果 alignment result	序列相似度/% sort by percent identity
Cet-12S	印太江豚 <i>Neophocaena phocaenoides</i>	印太江豚/长江江豚 <i>Neophocaena phocaenoides/ Neophocaena asiaeorientalis</i>	99.49–100
	中华白海豚 <i>Sousa chinensis</i>	中华白海豚/大西洋驼背豚 <i>Sousa chinensis/ Sousa teuszii</i>	100
	长吻飞旋海豚 <i>Stenella longirostris</i>	长吻飞旋海豚 <i>Stenella longirostris</i>	100
	热带斑海豚 <i>Stenella attenuata</i>	热带斑海豚 <i>Stenella attenuata</i>	98.48–99.49
	伪虎鲸 <i>Pseudorca crassidens</i>	伪虎鲸 <i>Pseudorca crassidens</i>	98.49–98.98
	Marver1	印太江豚 <i>Neophocaena phocaenoides</i>	印太江豚/长江江豚 <i>Neophocaena phocaenoides/ Neophocaena asiaeorientalis</i>
中华白海豚 <i>Sousa chinensis</i>		中华白海豚/大西洋驼背豚 <i>Sousa chinensis/ Sousa teuszii</i>	99.50
长吻飞旋海豚 <i>Stenella longirostris</i>		长吻飞旋海豚 <i>Stenella longirostris</i>	99.50
热带斑海豚 <i>Stenella attenuata</i>		热带斑海豚 <i>Stenella attenuata</i>	98.52–99.02
伪虎鲸 <i>Pseudorca crassidens</i>		伪虎鲸 <i>Pseudorca crassidens</i>	98.53–99.50

(待续 to be continued)

(续表 2 Tab. 2 continued)

引物名称 primer	DNA 模板 DNA template	比对结果 alignment result	序列相似度/% sort by percent identity	
Cet-16S	印太江豚 <i>Neophocaena phocaenoides</i>	印太江豚/长江江豚 <i>Neophocaena phocaenoides/Neophocaena asiaeorientalis</i>	99.56–99.12	
	中华白海豚 <i>Sousa chinensis</i>	中华白海豚/宽吻海豚 <i>Sousa chinensis/Tursiops truncatus</i>	99.56–100	
	长吻飞旋海豚 <i>Stenella longirostris</i>	长吻飞旋海豚 <i>Stenella longirostris</i>	100	
	热带斑海豚 <i>Stenella attenuata</i>	热带斑海豚 <i>Stenella attenuata</i>	98.68–99.12	
	伪虎鲸 <i>Pseudorca crassidens</i>	伪虎鲸 <i>Pseudorca crassidens</i>	98.68–99.12	
	Marver3	印太江豚 <i>Neophocaena phocaenoides</i>	印太江豚/长江江豚 <i>Neophocaena phocaenoides/Neophocaena asiaeorientalis</i>	98.71–99.57
		中华白海豚 <i>Sousa chinensis</i>	中华白海豚/宽吻海豚 <i>Sousa chinensis/Tursiops truncatus</i>	99.14–99.57
长吻飞旋海豚 <i>Stenella attenuata</i>		长吻飞旋海豚 <i>Stenella attenuata</i>	99.14	
热带斑海豚 <i>Stenella attenuata</i>		热带斑海豚 <i>Stenella attenuata</i>	98.71–99.14	
伪虎鲸 <i>Pseudorca crassidens</i>		伪虎鲸 <i>Pseudorca crassidens</i>	98.92–99.47	

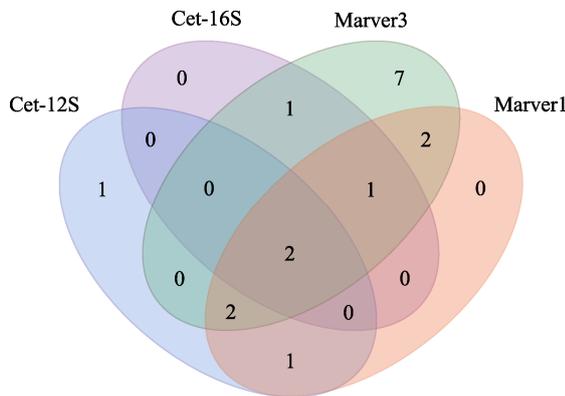


图 2 每种引物检出鲸类的站点数

Fig. 2 Quantity of sites that cetaceans were detected by each primer

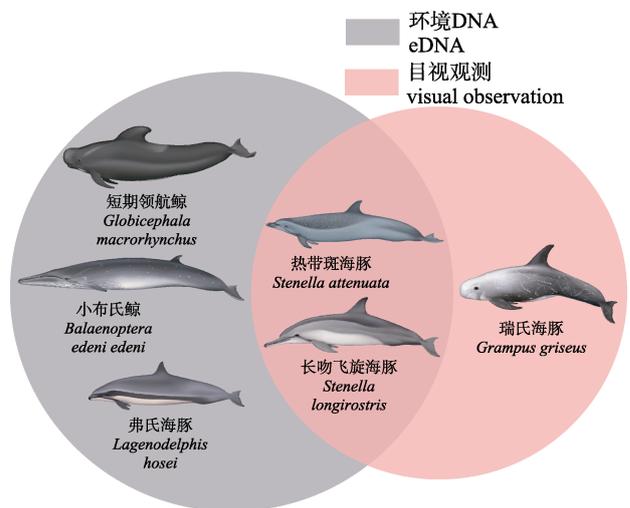


图 4 环境 DNA 与目视观察结果比较

Fig. 4 Comparison between environmental DNA and visual observation results

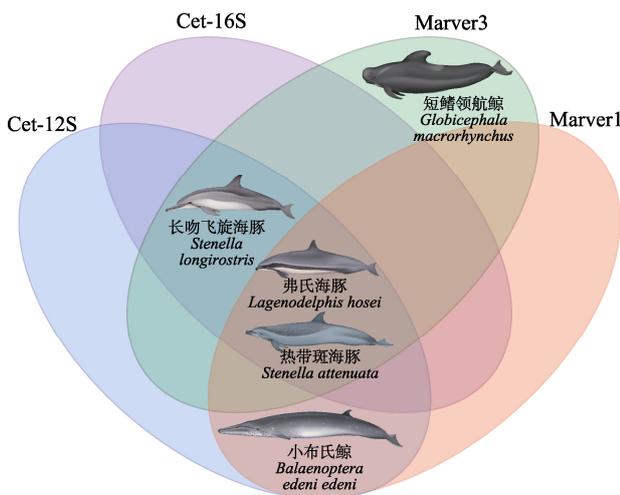


图 3 每种引物检出的鲸类

Fig. 3 Cetacean species detected by each primer

2.3 不同引物检测效果的比较

利用 4 种引物分别检测到鲸类 3~4 种, 序列 471~3787 条, 其他物种 15~146 种, 序列 2444~660653 条(表 3), 鲸类检出率为 21.1%~84.2%。Cet-12S 检测结果中鲸类序列数和物种数占比分别为 33.0%(图 6)和 21.1%(图 7), 该比例在其他引物的检测结果中为 0.2%~0.6%和 2.0%~4.1%。

为对比引物的检测效率, 利用 Mann-Whitney U 检验分析不同引物在每个站点检测到的鲸类序列数与物种数、其他海洋动物序列数与物种数之间的差异。在鲸类序列数和物种数方面, 不同引

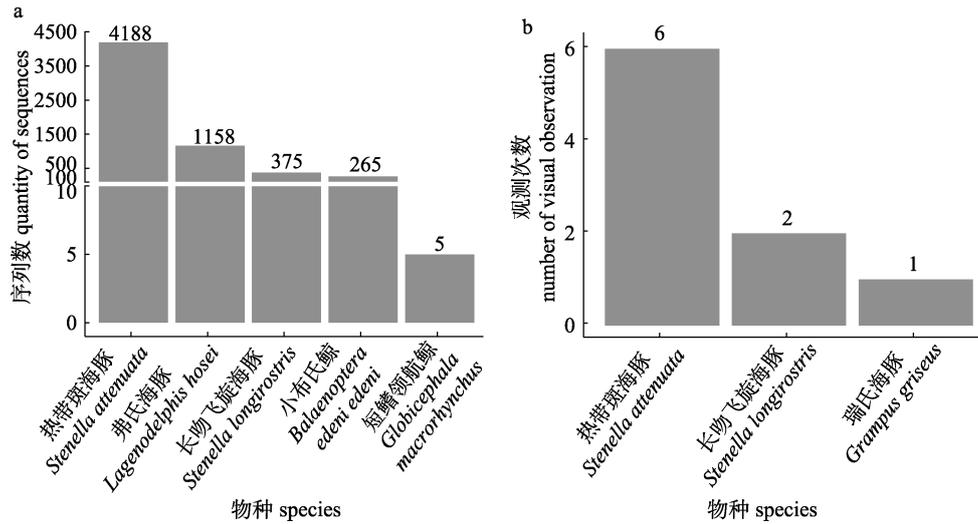


图 5 环境 DNA (a)和目视观测(b)结果中的优势种情况
 Fig. 5 Dominant species situation in eDNA (a) and visual observation (b) results

表 3 不同引物的检测结果
 Tab. 3 Detection results of different primers

引物名称 primer	鲸类物种数(序列数) quantity of cetacean species (sequences)	其他物种数(序列数) quantity of other marine animal species (sequences)	鲸类检出率(检出站点数) Cetacean detection rate (detected sites)
Cet-12S	4 (1204)	15 (2444)	47.4% (N=9)
Marver1	3 (3787)	146 (660653)	42.1% (N=8)
Cet-16S	3 (471)	70 (126508)	21.1% (N=4)
Marver3	4 (537)	111 (252707)	84.2% (N=16)

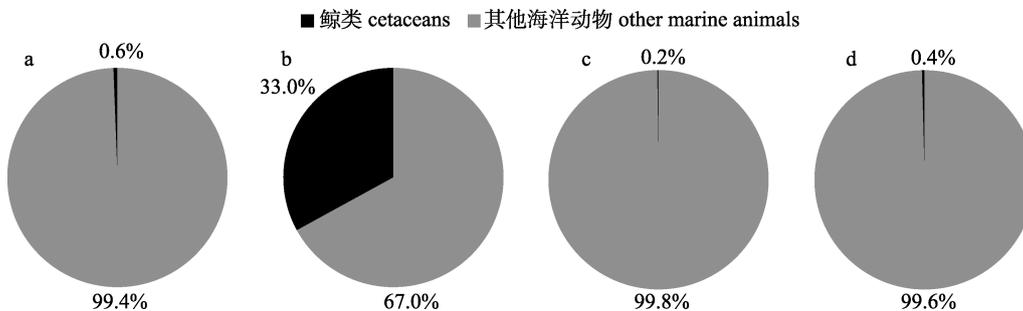


图 6 引物 Marver1 (a)、Cet-12S (b)、Marver3 (c)和 Cet-16S (d)检测结果中的序列组成
 Fig. 6 Sequence composition in the detection results of primers Marver1 (a), Cet-12S (b), Marver3 (c) and Cet-16S (d)

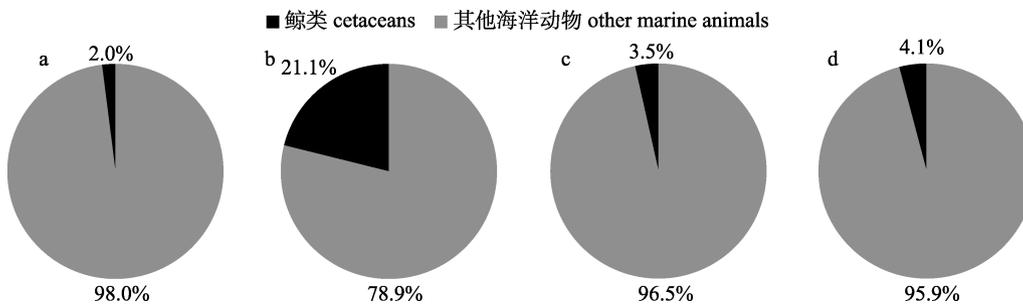


图 7 引物 Marver1 (a)、Cet-12S (b)、Marver3 (c)和引物 Cet-16S (d)检测结果中的物种组成
 Fig. 7 Species composition in the detection results of primers Marver1 (a), Cet-12S (b), Marver3 (c) and Cet-16S (d)

物的检测值之间并不存在显著差异($P>0.05$)(图 8)。在其他海洋动物序列数方面, 4 种引物的检测值之间均存在显著差异, 引物 Cet-12S 检测值最低(平均值=164), 引物 Marver1 最高(平均值=34771.2); 在其他海洋动物物种数方面, 引物 Cet-12S 检测值(平均值=2.4), 显著低于其他 3 种

引物, 引物 Marver3 最高(平均值=36)(图 9)。

3 讨论

本研究验证了 4 对鲸类通用引物鲸类检测中的有效性, 并对比了不同引物对检测结果的序列数和物种数。

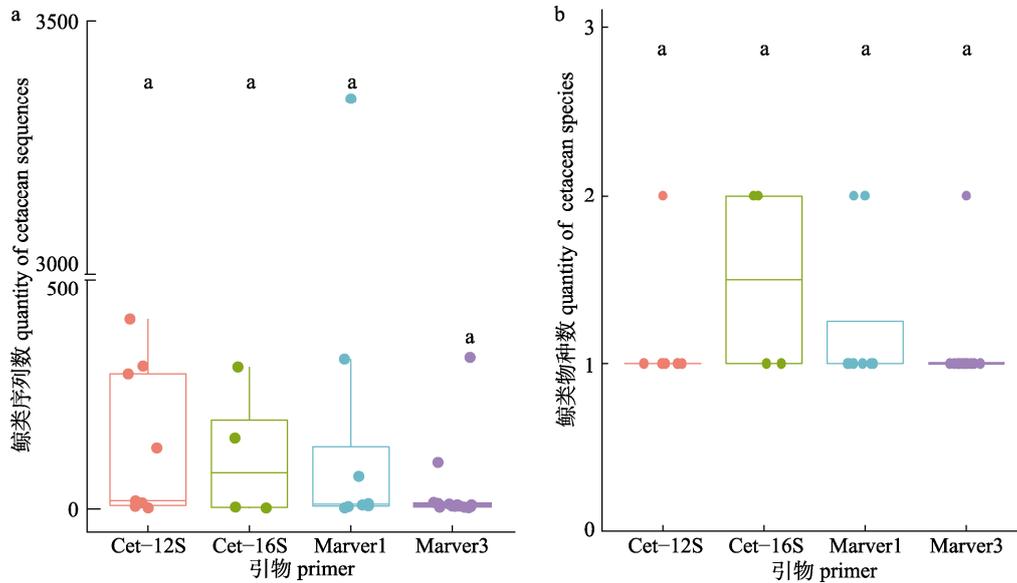


图 8 不同通用引物检测结果中鲸类序列数(a)和物种数(b)差异性分析
不同字母之间表示存在显著性差异($P<0.05$).

Fig. 8 Differential analysis of quantity of cetacean sequences (a) and species (b) in different universal primer detection results
Different letters indicate significant difference ($P<0.05$).

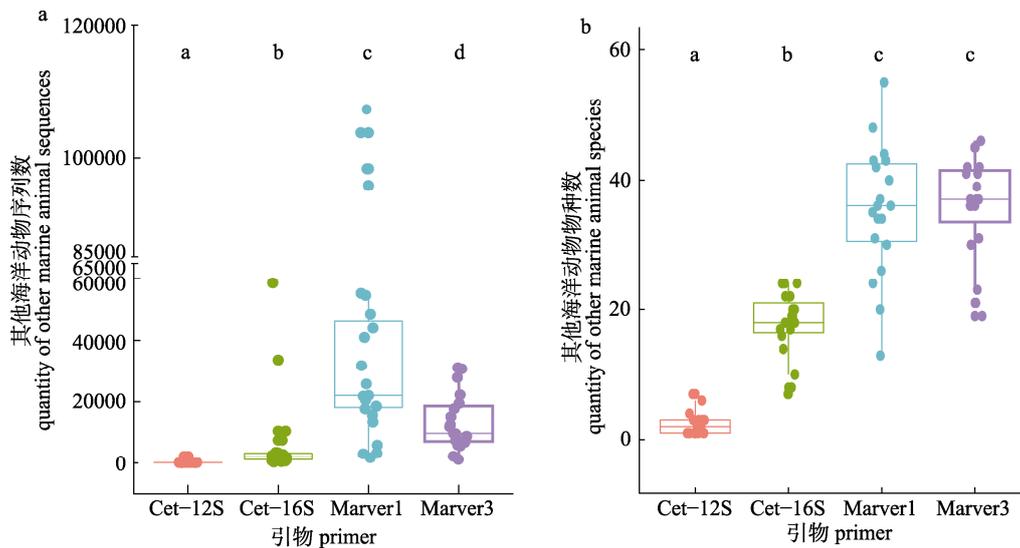


图 9 不同通用引物检测结果中其他海洋动物序列数(a)和物种数(b)差异性分析
不同字母之间表示存在显著性差异($P<0.05$).

Fig. 9 Differential analysis of quantity of other marine animals sequences (a) and species (b) in different universal primer detection results
Different letters indicate significant difference ($P<0.05$).

3.1 环境 DNA 技术是探测鲸类物种多样性的有效手段

本研究通过环境 DNA 技术在西沙群岛海域水样中成功检测出 5 种鲸类, 而通过目视仅观测到 3 种鲸类。环境 DNA 检测到 5 种鲸类中除被目视观测到的热带斑海豚、长吻飞旋海豚外, 还检测到了小布氏鲸、短鳍领航鲸、弗氏海豚, 部分鲸类只被环境 DNA 检测到, 可能是部分鲸类离船较远而未被观测到。同时环境 DNA 结果中序列数最高的鲸类, 与目视观测到的优势种一致, 这表明鲸类丰度与环境 DNA 序列数存在一定的相关性, 该结论与前人研究中 eDNA 读取数通常和生物量、丰度呈正相关的结论一致^[37]。因此, 环境 DNA 技术在鲸类物种多样性的调查和评估方面具有可行性。

在本研究检测到的热带斑海豚、短鳍领航鲸、弗氏海豚均在 Lin 等^[11]的南海北部船基目视调查中被观测到, 其中热带斑海豚观测次数和数量最多, 该种海豚常见于热带和亚热带海域^[26], 因此推断该物种可能是南海外海鲸类的优势物种。此外, 在环境 DNA 结果中, 小型齿鲸的序列数占绝大多数, 该结果与南海北部船基调查中观测到小型齿鲸的次数和数量比大型齿鲸数更多的结果一致。本研究与南海北部船基调查的鲸类物种差异较大, 推测可能是地理位置差异以及环境 DNA 采样范围较小导致的。

3.2 环境 DNA 技术的优势

环境 DNA 技术作为一种新兴的生物监测技术, 目前已在鲸类研究领域有所应用, 其优势在于, 只需提取分析水样中的 DNA 对鲸类进行鉴定, 不受自然环境条件和观察者主观因素的影响, 技术要求与目视观测及形态学鉴定相比较低^[38], 成本更低且效率更高。在远洋鲸类物种多样性的调查中, 可以依托商业渔船、轮渡以及其他科研船舶进行水样采集, 从而增加采样频率和扩大采样的时间及空间尺度, 以提供更全面、更丰富的鲸类信息^[39]。灵敏度高, 可检测到一些数量稀少的物种, 且不受目视距离限制, 这可以及时向管理者提供科学的数据, 从而为制定保护政策提供支持^[40]。通过无创方式获取生物分子信息, 相

对于依赖遗体获取稀有鲸类的分子信息, 来源更为稳定, 此外还可以降低对鲸类的干扰和潜在影响^[41]。有研究指出, 大翅鲸(*Megaptera novaeangliae*)的环境 DNA 在 15 min 后会下降至较低水平^[42], 说明鲸类环境 DNA 在海水中的存在具有一定的时效性, 因此利用这一特性可以更深入地了解鲸类的活动模式和时空分布。

3.3 环境 DNA 技术的局限性

尽管本研究所用的引物在鲸类检测中效果相近, 但 Cet-12S 所出现非特异性扩增极少, 这是其他 3 对引物所无法比拟的优势, 因此在仅选择一种基因标记的情况下, 使用 Cet-12S 进行环境 DNA 鲸类多样性研究效果最佳。实验结果表明, 没有任何一种引物的检测结果可以涵盖所有检出鲸类和站点, 这意味着使用单一的基因标记引物可能会降低鲸类检出率, 原因可能是受海水中理化因子的影响^[43-45], 环境 DNA 发生不同程度的降解, 导致不同物种以及不同基因片段的丰度存在差异, 因此在鲸类环境 DNA 研究中应充分考虑多种基因标记的综合应用, 如 COI^[23]、Cytb^[46]、D-loop^[24]等常用于开发鲸类 DNA 引物的基因, 以最大程度地确保检测结果的真实性和客观性。

本研究所用通用引物的目标片段较短, 且均位于线粒体编码区, 保守程度高, 对于隶属于江豚属(*Neophocaena* spp.)^[47]、驼海豚属(*Sousa* spp.)^[48]亲缘关系高、遗传差异小的亚种鉴定效果并不理想, 因此针对线粒体控制区基因的长片段开发高特异性引物是鉴定这些物种的有效方法。

3.4 环境 DNA 实验体系的优化

在环境 DNA 测序结果中, 非特异性扩增的序列数往往占绝对优势, 存在影响目标序列扩增的可能性^[49], 是制约环境 DNA 技术发展的一个重要因素, 针对这一问题, 使用阻断引物(blocking primer)可能是一种有效的方法。阻断引物是一种经过修饰的寡核苷酸, 在 PCR 扩增中可选择性地抑制某类 DNA 的扩增^[50], 从而提升通用引物的效率, 在一些研究中已有应用。例如, Vestheim 等^[50]的一项关于磷虾食性研究指出, 阻断引物能明显减少捕食者自身序列的丰度, 并增加了稀有猎物序列的丰度; Boessenkoo 等^[49]通过阻断引物减少

了环境 DNA 中人类序列的扩增,提高了远古哺乳动物的序列丰度。因此在后续研究中可以将阻断引物的使用纳入环境 DNA 技术优化的范畴。

参考文献:

- [1] Lotze H K. Marine biodiversity conservation[J]. *Current Biology*, 2021, 31(19): R1190-R1195.
- [2] Ward D, Melbourne-Thomas J, Pecl G T, et al. Safeguarding marine life: Conservation of biodiversity and ecosystems[J]. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 2022, 32(1): 65-100.
- [3] Lincoln S, Andrews B, Birchenough S N R, et al. Marine litter and climate change: Inextricably connected threats to the world's oceans[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 837: 155709.
- [4] Mazaris A D, Kallimanis A, Gissi E, et al. Threats to marine biodiversity in European protected areas[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 677: 418-426.
- [5] Kanaji Y, Okazaki M, Kishiro T, et al. Estimation of habitat suitability for the southern form of the short - finned pilot whale (*Globicephala macrorhynchus*) in the North Pacific[J]. *Fisheries Oceanography*, 2015, 24(1): 14-25.
- [6] Pershing A J, Christensen L B, Record N R, et al. The impact of whaling on the ocean carbon cycle: Why bigger was better[J]. *PLoS One*, 2010, 5(8): e12444.
- [7] Roman J, McCarthy J J. The whale pump: Marine mammals enhance primary productivity in a coastal basin[J]. *PLoS One*, 2010, 5(10): e13255.
- [8] Byrd B L, Hohn A A, Lovewell G N, et al. Strandings as indicators of marine mammal biodiversity and human interactions off the coast of North Carolina[J]. *Fishery Bulletin*, 2014, 112(1): 1-23.
- [9] Liu M M, Lin M L, Li S H. Species diversity and spatiotemporal patterns based on cetacean stranding records in China, 1950-2018[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 822: 153651.
- [10] Di Tullio J C, Gandra T B R, Zerbini A N, et al. Diversity and distribution patterns of cetaceans in the subtropical southwestern Atlantic outer continental shelf and slope[J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0155841.
- [11] Lin M L, Liu M M, Caruso F, et al. A pioneering survey of deep - diving and off - shore cetaceans in the northern South China Sea[J]. *Integrative Zoology*, 2021, 16(4): 440-450.
- [12] Sankalpa D M R, Thilakarathne E P D N, Lin W Z, et al. Cetacean occurrence and diversity in whale - watching waters off Mirissa, Southern Sri Lanka[J]. *Integrative Zoology*, 2021, 16(4): 462-476.
- [13] Bohmann K, Evans A, Gilbert M T P, et al. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2014, 29(6): 358-367.
- [14] Valsecchi E, Tavecchia G, Boldrocchi G, et al. Playing "hide and seek" with the Mediterranean monk seal: A citizen science dataset reveals its distribution from molecular traces (eDNA)[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): Article No.2610.
- [15] Coster S S, Dillon M N, Moore W, et al. The update and optimization of an eDNA assay to detect the invasive rusty crayfish (*Faxonius rusticus*)[J]. *PLoS One*, 2021, 16(10): e0259084.
- [16] Brys R, Halfmaerten D, Neyrinck S, et al. Reliable eDNA detection and quantification of the European weather loach (*Misgurnus fossilis*)[J]. *Journal of Fish Biology*, 2021, 98(2): 399-414.
- [17] Lam I P Y, Sung Y H, Fong J J. Using eDNA techniques to find the endangered big-headed turtle (*Platysternon megacephalum*)[J]. *PLoS One*, 2022, 17(2): e0262015.
- [18] 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[J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21(8): 1951-1965.
- [19] Cheng R L, Luo Y, Zhang Y F, et al. eDNA metabarcoding reveals differences in fish diversity and community structure in heterogeneous habitat areas shaped by cascade hydro-power[J]. *Ecology and Evolution*, 2023, 13(7): e10275.
- [20] Jia H, Wang Y B, Yoshizawa S, et al. Seasonal variation and assessment of fish resources in the Yangtze Estuary based on environmental DNA[J]. *Water*, 2020, 12(10): 2874.
- [21] Jiang P W, Zhang S, Xu S N, et al. Comparison of environmental DNA metabarcoding and bottom trawling for detecting seasonal fish communities and habitat preference in a highly disturbed estuary[J]. *Ecological Indicators*, 2023, 146: 109754.
- [22] Zhang S, Cao Y T, Chen B Y, et al. Assessing the potential use of environmental DNA for multifaceted genetic monitoring of cetaceans: Example of a wandering whale in a highly disturbed bay area[J]. *Ecological Indicators*, 2023, 148: 110125.
- [23] Tang Y K, Wu Y S, Liu K, et al. Investigating the distribution of the Yangtze finless porpoise in the Yangtze River using environmental DNA[J]. *PLoS One*, 2019, 14(8): e0221120.
- [24] Pinfield R, Dillane E, Runge A K W, et al. False - negative detections from environmental DNA collected in the presence of large numbers of killer whales (*Orcinus orca*)[J]. *Environmental DNA*, 2019, 1(4): 316-328.
- [25] Foote A D, Thomsen P F, Sveegaard S, et al. Investigating

- the potential use of environmental DNA (eDNA) for genetic monitoring of marine mammals[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e41781.
- [26] Wang P L. Chinese cetaceans[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2012: 1-393. [王丕烈. 中国鲸类[M]. 北京: 化学工业出版社, 2012: 1-393.]
- [27] Valsecchi E, Bylemans J, Goodman S J, et al. Novel universal primers for metabarcoding environmental DNA surveys of marine mammals and other marine vertebrates[J]. *Environmental DNA*, 2020, 2(4): 460-476.
- [28] Swindell S R, Plasterer T N. SEQMAN: Contig assembly[A]/Swindell S R. Sequence Data Analysis Guidebook[M]. Totowa: Humana Press, 1997: 75-89.
- [29] Chen S F, Zhou Y Q, Chen Y R, et al. Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor[J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(17): i884-i890.
- [30] Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads[J]. *EMBnet.journal*, 2011, 17(1): 10-12.
- [31] Edgar R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. *Bioinformatics*, 2010, 26(19): 2460-2461.
- [32] Callahan B J, McMurdie P J, Rosen M J, et al. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data[J]. *Nature Methods*, 2016, 13(7): 581-583.
- [33] Dai S Q, Bai M J, Jia H, et al. An assessment of seasonal differences in fish populations in Laizhou Bay using environmental DNA and conventional resource survey techniques[J]. *Fishes*, 2022, 7(5): 250.
- [34] Kumar G, Reaume A M, Farrell E, et al. Comparing eDNA metabarcoding primers for assessing fish communities in a biodiverse estuary[J]. *PLoS One*, 2022, 17(6): e0266720.
- [35] Dugal L, Thomas L, Meenakshisundaram A, et al. Distinct coral reef habitat communities characterized by environmental DNA metabarcoding[J]. *Coral Reefs*, 2023, 42(1): 17-30.
- [36] Xi R, Gao W R, Wang X, et al. Species diversity of coral reef fishes around the West Island of Sanya City, South China Sea, based on environmental DNA[J]. *Biodiversity Data Journal*, 2022, 10: e89685.
- [37] Rourke M L, Fowler A M, Hughes J M, et al. Environmental DNA (eDNA) as a tool for assessing fish biomass: A review of approaches and future considerations for resource surveys[J]. *Environmental DNA*, 2022, 4(1): 9-33.
- [38] Suarez-Bregua P, Álvarez-González M, Parsons K M, et al. Environmental DNA (eDNA) for monitoring marine mammals: Challenges and opportunities[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2022, 9: 987774.
- [39] Valsecchi E, Arcangeli A, Lombardi R, et al. Ferries and environmental DNA: Underway sampling from commercial vessels provides new opportunities for systematic genetic surveys of marine biodiversity[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2021, 8: 704786.
- [40] Juhel J B, Marques V, Fernández A P, et al. Detection of the elusive Dwarf sperm whale (*Kogia sima*) using environmental DNA at Malpelo Island (Eastern Pacific, Colombia)[J]. *Ecology and Evolution*, 2021, 11(7): 2956-2962.
- [41] Boldrocchi G, Conte L, Galli P, et al. Surface-sourced eDNA to track deep-diver cetaceans: The study case of Cuvier's beaked whale (*Ziphius cavirostris*) at Caprera Canyon and surrounding areas (Western Mediterranean Sea)[J]. *bioRxiv*, 2023, DOI: 10.1101/2023.11.07.565978.
- [42] Alter S E, King C D, Chou E, et al. Using environmental DNA to detect whales and dolphins in the New York Bight[J]. *Frontiers in Conservation Science*, 2022, 3: 820377.
- [43] Lamb P D, Fonseca V G, Maxwell D L, et al. Systematic review and meta-analysis: Water type and temperature affect environmental DNA decay[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2022, 22(7): 2494-2505.
- [44] McCartin L J, Vohsen S A, Ambrose S W, et al. Temperature controls eDNA persistence across physicochemical conditions in seawater[J]. *Environmental Science & Technology*, 2022, 56(12): 8629-8639.
- [45] Troth C R, Sweet M J, Nightingale J, et al. Seasonality, DNA degradation and spatial heterogeneity as drivers of eDNA detection dynamics[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 768: 144466.
- [46] Qu C J, Stewart K A. Evaluating monitoring options for conservation: Comparing traditional and environmental DNA tools for a critically endangered mammal[J]. *The Science of Nature*, 2019, 106(3-4): Article No.9.
- [47] Jefferson T A, Wang J Y. Revision of the taxonomy of finless porpoises (genus *Neophocaena*): The existence of two species[J]. *Journal of Marine Animals and Their Ecology*, 2011, 4(1): 3-16.
- [48] Frère C H, Hale P T, Porter L, et al. Phylogenetic analysis of mtDNA sequences suggests revision of humpback dolphin (*Sousa* spp.) taxonomy is needed[J]. *Marine and Freshwater Research*, 2008, 59(3): 259-268.
- [49] Boessenkool S, Epp L S, Haile J, et al. Blocking human contaminant DNA during PCR allows amplification of rare mammal species from sedimentary ancient DNA[J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21(8): 1806-1815.
- [50] 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[J]. *Frontiers in Zoology*, 2008, 5(1): Article No.12.

Preliminary investigation of cetacean species diversity in Xisha sea area of the South China Sea using environmental DNA technology

MAI Junxiao^{1,2}, ZHANG Shuai², ZHENG Ruodan^{2,3}, WANG Teng², LAI Xiaofang¹, JIANG Peiwen², WANG Wenxin^{2,3}, CHEN Zuozhi², LI Min²

1. College of Marine Sciences and Fisheries, Jiangsu Ocean University, Lianyungang 222005, China;
2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory for Sustainable Utilisation of Open-Sea Fishery, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Guangdong Provincial Key Laboratory of Fishery Ecology Environment, Guangzhou 510300, China;
3. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 200020, China

Abstract: This study investigated the application prospects of environmental DNA (eDNA) technology for studying the species diversity of cetaceans. It involves extracting eDNA from water samples in the Xisha sea area using universal primers for amplification targeting cetacean mitochondrial 12S rRNA and 16S rRNA. High-throughput sequencing was conducted. The results were combined with visual observation data to discuss the potential of eDNA technology in cetacean species diversity studies. These results indicated that the 4 universal primers were effective for cetacean identification. Using these primers, 5 cetacean species were detected in samples from 19 stations in the Xisha sea area. The identified species included the pan-tropical spotted dolphin (*Stenella attenuata*), spinner dolphin (*Stenella longirostris*), Fraser's dolphin (*Lagenodelphis hosei*), Eden's whale (*Balaenoptera edeni edeni*), and short-finned pilot whale (*Globicephala macrorhynchus*). The cetaceans observed during sampling included the pantropical spotted dolphin, spinner dolphin, and Risso's dolphin (*Grampus griseus*). The dominant species detected by both methods were consistent, and the environmental DNA (eDNA) technology identified species that were not visually observed. The detection results of primers Cet-12S and Marver3 covered 5 cetacean species and 17 sites where cetaceans were detected, indicating that the combined use of primers targeting different gene segments is advantageous for improving detection effectiveness. There were no significant differences among the 4 primers in terms of the detected cetacean sequences and number of species. Cet-12S exhibited the highest proportion of cetacean sequences and species, accounting for 33.0% and 21.1% of the total population, respectively. In contrast, the other primers detected much lower proportions of cetacean sequences and species, ranging from 0.2% to 0.6% and 2.0% to 4.1%, respectively. In addition, the number of nonspecifically amplified sequences and species detected by Cet-12S was significantly lower than that of the other 3 primers, indicating its high specificity as a universal primer for cetacean eDNA. Compared to visual observation, eDNA technology has advantages such as high sensitivity, efficiency, and cost-effectiveness, making it well suited for studying the species diversity of cetaceans. This study enhanced our understanding of cetacean species diversity in the Xisha Sea area, offering technical insights for cetacean conservation and research.

Key words: environmental DNA; universal primers; cetacean; species diversity; Xisha sea area; the South China Sea

Corresponding author: LI Min. E-mail: limin@scsfri.ac.cn