

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17342

## 环境 DNA 在水域生态中的研究进展

赵明, 赵梦迪, 马春艳, 张凤英, 蒋科技, 王田, 马凌波

中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090

**摘要:** 环境 DNA (environmental DNA, eDNA)是指生物通过皮肤脱落、唾液、配子、粪便以及分泌物等方式向环境中释放的游离 DNA。环境 DNA 具有敏感性、准确性以及容易操作等诸多优势, 更能实时地反映物种多样性以及生物量等, 近两三年受到了世界各地学者们的大量关注。水域环境高度复杂, 环境 DNA 在水域生态领域具有重要的应用价值。本文主要从环境 DNA 在水域生态的应用以及研究方法方面对环境 DNA 的研究做一小结, 同时介绍环境 DNA 在其他生境的应用, 以期为水域生态的研究提供参考。

**关键词:** 生物多样性; 物种保护; 环境 DNA; 水域生态; 资源调查

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)04-0714-07

20 世纪以来, 生物多样性锐减是全球环境面临的最重要的问题之一, 这与生态环境和全球健康密切相关<sup>[1]</sup>。1970 年至 2010 年, 全球生物多样性减少 52%<sup>[2]</sup>, 因此, 加强对生物多样性的保护尤为重要。对生物多样性的保护主要应从以下几个方面展开: 首先, 全面评估生物多样性以及生物遗传多样性状态。以海洋生境为例, 目前主要采用定时定点网具捕捞调查方法, 随后随机取样利用传统测量方法和遗传标记对特定物种的遗传多样性进行评估。其次, 对濒危、珍稀物种加强保护, 主要难点在对珍稀物种资源量的监测评估和人工繁育。此外, 对有害入侵物种的监测、清除以及生境环境的保护等也至关重要。近年来, 一种新兴的检测物种多样性及丰度的方法—环境 DNA (environment DNA, eDNA), 由于其灵敏性、准确性以及成本低等诸多优势逐渐在此领域大放异彩。本文将从环境 DNA 的应用以及研究方法等方面对近年来环境 DNA 的研究做一总结, 以期为今后的研究提供帮助。

### 1 环境 DNA 概述

环境 DNA 指环境中游离的 DNA 分子, 在自然环境中分布广泛, 主要由生物通过脱落的皮肤、粪便、唾液、配子、分泌物等方式获得<sup>[3]</sup>。由于游离 DNA 在外界环境中半衰期较短, 所以环境 DNA 反应几乎是实时的生物状态, 因而具有重要的应用前景。早在 2008 年, Ficetola 等<sup>[4]</sup>即开始用 eDNA 监测淡水中一种青蛙(*Rana catesbeiana*)的分布, 随后 eDNA 方法便被广泛用于其他监测和生物检测中。研究表明, 影响水体中 eDNA 降解速率的因素主要有温度、有机碳浓度、阳光、固相颗粒等<sup>[5-6]</sup>。

### 2 环境 DNA 在水域生态中的应用

eDNA 自从首次应用之后, 已在脊椎动物、无脊椎动物、原生动物和植物等多种类型的生物群落中得到应用。植物的 eDNA 释放与生物量具有一定的关系, 但并不显著, 实验表明植物并不释放常量的 DNA, 这表明 eDNA 在研究植物的生物

收稿日期: 2017-09-19; 修订日期: 2018-02-27.

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303047); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2013A11); 科技部科技基础性工作专项(2013FY110700).

作者简介: 赵明(1989-), 助理研究员, 从事海洋生态研究. E-mail: mingzhao1@hotmail.com

通信作者: 马凌波, 研究员, 从事生物技术与遗传育种研究. E-mail: malingbo@vip.sina.com

量还需要进一步的探索<sup>[7]</sup>。但 eDNA 亦有其独特的优势,不仅可以检测活的植物,还可以检测休眠组织、种子、花粉、碎屑等,因此在植物群落的多样性研究中亦可有广泛应用<sup>[8]</sup>。对于环境 DNA 在水域生态系统的植物的应用主要可从对植物群落多样性、入侵植物的清除效果、经济作物的病原监测等领域展开。下面主要总结 eDNA 在动物研究中的应用,根据实验目的将其应用主要分为多样性检测、生物量估算、监测入侵物种和珍稀物种等。

## 2.1 物种多样性以及新物种发现

环境 DNA 在对多种类型的生物多样性检测中均有广泛应用。在水域生态系统中主要包括对微小真核生物和高等水生动物的检测。对微小真核生物的研究主要成果表现在丰富了相关物种的分类学信息。如 Hartikainen 等<sup>[11]</sup>开发的黏孢子虫谱系特异性引物对食鱼动物粪便样本中的微小真核生物粘孢子虫进行检测,发现仅有 7% 的 OTU 能聚类到 GenBank 中,结果丰富了黏孢子虫的分类学。利用 COI 检测原生生物 *Nebela collaris* 的多样性,检测的结果与镜检形态的数据具有相关性,且相关性随着镜检体积的增加而提高<sup>[12]</sup>。

对于高等水生动物多样性的研究较多,从最初采用克隆方法到后来发展的高通量测序。如 Minamoto 等<sup>[13]</sup>利用 *cyt b* 部分序列加克隆方法检测了河流中的鱼类多样性,在 47 个克隆检测出了 4 种鱼。Evans<sup>[14]</sup>利用 206 升的中型生态系统的研究证明了环境 DNA 方法研究鱼类和两栖类的多样性及生物量的可行性。Miya 等<sup>[15]</sup>通过对 880 种鱼类全线粒体序列以及 160 种部分线粒体序列分析开发了一对鱼类通用 PCR 引物,该引物位于 12S rRNA 的高度可变区,首先用水族馆水样证明了引物的有效性,在分布于 59 个科 123 个属的 180 种鱼检测出了 168 种;野外试验珊瑚礁周围海水样品中检测到了 93 种鱼,其中 64 种不存在于上面测试的水族箱中。Yamamoto 等<sup>[16]</sup>用 Miya 等<sup>[15]</sup>的通用引物在日本近海 47 个点大约 11 km 检测出来 128 种鱼,包括水下调查可见的和本地调查不可见的。本实验室利用 Miya 等<sup>[15]</sup>开发的 12S rRNA 通用引物 Mi-Fish-U 在中国东黄海水域 10

个站位共检测到 100 种鱼,隶属于 2 个纲 19 个目 53 个科 85 个属,且通过查找中国台湾鱼类资料库证明这些鱼或其所在属均为东海常见种。这些均表明环境 DNA 可以作为生物多样性研究的一项重要手段。

此外,环境 DNA 在其他生境中亦有广泛应用。如 Andersen 等<sup>[10]</sup>在土壤样本中用 16S rRNA 检测脊椎动物的多样性<sup>[9]</sup>;在节肢动物中,用 157 bp 的节肢动物特异引物 COI 对美国 700 个家庭房屋内外灰尘中的节肢动物多样性进行了研究,结果不仅丰富了对人类居住地节肢动物多样性的认识,并且通过这些数据对多种节肢动物的食物网和地理分布进行了描述。同时表明地下室、家庭居住者和周边土地利用方式对居住地的节肢动物多样性的影响比气候因素更大。

环境 DNA 方法应用于检测生物多样性的研究催生了一个新名词——宏条形码(meta-barcoding)的产生。综合上述研究,目前可被用来做宏条形码的序列主要有线粒体 COI 序列、12S rRNA 序列、ITS 序列等。其中,鱼类的多样性检测中最为成功的是 12S rRNA 序列,其所扩增的片段几乎 90% 均注释到鱼类中,但其分辨率较低,在区分种属方面仍需要改进。而 COI 作为传统的鱼类条形码序列,数据库最为全面,但其在不同种类间高度保守,而目前尚未有成熟 COI 宏条形码引物,这也是本实验室未来开发的方向之一。此外,对于线粒体多片段的靶向富集也是一个重要的方向,上海海洋大学的李晨虹教授团队做了一些先导性的工作。

在新物种发现方面,目前主要是在微小真核生物领域应用较多,在后面的研究中可以针对一个小的进化类群开发特异性的序列。如针对石首鱼科,通过分析大量石首鱼科的线粒体全序,筛选可作为石首鱼科条形码的序列,设计特异性引物进行大量不同地区的环境 DNA 样本进行扩增测序,随后分析即可有针对性的进行区域调查检测。

## 2.2 生物量估算

eDNA 的释放与物种的分布具有紧密的联系,主要体现在实时性和物种的生物量具有一定的线性关系。目前对环境 DNA 的研究多集中在水生

生态系统的领域。中型生态系统实验显示 eDNA 在动物刚放入时开始上升,但在 6 天后达到平衡<sup>[17]</sup>。Thomsen 等<sup>[18]</sup>利用中性生态系统证明,如果没有新的补充,eDNA 在两周后不能被检测到,即使是 100 bp 的 DNA 片段也会在数天内降解而检测不到<sup>[19]</sup>。在中型生态系统中放入美洲鲥(*Engraulis mordax*)、太平洋沙丁鱼(*Sardinops saga*)和鲭(*Scomber japonicas*),采用荧光定量方法估算 eDNA 脱落的速率为每克生物量每小时 165~3368 pg DNA,降解速率常数为 0.055~0.101<sup>[20]</sup>。已有多项研究表明 eDNA 量与物种丰度具有一定的线性关系<sup>[21-22]</sup>。本实验室开发了一对龙头鱼的特异性荧光定量 PCR 引物,对东黄海区 18 个站点的龙头鱼分布进行了预测,预测结果与历史捕捞调查的结果分布基本一致,这也表明环境 DNA 丰度与物种生物量具有一定的线性关系。

在用水样环境 DNA 研究生物量时要注意近缘物种干扰、动物的活动周期以及水流速度方向等问题。如对太平洋鲑属(*Oncorhynchus*)的三种鱼用 eDNA 检测不能明显地区分三种鱼<sup>[23]</sup>。此外,eDNA 量与动物的活动具有重要联系。如采用 qPCR 方法对不同季节阿拉巴马州黑武士河上游的两种生物阿拉巴马泥鳅(*Necturus alabamensis*)(冬季活跃)和平背麝香龟(*Sternotherus depressus*)(夏季活跃)的 eDNA 进行检测,结果表明 eDNA 的含量与动物的活动具有重要联系<sup>[24]</sup>。eDNA 可随着河流迁移,Deiner 等<sup>[25]</sup>在河流中检测到了 296 科的真核生物,同时这些 eDNA 样本可随着河流流动,陆生物种的 eDNA 也可被检测到,这表明 eDNA 指示的多样性信息可随着河流迁移。

### 2.3 入侵物种和珍稀物种

监管物种和生态系统的三个要素:防止有害入侵种,做到早发现早响应;保存濒危种,保护多样性;评估生态安全性,早预防。水域生态系统中传统的方法如网具、陷阱、电鱼和视觉观察均不能有效做到上面三点<sup>[26]</sup>。在这个方面,eDNA 由于其敏感性、快速性和特异性因而具有巨大的优势。超过 180 种非本地种被引进劳伦系的五大湖地区,引进的潜在途径包括商业贸易、在水环境

中无意识地丢弃一些无用的种类等<sup>[27]</sup>。eDNA 方法可用于对压舱物和海港水样入侵物种的监测,做到早发现、早预防<sup>[28]</sup>。美国科学家利用 eDNA 方法对入侵物种大头鲢(*Hypophthalmichthys molitrix*)<sup>[29]</sup>、陆生入侵物种茶翅蝽(*Halyomorpha halys*)<sup>[30]</sup>、入侵种缅甸蟒蛇(*Burmese Pythons*)<sup>[31]</sup>等实现了监测。有学者甚至建议政府将对环境 DNA 中亚洲鲤的监测作为五大湖地区的一项常规手段<sup>[32]</sup>。日本科学家在此方面也做了大量工作,主要包括对入侵物种蓝鳃太阳鱼的监测<sup>[33-34]</sup>。日本的本地鲤由于引进欧洲的鲤已经濒临灭绝,他们开发了针对非本地种的检测方法,通过检测非本地种的基因型来对欧洲鲤进行监测<sup>[35]</sup>。

对于珍稀物种的检测要求准确、敏感、不破坏生境等,eDNA 方法完美实现了这些要求。Schmelzle 等<sup>[36]</sup>比较了传统拖网围网方法与 eDNA 方法对加利福尼亚北部和俄勒冈州南部的海岸线附近的 29 个位点的濒危物种潮汐虾虎鱼(*Eucyclogobius newberryi*)的检出率,利用多元占有模型分析发现 eDNA 方法的检出率几乎是传统方法的两倍,且在其中一个传统方法未发现的位点和被认为区域性灭绝的位点检测到靶物种。Sigsgaard 等<sup>[37]</sup>采用 qPCR 方法对丹麦几近灭绝的物种欧洲泥鳅(*Misgurnus fossilis*)实现了监测;Voros 等<sup>[38]</sup>采用 PCR 方法对克罗地亚的 15 个洞穴的一种两栖动物穴居类洞螈(*Proteus anguinus*)(红色名录)进行了有效的检测;金色树蛙(*Phytotriades auratus*)(红色名录)栖息在新印度群岛的特立尼达拉岛的最高峰的一种凤梨科植物(*Glomeropitcairnia erectiflora*)的水坑中,通过对水样中的 eDNA 的检测实现了对金色树蛙的监测<sup>[39]</sup>。这些均表明 eDNA 在珍稀物种的监测中具有巨大的优势。

### 2.4 其他应用

eDNA 还有很多待开发的应用,与水域生态相关的包括病原检测、群体遗传研究、重构历史群落等。如在病原检测中,对水样中一种珍稀物种树蛙的病原的监测能起到重要的预防作用<sup>[40]</sup>,也可对引发人类胆管癌的后睾吸虫病的病原进行有效检测<sup>[41]</sup>。此外,使用粪便样本来源的 DNA 片段可对珍稀动物的群体遗传方面进行研究<sup>[42]</sup>,对

环境指示生物 eDNA 的研究也可作为环境污染物的指标<sup>[43]</sup>, 对不同时期沉积物中 eDNA 的研究可以追溯历史事件<sup>[44]</sup>等。

### 3 环境 DNA 的研究方法

eDNA 样品因实验目的和对象的不同有多种多样的来源, 水域生态中最经常使用的为水样和底泥样本, 但不局限于此。如检测排泄物中的原生动物以及研究其分类<sup>[11]</sup>, 通过被棕熊吃剩下的大马哈鱼残骸上残留的唾液样本研究棕熊的遗传结构, 研究海洋沉积物中微小无脊椎动物的分类学<sup>[45]</sup>, 检测昆虫捕食者的粪便或者昆虫栖息过的纸或蛻的壳确定对应的昆虫种类<sup>[30]</sup>, 通过房屋内外的灰尘研究人类居住地的节肢动物多样性<sup>[10]</sup>。

目前, 对 eDNA 的研究方法根据实验目的的不同主要有 PCR 检测、荧光定量 PCR 监测、高通量测序三种。PCR 检测主要是检测特定物种的存在与否, 如利用 PCR 方法检测流动水中的两种脊椎动物落基山尾蟾(*Ascaphus montanus*)和太平洋大鲵(*Dicamptodon aterrimus*)<sup>[46]</sup>。而 PCR 亦可结合克隆方法进行低通量的生物多样性研究。荧光定量 PCR 不仅可以检测存在与否, 同时也可对生物量做一定的预测, 物种检测方面目前最常用的还是 Taqman 探针法, 其灵敏性高, 但成本也相对较高, 而常用的 SYBR 方法对于引物特异性和产物片段大小要求非常高, 参考多重基因表达分析的利用毛细管电泳技术结合荧光标记可针对多个物种同时实现监测, 这也是后续可以开发的一项技术; 高通量测序主要用于监测多样性, 同时对资源量也有一定的统计。尽管荧光定量 PCR 和高通量测序相对 PCR 方法具有诸多优势, 但由于技术的限制, 前二者对扩增片段大小有要求: 荧光定量一般要求扩增产物在 80~150 bp 为宜, 而高通量测序的产物出于对测序成本的考虑则最好在 300 bp 以内。关于这个方面, 陈炼等<sup>[47]</sup>做了较为详尽的总结和展望。

Anna 等<sup>[48]</sup>总结出了 eDNA 在生态学研究的 9 个步骤: (1) 定义 DNA 测试的范围, 筛选出可做条形码的基因; (2) 建立感兴趣的物种类群的靶基因数据库; (3) 根据靶基因的进化关系分析检

验其区别物种的能力; (4) 类群特异性引物的设计; (5) 选取近缘物种评估引物的有效性; (6) 引物特异性分析: 利用对照研究假阳性、假阴性扩增子; (7) 利用连续稀释的 DNA 对引物的敏感性进行分析; (8) 根据实验样品评估引物性能及 PCR 条件; (9) 实施大范围的实验来制定具有使用限制和可能错误的标准调查原则。根据这个路线结合自己的实验目的即可设计相对完整的环境 DNA 实验方案。

### 4 环境 DNA 方法的优势及局限

综上所述, 相对于传统方法, eDNA 方法具有环境友好型、数据客观、灵敏度高、省时省力以及花费更低等优势。环境友好主要表现在其取样的非侵入性, 如在渔业资源调查中仅需要一部分水样即可, 无需捕杀物种, 这在珍稀物种的调查中显得尤为重要。数据客观指环境 DNA 对专业的分类专家的依赖性较低, 在分类学专家协助建立标准精确的数据库后, 没有相关背景经验的人员也可以进行分析。相对于传统方法, 环境 DNA 对单一物种的检出率和生态系统的物种数检测灵敏度更高, 这已在多项研究中证实<sup>[2, 49-50]</sup>。本实验室利用 Miya 等开发的 Mifish-U 引物检测获得的物种数为传统捕捞方法的 2 倍, 且可检出物种数会随着 eDNA 数据库的完善进一步提高。另外, Davy 等<sup>[51]</sup>通过对比发现传统方法的花费几乎是环境 DNA 的 2~10 倍。

尽管如此, 环境 DNA 方法相对于传统方法仍存在问题: 不能直接获得物种的发育时期、性别比例等信息, 且不能区分物种的死亡的个体<sup>[48]</sup>。而由于其及其灵敏, 取样时又容易受到人源污染或者样本间交叉污染<sup>[21]</sup>。此外, 环境 DNA 的样本采集、提取和检测容易存在人为的误差, 因此建立标准的采样提取分析流程对于环境 DNA 的应用研究是十分必要的。

### 5 国内研究现状及展望

自从环境 DNA 的概念提出以来, 国外科学家在此方面已做了大量的研究。我国在此领域起步较晚, 马竹欣<sup>[50]</sup>利用环境 DNA 对元阳梯田中克

氏原螯虾的分布进行检测, 结果表明环境 DNA 技术可以高效地监测克氏原螯虾的分布现状和扩散动态; 卢珊<sup>[52]</sup>研究了 4 种水生动物与其环境 DNA 的定性与定量关系环境 DNA, 结果证明环境 DNA 与相应水生动物之间确实存在着密切的内在联系; 刘军等<sup>[53]</sup>筛选了鱼类环境 DNA 研究中通用引物, 分析认为线粒体 16S rRNA 较为适合做鱼类群落结构的分析; 王晓辉等<sup>[54]</sup>对海洋底泥环境 DNA 的提取和纯化方法进行了比较分析。环境 DNA 最主要的特征是客观性、准确性以及灵敏性, 因此后续在资源调查、新物种发掘、病原检测、特定物种监测、特定鱼类洄游路线、产卵场调查、群体遗传以及环评领域的生物多样性评价方面可开展相关探索。

结合本实验室的研究, 在今后的研究中应特别注意以下几个问题: 第一, eDNA 取样时的样本保存和提取方法尽可能做到一致, 那么如何更好地保存提取样本、增加不同样本间的可比性、提高可重复性、建立标准规范的保存提取方法; 第二, 注意不同样本间的交叉污染、实验室污染和人源污染问题, 不同样本间使用不同的预处理装置或两次取样之间对预处理装置进行消毒处理; 环境 DNA 提取和 PCR 所用的试剂耗材严格消毒, 不混用以减少实验室污染。第三, 建立可靠规范的数据库, 数据库的数据应做到准确无误, 做到数据中每条序列均能找到其出处以及对应的标本, 此点尤为重要。环境 DNA 最主要的特征就是客观性, 因此, 上述几点非常重要, 这需要相关领域学者的共同努力。而不论环境 DNA 应用于哪个领域, 在验证方法的可行性之后, 建立标准的分析流程是相关研究的重中之重。

#### 参考文献:

- [1] Pimm S L, Jenkins C N, Abell R, et al. The biodiversity of species and their rates of extinction, distribution, and protection[J]. *Science*, 2014, 344(6187): 1246752.
- [2] Valentini A, Taberlet P, Miaud C, et al. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding[J]. *Molecular Ecology*, 2016, 25(4): 929-942.
- [3] Hanfling B, Lawson Handley L, Read D S, et al. Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods[J]. *Molecular Ecology*, 2016, 25(13): 3101-3119.
- [4] Ficetola G F, Miaud C, Pompanon F, et al. Species detection using environmental DNA from water samples[J]. *Biology Letters*, 2008, 4(4): 423-425.
- [5] Gutierrez-Cacciabue D, Cid A G, Rajal V B. How long can culturable bacteria and total DNA persist in environmental waters? The role of sunlight and solid particles[J]. *Science of the Total Environment*, 2016, 539: 494-502.
- [6] Eichmiller J J, Best S E, Sorensen P W. Effects of temperature and trophic state on degradation of environmental DNA in lake water[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(4): 1859-1867.
- [7] Matsushashi S, Doi H, Fujiwara A, et al. Evaluation of the environmental DNA method for estimating distribution and biomass of submerged aquatic plants[J]. *PLoS ONE*, 2016, 11(6): e0156217.
- [8] Fahner N A, Shokralla S, Baird D J, et al. Large-scale monitoring of plants through environmental DNA metabarcoding of soil: Recovery, resolution, and annotation of four DNA markers[J]. *PLoS ONE*, 2016, 11(6): e0157505.
- [9] Andersen K, Bird K L, Rasmussen M, et al. Meta-barcoding of 'dirt' DNA from soil reflects vertebrate biodiversity[J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21(8): 1966-1979.
- [10] Madden A A, Barberan A, Bertone M A, et al. The diversity of arthropods in homes across the United States as determined by environmental DNA analyses[J]. *Molecular Ecology*, 2016, 25(24): 6214-6224.
- [11] Hartikainen H, Bass D, Briscoe A G, et al. Assessing myxozoan presence and diversity using environmental DNA[J]. *International Journal for Parasitology*, 2016, 46(12): 781-792.
- [12] Kosakyan A, Mulot M, Mitchell E A, et al. Environmental DNA COI barcoding for quantitative analysis of protists communities: A test using the *Nebela collaris* complex (Amoebozoa; Arcellinida; Hyalospheniidae)[J]. *European Journal of Protistology*, 2015, 51(4): 311-320.
- [13] Minamoto T, Yamanaka H, Takahara T, et al. Surveillance of fish species composition using environmental DNA[J]. *Limnology*, 2012, 13(2): 193-197.
- [14] Evans N T, Olds B P, Renshaw M A, et al. Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2016, 16(1): 29-41.
- [15] Miya M, Sato Y, Fukunaga T, et al. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species[J]. *Royal Society Open Science*, 2015, 2(7): 150088.
- [16] Yamamoto S, Masuda R, Sato Y, et al. Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 40368.
- [17] Takahara T, Minamoto T, Yamanaka H, et al. Estimation of fish biomass using environmental DNA[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(4): e35868.
- [18] Thomsen P F, Kielgast J, Iversen L L, et al. Monitoring en-

- dangered freshwater biodiversity using environmental DNA[J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21(11): 2565-2573.
- [19] Thomsen P F, Kielgast J, Iversen L L, et al. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples[J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(8): e41732.
- [20] Sassoubre L M, Yamahara K M, Gardner L D, et al. Quantification of environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates for three marine fish[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(19): 10456-10464.
- [21] Thomsen P F, Møller P R, Sigsgaard E E, et al. Environmental DNA from seawater samples correlate with trawl catches of subarctic, deepwater fishes[J]. *PLoS ONE*, 2016, 11(11): e0165252.
- [22] McKelvey K S, Young M K, Knotek W L, et al. Sampling large geographic areas for rare species using environmental DNA: a study of bull trout *Salvelinus confluentus* occupancy in western Montana[J]. *Journal of Fish Biology*, 2016, 88(3): 1215-1222.
- [23] Wilcox T M, Carim K J, McKelvey K S, et al. The dual challenges of generality and specificity when developing environmental DNA markers for species and subspecies of *Oncorhynchus*[J]. *PLoS ONE*, 2015, 10(11): e0142008.
- [24] de Souza L S, Godwin J C, Renshaw M A, et al. Environmental DNA (eDNA) detection probability is influenced by seasonal activity of organisms[J]. *PLoS ONE*, 2016, 11(10): e0165273.
- [25] Deiner K, Fronhofer E A, Machler E, et al. Environmental DNA reveals that rivers are conveyor belts of biodiversity information[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 12544.
- [26] Lodge D M, Turner C R, Jerde C L, et al. Conservation in a cup of water: estimating biodiversity and population abundance from environmental DNA[J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21(11): 2555-2558.
- [27] Nathan L R, Jerde C L, Budny M L, et al. The use of environmental DNA in invasive species surveillance of the Great Lakes commercial bait trade[J]. *Conservation Biology*, 2015, 29(2): 430-439.
- [28] Egan S P, Grey E, Olds B, et al. Rapid molecular detection of invasive species in ballast and harbor water by integrating environmental DNA and light transmission spectroscopy[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(7): 4113-4121.
- [29] Erickson R A, Rees C B, Coulter A A, et al. Detecting the movement and spawning activity of bigheaded carps with environmental DNA[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2016, 16(4): 957-965.
- [30] Valentin R E, Maslo B, Lockwood J L, et al. Real-time PCR assay to detect brown marmorated stink bug, *Halyomorpha halys* (Stål), in environmental DNA[J]. *Pest Management Science*, 2016, 72(10): 1854-1861.
- [31] Hunter M E, Oyler-McCance S J, Dorazio R M, et al. Environmental DNA (eDNA) sampling improves occurrence and detection estimates of invasive burmese pythons[J]. *PLoS ONE*, 2015, 10(4): e0121655.
- [32] Jerde C L, Chadderton W L, Mahon A R, et al. Detection of Asian carp DNA as part of a Great Lakes basin-wide surveillance program[J]. *Canadian Journal of Fisheries & Aquatic Sciences*, 2013, 70(4): 522-526.
- [33] Takahara T, Minamoto T, Doi H. Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds[J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(2): e56584.
- [34] Doi H, Takahara T, Minamoto T, et al. Droplet digital polymerase chain reaction (PCR) outperforms real-time PCR in the detection of environmental DNA from an invasive fish species[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(9): 5601-5608.
- [35] Uchii K, Doi H, Minamoto T. A novel environmental DNA approach to quantify the cryptic invasion of non-native genotypes[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2016, 16(2): 415-422.
- [36] Schmelzle M C, Kinziger A P. Using occupancy modelling to compare environmental DNA to traditional field methods for regional-scale monitoring of an endangered aquatic species[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2016, 16(4): 895-908.
- [37] Sigsgaard E E, Carl H, Møller P R, et al. Monitoring the near-extinct European weather loach in Denmark based on environmental DNA from water samples[J]. *Biological Conservation*, 2014, 183: 46-52.
- [38] Vörös J, Marton O, Schmidt B R, et al. Surveying Europe's only cave-dwelling chordate species (*Proteus anguinus*) using environmental DNA[J]. *PLoS ONE*, 2017, 12(1): e0170945.
- [39] Torresdal J D, Farrell A D, Goldberg C S. Environmental DNA detection of the golden tree frog (*Phytotriades auratus*) in bromeliads[J]. *PLoS ONE*, 2017, 12(1): e0168787.
- [40] Hall E M, Crespi E J, Goldberg C S, et al. Evaluating environmental DNA-based quantification of ranavirus infection in wood frog populations[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2016, 16(2): 423-433.
- [41] Hashizume H, Sato M, Sato M O, et al. Application of environmental DNA analysis for the detection of *Opisthorchis viverrini* DNA in water samples[J]. *Acta Tropica*, 2017, 169: 1-7.
- [42] Zhu L, Zhang S, Gu X, et al. Significant genetic boundaries and spatial dynamics of giant pandas occupying fragmented habitat across southwest China[J]. *Molecular Ecology*, 2011, 20(6): 1122-1132.
- [43] Xie Y, Wang J, Yang J, et al. Environmental DNA metabarcoding reveals primary chemical contaminants in freshwater sediments from different land-use types[J]. *Chemosphere*, 2017, 172: 201-209.
- [44] Giguet-Covex C, Pansu J, Arnaud F, et al. Long livestock farming history and human landscape shaping revealed by lake sediment DNA[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 3211.
- [45] Ward G M, Bennett M, Bateman K, et al. A new phylogeny and environmental DNA insight into paramyxids: an increasingly important but enigmatic clade of protistan para-

- sites of marine invertebrates[J]. International Journal for Parasitology, 2016, 46(10): 605-619.
- [46] Goldberg C S, Pilliod D S, Arkle R S, et al. Molecular detection of vertebrates in stream water: A demonstration using Rocky Mountain tailed frogs and Idaho giant salamanders[J]. PLoS ONE, 2011, 6(7): e22746.
- [47] Chen L, Wu L, Liu Y, et al. Application of environmental DNA metabarcoding in ecology[J]. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(15): 4573-4582. [陈炼, 吴琳, 刘燕, 等. 环境 DNA metabarcoding 及其在生态学研究中的应用[J]. 生态学报, 2016, 36(15): 4573-4582.]
- [48] MacDonald A J, Sarre S D. A framework for developing and validating taxon-specific primers for specimen identification from environmental DNA[J]. Molecular Ecology Resources, 2016, 17(4): 708-720.
- [49] Dunker K J, Sepulveda A J, Massengill R L, et al. Potential of environmental DNA to evaluate Northern pike (*Esox lucius*) eradication efforts: An experimental test and case study[J]. PLoS ONE, 2016, 11(9): e0162277.
- [50] Ma Z X. Distribution of invasive crayfish *Procambarus clarkii* in Yuanyang Terrace revealed by eDNA[D]. Kunming: Yunnan University, 2016. [马竹欣. 利用环境 DNA 技术调查入侵种克氏原螯虾在元阳梯田的分布[D]. 昆明: 云南大学, 2016.]
- [51] Davy C M, Kidd A G, Wilson C C. Development and validation of environmental DNA (eDNA) markers for detection of freshwater turtles[J]. PLoS ONE, 2015, 10(7): e0130965.
- [52] Lu S. Qualitative and quantitative relationship between common aquatic animals and their environmental DNA[D]. Nanjing: Nanjing Normal University, 2015. [卢珊. 常见水生动物与其环境 DNA 的定性定量关系[D]. 南京: 南京师范大学, 2015]
- [53] Liu J, Zhao L J, Fan Y C, et al. Universal primer screening and verification for fish environment DNA research[J]. Freshwater Fisheries. 2016, 46(1): 9-17. [刘军, 赵良杰, 凡迎春, 等. 鱼类环境 DNA 研究中通用引物的筛选验证[J]. 淡水渔业. 2016, 46(1): 9-17.]
- [54] Wang X H, Huang L S X, Bai F W, et al. Comparative study of methods for extraction and purification of environmental DNA from marine sediment samples[J]. Journal of Dalian University of Technology, 2014, 54(3): 272-277. [王晓辉, 黄李淑馨, 白凤武, 等. 海洋底泥环境 DNA 提取与纯化方法比较研究[J]. 大连理工大学学报, 2014, 54(3): 272-277.]

## Studies on the application of the environmental DNA in aquatic ecosystem

ZHAO Ming, ZHAO Mengdi, MA Chunyan, ZHANG Fengying, JIANG Keji, WANG Tian, MA Lingbo

East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China

**Abstract:** This review introduces the environmental DNA (eDNA) method which is a newly developed technique to monitor biodiversity. eDNA are free DNA molecules contained in the shedding of skin, feces, saliva, gametes, and secretions. Recently, eDNA has become a global research hotspot owing to its sensitivity, accuracy, and easy implementation. Above all, eDNA can monitor biodiversity and biomass in real-time. Owing to the highly complicated characteristics of aquatic ecology, eDNA methods play a considerable role on this area. This review summarized the eDNA application and methods in aquatic ecosystems, outlined some aspects requiring improvement, and suggested future developments and innovations for research. eDNA methods were mainly applied in three research areas, namely biodiversity analysis, biomass evaluation, and invasive and endangered species monitoring. Currently, eDNA used for biodiversity research has mostly relied on meta-barcoding technology. Examples of different meta-barcoding applications, such as microscopic eukaryotes and aquatic animals have been summarized, and further research directions suggested. Regarding biomass evaluation, most eDNA achievements and limitations in this area have been summarized. Invasive and endangered species monitoring is possibly the most successful eDNA application, and many examples have been summarized to provide a comparative basis for relative researchers. The superiority and limitation of eDNA methods have been summarized based on published articles and the results from our laboratory. Finally, prospective eDNA applications have been listed to specify direction for further studies.

**Key words:** biodiversity; environmental DNA; water ecosystem; resources survey

**Corresponding author:** MA Lingbo. E-mail: malingbo@vip.sina.com