

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.18133

环境 DNA 在长江江豚监测中的应用

吴昀晟¹, 唐永凯², 李建林², 刘凯², 李红霞², 王钦¹, 俞菊华^{1,2}, 徐跑^{1,2}

1. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214128;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214128

摘要: 为了从水体环境中提取到高质量的 eDNA 环境 DNA (environmental DNA, eDNA), 应用于长江中长江江豚 (*Neophocaena phocaenoides asaeorientalis*) 的分布调查, 本研究比较了滤膜孔径和水样保存方式对 eDNA 获取的影响, 同时对比了 eDNA 技术与传统调查法对长江江豚的检测结果。结果显示水样抽滤时间与滤膜孔径大小呈负相关关系, 且都可以检出目标生物; 水样采集后需在 6 h 内完成抽滤处理, 或在冷藏条件下短期保存 48 h; 长江流域江苏段中观测到长江江豚出现的 8 个检测点均检测出长江江豚 eDNA, 而在 10 个未观测到长江江豚的水域中有 3 个检测出其 eDNA。研究表明, 相比传统目视监测方法, eDNA 技术在长江江豚监测中不仅具有较高的准确性, 还具有更高的灵敏性, 可作为长江江豚种群调查的有效辅助检测工具。

关键词: 长江江豚; 环境 DNA; 检测技术; 分布; 生物量评估

中图分类号: S931

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2019)01-0124-09

长江江豚 (*Neophocaena phocaenoides asaeorientalis*) 作为目前长江中生存的唯一的水生哺乳动物, 是指示其生态环境是否良好的重要指标^[1]。长江水质恶化与鱼类资源衰退严重影响了长江江豚的栖息^[2-3]。近几次的科学考察结果显示长江江豚数量急剧减少, 甚至可能在 20 年内灭绝^[4]。保护濒危生物, 首先需要了解其自然栖息分布状况, 而传统的水生生物监测方法工作量大, 结果不全面, 调查成本高, 还会给水生生物与生态系统带来一定程度的负面影响^[6]。

近年来, 环境 DNA (environmental DNA, eDNA) 技术已被广泛应用于水生生物保护监测的研究中^[7]。该技术能在不接触生物的同时, 准确、灵敏地检测出低密度水生生物的存在^[8], 也可以评估一定水域中目标物种的生物量^[9]。Ficetola 等^[10]利用 eDNA 技术监测美国牛蛙 (*Rana catesbeiana*) 的分布情况, 将该技术引入水生生物研究领域。

Jerde 等^[11]利用 eDNA 技术监测亚洲鲤在北美五大湖的入侵情况, 发现了鳙 (*Aristichthys nobilis*) 和鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 的入侵范围已经超出传统监测方法划定的监管区域。Rees 等^[12]利用 eDNA 技术在传统方法未检出的池塘中检测到了濒危动物冠北螈 (*Triturus cristatus*)。目前, 国内应用 eDNA 技术检测长江江豚的研究已有报道, Stewart 等^[13]对天鹅洲保护区内江豚种群在不同季节的分布规律进行了探索。而应用该技术监测长江干流中长江江豚的分布却未见报道。长江泥沙含量高, 水流流速大, 会导致水样中 eDNA 的回收效率低, 检测不稳定, 针对浑浊流动的长江水体, 具体的技术标准也需要重新建立。

本研究基于 eDNA 技术, 比较了 4 种孔径滤膜和不同储存方式与时间的组合对 eDNA 提取的影响, 建立了适用于长江水样处理的方法, 多方面对长江流域江苏段的长江江豚分布进行调查,

收稿日期: 2018-04-17; 修订日期: 2018-06-24.

基金项目: 江苏省长江江豚繁育项目(苏财农 2016-36 号); 中国水产科学研究院基本科研业务费项目(2017HY-XKQ0201); 修复向家坝库区渔业资源及保护长江珍稀特有物种合作项目(F02 西江保护区江豚迁入及驯养).

作者简介: 吴昀晟(1992-), 男, 硕士研究生. E-mail: wysh6666@126.com

通信作者: 徐跑, 研究员, E-mail: xup@ffrc.cn; 俞菊华, 研究员, E-mail: yujh@ffrc.cn

为长江江豚等水生生物的保护提供有力的技术支持。

1 材料与方法

1.1 水样采集

在考察船关闭发动机数分钟后,从表层水体(水面以下 0.3~0.6 m)采集水样,放置于全新 1 L 可密封的广口瓶。采集器在使用前需经过 10%漂白粉溶液消毒,无菌水冲洗并干燥;采集人员佩戴一次性手套,取样后更换^[14]。水样使用真空泵现场抽滤或冷藏条件下运送回实验室抽滤。滤膜浸没于装有 95%乙醇的 2 mL EP 管中,保存在-20℃直至 DNA 提取^[15-16]。

保存的滤膜取出干燥后剪碎,使用 OMEGA 公司的 Water DNA Kit 提取 DNA,提取过程中 90℃ 水浴溶解难溶细胞,最后加入 50 μL Elution Buffer 洗脱,提高 eDNA 样品的浓度,置于-20℃冷冻保存。

1.2 实验设计

1.2.1 四种孔径滤膜 eDNA 获取的比较 水样采集地位于镇江豚类自然保护区下游水域(32°11'~32°13'N, 119°36'~119°39'E)。保护区为半封闭航道,通航船舶较少,水质污染程度低,鱼类资源丰富,是豚类等大型水生动物栖息的良好场所^[17],多次野外科学考察表明该水域有数群长江江豚活动^[18]。从

镇江保护区下游水域(32°11'51.30"N, 119°37'13.31"E)采集了春季(4 月)、夏季(8 月)、冬季(1 月)3 个季节的水样。处理水样分别使用孔径为 10 μm、5 μm、1 μm、0.45 μm 的尼龙滤膜(直径 47 mm)抽滤 1 L,每组设置 6 个重复。

1.2.2 长江水样储存方式的比较 选取了长江下游干流江苏段两个采样时观测到有江豚的水域:X 点(32°14'54.96"N, 119°31'02.81"E)与 Y 点(32°16'12.35"N, 119°41'53.57"E)。将采集到的水样随机分配到室温(20℃)或冷藏(4℃)条件下保存。每个储存条件的水样在保存后第 6、24、48、72、144、216、312 小时,分别使用 5 μm 孔径的尼龙滤膜(直径 47 mm)抽滤 1 L,每组设置 6 个重复(表 1)。

1.2.3 eDNA 技术与传统方法比较 科学考察范围为从苏皖交界的新生洲(31°46'17.48"N, 118°28'10.92"E)至崇明东风西沙水库(31°40'53.56"N, 121°11'19.47"E)。每 30 km 左右江段内挑选一个检测点,检测点为采样时观测到长江江豚出现的水域或采样时未观测到的疑似点。疑似点为距江岸 200~500 m,岸边无码头或工厂,江道罕有船舶航行,存在一定数量的鱼类,适合长江江豚生存的水域^[18]。共选取了 15 个检测点(图 1),其中 S4、S7、S8、S9、S14 观测到有长江江豚,并计数其出现的数量^[19],其余 10 个检测点 S1、S2、S3、S5、S6、S10、S11、S12、S13、S15 为疑似点。

表 1 储存方式与时间对长江江豚 eDNA 提取的影响的实验设计
Tab. 1 Design of the trial for the effect of storage condition and time on eDNA concentration of *Neophocaena phocaenoides asaeorientalis*

n=6; $\bar{x}\pm SD$

采样点 sampling station	储存条件/℃ storage condition	抽滤水样体积/L volume of water sample processed	保存时间/h storage time							
X	4	1	6	24	48	72	144	216	312	
X	20	1	6	24	48	72	144	216	312	
Y	4	1	6	24	48	72	144	216	312	
Y	20	1	6	24	48	72	144	216	312	

采集后立即对水样抽滤处理。为防止大颗粒泥沙堵塞滤膜,使用医用纱布预过滤^[13],每次使用后更换^[20]。使用 5 μm 孔径的尼龙滤膜(直径 47 mm)抽滤 1 L 水样,每组设置 6 个重复。所有检测点增加 1 个以 1 L 去离子水为样本的阴性对

照,与样品一同保存、运输、检测来确认样品没有受到污染^[21]。不同检测点的样品隔离保存,避免交叉污染^[22]。

1.3 引物设计与荧光定量 PCR

根据长江江豚线粒体 D-loop 区域基因序列,

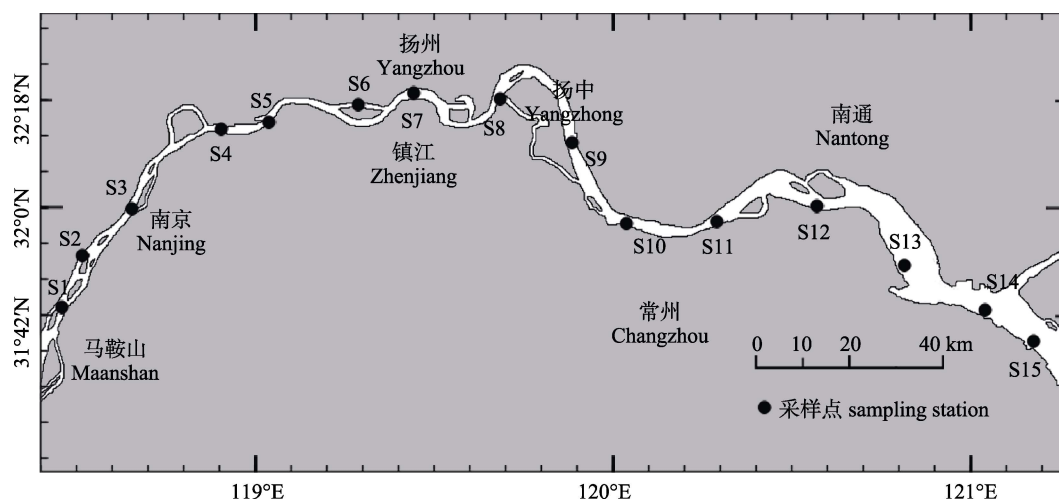


图 1 检测点编号与定位

Fig. 1 Location of sampling sites

使用 Primer premier 6.0 软件进行特异性引物设计: YFPDloop F: 5'-TATGTCCACTAGCCCCTTCATA-ACCATTA-3'; YFPDLoop R: 5'-AGATCATTAT-TTAGCTACCCCCACAAGC-3', 扩增片段长度为 102 bp。引物由苏州泓迅生物科技股份有限公司合成。

使用 SYBR® Premix Ex Taq™ II 试剂盒 (TaKaRa) 进行荧光定量 PCR。20 μL 反应体系包括: 10 μL SYBR® Premix Ex Taq™ II, 2 μL DNA 模板和正反引物各 0.8 μL。反应条件如下: 95℃ 预变性 3 min; 45 个循环包括: 95℃ 变性 10 s, 60℃ 退火 20 s。每个 DNA 样品设置 3 个重复, 并增加以 ddH₂O 为模板的阴性对照和以质粒为模板的阳性对照, 每组 3 个重复。

检测结果判定: 阴性对照产生扩增则重复该试验组; 3 个重复都没有扩增曲线表明该样品无目标 eDNA; 3 个重复中 2 个无扩增曲线或熔解曲线出现双峰, 则该样品重新进行荧光定量 PCR; 2 个或 2 个以上重复有扩增且熔解温度与阳性对照相同, 则表明该样品中存在长江江豚 eDNA。

1.4 荧光定量 PCR 标准曲线的建立

提取铜陵淡水豚国家级自然保护区内长江江豚迁地种群的血液 DNA, 使用 YFPMCR 引物 (YFPMCR F: 5'-AAGCTGGAATTCTTTATAAAC-TACTC-3'; YFPMCR R: 5'-AACTATCTGTATGAT-TTCATTATGGG-3') 扩增线粒体 DLoop 区域, 制备质粒标准品, 依次稀释质粒, 形成 $10^1 \sim 10^7$ copies/μL

的 7 个梯度, 制作荧光定量 PCR 标准曲线。

1.5 数据处理

水样中长江江豚 eDNA 浓度按标准曲线计算, 以平均值±标准差 ($\bar{x} \pm SD$) copies/L 表示。数据分析采用 SPSS 19.0 软件, 先进行同质方差分析 (levene test), 再进行单因素方差分析 (one-way ANOVA)。水样储存实验的数据先采用双因素方差分析 (two-way ANOVA), 若违反球形假设采用 Greenhouse-Geisser 校正^[23], 再采用单因素方差分析和 Duncan 多重比较检验。 $P < 0.05$ 认为有显著性差异, $P < 0.01$ 认为有极显著差异。

2 结果和分析

2.1 标准曲线制作

根据标准质粒浓度与扩增 C_T 值, 计算得出引物 YFPDloop 扩增标准曲线为 $y = -3.41x + 39.30$, $R^2 > 0.99$ (y 为定量 PCR 检测的样本 C_T 值, x 为样本中长江江豚 eDNA 拷贝数对数值), PCR 扩增效率为 0.96 (图 2)。

2.2 不同孔径滤膜对三季水样 eDNA 提取的影响

使用 0.45 μm 孔径滤膜抽滤 1 L 水样的时间为 (85.5±25.5) min, 1 μm 孔径滤膜抽滤时间为 (42.8±14.2) min, 5 μm 孔径滤膜抽滤时间为 (14.3±5.2) min, 10 μm 孔径滤膜抽滤时间为 (7.6±3.3) min,

所有滤膜的 DNA 提取都表现出正态分布, 数据具有方差齐性 ($P = 0.09$), 未观测到异常值。其中

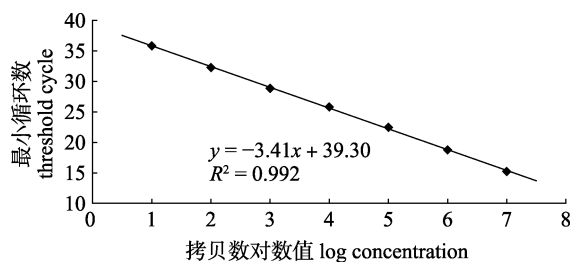


图 2 长江江豚线粒体 D-Loop 的标准曲线

Fig. 2 Standard curve of mitochondria of *Neophocaena phocaenoides asaeorientalis*

使用 0.45 μm 孔径滤膜提取 eDNA 的效率最高, 其夏季、春季、冬季水样所测得的长江江豚 eDNA 平均浓度分别为 (21944 ± 2538) copies/L、 (7221 ± 1209) copies/L、 (14284 ± 2170) copies/L。使用 1 μm 、

5 μm 、10 μm 孔径的滤膜抽滤夏季水样与 0.45 μm 孔径滤膜的检测结果比值分别为 0.958、0.904、0.820; 春季水样的比值分别为 0.904、0.688、0.555; 冬季水样的比值分别为 0.857、0.571、0.500。将各季节水样通过不同孔径测得的长江江豚 eDNA 浓度比值与孔径大小进行非曲线拟合(图 5)。单因素方差分析结果显示: 对于夏季水样, 使用各种孔径滤膜抽滤提取的 eDNA 平均浓度之间无显著差异($P > 0.05$); 对于冬季水样, 0.45 μm 滤膜与 1 μm 滤膜, 5 μm 滤膜与 10 μm 滤膜之间抽滤所得的结果无显著差异($P > 0.05$), 而 1 μm 滤膜与 5 μm 滤膜检测到的 eDNA 平均浓度有极显著差异($P < 0.01$); 春季水样的差异性与冬季水样相同。

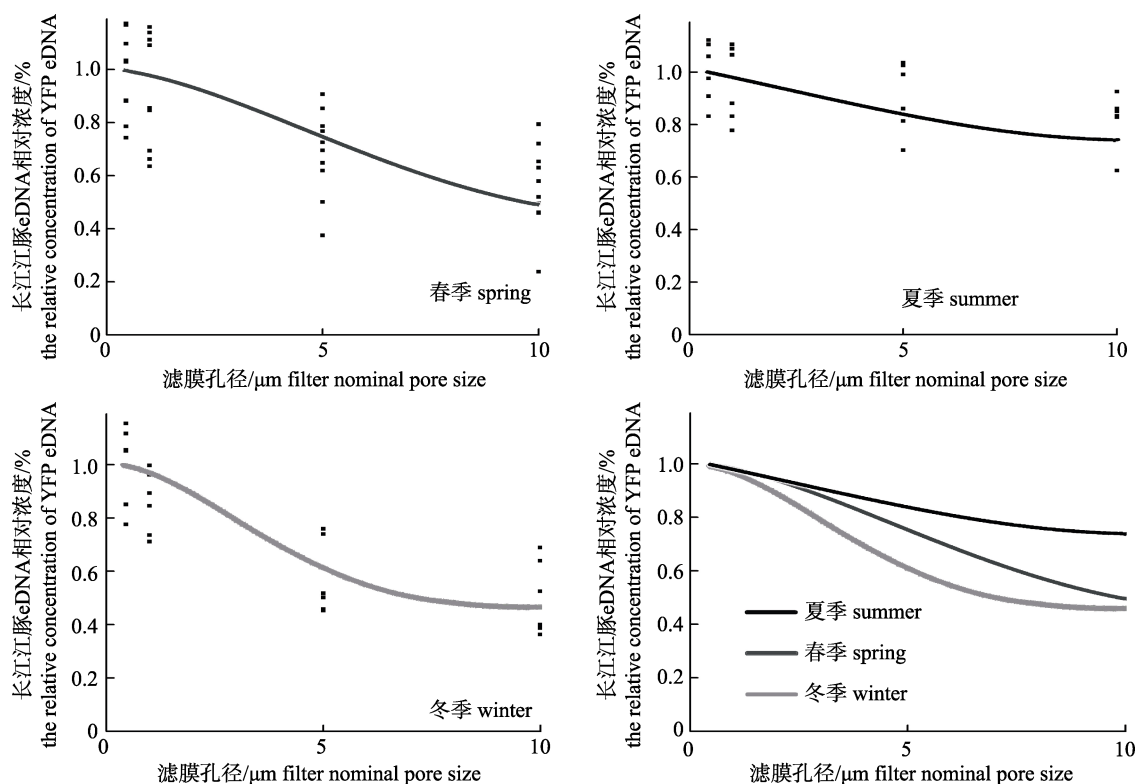


图 3 春季、夏季和冬季水样长江江豚 eDNA 抽滤结果随滤膜孔径的变化趋势

Fig. 3 The relationship between filter pore sizes and the *Neophocaena phocaenoides asaeorientalis* (YFP) eDNA yield of samples in spring, summer and winter

2.3 储存方式与时间对水样 eDNA 提取的影响

计数了采样过程中出现的长江江豚数量, X 点 14 头, Y 点 9 头。数据组均表现出方差齐性和正态分布($P = 0.20$)。

X 点检测结果双因素分析时违反了球形假设

$[\chi^2(12) = 106.84, P < 0.01]$, 采用 Greenhouse-Geisser 校正($\epsilon = 0.32$)。储存条件与时间之间的交互作用影响显著($P < 0.05, \eta_p^2 = 0.27$)。对于不同储存方式, 长江江豚 eDNA 浓度在保存 6 h 和 24 h 无显著差异($P > 0.05$), 但在保存 48 h、72 h、144 h、216 h、

312 h 有显著差异($P<0.05$)。以储存时间为主效应,分析得出冷藏保存组[$P<0.01$, $\eta_p^2=0.70$], 室温保存组[$P<0.01$, $\eta_p^2=0.84$]中长江江豚 eDNA 浓度都有显著差异。对于冷藏样品, 保存 48 h 后, 浓度显著下降($P>0.05$); 对于室温样品, 保存 6 h 后, 长江江豚 eDNA 浓度显著下降, 24 h 后浓度不再显著变化($P>0.05$, 图 4a)。

Y 点检测结果[$\chi^2(10)=37.88$, $P<0.01$]也进行了 Greenhouse-Geisser 校正($\epsilon=0.55$)。储存条件与时间之间的交互作用影响极显著[$P<0.01$, $\eta_p^2=$

0.46]。长江江豚 eDNA 浓度在储存 6 h($P>0.05$)和 144 h($P>0.05$)无显著差异, 在保存 24 h、48 h、72 h、216 h 有极显著差异($P<0.01$)。以储存时间为主效应, 分析得出冷藏保存组($P<0.01$, $\eta_p^2=0.84$), 室温保存组($P<0.01$, $\eta_p^2=0.76$)中长江江豚 eDNA 浓度都有显著差异。对于冷藏样品, 保存 24 h 后, 长江江豚 eDNA 浓度极显著下降($P<0.01$); 对于室温样品, 保存 6 h 后, 长江江豚 eDNA 浓度极显著下降($P<0.01$), 72 h 和 144 h 的浓度最低, 但它们之间差异不显著($P>0.05$, 图 4b)。

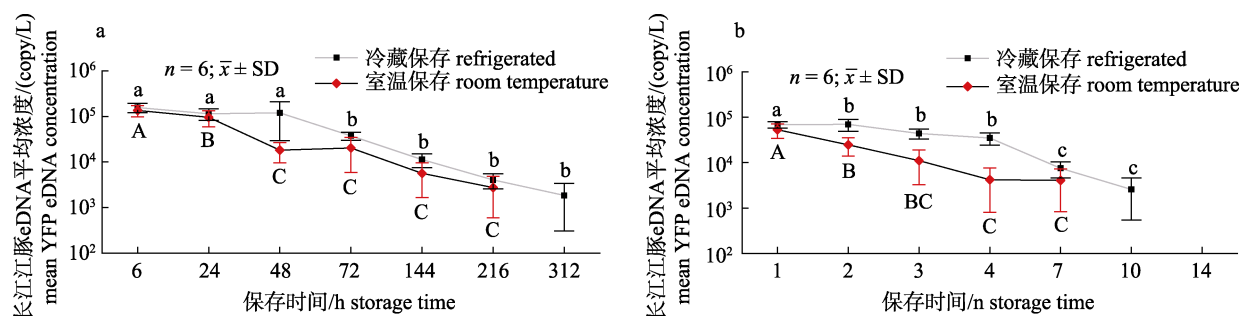


图 4 两种储存条件下长江江豚 eDNA 检测浓度随时间的变化图

a. 采样点 X; b. 采样点 Y. 相同保存条件下, 标有不同字母表示不同储存时间组 eDNA 平均浓度具有显著差异($P<0.05$); 小写字母为冷藏保存组, 大写字母为室温保存组。

Fig. 4 Changes in *Neophocaena phocaenoides asaeorientalis* (YFP) eDNA yield across time for samples stored under two different conditions

a. Sampling station X; b. Sampling station Y. Under the same stored condition, different letters mean significant difference among different storage time ($P<0.05$); lower-case letters refer to refrigerated groups, and capital letters refer to room temperature groups.

2.4 长江江苏段江豚检测

观测到长江江豚的 5 个检测点检测结果都呈阳性。10 个疑似点中有 3 个检测结果呈阳性, 分别为 S2、S3、S12 (表 2)。

以测得的水样 DNA 平均浓度与观察统计的长江江豚数量进行拟合, 所得拟合曲线为 $y=7826-5588x+1171x^2$ (图 5)。通过拟合曲线估算 3 个阳性疑似点 S2、S3、S12 的长江江豚数量分别为 5.7 ± 1.2 , 4.3 ± 0.4 , 8.8 ± 1.7 (95%置信区间)。

3 讨论

3.1 滤膜孔径对 eDNA 提取效率的影响

水生生物生存于水环境中, 并不断将含有自身遗传信息的细胞组织释放到其中, 如生殖细胞、上皮组织、排泄物等^[24-25]。这些细胞组织进入水环境时是直径超过 1 mm 的大颗粒, 在水流作

用下迅速下沉或分解为小于 100 μm 的颗粒^[26]。早期的研究报道建议使用小孔径的滤膜(0.22~1 μm)抽滤水样能最大限度地富集水样中的 DNA^[27-28]。但对于浑浊的长江水样, 1 μm 孔径的滤膜会被迅速堵塞, 1 L 水样需要抽滤 40~60 min。Robson 等^[29]建议对泥沙或藻类含量高的水样进行预过滤(10 μm 或 20 μm 滤膜), 再使用 3 μm 滤膜抽滤提取, 可以有效减少处理时间, 同时降低杂质含量, 提高检出率。但在采样现场重复抽滤易造成污染, 本研究通过多层纱布进行预过滤, 增大滤膜孔径至 5 μm , 同时提高抽滤水量至 1 L, 能快速完成水样处理, 且成功检测到长江江豚 eDNA。水样中 eDNA 物质颗粒的组成受季节因素影响。冬季水样中大于 5 μm 颗粒的 eDNA 占 0.45 μm 滤膜获取 eDNA 的 57%, 而夏季水样中却占 90%, 这与 Turner 等^[30]的研究结果相似, 高温加速了较小直

表 2 各检测点长江江豚 eDNA 检测结果

Tab. 2 Detection results of *Neophocaena phocaenoides asaeorientalis* eDNA concentration in various sampling stations

检测点 sampling station	观测的长江 江豚数量 number of YFP	检测结果 detection result		eDNA 平均 浓度/(copies/L) mean eDNA concentration
		荧光定量 PCR 结果 results of real-time PCR	水样检测结果 detection result of sampling water	
S1	0	0/3;0/3;0/3;0/3;0/3;0/3	0/6	—
S2	0	3/3;3/3;3/3;3/3;3/3;3/3	6/6	14996±8916
S3	0	3/3;3/3;3/3;2/3;2/3;2/3	6/6	5194±1178
S4	2	3/3;2/3;3/3;0/3;2/3;0/3	4/6	2820±1023
S5	0	0/3;0/3;0/3;0/3;0/3;0/3	0/6	—
S6	0	0/3;0/3;0/3;0/3;0/3;0/3	0/6	—
S7	8	3/3;3/3;3/3;3/3;3/3;3/3	6/6	35588±7662
S8	3	2/3;3/3;3/3;3/3;3/3;0/3	5/6	3027±1763
S9	2	2/3;0/3;3/3;3/3;0/3;3/3	4/6	1105±949
S10	0	0/3;0/3;0/3;0/3;0/3;0/3	0/6	—
S11	0	0/3;0/3;0/3;0/3;0/3;0/3	0/6	—
S12	0	3/3;3/3;3/3;3/3;3/3;3/3	6/6	51365±23047
S13	0	0/3;0/3;0/3;0/3;0/3;0/3	0/6	—
S14	7	3/3;3/3;3/3;3/3;2/3;3/3	6/6	11940±5490
S15	0	0/3;0/3;0/3;0/3;0/3;0/3	0/6	—

注: “—”表示未检出; 0/3, 2/3, 3/3 表示三组重复中出现阳性扩增的组数。
Note: “—” represents undetected; 0/3, 2/3, 3/3 represent the number of positive results in three replicates.

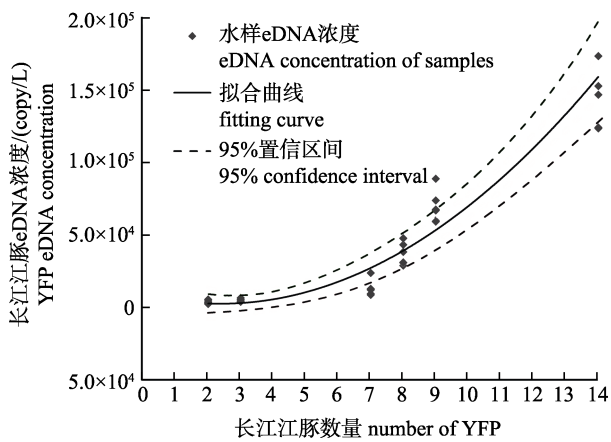


图 5 长江江豚 eDNA 浓度与江豚数量关系

Fig. 5 The relationship between numbers and eDNA yield of *Neophocaena phocaenoides asaeorientalis* (YFP)

径颗粒的分解与其中 eDNA 的降解。因此对于夏季水样, 使用 5 μm 滤膜抽滤仍可以得到较高的获取效率。

3.2 水样储存方法和时间对 eDNA 提取效率的影响

水样中的 eDNA 会被微生物的胞外酶降解, 储存温度则是影响降解速率的关键因素。取样后 24 h 内水样 eDNA 浓度差异不显著, 因此将水样

集中采集、短暂放置、现场处理的取样方法是可行的。而之后从冷藏条件下保存的水样中将提取到浓度更高的 eDNA; 采样保存 48 h 后, eDNA 降解速率显著增加, 浓度急剧下降, 最终会在 312 h 内降低到检测阈值以下。因此, 当长江水样不能立即处理, 可在冷藏条件下短期保存 48 h, 但不宜长期保存。水样的储存与处理是 eDNA 技术应用于不同水环境时十分关键的阶段, 将会显著影响 eDNA 的获取。Hinlo 等^[31]对河流水样保存的研究显示出相似的结论, 但首次冻融会显著降低 eDNA 浓度, 对低密度水生生物的检出率与生物量评估造成误差; 而实验室养殖下保存的水样在保存 28 d 后仍可检测到泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*) eDNA。这种差异源自于保存水样自身的特性, 微生物群体的组成、pH、光照强度、生化需氧量等诸多因素都会影响 eDNA 的降解, 从而导致水样保存的不同结果^[32-33]。

3.3 eDNA 的检测成功率

在 eDNA 技术的应用中, 应严格控制试验条件, 避免污染, 其中解除假阳性与假阴性结果对最后检测结果的判断尤为重要, 特别是在荧光定

量 PCR 过程中须设定阴性和阳性对照^[34-35]。由于目标生物 DNA 在总 eDNA 中含量极少,而其余非目标 DNA 和非 DNA 物质都是潜在的 PCR 抑制物,易形成假阴性扩增。水样在采集时也需要避免污染,对设备进行消毒灭菌,并增加检测阴性水样为对照,可以有效排除采样、抽滤、保存过程中污染的发生。将 eDNA 技术的各阶段分配在不同实验室内进行,可以避免交叉污染。无论水域中目标生物密度高低都会出现低检出率或不稳定的检出率,这表明 eDNA 在水域的分布并不均匀,呈斑片状分布,这与 Eichmiller 等^[36]的研究报道相同。为保证检测的成功率和可靠性,须增加检测点的重复数,另外提高抽滤水样量也能确保获取到的样品 eDNA 浓度不会低于检测的最低阈值。

3.4 eDNA 技术与长江江豚保护

长江江豚是国家二级保护动物,鉴于其体型特性与生活习性,难以在其体内或体表进行标记跟踪,许多传统的调查方法也因此受到限制。长江流域覆盖广阔,长江江豚的分布是分散且难以掌握的,因此对长江江豚进行准确定位,实时跟踪、长期监测都是非常困难的。本研究的应用结果显示,在观察到长江江豚出现的水域,均能检测到其 eDNA,而在未观察到的水域也能检测出长江江豚 eDNA 的存在,这表明该技术可应用于长江浑浊流动水域长江江豚的分布调查与栖息地监测。随着观测到水域中长江江豚数量的增加,其水样中长江江豚 eDNA 浓度也显著增加,这表明两者之间存在着非常明确的正相关关系,通过检测水域中长江江豚 eDNA 浓度可以判断水域中目标生物相对生物量的高低。在镇江保护区下游采集的夏季水样中长江江豚 eDNA 浓度显著高于冬季,因为夏季 eDNA 具有更高的降解速率,但此时期长江江豚的交配、摄食、抚幼等行为更活跃,会向环境释放更多的 eDNA。因此夏季更适合应用 eDNA 技术对长江流域的长江江豚进行分布调查。Takahara 等^[37]同样研究发现鲤(*Cyprinus carpio*)在生理活动频繁的时期或受到环境胁迫时释放的 DNA 会显著增加。环境中 eDNA 含量的变化具有较高的即时性和客观性^[38]。在长江江豚

不活跃的冬季,水样中 eDNA 浓度较低,因此可应用该技术监测自然环境中长江江豚的生理状况,通过检出 eDNA 浓度的升高变化,可迅速发现长江中受伤或生理异常的长江江豚^[39]。

利用 eDNA 技术调查成本低、周期短、检测灵敏准确性高的优势,在长江流域长江江豚栖息地或保护区内设立监测点可长期持续地监测水域中其种群分布、数量变化、个体生理状态等,为就地保护、迁地保护、人工繁殖等保护措施的实施提供重要依据^[40]。

参考文献:

- [1] Xu P, Liu K, Xu D P, et al. Current status and research prospect of Yangtze finless porpoise[J]. Scientific Fish Farming, 2017(5): 1-3. [徐跑, 刘凯, 徐东坡, 等. 长江江豚的保护现状及研究展望[J]. 科学养鱼, 2017(5): 1-3.]
- [2] She Y R, Chao M, Quan W M, et al. Fish community diversity analyses in the Yangtze River estuary, China[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(6): 1051-1059. [史赞荣, 晁敏, 全为民, 等. 长江口鱼类群落的多样性分析[J]. 中国水产科学, 2012, 19(6): 1051-1059.]
- [3] Mei Z G, Huang S L, Hao Y J, et al. Accelerating population decline of Yangtze finless porpoise (*Neophocaena asiaeorientalis asiaeorientalis*)[J]. Biological Conservation, 2012, 153: 192-200.
- [4] Zhang X F, Wang K X. Population viability analysis for Yangtze finless porpoise[J]. Acta Ecologica Sinica, 1999, 19(4): 529-533. [张先锋, 王克雄. 长江江豚种群生存力分析[J]. 生态学报, 1999, 19(4): 529-533.]
- [5] Ding W. Population status, threats and conservation of the Yangtze finless porpoise[J]. Chinese Science Bulletin, 2009, 54(19): 3473-3484.
- [6] Lambert G I, Jennings S, Kaiser M J, et al. Quantifying recovery rates and resilience of seabed habitats impacted by bottom fishing[J]. Journal of Applied Ecology, 2015, 51(5): 1326-1336.
- [7] Xu H, Luo Q, Li Y, et al. Applications of environmental DNA approaches to ecological researches[J]. Biotechnology Bulletin, 2014(10): 49-55. [徐浩, 罗茜, 李云, 等. 环境 DNA 研究技术及其在生态学领域的应用[J]. 生物技术通报, 2014(10): 49-55.]
- [8] Shaw J L A, Clarke L J, Wedderburn S D, et al. Comparison of environmental DNA metabarcoding and conventional fish survey methods in a river system[J]. Biological Conservation, 2016, 197(1): 131-138.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Jerde C L, Mahon A R, Chadderton W L, et al. "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA [J]. Conservation Letters, 2011, 4(2): 150-157.
- [12] Rees H C, Maddison B C, Middleditch D J, et al. The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology[J]. Journal of Applied Ecology, 2015, 51(5): 1450-1459.
- [13] Stewart K, Ma H J, Zheng J S, et al. Using environmental DNA to assess population-wide spatiotemporal reserve use[J]. Conservation Biology, 2017, 31(5): 1173-1182.
- [14] Pilliod David S, Goldberg Caren S, Arkler Robert S, et al. Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples[J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2013, 70(8): 1123-1130.
- [15] 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.
- [16] Deiner K, Altermatt F. Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river[J]. PLoS ONE, 2014, 9(2): e88786.
- [17] Dai L L, Gong Y C, Feng W S, et al. Community structure of zooplankton and its relationship to survivability of Yangtze dolphin in Zhenjiang Yangtze dolphin nature reserve, Jiangsu Province[J]. Journal of Hydroecology, 2011, 32(5): 30-36. [代梨梨, 龚迎春, 冯伟松, 等. 江苏镇江长江豚类保护区浮游动物群落结构特征及江豚生存状况评估[J]. 水生生态学杂志, 2011, 32(5): 30-36.]
- [18] Mei Z G, Chen M, Li Y T, et al. Habitat preference of the Yangtze finless porpoise in a minimally disturbed environment[J]. Ecological Modelling, 2017, 353: 47-53.
- [19] Zhao X J, Barlow J, Taylor B L, et al. Abundance and conservation status of the Yangtze finless porpoise in the Yangtze River, China[J]. Biological Conservation, 2008, 141(12): 3006-3018.
- [20] Geerts A N, Boets P, Van den Heede S, et al. A search for standardized protocols to detect alien invasive crayfish based on environmental DNA (eDNA): A lab and field evaluation[J]. Ecological Indicators, 2018, 84: 564-572.
- [21] Foote A D, Thomsen S, Sveegaard S, et al. Testing the potential use of environmental DNA (eDNA) for genetic monitoring of marine species[J]. PLoS ONE, 2012, 7(8): e41781.
- [22] Yamanaka H, Minamoto T. The use of environmental DNA of fishes as an efficient method of determining habitat connectivity[J]. Ecological Indicators, 2016, 62(1): 147-153.
- [23] Associa A P. Concise Rules of APA Style[M]. American Psychological Association, 2011: 254-255.
- [24] Rees H C, Maddison B C, Middleditch D J, et al. The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology[J]. Journal of Applied Ecology, 2015, 51(5): 1450-1459.
- [25] Taberlet P, Coissac E, Hajibabaei M, et al. Environmental DNA[J]. Molecular Ecology, 2012, 21(8): 1789-1793.
- [26] Minamoto T, Naka T, Moji K, et al. Techniques for the practical collection of environmental DNA: filter selection, preservation, and extraction[J]. Limnology, 2016, 17(1): 23-32.
- [27] Evans N T, Lamberti G A. Freshwater fisheries assessment using environmental DNA: A primer on the method, its potential, and shortcomings as a conservation tool[J]. Fisheries Research, 2017, 197(1): 60-66.
- [28] 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 and Aquatic Sciences, 2013, 70(4): 522-526.
- [29] Robson H L, Noble T H, Saunders R J, et al. Fine tuning for the tropics: application of eDNA technology for invasive fish detection in tropical freshwater ecosystems[J]. Molecular Ecology Resources, 2016, 16(4): 922-932.
- [30] Turner C R, Barnes M A, Xu C C Y, et al. Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA[J]. Methods in Ecology and Evolution, 2014, 5(7): 676-684.
- [31] Hinlo R, Gleeson D, Lintermans M, et al. Methods to maximise recovery of environmental DNA from water samples[J]. PLoS ONE, 2017, 12(6): e0179251.
- [32] Gomes G B, Hutson K S, Domingos J A, et al. Use of environmental DNA (eDNA) and water quality data to predict protozoan parasites outbreaks in fish farms[J]. Aquaculture, 2017, 479: 467-473.
- [33] Buxton A S, Groombridge J J, Griffiths R A, et al. Is the detection of aquatic environmental DNA influenced by substrate type?[J]. PLoS ONE, 2017, 12(8): e0183371.
- [34] Bohmann K, Evans A, Gilbert M T, et al. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring[J]. Trends in Ecology and Evolution, 2014, 29(6): 358-367.
- [35] Thomsen P F, Kielgast J, Iversen L L, et al. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA[J]. Molecular Ecology, 2012, 21(11): 2565.
- [36] Eichmiller J J, Bajer P G, Sorensen P W. The relationship between the distribution of common carp and their environmental DNA in a small lake[J]. PLoS ONE, 2014, 9(11): e112611.
- [37] Takahara T, Minamoto T, Yamanaka H, et al. Estimation of

- fish biomass using environmental DNA[J]. PLoS ONE, 2012, 7(4): e35868.
- [38] Pompanon F, Coissac E, Taberlet P. Metabarcoding, a new way of analyzing biodiversity[J]. Biofutur, 2011, 319: 30-32.
- [39] Eichmiller 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.
- [40] Polley L, Thompson A. Parasites and wildlife in a changing world[J]. Trends in Parasitology, 2015, 31(4): 123-124.

The application of environmental DNA in the monitoring of the Yangtze finless porpoise, *Neophocaena phocaenoides asaeorientalis*

WU Yunsheng¹, TANG Yongkai², LI Jianlin², LIU Kai², LI Hongxia², WANG Qin¹, YU Juhua^{1,2}, XU Pao^{1,2}

1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214128, China;

2. Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214128, China

Abstract: The Yangtze finless porpoise, *Neophocaena phocaenoides asaeorientalis* (YFP) is the flagship of aquatic protection species in the Yangtze River in China. The number of Yangtze finless porpoises is continuously decreasing because their living conditions are affected by human factors. Determining the distribution of the finless porpoises is necessary to protect them; however, surveys all along the Yangtze River are time-consuming and expensive. Environmental DNA (eDNA) technology used for the detection of organisms is economical, efficient, accurate, sensitive, and non-invasive and can narrow the scope of investigation, which allows limited conservation funds to be used more efficiently. It has already been applied to detect and estimate the distribution of endangered or invasive aquatic species. Environmental DNA technology often deals with a small amount of degraded and short DNA fragments, which implies that maximizing the eDNA yield is required to improve the accurate detection of the target organism from turbid stream systems. In this study, we compared the effects of four different pore-sized filters (10 μm , 5 μm , 1 μm , 0.45 μm) on the filtration time of eDNA during its extraction from stream water. Also, we compared the eDNA yield from water samples stored under two different conditions (room temperature 20 $^{\circ}\text{C}$, refrigerated 4 $^{\circ}\text{C}$) over a 14 day period. Results showed that the target eDNA was detected from the four different pore-sized filters; however, the filtration time was negatively correlated with the pore sizes of the filters. Considering the filtration time, the combination of a large pore-sized filter (5 μm) and a high volume of water (1 L) from the samples is a good choice to extract eDNA from the Yangtze River. Different storage methods and times significantly affected the eDNA yield. Thus, our results also support the recommendation that the water samples from the Yangtze River should be filtered within 6 hours of collection at room temperature or be stored at 4 $^{\circ}\text{C}$ for a short period of time (i.e., 48 hours). The eDNA concentration in the water samples dropped below the threshold for detection when they were stored at room temperature for 10 days or at 4 $^{\circ}\text{C}$ for 14 days; thus, the eDNA in the water samples is not suited for long-term preservation. Compared with traditional field investigations, the eDNA survey exhibited a 100% detection rate from the Yangtze river in the Jiangsu Province where the finless porpoise has emerged. Three positive results were also detected from 10 survey points where the finless porpoise has not yet been observed. The fitted curve between the number of finless porpoises and the eDNA yield was built to estimate the biomass of the porpoises within an area of water. Although eDNA production and degradation is affected by many environmental factors such as temperature, pH, and microbial communities, the technology was still more sensitive than traditional field investigations for the detection of the Yangtze finless porpoise in the Yangtze River.

Key words: *Neophocaena phocaenoides asaeorientalis*; environmental DNA; detection technology; distribution; biomass estimation

Corresponding author: XU Pao, E-mail: xup@ffrc.cn; YU Juhua, E-mail: yujh@ffrc.cn