

# 环境 DNA 技术在渔业资源生物量评估中的研究进展：现状与展望

刁曹璿<sup>1,2</sup>, 王 闻<sup>3,4</sup>, 线薇薇<sup>1,2,5</sup>, 张 辉<sup>1,2,5</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所 海洋生态与环境科学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 齐鲁工业大学(山东省科学院)山东省科学院海洋仪器仪表研究所, 山东 青岛 266100; 4. 山东省海洋仪器仪表科技中心有限公司, 山东 青岛 266100; 5. 中国科学院海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071)

**摘要:** 近年来, 由于过度频繁的人类活动, 导致全球渔业资源正遭受威胁。与传统渔业评估方法相比, 环境 DNA(eDNA)技术具有操作简便、侵入性低、灵敏度高等优点, 因而在渔业资源评估中应用广泛。eDNA 技术在物种丰度和生物量评估中已经被证明是可行的, 本文总结了 eDNA 技术在渔业资源生物量评估中的研究现状, 从 eDNA 技术与传统方法互补性、eDNA 浓度影响因素及模型、生物量定量模型等方面展开阐述, 并对以后的研究方向提出新思路, 为 eDNA 技术在渔业资源生物量评估中应用提供参考。

**关键词:** 环境 DNA; 渔业资源; 生物量评估; 生态保护

**中图分类号:** P735 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2022)02-0135-10

**DOI:** 10.11759/hyxx20210409002

由于网箱养殖、过度捕捞等一系列人类活动, 导致全球渔业资源正在遭受威胁。因此, 调查渔业资源现状并采取相应措施势在必行, 有效的渔业管理依赖于对物种的定性和定量评估。在过去的几十年中, 水生生物的调查大多采用选择性和侵入性的传统方法, 包括直接观察、拖网捕捞、陷阱诱饵、电气捕鱼、声波测量等<sup>[1]</sup>, 这些方法大多局限于商业物种和特定区域, 而且成本高、费时费力、难度较大, 一些鱼类游动快速且能挣脱渔网, 使用传统方法效率极低<sup>[2]</sup>。由于鱼类对人类干扰敏感, 长期使用传统方法进行渔业资源评估, 不但会影响鱼类生存, 而且会破坏生态环境。

环境 DNA(environmental DNA, eDNA)是指直接从环境样本, 如土壤、沉积物、排泄物、空气、水体等中获得的遗传物质, 不存在任何明显的生物源物质——是一种有效的、非侵入性的、易于标准化的方法<sup>[3]</sup>。这些环境中的遗传物质主要来源于线粒体 DNA 和核 DNA, 包括脱落的肠细胞、皮肤细胞、尿液、粘液、卵子或精子等<sup>[4-5]</sup>。

环境 DNA 技术是指从环境样本中直接提取 DNA 片段后进行定性和定量研究<sup>[6]</sup>。在水生环境中, eDNA 技术主要应用于单一物种定性分析, 物种多

样性研究以及生物量定量评估等方面, 具有操作简便、侵入性低、灵敏度高等优点, 在渔业资源评估中应用广泛。

eDNA 技术早期应用于研究环境微生物<sup>[7]</sup>; Ficetola 等<sup>[8]</sup>首次将其应用到大型水生生物中——追踪水体中入侵的美国牛蛙; 随后, 利用 eDNA 技术进行目标种的监测取得了一定进展, 包括追踪入侵物种<sup>[8-10]</sup>、监测濒危物种<sup>[11-13]</sup>等。一方面, 物种入侵导致生物多样性丧失、生态系统退化等一系列问题, 另一方面, 利用传统方法很难检测到低浓度物种, 因此, eDNA 技术的推广可以有效提高物种检出率。随着 eDNA 技术日益成熟, eDNA 技术的应用从单一物种

收稿日期: 2021-04-09; 修回日期: 2021-04-29

基金项目: 国家自然科学基金(41976094, 42090044); 中国科学院海洋大科学研究中心重点部署项目(COMS2019Q14); 江苏省面上项目(BK20201212); 广西防城港市科技计划(防科 AB20014024)

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, Nos. 41976094, 42090044; Key Deployment Project of Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, No. COMS2019Q14; Natural Science Foundation of Jiangsu Province, No. BK20201212; S&T Program of Fangchenggang, No. Fangke AB20014024]

作者简介: 刁曹璿(1998—), 女, 江苏南通人, 硕士研究生, 主要研究方向为渔业生态, E-mail: cydiao7788@163.com; 张辉(1986—), 通信作者, 研究员, 主要研究方向为渔业生态, E-mail: zhanghui@qdio.ac.cn

的检测逐渐过渡到探索生物多样性,人们对湖泊、河流等淡水系统的研究日趋成熟<sup>[14]</sup>,海洋等开放水体也逐渐成为重点研究对象,Thomsen 等<sup>[15]</sup>首次将高通量测序应用到海洋生物多样性的研究中,在丹麦海水样品中检测到传统方法难以检测到的稀有种以及四种鸟类。由于 eDNA 技术易操作、准确性高,因而被运用到越来越多的研究中,包括物种生活史<sup>[16]</sup>、种群遗传多样性及群落能量流动<sup>[17]</sup>等领域。近年来,国内也逐渐开展相关研究,主要集中在长江中下游及东部沿海区域。刘军等<sup>[18]</sup>筛选出适用于 eDNA 研究的鱼类通用引物,表明 16S rRNA 适用于鱼类群落结构的研究;李苗等<sup>[19]</sup>建立并优化了基于 eDNA 的中国对虾生物量评估的检测技术;徐念等<sup>[20]</sup>在长江中下游利用 eDNA 技术检测到 15 种鱼类;Zhang 等<sup>[21]</sup>利用 eDNA 技术首次在长江口及邻近海域监测鱼类群落,研究表明,鱼类群落不同季节间存在显著差异;在此基础上,Jia 等<sup>[22]</sup>调查了长江口鱼类群落年度变化,结果与之前一致。目前,eDNA 技术已检测到水生生态系统中两栖动物、硬骨鱼类<sup>[23]</sup>以及海洋哺乳动物<sup>[24]</sup>等不同物种组成,证明 eDNA 技术可以作为生物监测的补充工具,应用于不同时间和空间尺度上水生生物的生态研究和渔业管理。此外,陈治等<sup>[25]</sup>优化了高浊度水样 eDNA 的获取方法;张辉和线薇薇开发了一种收集海水中 eDNA 的装置<sup>[26]</sup>,为水样采集及 eDNA 提取提供了借鉴参考,推动了 eDNA 技术的发展。

## 1 环境 DNA 的操作流程

eDNA 的操作流程(图 1)主要分为 4 个步骤:水样采集、eDNA 样品收集、eDNA 提取和 eDNA 检测。

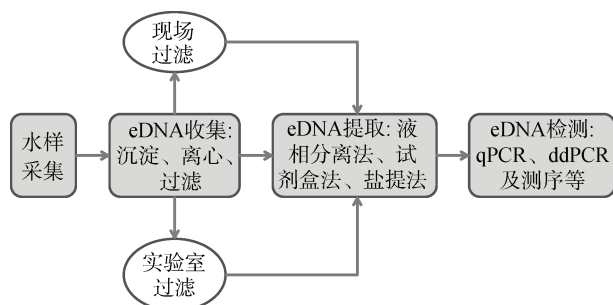


图 1 eDNA 的操作流程  
Fig. 1 Workflow of eDNA analysis

### 1.1 水样采集

水样采集需要考虑采样水深、样本体积及样本

重复等问题,通常根据研究目的、水体质量及目标种丰度来考虑。大多数研究在采集水样时选择表层水,而有些物种在不同生命阶段、不同季节生活在不同水深<sup>[27]</sup>。因此,在采集水样前,要对目标种的产卵、觅食等时空季节分布进行调查,以及横向与纵向相结合的方法采样。一般来说,采集的水样体积为 1~2 L<sup>[28]</sup>,如果目标种分布范围广或丰度低,应该扩大采样范围和水体体积<sup>[29]</sup>。为提高物种检测率和降低实验偶然性,每个水体通常采集 3 个样本<sup>[15, 30]</sup>。

### 1.2 eDNA 样品收集

收集 eDNA 样品的方法包括沉淀、离心和过滤<sup>[31]</sup>。当水体体积较小时,样品中 eDNA 浓度较高,可以选择沉淀法收集样品<sup>[32]</sup>;过滤能处理较大体积的水体,收集到更多样品,因此,一般采用过滤或离心过滤相结合的方法来收集 eDNA 样品。根据滤膜材质不同,可以分为硝酸纤维素、混合纤维素酯、玻璃纤维、聚碳酸酯和尼龙过滤器等,滤膜孔径从 0.2  $\mu\text{m}$  到 12  $\mu\text{m}$  不等,孔径小的过滤器回收率高,对生物量变化更敏感<sup>[33-34]</sup>。选择合适的过滤器对量化鱼类丰度起到重要作用<sup>[35]</sup>,其中,eDNA 样品收集中最常用的是 0.7  $\mu\text{m}$  玻璃纤维过滤器(图 2)。

对于一些较为偏远的采样地,可以选择现场过滤,防止水样在运输过程中受到污染并降低成本;对于浑浊度较高、采集体积大的水样,选择实验室过滤,在避光、无菌条件下将水样从现场运回实验室,运输过程中可以使用乙醇<sup>[36]</sup>保存以减少污染,为了防止 DNA 降解,eDNA 样品收集后一般于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  储存。

### 1.3 eDNA 提取

eDNA 提取包括盐提法<sup>[33]</sup>、液相分离法(即十六烷基三甲基溴化镍(CTAB)提取法和苯酚-氯仿-异戊醇(PCI)提取法)和试剂盒提取法<sup>[37]</sup>(图 3)。尽管试剂盒的成本较高,但试剂盒提取法操作简单且便于回收<sup>[38]</sup>,能够实现自动化和高通量,因此,试剂盒提取是 eDNA 提取的主要方法,目前使用的 DNA 提取试剂盒包括 DNeasy Blood and Tissue Kit、PowerWater DNA Isolation Kit、PowerSoil DNA Isolation Kit 和 Gmax Mini genomic DNA kit 等,其中最常用的是 DNeasy Blood and Tissue Kit,为获得更多的 eDNA,可以在标准方案中添加蛋白酶 K 处理<sup>[3, 39]</sup>。

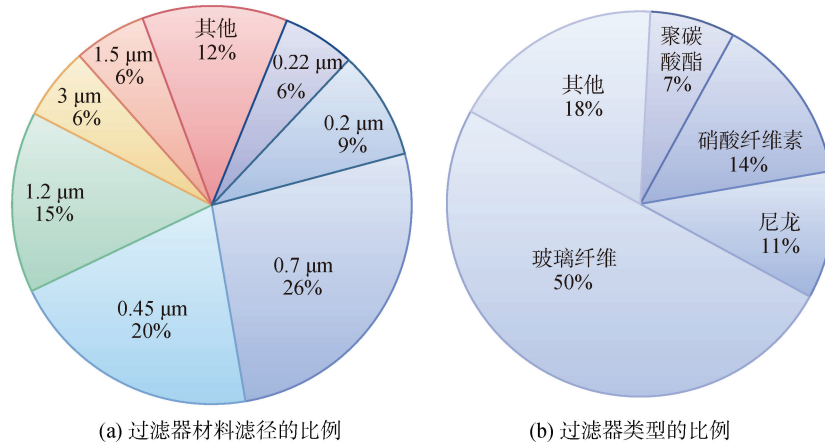


图 2 从水样中收集 eDNA 的方法的过滤器材料滤径的比例和过滤器类型的比例

Fig. 2 eDNA collection methods from water samples. (a) Proportion of pore sizes of filters. (b) Proportion of filter types.

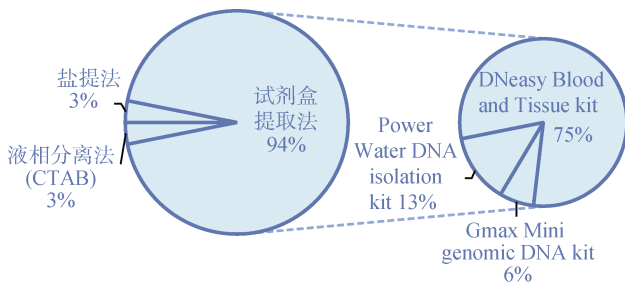


图 3 不同 eDNA 提取方法的使用比例

Fig. 3 Proportion of different eDNA extraction methods

### 1.4 eDNA 检测

eDNA 检测包括单一物种特异性检测和多个物种非特异性检测。特异性检测方法主要包括: 多聚酶链反应 (PCR)、实时荧光定量 PCR (qPCR) 及微滴度 PCR (ddPCR) 等。PCR 反应结果为阳性, 说明样品中有目标种, 反之则为阴性; qPCR 是物种特异性检测的主要方法, 扩增量超过荧光阈值为阳性, 反之则为阴性<sup>[17]</sup>; ddPCR 是第三代 PCR 技术, 通俗来讲就是将 PCR 反应分成数千个液滴, 并检测每个液滴的扩增, 从而实现直接定量目标 DNA, 与 qPCR 相比, ddPCR 对目标种的定量更准确<sup>[40]</sup>。物种特异性标记主要选择线粒体基因组 (Mitochondrial DNA, mtDNA), 包括 *Cytb* 基因、*COI* 基因、*D-loop* 区、*ND5*、*12S* rRNA 和 *16S* rRNA 等片段 (图 4), 其中, 应用最广泛的是 *Cytb* 基因, Doi 等<sup>[40]</sup>、Janosik 等<sup>[41]</sup> 和 Yamamoto 等<sup>[42]</sup> 分别结合不同检测方法 (即 PCR、ddPCR 和 qPCR) 对特定物种 *Cytb* 基因拷贝数进行定量; Knudsen 等<sup>[2]</sup> 和 Salter 等<sup>[43]</sup> 将 *COI* 基因和 *D-loop* 区与 qPCR 相结合, 分别将其运用到丹麦周围不同海区的生物量评估研究中, 而 *12S* rRNA 和 *16S* rRNA 主要与 PCR

结合进行特异性物种检测, 并且在海洋中应用较少, 研究集中在控制生态系实验和河流等淡水流域<sup>[44-45]</sup>。

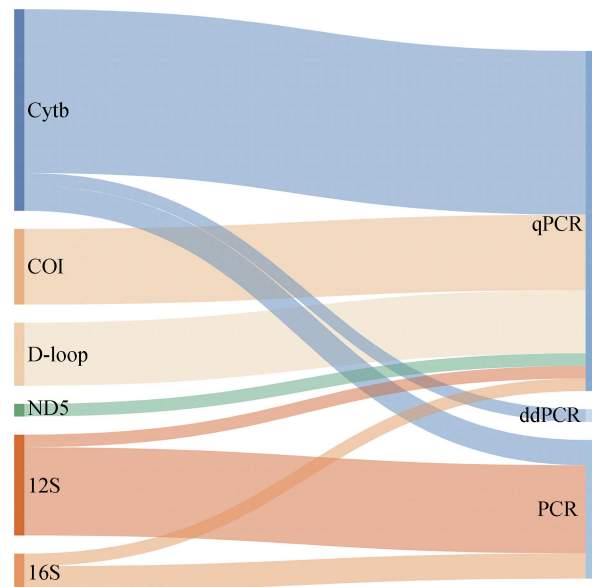


图 4 eDNA 研究中常用的特异性标记及其检测方法

Fig. 4 Specific genetic markers and detection methods for eDNA research

在进行多个物种检测时, 主要利用环境 DNA 宏条形码技术 (eDNA metabarcoding), 通过结合宏条形码技术和高通量测序 (即第二代测序, High-throughput sequencing) 来设计通用引物进行 PCR 扩增, 其中, 目标基因主要是 *12S* rRNA, 扩增长度为 100~460 bp (表 1), 扩增的 DNA 片段与物种相匹配为阳性, 反之则为阴性, 对扩增的 DNA 片段进行测序, 利用测序读数与 eDNA 组成之间的关系来研究物种丰度, 具有高效、低成本的优势。

表 1 用于鱼类群落研究的通用引物及目标基因

Tab. 1 Universal primers and Target genes used for the research of fish community

研究对象	参考文献	引物名称	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')	目标基因	扩增子长度/bp
8 种淡水鱼和 1 种两栖动物	[46]	Ac12S	ACTGGGATTAGATACCCCACTA TG	GAGAGTGACGGGCGGTGT	<i>Cytb</i> 、12S rRNA、16S rRNA	385
		Am12S	AGCCACCGCGTTATACG	CAAGTCCTTTGGGTTTTAAGC		241
		Ac16S	CCTTTTGCATCATGATTAGC	CAGGTGGCTGCTTTTAGGC		330
		Ve16S	CGAGAAGACCCTATGGAGCTTA	AATCGTTGAACAAACGAACC		310
淡水鱼	[47]	12S-V5	ACTGGGATTAGATACCCC	TAGAACAGGCTCCTCTAG	12S rRNA、 <i>Cytb</i>	106
		L14841/H15149	AAAAAGCTTCCATCCAACATCT CAGCATGATGAAA	AAACTGCAGCCCCCTCAGAATG ATATTTGTCTCA		460
淡水鱼	[48]	12S-V5	ACTGGGATTAGATACCCC	TAGAACAGGCTCCTCTAG	12S rRNA	106
8 种海洋鱼类	[49]	12S-V5	ACTGGGATTAGATACCCC	TAGAACAGGCTCCTCTAG	12S rRNA	106
海洋鱼类	[15]	Teleo	ACACCGCCCGTCACTCT	CTTCCGGTACACTTACCATG	12S rRNA	100
海洋鱼类	[50]	MiFish-U	GTCGGTAAACTCGTGCCAGC	CATAGTGGGGTATCTAATCCC AGTTTG	12S rRNA	163~185

## 2 环境 DNA 在生物量评估中的研究

渔业资源评估不仅需要进行物种定性及生物多样性研究；而且需要定量评估物种丰度和生物量，这也将成为 eDNA 研究的重要前沿。近年来，人们对于淡水的研究较多，而海洋环境条件更为复杂，研究起来十分困难，因此，相较于淡水系统，人们对海洋的研究较少。

### 2.1 eDNA 在生物量研究中的进展

利用 eDNA 技术评估生物量主要采用两种方法(表 2)，一是量化 eDNA 浓度与生物量之间的关系，大量研究证明了 eDNA 浓度与物种丰度和生物量之间存在着正相关，例如，Takahara 等<sup>[30]</sup>的水族箱和池塘实验证明了 eDNA 浓度与鲤鱼生物量之间呈正相关，并用此方法估算天然泻湖中鲤鱼的生物量和分

布；Lacoursiere-Roussel 等<sup>[51]</sup>用 eDNA 浓度量化了湖鱒的相对丰度；Tillotson 等<sup>[52]</sup>研究表明，eDNA 浓度与鲑鱼数量密切相关等。在海洋等开放水体中，由于 eDNA 源和汇的机制尚不明确以及 eDNA 浓度受多种因素影响，有时会产生不同的研究结果，Salter 等<sup>[43]</sup>定量得到的 eDNA 浓度与大西洋鳕鱼生物量一致；Knudsen 等<sup>[2]</sup>研究表明，eDNA 浓度和波罗的海 6 种鱼主要丰度之间有一定关联，但与拖网捕获的生物量之间没有显著的相关性；Yamamoto 等<sup>[42]</sup>将时间和空间因素考虑在内，实现 eDNA 定量评估鱼类丰度的目标。这表明，eDNA 可以作为物种丰度或生物量的粗略指标，适当考虑生物和非生物因素能提高 eDNA 定量评估的准确性。eDNA 定量分析的优势在于可以比较 eDNA 浓度的时空变化，有助于实时掌握水体中物种生物量的变动趋势。

表 2 eDNA 技术评估生物量的研究方法及其优缺点总结

Tab. 2 Summary of research methods and advantages and weaknesses based on eDNA technology in biomass evaluation

研究方法	水体类型	研究对象	国家	参考文献	优势	不足
测序读数	淡水	淡水鱼类群落、两栖动物	美国、英国	[46-47]	测序操作简便高效	PCR 和测序过程中的随机性或偏差
	海洋	海洋鱼类群落	丹麦、日本	[15, 50]		
eDNA 浓度	淡水	鲤鱼、鳟鱼、鲑鱼及两栖类等	美国、日本、加拿大、澳大利亚	[33, 40, 54-55]	易于比较 eDNA 浓度的时空变化，以便掌握物种生物量变动趋势	难以控制影响 eDNA 浓度的生物及非生物因素
	海洋	竹荚鱼、鳕鱼、鲭鱼等	美国、丹麦、日本	[2, 42, 56]		

评估水生生态系统生物量的另一实践是 eDNA 技术与高通量测序相结合,利用测序读数来评估生物量<sup>[48,53]</sup>。Thomsen 等<sup>[15]</sup>等首次将其应用到海洋中,证明了测序读数和海洋鱼类丰度具有一致性。由于 PCR 抑制,即使 eDNA 丰度是生物丰度或生物量的指标,高通量测序获得的测序读数也可能不是 eDNA 丰度的指标,因此,宏条形码技术在研究物种丰度和生物量方面具有一定挑战。Kelly 等<sup>[49]</sup>和 Evans 等<sup>[46]</sup>的研究表明,序列读数与丰度之间存在很弱的正相关性;之后, Hanfling 等<sup>[47]</sup>假设采样、PCR 和测序过程没有显著偏差,测序读数可以作为一个有效评估丰度的方法,然而,在实践中发现,测序读数和丰度之间关系复杂,假设很难实现。最近, Ushio 等<sup>[50]</sup>将内标 DNA 添加到 eDNA 样品中,利用 eDNA 技术同时对多种鱼类 eDNA 进行定量,并考虑了 PCR 抑制的影响,结果证明这种方法比 qPCR 定量更准确、高效。

## 2.2 eDNA 技术与传统方法相结合

长期以来,人们采用直接观察、拖网捕捞、陷阱诱饵、电气捕鱼、声波测量等传统方法进行渔业资源调查,然而,传统方法只能掌握种群实时分布,且不可重复。eDNA 技术能检测到过去几天甚至几周内的物种脱落物,且可多次重复、减少误差,然而,由于物种脱落物可能随着水流流向任何位置,甚至沉入水底,形成沉积物,因而导致物种丰度产生明显的偏差。

近年来,大多数研究将传统方法与 eDNA 技术相结合,证明了 eDNA 技术在评估物种丰度和生物量方面的有效性。在淡水系统中, Pilliod 等<sup>[54]</sup>评估了美国爱荷达州小溪中的尾蛙和大鲵的丰度,在种群密度较低的情况下,eDNA 的检出率比传统检测方法略高; Lacoursiere-Roussel 等<sup>[51]</sup>利用 eDNA 估算加拿大湖鲑的丰度,结果与传统刺网渔获量一致; Itakura 等<sup>[44]</sup>定量评估了日本鳗丰度,减少电钓给生物带来的损害; Yates 等<sup>[57]</sup>结合标记重捕法评估美洲红点鲑丰度。在海洋生态系统中, Salter 等<sup>[43]</sup>检测到大西洋鳕鱼 eDNA 丰度与拖网渔获量高度一致; Thomsen 等<sup>[58]</sup>在对格陵兰岛深海鱼类的研究中也得出同样的结论,降低拖网成本; Yamamoto 等<sup>[42]</sup>结合定量回声测深仪估算日本舞鹤湾竹荚鱼生物量,声波测量是一种有效的检测手段,但在遇到障碍物时很难检测,因此, eDNA 技术可以成为传统方法的有力补充。

## 2.3 eDNA 浓度影响因素及相关模型

eDNA 浓度与脱落率和衰变率有关, eDNA 在水中脱落和衰变受到多种生物因素和非生物因素影响<sup>[59]</sup>。eDNA 脱落率与物种数量和质量有关,一般来说,成鱼的 eDNA 释放率是幼鱼的 3~4 倍<sup>[38]</sup>,当鱼类进行捕食、产卵等活动时,可能导致 eDNA 浓度在短时间内急剧变化<sup>[60]</sup>; eDNA 衰变率取决于 DNA 片段长度, DNA 片段越长,衰变越快<sup>[58]</sup>,而不同来源的 eDNA 衰变机制是一致的,每个物种 eDNA 衰变率不受其他物种影响<sup>[56]</sup>;温度是影响 eDNA 浓度的主要非生物因素,水温影响鱼类的生长代谢,从而影响 eDNA 脱落,研究表明鱼类在温水中释放的 eDNA 比在冷水中释放得多<sup>[33]</sup>,并且温度越高, eDNA 脱落和衰变速率越快<sup>[59]</sup>,因此, eDNA 能在温度较低的水体中保存一段时间。Collins 等<sup>[61]</sup>研究发现,近岸环境中 eDNA 降解速度是大洋中的 1.6 倍,与淡水相比,海洋系统一般具有较高的盐度、离子含量、pH 以及更稳定的温度,这些因素也被证明有利于 DNA 保存<sup>[62-63]</sup>。

由于 eDNA 浓度的不确定性影响生物量定量研究,因此,人们开始构建相关模型来研究 eDNA 浓度变化。Takahara 等<sup>[30]</sup>利用一般线性模型分析 eDNA 浓度与 6 个环境因子之间的关系; Thomsen 等<sup>[15]</sup>首次构建海水中鱼类 eDNA 指数衰变模型, Tsuji 等<sup>[39]</sup>在此基础上拓展了水温效应; Cerco 等<sup>[64]</sup>构建了 eDNA 归趋模型来量化 eDNA 浓度; Nukazawa 等<sup>[65]</sup>根据 eDNA 衰变实验得出衰变常数,构建模型模拟 eDNA 释放和降解; Schultz<sup>[66]</sup>使用贝叶斯预测模型估算 eDNA 浓度,并在亚洲鲤鱼中得到验证。此外,为了防止取样后的降解,可以进行回归分析校正 eDNA 浓度。

## 2.4 生物量定量相关模型

为了更好地掌握渔业资源的动态变化,人们致力于构建生物量定量的相关模型来研究 eDNA 浓度与物种丰度和生物量之间关系。Sassoubre 等<sup>[56]</sup>建立拉格朗日质量平衡模型来研究东太平洋温带水域三种海洋鱼类丰度; Doi 等<sup>[67]</sup>利用广义线性模型得出 eDNA 浓度与日本香鱼生物量之间存在正相关; Chambert 等<sup>[45]</sup>证明了负二项模型比正态分布模型定量更准确; Levi 等<sup>[68]</sup>利用泊松回归模型定量分析鲑鱼数量; Itakura 等<sup>[44]</sup>构建线性混合效应模型研究 eDNA 和日本鳗空间分布、丰度和生物量之间的关系; Knudsen 等<sup>[2]</sup>运用广义线性模型研究发现,波罗的海

6 种商业鱼类 eDNA 浓度与其主要丰度之间存在相关性; Yates 等<sup>[57]</sup>运用异速生长模型估算 eDNA 浓度与种群水平上丰度的相关性; Fukaya 等<sup>[69]</sup>在之前 Yamamoto 等人研究的基础上, 构建了数值水动力示踪模型, 并通过贝叶斯推理估算种群丰度, 而且这个方法可以被用来研究外源 DNA 的输入。

### 2.5 eDNA 技术在生物量评估中的应用

在实际中, 利用 eDNA 评估物种丰度和生物量可以进行有效的渔业资源管理。掌握商业鱼类生物量的动态变化对经济发展尤为重要, 长期以来, 通过标准化拖网调查来量化商业鱼类的数量, 导致生态环境严重破坏, 鲑鱼是淡水生态系统中的重要经济种, Tillotson 等<sup>[52]</sup>和 Levi 等<sup>[68]</sup>分别利用 eDNA 定量评估不同河流中鲑鱼丰度和生物量, 证明 eDNA 是物种丰度和生物量评估的有效工具; Salter 等<sup>[43]</sup>将其应用在海洋种大西洋鳕鱼的研究中, 也得出同样结论。一些研究将 eDNA 技术应用于评估濒危物种生物量, 例如, Mizumoto 等<sup>[70]</sup>进行日本濒危鲑鱼水族箱实验, eDNA 浓度可以作为生物量指标, 但在自然环境中应用需进一步研究; Itakura 等<sup>[44]</sup>利用 eDNA 定量研究濒危的大鳞大马哈鱼, 减少围网调查对濒危种侵入的影响, 这在维持生态系统稳定等方面具有重要意义。此外, 生态系统中一旦遭遇物种入侵, 入侵种丰度和生物量的评估是渔业管理必不可少的一个环节, Minamoto 等<sup>[71]</sup>研究了入侵虹鳟鱼及本地红点鲑鱼的分布和生物量变化, Baldigo 等<sup>[72]</sup>和 Yates 等<sup>[57]</sup>分别评估了 eDNA 定量溪鳟种群丰度的能力, 证明 eDNA 是物种丰度的可靠指标。因此, 可以通过 eDNA 定量评估入侵种丰度并采取相应措施, 从而降低入侵种对本地种的威胁。

### 2.6 eDNA 技术存在问题及优化方案

尽管 eDNA 技术日益成熟, 在渔业资源评估中发挥着重要作用, 但研究过程中出现的假阳性和假阴性是 eDNA 技术应用的巨大挑战<sup>[29]</sup>。假阳性是指检测到自然界不存在的物种; 假阴性是指自然界存在而未检测到的目标物种。引起假阳性和假阴性的因素很多, 包括 eDNA 的源和汇机制尚不明确、样品污染以及操作过程中产生的偏差等。因此, 首先对潜在的外源 DNA 源进行检测, 考虑不同发育阶段个体之间的 eDNA 释放速率的差异以及影响 eDNA 浓度的环境因子。在实验过程中, 严格操作步骤, 进行阴性对照, 减少野外和实验室污染; 此外, 增加采样强

度及 PCR 和测序重复以降低偏差。

## 3 结论与展望

eDNA 技术主要通过收集环境样本中的 DNA 片段来实现对个体到群落的定性和定量调查。它不仅检测目标物种, 调查生物多样性及其时空分布, 还可以评估种群丰度及生物量, 是渔业资源管理的有利工具。在全球范围内, 目前基于 eDNA 技术进行生物量评估的研究主要集中在美国、日本、澳大利亚等发达国家, 国内基于 eDNA 技术的相关研究主要集中在淡水等静水中, 而在海洋等开放水域中的调查相对空缺。作为海洋渔业大国, 在当前渔业资源衰退的背景下, 我国应当对 eDNA 技术推广使用, 从而在不破坏生态环境前提下更高效、有力地收集渔业资源数据, 为资源利用和生态系统保护提供技术手段。

生物量是评估生态系统健康及渔业资源可持续发展的重要指标, 基于 eDNA 技术进行生物量评估具有重要的应用价值。由于 eDNA 浓度易受到生物和非生物因素的影响, 基于 eDNA 技术的定量研究仍处于发展阶段, 因此, 研究 eDNA 的脱落率和衰变率的影响因素, 是 eDNA 定量评估的重要前提。大量研究证明对 eDNA 浓度的不确定性进行建模能提高定量评估的可靠性, 为实现在海洋等复杂多变的环境中研究提供科学依据。此外, 为提高 eDNA 技术的准确性, 相关技术手段也应当不断拓展, 从而促进其成为渔业资源监测的常规手段。但应当注意的是, 由于不能直接观察到生物体, 因此, eDNA 技术不能完全代替传统方法, 在以后的调查监测中, 两者相互补充、相互结合, 在生物量评估中共同发挥作用, 开启渔业资源调查与评估的新篇章。

#### 参考文献:

- [1] HANSEN B K, BEKKEVOLD D, CLAUSEN L W, et al. The sceptical optimist: challenges and perspectives for the application of environmental DNA in marine fisheries[J]. *Fish and Fisheries*, 2018, 19(5): 751-768.
- [2] KNUDSEN S W, EBERT R B, HESSELSON M, et al. Species-specific detection and quantification of environmental DNA from marine fishes in the Baltic Sea[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2019, 510: 31-45.
- [3] WANG S P, YAN Z G, HANFLING B, et al. Methodology of fish eDNA and its applications in ecology and environment[J]. *Science of the Total Environment*,

- 2021, 755(2): 142622.
- [4] GOLDBERG C S, STRICKLER K M, PILLIOD D S. Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms[J]. *Biological Conservation*, 2015, 183: 1-3.
- [5] HARRISON J B, SUNDAY J M, ROGERS S M. Predicting the fate of eDNA in the environment and implications for studying biodiversity[J]. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, 2019, 286(1915): 20191409.
- [6] 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*, 2018, 197: 60-66.
- [7] JUNIPER S K, CAMBON M A, LESONGEUR F, et al. Extraction and purification of DNA from organic rich subsurface sediments (ODP Leg 169S)[J]. *Marine Geology*, 2001, 174(1/4): 241-247.
- [8] 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.
- [9] TREGUIER A, PAILLISSON J M, DEJEAN T, et al. Environmental DNA surveillance for invertebrate species: advantages and technical limitations to detect invasive crayfish *Procambarus clarkii* in freshwater ponds[J]. *Journal of Applied Ecology*, 2014, 51(4): 871-879.
- [10] 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.
- [11] PIGGOTT M P. An environmental DNA assay for detecting Macquarie perch, *Macquaria australasica*[J]. *Conservation Genetics Resources*, 2017, 9(2): 257-259.
- [12] SIGSGAARD E E, CARL H, MOLLER P R, et al. Monitoring the near-extinct European weather loach in Denmark based on environmental DNA from water samples[J]. *Biological Conservation*, 2015, 183: 46-52.
- [13] LARAMIE M B, PILLIOD D S, GOLDBERG C S. Characterizing the distribution of an endangered salmonid using environmental DNA analysis[J]. *Biological Conservation*, 2015, 183: 29-37.
- [14] THOMSEN P F, WILLERSLEV E. Environmental DNA—An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity[J]. *Biological Conservation*, 2015, 183: 4-18.
- [15] 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.
- [16] 张辉, 线薇薇. 环境 DNA 技术在生态保护和监测中的应用[J]. *海洋科学*, 2020, 44(7): 96-102.
- ZHANG Hui, XIAN Weiwei. Application of environmental DNA technology in ecological conservation and monitoring[J]. *Marine Sciences*, 2020, 44(7): 96-102.
- [17] 单秀娟, 李苗, 王伟继. 环境 DNA(eDNA)技术在水生生态系统中的应用研究进展[J]. *渔业科学进展*, 2018, 39(3): 23-29.
- SHAN Xiujuan, LI Miao, WANG Weiji. Application of environmental DNA technology in aquatic ecosystem[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 23-29.
- [18] 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.
- LIU Jun, ZHAO Liangjie, FAN Yingchun, et al. Universal primer screening and verification for fish environment DNA research[J]. *Freshwater Fisheries*, 2016, 46(1): 9-17.
- [19] 李苗, 单秀娟, 王伟继, 等. 中国对虾生物量评估的环境 DNA 检测技术的建立及优化[J]. *渔业科学进展*, 2019, 40(1): 12-19.
- LI Miao, SHAN Xiujuan, WANG Weiji, et al. Establishment and optimization of environmental DNA detection techniques for assessment of *Fenneropenaeus chinensis* biomass[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(1): 12-19.
- [20] 徐念, 常剑波. 长江中下游干流环境 DNA 样本鱼类物种检测的初步研究[J]. *水生生态学杂志*, 2016, 37(5): 49-55.
- XU Nian, CHANG Jianbo. Preliminary study on fish species detection in the middle and lower Yangtze River using environmental DNA[J]. *Journal of Hydroecology*, 2016, 37(5): 49-55.
- [21] ZHANG H, YOSHIZAWA S, IWASAKI W, et al. Seasonal fish assemblage structure using environmental DNA in the Yangtze Estuary and its adjacent waters[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2019, 6: 00515.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] BOUSSARIE G, BAKKER J, WANGENSTEEN O S, et al. Environmental DNA illuminates the dark diversity of sharks[J]. *Science Advances*, 2018, 4(5): eaap9661.
- [25] 陈治, 宋娜, 源利文, 等. 舟山近海水样环境 DNA 获取方法的建立[J]. *水生生物学报*, 2020, 44(1): 50-58.
- CHEN Zhi, SONG Na, YUAN Liwen, et al. The eDNA collection method of Zhoushan coastal waters[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(1): 50-58.
- [26] 张辉, 线薇薇. 一种收集海水中环境 DNA 的装置,

- ZL201920125138.2[P]. [2019-11-12].  
ZHANG Hui, XIAN Weiwei. A device for collecting environmental DNA in seawater, ZL201920125138.2[P]. [2019-11-12].
- [27] WANG X Y, LU G Q, ZHAO L L, et al. Assessment of fishery resources using environmental DNA: The large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) in the East China Sea[J]. Fisheries Research, 2021, 235: 105813.
- [28] REES H C, MADDISON B C, MIDDLEDITCH D J, et al. REVIEW: The detection of aquatic animal species using environmental DNA - a review of eDNA as a survey tool in ecology[J]. Journal of Applied Ecology, 2014, 51(5): 1450-1459.
- [29] SHU L, LUDWIG A, PENG Z G. Standards for methods utilizing environmental DNA for detection of fish species[J]. Genes, 2020, 11(3): 296.
- [30] TAKAHARA T, MINAMOTO T, YAMANAKA H, et al. Estimation of fish biomass using environmental DNA[J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35868.
- [31] LIANG Z B, KEELEY A. Filtration recovery of extracellular DNA from environmental water samples[J]. Environmental Science & Technology, 2013, 47(16): 9324-31.
- [32] 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.
- [33] LACOURSIERE-ROUSSEL A, ROSABAL M, BERNATCHEZ L. Estimating fish abundance and biomass from eDNA concentrations: variability among capture methods and environmental conditions[J]. Molecular Ecology Resources, 2016, 16(6): 1401-1414.
- [34] EICHMILLER J J, MILLER L M, SORENSEN P W. Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish[J]. Molecular Ecology Resources, 2016, 16(1): 56-68.
- [35] LI J L, HANDLEY L J L, READ D S, et al. The effect of filtration method on the efficiency of environmental DNA capture and quantification via metabarcoding[J]. Molecular Ecology Resources, 2018, 18(5): 1102-1114.
- [36] LADELL B A, WALLESER L R, MCCALLA S G, et al. Ethanol and sodium acetate as a preservation method to delay degradation of environmental DNA[J]. Conservation Genetics Resources, 2019, 11(1): 83-88.
- [37] KUMAR G, EBLE J E, GAITHER M R. A practical guide to sample preservation and pre-PCR processing of aquatic environmental DNA[J]. Molecular Ecology Resources, 2020, 20(1): 29-39.
- [38] GOLDBERG C S, TURNER C R, DEINER K, et al. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species[J]. Methods in Ecology and Evolution, 2016, 7(11): 1299-1307.
- [39] TSUJI S, USHIO M, SAKURAI S, et al. Water temperature-dependent degradation of environmental DNA and its relation to bacterial abundance[J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0176608.
- [40] DOI H, UCHII K, TAKAHARA T, et al. Use of droplet digital PCR for estimation of fish abundance and biomass in environmental DNA surveys[J]. PLoS One, 2015, 10(3), e0122763.
- [41] JANOSIK A M, JOHNSTON C E. Environmental DNA as an effective tool for detection of imperiled fishes[J]. Environmental Biology of Fishes, 2015, 98(8): 1889-1893.
- [42] YAMAMOTO S, MINAMI K, FUKAYA K, et al. Environmental DNA as a 'Snapshot' of fish distribution: A case study of Japanese jack mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan[J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0149786.
- [43] SALTER I, JOENSEN M, KRISTIANSEN R, et al. Environmental DNA concentrations are correlated with regional biomass of Atlantic cod in oceanic waters[J]. Communications Biology, 2019, 2: 1-9.
- [44] ITAKURA H, WAKIYA R, YAMAMOTO S, et al. Environmental DNA analysis reveals the spatial distribution, abundance, and biomass of Japanese eels at the river-basin scale[J]. Aquatic Conservation-Marine and Freshwater Ecosystems, 2019, 29(3): 361-373.
- [45] CHAMBERT T, PILLIOD D S, GOLDBERG C S, et al. An analytical framework for estimating aquatic species density from environmental DNA[J]. Ecology and Evolution, 2018, 8(6): 3468-3477.
- [46] 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.
- [47] HANFLING B, HANDLEY L 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.
- [48] STOECKLE M Y, SOBOLEVA L, CHARLOP-POWERS Z. Aquatic environmental DNA detects seasonal fish abundance and habitat preference in an urban estuary[J]. PLoS One, 2017, 12(4): e0175186.
- [49] KELLY R P, PORT J A, YAMAHARA K M, et al. Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e86175.
- [50] USHIO M, MURAKAMI H, MASUDA R, et al. Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing[J]. Metabarcoding and Metagenomics, 2018, 2: 1-15.
- [51] LACOURSIERE-ROUSSEL, COTE G, LECLERC V, et



- al. Quantifying relative fish abundance with eDNA: a promising tool for fisheries management[J]. *Journal of Applied Ecology*, 2016, 53(4): 1148-1157.
- [52] TILLOTSON M D, KELLY R P, DUDA J J, et al. Concentrations of environmental DNA (eDNA) reflect spawning salmon abundance at fine spatial and temporal scales[J]. *Biological Conservation*, 2018, 220: 1-11.
- [53] DI MURI C, HANDLEY L L, BEAN C W, et al. Read counts from environmental DNA (eDNA) metabarcoding reflect fish abundance and biomass in drained ponds[J]. *Metabarcoding and Metagenomics*, 2020, 4: 97-112.
- [54] PILLIOD D S, GOLDBERG C S, ARKLE R 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.
- [55] HINLO R, LINTERMANS M, GLEESON D, et al. Performance of eDNA assays to detect and quantify an elusive benthic fish in upland streams[J]. *Biological Invasions*, 2018, 20(11): 3079-3093.
- [56] 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.
- [57] YATES M C, GLASER D M, POST J R, et al. The relationship between eDNA particle concentration and organism abundance in nature is strengthened by allometric scaling[J]. *Molecular Ecology*, 2020, 30(13): 3068-3082.
- [58] THOMSEN P F, MOLLER 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.
- [59] STEWART K A. Understanding the effects of biotic and abiotic factors on sources of aquatic environmental DNA[J]. *Biodiversity and Conservation*, 2019, 28: 983-1001.
- [60] MARUYAMA A, NAKAMURA K, YAMANAKA H, et al. The release rate of environmental DNA from juvenile and adult Fish[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114639.
- [61] COLLINS R A, WANGENSTEEN O S, O'Gorman E J, et al. Persistence of environmental DNA in marine systems[J]. *Communications Biology*, 2018, 1: 185.
- [62] JANE S F, WILCOX T M, MCKELVEY K S, et al. Distance, flow and PCR inhibition: eDNA dynamics in two headwater streams[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2015, 15(1): 216-227.
- [63] DEJEAN T, VALENTINI A, DUPARC A, et al. Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems[J]. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23398.
- [64] CERCO C F, SCHULTZ M T, NOEL M R, et al. A fate and transport model for Asian carp environmental DNA in the Chicago area waterways system[J]. *Journal of Great Lakes Research*, 2018, 44(4): 813-823.
- [65] NUKAZAWA K, HAMASUNA Y, SUZUKI Y. Simulating the advection and degradation of the environmental DNA of common carp along a river[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(18): 10562-10570.
- [66] SCHULTZ M T. Inference of genetic marker concentrations from field surveys to detect environmental DNA using Bayesian updating[J]. *PLoS One*, 2018, 13(1): e0190603.
- [67] DOI H, INUI R, AKAMATSU Y, et al. Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish[J]. *Freshwater Biology*, 2017, 62(1): 30-39.
- [68] LEVI T, ALLEN J M, BELL D, et al. Environmental DNA for the enumeration and management of Pacific salmon[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2019, 19(3): 597-608.
- [69] FUKAYA K, MURAKAMI H, YOON S, et al. Estimating fish population abundance by integrating quantitative data on environmental DNA and hydrodynamic modelling[J]. *Molecular Ecology*, 2020, 30(13): 3057-3067.
- [70] MIZUMOTO H, URABE H, KANBE T, et al. Establishing an environmental DNA method to detect and estimate the biomass of Sakhalin taimen, a critically endangered Asian salmonid[J]. *Limnology*, 2018, 19(2): 219-227.
- [71] MINAMOTO T, HAYAMI K, SAKATA M K, et al. Real-time polymerase chain reaction assays for environmental DNA detection of three salmonid fish in Hokkaido, Japan: Application to winter surveys[J]. *Ecological Research*, 2019, 34(1): 237-242.
- [72] BALDIGO B P, SPORN L A, GEORGE S D, et al. Efficacy of environmental DNA to detect and quantify brook trout populations in headwater streams of the Adirondack Mountains, New York[J]. *Transactions of the American Fisheries Society*, 2017, 146(1): 99-111.

# Role of the environmental DNA technology application in the biomass assessment of the fishery resource: current status and future perspectives

DIAO Cao-yun<sup>1, 2</sup>, WANG Wen<sup>3, 4</sup>, XIAN Wei-wei<sup>1, 2, 5</sup>, ZHANG Hui<sup>1, 2, 5</sup>

(1. CAS Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Institute of Oceanographic Instrumentation, Qilu University of Technology, Shandong Academy of Sciences, Qingdao 266100, China; 4. Shandong Technological Center of Oceanographic Instrumentation, Qingdao 266100, China; 5. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

**Received:** Apr. 9, 2021

**Key words:** environmental DNA; fishery resources; biomass assessment; ecological conservation

**Abstract:** The global fishery resources are now under endangerment due to the continual interruption triggered by human activities in the past few years. To evaluate its deleterious effects, the environmental DNA (eDNA) assessment method has been established to be more advantageous for its simple operation, low invasiveness, and high sensitivity, and hence widely used in comparison to the traditional assessment techniques. It has also been proven to be more constructive to analyze the biomass and the species abundance. This study summarizes the investigation carried out by the eDNA technique to evaluate the biomass of fishery resources, including the following aspects: the complementarity of the eDNA and the traditional methods, factors and models of the eDNA concentration, and the quantitative models of the biomass. What's more, this review provides new perspectives for future study, which will impart the crucial standpoint of the eDNA technology application in relation to the biomass assessment of fishery resources.

(本文编辑: 赵卫红)