

基于沉积物 eDNA 评估三疣梭子蟹资源量的方法初探

张凡瑶¹, 张再美¹, 陈萌琦¹, 韦东升¹, 徐严欢¹, 姚冰¹, 孙振宁², 李慧¹, 杨艳艳², 周兴³, 李凡², 陈翠霞¹

(1. 中国石油大学(华东)化学化工学院, 山东 青岛 266580; 2. 山东省海洋资源与环境研究院, 山东省海洋生态修复重点实验室, 山东 烟台 264006; 3. 山东省青岛市黄岛区海洋发展局, 山东 青岛 266499)

摘要: 本文旨在通过沉积物 eDNA(environmental DNA)的分析, 建立一种快速评估三疣梭子蟹资源量的方法。采用柱状采泥器对莱州湾同一地点(37°30'E、119°20'N)不同深度(0~24 cm, 7个深度)进行样品采集, 提取不同深度地层沉积物中的 eDNA, 并以此为模板, 运用三疣梭子蟹 COI 基因通用型引物和特异性引物分别进行普通 PCR 和实时荧光定量 PCR (quantitative PCR, qPCR)扩增, 评估莱州湾近年来三疣梭子蟹的资源量变化。结果显示: 7个样品的 eDNA 中均能扩增出 700 bp 长度的 DNA 产物, 表明在不同深度沉积物所代表的年份均有三疣梭子蟹的存在; 通过 Clustal X 与 MEGA 7.0 软件比对各序列碱基之间的差异性, 发现不同柱深沉积物中的 COI 基因共出现 11 个变化位点, 包括 8 个转换位点、2 个颠换位点和 1 个插入位点; qPCR 结果显示, 8~9 cm 处的三疣梭子蟹 COI 基因拷贝数要大于其他深度地层沉积物, 说明此柱深代表的年份中三疣梭子蟹的资源量高于其他年份。利用沉积物 eDNA 评估莱州湾海域内的三疣梭子蟹资源量的方法, 可以打破时间和空间的限制, 检测不同年份三疣梭子蟹的资源量的变化。

关键词: eDNA; 三疣梭子蟹; COI 基因; qPCR; 资源量

中图分类号: S932.5+2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2023)5-0113-08

DOI: 10.11759/hyxx20220520001

三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)俗称海蟹或大蟹, 属于甲壳纲十足目梭子蟹科, 在我国大陆架海域广为分布, 具有体型较大、肉质肥美、营养丰富等优点, 是我国单物种产量最高的一种蟹类, 同时也是山东近海主要的增殖放流物种之一^[1-2]。但是, 由于过度捕捞和环境变化的双重影响, 其资源量不断衰退^[3]。因此, 自 2007 年起, 山东省开始在莱州湾大规模放流三疣梭子蟹^[4], 截至 2020 年, 已累计放流三疣梭子蟹稚蟹超过 10 亿尾。为合理确定放流数量和地点、提高放流效率、科学评价放流效果, 急需一种科学、准确、便捷的三疣梭子蟹资源量评估技术。

近年来, 不少学者对三疣梭子蟹的资源量进行研究, 杨刚等^[5]、张明亮等^[6]构建 ECOPATH 模型, 将生态系统简化为不同功能组, 利用各功能组的能量输入与输出的关系, 估算三疣梭子蟹在莱州湾的生态容量为 3 749 t。王彬等^[7]、Sun 等^[8]、吴强等^[9]利用扫海面积法, 即根据拖网单位时间的扫海面积和拖网渔获量估算单位面积内三疣梭子蟹的绝对数量。高丽等^[10]利用 Ricker 亲体-补充量关系模型即群

体资源量与补充量之间的关系对浙江渔场内三疣梭子蟹进行动态变化的预测。上述研究为三疣梭子蟹在特定地点的资源量估算提供了科学的方法, 然而扫海面积法存在资金投入大、取样时间受限制等局限性, 难以高效准确地掌握三疣梭子蟹的资源量及其时间序列信息; 由于种群数量较大且呈现动态变化, 使得 ECOPATH 模型与 Ricker 亲体-补充量关系模型法对于物种资源量的评估仍存在投入资金大、非标准取样、对物种数量有破坏性等方面的局限性。

收稿日期: 2022-05-20; 修回日期: 2022-07-27

基金项目: 烟台市科技创新发展计划(2020MSGY056); 山东省自然科学基金重点项目(ZR2020KE050); 烟台市科技创新发展计划(2021XDHZ053); 山东省教学改革重点项目(Z2022114)

[Foundation: The Science and Technology Innovation Development Program of Yantai, No. 2020MSGY056; Key Project of Natural Science Foundation of Shandong Province, No. ZR2020KE050; Science and Technology Innovative Development Programme of Yantai, No. 2021XDHZ053; Shandong Province Teaching Reform Key Project, No. Z2022114]

作者简介: 张凡瑶(1997—), 女, 山东日照人, 硕士生, 攻读专业为生物化工, E-mail: 1134688407@qq.com; 陈翠霞(1979—), 通信作者, 山东兖州人, 博士, 教授, 主要从事肽生物材料的制备及功能研究, E-mail: chencx@upc.edu.cn; 李凡(1981—), 通信作者, 山东临沂人, 副研究员, 主要从事渔业资源与渔业生态研究, E-mail: lifan811230@126.com

eDNA 是 20 世纪 90 年代发展起来的一项技术,是指从水、沉积物等环境样本中提取到的 DNA,包括细胞内 DNA 和细胞外 DNA,可用于监测水生生物物种丰富度^[11]。Ficetola 等^[12]利用 eDNA 信息分析成功检测到入侵物种牛蛙的存在,被认为是 eDNA 首次用于水生生物监测。随后,eDNA 被用来检测海洋脊椎动物和海洋无脊椎动物等^[13],实现了对水生生物种类的评估。自 2010 年以来,随着 qPCR 和 DNA 条形码技术的发展,eDNA 技术逐渐从定性分析物种存在与否逐渐扩展到定量分析物种的丰度^[14-17]。海洋沉积物是许多生物的归宿,记录着海洋环境长期演变信息^[18],而沉积柱样品作为胞外 DNA 的载体^[19],保留了多种物种的混合复杂基因组信息,相较于其他海洋环境样品,基因组信息丰富,故海洋沉积物是研究海洋生物的重要物质^[20]。评估同一地点不同深度沉积物中生物的 DNA 的含量,有助于重建某段时间内、某一海域某一物种的种群数量信息^[21],尤其利于某一物种的历史变动分析^[22]。

与传统的生物监测手段不同,eDNA 无需对物种本身而只要对环境样本进行操作处理,具有资金投入少、取样简单、灵敏度高优势,逐渐被应用于生物物种监测、生物量估算等方面^[23]。本文通过对莱州湾同一地点不同深度地层沉积物进行 eDNA 提取,并利用 qPCR 的方法,初步建立一种基于沉积物 eDNA 评估三疣梭子蟹资源量的方法。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

1.1.1 三疣梭子蟹

本实验所用的三疣梭子蟹由青岛慧鹏海水养殖公司(青岛海清)提供,大小为 0.3 kg/只,从养殖场取回后,保存于-80℃冰箱里备用。

1.1.2 沉积物样品

沉积物样品来自莱州湾(37°30'E、119°20'N)柱状采泥器采集的样品,样品运送过程中,用生物冰块保存,收到样品后,保存于-80℃冰箱里备用。实验中采用的柱深分别为 0~1 cm, 7~8 cm, 8~9 cm, 9~10 cm, 10~11 cm, 13~14 cm, 22~24 cm。每一深度沉积物在进行 eDNA 提取时,取 5 个重复样品。设置连续柱深和非连续柱深的目的是为验证不同地层深度 eDNA 含量的差异性。

1.2 实验方法

1.2.1 蟹肌肉组织 DNA 和环境 DNA 提取与检测

取 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm (约 0.5 g) 大小的三疣梭子蟹肌肉组织样品,剪碎,加入 550 μL DNA 裂解液(0.5 mol/L Tris-HCl, 0.1 mol/L EDTA, 5 mol/L NaCl, 10% SDS, 1 g RNA 酶),混匀后,加入 20 μL 蛋白酶 K,置于 56℃ 水浴锅中水浴消化 2~3 h 至溶液透明,采用苯酚-氯仿提取法提取三疣梭子蟹基因组 DNA。分别取 0.5 g 不同地层深度的沉积物样品(5 个重复样品),采用 Fast DNA Spin Kit for Soil 试剂盒提取沉积物样品 DNA,并溶于 60 μL 的缓冲液中。用 NANODrop 2000 超微量分光光度计检测三疣梭子蟹肌肉组织 DNA 和沉积物样品 DNA 浓度,-20℃ 保存备用。

1.2.2 普通 PCR 与 qPCR 扩增

PCR 扩增引物:采用 COI 基因普通 PCR 引物序列(COIL1490, COIH2198)^[24-25]扩增三疣梭子蟹 COI 基因,以进行序列一致性分析,利用 Primer 5.0 设计三疣梭子蟹特异性 qPCR 引物 COI-qPCR for 和 COI-qPCR rev 用于 COI 基因的定量分析,用 Primer 5.0 设计引物 COI-NE for 和 COI-NE rev,扩增特定 COI 基因片段,作为模板建立 qPCR 标准曲线(表 1),各引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

表 1 PCR 扩增引物及产物

Tab. 1 PCR primers and amplification products

引物名称	引物序列(方向: 5'→3')	PCR 产物/bp	实验目的
COIL1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	705	普通 PCR
COI H2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA		普通 PCR
COI-qPCR for	GGGAGCAGTCTTTGGCATCT	196	qPCR
COI-qPCR rev	GCCTCAGGTAGTATAAGCGTCT		qPCR
COI-NE for	TCGTGCTGAATTAGGACAACC	1 348	标曲模板
COI-NE rev	AAGGAGAGAATATAACAGGCCGAC		标曲模板

PCR 扩增体系及反应条件: PCR 扩增体系为 25 μ L, 反应液包括 12.5 μ L 2 \times GC buffer I, 4 μ L dNTP Mixture (2.5 mmol/L), 0.25 μ L TaKaRa LA Taq (5 U/ μ L), 1 μ L 模板 DNA, 引物各 1 μ L (10 mmol/L), 无菌去离子水补齐至 25 μ L。PCR 扩增程序为: (1)95 $^{\circ}$ C 5 min; (2)95 $^{\circ}$ C 50 s, 52 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; (3)72 $^{\circ}$ C 10 min。

qPCR 扩增体系及反应条件: 使用宝日医生物技术(北京)有限公司的 TB Green Premix Ex TaqTM II (Tli RNaseH Plus) qPCR 试剂盒进行 qPCR 扩增。为建立标准曲线, 以 COI-NE for 和 COI-NE rev 为引物, 以三疣梭子蟹肌肉组织 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到 COI 特定基因片段, 纯化回收后作为模板用于 qPCR 扩增。将模板 DNA 以 5 倍浓度进行梯度稀释, 进行 qPCR。qPCR 扩增体系为 20 μ L 反应体系, 反应液包括 SYBR[®] Premix Ex TaqTM 10 μ L, 0.4 μ L 上、下游引物 (10 μ mol/L), 模板 2 μ L, ROXII 0.4 μ L, 水 6.8 μ L。扩增反应程序为 3 步法: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 57 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 32 s, 40 个循环。沉积物 eDNA 模板不经稀释, 取 2 μ L 作为模板, 采用相同的条件进行扩增。沉积物 DNA 与

$$\text{模板拷贝数} = \frac{6.02 \times 10^{23} \times \text{模板质量(g)}}{\text{模板长度} \times 660 (\text{碱基摩尔质量, g/mol bp})}$$

2 结果与分析

2.1 三疣梭子蟹基因组 DNA 及沉积物 eDNA COI 基因扩增

通过 NANODrop2000 超微量分光光度计检测, 三疣梭子蟹及沉积物样品中 DNA 的质量浓度分别为 8 376、446.4、336、174、156、267.6、57.6、92.4 ng/g, 以三疣梭子蟹和不同地层沉积物 eDNA 为模板, 采用通用型 COI 基因引物(COIL1490, COIH2198)扩增 COI 基因, 并对扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳验证。结果显示, 凝胶电泳条带明亮清晰且均可扩增得到长度在 700 bp 左右的目的条带(图 1), 证明各 DNA 均可成功扩增得到 COI 基因, 并且特异性良好。

2.2 不同柱深沉积物三疣梭子蟹 COI 基因序列比对

利用 1.2.3 方法对所测得的序列(647 bp)进行分析。序列碱基组成分析发现, 各样品扩增的 COI 基因的 A+T 的平均含量为 62.27%, G+C 的平均含量 37.73%。序列碱基突变位点分析结果显示通过通用引物扩增得到的 COI 基因有 11 个突变位点(表 2), 包括 8 个转换位点、2 个颠换位点和 1 个插入位点。

标准品 DNA 均做 3 个重复。

PCR 扩增产物用 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 将大小正确的条带纯化回收后送生工生物工程(上海)有限公司测序。

1.2.3 COI 基因序列比对

将测序所得到的 8 条序列(三疣梭子蟹肌肉组织 DNA 和 7 个沉积物 eDNA)分别在 NCBI Gene Bank 比对, 确定所扩增序列是否为三疣梭子蟹 COI 基因。利用 Clustal X 与 MEGA 7.0 软件比对各序列碱基之间的差异性。

1.2.4 qPCR 分析

首先, 采用 ABI 7500 Software 自动计算各样品的 Ct 值(Ct 值为每个反应管内的荧光信号到达设定阈值时所经历的循环数), 同时, 根据作为标准曲线模板的 COI 基因(1348 bp)的 DNA 浓度, 利用下列公式计算模板 COI 基因的拷贝数, 以平均 Ct 值为横坐标, 以 lg(已知 COI 基因拷贝数)为纵坐标, 绘制标准曲线。将沉积物平均 Ct 值代入标准曲线, 计算得到沉积物中 COI 基因的拷贝数。

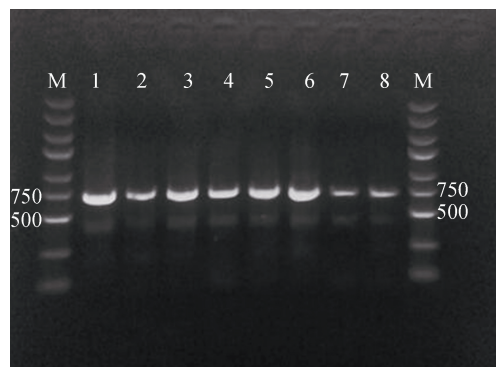


图 1 COI 基因 PCR 产物凝胶电泳图

Fig. 1 Gel electrophoresis pattern of the COI gene PCR products

注: M 表示 D2000 plus DNA Ladder; 1 表示三疣梭子蟹肌肉组织 DNA; 2—8 分别表示不同地层沉积物 DNA(对应地层分别为 0~1 cm; 7~8 cm; 8~9 cm; 9~10 cm; 10~11 cm; 13~14 cm; 22~24 cm)

与 NCBI 数据库中的三疣梭子蟹 COI 基因序列相比^[26], 养殖的三疣梭子蟹 COI 基因在 574 位插入 T 并在 594 位出现 G-C 颠换。其余地层深度所提取的 eDNA 扩增的 COI 基因序列在 134 位均出现 A-G 转换, 10~11 cm 所提取的 eDNA 扩增的 COI 基因序列在 276 位出现了 G-C 颠换。总体分析结果说明 7 个沉

积物中所提取到的 eDNA 扩增得到的 COI 基因与 2020 年新上传的三疣梭子蟹 COI 基因序列相似度达到 99%以上^[26], 表明不同沉积物中三疣梭子蟹未发生明显的遗传变异。

表 2 不同地层沉积物中 eDNA 扩增的 COI 基因片段遗传一致性分析

Tab. 2 Genetic consistency analysis of the COI gene fragments amplified from eDNA in different sediments

沉积物	颠换	转换	插入
<i>Portunus tritomata</i>	G-C(594)	A-G(134)	T(574)
0~1 cm	-	A-G(134)	-
7~8 cm	-	A-G(134)	-
8~9 cm	-	A-G(134)	-
9~10 cm	-	A-G(134)	-
10~11 cm	G-C(276)	A-G(134)	-
13~14 cm	-	A-G(134)	-
22~24 cm	-	A-G(134)	-

注: “-” 表示无碱基变化, 括号内为变化位点

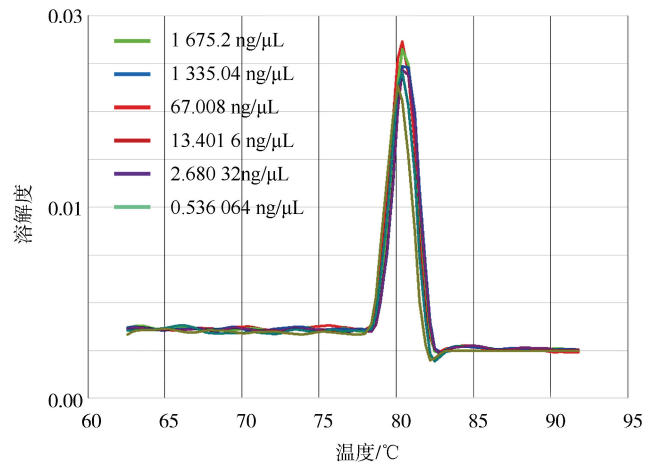
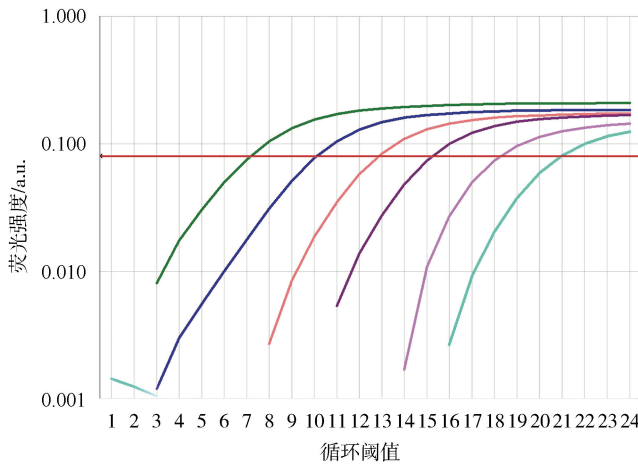


图 2 COI 基因扩增曲线和基因溶解曲线

Fig. 2 COI gene amplification curve and dissolution curve

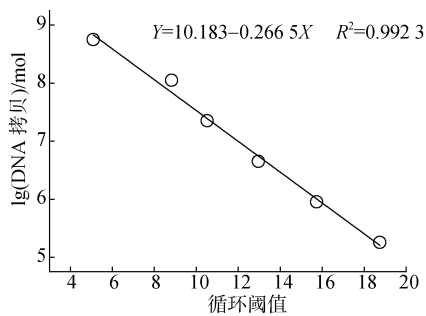


图 3 COI 基因拷贝数标准曲线

Fig. 3 Standard curve for the COI gene copy number

2.3 qPCR 定量分析

2.3.1 标准曲线

以三疣梭子蟹肌肉基因组 DNA 为模板, COI-NE for 和 COI-NE rev 为引物, 进行 PCR 扩增, 获得 1 348 bp 大小的 COI 基因片段, 将基因片段进行纯化回收, 利用 NANODrop 2000 超微量分光光度计测定模板质量浓度为 20.8 ng/μL。将该溶液梯度稀释后作为模板, 并按照 1.2.4 公式计算 COI 基因的拷贝数。随后, 采用 COI-qPCR 引物对, 进行 qPCR。扩增结果如图 2 所示, 在指数扩增区域每条扩增曲线之间均被隔开, 且每个反应的熔解曲线在 80~80.5°C 处均出现单峰, 表明设计的 qPCR 引物特异性强, 扩增效果好。

依据 qPCR 的结果, 三疣梭子蟹 COI 基因的标准曲线如图 3 所示, 该曲线拟合方程为 $Y=10.183-0.266 5X$, $R^2=0.992 3$, 表明 Ct 值与 COI 基因拷贝数的对数之间呈现良好的线性关系, 该基因可用于测定环境中三疣梭子蟹基因组 DNA 含量。

2.3.2 三疣梭子蟹基因拷贝数分析

按照 1.2.4 所示方法, 以不同柱深沉积物 eDNA 为模板, 进行 qPCR, 得到不同柱深沉积物中 eDNA 模板扩增的 Ct 值, 利用标准曲线, 获得不同沉积物中三疣梭子蟹 COI 基因的拷贝数, 进而获得每克沉积物中 COI 基因的拷贝数(图 4)。结果显示, 0~1 cm、7~8 cm、9~10 cm、10~11 cm、22~24 cm 这 5 个深度的 COI 基因拷贝数大致相同, 8~9 cm 的柱状沉积物中 COI 基因的拷贝数最高, 而 13~14 cm 的柱状沉积物中 COI 基因的拷贝数最低。

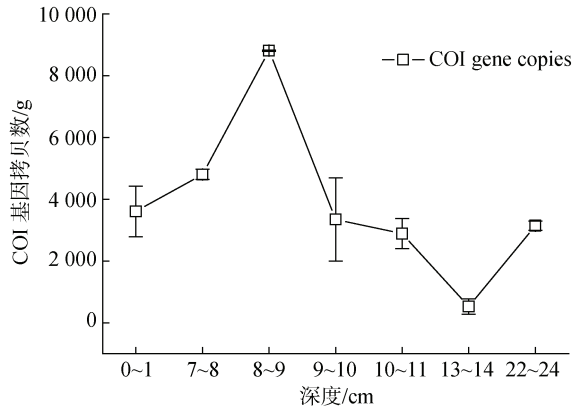


图4 地层深度与 COI 基因拷贝数的关系

Fig. 4 Relationship between stratigraphic depth and COI gene copy number

3 讨论

eDNA 是生物体释放到环境中的 DNA, 其浓度与生物量有关, 且不受温度的影响^[27]。研究发现表层沉积物中 eDNA 相对比较稳定, 一旦进入水体后会被快速降解^[28-29]。因此可通过不同地层 eDNA 的丰度及特定物种 DNA 探针检测不同生物在特定时期内的资源量, 然而, 沉积物 eDNA 的提取效率一直是困扰科研人员的一个问题。目前, 沉积物中 eDNA 的提取有 SDS 提取法、高盐法、蛋白酶 K 法、试剂盒法等, 大致可以分为两类, 即直接提取法和间接提取法^[30]。本研究前期利用直接法提取不同地层深度沉积物中的 eDNA, 获得的 eDNA 含量低, 凝胶电泳结果显示 PCR 扩增后无条带或条带较暗且有杂带和拖带, 说明提取的 eDNA 质量较差, 可能与沉积物中所含的腐殖质酸、eDNA 提取试剂酚类化合物等抑制了 PCR 过程有关^[31]。而试剂盒法能较好地解决该问题, 本研究采用 MP BIO 公司开发的 Fast DNA Spin Kit for Soil 试剂盒^[32]对沉积物进行 eDNA 快速提取, 在较短时间内有效提取 eDNA 且避免 PCR 抑制剂等的干扰, 凝胶电泳结果显示 PCR 扩增后条带清晰且明亮。同时, 为提高 eDNA 提取的重复性, 在提取 eDNA 样品时, 采用同一平面九点取样法, 大大提高了各样品 eDNA 提取的效率和准确率。在以后的研究中, 如何保证提取各沉积物 eDNA 浓度的重复性, 仍是需要研究的重点。

在获取高质量的 eDNA 后, 本研究以其为模板, 采用三疣梭子蟹特异性 COI 基因的引物 COI-qPCR for 和 COI-qPCR rev 进行 PCR 扩增, 结合荧光定量

PCR 技术, 可预估不同地层深度沉积物中三疣梭子蟹 COI 基因的拷贝数。参考海洋沉积物同位素年代测定结果^[33-34], 预估本实验 7~8 cm 沉积物对应年代约为 2013 年。从 DNA 拷贝数与不同地层深度的关系可知, 相较于其他地层, 8~9 cm 所对应的 2012 年左右所对应的 DNA 拷贝数较多, 13~14 cm 所处的 2007 年左右所对应的 DNA 拷贝数较少, 其余地层深度所对应年代的 DNA 拷贝数大致相同, 说明自实施渔业修复计划以来三疣梭子蟹产量有所增加, 但 0~1 cm 所处的地层含有的 DNA 拷贝数较少, 间接说明三疣梭子蟹含量可能在降低。这一发现, 能够有效监测三疣梭子蟹在不同地层年代的资源量, 科学评价三疣梭子蟹自然资源量的变化并依此制定相应的政策。

综上所述, 本研究成功从不同地层沉积物中提取到包含三疣梭子蟹基因在内的 eDNA, 利用 qPCR 技术检测沉积物 eDNA 中的三疣梭子蟹 COI 基因拷贝数, 可用于评估三疣梭子蟹的资源量。eDNA 是含有大量细胞的有机体经过时间的推移后在环境中留下的残骸, 是目前检测生态物种资源量最简单高效的手段, 但 eDNA 技术的局限性如样品污染、DNA 的降解、PCR 抑制剂以及数据库不完整等技术性问题, 如何通过实验技术优化, 提升 eDNA 技术在评估特定物种资源量方面的精确度, 仍是需努力解决的问题。

参考文献:

- [1] 薛俊增, 堵南山, 赖伟, 等. 中国三疣梭子蟹 *Portunus trituberculatus* Miers 的研究[J]. 东海海洋, 1997, 14(4): 61-66.
XUE Junzeng, DU Nanshan, LAI Wei, et al. A review of studies on *Portunus trituberculatus* in China[J]. Donghai Marine Science, 1997, 14(4): 61-66.
- [2] 杨刚, 徐炳庆, 王秀霞, 等. 莱州湾三疣梭子蟹生物学参数及生长特性研究[J]. 海洋渔业, 2017, 39(4): 401-410.
YANG Gang, XU Bingqing, WANG Xiuxia, et al. On biological parameters and growth characteristics of *Portunus trituberculatus* in the Laizhou Bay[J]. Marine Fisheries, 2017, 39(4): 401-410.
- [3] 傅秀梅. 中国近海生物资源保护性开发与可持续利用研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
FU Xiumei. Studies on protective exploitation and sustainable development of Chinese offshore bioresources[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008.
- [4] 卢晓, 董天威, 涂忠, 等. 山东省三疣梭子蟹增殖放流

- 回顾与思考[J]. 渔业信息与战略, 2018, 33(2): 104-108.
LU Xiao, DONG Tianwei, TU Zhong, et al. Review and consideration on *Portunus trituberculatus* stock enhancement in Shangdong Province[J]. Fishery Information and Strategy, 2018, 33(2): 104-108.
- [5] 杨刚. 山东近海蟹类群落结构及三疣梭子蟹生长参数、资源量研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.
YANG Gang. On community structure of crab and biological parameters and stock number of *Portunus trituberculatus* in Shandong offshore[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017.
- [6] 张明亮, 冷悦山, 吕振波, 等. 莱州湾三疣梭子蟹生态容量估算[J]. 海洋渔业, 2013, 35(3): 303-308.
ZHANG Mingliang, LENG Yueshan, LV Zhenbo, et al. Estimating the ecological carrying capacity of *Portunus trituberculatus* in Laizhou Bay[J]. Marine Fisheries, 2013, 35(3): 303-308.
- [7] 王彬, 刘修泽, 李玉龙, 等. 辽东湾三疣梭子蟹增殖放流效果评估[J]. 水产学报, 2020, 44(8): 1329-1339.
WANG Bin, LIU Xiuzhe, LI Yulong, et al. Stocking effectiveness of hatchery-raised swimming crabs (*Portunus trituberculatus*) released into Liaodong Bay[J]. Journal of Fisheries of China, 2020, 44(8): 1329-1339.
- [8] SUN C Y, WANG Y B. Impacts of the sampling design on the abundance index estimation of *Portunus trituberculatus* using bottom trawl[J]. Acta Oceanologica Sinica, 2020, 39(6): 48-57.
- [9] 吴强, 王俊, 陈瑞盛, 等. 莱州湾三疣梭子蟹的生物学特征、时空分布及环境因子的影响[J]. 应用生态学报, 2016, 27(6): 1993-2001.
WU Qiang, WANG Jun, CHEN Ruisheng, et al. Biological characteristics, temporal-spatial distribution of *Portunus trituberculatus* and relationships between its density and impact factors in Laizhou Bay[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2016, 27(6): 1993-2001.
- [10] 高丽. 基于主要海洋环境因子的浙江北部海域三疣梭子蟹补充量预测分析[D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2020.
GAO Li. Influences of environmental factors on the spawning stock-recruitment relationship of *Portunus trituberculatus* in the Northern Zhejiang Sea area[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2020.
- [11] 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, 2014, 51(5): 1450-1490.
- [12] FICETOLA G F, MIAUD C, POMPANON F, et al. Species detection using environmental DNA from water samples[J]. Biology Letters, 2008, 4: 423-425.
- [13] SIGSGAARD E E, TORQUATO F, FROSLEV T G, et al. Using vertebrate environmental DNA from seawater in biomonitoring of marine habitats[J]. Conservation Biology, 2020, 34(3): 697-710.
- [14] 唐晟凯, 钱胜峰, 沈冬冬, 等. 应用环境 DNA 技术对邵伯湖浮游动物物种检测的初步研究[J]. 水产养殖, 2021, 42(3): 13-20.
TANG Shengkai, QIAN Shengfeng, SHEN Dongdong, et al. Preliminary study on detection of zooplankton species in Shaobo Lake by environment DNA technology[J]. Journal of Aquaculture, 2021, 42(3): 13-20.
- [15] 胡愈忻, 彭玉, 李瑞雯, 等. 基于环境 DNA 宏条形码的丹江口水库浮游生物多样性及群落特征[J]. 湖泊科学, 2021, 33(6): 1650-1659.
HU Yuxi, PENG Yu, LI Ruiwen, et al. Plankton diversity and community characteristics in Danjiangkou Reservoir based on environmental DNA metabarcoding[J]. Journal of Lake Science, 2021, 33(6): 1650-1659.
- [16] PIETRAMELLARA G, ASCHER J, BORGOGNI F, et al. Extracellular DNA in soil and sediment: fate and ecological relevance[J]. Biology and Fertility of Soils, 2009, 45(3): 219-235.
- [17] GILBEY J, CARVALHO G, CASTILHO R, et al. Life in a drop: sampling environmental DNA for marine fishery management and ecosystem monitoring[J]. Marine Policy, 2021, 124: 104331.
- [18] 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.
- [19] 赵彦伟, 陈家琪, 董丽, 等. 环境 DNA 技术在水生态领域应用研究进展[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(10): 2057-2065.
ZHAO Yanwei, CHEN Jiaqi, DONG Li, et al. Advances in the application of environmental DNA in aquatic ecosystems[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2021, 40(10): 2057-2065.
- [20] WEI N, NAKAJIMA F, TOBINO T. A microcosm study of surface sediment environmental DNA: Decay observation, abundance estimation, and fragment length comparison[J]. Environmental Science and Technology, 2018, 52(21): 12428-12435.
- [21] 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, 2018, 510: 31-45.
- [22] OGATA M, MASUDA R, HARINO H, et al. Environmental DNA preserved in marine sediment for detecting jellyfish blooms after a tsunami[J]. Scientific Reports, 2021, 1: 16830.
- [23] 邢迎春, 高婉茹, 白洁, 等. 环境 DNA 在湖泊生物多样性研究中的应用[J]. 水生生物学报, 2022, 46(1):

- 137-148.
XING Yingchun, GAO Wanru, BAI Jie, et al. Applications of environmental DNA in lake biodiversity[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, 46(1): 137-148.
- [24] FOLMER O, BLACK M, HOEH W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3(5): 294-299.
- [25] 高俊娜, 刘萍, 李健, 等. 利用 16S rRNA 和 COI 基因序列对三疣梭子蟹不同群体遗传特征的比较分析[J]. *渔业科学进展*, 2010, 31(5): 59-68.
GAO Junna, LIU Ping, LI Jian, et al. Comparison of genetic characteristics of three *Portunus trituberculatus* populations based on the sequences of mitochondrial 16S rRNA and COI gene[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2010, 31(5): 59-68.
- [26] CONRAD L S, STACY C, MIKHAIL D, et al. NCBI Taxonomy: a comprehensive update on curation, resources and tools[J]. *Database*, 2020, 2020: baaa062.
- [27] KLYMUS K E, RICHTER C A, CHAPMAN D C, et al. Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*[J]. *Biological Conservation*, 2015, 183: 77-84.
- [28] 钱塘毅, 王伟继, 李苗, 等. 黄海中国对虾环境 DNA(eDNA)的垂直分布规律及其影响因素初探[J]. *渔业科学进展*, 2021, 42(2): 1-9.
QIAN Tangyi, WANG Weiji, LI Miao, et al. A preliminary study on the vertical distribution of *Penaeus chinensis* environmental DNA in the Yellow Sea and its influencing factors[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(2): 1-9.
- [29] 魏楠, 王夏晖, 张春鹏. 环境 DNA 在监测表层沉积物中的运用及其与环境变量的关系[J]. *环境工程学报*, 2020, 14(8): 2262-2269.
WEI Nan, WANG Xiahui, ZHANG Chunpeng. Application of environment DNA in monitoring surface and its relationship to environment variables[J]. *Chinese Journal of Environment Engineering*, 2020, 14(8): 2262-2269.
- [30] 张温典, 姚刚乾, 路丙社. 从土壤中提取 DNA 方法的研究进展[J]. *河北林果研究*, 2003, 18(3): 300-304.
ZHANG Wendian, YAO Gangqian, LU Bingshe. The progress of the study on the method of distilling of DNA from soil[J]. *Hebei Journal of Forestry and Orchard Research*, 2003, 18(3): 300-304.
- [31] 吴红萍, 郑服丛. 不同环境中土壤微生物总 DNA 的提取与纯化[J]. *广西农业科学*, 2008, 39(1): 12-16.
WU Hongping, ZHENG Fucong. Extraction and purification of total DNA of soil microorganisms in different environments[J]. *Guangxi Academy of Agricultural Science*, 2008, 39(1): 12-16.
- [32] FRANCIS C. A, ROBERTS K J, BEMAN J M, et al. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 2005, 102(41): 14683-14688.
- [33] 刘健, 段宗奇, 梅西, 等. 南黄海中部隆起晚新近纪—第四纪沉积序列的地层划分与沉积演化[J]. *海洋地质与第四纪地质*, 2021, 41(5): 25-43.
LIU Jian, DUAN Zhongqi, MEI Xi, et al. Stratigraphic classification and sedimentary evolution of the late Neogene to Quaternary sequence on the Central Uplift of the South Yellow Sea[J]. *Marine Geology and Quaternary Geology*, 2021, 41(5): 25-43.
- [34] 黄学勇. 广利河口及莱州湾西部沉积特征分析[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2019.
HUANG Xueyong. Analysis of sedimentary characteristics in the Guangli River estuary and the Western Laizhou Bay[D]. Dalian: Liaoning Normal University, 2019.

A preliminary method to assess the *Portunus trituberculatus* resource based on sedimentary eDNA

ZHANG Fan-yao¹, ZHANG Zai-mei¹, CHEN Meng-qi¹, WEI Dong-sheng¹, XU Yan-huan¹, YAO Bing¹, SUN Zhen-ning², LI Hui¹, YANG Yan-yan², ZHOU Xing³, LI Fan², CHEN Cui-xia¹

(1. College of Chemistry and Chemical Engineering, China University of Petroleum, Qingdao 266580, China; 2. The Key Laboratory of Restoration for Marine Ecology of Shandong Province, Shandong Marine Resources and Environment Research Institute, Yantai 264006, China; 3. Qingdao Municipal Marine Development Bureau, Qingdao 266499, China)

Received: May 20, 2022

Key words: eDNA; *Portunus trituberculatus*; COI gene; qPCR; resource

Abstract: This study aimed to establish a rapid method to assess the *Portunus trituberculatus* resource by analyzing sedimentary environmental DNA (eDNA). Samples were collected at different sediment depths (0~24 cm, 7 depths) from the same location (37°30" E, 119°20" N) in Laizhou Bay using a column mud collector. The eDNA samples extracted from the ocean sediments served as the template to amplify the cytochrome *c* oxidase subunit 1 (COI) gene by polymerase chain reaction (PCR) and quantitative PCR (qPCR) using universal and specific primers for the *P. trituberculatus* COI gene. The amplified products were used to assess the *P. trituberculatus* resource in Laizhou Bay. The results showed that the 700 bp COI gene fragments were amplified from all extracted eDNA, indicating the presence of *P. trituberculatus* in the years represented by the sediments at different depths. Genetic consistency was analyzed by Clustal X and MEGA 7.0 software, and 11 variable sites, including 8 conversion sites, 2 inversion sites, and 1 insertion site, were found for the COI gene at the different depths, suggesting high homology of *P. trituberculatus* in the years represented by the 7 sediments. The qPCR results showed that the *P. trituberculatus* COI gene copy number at 8–9 cm of soil depth was higher than that at the other depths, suggesting that the *P. trituberculatus* resource was richer in the years represented by the 8~9 cm depth than the other years. Using sedimentary eDNA saved time and space when assessing the *P. trituberculatus* resource in Laizhou Bay.

(本文编辑: 赵卫红)