

环境 RNA 技术在水生生态系统生物多样性监测中的应用

李文琼^{1,3}, 代书勤¹, 张 辉^{1,2,3}, 线薇薇^{1,2}

(1. 中国科学院海洋研究所 中国科学院海洋生态与环境科学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋生态与环境科学功能实验室, 山东 青岛 266237; 3. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 随着人类活动在全球范围内的不断增强, 水生生态系统的生物多样性丧失, 群落结构发生巨大变化。因此, 进行准确可靠的生物多样性监测来确定目标区域的物种丰度和群落结构对生态保护和资源可持续利用至关重要。环境 DNA 技术(eDNA)作为一种非入侵性的新手段, 正在迅速发展, 然而, eDNA 技术易出现假阳性, 从而导致实时生物多样性监测不准确的现象仍然普遍存在。与 eDNA 技术相比, 环境 RNA 技术(eRNA)的快速降解使得它具有减少 eDNA 监测结果假阳性的潜力。本文概述了 eRNA 技术在水生生态系统的生物多样性监测中的可行性, 主要从 eRNA 技术在水生生态系统中的可检测性和提高检测分辨率的潜力两个方面来介绍; 综述了 eRNA 技术目前在水生生态系统生物多样性监测方面的研究进展; 指出了 eRNA 技术目前存在的问题并分析了未来的研究方向。本文对未来将 eRNA 技术实际应用于水生生态系统的生物多样性监测、生态保护和资源可持续利用具有一定的参考价值。

关键词: 环境 RNA; 生物多样性; 生态监测; 生态保护

中图分类号: P735 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2023)8-0090-11

DOI: 10.11759/hyxx20221101002

随着网箱养殖、过度捕捞、矿物及油气资源开发等人类活动在全球范围内的不断增强, 水生生态系统的生物多样性丧失, 群落结构发生巨大变化^[1]。为了在受影响区域实施及时、有效的措施以保护隐蔽的、脆弱的以及濒危的物种, 提前干预和监管外来物种的入侵行为并保证海洋资源的可持续利用, 探究准确可靠的生物多样性监测方法来确定目标区域的物种丰度和群落结构是至关重要的^[2-3]。

上述挑战, 以及传统野外监测方法的局限性, 均促进了基于分子技术的生物多样性监测的快速发展。新型分子技术引入了对生物多样性进行非靶向监测的可能性, 它可以探索研究区域的所有群落, 并进一步提供了将某些稀有或未知物种和生态上重要的物种纳入生物多样性监测的可能性^[4]。目前应用于生物多样性监测较为成熟的分子技术是环境 DNA(environmental DNA, eDNA)技术, 该技术成本低、破坏性小、准确性高的特点使其越来越频繁的应用于水生生态监测, 其中包括生物多样性监测及生物量定量评估。例如, Zhang 等^[5]基于 eDNA 技术研究了长江口及其邻近水域鱼类群落, 结果表明, 与传统方法相比, eDNA 技术能够更为灵敏地监测到鱼类群落结构随季节的变化。Diao 等^[6]基于 eDNA 技术对中国南海的生物多样性进

行监测, 结果表明, 通过 eDNA 技术成功实现了对三大类群的多样性监测。以上研究均证明了 eDNA 技术能够应用于水生生态系统生物多样性监测。在 Salter 等^[7]对大西洋鳕鱼进行 eDNA 技术的定量研究中, 将 eDNA 技术与传统拖网调查的结果进行比较, 发现大西洋鳕鱼的捕获量与 eDNA 技术所得结果呈显著正相关关系, 因此, eDNA 技术具有水生生态系统的鱼类种群的区域性定量评估的潜力。尽管 eDNA 技术日渐成熟且广泛应用于水生生态监测, 然而 eDNA 在生物体离开后仍在环境中持续存在数周以及在水柱中迁移的能力, 可能导致检测结果的假阳性, 从而导致实时生物多样性评估不准确^[8-14]。而环境 RNA 技术(environmental RNA, eRNA)有望作为一种高敏感性的补充技术与 eDNA 技术结合使用来解决这一问题。

收稿日期: 2022-11-01; 修回日期: 2022-12-02

基金项目: 国家重点研发计划项目(2022YFE0112800); 国家自然科学基金(42111540159); 中国科学院青年创新促进会(2020211)

[Foundation: National Key Research and Development Project of China, No. 2022YFE0112800; National Natural Science Foundation of China, No. 42111540159; Youth Innovation Promotion Association CAS, No. 2020211]

作者简介: 李文琼(1999—), 女, 山东泰安人, 硕士研究生, 主要研究方向为渔业生态, E-mail: liwenqiong@qdio.ac.cn; 张辉(1986—), 通信作者, 男, 山东安丘人, 研究员, 主要研究方向为渔业生态, E-mail: zhanghui@qdio.ac.cn

eRNA, 指在环境中存在的 RNA, 由生物体释放到周围环境中, 主要以游离、囊泡或细胞的形式存在, 并在环境介质中发生一段距离的迁移, 之后大

部分 eRNA 迅速降解, 还有极少的 eRNA 吸附在沉积物颗粒上向下沉降并在深海沉积物中积累^[15-17] (图 1)。

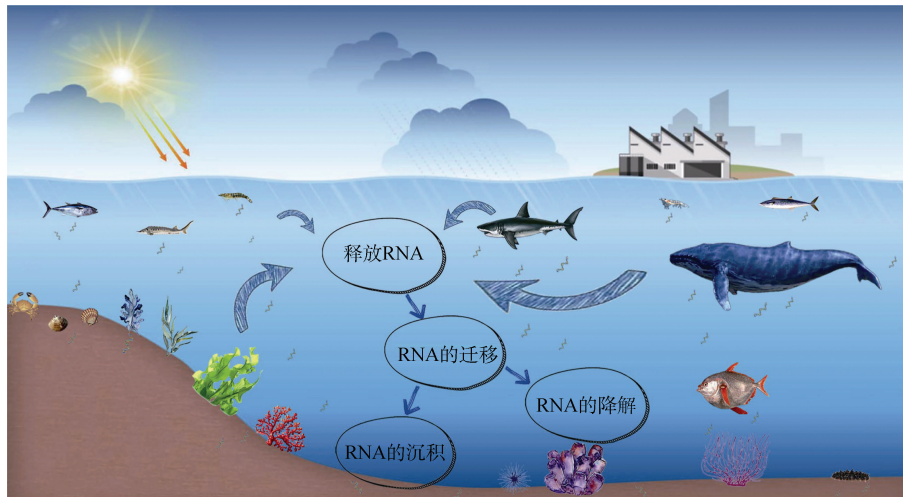


图 1 环境 RNA 在海洋中的活动轨迹

Fig. 1 Moving track of environmental RNA in the ocean

eRNA 技术指从环境样本中直接提取 RNA 片段后进行相关生物多样性研究。eRNA 技术的操作流程主要包括环境样品采集, 提取样品中的 RNA 并将其

逆转录, 将获得的互补 DNA(complementary DNA, cDNA)作为模板进行 PCR 扩增, 以及基于高通量测序技术来监测研究区域中的生物多样性(图 2)。



图 2 eRNA 技术的操作流程——以水样为例

Fig. 2 Workflow of eRNA technology in the research on water samples

1 环境 RNA 技术在生物多样性监测中的可行性

与 DNA 相比, RNA 是一种不太稳定的分子。RNA 分子的单链结构、致使碱基催化水解的额外羟基的存在以及外源性和内源性 RNA 酶的普遍存在可能是 eRNA 的降解速率较 eDNA 更快的主要原因^[18-19]。因此, 普遍认为环境介质中的 RNA 会因其过快的降解速率而无法检测到具有生物学意义的数量^[20]。然而, 最近的实验研究表明, eRNA 在水生生态系统中具有一定的可检测性、高释放率和快速周转率, 这些 eRNA 所特有的优势以及 eRNA 技术在提高检查分辨率方面的潜力, 使得 eRNA 技术在水生生态系统的生物多样性监测中具有可行性。

1.1 环境 RNA 在水生生态系统中的可检测性

Cristescu^[15]在阐述 eRNA 持久性的综述性文章

中表明, 代谢活跃的生物体可以将大量 RNA 释放到环境中, 而细胞外囊泡、衣壳等结构的存在能够防止 RNA 被 RNA 酶迅速降解, 从而大大延长了微生物或大型生物释放到周围环境中的 RNA 在环境中的存在时间; von Ammon 等^[21]在关于 eDNA 与 eRNA 分子信号的检测相关性的研究中表明, eRNA 的可检测性随着 eDNA 拷贝数的增加而增加。这些研究为 eRNA 在水生生态系统中的可检测性提供了初步的理论依据。之后人们利用水族箱进行受控实验, 以更具体地探究 eRNA 在水体环境中的存在时间, 进一步证实了 eRNA 在水生生态系统中的可检测性。例如, Wood 等^[22]以两种海洋无脊椎动物(缨鳃虫和柄海鞘)为研究对象, 比较了 eDNA 和 eRNA 的可检测时间, 研究发现 eRNA 在移除生物体的水族箱中的可检测时间长达 13 h, 比 eDNA 时间要短; Mérou 等^[23]在检测受感染牡蛎中的牡蛎寄生虫的 eDNA 和 eRNA 在海水

中存在时间的实验中发现,牡蛎寄生虫的 eRNA 能够持续存在 30 d,比 eDNA 的存在时间还长;Marshall 等^[24]基于 eDNA 技术和 eRNA 技术,采集了移除斑马贻贝和条纹贻贝后的水族箱样品进行研究,结果表明在移除生物体的 3 d 后仅检测到核糖体 RNA(ribosomal RNA, rRNA)基因靶标,而 H2B 信使 RNA(messenger RNA, mRNA)基因靶标在 24 h 后就无法检测到。在最近的 2 项探究环境条件对 eRNA 降解速率影响的实验中,Qian 等^[25]调查了温度对中国对虾 eRNA 可检测时间的影响,结果显示 eRNA 在低温下可检测时间较长(22 h 左右),而随着温度的升高,eRNA 的可检测时间缩短至 11 h 左右;Kagzi 等^[26]在基于 pH 梯度探究蚤状溞 eRNA 的存在时间的研究中发现,pH 值的变化对其 eRNA 的存在时间影响不大,范围约为 21~27 h。在最近的一项野外试验中,Littlefair 等^[27]发现,野外采集水样后低温储存 2~5 h 仍然可以检测到来自 eRNA 的可靠信号。因此,eRNA 可以足够持久的存在于水体环境中,这使得 eRNA 具有一定的可检测性。

1.2 环境 RNA 技术的检测分辨率

eDNA 技术的分辨率仅限于物种水平的检测或种群水平的遗传推断,而 eRNA 技术在这方面具有超越 eDNA 技术的潜力^[28]。多年来,侵入性生物监测方法一直使用从组织或整个生物体产生的 mRNA 图谱来阐明个体的生物学状态^[29-30]。从微观上来说,mRNA 反映了来源生物的转录图谱。个体随时间推移或者来自不同环境的个体之间所产生的 mRNA 图谱的变化可以作为生物体对特定环境应激源反应的特征。也就是说,拥有相似基因图谱

的生物体,根据它们的发育阶段、生理状态、遗传背景或表型的不同,可能会在转录图谱中表现出显著的差异^[31-34]。

由于 RNA 序列只由在生物体组织内转录活跃的基因产生,因此不同状态的同种生物之间相应的转录特征可以由生物体产生的 eRNA 来反映,而这种生物特征可以在一段时间内检测到^[22, 24]。因此,Yates^[20]认为 eRNA 技术能够比 eDNA 技术以更高的检测分辨率来更精确地反映物种的存在,并提供物种存在与否之外的信息,这个过程可以通过使用高特异性靶向分析检测 eRNA 序列,反映从环境样品中检测到产生的特异性或强烈上调的 eRNA 转录物相应的生理状态来实现。Tsuru 等^[35]的研究首次证明了 eRNA 技术具有提高检测分辨率的能力,研究通过斑马鱼 eRNA 的 mRNA 分型来确认遗传分子的组织来源,发现一部分特定的靶向组织的 mRNAs 是在水中检测到的 eRNA 的来源,这进一步证明了 eRNA 技术具有监测水生脊椎动物生理状态的潜力。因此,eRNA 技术有望通过检测不同生理状态特异性表达的 mRNA 分型来监测生物个体的生理状态,从而提高生物多样性监测的检测分辨率,以更好的进行生态保护,进一步实现资源可持续利用。

2 环境 RNA 技术的研究进展

自 2010 年以来,随着生物技术特别是高通量测序技术的飞速发展,越来越多的研究利用 eRNA 技术监测复杂的生态系统的不同生物的多样性,主要包括陆地以及水生生态系统等,其中与水生生态系统有关的研究约占 eRNA 技术相关研究总数的 89%^[36-43](图 3)。

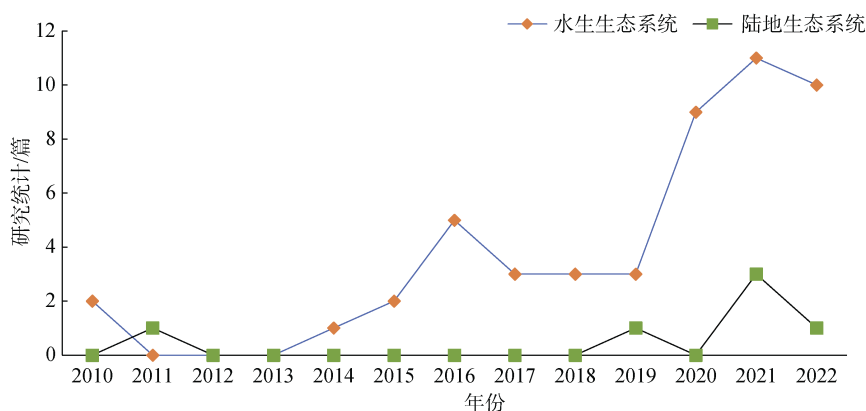


图 3 环境 RNA 研究统计

Fig. 3 Research statistics of eRNA

截至 2022 年 7 月, 相比于较为成熟并已投入实际应用的 eDNA 技术, 大多数评估 eRNA 技术对生物多样性监测的适用性的研究都是概念验证研究, 还有一部分是与 eDNA 技术进行对比或作为传统监测方法和 eDNA 技术的补充方法进行的实验研究。虽

然 eRNA 技术主要用于监测水生生态系统生物多样性, 但其中多数研究主要集中在海洋沉积环境中的原核生物、微型真核生物等小型生物的生物多样性监测上, 而利用 eRNA 技术监测海洋水体环境中的鱼类等大型生物的生物多样性的研究相对较少(图 4)。

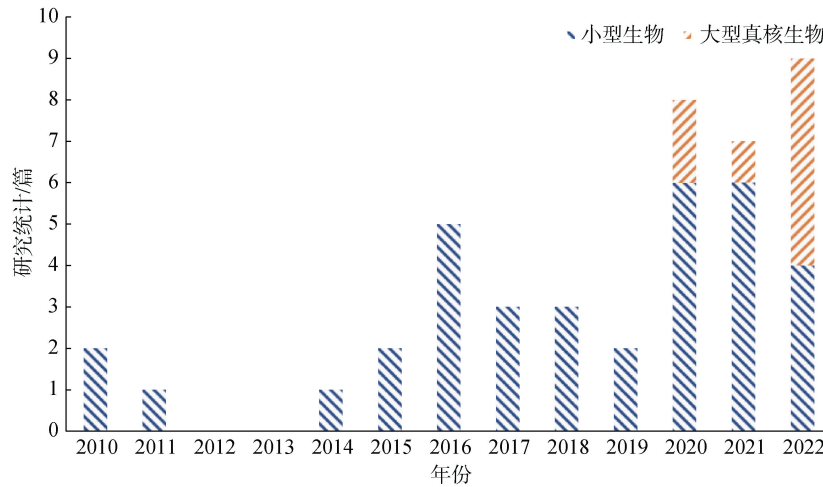


图 4 以小型生物与大型真核生物为研究对象的环境 RNA 研究统计
Fig. 4 Research statistics of eRNA on microfauna and macro-eukaryote

2.1 环境 RNA 技术在小型生物多样性监测中的应用

自 2014 年以来, 许多研究将 eRNA 技术用于水生生态系统的沉积环境和水体环境中原核生物、微型真核生物等小型生物的生物多样性监测上, 并与基于 eDNA 技术和传统的监测方法所得数据进行了比较, 以反映沉积物和水体中小型生物的生物多样性受人类活

动的影响, 评估 eRNA 技术在监测水生生态系统的生物多样性方面的可行性。尽管一部分研究认为, eDNA 技术在进行生物多样性监测方面的可行性与 eRNA 技术一致甚至更高^[41, 44-47]。但更多研究发现, eRNA 技术在生物多样性监测方面有相较 eDNA 技术所特有的优势, 因此能够作为一种监测水生生态系统的小型生物多样性的有力工具(表 1)。

表 1 eRNA 技术应用在小型生物群落监测中的文献统计

Tab. 1 Research statistics on the application of eRNA in monitoring microfauna communities

采样地点	研究对象	环境样品	研究技术	参考文献
鲑鱼养殖场	有孔虫	沉积物	eDNA/eRNA	Pawlowski 等 ^[44]
鲑鱼养殖场	微型后生动物	沉积物	eDNA/eRNA	Lejzerowicz 等 ^[48]
鲑鱼养殖场	有孔虫	沉积物	eDNA/eRNA	Pochon 等 ^[49]
鲑鱼养殖场	有孔虫	沉积物	eDNA/eRNA	Pawlowski 等 ^[50]
海上石油钻井	有孔虫	沉积物	eDNA/eRNA	Laroche 等 ^[51]
深海	原生生物及微型后生动物	沉积物	eDNA/eRNA	Guardiola 等 ^[45]
海洋	原生生物及微型藻类	海水	eDNA/eRNA	Marquardt 等 ^[52]
海上石油钻井	有孔虫	沉积物	eDNA/eRNA	Laroche 等 ^[41]
海洋	原生生物及微型藻类	海水	eDNA/eRNA	Meshram 等 ^[53]
船舶	真菌、原生生物及微型后生动物	船舱压载水	eDNA/eRNA	Pochon 等 ^[54]
沿海	微型后生动物	水柱及沉积物	eDNA/eRNA	López-Escardó 等 ^[55]

续表

采样地点	研究对象	环境样品	研究技术	参考文献
海上石油钻井	细菌、真菌及微型藻类	沉积物	eDNA/eRNA	Laroche 等 ^[46]
鲑鱼养殖场	细菌及有孔虫	沉积物	eDNA/eRNA	Keeley 等 ^[47]
鲑鱼养殖场	纤毛虫	沉积物	eDNA/eRNA	Forster 等 ^[56]
深海	原核生物、原生生物及微型后生动物	沉积物	eDNA/eRNA	Brandt 等 ^[57]
沿海	原生生物	沉积物	eDNA/eRNA	Broman 等 ^[58]
海山	细菌、原生生物及微型后生动物	沉积物	eDNA/eRNA	Kitahashi 等 ^[59]
海洋	原生生物、微型藻类及微型后生动物	沉积物	eDNA/eRNA	Iburg 等 ^[60]
牡蛎养殖场	牡蛎包纳米虫	海水	eDNA/eRNA	Mérou 等 ^[23]
黄海冷水团	原核生物、原生生物及微型藻类	沉积物	eDNA/eRNA	Huang 等 ^[61]
深海	有孔虫及微型后生动物	沉积物	eDNA/eRNA	Lejzerowicz 等 ^[62]
湖泊	细菌	沉积物	eDNA/eRNA	Pearman 等 ^[63]
沿海	有孔虫	加铬沉积物	eDNA/eRNA	Greco 等 ^[64]

在水生生态系统的沉积环境中, Pawlowski 等^[44, 50]和 Pochon 等^[49]对海洋渔业养殖场沉积物中的有孔虫进行监测, 发现 eRNA 技术能够更加强烈地检测到有孔虫物种丰富度随着有机富集程度的增加而急剧下降; Pochon 等^[49]基于 eRNA 技术所推断的不同流量养殖场之间的有孔虫群落结构与基于 eDNA 技术及传统的监测方法的所得结果一致, 且 eRNA 技术所得数据与各项生物指数及环境变量之间存在比 eDNA 技术更强的相关性; Laroche 等^[41, 46, 51]在监测近海石油钻井对有孔虫群落影响的研究中发现 eRNA 技术所得数据与环境变量及空间梯度之间的相关性更强, 且能够更好地反映人类活动对 α 多样性的影响。Lejzerowicz 等^[48]监测了苏格兰鲑鱼养殖场中微型后生动物的生物多样性, 证明了基于 eRNA 技术推断的生物指数能更好地反映与基于传统监测方法所得生物指数之间的相关性; Forster 等^[56]以纤毛虫为研究对象, 发现基于 eRNA 技术的纤毛虫群落监测的分辨率比基于 eDNA 技术的更高; Huang 等^[61]在对黄海冷水团内外底栖微型真核生物群落结构进行调查的研究显示, eRNA 技术分析在监测海洋底栖微型真核生物的空间分布方面具有很大优势。在水生生态系统的水体环境中, Marquardt 等^[52]和 Meshram 等^[53]在监测挪威西斯皮茨卑尔根岛海水中的原生生物及微型藻类的生物多样性研究中得出, eRNA 技术能够更好地反映微型真核生物群落中纤毛虫类群的存在; Pochon 等^[54]对新西兰附近码头的船舱压载水样品进行调查, 发现基于 eRNA 技术与 eDNA 技术所得数据之间存在差异, 且

更为突出地反映了纤毛虫等微型后生动物的生物多样性。eRNA 技术可以作为水生生态系统小型生物多样性监测的有效工具。

2.2 环境 RNA 技术在大型生物多样性监测中的应用

eRNA 技术的相关研究多聚焦于海洋、淡水沉积物中的小型生物多样性的监测, 而以水生生态系统中的鱼类等大型生物为研究对象的相关研究较少。但自 2020 年开始, 一些利用 eRNA 技术来监测水生生态系统中大型生物多样性的研究证实, 其可以作为 eDNA 技术的一种补充工具来监测鱼类等大型生物的群落结构和物种多样性(表 2)。

表 2 eRNA 技术应用在大型真核生物群落监测中的研究统计

Tab. 2 Research statistics on the application of eRNA in monitoring macroeukaryote communities

研究对象	环境样品	研究技术	参考文献
缨鳃虫和柄海鞘	海水	eDNA/eRNA	Wood 等 ^[22]
斑马鱼	海水	eRNA	Tsuri 等 ^[35]
鱼类	淡水	eDNA/eRNA	Miyata 等 ^[65]
桡足类	海水	eDNA/eRNA	Hirai 等 ^[66]
中国对虾	海水	eDNA/eRNA	Qian 等 ^[25]
缨鳃虫和柄海鞘	海水	eDNA/eRNA	Kagzi 等 ^[26]
缨鳃虫	海水	eDNA/eRNA	Brand 等 ^[67]
鱼类	淡水	eDNA/eRNA	Littlefair 等 ^[27]

在水族箱实验的基础上, Tsuru 等^[35]成功检测了斑马鱼的 6 个特异性 mRNA 靶标; Miyata 等^[65]通过 eRNA 技术靶向在日本那珂河中采集的水样中的线粒体 12S rRNA 基因, 成功地对鱼类进行了 eRNA 技术的分析, 结果显示 eRNA 技术对环境存在物种的检测敏感性略高于 eDNA 技术, 而阳性预测性明显高于 eDNA 技术, 同时, eRNA 技术所得数据与传统的实地调查所得物种丰度之间的相关性高于 eDNA 技术, 因此, 可以得出 eRNA 技术具有更强的潜力来识别实际存在于采样点的代谢活跃的鱼类物种组合; Littlefair 等^[27]利用 eRNA 技术来调查加拿大 IISD 实验淡水湖区中采集的水样, 研究成功确认 eRNA 来源于鱼类生物, 且实现了与 eDNA 技术相似的鱼类物种检测率, 甚至其检测到的真阳性率明显更高, 说明 eRNA 技术能够准确检测到更多的已知存在于湖泊中的物种。因此, eRNA 技术在监测水生生态系统中包括鱼类在内的大型真核生物的多样性方面是切实可行的。

2.3 环境 RNA 技术与环境 DNA 技术相结合

自 2016 年以来, 大量研究对水生生态系统中的小型生物多样性进行监测, 证明了将 eRNA 技术与 eDNA 技术结合使用, 能够监测最近存在于研究区域的代谢活跃的生物类群, 有效改善 eDNA 技术所产生的假阳性, 以提高检测结果的准确性。Meshram 等^[53]的研究显示, 将二者结合使用可以解释已识别分类群的代谢活性水平; Pochon 等^[54]在调

查船舶压载水样品的研究中, 进一步证实了 eRNA 技术能够确定环境样品中是否存在代谢活跃的生物体; Lejzerowicz 等^[62]监测太平洋上克拉里昂-克利珀顿区深海底栖微型真核生物的生物多样性, 结果表明 eRNA 技术可以更准确地描绘深海群落在空间和时间上的斑块性, 从而反映代谢活跃的、更短的时间尺度内的生物多样性。Laroche 等^[41, 46]研究表明, 结合 eRNA 技术和 eDNA 技术所得数据、建立共享数据集, 有望成为处理遗留 DNA、减少假阳性更为有效的方法; Greco 等^[64]监测围隔生态系统中铬含量不同的沉积物中底栖有孔虫群落所受的影响, 结果表明结合使用 eRNA 技术和 eDNA 技术有利于更准确地捕捉生态影响; López-Escardó 等^[55]在基于 eRNA 技术调查欧洲六 6 个沿海地点采集的水柱和沉积物样品的研究中发现, 使用 eRNA 技术和 eDNA 技术所得的共享数据集能够更好地监测研究区域的生物多样性。因此, eRNA 技术有望成为 eDNA 技术的有力补充。

3 环境 RNA 技术存在的问题及改进措施

eRNA 技术可以与 eDNA 技术优势互补、结合使用来提高监测水生生态系统生物多样性的准确度, 但迄今为止, eRNA 技术与 eDNA 技术仍然存在很多问题亟待解决。因此, 将 eRNA 技术作为新型补充工具投入实际应用还需要很多努力(表 3)。

表 3 eDNA 和 eRNA 技术监测生物多样性的优缺点总结

Tab. 3 Advantages and disadvantages based on eDNA and eRNA technologies in biodiversity monitoring

eDNA 技术 ^[68-69]		eRNA 技术	
优势	不足	优势	不足
简单易行、非侵入性的样品采集	易出现假阴性和假阳性	非侵入性、高灵敏度	存在产生假阴性的可能
无需专业的分类学知识即可操作	测序成本较高	eRNA 周转快, 减少 eDNA 产生的假阳性问题	获取足量且稳定的 eRNA 及逆转录所需的成本和时间更多
时间和空间灵敏度高, 提高物种检测率	野外采样后高质量保存和提取难度大	反映代谢活跃的、最近存在的生物类群	技术尚不成熟, 缺乏标准化方法
实时掌握生物多样性和生物量的变动趋势	数据库覆盖不足	提高检测分辨率	目前有关研究仍不足

一方面, 相比于 eDNA 技术, eRNA 的快速降解使 eRNA 技术投入应用的条件更为严格^[54]。具体表现在 eRNA 技术在样品采集、保存以及提取过程中,

为了确保能够获得足量的 eRNA 以用于下游分析, 需要付出比 eDNA 技术更多的成本和时间。在目前的研究中, 将样品低温保存或储存在 RNA 保存液中

通常是最大限度地减少现场采样和实验室处理之间 eRNA 损失的方法。然而,低温保存以及 RNA 保存液昂贵的成本,使得 eRNA 技术的实际应用存在限制^[70]。另一方面,与 eRNA 的组成、来源、浓度等相关的问题还没有明确的结论,且水生生态系统中 eRNA 释放和降解的相关研究均是在封闭的水族箱中针对有限的目标物种进行的,并不能完全还原自然环境对 eRNA 的影响,也无法推断各项研究结果之间存在差异甚至完全相反的原因^[20]。

因此,需要针对 eRNA 的敏感性来进一步研究专门、廉价且能够广泛应用的采样、保存以及提取方法,从而得到浓度高、稳定性好的 eRNA 以用于下游分析。另外,需要对 eRNA 自身存在的问题及自然环境中不同物种的 eRNA 的释放和降解进行进一步研究。

4 结论与展望

eRNA 技术主要通过收集环境中的 RNA 片段来实现相关生物多样性的监测调查。作为一种新颖的分子技术,目前关于 eRNA 技术的研究大多是概念验证和实验性研究。在研究对象上,目前基于 eRNA 技术的研究多集中于水生生态系统沉积环境中的原生生物等小型生物,而有关水生生态系统中水体环境中的鱼类等大型真核生物的研究相对较少;在全球范围内,目前基于 eRNA 技术监测水生生态系统生物多样性的研究主要集中在新西兰、日本、加拿大等发达国家,而国内基于 eRNA 技术的相关研究相对空缺。但 eRNA 技术具有不容忽视的应用价值,在未来仍需国内外的科研工作者们进一步开展相关研究,特别是对海洋水体环境中的鱼类等大型真核生物多样性的研究,以充分发挥 eRNA 技术的优势和潜力,为海洋生物多样性监测提供理论支持和技术手段。

目前,将 eRNA 技术投入实际应用还需要解决很多问题。第一,需要进一步对生物所释放的 eRNA 在自然环境中的可检测性进行确定;第二,需要标准化 eRNA 技术的采集方法;第三,需要进一步解决 eRNA 本身所存在的问题。eRNA 技术的投入使用将有望准确监测最近存在于研究区域的代谢活跃的生物类群的生物多样性,减少 eDNA 技术带来的假阳性,传递生物个体生理状态、环境压力响应和繁殖状态信息,提高实际应用中的检测分辨率,从而实现高灵敏度分析,这有助于更准确地监测人类活动造

成的环境扰动并为生态保护和资源可持续提供新的信息。但应当注意的是,eRNA 技术并不能完全替代 eDNA 技术,应将二者结合应用,优势互补,以有效减少误差的出现,提高研究的准确性,在水生生态系统生物多样性监测方面共同发挥作用。

参考文献:

- [1] ZIZKA V M A, KOSCHORRECK J, KHAN C C, et al. Long-term archival of environmental samples empowers biodiversity monitoring and ecological research[J]. *Environmental Sciences Europe*, 2022, 34(1): 40.
- [2] 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.
- [3] 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): 1450-1459.
- [4] DARLING J A, GALIL B S, CARVALHO G R, et al. Recommendations for developing and applying genetic tools to assess and manage biological invasions in marine ecosystems[J]. *Marine Policy*, 2017, 85: 54-64.
- [5] ZHANG H, YOSHIKAWA 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: 515.
- [6] DIAO C Y, JIA H, GUO S J, et al. Biodiversity exploration in autumn using environmental DNA in the South China sea[J]. *Environmental Research*, 2022, 204: 112357.
- [7] 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: 461.
- [8] BARNES M A, TURNER C R, JERDE C L, et al. Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems[J]. *Environmental Science & Technology*, 2014, 48(3): 1819-1827.
- [9] DEJEAN T, VALENTINI A, DUPARC A, et al. Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems[J]. *PloS One*, 2011, 6(8): e23398.
- [10] GOLDBERG C S, SEPULVEDA A, RAY A, et al. Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*)[J]. *Freshwater Science*, 2013, 32(3): 792-800.
- [11] THOMSEN P F, KIELGAST J, IVERSEN L L, et al. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA[J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21(11): 2565-2573.

- [12] DEINER K, ALTERMATT F. Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river[J]. *PloS One*, 2014, 9(2): e88786.
- [13] SHOGREN A J, TANK J L, ANDRUSZKIEWICZ E, et al. Controls on eDNA movement in streams: Transport, retention, and resuspension[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 5065.
- [14] CRISTESCU M E, HEBERT P D N. Uses and misuses of environmental DNA in biodiversity science and conservation[J]. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics*, 2018, 49(1): 209-230.
- [15] CRISTESCU M E. Can environmental RNA revolutionize biodiversity science?[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2019, 34(8): 694-697.
- [16] TORTI A, LEVER M A, JORGENSEN B B. Origin, dynamics, and implications of extracellular DNA pools in marine sediments[J]. *Marine Genomics*, 2015, 24: 185-196.
- [17] ORSI W, IDDLE J F, EDGCOMB V. Deep sequencing of seafloor eukaryotic rRNA reveals active Fungi across marine subsurface provinces[J]. *PloS One*, 2013, 8(2): e56335.
- [18] LI Y F, BREAKER R R. Kinetics of RNA degradation by specific base catalysis of transesterification involving the 2'-hydroxyl group[J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1999, 121(23): 5364-5372.
- [19] CHEE T S, CHIN Y B. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present[J]. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2009, 2009: 574398.
- [20] YATES M C, DERRY A M, CRISTESCU M E. Opinion environmental RNA: A revolution in ecological resolution?[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2021, 36(7): 601-609.
- [21] VON AMMON U, WOOD S A, LAROCHE O, et al. Linking environmental DNA and RNA for improved detection of the marine invasive fanworm *Sabella spallanzanii*[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2019, 6: 00621.
- [22] WOOD S A, BIESSY L, LATCHFORD J L, et al. Release and degradation of environmental DNA and RNA in a marine system[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 704: 135314.
- [23] MÉROU N, LECADÉ C, POUVREAU S, et al. An eDNA/eRNA-based approach to investigate the life cycle of non-cultivable shellfish micro-parasites: the case of *Bonamia ostreae*, a parasite of the European flat oyster *Ostrea edulis*[J]. *Microbial Biotechnology*, 2020, 13(6): 1807-1818.
- [24] MARSHALL N T, VANDERPLOEG H A, CHAGANTI S R. Environmental (e)RNA advances the reliability of eDNA by predicting its age[J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 2769.
- [25] QIAN T Y, SHAN X J, WANG W J, et al. Effects of temperature on the timeliness of eDNA/eRNA: A case study of *Fenneropenaeus chinensis*[J]. *Water*, 2022, 14(7): 1155.
- [26] KAGZI K, HECHLER R M, FUSSMANN G F, et al. Environmental RNA degrades more rapidly than environmental DNA across a broad range of pH conditions[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2022, 22(7): 2640-2650.
- [27] LITTLEFAIR J E, RENNIE M D, CRISTESCU M E. Environmental nucleic acids: A field-based comparison for monitoring freshwater habitats using eDNA and eRNA[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2022, 22(8): 2928-2940.
- [28] SIGSGAARD E E, JENSEN M R, WINKELMANN I E, et al. Population-level inferences from environmental DNA—Current status and future perspectives[J]. *Evolutionary Applications*, 2020, 13(2): 245-262.
- [29] TOM M, AUSLANDER M. Transcript and protein environmental biomarkers in fish—a review[J]. *Chemosphere*, 2005, 59(2): 155-162.
- [30] RAFTOS D A, MELWANI A R, HAYNES P A, et al. The biology of environmental stress: molecular biomarkers in Sydney rock oysters (*Saccostrea glomerata*)[J]. *Environmental Science-Processes & Impacts*, 2016, 18(10): 1359-1359.
- [31] AKBARZADEH A, G N THER O, HOUDE A L, et al. Developing specific molecular biomarkers for thermal stress in salmonids[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 749.
- [32] DEBES P V, NORMANDEAU E, FRASER D J, et al. Differences in transcription levels among wild, domesticated, and hybrid Atlantic salmon (*Salmo salar*) from two environments[J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21(11): 2574-2587.
- [33] SPANIER K I, MIEKE J, ELLEN D, et al. Conserved transcription factors steer growth-related genomic programs in daphnia[J]. *Genome Biology & Evolution*, 2017, 9(6): 1821-1842.
- [34] WATANABE Y, TANAKA R, KOBAYASHI H, et al. Metamorphosis-dependent transcriptional regulation of *xak-c*, a novel *Xenopus* type I keratin gene[J]. *Developmental Dynamics*, 2002, 225(4): 561-570.
- [35] TSURI K, IKEDA S, HIROHARA T, et al. Messenger RNA typing of environmental RNA (eRNA): A case study on zebrafish tank water with perspectives for the future development of eRNA analysis on aquatic vertebrates[J]. *Environmental DNA*, 2020, 3(1): 14-21.
- [36] PAREEK C S, SMOCZYNSKI R, TRETYN A. Sequencing technologies and genome sequencing[J]. *Journal of Applied Genetics*, 2011, 52(4): 413-435.

- [37] SOON W W, HARIHARAN M, SNYDER M P. High-throughput sequencing for biology and medicine[J]. *Molecular Systems Biology*, 2013, 9: 640.
- [38] ADRIAN-KALCHHAUSER I, BURKHARDT-HOLM P. An eDNA assay to monitor a globally invasive fish species from flowing freshwater[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0147558.
- [39] CLUSA L, ARDURA A, GOWER F, et al. An easy phylogenetically informative method to trace the globally invasive *potamopyrgus* mud snail from River's eDNA[J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0162899.
- [40] 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.
- [41] LAROCHE O, WOOD S A, TREMBLAY L A, et al. Metabarcoding monitoring analysis: the pros and cons of using co-extracted environmental DNA and RNA data to assess offshore oil production impacts on benthic communities[J]. *PeerJ*, 2017, 5: e3347.
- [42] 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.
- [43] WOOD S A, POCHON X, MING W, et al. Considerations for incorporating real-time PCR assays into routine marine biosecurity surveillance programmes: a case study targeting the Mediterranean fanworm (*Sabella spallanzanii*) and club tunicate (*Styela clava*)[J]. *Genome*, 2019, 62(3): 137-146.
- [44] PAWLOWSKI J, ESLING P, LEJZEROWICZ F, et al. Environmental monitoring through protist next-generation sequencing metabarcoding: assessing the impact of fish farming on benthic foraminifera communities[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2014, 14(6): 1129-1140.
- [45] GUARDIOLA M, WANGENSTEEN O S, TABERLET P, et al. Spatio-temporal monitoring of deep-sea communities using metabarcoding of sediment DNA and RNA[J]. *PeerJ*, 2016, 4: e2807.
- [46] LAROCHE O, WOOD S A, TREMBLAY L A, et al. A cross-taxa study using environmental DNA/RNA metabarcoding to measure biological impacts of offshore oil and gas drilling and production operations[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2018, 127: 97-107.
- [47] KEELEY N, WOOD S A, POCHON X. Development and preliminary validation of a multi-trophic metabarcoding biotic index for monitoring benthic organic enrichment[J]. *Ecological Indicators*, 2018, 85: 1044-1057.
- [48] LEJZEROWICZ F, ESLING P, PILLET L, et al. High-throughput sequencing and morphology perform equally well for benthic monitoring of marine ecosystems[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 13932.
- [49] POCHON X, WOOD S A, KEELEY N B, et al. Accurate assessment of the impact of salmon farming on benthic sediment enrichment using foraminiferal metabarcoding[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2015, 100(1): 370-382.
- [50] PAWLOWSKI J, ESLING P, LEJZEROWICZ F, et al. Benthic monitoring of salmon farms in Norway using foraminiferal metabarcoding[J]. *Aquaculture Environment Interactions*, 2016, 8: 371-386.
- [51] LAROCHE O, WOOD S A, TREMBLAY L A, et al. First evaluation of foraminiferal metabarcoding for monitoring environmental impact from an offshore oil drilling site[J]. *Marine Environmental Research*, 2016, 120: 225-235.
- [52] MARQUARDT M, VADER A, STUBNER E I, et al. Strong seasonality of marine microbial eukaryotes in a high-Arctic fjord (Isfjorden, in West Spitsbergen, Norway)[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016, 82(6): 1868-1880.
- [53] MESHAM A R, VADER A, KRISTIANSEN S, et al. Microbial eukaryotes in an Arctic under-ice spring bloom north of Svalbard[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2017, 8: 1099.
- [54] POCHON X, ANASTASIJA Z, FLETCHER L M, et al. Wanted dead or alive? Using metabarcoding of environmental DNA and RNA to distinguish living assemblages for biosecurity applications[J]. *PLoS One*, 2017, 12(11): e0187636.
- [55] LÓPEZ-ESCARDÓ D, PAPS J, VARGAS C D, et al. Metabarcoding analysis on European coastal samples reveals new molecular metazoan diversity[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 9106.
- [56] FORSTER D, FILKER S, KOCHEMS R, et al. A comparison of different ciliate metabarcoding genes as bioindicators for environmental impact assessments of salmon aquaculture[J]. *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 2019, 66(2): 294-308.
- [57] BRANDT M I, TROUCHE B, HENRY N, et al. An assessment of environmental metabarcoding protocols aiming at favoring contemporary biodiversity in inventories of deep-sea communities[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2020, 7: 234.
- [58] BROMAN E, BONAGLIA S, NORKKO A, et al. High throughput shotgun sequencing of eRNA reveals taxonomic and derived functional shifts across a benthic productivity gradient[J]. *Molecular Ecology*, 2021, 30(13): 3023-3039.
- [59] KITAHASHI T, SUGIME S, INOMATA K, et al. Meiofaunal diversity at a seamount in the Pacific Ocean: A

- comprehensive study using environmental DNA and RNA[J]. Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers, 2020, 160: 103253.
- [60] IBURG S, NYBOM I, BONAGLIA S, et al. Organic contaminant mixture significantly changes microbenthic community structure and increases the expression of PAH degradation genes[J]. Frontiers in Environmental Science, 2020, 8: 128.
- [61] HUANG P P, ZHAO F, XU K D, et al. Are marine benthic microeukaryotes different from macrobenthos in terms of regional geographical distribution? New insights revealed by RNA metabarcoding[J]. Continental Shelf Research, 2020, 209: 104255.
- [62] LEJZEROWICZ F, GOODAY A J, ANGELES I B, et al. Eukaryotic biodiversity and spatial patterns in the Clarion-Clipperton Zone and other abyssal regions: Insights from sediment DNA and RNA metabarcoding[J]. Frontiers in Marine Science, 2021, 8: 671033.
- [63] PEARMAN J K, BIESSY L, HOWARTH J D, et al. Deciphering the molecular signal from past and alive bacterial communities in aquatic sedimentary archives[J]. Molecular Ecology Resources, 2022, 22(3): 877-890.
- [64] GRECO M, LEJZEROWICZ F, REO E, et al. Environmental RNA outperforms eDNA metabarcoding in assessing impact of marine pollution: A chromium-spiked mesocosm test[J]. Chemosphere, 2022, 298: 134239.
- [65] MIYATA K, INOUE Y, AMANO Y, et al. Fish environmental RNA enables precise ecological surveys with high positive predictivity[J]. Ecological Indicators, 2021, 128: 107796.
- [66] HIRAI J, HIDAKA K, NAGAI S, et al. DNA/RNA metabarcoding and morphological analysis of epipelagic copepod communities in the Izu Ridge off the southern coast of Japan[J]. Ices Journal of Marine Science, 2021, 78(9): 3444-3456.
- [67] BRAND S C, JEFFS A G, VON AMMON U, et al. Assessing the presence, settlement and growth of the invasive Mediterranean fanworm, *Sabella spallanzanii*, on mussel farms[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2022, 554: 151767.
- [68] 刁曹鋆, 王闻, 线薇薇, 等. 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[J]. 海洋科学, 2022, 46(2): 135-144.
- DIAO Caoyun, WANG Wen, XIAN Weiwei, et al. Role of the environmental DNA technology application in the biomass assessment of the fishery resource: current status and future perspectives[J]. Marine Sciences, 2022, 46(2): 135-144.
- [69] 张辉, 线薇薇. 环境 DNA 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.
- [70] BOWERS H A, POCHON X, VON AMMON U, et al. Towards the optimization of eDNA/eRNA sampling technologies for marine biosecurity surveillance[J]. Water, 2021, 13(8): 1113.

Application of environmental RNA technology in biodiversity monitoring of the aquatic ecosystem

LI Wen-qiong^{1, 3}, DAI Shu-qin¹, ZHANG Hui^{1, 2, 3}, XIAN Wei-wei^{1, 2}

(1. CAS Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266237, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Nov. 1, 2022

Key words: environmental RNA; biodiversity, ecological monitoring; ecological conservation

Abstract: The continuous increase in human activities worldwide has caused a loss of aquatic biodiversity and a dramatic change in the aquatic community structure. Therefore, accurate and reliable biodiversity monitoring is essential for ecological conservation and sustainable resource use to determine species abundance and community structure in target areas. Environmental DNA (eDNA) technology is a new and noninvasive monitoring method that is rapidly developing. However, eDNA technology is prone to false positives, which lead to inaccurate real-time biodiversity monitoring that is still widespread. Owing to its rapid degradation, environmental RNA (eRNA) is potentially less prone to false positives than eDNA. This paper summarized the feasibility of eRNA in biodiversity monitoring of the aquatic ecosystem, primarily focusing on its detectability and potential to improve detection resolution in the aquatic ecosystem. Furthermore, the current research progress in the field of eRNA was also summarized. Finally, the current challenges associated with using eRNA were discussed, and a possible future research direction was proposed. This paper can provide a valuable reference for the practical application of eRNA in biodiversity monitoring, ecological conservation, and sustainable use of resources in aquatic ecosystems in the future.

(本文编辑: 赵卫红)