

舟山近海环境 DNA 保存方法的建立及优化*

陈 治¹ 陈建威² 王晓艳³ 高天翔⁴ 刘 岩⁵

(1. 海南热带海洋学院水产与生命学院 三亚 572022; 2. 青岛华大基因研究院 青岛 266555; 3. 浙江海洋大学国家海洋设施养殖工程技术研究中心 舟山 316022; 4. 浙江海洋大学水产学院 舟山 316022; 5. 中国水产科学研究院南海水产研究所 广州 510300)

摘要 近年来, 环境 DNA (environmental DNA, eDNA) 技术开始被广泛应用于水生生物多样性研究。本文通过绝对定量和高通量测序技术对舟山近海高浊度水样 eDNA 的保存方法进行了建立和优化。研究结果如下: (1) “酒精+低温”保存法的 eDNA 获得量是“酒精+常温”保存法的 0.78—1.06 (7d)、0.89—1.80 (15d)、1.05—2.75 (30d) 和 2.69 (60d) 倍; (2) 酒精保存法(低温、常温)存在 eDNA 富集物渗漏及滤膜黏附现象; (3) 短期内冷冻保存样品的 eDNA 获得量是酒精保存样品获得量的 1.25—1.59 倍 (7d) 和 1.07—1.20 倍 (15d); (4) 酒精保存法的 eDNA 降解速率慢于冷冻保存法, 长期内酒精保存样品的 eDNA 获得量是冷冻保存样品获得量的 1.99—2.10 倍 (30d) 和 2.84—7.64 倍 (60d); (5) 二次富集(过滤)能显著提高 eDNA 获得量, 富集组 eDNA 浓度是未富集组浓度的 1.60—4.95 倍 (“酒精+低温”) 和 1.21—2.04 倍 (“酒精+常温”); (6) “酒精+低温”保存的样品在高通量测序总丰度、各鱼种分丰度、物种多样性指数等多个方面优于冷冻保存样品; (7) 微生物(micro-organism)的 eDNA 降解速率慢于大生物(macro-organism), 不同界(Kingdom)的 eDNA 最优保存方法可能并不相同。本研究首次建立了舟山近海高浊度水样 eDNA 最适保存方法, 为相似水域的 eDNA 保存提供了借鉴参考。

关键词 舟山近海; eDNA 保存; “酒精+低温”; 二次过滤

中图分类号 S931.4 doi: 10.11693/hyhz20190200034

生物多样性是维持生态平衡、促进人与自然和谐发展的重要成分, 是生态系统稳定的关键因素, 也是生态系统对环境变化响应与适应的重要指标(Myers *et al.*, 2000)。准确掌握水生生物在水体环境中的生物量及其时空分布是开展水生生物多样性保护的基本前提和重要基础(Lodge *et al.*, 2012)。传统的拖网、电鱼、探鱼仪、潜水观测等水生生物多样性调查方法具有调查费用高、所需时间久、靶生物捕获率低、物种鉴别困难及对调查对象及其所在生境破坏性大等缺点(马鸿娟等, 2016; 姜维等, 2016)。近年来, 环境 DNA(environmental DNA, eDNA) 技术开始被逐渐应用于水生生物多样性调查。eDNA 是生物体释放于冰

芯、土壤、空气、水体、底泥等环境中的游离的 DNA 总称(Fahner *et al.*, 2016; Collins *et al.*, 2018; Seymour *et al.*, 2018)。该方法最早出现于 20 世纪 80 年代微生物生态学研究(Ogram *et al.*, 1987; Willerslev *et al.*, 2003; Bohmann *et al.*, 2014; Thomsen *et al.*, 2015), 2008 年开始被应用于水生生物研究领域(Ficetola *et al.*, 2008)。

eDNA 保存是 eDNA 分析的重要组成部分, 此步骤一般分酒精保存和冷冻保存两种(单秀娟等, 2018)。但目前尚无关于 eDNA 保存的统一标准。Takahara 等(2012)对冷冻保存 1—2d 后的水样进行抽滤, 发现 eDNA 获得量与现场抽滤的效果相同。Minamoto 等(2016)通过比较分析, 发现室温条件下 eDNA 降解速率较快, 而用酒

* 国家自然科学基金项目, 41776171 号, 41806180 号; 国家自然科学基金委 2018 年度东海春季共享航次, NORC2018-02 号。本研究的数据受控储存在国家基因库核酸序列归档库(CNSA: <https://db.cngb.org/cnsa>), 可使用编号: CNP0000391 搜索获取相关数据。陈 治, 博士研究生, E-mail: change@163.net

通信作者: 高天翔, 教授, 博士, E-mail: gaotianxiang0611@163.com

收稿日期: 2019-02-12, 收修改稿日期: 2019-05-23

精保存后 eDNA 在 6d 内不存在显著降解。同属冷冻保存, 一般认为超低温 -80°C 效果优于 -20°C , 但目前已有的水生生物 eDNA 保存却极少使用 -80°C 冷冻保存 (Deiner *et al.*, 2015; 姜维等, 2016; Doğdu *et al.*, 2016; Minamoto *et al.*, 2016; Tsuji *et al.*, 2016)。由此来看, eDNA 的最佳保存方法, 可能与研究的对象、水域、目的、保存的灵便性等密切相关。舟山渔场是我国最大的近海渔场, 该海域泥沙含量高(张启龙等, 2007)。目前国内尚无该海域及类似高浊度水域水生生物 eDNA 保存方法的相关研究。本研究采用绝对定量(absolute quantification)和高通量测序方法(next-generation sequencing, NGS)分析了不同 eDNA 保存方法的差异, 以期探明舟山近海 eDNA 最佳保存方法, 为该海域开展基于 eDNA 技术的水生生物多样性调查提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

定量检测对象为浙江省舟山市西轩岛乌贼繁育中心培育的曼氏无针乌贼(*Sepiella japonica*)群体, 胴长 3.0—7.2cm, 体重 24—127g。高通量测序对象为舟山渔场某海域天然海水。

1.2 冷冻、“酒精+常温”、“酒精+低温”三种保存方法初步比较

实验开始之前统一使用浓度为 0.1%的次氯酸钠溶液对水桶、量筒、烧杯、滤泵、镊子、剪刀等进行消毒处理。水样采集于浙江省舟山市海洋科学城($29^{\circ}58'40.81''\text{N}$, $122^{\circ}12'57.47''\text{E}$)附近海域。采样时间为 2017 年 4 月 15 日。取两只总重量为 155.9g 的曼氏无针乌贼(已死), 放入刚采集的 10L 海水水样中。冲洗乌贼身上的粘膜、墨汁等物质。玻璃棒轻搅 1min 后, 将乌贼用镊子取出。继续用玻璃棒轻搅 1min, 使水样充分混合。将 10L 水样按 1:1000 的比例加入浓度为 10%的苯扎氯铵试剂(阳离子表面活性剂), 使水样中苯扎氯铵的终止浓度为 0.01%。用直径为 47mm、孔径为 $0.45\mu\text{m}$ 的硝酸纤维滤膜抽取 39 个体积为 100mL 的水样。抽滤装置为不锈钢三联抽(Combisart 3-branch stainless steel manifold, GM-0.33A pump)。滤膜保存方式见表 1。

表 1 三种 eDNA 保存方法分组设置信息

Tab.1 The group setup of three eDNA preservation methods

组别	滤膜数量	滤膜处理方式
a	12	锡箔纸包覆, -20°C 冷冻保存
b	12	锡箔纸包覆, 加酒精后 -20°C 低温保存
c	12	锡箔纸包覆, 加酒精后常温保存

锡箔纸包覆时注意留一小部分滤膜与酒精接触。对最后 3 个水样及阴性对照立即进行 eDNA 提取。结果作为 a、b、c 三组的初始浓度(0d 组)。其余 36 个滤膜则分别在保存 7、15、30、60d 后各取 9 个进行 eDNA 提取。eDNA 提取方法参照姜维等(2016)、马竹欣(2016)。数字定量 PCR(digital PCR, dPCR)扩增及后续数据处理参考 Doi 等(2015)。

1.3 酒精保存方法的优化

针对 1.2 酒精保存(b 常温组、c 低温组)方法中出现的滤膜上富集物易渗漏等缺点, 本小节改进酒精保存方法。对渗漏的富集物二次过滤, 探讨二次过滤对 eDNA 获得量的影响。

采样地点、采样方式及防污染措施与 1.2 相同, 采样时间为 2017 年 5 月 20 日。取 3 只总重量为 176.5g 的曼氏无针乌贼, 按照 1.2 处理方式使水样中含有曼氏无针乌贼 eDNA 后, 抽滤 63 个体积为 50mL 的水样。滤膜保存方式见表 2。

表 2 二次过滤分组设置
Tab.2 Group setup of secondary filtration

组别	滤膜数量	滤膜处理方式
a	12	锡箔纸包覆, -20°C 冷冻保存
b-1	12	锡箔纸包覆, 加酒精后 -20°C 低温保存
b-2	12	加酒精后 -20°C 低温保存
c-1	12	锡箔纸包覆, 加酒精后常温保存
c-2	12	加酒精后常温保存

对最后 3 个水样及阴性对照进行 eDNA 提取。结果作为五组样品的初始浓度(0d 组)。其余 60 个滤膜则分别在保存 7、15、30、60d 后各取 15 个滤膜进行 eDNA 提取。eDNA 提取时, b-1、c-1 组不进行二次过滤; b-2、c-2 组则用直径 47mm、孔径 $0.22\mu\text{m}$ 的滤膜进行二次过滤。过滤前先轻微晃动离心管, 并对离心管及滤膜用 15mL 蒸馏水反复润洗三次, 依次将全部液体加入新滤膜上进行过滤。eDNA 提取方法及数字定量 PCR 扩增、后续数据分析参考 1.2。

1.4 冷冻与“酒精+低温”两种保存方法高通量测序结果比较

利用国家自然科学基金 2018 年东海春季共享航次和自然资源部第二海洋研究所 2018 年东海春季资源调查, 对浙江近海十个调查站位取两个表层海水平行样, 每个平行样体积为 450mL。一组平行样 -20°C 冷冻保存(a 组), 另一组平行样加酒精后 -20°C 冷冻保存(b 组)。样品保存 58、94d 后从 a、b 两组各

取5个水样,并对b组样品进行二次过滤。在青岛华大基因研究院进行eDNA提取和鱼类12S rRNA metabarcoding测序分析。所用引物、建库流程及后续数据分析参照Miya等(2015)。

1.5 差异显著性分析

运用SPSS13.0软件对不同样品eDNA分子获得量进行差异显著性分析。其中,两组样本间比较采用T检验(student's t test),检验之前先使用F检验查看方差齐性。对于具有方差齐性的样本采用双样本等方差检验,不具有方差齐性的样本采用双样本异方差检验;多组样品间(三组及三组以上)比较采用单因素方差分析(one-way analysis of variance, one-way ANOVA)。显著差异阈值为 $P=0.05$,试验结果以“平均值±标准差”表示。

2 结果

2.1 三种eDNA保存方法初步比较

单因子方差分析结果显示:随保存时间的增加,a、b、c三组曼氏无针乌贼分子拷贝数显著下降,组内不同天数组之间存在极显著差异(a组: $F=418.13, P<0.001$; b组: $F=146.21, P<0.001$; c组: $F=248.95, P<0.001$)。保存7、15、30、60d后eDNA获得量分

别为初始浓度的0.59—0.95 (0.77 ± 0.18)、0.57—0.69 (0.64 ± 0.06)、0.21—0.45 (0.36 ± 0.13)、0.05—0.38 (0.19 ± 0.17)倍。除保存时间外,保存方法也显著(或极显著)影响eDNA获得量。保存7d、15d时,冷冻保存组(a组)eDNA获得量最高,是“酒精+低温”组(b组)和“酒精+常温”组(c组)的1.59(7d)、1.25倍(7d)和1.20(15d)、1.07倍(15d);保存30d、60d时b组获得量最高,分别为a组和c组的2.1(30d)、1.05倍(30d)和7.67(60d)、2.69倍(60d)。除初始组(0d)外,其余不同天数组在三种保存方法间均存在显著或者极显著差异(0d: $F=0, P=1$; 7d: $F=42.95, P=0.0062$; 15d: $F=27.46, P=0.0118$; 30d: $F=78.57, P=0.0026$; 60d: $F=216.61, P=0.0006$)。三种保存方法在保存不同天数后其曼氏无针乌贼eDNA分子拷贝数(copies/ μL)见图1、表3。

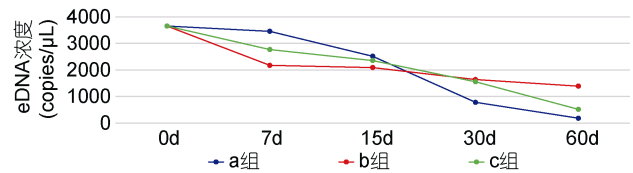


图1 三种eDNA保存方法数字PCR定量检测结果
Fig.1 Results of three eDNA preservation methods quantified by digital PCR

表3 三种保存方法eDNA获得量(copies/ μL) (平均值±标准差)
Tab.3 eDNA yield of three preservation methods (copies/ μL) (mean \pm SD)

滤膜保存天数 (d)	组别		
	a组	b组	c组
0	3501—3819(3653±160)	3501—3819(3653±160)	3501—3819(3653±160)
7	3268—3631(3455±182)	2090—2317(2172±126)	2683—2825(2768±175)
15	2386—2646(2515±130)	1974—2274(2090±161)	2269—2452(2353±292)
30	686—899(779±109)	1538—1726(1637±94)	1442—1634(1556±101)
60	149—211(182±31)	1332—1445(1390±57)	471—582(516±58)

2.2 二次过滤对eDNA获得量的影响

b-1、b-2除在0d组eDNA获得量无差异外,其余不同天数组均存在显著或极显著差异(7d, $P=0.0212$; 15d, $P=0.0071$; 30d, $P=0.0011$; 60d, $P=0.0003$)。b-2不同天数组eDNA浓度分别为b-1对应组的1.81、1.60、2.09、4.95倍。c-1、c-2虽然只在7d、30d时eDNA获得量有显著差异,但c-2组的eDNA平均浓度一直高于c-1组(7d, $P=0.0196$; 15d, $P=0.0732$; 30d, $P=0.0056$)。c-2不同天数组eDNA浓度分别为c-1对应组的1.21、1.28、2.04倍(60d时c-1、c-2组浓度均为0)。

经优化后,b-2组无论是短期保存(15d以内)还是

长期保存(15—60d),其曼氏无针乌贼eDNA获得量均等于或显著高于冷冻保存组(a组)(图2、表4)。b-2

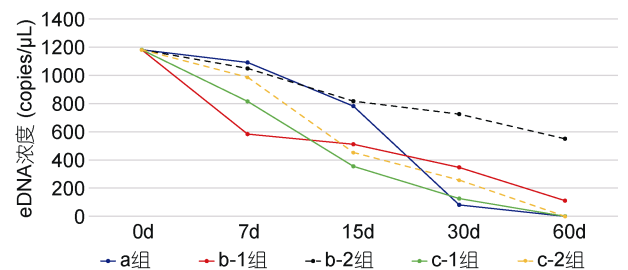


图2 二次过滤后不同组数字PCR定量检测结果
Fig.2 Results of quantitative detection by digital PCR for different groups after secondary filtration

表 4 二次过滤后不同组 eDNA 获得量(copies/ μL) (平均值 \pm 标准差)
Tab.4 The eDNA yield of three preservation methods after secondary filtration (mean \pm SD)

滤膜保存 天数(d)	组别				
	a 组	b-1 组	b-2 组	c-1 组	c-2 组
0	1067—1206(1182 \pm 105)	1067—1206(1182 \pm 105)	1067—1206(1182 \pm 105)	1067—1206(1182 \pm 105)	1067—1206(1182 \pm 105)
7	1048—1148(1092 \pm 51)	550—605(583 \pm 29)	916—1123(1050 \pm 116)	786—873(816 \pm 50)	926—1048(987 \pm 61)
15	731—846(782 \pm 59)	467—556(511 \pm 45)	750—884(817 \pm 67)	331—378(355 \pm 24)	386—519(453 \pm 67)
30	69—101(81 \pm 17)	329—374(347 \pm 24)	688—778(725 \pm 47)	93—164(126 \pm 36)	239—282(257 \pm 22)
60	0	97—132(111 \pm 19)	514—588(550 \pm 37)	0	0

不同天数组 eDNA 浓度分别为 a 组对应天数组的 0.96、1.04、8.95 倍(60d 时 a 组 eDNA 浓度为 0)(7d, $P=0.6033$; 15d, $P=0.5298$; 30d, $P=0.0002$; 60d, $P=0.0001$)。

2.3 保存 58d 后样品高通量测序结果

测序所得的 observed species 曲线后期呈平滑状态, 说明样品测序量足够, 可以用于后续数据分析(图 3, 左)。a、b 两组所得的鱼类序列数分别为 8442—32924 (24004 \pm 9527)、33455—58348 (50080 \pm 11404), OTU 数目分别为 21—40 (29.5 \pm 7.97)、24—45 (34.25 \pm 8.98)(表 5)。b 组的鱼类 eDNA 序列数目显著高于 a 组, 是 a 组的 1.08—6.91 (2.68 \pm 2.09)倍。a、b 两组在 Tag 数目上接近极显著差异($P=0.0115$)。b 组 5 个站位的 OTU 数目均高于 a 组(图 3, 右; 表 5), 是 a 组的 1.09—1.24 (1.15 \pm 0.06)倍, 但两组间不存在显著差别($P=0.4567$)。此外, a、b 两组在 Shannon 指数上存在显著差别($P=0.0221$)。显示综合考虑种数和均匀度两方面因素时, 样品存在较大差异(表 5)。a、b 两

组共定义 74 个 OTU, 其中有 14 种鱼类在 OTU 丰度上存在显著或者极显著差别。这 14 种鱼中, 除花鲈 *Lateolabrax maculatus* 为 a 组丰度高于 b 组外, 其余皆为 b 组高于 a 组(表 6)。样品种水平的物种 profiling 柱状图显示, a 组相对丰度最高的五种鱼依次为角木叶鲈 *Pleuronichthys cornutus* (16.52%)、黄鲛鲷 *Lophius litulon* (13.12%)、小裸胸鲷 *Gymnothorax minor* (9.7%)、柠檬斑鲷 *Pseudorhombus cinnamoneus* (8.56%)、细条天竺鲷 *Jaydia lineata* (8.43%), 但 b 组依次为小裸胸鲷 *Gymnothorax minor* (13.75%)、小黄鱼 *Larimichthys pamoides* (12.19%)、褐牙鲷 *Paralichthys olivaceus* (8.18%)、黄鲛鲷 *Lophius litulon* (7.69%)、叫姑鱼 *Johnius grypotus* (6.56%)(图 4)。两组样品物种组成相对丰度并不相同, 这与 Shannon 指数上存在显著差别相对应。种水平的丰度热图结果显示, a、b 两组聚类无规律, 10 个样品间均未出现平行样率先聚类的情况, 表明 eDNA 保存方法影响平行样间的相似性, 使平行样在物种组成和丰度上差异较大(图 5)。

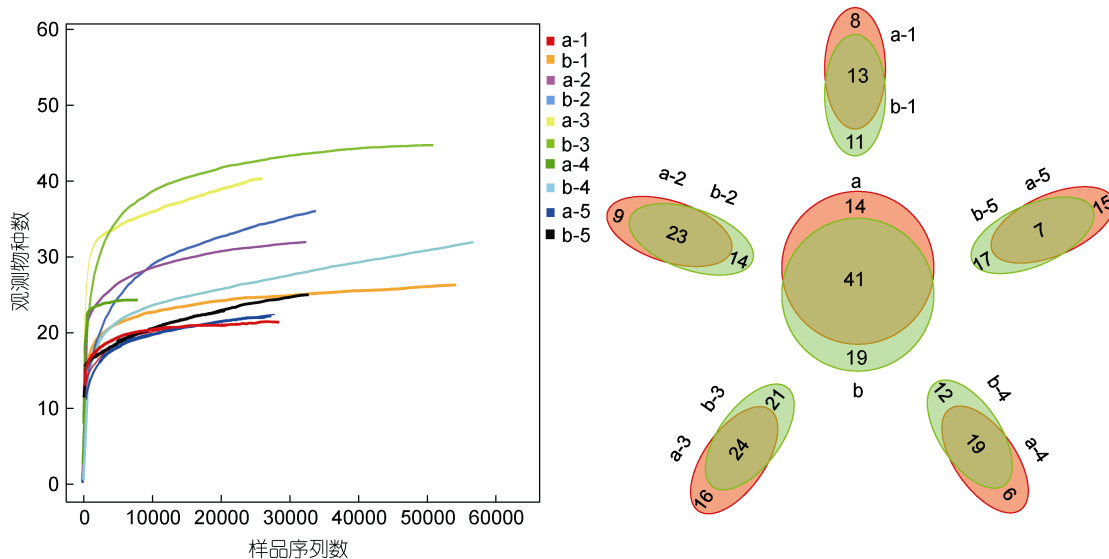


图 3 鱼类物种稀释曲线(左)及 OTU 信息(右)

Fig.3 Rarefaction curve of the observed fish species (left) and the OTU information (right)

表 5 鱼类 eDNA 样本高通量测序基本信息及差异显著性分析

Tab.5 Fish species information of eDNA samples after NGS (the next-generation sequencing) and analysis of the significance

组别或 P 值	Tag 数	OTU 数	Chao 指数	Ace 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
a	8442— 32924(24004±9527)	21— 40(29.5±7.97)	21— 42.5(32.1±9.96)	21.38— 43.04(33.81±9.77)	1.72— 2.11(1.83±0.16)	0.15— 0.24(0.20±0.03)
b	33455— 58348(50080±11404)	24— 45(34.25±8.98)	24.33— 59.5(40.77±14.12)	25— 58.83(45.42±13.99)	1.86— 2.25(2.11±0.15)	0.14— 0.21(0.17±0.03)
P	0.0115	0.4567	0.299	0.172	0.0221	0.2009

表 6 丰度具有显著性差异的鱼种

Tab.6 Fish species that have significant differences in abundance

物种名称	a 组		b 组		P
	绝对丰度	相对丰度	绝对丰度	相对丰度	
前肛鳗 <i>Dysomma anguillare</i>	0—126(28±54)	0—0.71(0.16±0.31)	0—8394(2095±3626)	0—0.99(0.64±0.46)	0.0496
龙头鱼 <i>Harpadon nehereus</i>	0—470(96±208)	0—0.15(0.05±0.07)	5—5150(2631±3648)	0.85—0.99(0.95±0.07)	0
长蛇鲻 <i>Saurida elongata</i>	0—70(14±31)	0—0.12(0.02±0.05)	0—501(139±219)	0—1(0.38±0.52)	0.0135
日本鳀 <i>Engraulis japonicus</i>	0—139(63±67)	0—0.26(0.1±0.12)	1—2154(873±913)	0.74—1(0.90±0.12)	0
多棘腔吻鳕 <i>Coelorinchus multispinulosus</i>	0—39(8±17)	0—0.1(0.02±0.04)	0—340(68±151)	0—1(0.38±0.52)	0.0048
六丝钝尾虾虎鱼 <i>Amblychaeturichthys hexanema</i>	0—144(31±63)	0—0.08(0.02±0.03)	0—5416(1724±2483)	0—0.99(0.57±0.53)	0.0039
花鲈 <i>Lateolabrax maculatus</i>	0—6333(1267±2831)	0—1(0.4±0.54)	0	0	0
叫姑鱼 <i>Johnius grypotus</i>	7—5632(1288±2436)	0.01—0.92(0.23±0.38)	63—11017(3066±4585)	0.08—0.98(0.77±0.38)	0.0405
小黄鱼 <i>Larimichthys polyactis</i>	0—304(99±124)	0—0.41(0.09±0.18)	0—22718(5699±9652)	0—0.88(0.70±0.43)	0.0323
少鳞鱧 <i>Sillago japonica</i>	0	0	0—245(50±108)	0—1(0.4±0.55)	0
单指虎鲷 <i>Minous monodactylus</i>	0	0	0—16(3±7)	0—1(0.4±0.55)	0
短吻三线舌鲷 <i>Cynoglossus abbreviatus</i>	0—6(2±4)	0—0.09(0.02±0.04)	0—19(4±8)	0—1(0.38±0.52)	0.0176
镰鲷 <i>Pampus echinogaster</i>	0—1312(422±604)	0—0.38(0.1±0.17)	1—5114(1767±2095)	0.62—1(0.90±0.17)	0
燕魮未定种 <i>Gymnura</i> sp.	0	0	0—8(2±8)	0—1(0.4±0.55)	0

2.4 保存 94d 后样品高通量测序结果

保存 94d 后的样品 eDNA 严重降解, 5 个站位中有 2 个站位样品测序失败。剩余 3 个站位样品均未检测到鱼类信息, 高通量测序结果皆为微生物物种。测序所得的 observed species 指数曲线后期呈平滑状态(图 6, 左)。a、b 两组的有效序列数分别为 52571—58790 (56296±3582)、47563—52589 (50574±2895), OTU 数分别为 63—82 (73.2±9.71)、44—81 (59.2±20.81)。a 组的序列数和 OTU 数略高于 b 组, 是 b 组的 1.105—1.118 (1.114±0.007)和 0.938—1.782 (1.384±0.424)。但

两组之间并无显著区别(Tag number: $P=0.0945$; OTU number: $P=0.2977$) (表 7)。Chao 指数和 Simpson 指数上存在显著差别($P=0.0319$; $P=0.023$), 显示两组样品在物种组成上存在一定的差别。物种 profiling 图显示虽然 a、b 两组的第一优势菌群均为变形菌门(Proteobacteria; a: 67.18%, b: 62.45%), 但第二大优势菌群却分别为放线菌门(Actinobacteria; a: 17.04%, b: 2.67%)和拟杆菌门(Bacteroidetes; a: 3.98%, b: 14.26%)(图 6, 右)。不同的 eDNA 保存方法也对微生物的物种组成产生一定影响。

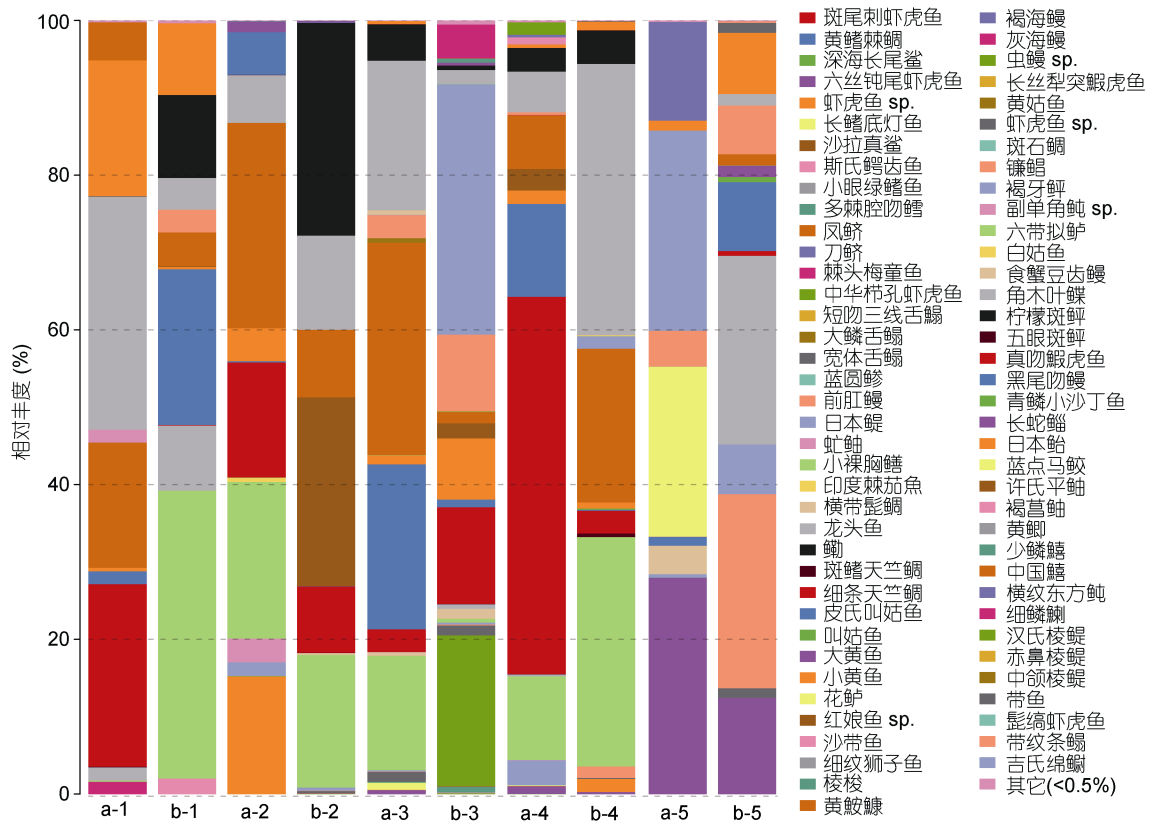


图 4 种水平的 profiling 柱状图

Fig.4 The profiling histogram at species level

3 讨论

3.1 酒精和低温的保护作用

加入酒精保存的样品, 7d 后其浓度约为初始浓度的 69.03%—83.5% (76.1%±7.24%) (c、c-1、c-2 组)。样品常温保存 60d 后, 曼氏无针乌贼 eDNA 分子拷贝数依然较高(c 组: 471—582 (516±58))。在交通闭塞、取样困难、电力匮乏的野外, 蠕动泵抽滤后对滤膜进行“酒精+常温”保存不失为 eDNA 保存的优选(姜维等, 2016; 马竹欣, 2016)。低温条件下, 酒精对 eDNA 的保护效果依旧明显。样品保存 30、60d 时, 有酒精组(b、b-1、b-2 组)曼氏无针乌贼 eDNA 分子获得量是无酒精组(a 组)eDNA 获得量的 2.10—8.95(5.74±3.12) 倍。并且保存时间越久, 差别倍数越高。高通量测序结果也表明, 有酒精组样品(b 组)在样品总序列数和多个鱼种分序列数上均显著高于无酒精组(a 组)。酒精对 DNA 有较好的保护作用, 因此 Ficetola 等(2008)、Thomsen 等(2012a, b)、Minamoto 等(2016)、姜维等(2016)、马竹欣(2016)等在野外采样时均曾使用酒精对 eDNA 进行保存。

酒精保存法有一定缺点, 主要表现在富集物容易渗漏、后续去酒精过程繁琐、若风干时间过长则容易导致 eDNA 降解。而无酒精保存组却不存在这些问题。Jo 等以竹荚鱼(*Trachurus japonicus*)为定量检测对象, 发现温度显著影响 eDNA 降解速率, 建议使用低温对 eDNA 进行保存(Jo *et al.*, 2019)。Yamanaka 等(2017)的研究也表明高温加速 eDNA 降解。本研究中, 冷冻处理对样品短期保存(15d 内)效果良好。在此时间范围内, a 组的 eDNA 平均分子获得量高于 b、b-1、c、c-1、c-2 五组的分子获得量。样品的 eDNA 获得量是后五者的 1.25—1.59 倍(7d)和 1.07—1.20 倍(15d)。特别是 7d 组, 其 eDNA 浓度是初始组的 92.39%—94.58%。采用冷冻保存法对滤膜进行短期保存, 不仅可以获得最高的 eDNA 获得量, 还可以避免酒精带来的繁琐操作。但是, 冷冻保存的 eDNA 样品在 15d 后有加速降解的趋势。保存 30—60d 时, 曼氏无针乌贼分子浓度最低值均来自 a 组, 仅为“酒精+常温”组(c、c-1、c-2)的 0—64.29% (30.19%±26.11%)。因此不建议使用 -20°C 冷冻处理方式对滤膜进行长期保存。

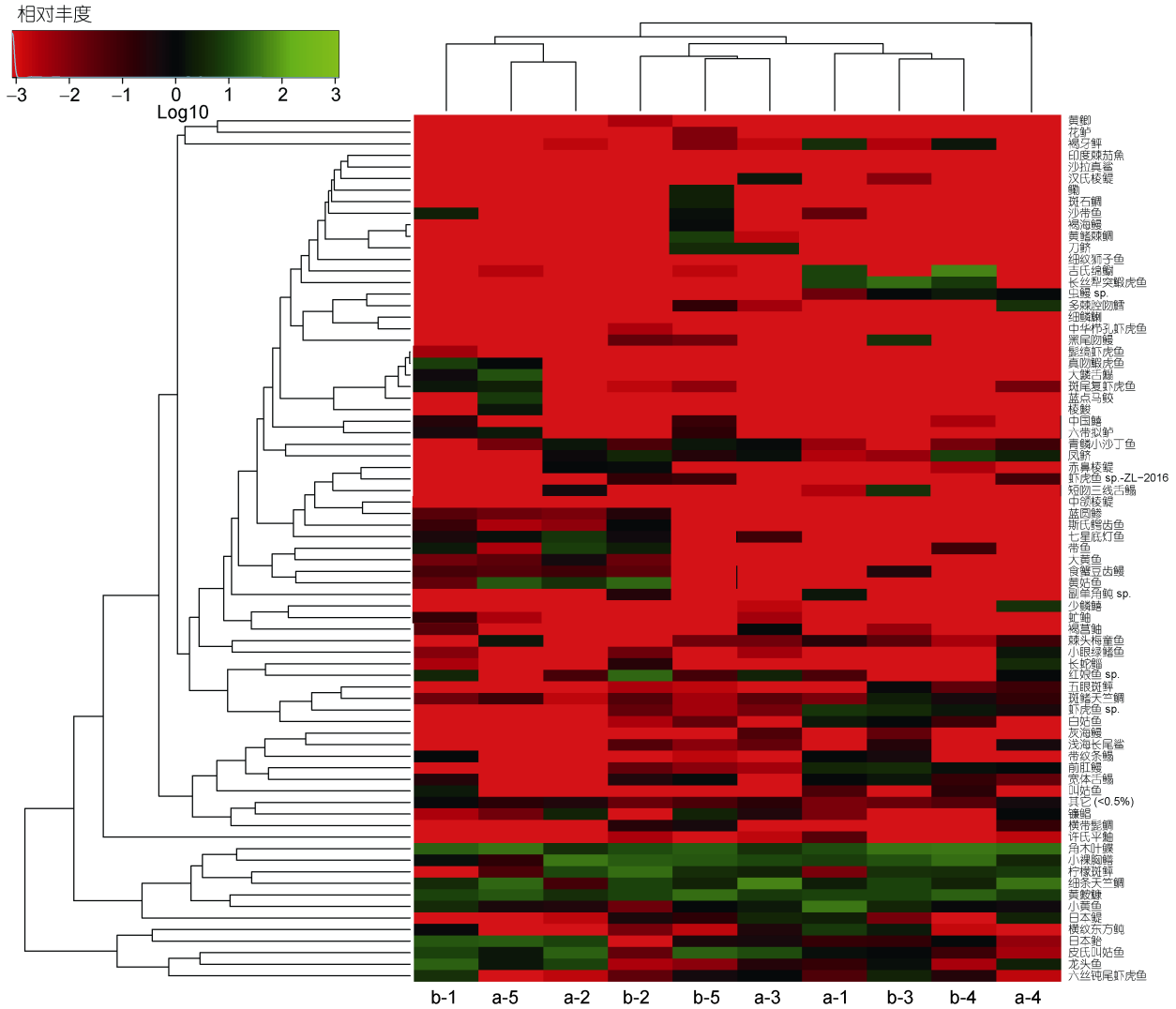


图 5 种水平的丰度热图
Fig.5 Log-scaled percentage heat map at species level

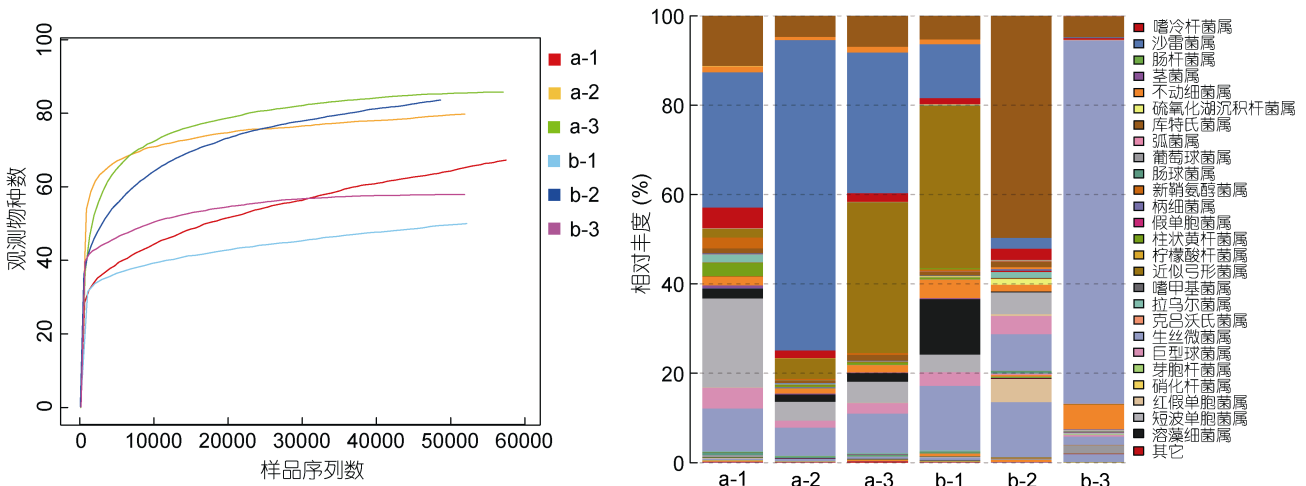


图 6 微生物物种稀释曲线(左)及属水平的 profiling 柱状图(右)
Fig.6 Rarefaction curve of observed micro-organisms species (left) and profiling histogram at genus level (right)

表 7 微生物 eDNA 样本高通量测序基本信息及差异显著性分析
Tab.7 Micro-organism information of eDNA samples after NGS and analysis of the significance

组别或 P 值	Tag number	OTU number	Ace 指数	Chao 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
a	52571— 58790(56296±3582)	63— 82(73.2±9.71)	64.33— 83.34(75.93±10.27)	68— 105(89±19)	1.81— 2.55(2.18±0.37)	0.18— 0.31(0.23±0.07)
b	47563— 52589(50574±2895)	44— 81(59.2±20.81)	46.95— 82.62(59.03±20.43)	54— 95(68.67±22.85)	0.89— 2.23(1.73±0.73)	0.28— 0.67(0.44±0.20)
P	0.0945	0.2977	0.2905	0.0319	0.1124	0.023

3.2 二次过滤的优点

目前, 有研究者在 eDNA 提取之前使用专门的唾液收集管对滤膜上的 eDNA 进行二次富集(离心), 以提高 eDNA 获得量(Takahara *et al*, 2013; Yamamoto *et al*, 2016; Minamoto *et al*, 2017)。但此类唾液收集管对离心机规格有要求, 且价格较贵。针对酒精保存法存在的问题, 本研究探索了二次过滤对 eDNA 获得量的影响。“2.2”、“2.3”的结果表明: 二次过滤能够显著提高 eDNA 的获得量。

与冷冻保存法相比, 酒精保存法最大的劣势在于后期去酒精操作较为繁琐。但二次富集则可弥补这些缺陷。首先, 采用二次过滤法在取样阶段无需对滤膜进行锡箔纸包覆处理, 直接对滤膜浸泡即可。滤膜在浸泡过程中不易发生黏附。而锡箔纸包覆过的滤膜则易出现滤膜粘附成团块现象, 不利于后期展开风干。其次, 即使经过严格包覆处理, 样品也会出现 eDNA 富集物渗漏现象。二次过滤可将这部分 eDNA 重新收集。此操作效果类似 Minamoto 等(2017)用唾液收集管进行二次离心操作。最后, 离心管体积小、过滤时间短。二次过滤后用超纯水润洗滤泵、滤膜, 新滤膜上残留的酒精较少, 液体基本为水。可直接用于 eDNA 提取。既省去了酒精风干所浪费的时间, 也避免了风干带来的 eDNA 降解。

3.3 后续还需进一步优化的环节

有研究表明滤膜孔径影响 eDNA 获得量(Deiner *et al*, 2015)。本研究使用孔径 0.22 μm 的滤膜进行二次过滤。后续应探讨更小孔径滤膜的富集效果。保存 94d 的样品高通量测序后未能检测到鱼类信息。OTU 经注释后皆为微生物。微生物的 eDNA 降解速率可能慢于大生物。使用更低的保存温度或许能延长鱼类 eDNA 的保存时间。同时, -20°C 冷冻保存的曼氏无针乌贼 eDNA 样品在 15d 后有加速降解的趋势(见结果 2.1、2.2 部分), 这可能也是由未使用更低的冷冻温度造成(Strickler *et al*, 2015)。赵梦迪(2017)利用环境 DNA 分析冬季中国东黄海海域的鱼类多样性时使用

-80°C 对水样进行保存; Rodgers、Cowart 等使用液氮对南、北极水样进行了超低温保存, 但三者的保存时间均未超过一个月, 且均未进行 eDNA 降解速率方面的研究(Cowart *et al*, 2018; Rodgers *et al*, 2018)。一些微生物 eDNA 在 -80°C 条件下可保存一年(赵裕栋等, 2012), 组织 DNA 在超低温条件下的保存时间则更久(庞峻峰等, 2001)。此类结果要优于本研究。但与微生物 eDNA 及组织 DNA 不同, 自然水体中大生物 eDNA 浓度低、降解快(Tsuji *et al*, 2016; Jo *et al*, 2019), 一般 24h 后即低于定量检测阈值。而在偏远地区(如山区或只能徒步采样的野外)往往无法携带复杂的超低温保存设备(如液氮罐等)。因此从样品保存的便捷性、紧迫性和可行性角度考虑, 目前已有的水生生物 eDNA 保存极少使用 -80°C 冷冻处理(Deiner *et al*, 2015; 姜维等, 2016; Dođdu *et al*, 2016; Minamoto *et al*, 2016; Tsuji *et al*, 2016)。已有的相关研究基本将实验温度设置在 -20 — 45°C 间, 并在此温度范围内建立和优化水生生物 eDNA 的保存方法(Deiner *et al*, 2015; Renshaw *et al*, 2015; Wegleitner *et al*, 2015; Minamoto *et al*, 2016; Yamanaka *et al*, 2017; Seymour *et al*, 2018)。本研究在实验之初亦未将超低温组考虑在内, 后续应探究更低温度下(如 -80°C)水生生物 eDNA 的极限保存时间。

此外, 保存 94d 的样品 a、b 两组微生物总序列数并不存在显著差别。a 组的 Tag number 反而稍微高于 b 组, 这与 2.1、2.2、2.3 的结果相矛盾。不同界(Kingdom)的 eDNA 最优保存方法可能并不一致。Deiner 等(2015)的研究也表明, 对于原核生物, 建议使用沉淀法, 对于真核生物, 则建议使用抽滤法——两类生物的 eDNA 最优采集方法也不相同。后续应更加系统地比较这两类生物在 eDNA 保存方法上的差异。此外, b 组鱼类 Tag 数值虽然显著高于 a 组, 但二者在 OTU 数上却不存在显著差别($P=0.4567$)。eDNA metabarcoding 技术灵敏度极高, 可有效检测低密度物种的存在。这可能是 OTU number 未能有效反映两种保存方法效果不同的原因。

4 结论

本研究首次建立了舟山近海高浊度水样大生物 eDNA 最适保存方法, 建议使用“酒精+低温”法+“二次过滤”对相似水样进行 eDNA 长期保存。

参 考 文 献

- 马竹欣, 2016. 利用环境 DNA 技术调查入侵种克氏原螯虾在元阳梯田的分布. 昆明: 云南大学硕士学位论文
- 马鸿娟, Kathryn S, 马利民等, 2016. 环境 DNA 及其在水生生态系统保护中的应用. 生态学杂志, 35(2): 516—523
- 张启龙, 王 凡, 赵卫红等, 2007. 舟山渔场及其邻近海域水团的季节特征. 海洋学报, 29(5): 1—9
- 庞峻峰, 张亚平, 2001. 标本 DNA 研究进展. 动物学研究, 22(6): 490—496
- 单秀娟, 李 苗, 王伟继, 2018. 环境 DNA(eDNA)技术在水生生态系统中的应用研究进展. 渔业科学进展, 39(3): 23—29
- 赵梦迪, 2017. 利用环境 DNA 分析冬季中国东黄海水域鱼类多样性. 上海: 上海海洋大学硕士学位论文
- 赵裕栋, 周 俊, 何 璟, 2012. 土壤微生物总 DNA 提取方法的优化. 微生物学报, 52(9): 1143—1150
- 姜 维, 王启军, 邓 捷等, 2016. 以川陕哲罗鲑为目标物种的水样环境 DNA 分析流程的优化. 应用生态学报, 27(7): 2372—2378
- Bohmann K, Evans A, Gilbert M T P *et al*, 2014. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology & Evolution*, 29(6): 358—367
- Collins R A, Wangenstein O S, O’Gorman E J *et al*, 2018. Persistence of environmental DNA in marine systems. *Communications Biology*, 1(1): 185
- Cowart D A, Murphy K R, Cheng C H C, 2018. Metagenomic sequencing of environmental DNA reveals marine faunal assemblages from the West Antarctic Peninsula. *Marine Genomics*, 37: 148—160
- Deiner K, Walser J C, Machler E *et al*, 2015. Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biological Conservation*, 183: 53—63
- Doğdu S A, Turan C, 2016. Environmental DNA for detection of endangered grouper species (*Epinephelus* spp.). *Natural and Engineering Sciences*, 1(3): 42—48
- Doi H, Takahara T, Minamoto T *et al*, 2015. Droplet digital Polymerase Chain Reaction (PCR) outperforms real-time PCR in the detection of environmental DNA from an invasive fish species. *Environmental Science & Technology*, 49(9): 5601—5608
- Fahner N A, Shokralla S, Baird D J *et al*, 2016. Large-scale monitoring of plants through environmental DNA metabarcoding of soil: recovery, resolution, and annotation of four DNA markers. *PLoS One*, 11(6): e0157505
- Ficetola G F, Miaud C, Pompanon F *et al*, 2008. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 4(4): 423—425
- Jo T, Murakami H, Yamamoto S *et al*, 2019. Effect of water temperature and fish biomass on environmental DNA shedding, degradation, and size distribution. *Ecology and Evolution*, 9(3): 1135—1146
- Lodge D M, Turner C R, Jerde C L *et al*, 2012. Conservation in a cup of water: estimating biodiversity and population abundance from environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21(11): 2555—2558
- Minamoto T, Naka T, Moji K *et al*, 2016. Techniques for the practical collection of environmental DNA: filter selection, preservation, and extraction. *Limnology*, 17(1): 23—32
- Minamoto T, Fukuda M, Katsuhara K R *et al*, 2017. Environmental DNA reflects spatial and temporal jellyfish distribution. *PLoS One*, 12(2): e0173073
- Miya M, Sato Y, Fukunaga T *et al*, 2015. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science*, 2(7): 150088
- Myers N, Mittermeier R A, Mittermeier C G *et al*, 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772): 853—858
- Ogram A, Sayler G S, Barkay T, 1987. The extraction and purification of microbial DNA from sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 7(2—3): 57—66
- Renshaw M A, Olds B P, Jerde C L *et al*, 2015. The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol-chloroform-isoamyl alcohol DNA extraction. *Molecular Ecology Resources*, 15(1): 168—176
- Rodgers T W, Olson J R, Klobucar S L *et al*, 2018. Quantitative PCR assays for detection of five arctic fish species: *Lota lota*, *Cottus cognatus*, *Salvelinus alpinus*, *Salvelinus malma*, and *Thymallus arcticus* from environmental DNA. *Conservation Genetics Resources*, 10(4): 859—865
- Seymour M, Durance I, Cosby B J *et al*, 2018. Acidity promotes degradation of multi-species environmental DNA in lotic mesocosms. *Communications Biology*, 1(1): 4
- Strickler K M, Fremier A K, Goldberg C S, 2015. Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation*, 183(9): 85—92
- Takahara T, Minamoto T, Yamanaka H *et al*, 2012. Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLoS One*, 7(4): e35868
- Takahara T, Minamoto T, Doi H, 2013. Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. *PLoS One*, 8(2): e56584
- Thomsen P F, Kielgast J, Iversen L L *et al*, 2012a. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS One*, 7(8): e41732
- Thomsen P F, Kielgast J, Iversen L L *et al*, 2012b. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21(11): 2565—2573
- Thomsen P F, Willerslev E, 2015. Environmental DNA—an emerging tool in conservation for monitoring past and

- present biodiversity. *Biological Conservation*, 183: 4—18
- Tsuji S, Yamanaka H, Minamoto T, 2016. Effects of water pH and proteinase K treatment on the yield of environmental DNA from water samples. *Limnology*, 18(1): 1—7
- Wegleitner B J, Jerde C L, Tucker A *et al*, 2015. Long duration, room temperature preservation of filtered eDNA samples. *Conservation Genetics Resources*, 7(4): 789—791
- Willerslev E, Hansen A J, Binladen J *et al*, 2003. Diverse plant and animal genetic records from holocene and pleistocene sediments. *Science*, 300(5620): 791—795
- Yamamoto S, Minami K, Fukaya K *et al*, 2016. Environmental DNA as a ‘snapshot’ of fish distribution: a case study of Japanese jack mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan. *PLoS One*, 11(3): e0149786
- Yamanaka H, Minamoto T, Matsuura J *et al*, 2017. A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant. *Limnology*, 18(2): 233—241

ESTABLISHMENT AND OPTIMIZATION OF THE EDNA PRESERVATION METHOD FOR ZHOUSHAN COASTAL WATERS

CHEN Zhi¹, CHEN Jian-Wei², WANG Xiao-Yan³, GAO Tian-Xiang⁴, LIU Yan⁵

(1. College of Fisheries and Life Science, Hainan Tropical Ocean University, Sanya 572022, China; 2. BGI-Qingdao, BGI-Shenzhen, Qingdao 266555, China; 3. National Engineering Research Center of Marine Facilities Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China; 4. Fisheries College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China; 5. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract In recent years, environmental DNA (eDNA) has been widely used in the research of aquatic biodiversity. We use absolute quantification and high-throughput sequencing to establish and optimize the preservation methods of eDNA for Zhoushan coastal waters. Three eDNA preservation methods were tested and compared, including freeze at -20°C , in alcohol at room temperature, and in alcohol at -20°C . The results show that the yield of preservation in alcohol at -20°C was 0.78—1.06 (7d), 0.89—1.80 (15d), 1.05—2.75 (30d), and 2.69 (60d) times higher than that of preservation in alcohol at room temperature. However, both alcohol methods have problems of eDNA enrichment material leaking and filter membrane adhesion. The yield of freeze at -20°C in short term was 1.25—1.59 (7d) and 1.07—1.20 (15d) times higher than that in alcohol. The degradation rate of eDNA in alcohol was lower than that in freeze. The yield of samples preserved in alcohol was 1.99—2.10 times (30d) and 2.84—7.64 (60d) times higher than that of samples preserved in freeze. In addition, the yield of eDNA was significantly increased by secondary filtration. The concentration of enriched group increased the yield to 1.60—4.95 (alcohol at -20°C) and 1.21—2.04 (alcohol at room temperature) times higher than that of unenriched group. We find that samples preserved in cold alcohol were better than those preserved with freeze in many aspects, including the total tags of high-throughput sequencing, the abundance of fish species, and the diversity index. The eDNA degradation rate of a micro-organism is slower than that of macro-organism. The optimal preservation methods of animals of a different kingdom might be different. The optimal preservation for eDNA collected from Zhoushan coastal waters was established first time, which provided a reference for eDNA preservation in similar water region.

Key words coastal waters of Zhoushan; preservation method of eDNA; cold alcohol; secondary filtration