

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20180906005

http://www.yykxjz.cn/

李苗, 单秀娟, 王伟继, 丁小松, 戴芳群, 吕丁, 吴欢欢. 环境 DNA 在水体中存留时间的检测研究——以中国对虾为例. 渔业科学进展, 2020, 41(1): 51–57

Li M, Shan XJ, Wang WJ, Ding XS, Dai FG, Lü D, Wu HH. Studying the retention time of *Fenneropenaeus chinensis* eDNA in water. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(1): 51–57

# 环境 DNA 在水体中存留时间的检测研究——以中国对虾为例\*

李 苗<sup>1,3</sup> 单秀娟<sup>1,2①</sup> 王伟继<sup>1,2</sup> 丁小松<sup>1,3</sup>  
戴芳群<sup>1,2</sup> 吕 丁<sup>1</sup> 吴欢欢<sup>1</sup>

(1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室 山东省渔业资源与生态环境重点实验室 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室 青岛 266071; 3. 上海海洋大学海洋科学学院 上海 201306)

**摘要** 精确地掌握物种的分布与种群动态是保护生物学的基础。然而,对于某些具有特殊生活史的物种以及群体数量非常少的种群而言,物种分布检测极其困难。DNA 条形码技术与环境 DNA(Environmental DNA, eDNA)的结合使以上困难得以解决。鉴于 eDNA 易降解、在环境中含量低的特性,探究其在环境中的持续存留时间对于后续准确进行定性与定量分析至关重要。本研究以中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)为研究对象,结合实时荧光定量 PCR 定量分析了水环境中 eDNA 随时间的降解情况,基于赤池信息准则(Akaike Information Criterion, AIC),选择了最适于 eDNA 随时间降解的统计模型。结果显示,当 eDNA 的释放源头被去除后, eDNA 在水体中的含量与时间呈负相关关系,其在环境中的存留时间为 30 d 左右。本研究旨在为合理规划物种的定性检测与定量评估提供理论依据,以期将人为因素造成的实验误差降到最低。

**关键词** 环境 DNA; 存留时间; 中国对虾

**中图分类号** S931 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2020)01-0051-07

全球渔业衰退是 21 世纪面临的重大挑战之一 (Dudgeon, 2010; 金显仕等, 2015; Evans *et al*, 2018)。然而,对研究人员与政策制定者而言,收集水生生物种群分布与种群动态变化的精确数据是其面临的巨大挑战(Thomsen *et al*, 2015),特别是对于某些密度极小与具有特殊生活史的种群,检测其时空分布与调查

其种群动态变化将变得更加困难(Mackenzie *et al*, 2005; Dejean *et al*, 2011)。为了克服以上困难, DNA 条形码技术被成功地应用到水生生态系统中,检测来自生物体细胞外的 DNA(即 eDNA)(Bohmann *et al*, 2014; 单秀娟等, 2018),进而通过 eDNA 去掌握物种的分布与种群动态变化。该方法不需要采集生物样

\* 国家重点研发计划(2017YFE0104400)、国家重点基础研究发展计划(2015CB453303)、山东省泰山学者专项基金项目 and 青岛海洋科学与技术试点国家实验室鳌山人才培养计划项目(2017ASTCP-ES07)共同资助 [This work was supported by the National Key R&D Program of China (2017YFE0104400), the National Basic Research Program of China (2015CB453303), Special Funds for Taishan Scholar Project of Shandong Province, and Aoshan Talents Cultivation Program Supported by Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology(Qingdao) (2017ASTCP-ES07)]. 李 苗, E-mail: limiao0417@126.com

① 通讯作者: 单秀娟, 研究员, E-mail: shanxj@ysfri.ac.cn

收稿日期: 2018-09-06, 收修改稿日期: 2018-12-05

本,对生态系统无伤害且经济高效。目前,该方法已成功应用到生物检测(Goldberg *et al*, 2015; Davison *et al*, 2017)、生物多样性评价(Drummond *et al*, 2015; Majaneva *et al*, 2018)、生物量评估(Pilliiodavid *et al*, 2013; Tillotson *et al*, 2018)、鱼类洄游(Yamanaka *et al*, 2016)以及其他方面(Sigsgaard *et al*, 2016、2017)的研究中。

由于 eDNA 极易降解,且在环境中含量极低,因而,其在环境中的存留时间将会直接影响后期的定性与定量分析。为了能够将 eDNA 技术准确地应用到水生生态系统的研究领域中,探究 eDNA 在水体中的存留时间显得尤为重要。eDNA 在环境中的存留时间是指切断 eDNA 的来源之后,eDNA 在环境中的持续存在时间(Dejean *et al*, 2011)。虽然,已有相关研究表明,eDNA 在水体中呈指数式降解(Dejean *et al*, 2011; Strickler *et al*, 2015),但不同的物种具有不同的生活史,其释放 eDNA 的速率各不相同(Minamoto *et al*, 2017),从而导致不同物种释放的 eDNA 在水体中的存留时间不同。本研究以中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)为研究对象,结合实时荧光定量 PCR,检测 eDNA 在水体中的存留时间,同时,探究 eDNA 降解速率与时间之间的关系。本研究旨在为水生生态系统 eDNA 的取样、操作流程优化、整体实验方案设计及应用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 特异性引物设计

针对中国对虾的线粒体细胞色素酶氧化亚基 I (CO I)基因设计特异性引物。在 GenBank 数据库中检索中国对虾线粒体 DNA (mtDNA) CO I 基因序列(GenBank 登录号: gbHQ700930.1),利用 BioEdit 和 MEGA7 软件进行序列比对,使用 Primer Premier 6 与 Beacon Designer 8 软件设计引物与探针,并在 NCBI 网站上进行引物特异性测试。

筛选确定 1 对特异性扩增中国对虾 CO I 基因的目的片段为 597 bp 的普通 PCR 引物(CO I PF: TTGT AGTTACAGCCCACGCT, CO I PR: AAATTATCCCGAAGGCGGGT)与 1 对目的片段为 106 bp 的荧光定量 PCR 引物(CO I DF: AGGGGTAGGAACAGGATG-AAC, CO I DR: GACACCAGCTAGATGCAGCG, Probe: 5'FAM-TCAGCTAGAATTGCTCATGCCGGA-GCTTCAGT-3'BHQ1),其中,普通 PCR 引物用来制备质粒标准品 DNA,定量 PCR 引物所扩增的目的片段为普通 PCR 引物所扩增目的片段的一部分。引物

由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

### 1.2 中国对虾肌肉组织 DNA 提取及 PCR 扩增

实验所用中国对虾肌肉组织取自 2016 年渤海渔业资源调查捕获的中国对虾,−20℃ 保存。

中国对虾肌肉组织 DNA 的提取采取传统的酚-氯仿-异戊醇方法,提取完成后,使用紫外分光光度计检测 DNA 浓度并稀释到 50 ng/μl,用 1.5 ml 无菌离心管分装,−20℃ 保存。25 μl PCR 反应体系:10×Taq Buffer 2.5 μl, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 0.5 μl, 正反向引物(CO I PF/CO I PR)(10 mmol/L)各 0.5 μl, Taq DNA Polymerase(5 U/μl) 0.5 μl, 模板 DNA (50 ng/μl) 1 μl, MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 1.5 μl, ddH<sub>2</sub>O 18 μl。PCR 扩增反应条件:94℃ 预变性 3 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 1 min, 扩增 35 个循环; 72℃ 复延伸 10 min。PCR 产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

### 1.3 中国对虾 mtDNA CO I 基因克隆及质粒标准品制备

将 1.2 中 PCR 产物用 Gel Extraction Kit (OMEGA)试剂盒进行纯化。将纯化的 PCR 产物连接到 pMD-18-T 质粒载体(TaKaRa)上,转化入 DH5α 感受态细胞(TaKaRa)中,最后在含 Amp、X-gal 及 IPTG 的 LB 固体平板培养基上过夜培养,经过蓝白斑筛选后,挑取 8 个白色单菌落,分别置于 1.5 ml 离心管中培养 8 h,将菌液送至生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

根据测序结果,选取连接转化成功的菌液扩大培养。培养 24 h 后,使用 Plasmid Mini Kit I (OMEGA)进行质粒标准品 DNA 提取。DNA 提取完成后,使用紫外分光光度计检测并计算其拷贝数,最后将其稀释到 10<sup>8</sup> copies/μl, −80℃ 保存备用。

以上所有实验步骤均按照说明书进行操作。

### 1.4 样品采集

为了检测 eDNA 在水体中的存留时间,必须保证水体中有一定量的 eDNA,且在开始检测时切断其 eDNA 的释放源头,以免生物体不断地向水体中释放 DNA 而影响实验结果。因此,通常是在固定的水体中饲养研究对象一段时间,待水体中 eDNA 有一定量的积累后将生物体从水体中移除。

本实验所用水样取自中国水产科学研究院黄海水产研究所水产遗传育种中心中国对虾养殖池(养殖池内只有中国对虾这单一物种,且养殖池内有足够量的 eDNA),养殖池长 5.5 m、宽 3.6 m、高 1.2 m,池内水体体积为 14 m<sup>3</sup>,池内有中国对虾 180 只,虾体平均体重为 27 g。从池内取 25 L 水样用提前消毒的

无菌白色塑料桶带回实验室, 室温保存, 桶内用充气泵保持充气直至取样完毕(有关养殖池信息及中国对虾体长、体重数据均由遗传育种中心工作人员测量)。

取样工作参照 Dejean 等(2008)的方法并加以改进, 每隔 24 h 从水桶内取 15 ml 水样, 装进 50 ml 无菌离心管内, 同时, 在离心管内加 3 mol/L 的醋酸钠溶液 1.5 ml 与无水乙醇 33 ml, 每次取 3 个平行样本,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存直至进行 eDNA 提取。水样采集时间为 2018 年 1 月 12 日~2 月 7 日, 取样时间为每天 08:00。

### 1.5 eDNA 提取

选用 DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen, Hilden, 德国)试剂盒进行 eDNA 的提取, 提取方法参照 Ficetola 等(2008)、Dejean 等(2008)与 Renshaw 等(2015), 并进行相应改进, 其具体提取步骤为:

将水样从冰箱拿出,  $4^{\circ}\text{C}$  9000 g 离心 1 h。将上一步离心管底部的沉淀物全部刮出, 放入 2 ml 的无菌离心管中, 加入 570  $\mu\text{l}$  的 Buffer ATL 与 60  $\mu\text{l}$  的蛋白酶 K, 涡旋震荡混匀, 恒温水浴 3 h 直至沉淀物完全裂解, 水浴期间, 每隔 15 min 轻轻颠倒混匀离心管以加速裂解, 裂解完成后涡旋震荡 15 s。其余步骤按照试剂盒说明书进行, 其中, 最后一步中 DNA 的洗脱用 60  $\mu\text{l}$  Buffer TE, 而非试剂盒中 Buffer AE。

eDNA 提取完成后, 立即使用紫外分光光度计检测其浓度, 若 eDNA 样品浓度高于 250 ng/ $\mu\text{l}$ , 则将其进行稀释。每个 eDNA 样品吸取 10  $\mu\text{l}$  用作琼脂糖凝胶电泳检测及 PCR 定量分析, 其余 50  $\mu\text{l}$  eDNA 溶液于  $-80^{\circ}\text{C}$  保存。

### 1.6 eDNA 的定量分析

所有提取的 eDNA 样品采用 BBI 生命科学有限公司 2 $\times$ TaqMan Fast qPCR Master Mix(Low Rox)实时荧光定量 PCR 试剂盒进行定量分析。PCR 采用 20  $\mu\text{l}$  体系: 10  $\mu\text{l}$  2 $\times$ TaqMan Fast qPCR Master Mix, 正反向引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 0.4  $\mu\text{l}$ , 0.4  $\mu\text{l}$  探针(10  $\mu\text{mol/L}$ ), 2  $\mu\text{l}$  模板 DNA, 6.8  $\mu\text{l}$  PCR 级水。扩增反应程序采用两步法:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;  $94^{\circ}\text{C}$  变性 5 s,  $60^{\circ}\text{C}$  退火延伸 34 s, 40 个循环。

PCR 扩增使用 ABI 7500 型定量 PCR 仪和 96 孔板(Thermo Fisher), 标准品 DNA 与未知浓度 eDNA 样品均进行 3 个重复, 每个 96 孔板进行 3 个阴性对照(无模板)与 3 个阳性对照(中国对虾基因组 DNA), 标准品以 10 倍浓度梯度从  $10^7$  copies/ $\mu\text{l}$  稀释至  $10^1$  copies/ $\mu\text{l}$ 。实验数据采用绝对定量法分析, eDNA 拷贝数取阳性扩增样品的平均值, 应用系统软件 SDS1.4.0.25 自动

计算 Ct 值及生成标准曲线与扩增曲线。

### 1.7 数据分析

基于 AIC 选择了最适于 eDNA 随时间降解的模型(Burnham, 2002; Wickham, 2009), 所有数据使用 R3.5.0 进行处理, 误差控制在 95%的置信区间以内。

## 2 结果与分析

### 2.1 引物特异性验证

PCR 产物经 2%的琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示, 引物对 CO I PF/PR 与 CO I DF/DR 成功扩增出 597 bp 与 106 bp 的目的片段, 与预期结果完全一致, 电泳条带单一且明亮, 无杂带(图 1), 证明所设计的引物特异性很好。

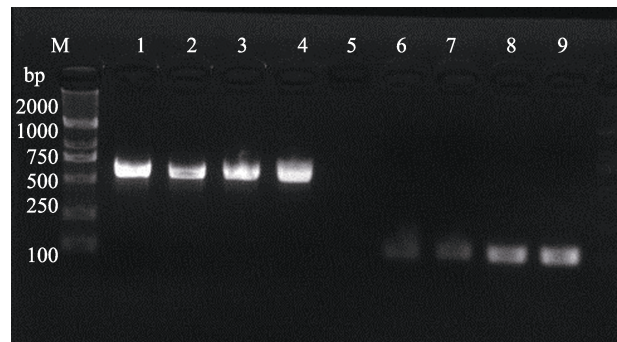


图 1 引物 CO I PF/PR 与 CO I DF/DR 的扩增结果

Fig.1 Amplification of primer CO I PF/PR and CO I DF/DR

M: DNA Marker DL 2000; 泳道 1~4 为引物 CO I PF/PR 的 PCR 产物; 泳道 6~9 为引物 CO I DF/DR 的 PCR 产物  
M: DNA Marker DL 2000; Lane 1~4: PCR products of CO I PF/PR; Lane 6~9: PCR products of CO I DF/DR

### 2.2 标准曲线建立及回归方程设定

通过实时荧光定量 PCR 扩增, PCR 检测系统根据荧光值的变化规律, 自动生成中国对虾 CO I 基因的标准曲线(图 2)。曲线的斜率为  $K=-3.15$ , 相关系数  $R^2=0.994$ , 回归方程为  $y=-3.24x+37.47$ , 说明在稀释的质粒标准品 DNA 浓度范围内具有良好的线性关系, 表明本研究建立的标准曲线能够准确地反映中国对虾 CO I 基因的扩增。

### 2.3 eDNA 检测

使用紫外分光光度计检测未知浓度 eDNA 样品发现, 大部分样品的  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  值均低于 1.8, 只有极少数样品的  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  值在 1.8~2.0 之间, 且 eDNA 样品浓度普遍较低, 说明水体中 eDNA 含量较少且水体中杂质较多, 因而导致提取的 DNA 纯度较低。

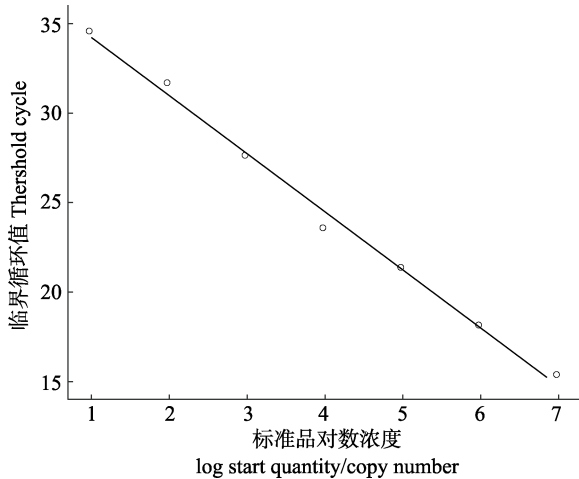


图2 中国对虾 CO I 基因 AQ-PCR 标准曲线  
Fig.2 Standard curve of AQ-PCR of *Fenneropenaeus chinensis* CO I gene

## 2.4 eDNA 降解结果

检测结果显示,在 eDNA 的释放源头去除后,随着时间的推移,水体中 eDNA 的拷贝数与时间呈负相关关系。第 1 天(2018 年 1 月 12 日)检测时每 15 ml 水样中含有的 DNA 拷贝数为  $3.76 \times 10^4$ ,而在第 27 天(2018 年 2 月 7 日)检测时,每 15 ml 水体中的 eDNA 拷贝数则降解为 711。此外,基于 AIC 比较了 GAM (Gaussian)、GAM(Inverse.Gaussian)、GLM、一元一次回归及一元二次回归 5 种模型对 eDNA 降解与时间之间的关系适用性的适用性,发现用 GAM(Gaussian)模型拟合 eDNA 降解与时间之间的关系曲线 AIC 值最小(AIC=472.0694)(表 1),同时,其相关系数  $R^2$  也最高( $R^2=0.984$ )(图 3),说明 GAM(Gaussian)模型能更好反映 eDNA 的降解与时间之间的关系。

表 1 基于 AIC 值对模型的选择  
Tab.1 The choice of model based on AIC value

项目 Items	GAM (gaussian)	GAM (inverse.gaussian)	GLM	一元一次 Linear	一元二次 Quadratic
AIC	472.0694	497.6066	518.5996	518.5996	491.4329
$R^2$	0.984	0.977	0.8969	0.8969	0.9635
Deviance explained	98.9%	96.6%	—	—	—

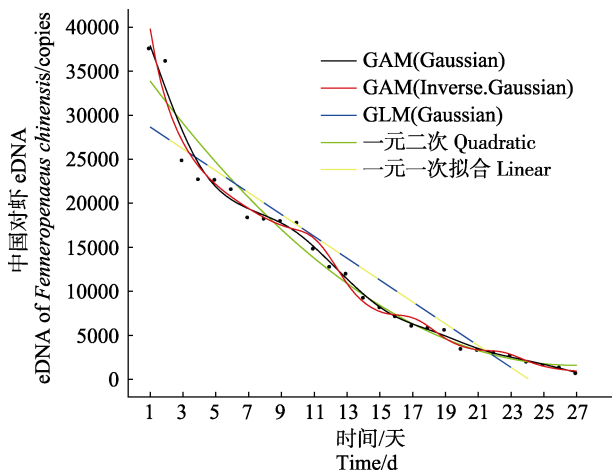


图3 中国对虾 eDNA 降解与时间之间的关系拟合  
Fig.3 Relationship fitting between degradation of eDNA and time in *Fenneropenaeus chinensis*

## 3 讨论

eDNA 的检出率主要取决于释放速率与降解速率,同时,目标种群数量的大小对 eDNA 的检出率也有一定的影响。此外,除了不可控的自然因素外,一些人为因素也对 eDNA 检出率的高低有不可忽视的影响。eDNA 从生物体释放进入水环境后,可能会持续存在,吸附在有机或者无机颗粒上成为沉积物,

或者在水环境中逐渐被降解(Levy-Booth *et al*, 2007),影响其降解的因素主要有核酸酶、温度、pH、紫外光照、水化学及微生物的活动等一系列生物与非生物因素(Barnes *et al*, 2014; Strickler *et al*, 2015; Tsuji *et al*, 2016)。

### 3.1 长片段 eDNA 与短片段 eDNA 在研究中的区别

eDNA 由释放源进入水环境后,随着时间的变化,一般经过由大片段逐渐分解为小片段直至降解的过程,在这个过程中,根据其环境条件的不同,eDNA 在不同环境因子的影响下被加速降解。片段大小为 300~400 bp 的 eDNA 在人为实验控制的条件下能够在水体中持续存在 7 d (Zhu, 2006; Dejean *et al*, 2011),7 d 后仍能检测到的 eDNA 则为  $\leq 100$  bp 左右的短片段 DNA。本研究采用实时荧光定量 PCR (TaqMan 法)扩增了一段目的片段大小为 106 bp 的短片段 eDNA,检测了短片段 eDNA 在水体中滞留时间的长短,结果发现,较长片段 eDNA 而言,短片段 eDNA 在水体存留的时间要长很多,其完全降解至少需要 30 d,但是,长片段 eDNA 能够更加准确地反映最新的生物信息(Hänfling *et al*, 2016; Bista *et al*, 2017)。同时,这也反映出研究者应该针对自己的最终目的设计实验,扩增符合需求的 eDNA 片段,以达到最佳的研究效果。Jo 等(2017)设计了 1 对能够扩增

719 bp 的长片段 eDNA 的引物与 1 对能够扩增 127 bp 的短片段 eDNA 的引物, 分别应用实时荧光定量 PCR 对竹筴鱼(*Trachurus japonicus*)进行了生物量估测及分布监测, 表明扩增长片段的 eDNA 能够更加精确地评估生物量以及对物种分布做出准确判断。根据长短片段 eDNA 在水体中滞留时间的不同, 建议在利用 eDNA 技术进行生物量评估与物种时空动态分布监测时, 设计能够扩增长片段 eDNA 的引物以扩增来自于生物体最新释放进入水体的 DNA, 而不是长期滞留于水体中的 DNA, 以避免 2 个资源调查周期之间短片段 eDNA 的累积效果所导致的实验误差。

### 3.2 不同物种释放的 eDNA 在水体中存留时间的区别

一般而言, 水生动物释放的 eDNA 在水体的存留时间为 7~30 d, 但不同的生物种类的生活史特征不同, 释放 eDNA 的速率不同(Minamoto *et al.*, 2017), 释放 eDNA 量的多少与 eDNA 片段的大小也各不相同(Geerts *et al.*, 2018)。因此, 对不同的物种而言, 其释放的 DNA 在环境中的存留时间也不同。Thomsen 等(2012)研究发现, 在饲养锄足蟾(*Pelobates fuscus*)和冠北螈(*Triturus cristatus*)时, 养殖水体中 eDNA 的量随时间不断增加, 但将其移除后, 水体中 eDNA 的量快速下降, 7~14 d 后, eDNA 完全降解; 而 Goldberg 等(2013)以淡水螺(*Potamopyrgus antipodarum*)为研究对象, 在 15℃ 恒温条件下饲养淡水螺一段时间后将其移除, 发现其释放到水体中的 DNA 能够在环境中存留 14~42 d。本研究与前人的研究相比, 中国对虾所释放的 eDNA 在水体中的存留时间较长, 主要是因为甲壳类的整个生活史过程中存在蜕皮现象, 因而其释放到水中的 eDNA 的量较大。此外, 本研究所取水样的养殖池中的中国对虾密度较大, 是 eDNA 在水体中存留时间较长的原因之一。

### 3.3 环境因子对 eDNA 存留时间的影响

除了物种本身生活史差异性造成的存留时间不同外, 环境因子的变动也会导致 eDNA 在水体中存留时间的差异。已有研究表明, 温度与 eDNA 的降解速率呈正相关关系(Strickler *et al.*, 2015; Lacoursière-Roussel *et al.*, 2016)。Strickler 等(2015)研究了美国牛蛙(*Lithobates catesbeianus*)释放到水体中的 eDNA 分别在 5℃、25℃ 和 30℃ 的条件下的降解情况, 发现当环境中 eDNA 的量相同时, 5℃ 时 eDNA 的降解最缓慢, 主要因为低温条件下微生物的生长过程较为缓慢, 降低了有关生命活动导致的 eDNA 的降解。本研究所用水体是在冬天室温(15℃)的情况下保存的, 与

夏季相比, eDNA 的降解速率较为缓慢。因此, 对于自然水体而言, 随着季节的交替变化, 水温发生变化, 其水环境中的 eDNA 的降解速率也发生变化。此外, 研究表明, pH、紫外辐射以及水化学对 eDNA 的降解也存在一定的影响(Pilliod *et al.*, 2013; Barnes *et al.*, 2014; Eichmiller *et al.*, 2014、2016a、b)。但是, 以上环境因子共同作用时如何影响 eDNA 的降解尚不清楚。未来在应用 eDNA 技术准确评估目标种生物量之前, 解决上述环境因子对 eDNA 降解的影响机制至关重要。

## 4 小结

通过检测 eDNA 在水体中的存留时间发现, 短片段 eDNA 在水环境中能够存留长达 30 d 左右, 可以据此来合理设计实验方案、确定合适的采样周期以及寻求妥善的 eDNA 存储方法, 从而为 eDNA 技术更有力地应用到水生生态系统的研究领域奠定基础。

**致谢:** 衷心感谢中国水产科学研究院黄海水产研究所水产动物遗传育种中心陈宝龙老师与课题组项目聘用人员王惠宾在取样方面给予的建议与帮助!

## 参 考 文 献

- Barnes MA, Turner CR, Jerde CL, *et al.* Environmental conditions influence eDNA persistence in aquatic systems. *Environmental Science and Technology*, 2014, 48(3): 1819
- Bista I, Carvalho GR, Walsh K, *et al.* Annual time-series analysis of aqueous eDNA reveals ecologically relevant dynamics of lake ecosystem biodiversity. *Nature Communications*, 2017, 8: 14087
- Bohmann K, Evans A, Gilbert MT, *et al.* Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring. *Trends in Ecology and Evolution*, 2014, 29(6): 358–367
- Burnham KP. *Information and likelihood theory: A basis for model selection and inference//Model selection and multimodel inference.* Springer New York, 2002, 49–97
- Davison PI, Copp GH, Créach V, *et al.* Application of environmental DNA analysis to inform invasive fish eradication operations. *Science of Nature*, 2017, 104(3-4): 35
- Dejean T, Valentini A, Duparc A, *et al.* Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23398
- Drummond AJ, Newcomb RD, Buckley TR, *et al.* Evaluating a multigene environmental DNA approach for biodiversity assessment. *GigaScience*, 2015, 4(1): 46
- Dudgeon D. Prospects for sustaining freshwater biodiversity in the 21st century: Linking ecosystem structure and function. *Current Opinion in Environmental Sustainability*, 2010, 2(5-6): 422–430
- Eichmiller JJ, Bajer PG, Sorensen PW. The relationship between



- the distribution of common carp and their environmental DNA in a small lake. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112611
- Eichmiller JJ, Best SE, Sorensen PW. Effects of temperature and trophic state on degradation of environmental DNA in lake water. *Environmental Science and Technology*, 2016a, 50(4): 1859–1867
- Eichmiller JJ, Miller LM, Sorensen PW. Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish. *Molecular Ecology Resources*, 2016b, 16(1): 56–68
- Evans NT, Lamberti GA. Freshwater fisheries assessment using environmental DNA: A primer on the method, its potential, and shortcomings as a conservation tool. *Fisheries Research*, 2018, 197: 60–66
- Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, *et al.* Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 2008, 4(4): 423–425
- Geerts AN, Boets P, Heede SVD, *et al.* A search for standardized protocols to detect alien invasive crayfish based on environmental DNA (eDNA): A lab and field evaluation. *Ecological Indicators*, 2018, 84: 564–572
- Goldberg CS, Sepulveda A, Ray A, *et al.* Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*). *Freshwater Science*, 2013, 32(3): 9
- Goldberg CS, Strickler KM, Pilliod DS. Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. *Biological Conservation*, 2015, 183: 1–3
- Hänfling B, Lawson HL, Read DS, *et al.* Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods. *Molecular Ecology*, 2016, 25(13): 3101–3119
- Jin XS, Dou SZ, Shan XJ, *et al.* Hot spots of frontiers in the research of sustainable yield of Chinese inshore fishery. *Progress in Fishery Sciences*, 2015, 36(1): 124–131 [金显仕, 窦硕增, 单秀娟, 等. 我国近海渔业资源可持续产出基础研究的热点问题. *渔业科学进展*, 2015, 36(1): 124–131]
- Jo T, Murakami H, Masuda R, *et al.* Rapid degradation of longer DNA fragments enables the improved estimation of distribution and biomass using environmental DNA. *Molecular Ecology Resources*, 2017, 17(6): 1–9
- Lacoursière-Roussel A, Rosabal M, Bernatchez L. Estimating fish abundance and biomass from eDNA concentrations: Variability among capture methods and environmental conditions. *Molecular Ecology Resources*, 2016, 16(6): 1401–1414
- Levy-Booth DJ, Campbell RG, Gulden RH, *et al.* Cycling of extracellular DNA in the soil environment. *Soil Biology and Biochemistry*, 2007, 39(12): 2977–2991
- Mackenzie DI, Nichols JD, Sutton N, *et al.* Improving inferences in population studies of rare species that are detected imperfectly. *Ecology*, 2005, 86(5): 1101–1113
- Majaneva M, Diserud OH, Eagle SHC, *et al.* Environmental DNA filtration techniques affect recovered biodiversity. *Scientific Reports*, 2018, 8(1): 4682
- Minamoto T, Fukuda M, Katsuhara KR, *et al.* Environmental DNA reflects spatial and temporal jellyfish distribution. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0173073
- Pilliod DS, Goldbergcaren S, Arklerobert S, *et al.* Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2013, 70(8): 1123–1130
- Pilliod DS, Goldberg CS, Arkle RS, *et al.* Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources*, 2013, 14(1): 109–116
- Renshaw MA, Olds BP, Jerde CL, *et al.* The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol-chloroform-isoamyl alcohol DNA extraction. *Molecular Ecology Resources*, 2015, 15(1): 168–176
- Shan XJ, Li M, Wang WJ. Application of environmental DNA technology in aquatic ecosystem. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 23–29 [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. *渔业科学进展*, 2018, 39(3): 23–29]
- Sigsgaard EE, Nielsen IB, Bach SS, *et al.* Population characteristics of a large whale shark aggregation inferred from seawater environmental DNA. *Nature Ecology and Evolution*, 2016, 1(1): 4
- Sigsgaard EE, Nielsen IB, Carl H, *et al.* Seawater environmental DNA reflects seasonality of a coastal fish community. *Marine Biology*, 2017, 164(6): 128
- Strickler KM, Fremier AK, Goldberg CS. Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation*, 2015, 183: 85–92
- Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, *et al.* Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 2012, 21(11): 2565–2573
- Thomsen PF, Willerslev E. Environmental DNA – An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 2015, 183: 4–18
- Tillotson MD, Kelly RP, Duda JJ, *et al.* Concentrations of environmental DNA (eDNA) reflect spawning salmon abundance at fine spatial and temporal scales. *Biological Conservation*, 2018, 220: 1–11
- Tsuji S, Yamanaka H, Minamoto T. Effects of water pH and proteinase K treatment on the yield of environmental DNA from water samples. *Limnology*, 2016, 18(1): 1–7
- Wickham H. *ggplot2*. Springer New York, 2009
- Yamanaka H, Minamoto T. The use of environmental DNA of fishes as an efficient method of determining habitat connectivity. *Ecological Indicators*, 2016, 62(1): 147–153
- Zhu B. Degradation of plasmid and plant DNA in water microcosms monitored by natural transformation and real-time polymerase chain reaction (PCR). *Water Research*, 2006, 40(17): 3231–3238

## Studying the Retention Time of *Fenneropenaeus chinensis* eDNA in Water

LI Miao<sup>1,3</sup>, SHAN Xiujuan<sup>1,2</sup>①, WANG Weiji<sup>1,2</sup>, DING Xiaosong<sup>1,3</sup>,  
DAI Fangqun<sup>1,2</sup>, LÜ Ding<sup>1</sup>, WU Huanhuan<sup>1</sup>

(1. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Shandong Provincial Key Laboratory of Fishery Resources and Ecological Environment, Qingdao 266071; 2. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071;  
3. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

**Abstract** Accurate knowledge of species distribution and population dynamics is the basis of conservation biology. However, for certain species that have a special life history and very few populations, species distribution detection becomes extremely difficult. The combination of DNA barcode technology and environmental DNA (eDNA) has solved these difficulties. Currently, this method has been applied successfully to biological testing, biodiversity assessment, biomass assessment, fish migration, and other research. Given the ease of degradation of eDNA and its low level in the environment, exploring its persistence in the environment is critical for accurate qualitative and quantitative analysis. In this study, *Fenneropenaeus chinensis* was used as the research subject. The degradation of eDNA in a water environment was quantitatively analyzed by real-time fluorescent quantitative PCR. The relationship between eDNA degradation rate and time was explored. The most suitable eDNA was selected based on Akaike Information Criterion (AIC). A statistical model of degradation of eDNA over time was used. The experimental results showed that the level of eDNA in water is negatively correlated with time. After the source of eDNA was removed, its residence time in the environment was about one month. The aim of this research was to provide a theoretical basis for the qualitative detection and quantitative assessment of rationally planned species, with a view to minimizing experimental error caused by human factors.

**Key words** Environmental DNA; Retention time; *Fenneropenaeus chinensis*

① Corresponding author: SHAN Xiujuan, E-mail: shanxj@ysfri.ac.cn