

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20200525002

http://www.yykxjz.cn/

钱塘毅, 王伟继, 李苗, 单秀娟, 金显仕. 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. 渔业科学进展, 2021, 42(2): 01–09

Qian TY, Wang WJ, Li M, Shan XJ, Jin XS. A preliminary study on the vertical distribution of *Fenneropenaeus chinensis* environmental DNA in the Yellow Sea and its influencing factors. Progress in Fishery Sciences, 2021, 42(2): 01–09

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*

钱塘毅^{1,2} 王伟继^{2,3} 李苗² 单秀娟^{2,3①} 金显仕^{2,3}

(1. 大连海洋大学水产与生命学院 大连 116036; 2. 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;
3. 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)

摘要 准确掌握物种分布和种群动态是渔业资源评估的基础。然而,对某些种群规模小或生活史复杂的物种进行监测的难度很大。近年来,环境 DNA 技术快速兴起,已被广泛应用于各类物种监测、生物多样性评估和生物量评价等领域。为了解冬季中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)越冬洄游过程中的分布情况,2019 年 12 月在黄海中南部采集表、中、底 3 个水层水样,检测其中中国对虾的 eDNA,并对表层沉积物进行室内实验。结果显示,中国对虾 eDNA 在自然水体中呈现特殊的垂直分布规律:底层浓度高,表层浓度低,这一规律与中国对虾生活习性相关;表层沉积物会在外力作用下再悬浮,并向周围释放 eDNA,对水体造成较大程度影响,本研究将采集到的表层沉积物分为 3 个实验组,3 个实验组最大释放量分别为 1624.06、3453.34 和 1143.24 copies/L,沉积物对水体的影响持续 1 周左右。

关键词 环境 DNA; 中国对虾; 分布规律; 表层沉积物; 生物量评估

中图分类号 S932.5+1 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2021)02-0001-09

准确地掌握目标物种的分布信息是生物多样性研究的必要前提之一,且对生物地理学、保护生物学和生态学等学科领域的研究也具有重要意义(Lodge *et al*, 2012, Ficetola *et al*, 2008)。与陆地环境不同,受到水深、温度、光照、压力等诸多因素限制,对水生生物进行直接观察和识别难度很大(Bogich *et al*,

2008),特别是某些低密度或具有独特生活史的种群(Dejean *et al*, 2011)。目前,传统调查方法,例如拖网、影像和声学调查等,通常成本高昂且会对珍稀物种造成巨大威胁(Murphy *et al*, 2010)。随着分子生物学研究的不断发展,环境 DNA (environmental DNA, eDNA)技术的出现使得“非侵入”式资源调查和物种跟踪成

* 国家自然科学基金项目(31872692)、国家重点研发计划(2017YFE0104400)、山东省支持青岛海洋科学与技术试点国家实验室重大科技专项(2018SDKJ0501-1)、山东省泰山学者专项基金项目和 中国水产科学研究院基本科研业务费(2019GH16)共同资助 [This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31872692), National Key Research and Development Program (2017YFE0104400), Pilot National Laboratory of Marine Science and Technology (Qingdao), Shandong Province (2018SDKJ0501-1), Taishan Scholars Project of Shandong Province, and Central Public-Interest Scientific Institution Basal Research Fund, CAFS (2019GH16)]. 钱塘毅, E-mail: 389168510@qq.com

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

收稿日期: 2020-05-25, 收修改稿日期: 2020-06-09

为可能(Taberlet *et al.*, 2012)。该技术是通过采集并检测生物体向水环境中释放的 DNA 片段来判断生物是否存在于该水域, 并进行生物量评估的一种新兴技术(Ficetola *et al.*, 2008; Takahara *et al.*, 2012)。eDNA 的来源广泛, 可以是生物的表面、黏液、粪便、尿液和生殖细胞等(Turner *et al.*, 2015; Klymus *et al.*, 2015; Wilcox *et al.*, 2015), 并且只需通过少量水样的采集分析即可满足调查目的(Thomsen *et al.*, 2012a、b), 从而降低采样成本, 减少采样工作对环境和生物体的干扰和破坏。eDNA 技术很大程度上弥补了传统调查方法的不足, 在物种保护和生物量评估等方面发挥重要作用。

已有学者对 eDNA 在河流中的扩散或降解进行研究(Deiner *et al.*, 2014; Jane *et al.*, 2015; Sansom *et al.*, 2017), 发现水体中的 eDNA 在自然条件下易降解, 且会在环境中扩散, 以短片段的形式移动到远离释放源的位置。此外, 仅依靠分析 eDNA 本身无法就其源头及释放时间进一步溯源。然而, 对于在面积、水流及深度相比河流都更为复杂的海洋环境中, eDNA 的分布规律及变化研究仍旧十分有限(Yamamoto *et al.*, 2016; O'Donnell *et al.*, 2017)。了解 eDNA 在水体中扩散和滞留的规律对于采样设计和空间推断(即样本所代表的可能出现的目标生物的位置)具有重要意义(Shogren *et al.*, 2017)。对水体中 eDNA 变化规律的阐释是利用其进行目标物种追踪及生物量评估的前提。一般而言, 利用 eDNA 技术对目标物种进行追踪是为获取其准确的分布位置和种群信息。而 eDNA 在水体中的分布受多种因素影响, 包括物种分布、水流、沉降和沉积物再悬浮等(Deiner *et al.*, 2014; Robison *et al.*, 1981; Saba *et al.*, 2012; Wotton *et al.*, 2001; Maggi, 2013)。这些除物种分布以外的其他因素的影响所导致 eDNA 的杂乱分布是研究者不想看到的。如何避免这些因素影响, 从而通过 eDNA 获取有效的目标物种信息是研究者一直以来想要解决的问题。而目前已有研究对 eDNA 的水平分布讨论较多(Thalinger *et al.*, 2019), 很少涉及垂直分布的特点, 或只涉及了单一介质(Turner *et al.*, 2015)。本研究选用中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)作为目标物种, 选择平均水深较大的黄海作为研究水域, 以 eDNA 垂直分布作为主要考察要素。鉴于沉积物也会对水体中 eDNA 浓度造成一定程度的影响(Turner *et al.*, 2015; 魏楠等, 2020)。将水体与沉积物的相互效应也考虑在内, 希望能更加科学合理地解释 eDNA 的分布特点。本研究分为两部分内容: (1) 在黄海中南部海域 8 个站位的不同水深(表、中、底)采水, 研究水体中中国对虾

eDNA 的分布规律; (2) 采集表层沉积物并进行室内实验, 分析沉积物对水体的影响方式。通过本研究希望能够了解中国对虾 eDNA 在水中的分布规律和影响因素, 更合理地设计采样工作以及更有效地将 eDNA 技术推广到其他物种的研究中。

1 材料与方法

1.1 采样站位

样品来源于中国水产科学研究院黄海水产研究所蓝海 101 号科研调查船于 2019 年 12 月 21 日在黄海的调查。根据邓景耀等(1990)对中国对虾的研究方法, 在中国对虾越冬洄游路线上, 选取 8 个站位, 利用分层采水方法在各站位分别采集表、中、底 3 个水层水样。其中, 表层水在距海面 3 m 深的位置取水, 中层水在 20 m 左右水深采水, 底层水在该站位水深于海底以上 5 m 左右位置取水(具体采样深度根据海况及作业难度有所变动), 具体采样位置见图 1, 采样水深信息见表 1。

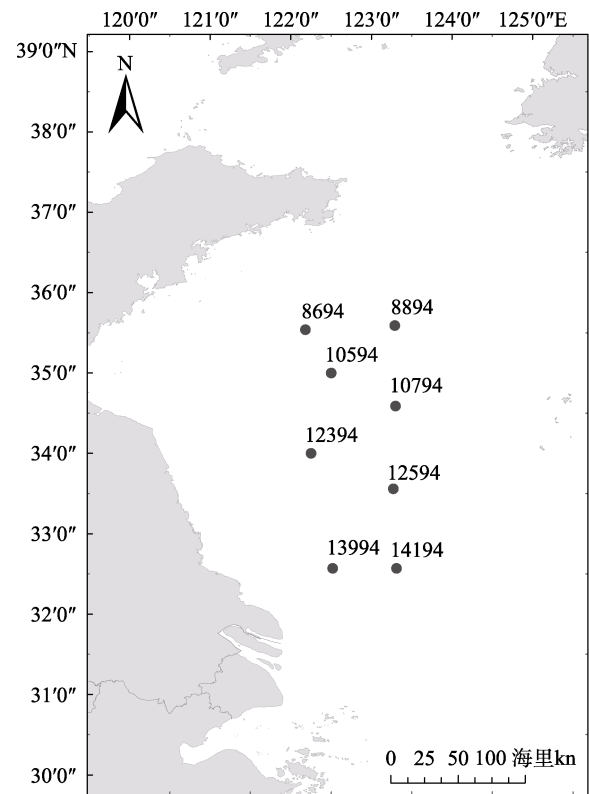


图 1 2019 年 12 月黄海采样站位

Fig.1 Sampling stations in the Yellow Sea in Dec. 2019

1.2 目的基因及特异性引物

选择中国对虾的线粒体细胞色素 C 氧化亚基 I

基因(mtDNA CO I)进行研究。引物参照李苗等(2019),其中,COI PF与COI PR作为普通PCR引物用来制备质粒标准品DNA。COI DF与COI DR作为定量PCR引物,扩增的目的片段为普通PCR引物所扩增片段的一部分。引物与探针由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 各站位采样水深
Tab.1 Station location and sampling depth

站位号 Station	经度 Longitude (°)	纬度 Latitude (°)	水深 Depth (m)	表层 水深 Surface (m)	中层 水深 Mid (m)	底层 水深 Bottom (m)
8694	112.18	35.54	56	3	20	48
8894	123.29	35.59	76	3	23	69
10594	122.50	35.00	68	3	20	60
10794	123.30	34.59	79	3	20	70
12394	122.25	34.00	51	3	21	33
12594	123.27	33.56	71	3	21	63
13994	122.52	32.57	35	3	20	28
14194	123.31	32.57	39	3	14	33

表 2 本研究用到的引物与探针
Tab.2 Primers and probes used in this study

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'~3')	退火温度 Annealing temperature (°C)	片段大小 Size (bp)
COI PF	TTGTAGTTACAGCCACGCT	56.4	597
COI PR	AAATTATCCCGAAGGCGGGT	56.7	
COI DF	AGGGGTAGGAACAGGATGAAC	57.7	106
COI DR	GACACCAGCTAGATGCAGCG	59.1	
Probe	5'FAM-TCAGCTAGAATTGCTCATGCCGAGCTTCAGT-3'BHQ1	66.2	106

离心管中的混合液转移到 DNeasy 离心柱中, 25°C 8000 g 离心 1 min;

(3)向离心柱内加入 500 μ l Buffer AW1, 25°C 8000 g 离心 1 min, 再向离心柱内加入 500 μ l Buffer AW2, 25°C 8000 g 离心 3 min;

(4)将离心柱放入 1.5 ml 的无菌离心管中, 在离心柱中央加入 100 μ l Buffer TE, 25°C 孵育 1 min。25°C 8000 g 离心 1 min;

eDNA 提取完成后, 立即使用超微量紫外分光光度计检测其浓度及质量, 若 eDNA 样品的浓度高于 250 ng/ μ l (实时荧光定量 PCR 试剂盒要求待测样品的 DNA 浓度低于 250 ng/ μ l), 则将其进行稀释。在每个 eDNA 样品内吸取 10 μ l DNA 溶液, 用作琼脂糖凝胶电泳检测及 PCR 定量分析, 其余 90 μ l eDNA 溶液

1.3 中国对虾 eDNA 富集

使用滤膜法对海水中 eDNA 进行富集。选取直径为 47 mm、孔径为 0.45 μ m 的玻璃纤维滤膜对 1 L 所采水样过滤(李苗等, 2019), 每个水样取 3 个平行样本及 3 个阴性对照, 共计 75 个样本。为避免样品相互污染, 过滤完后每张滤膜用锡纸单独包裹再放入封口袋中并做好标记, -20°C 保存直到进行 DNA 提取。

1.4 eDNA 提取

使用试剂盒进行 eDNA 提取, 具体提取方法参照 Renshaw 等(2015)并加以改进, 其具体提取步骤为:

(1)将滤膜从冰箱取出后, 用剪刀去除滤膜边缘多余部分, 再剪成条状, 置于 2 ml 无菌离心管中; 向离心管内加入 570 μ l 的 Buffer ATL 和 60 μ l 的蛋白酶 K 溶液(20 mg/ml), 涡旋震荡, 将混合液混合均匀, 在恒温水浴锅内 65°C 水浴 3 h, 水浴期间, 每隔 15 min 轻轻颠倒混匀离心管, 使其充分裂解, 裂解完成后取出并挤干剩余滤膜;

(2)向离心管内加入 630 μ l 的 Buffer AL 和 630 μ l 的无水乙醇, 涡旋震荡 15 s, 使其混合均匀; 将 2 ml

-80°C 保存备用。

1.5 中国对虾 eDNA 定量分析

所有提取的 eDNA 样品采用 BBI 生命科学有限公司的 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。定量 PCR (Quantitative PCR, qPCR) 扩增的反应体系按照试剂盒说明书要求采用 20 μ l 体系(表 3)。qPCR 扩增反应程序: 94°C 3 min; 94°C 5 s, 60°C 35 s, 40 个循环。qPCR 扩增仪器为 ABI 7500 型定量 PCR 仪, 质粒标准品 DNA 与未知浓度 eDNA 样品在每个 96 孔板均设计 3 个 qPCR 重复, 每个 96 孔板设置 3 个阴性对照(无模板)与 3 个阳性对照(中国对虾基因组 DNA), 质粒标准品 DNA 依次从 10⁷ copies/ μ l 以 10 倍的浓度

梯度稀释到 10 copies/ μl 。实验获得的所有数据采用绝对定量法分析,每个 eDNA 样品最终的拷贝数以阳性扩增样品的平均值为准,应用系统软件 SDS 1.4.0.25 自动计算 C_t 值,并生成标准曲线与扩增曲线。

表 3 实时荧光定量 PCR 反应体系及用量
Tab.3 Real-time fluorescence quantitative PCR reaction system and dosage

反应体系 Reaction system	用量 Dosage (μl)
2 \times PCR 反应预混液 2 \times PCR Master Mix	10.0
COI DF (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.4
COI DR (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.4
探针 Probe (10 $\mu\text{mol/L}$)	0.4
模板 DNA Template DNA	2.0
双蒸水 ddH ₂ O	6.8

1.6 表层沉积物释放实验设置

选择黄海中南部的 3 个站位(8694、10594 和 13994)采集表层沉积物(采样站位根据该海域底质类型进行选择)。表层沉积物的采集工作在同一航次中完成,采样时,将采泥器垂直下放到海底抓取沉积物,待采泥器闭合后提出海面移至夹板,排出采泥器中残留海水以避免沉积物悬浮进入水体。采样前后,采泥设备用双蒸水冲洗 2 遍以避免样品交叉污染。样品放入无菌封口袋,于 -20°C 冷库中保存,运输过程用冰块保持温度在 -10°C 左右,避免样品反复冻融。2020 年 1 月 3 日样品送达实验室后立即进行实验。3 个站位的表层沉积物分为 3 个实验组。每个实验组为 1 个 15 L 的塑料整理箱(长 \times 宽 \times 高: 35 cm \times 24 cm \times 20 cm),内装 1000 g 沉积物样品和 10 L 人工海水。实验过程中,所用人工海水经实验室 qPCR 检测,无中国对虾 eDNA 存在。实验启动时,分别混匀 3 个实验组,待沉积物重新沉淀后,采集 1 L 上层水样(3 个平行样品)进行中国对虾 eDNA 富集,滤膜用锡纸单独包装, -20°C 保存待用。取样后向整理箱中重新加入 3 L 人工海水以保证下次取样浓度一致。每日 15:00 取样,连续进行 1 周。所有实验组均在室内进行,室温保持在 10°C ,水温保持在 6°C 并通过空气泵持续曝气。所有实验设备均在实验前用高锰酸钾消毒,并用双蒸水冲洗。实验结束后,对所有样品统一进行 eDNA 的提取和 qPCR 检测。室内实验中国对虾 eDNA 的富集、提取及 qPCR 分析方法同上(1.3、1.4 和 1.5)。

表 4 实验条件设置
Tab.4 Setting of experimental condition

实验组 Experimental group	表层沉积物 Surface sediment (g)	人工海水 Artificial seawater (L)	平行样本数量 Parallel samples
8694	1000.00	10.00	3
10594	1000.00	10.00	3
13994	1000.00	10.00	3
空白 Blank	0	10.00	3

1.7 数据分析

所有数据经标准化处理后使用 Excel 2016、R 3.6.3 及其集成开发环境 R Studio 软件处理。

2 结果与分析

2.1 引物特异性验证

2%的琼脂糖凝胶电泳检测表明,引物 COI DF/DR 成功扩增了中国对虾 mtDNA CO I 长度为 106 bp 的目的片段,电泳条带单一明亮、无杂带(图 2),与预期结果一致,说明所选引物特异性良好。

2.2 中国对虾 CO I 基因 qPCR 扩增的标准曲线

从图 3 可以看出,本实验稀释的质粒标准品 DNA 浓度在 $10\sim 10^7$ copies/ μl 范围内具有良好的线性关系,说明本研究建立的标准曲线能够准确地反应中国对虾 mtDNA CO I 基因的扩增。

2.3 中国对虾 eDNA 分布规律

检测结果显示,在黄海 8 个站位的表、中、底层水样中,底层 eDNA 拷贝数与表层和中层具有显著差异($P=0.003$, $P=0.0009$)。除个别站位外,底层水体 eDNA 拷贝数均大于表、中层水体(表 5)。8894、12394 和 14194 站位表层 eDNA 浓度大于中层,其中,14194 站位表层 eDNA 浓度最高,呈现了中国对虾 eDNA 分布规律为表层少、底层多(图 4)。

2.4 表层沉积物释放实验

室内沉积物释放实验结果显示,表层沉积物在外力作用下会向水体中释放大量中国对虾 eDNA,其中,8694 与 10594 站位在实验第 1 天释放量最高,分别为 1624.06 和 3453.34 copies/L,而 13994 站位在第 2 天释放量达到最高,为 1143.24 copies/L。3 个实验组沉积物释放的 eDNA 拷贝数与时间呈负相关关系。均在第 7 天(2020 年 1 月 9 日)趋于稳定且保持在较低水平(表 6 和图 5)。

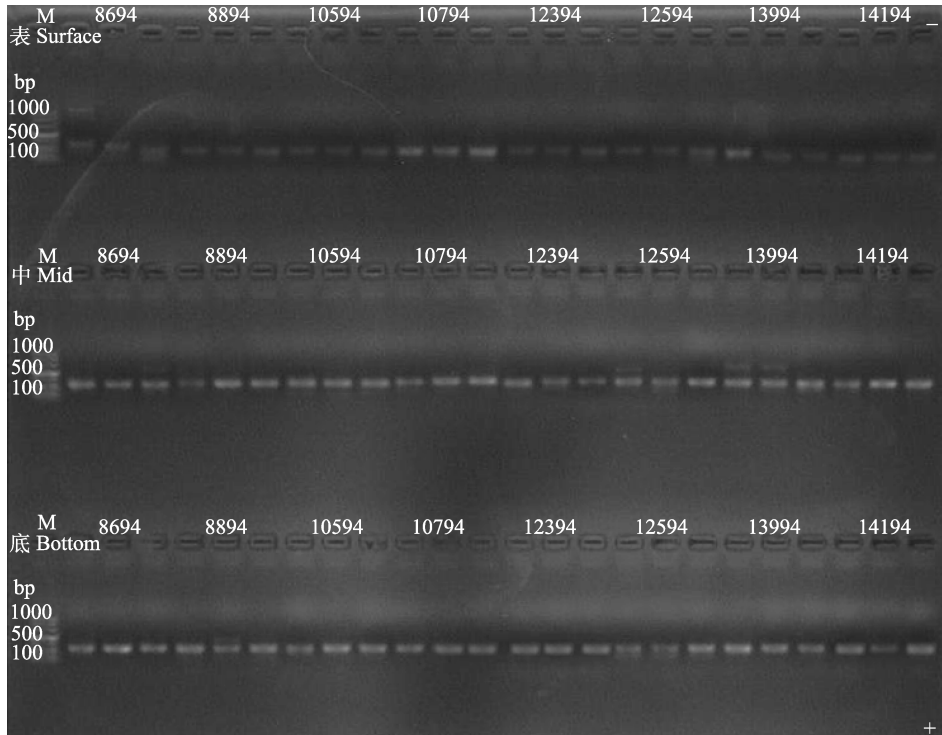


图 2 qPCR 产物的琼脂糖凝胶电泳检测结果

Fig.2 Detection of qPCR production by agarose gel electrophoresis

M: DNA Marker DL 2000; -: 负极; +: 正极; 连续 3 列泳道为同一采样站位

M: DNA Marker DL 2000; -: Negative electrode; +: Positive electrode;

Three rows of lanes are for the same sampling station

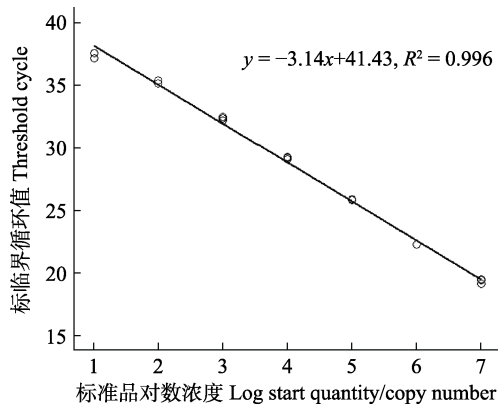


图 3 中国对虾 mtDNA CO I 基因 qPCR 标准曲线

Fig.3 The standard curve of qPCR of *F. chinensis* mtDNA CO I gene

表 5 黄海 8 个站位不同水深中国对虾 eDNA 浓度

Tab.5 Concentrations of *F. chinensis* eDNA in different water depths at eight stations in Yellow Sea (copies/L)

站位号 Station No.	表层 Surface	中层 Mid	底层 Bottom
8694	1898.74	2882.14	3465.42
8894	1818.40	1401.69	2212.25
10594	1616.72	2163.28	2551.10
10794	3582.64	7267.49	9338.28
12394	1789.86	1160.17	3054.33
12594	2689.88	3476.83	3425.31
13994	1415.96	1817.87	2596.97
14194	1735.86	1130.94	1118.00

3 讨论

3.1 生物习性对其 eDNA 分布的影响

本研究发现, 中国对虾在垂直方向上具有显著的分
布规律。结合目标物种在不同发育阶段的生活习性和
实际环境条件, 对 eDNA 浓度进行分析推测, 能够
分析得到更为准确的物种分布位置和生物量情况。以

往研究表明, 中国对虾在越冬场主要以底栖的甲壳
类、瓣鳃类、多毛类、蛇尾类(*Ophiuroidea*)及小型鱼
类为食, 还会摄食寄居蟹皮海绵(*Suberites domumeuila*)
(邓景耀等, 1990)。根据中国对虾这一摄食习性, 可
以推测中国对虾在黄海越冬洄游过程中应该集中分
布于底层水体。而检测结果与这一推测相符: 越冬期
中国对虾 eDNA 底层浓度相对较大。同时, 粪便和外
壳作为越冬期中国对虾的主要 eDNA 来源, 由于涌浪

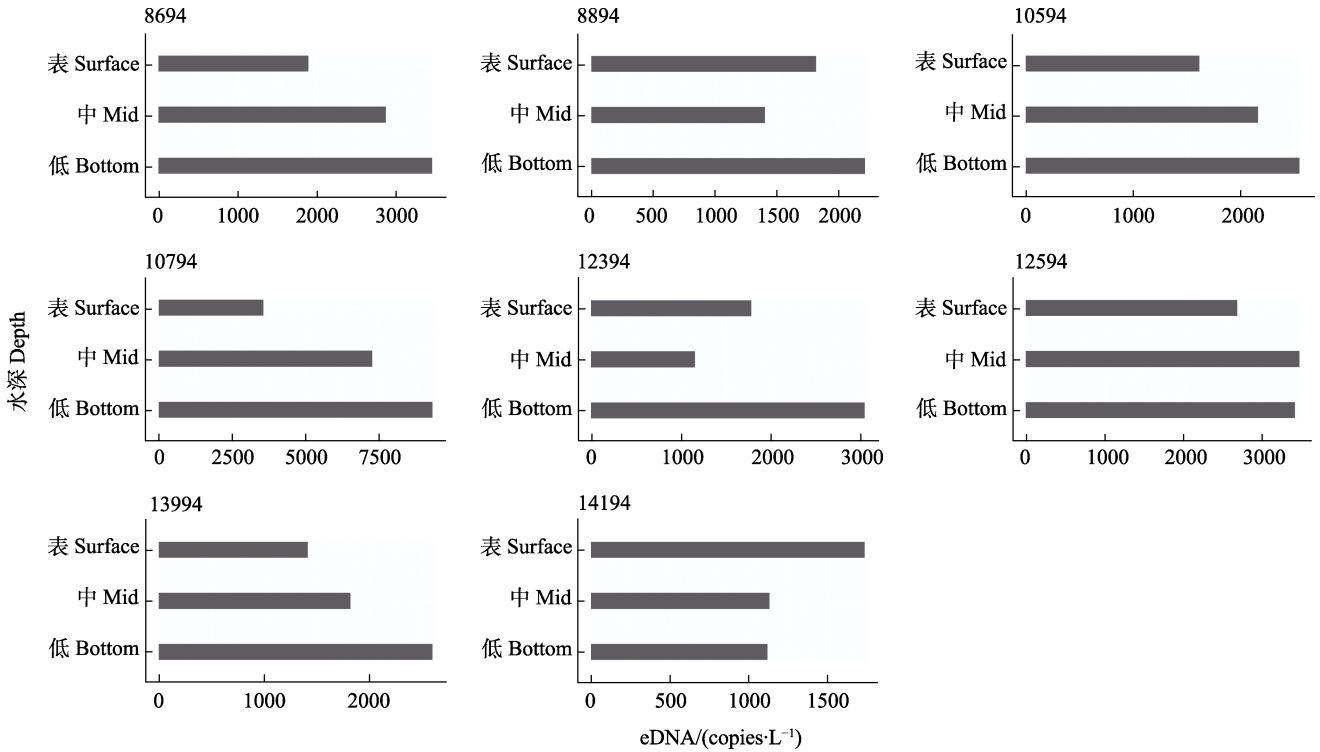


图 4 黄海 8 个站位不同水深中国对虾 eDNA 浓度

Fig.4 Concentrations of *F. chinensis* eDNA in different water depths at eight stations in Yellow Sea

表 6 表层沉积物释放中国对虾 eDNA 浓度

Tab.6 Variations of environmental DNA concentration of *F. chinensis* released from the surface substrate (copies/L)

站位号 Station	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d	6 d	7 d
8694	1624.06	1000.07	281.30	342.61	329.11	153.95	247.09
10594	3453.34	2812.50	1283.75	1039.92	544.87	640.89	270.17
13994	494.87	1143.24	1020.98	687.93	616.26	264.56	188.96

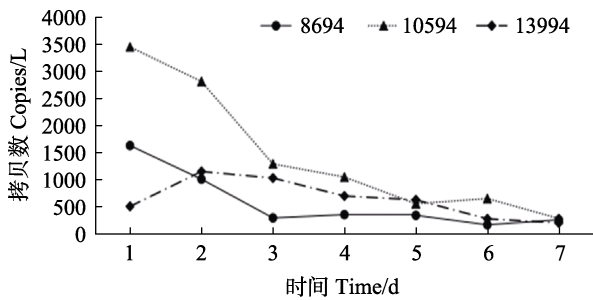


图 5 室内实验中国对虾 eDNA 的浓度变化

Fig.5 Variation of eDNA concentration of *F. chinensis* in laboratory experiments

和沉降作用, 这些物质会变成细小碎屑沉至底层水体 (Turner *et al*, 2015), 也会导致底层水体中国对虾 eDNA 浓度升高。此外, 不同物种或同一物种在不同发育阶段, 其 eDNA 的释放速率也存在一定差异 (Minamoto *et al*, 2017; Maruyama *et al*, 2014)。将种群构成因素纳入到考量范围, 也是提高 eDNA 技术准确

性的有效途径。

3.2 水体浑浊度对 eDNA 分布的影响

结果显示, 中国对虾的 eDNA 在自然水体中总体呈现底层浓度高、表层浓度低的特点, 但 8894、12394 和 14194 的检测结果与其他站位存在差异。在采样过程中发现, 这 3 站的水体较为浑浊, 泥沙量大, 可能是导致 eDNA 浓度反常变化的原因之一, 怀疑该海域存在垂直流, 导致底部泥沙悬浮, 从而对 eDNA 浓度存在一定程度影响。具体影响方式需要开展更多实验来验证。

3.3 沉积物对 eDNA 分布的影响

本研究发现, eDNA 会在水体与沉积物之间双向移动, 粪便和外壳作为中国对虾越冬期的主要 eDNA 来源, 不仅会在沉降作用下进入沉积物, 并且沉积物会在外力(如垂直流、底栖生物扰动和人为干扰等)作

用下, 导致沉积物再悬浮(Turner *et al.*, 2015), 向周围释放 eDNA, 使得底层水体 eDNA 浓度升高, 从而使测量值高于真实值。研究表明, eDNA 会在水体与沉积物之间转移, 因此, 将沉积物与水体结合进行分析更有意义(Leff *et al.*, 1992)。相比水体, 沉积物中含有更多的 eDNA(Corinaldesi *et al.*, 2005; Dell'Anno *et al.*, 2004)。其原因是: (1) 生物的粪便、外壳和脱落的组织会在沉降作用下进入沉积物中, 使沉积物中 eDNA 浓度升高(Turner *et al.*, 2015); (2) eDNA 可被沉积物中的表面活性颗粒吸附, 受保护而不被降解, 并且这些颗粒还会吸附核酸酶, 导致酶活性降低, 从而延长 eDNA 降解时间(Pietramellara *et al.*, 2009), 使沉积物中 eDNA 不断积累, 浓度上升。以上两点说明了沉积物在 eDNA 研究中的重要性。但大多数研究只是单独对沉积物中的 eDNA 进行研究, 鲜有研究者将沉积物与周围环境结合看待(魏楠等, 2020), 因而沉积物对周围环境的影响极易被忽视。本研究揭示了沉积物通过再悬浮释放 eDNA 的方式对周围水体造成巨大影响, 如何屏蔽这一影响, 减少测量误差, 是接下来研究的重点。

3.4 再悬浮 eDNA 残留时间的区别

室内实验发现, 表层沉积物中的中国对虾 eDNA 溶解进入水体 7 d 后近乎完全降解。而这与李苗等(2018)对中国对虾 eDNA 水中残留时间的研究结果存在差异, 其研究发现, 新鲜的 eDNA 可以在水体中残留 27 d。同时还发现, eDNA 降解时间受 eDNA 浓度影响。eDNA 浓度较高, 其降解时间较长(李苗等, 2020)。考虑到本研究的样本是在野外采集到的, 其浓度远比养殖场中的样品浓度小。因此, 本研究中沉积物释放的 eDNA 残留时间相对较短。另外, 新鲜的 eDNA 被生物体释放进入水体时发生降解, 致使片段长度缩短, 并在沉降作用下保留在沉积物中, 沉积物又在外力作用下再悬浮, 导致所释放短片段 eDNA 环境改变, 加速了降解过程, 因此, 沉积物释放的 eDNA 仅能残留较短时间。已有研究表明, 不同片段长度的 eDNA 在残留时间上具有显著差异(Dejean *et al.*, 2011)。在以后的研究中, 可以根据 eDNA 片段长度的不同, 对 eDNA 进行区分, 选择合适的引物长度进行 qPCR 检测, 以此降低沉积物释放的干扰。

在了解目标生物的生活习性的前提下, 研究人员进行有针对性的采样设计, 可以使检测结果更加可信。但需要对再悬浮的 eDNA 进行有效区分, 以避免测量结果的误差, 从而将 eDNA 技术更好地推广到其他水生物种的生态系统研究中。

参 考 文 献

- Bogich TL, Liebhold AM, Shea K. To sample or eradicate? A cost minimization model for monitoring and managing an invasive species. *Journal of Applied Ecology*, 2008, 45: 1134–1142
- Corinaldesi C, Danovaro R, Dell'Anno A. Simultaneous recovery of extracellular and intracellular DNA suitable for molecular studies from marine sediments. *Journal of Applied Environmental Microbiology*, 2005, 71: 46–50
- Deiner K, Altermatt F. Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river. *PLoS One*, 2014, 9: e88786
- Dejean T, Valentini A, Duparc A, *et al.* Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems. *PLoS One*, 2011, 6(8): e23398
- Dell'Anno A, Corinaldesi C. Degradation and turnover of extracellular DNA in marine sediments: Ecological and methodological considerations. *Journal of Applied Environmental Microbiology*, 2004, 70(7): 4384–4386
- Deng JY, Ye CC, Liu YC. Shrimp and its resource management in Bo Sea and Yellow Sea. Beijing: China Ocean Press, 1990 [邓景耀, 叶昌臣, 刘永昌. 渤海的对虾及其资源管理. 北京: 海洋出版社, 1990]
- Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, *et al.* Species detection using environmental DNA from water samples. *Journal of Biology Letters*, 2008, 4(4): 423–425
- Jane SF, Wilcox TM, McKelvey KS, *et al.* Distance, flow and PCR inhibition: eDNA dynamics in two headwater streams. *Journal of Molecular Ecology Resources*, 2015, 15(1): 216–227
- Klymus KE, Richter CA, Chapman DC, *et al.* Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*. *Journal of Biological Conservation*, 2015, 183: 77–84
- Leff L, McArthur J, Shimkets L. Information spiraling: Movement of bacteria and their genes in streams. *Journal of Microbial Ecology*, 1992, 24: 11–24
- Li M, Shan XJ, Wang WJ, *et al.* Establishment and optimization of environmental DNA detection techniques for assessment of *Fenneropenaeus chinensis* biomass. *Progress in Fishery Sciences*, 2019, 40(1): 12–19 [李苗, 单秀娟, 王伟继, 等. 中国对虾生物量评估的环境 DNA 检测技术的建立及优化. *渔业科学进展*, 2019, 40(1): 12–19]
- Li M, Shan XJ, Wang WJ, *et al.* Studying the retention time of *Fenneropenaeus chinensis* eDNA in water. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 51–57 [李苗, 单秀娟, 王伟继, 等. 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]
- Lodge DM, Turner CR, Jerde CL, *et al.* Conservation in a cup of water: Estimating biodiversity and population abundance

- from environmental DNA. *Journal of Molecular Ecology*, 2012, 21(11): 2555–2558
- Maggi F. The settling velocity of mineral, biomineral, and biological particles and aggregates in water. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 2013, 118(4): 2118–2132
- Maruyama A, Nakamura K, Yamanaka H, *et al.* The release rate of environmental DNA from juvenile and adult fish. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114639
- Minamoto T, Fukuda M, Katsuhara KR, *et al.* Environmental DNA reflects spatial and temporal jellyfish distribution. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0173073
- Murphy HM, Jenkins GP. Observational methods used in marine spatial monitoring of fishes and associated habitats: A review. *Journal of Marine and Freshwater Research*, 2010, 61: 236–252
- O'Donnell JL, Kelly RP, Shelton AO, *et al.* Spatial distribution of environmental DNA in a nearshore marine habitat. *Journal of Peer*, 2017, 5: e3044
- Pietramellara G, Ascher J, Borgogni F, *et al.* Extracellular DNA in soil and sediment: Fate and ecological relevance. *Journal of Biology and Fertility Soils*, 2009, 45(3): 219–235
- 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. *Journal of Molecular Ecology Resources*, 2015, 15(1): 168–176
- Robison BH, Bailey TG. Sinking rates and dissolution of midwater fish fecal matter. *Journal of Marine Biology*, 1981, 65(2): 135–142
- Saba GK, Steinberg DK. Abundance, composition, and sinking rates of fish fecal pellets in the Santa Barbara Channel. *Journal of Scientific Reports*, 2012, 2: 716
- Sansom BJ, Sassoubre LM. Environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates to model freshwater mussel eDNA transport in a river. *Journal of Environmental Science and Technology*, 2017, 51: 14244–14253
- Shogren AJ, Jennifer I, Andruszkiewicz TE, *et al.* Controls on eDNA movement in streams: Transport, retention, and resuspension. *Journal of Scientific Reports*, 2017, 7(1): 5065
- Taberlet P, Prud'Homme, SM, Campione E, *et al.* Soil sampling and isolation of extracellular DNA from large amount of starting material suitable for metabarcoding studies. *Journal of Molecular Ecology*, 2012, 21(8): 1816–1820
- Takahara T, Minamoto T, Yamanaka H, *et al.* Estimation of fish biomass using environmental DNA. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35868
- Thalinger B, Wolf E, Traugott M, *et al.* Monitoring spawning migrations of potamodromous fish species via eDNA. *Journal of Scientific Reports*, 2019, 9(1): 1033–1047
- Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, *et al.* Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS One*, 2012a, 7: e41732
- Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, *et al.* Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Journal of Molecular Ecology*, 2012b, 21(11): 2565–2573
- Turner CR, Uy KL, Everhart RC. Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. *Journal of Biology Conservation*, 2015, 183: 93–102
- Wei N, Wang XH, Zhang CP. Application of environmental DNA on monitoring surface sediment and the relationship to environment variables. *Journal of Environmental Engineering*, 2020, 14(8): 2262–2269 [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. *环境工程学报*, 2020, 14(8): 2262–2269]
- Wilcox TM, McKelvey KS, Young MK, *et al.* Environmental DNA particle size distribution from brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Journal of Conservation Genetics Resources*, 2015, 7(3): 639–641
- Wotton RS, Malmqvist B. Feces in aquatic ecosystems. *Journal of Bioscience*, 2001, 51: 537–544
- Yamamoto S, Masuda R, Sato Y, *et al.* Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Journal of Scientific Reports*, 2017, 7: 40368
- Yamamoto S, Minami K, Fukaya K, *et al.* Environmental DNA as a 'snapshot' of fish distribution: A case study of Japanese jack mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0149786

(编辑 冯小花)

A Preliminary Study on the Vertical Distribution of *Fenneropenaeus chinensis* Environmental DNA in the Yellow Sea and Its Influencing Factors

QIAN Tangyi^{1,2}, WANG Weiji^{2,3}, LI Miao², SHAN Xiujuan^{2,3}^①, JIN Xianshi^{2,3}

(1. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116036; 2. 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 Eco-Environment, Qingdao 266071;

3. Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071)

Abstract Accurate knowledge of species distributions and population dynamics is the basis for fishery resource assessments. However, it is difficult to monitor certain species with small populations or complex life histories. Recently, as a new monitoring technology, environmental DNA (eDNA) has been widely used in species monitoring, biodiversity assessments, and biomass assessments. In this study, eDNA technology was employed to understand the distribution of Chinese shrimp during its winter migration. In December 2019, we collected water samples from three water layers in the south-central Yellow Sea to test the eDNA of Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. In addition, laboratory experiments were carried out on the surficial sediments of the seabed. First, it was found that the eDNA of Chinese shrimp exhibited a specific vertical distribution in the natural water, which was characterized by a high concentration in the bottom layer and low concentration in the surface layer. This distribution is related to the life habits of Chinese shrimp. Second, the surficial sediments would re-suspend and release eDNA to the surrounding areas under the action of external forces, causing a large impact on the water. In this study, the surficial sediments were divided into three experimental groups. The maximum amounts of eDNA released by the three experimental groups were 1624.06, 3453.34, and 1143.24 copies/L, the effects of which lasted for approximately a week. It is hoped that this study will assist with the eDNA sampling design in the future.

Key words Environmental DNA; Chinese shrimp; Distribution; Surficial sediment; Biomass assessment

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