DOI: 10.5846/stxb201501150125
陈炼,吴琳,刘燕,徐海根.环境 DNA metabarcoding 及其在生态学研究中的应用.生态学报,2016,36(15): - .
Chen L, Wu L, Liu Y, Xu H G.Application of environmental DNA metabarcoding in ecology.Acta Ecologica Sinica,2016,36(15): - .

环境 DNA metabarcoding 及其在生态学研究中的应用

陈 炼[1,2],吴 琳[2],刘 燕[1],徐海根[1,*]

1 环境保护部南京环境科学研究所, 南京 210042

2 江苏第二师范学院生命科学与化学化工学院, 南京 210013

摘要:环境 DNA metabarcoding(eDNA metabarcoding)是指利用环境样本(如土壤、水、粪便等)中分离的 DNA 进行高通量的多个物种(或高级分类单元)鉴定的方法。近年来,该方法引起了科学家的广泛关注,逐渐应用于生物多样性研究、水生生物监测、珍稀濒危物种和外来入侵物种检测等生态学领域。本文介绍环境 DNA metabarcoding 的含义和研究方法;重点介绍环境 DNA metabarcoding 在物种监测、生物多样性研究和食性分析等生态学领域中的应用;总结环境 DNA metabarcoding 应用于生态学研究领域面临的挑战并对该方法的发展进行展望。

关键词:环境 DNA;metabarcoding;生物多样性;物种监测

Application of environmental DNA metabarcoding in ecology

CHEN Lian[1,2], WU Lin[2], LIU Yan[1], XU Haigen[1,*]

1 *Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Environmental Protection, Nanjing* 210042, *China*

2 *College of Life Sciences, Chemistry and Chemical Engineering, Jiangsu Second Normal University, Nanjing* 210013, *China*

Abstract: Environmental DNA metabarcoding is defined as high throughput DNA sequencing used for simultaneous molecular identification of multiple taxa in a complex environmental sample (i.e., soil, water, feces, etc.). In recent years, this method has aroused widespread concern among scientists and has been increasingly used in the field of ecology, such as biodiversity research, monitoring of aquatic, rare, or invasive species. This article describes the significance and the methods of environmental DNA metabarcoding, and highlights its application in the fields of species monitoring, detection of rare and invasive species, biodiversity, and diet analysis. Finally, this article summarizes the challenges in application of environmental DNA metabarcoding in ecological research and discusses the future prospects of its development.

Key Words: environmental DNA; metabarcoding; biodiversity; species detection

在生态学研究中,要实现对物种有效的管理与保护首先要对物种分布有清晰而明确的认识,这需要建立准确、快速的物种监测机制。近年来,环境 DNA metebarcoding 被广泛地应用于生态学的研究中。环境 DNA metabarcoding 是在 DNA 条形码技术的基础上研究出来的新兴方法。该方法从环境样品中直接提取 DNA,当结合第二代测序技术时可以实现对环境样品中所有存在物种的有效检测,在生物多样性研究、物种监测、动物食性分析和外来入侵物种检测等方面都有较好的应用前景。

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2013);江苏省环境科技创新团队项目资助

收稿日期:2015-01-15; **网络出版日期**:2015-00-00

* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: xhg@ nies.org

1 环境 DNA metabarcoding

1.1 环境 DNA

环境 DNA(environmental DNA, eDNA)的概念早在 20 世纪八十年代末就已经被提出,最初仅应用于微生物研究领域,它是指从环境样品(如土壤、沉积物、空气、水体等)中提取的 DNA,不对任何目标生物进行分离[1]。受该技术在微生物研究方面的启发,科学家们研究发现可以利用环境样品中包含的 DNA 进行物种鉴定及植食性动物的食性分析等方面的研究。

环境样品中通常含有动植物脱落的细胞或者是游离的 DNA,生物排泄过程中脱落的皮肤,尿液和粪便等也可以是“环境 DNA”的来源,并能提供一个环境系统中物种的存在记录[2-3]。

使用传统采样方法开展生态学研究,一些物种的样本采集通常比较困难,并且耗时费力。环境 DNA 允许从土壤、水体或是空气中包含的动物毛发、脱落的细胞、粪便等进行非损伤性取样,从而成功进行遗传检测。相比传统的直接采样,该方法成本更低,样本采集受气候条件影响较小[4],可以进行更大数量的样本收集。环境 DNA 还可以用来分析那些很难通过传统方法监测的物种,比如那些需要经过相关部门许可才可以获得的濒危或珍稀物种[5]。目前,有关环境 DNA 在生态学中的应用研究已有较多报道[6-12]。

1.2 环境 DNA metabarcoding

DNA 条形码作为物种快速鉴定和发现新物种的方法已得到广泛应用。对于不同类别生物的 DNA 条形码已确定了不同的扩增片段,例如:线粒体细胞色素 C 氧化酶 I 基因(COI) 已经作为标准条形码广泛用于鉴定动物物种 [13]; 核糖体 16S rRNA 常用于细菌的鉴定[14]; 而 ITS 基因则作为真菌的标准条形码用于物种鉴定[15]。中国植物条形码工作组建议 ITS 基因(或 ITS2)应作为种子植物的核心条形码之一[16]。目前通常采用 *rbc*L+*mat*K+ITS 基因组合作为植物的标准 DNA 条形码用于物种鉴定[17]。

DNA 条形码技术虽然发展前景广阔,但由于 DNA 易发生降解,所以对于保存年代久远的博物馆馆藏标本,要获得标准的 DNA 条形码序列比较困难。对于 DNA 降解的标本,相对而言,200bp 左右的序列易于扩增。由此,DNA 微型条形码(DNA minibarcode)的概念被提出,它是指长度为 100—200 bp 的 DNA 序列[18]。但在实际研究中,一方面,DNA 易降解;另一方面,传统测序技术仅适用于小样品量的测序,当需要研究的混合样品包含上千个个体时,传统测序技术不能满足复杂的、大范围的样品测序。在第二代测序技术的发展和 DNA 条形码存在局限性的双重作用下,metabarcoding 应运而生。Hajibabaei[19] 认为这两种技术的结合极大地推动了“DNA 宏分类学(DNA metasystematics)”的发展。环境 DNA metabarcoding 是指利用宏条形码对环境样本(如土壤、水、粪便等)中分离的 DNA 进行扩增和高通量测序,从而达到同时对环境样本中多个物种(或高级分类单元)鉴定的目的[1,20]。环境 DNA metabarcoding 克服传统物种鉴定方法耗时费力的缺点,以更高的效率和更低的成本极大地拓展 DNA 条形码在生态学中的应用。

环境 DNA metabarcoding 整合 DNA 条形码和高通量测序技术,通过提取环境样品中的 DNA,并使用特异性引物进行 PCR 扩增,对扩增产物进行测序后得到的可操纵分类单元(operational taxonomic units,OTUs)进行物种鉴定[21]。该技术最大的优势在于高通量、低成本并能快速地鉴定物种[4-5],最大的局限性在于 PCR 的偏向性,导致条形码的解析度和普适性及数据库的完善度水平较低。要实现 metabarcoding 技术高通量、准确、快速物种鉴定,最为关键的是构建完善的物种 DNA 条形码的标准数据库、物种信息库、信息共享和应用平台[22]。

环境 DNA metabarcoding 扩大了生物多样性的研究范围,其快速、可重复及高效性的特点让更多的研究人员进行物种鉴定和生物多样性评估。在对混合样品(水流样品或土壤样品等)的生物多样性评估时,传统方法中所遇的问题都会迎刃而解。

2 环境 DNA metabarcoding 的研究方法

2.1 样品采集

目前,在生态学研究中环境 DNA 样本的主要来源是水体、土壤和粪便等。水样可以来源于实验室的水

箱[23]、天然的池塘[24-25]、河流[26-27]、溪流[8]、海水[6,28]等。池塘、溪流、河流等的采样量从 15mL 到 10L 不等,对于溪流、河水和海水而言,一般标准的样本量大小是 1—2L[5]。在物种监测中一些研究小组采取在水体的不同地点 3 次取样的方法来提高水样中的物种覆盖度,增加物种检测概率[7-8,10,24]。对于流动水,应在水流上游连续采样以避免水样的重复采集。采样过程中始终佩戴一次性无菌手套,每采样一次及时更换手套[29]。水样的采集通常采用沉淀法(precipitation)或滤膜法(filtration)[10,24]。沉淀法是使用 50mL 的灭菌离心管,取 15mL 的水样,加入 1.5mL 的 3M 醋酸钠和 33.5mL 的无水乙醇,放置于-20℃冰箱保存[24,30]。同沉淀法相比,滤膜法需要更多体积的水,其优点是可以通过大量的水收集 DNA,但也会丢失一些能够增加检测几率的可溶性 DNA[31]。水通过装有 47mm 直径,0.45 μm 孔径的硝酸纤维素无菌过滤膜的一次性过滤器过滤。过滤后,将滤膜放置在无菌的 2mL 小瓶中,加入无水乙醇放置于-20℃保存[32]。对于滤膜规格和类型的选择,并没有统一的标准,有些研究者选用 25mm 直径,0.7 μm 的玻璃纤维滤膜或 1.5 μm 的玻璃纤维素滤膜[27,33]。研究发现对于静水和流水样本的大型无脊椎动物,使用滤膜法检测率最高。环境 DNA 采样同传统的方法比更容易以统一的标准实施,而且不易受到采样强度和人员培训差异的影响而变化[29]。

在对土壤的生物多样性分析中,土壤样品应该尽可能地代表研究区域的生物多样性,当研究区域的生物分布具有异质性时需要多份样品混合取样。在收集土壤样品时需要注意两点:一是应该随机或有规律地采集来自不同深度的土样,二是每个取样地点应该至少收集两份样品,同时每份样品应该是该取样地点不同深度的土样的混合品[31]。开展食性分析研究时,对采集到的 1 个或多个粪便样本,应从样本混合物中进行多次取样,以增加检测出样品中所含被捕食动物的可能性[34]。

2.2　环境 DNA 的提取

环境 DNA 提取方法也有很多种,包括氯仿萃取法[35]、细胞溶解的物理破碎法[26]以及二氧化硅提取法[8]。Dveiner 等[33]采集湖泊和河流水样,比较了 6 种不同的样本采集和 DNA 提取方法组合对水生态系统生物多样性监测的影响,结果表明不同的环境 DNA 采集和提取方法对 DNA 产量和高通量测序技术获得的序列数量有显著影响。采用滤膜法结合 DNeasy 血液和组织试剂盒(Qiagen, 德国)提取 DNA 的方法对生活在激流环境中物种的检测率最高。这也在检测稀有物种或入侵物种的研究中得到证实[8,27,36]。目前研究中环境 DNA 提取使用较多的是 DNeasy 血液及组织试剂盒(Qiagen, 德国), QIAamp 组织试剂盒(Qiagen 德国), PowerWater™ DNA 提取试剂盒 (MoBio Laboratories, 美国), PowerMax™ 土壤 DNA 提取试剂盒 (MoBio Laboratories, 美国)等[11,25,33]。

2.3　PCR 扩增与引物设计

由于环境 DNA 样本往往会混有不同物种,无法使用传统的 DNA 条形码进行研究。根据研究目的的需要,通常会扩增 1 个或多个基因。动物研究一般选择扩增线粒体 COI 基因, *Cyt* b 基因,12S rRNA 和 18S rDNA 等,植物研究一般选择扩增叶绿体 DNA *trn*L 的 P6 环。Thomsen 等[10]通过扩增环境水样中混合 DNA 的线粒体 COI 基因和 *Cyt* b 基因,成功鉴别了该环境中包含的两栖类、鱼类、甲虫、哺乳动物和昆虫等。

Metabarcoding 技术依赖于设计理想的引物,通过 PCR 从环境样品中扩增出高质量的混合 DNA 片段。由于环境中 DNA 易于受到紫外线和微生物分解作用的影响,物种的长 DNA 片段十分容易降解,因此使用短的片段(约 90—120bp)十分重要[5]。在不同的研究中,选择的宏条形码不可能是完全相同的,在很多情况下需要针对特定的生物设计特异性的引物[38]。所以使用 metabarcoding 技术分析环境 DNA 的研究中,为了避免在不同分类种群中放大偏差,设计短小的、高度保守的引物是极其重要的。如果实验设计的引物保守度低和特异性不足的话,容易引起碱基错配甚至引起实验结果出现假阳性和假阴性的结果[27]。因此理想的宏条形码应该具有序列短且高度保守、高辨别度等优点。Leray 等[37]设计了 5 组针对线粒体 COI 基因片段扩增的特异性引物,研究天竺鲷科(Apogonidae)和金鳞鱼科(Holocentridae)珊瑚鱼的胃内容物。结果表明其中一对引物(mlCOIintF/jgHCO2198)扩增出的 313bp 的线粒体 COI 基因片段比传统的 COI 基因通用引物(LCO1490/HCO2198)在后生动物多样性研究中能够获得更多的 OTUs,扩增成功率更高。

目前虽然有一些工具可以帮助生物学家设计引物,比如 Primer5 和 QPrimer,但是还不能完全满足 metabarcoding 设计引物的需求。Riaz 等[38]通过研究证实 ecoPrimers 软件可以满足 metabarcoding 研究中设计引物的要求,尽管仍然存在一对引物覆盖率较低的问题,但是可以通过设计极短的条形码来提高引物的特异性和对目标物种的覆盖率。相信随着公共数据库中数据的不断完善,可以根据生物的特异性和研究需求,精确地设计出更多更有效的条形码。

2.4 第二代高通量测序技术

1977 年,Sanger 等发明了双脱氧核苷酸末端终止法,而 Maxam 和 Gilbert 发明的化学降解法标志了第一代测序技术的产生。第一代测序技术完成了从噬菌体基因组到人类基因组草图的测序工作,但是由于其测序成本高、速度慢等缺点并不是最理想的方法[39]。随后,出现了可以边合成边测序,通过捕捉新合成的末端的标记来确定 DNA 的序列的第二代高通量测序技术(Next-generation sequencing,NGS),包括罗氏公司的 454 技术的 GS FLX 测序平台、Illumina 公司的 Solexa Genome Analyzer 测序平台和 ABI 公司的 SOLiD 测序平台[40]。第二代测序技术的大致步骤为:将片断化的基因组 DNA 两端连上特殊的接头,通过不同的方式将每个片段结合在微珠或芯片上,形成几百万个可以同时进行反应的微型反应池,每个单链 DNA 片段在其微型反应池中通过 PCR 扩增产生大量拷贝形成单克隆“DNA 簇群”(Polony),以作为测序的模板;再通过酶延伸反应或寡核苷酸连接反应同时对这几百万个微型反应池中的模板进行测序[41]。

第二代测序技术最显著的特征就是高通量,一次能对几十万到几百万条 DNA 分子进行序列测序,目前 SOLiD 3 系统单次运行可产生 50GB 的序列数据,相当于 17 倍人类基因组覆盖度[42]。与第一代测序技术相比,虽然读取的序列片段长度和准确度不及 Sanger 测序,但是第二代测序技术不仅降低了测序成本并缩短了测序时间,同时又可以对复杂的混合样品进行测序。因此第二代测序技术的广泛应用可以在短时间内对环境样品中包含的上百万条序列进行测序,可以实现短时间对复杂环境样品的研究。随着第三代测序技术(如 SMRT 技术,纳米孔单分子测序技术等)的迅速发展,测序的长度和准确性都会大幅度提高。同时第三代测序技术无需进行 PCR 扩增[43-44],解决了第二代测序错误偏向性的问题。

2.5 生物信息学分析

Metabarcoding 使用通用 PCR 引物扩增环境中的 DNA,经高通量测序后得到其中包含的大规模分类学信息基因。然而如何对测序得到的大量数据进行处理是第二代测序的主要问题。由于得到的序列片段较短,而且环境样品通常具有高度的复杂性,很难确定某条序列来自于哪个物种,因此面对海量的短序列,拼接和进一步的分析具有相当大的挑战。一般来说,数据处理过程主要包括:(1)去除噪音,即对测序数据进行预处理以去除低质量的污染的序列。测序产物可能含有非特异性扩增片段,利用特异性引物信息可以将其去除;序列中可能含有模糊碱基(ambiguous)、单碱基高重复区(homologous),长度过短的序列,及 PCR 过程中产生的一些嵌合体(chimera),将这些序列纳入分析范围会降低分析质量,因此修剪、去除(trim)这部分序列,可得到供精准分析的优化序列。如:SeqClean、VecScree、UCHIME 等可以用来去除噪音[39];(2)使用相关软件如(USEARCH/CROP、Denoiser/UCLUST、OCTUPUS)根据相似度或序列组成对序列进行归类获得 OTUs。因为每个物种单独贡献许多 DNA,而且通过 PCR 被复制了很多次,所以输出的数据集需要使用软件分配 OTUs,其每一个理想的 OTUs 应该只包含来自一个物种的序列[21]。最后,代表序列取自每个 OTU 和分配使用一个上面列出的数据库的一个或多个分类法。通过多个对条形码的分析可以获得在该环境中各种物种的存在情况;(3)在获得了 OTUs 后可以针对研究的具体内容进行后续分析,比如 α-多样性分析、β-多样性分析、构建系统发育树、物种分类及物种丰度分析等[39]。

3 环境 DNA metabarcoding 在生态学研究中的应用

3.1 生物多样性研究

物种的准确鉴定是探索、认识物种和保护生物多样性的基础。但是,使用传统的方法鉴定物种有很多局

限性:(1)耗时较长,效率较低;(2)过于依赖专家的经验,鉴定与分类结果的正确性有待商榷;(3)在某些物种的特定阶段或发育阶段时,会影响鉴定结果。DNA 条形码可以构建植物与动物之间的网状拓扑结构,可以从群落水平探讨物种多样性、系统发育多样性与群落稳定性之间的相互关系[17]。

近年来,环境 DNA metabarcoding 已成功应用于动植物的多样性研究。Yoccoz 等[12]利用 metabarcoding 技术分析了不同植被类型的土壤 DNA,获得其中叶绿体 trnL(UAA)内含子 P6 环序列,结果表明利用土壤 DNA 检测的植物多样性与传统地面调查估计的植物种类和生长型多样性结果高度一致。Bienert 等[45]利用 metabarcoding 技术结合线粒体 16S 基因,设计两个 DNA 短序列的特异性引物(大约 30bp 和 70bp)进行 PCR 扩增及测序,分析了法国阿尔卑斯山地生态系统土壤中蚯蚓组成。研究表明基于 DNA 方法分析的蚯蚓群落多样性与传统分类方法获得的结果一致,阐明了环境 DNA 作为土壤动物多样性评价工具的潜力。Thomsen 等[6]从丹麦的一个海洋生态系统中采集海水,利用环境 DNA metabarcoding 技术研究海洋鱼类生物多样性。在获得的环境 DNA 中发现了 15 种不同的鱼类以及 4 种鸟类,其中包括一些用传统监测方法很难发现的稀有物种。同时与 9 种传统的海洋鱼类调查方法比较,环境 DNA 检测出的鱼类多样性与其他传统方法相当,甚至优于传统方法。Thomsen 等[10]研究表明从湖泊、池塘和河流的少量水样中直接获得 DNA,可以检测并定量分析研究区域内珍稀及濒危淡水动物(两栖类、鱼类、哺乳类、昆虫类和甲壳类)多样性。同时表明通过池塘水中分离的 DNA,利用第二代测序技术可以检测到研究区域内两栖类和鱼类群体,环境 DNA 可以作为监测珍稀濒危物种的工具,应用于更广泛的物种监测中。

应用环境 DNA metabarcoding 技术不仅可以针对当前的生物多样性进行有效的评估,也可以对过去的动植物群落的多样性进行评估[11,45]。Epp 等[11]通过对过去和现在的环境 DNA 进行 metabarcoding 研究,所有目标类群都能通过 metabarcoding 的方法检测出来,但是类群之间和不同年代的环境样品所检测的结果存在较大变异范围,如更新世时期的样品中真菌检测成功率最高,同时也可以检测到苔藓植物、甲虫和鸟类的序列。

目前国内在应用环境 DNA metabarcoding 技术研究生物多样性的报道还比较少。杨晨雪等[46]使用 metabarcoding 技术研究土壤样品中的生物多样性,通过三种不同的生物信息学分析方法进行比较分析,探讨了用 18S rDNA 基因扩增土壤中后生动物的有效性,研究证明 metabarcoding 技术可以快速、全面、有力地调查土壤动物多样性。中科院昆明动物所 Yu 等[47]利用马氏网诱捕节肢动物,对整个混合样本的 DNA 进行线粒体 COI 基因扩增,再进行高通量测序,并结合生物信息学分析,探讨 metabarcoding 方法对群落的差异度(β-多样性)和群落内系统发育(α-多样性)评估的准确性,结果表明 metabarcoding 方法可以在更广的尺度上有效地测量生物多样性。

3.2　食性分析

食性分析及食物网络的研究可直接体现出生态群落的功能结构,是生态系统研究的重要组成部分[34]。传统的食性分析通常通过收集粪便并鉴别其中的食物残留,研究人员通过肉眼直接观察或利用早期的分子实验获取食谱信息。由于食物残留情况各异,这种方法耗时费力,对分析人员的经验依赖性大而且解析度不高,时间长,准确度不高[48]。

在动植物间的植食网络关系中,当观察动物的行为存在困难时,可利用动物消化道中的食物残渣,利用 metabarcoding 技术,研究人员可快速准确地进行大量样品的食性分析[34]。Shehzad 等[49]基于第二代测序技术进行了食肉动物豹猫(*Prionailurus bengalensis*)的食性分析。从 38 个豹猫的粪便提取出了混合 DNA,通过扩增约 100bp 片段的 12S rRNA 研究豹猫取食的食物种类,发现了 18 种猎物,包括八种哺乳动物、八种鸟类、一种两栖类和一种鱼类,并且确定豹猫主要食用啮齿动物鼠类。

在自然界中,动物栖息地和食物资源的改变,季节和地域的差异通常会对动物的取食有所影响。Soininen 等[50]利用叶绿体 *trn*L(UAA)内含子 P6 环作为条形码,对苔原生态系统的食草动物棕背　(*Myodes rufocanus*)和根田鼠(*Microtus oeconomus*)的胃内容物中包含的种子植物进行分析。结果表明棕背　和根田鼠对食物的选择比较灵活,尽管季节和地域会对这两种鼠的取食有所影响,但是影响很小。环境的改变会影响灵长类动

物的食物资源的获取。Quéméré 等[51]对濒临灭绝的金冠狐猴(*Propithecus tattersalli*)食谱多样性进行了研究。他们从该物种栖息地收集 96 个金冠狐猴的粪便,利用叶绿体 *trn*L 内含子 P6 环作为条形码对粪便中提取的 DNA 进行鉴定,发现金冠狐猴取食的食物中包含至少 130 多种植物,取食多样性有利于金冠狐猴应对栖息地环境的改变。温带地区的蝙蝠冬季取食在很大程度上被忽略。Hope 等[52]对纳氏鼠耳蝠(*Myotis nattereri*)的冬季取食进行研究,扩增采集的粪便样品的 *Cyt* b 基因,发现冬季纳氏鼠耳蝠取食的食物中包含大量的鳞翅目幼虫,证实了 metabarcoding 技术在动物食性分析研究上的可行性。

3.3 外来入侵物种的检测

目前外来入侵物种的情况日趋严重。当外来物种入侵时,入侵物种很有可能破坏原本的生态平衡,使生态系统不完善,从而对本地物种的种类和数量产生影响[24]。但是在早期入侵阶段外来入侵物种通常数量不多,使用传统的检测方法耗时且效率不高,难度高,不能及时被发现。这会导致外来入侵物种对本地生态平衡的危害达到最高值时才受到重视,为时已晚。环境 DNA metabarcoding 增强了对入侵物种早期监测的可能性,可以有效地遏制物种入侵。

研究发现利用环境 DNA metabarcoding 可以从淡水中提取环境 DNA,检测出外来入侵物种的存在。Ficetola 等[24]最早将环境 DNA metabarcoding 应用于物种监测,他们使用特异性引物扩增短线粒体 DNA 序列追踪在受控环境和自然环境中一种入侵牛蛙(*Rana catesbeiana*)的存在,发现对环境中低密度的物种,使用 metabarcoding 技术仍然可以进行快速有效的物种检测。这是首次结合大规模测序和 DNA 条形码技术的发展来进行物种识别,为利用环境 DNA 监测外来物种提供了新方法和新思路。Jerde 等[26]利用环境 DNA 研究美国芝加哥地区河流中的两种入侵亚洲鲤科鱼(*Hypophthalmichthys molitrix* 和 *H.nobilis*),发现使用传统电气捕鱼法检测到一条鱼需要 93 人天的努力,而环境 DNA metabarcoding 方法检测到目标物种只需要 0.174 人天。在亚洲鲤科鱼种群密度很低的区域,只有环境 DNA 方法能够检测到这两种鱼[5]。可见,环境 DNA metabarcoding 方法不仅在时间和资金成本上优于传统监测方法,而且可以在种群密度很低的环境样本中灵敏地检测到入侵物种的存在。Piaggio 等[23]捕获入侵佛罗里达州的半水栖物种缅甸巨蟒(*Python bivittatus*),放置于 90L 的水箱中评估水中环境 DNA 的降解速率,结果表明缅甸巨蟒的 DNA 在 96 小时以内都可以检测到。在佛罗里达州 6 个野外地点采集的水样中,有 5 个地点的缅甸巨蟒环境 DNA 为阳性,这与缅甸巨蟒的野外分布结果一致。Takahara 等[7]使用环境 DNA 方法采集日本海岸以及周围岛屿的 70 个水样对一种入侵蓝腮太阳鱼(*Lepomis macrochirus*)进行检测。利用蓝腮太阳鱼的特异性引物(100bp 的 *Cyt* b 片段)扩增水环境 DNA,结果表明 70 个池塘中有 19 个池塘遭受蓝腮太阳鱼的入侵。尽管鱼的大小、习性等因素对实验结果有一定影响,但使用环境 DNA metabacoding 提高了监测入侵物种的准确度。

3.4 物种监测

通过水体中的环境 DNA 可以有效检测水生脊椎动物,并且已在湿地和大型河流研究中得到证实[26]。利用环境 DNA 检测河流中的稀有物种和隐秘物种可以增加调查结果准确性,减少调查成本。Goldberg 等[8]利用 metabarcoding 技术,通过收集快速流动的水体环境 DNA 样本,对尾突角蟾(*Ascaphus montanus*)和爱达荷陆巨螈(*Dicamptodon aterrimus*)两种珍稀物种进行监测。设计特异性引物尾突角蟾和爱达荷陆巨螈的线粒体 *Cyt* b 区域的 85bp 和 78bp 片段,在五个不同物种密度的水样中均成功进行了 PCR 扩增并灵敏地检测到了目标物种的存在。该研究还发现早春季节比早秋季节更难以检测到两栖类物种存在,推测可能是由于早春比早秋温度更低,降低了生物代谢速率而导致。Foote 等[28]从海水中分离 DNA,使用特异性引物扩增线粒体 DNA 区域 60—80bp 的片段检测水体中是否存在港湾鼠海豚(*Phocoena phocoena*),对控制条件下和自然条件下该物种进行遗传监测。在一个样地中检测到长肢领航鲸(*Globicephala melas*),而该物种极少在研究海域被发现,结果表明环境 DNA 的方法可用于检测稀有物种。Wilcox 等[27]利用环境 DNA 结合定量 PCR 检测了河流中的两个稀有物种,美洲红点鲑(*Salvelinus fontinalis*)和强壮红点鲑(*S. confluentus*),同时发现定量 PCR(qPCR)比传统 PCR 更加灵敏,检测概率更高。Rees 等[25]利用环境 DNA 和传统的实地调查方法开展对英国

珍稀保护物种冠北螈(*Triturus cristatus*)的监测,野外调查发现有冠北螈分布的地点中,采集的水样 DNA 中成功检测出冠北螈的概率为 84%。使用环境 DNA 方法监测物种,对物种及其生存环境不会造成损害。随着测序成本的下降,环境 DNA 与 metabarcoding 技术结合应用在许多情况下甚至优于一些传统监测方法,成为物种监测方法的又一选择[4]。

4　面临的挑战

4.1　样品来源的影响

使用环境 DNA 监测水生生物时,必须保证能获得该环境的完整样品并能进行很好的保存[27]。水体的温度和光照情况[53-54],水体的流速[55],物种密度和在环境中的停留时间[54],生物体的发育阶段[55]等均会对环境中所取的 DNA 的量造成影响。Maruyama 等[56]对水体中 DNA 的半衰期进行了研究和计算,发现鱼类离开此水体后环境 DNA 的半衰期是 6.3h,但对环境 DNA 降解速率及其影响因素,环境 DNA 在环境中存在时间的长短等问题仍缺乏充分的了解。

在采集溪流水样时,由于许多溪流水来自于地下水,所以接触到目标生物脱落 DNA 的可能性较低。此外,由于溪流水水位浅而且是充分混合的,因此脱落的 DNA 被光降解的可能性更大,导致在溪流中检测到的目标物种密度会比较低[27]。使用环境 DNA metabarcoding 技术对淡水中的物种进行检测已被证实快速有效。淡水中水流较平和且流量小,所以准确度高。与淡水相比,海洋生态系统中有单位体积中的生物量比例更大,海流和波浪的影响作用,以及盐度对保存和提取环境 DNA 的影响都需要加以考虑。这些因素可能意味着海水中的环境 DNA 不太集中,且分散更迅速,提取 DNA 时比较困难,导致在海水中使用时只能针对一小片区域,并且对外来入侵物种的检测效率不高。因此在海水中的使用还需要进一步的研究与完善[28]。

4.2　PCR 扩增的偏向性

环境 DNA 宏条形码技术的一个潜在的局限性是 PCR 引物设计。通用引物的使用是普遍的,对所有的序列都有扩增的作用。非特异性的引物和探针会造成假阳性的结果,非靶标模板的竞争会产生不准确的 DNA 量估计,从而导致物种丰富度的不准确估计[53]。可以通过以下两种方式来解决由于非特异性引物而造成的假阳性:(1)设计分析与非目标物种最大化碱基对错配的引物区域;(2)通过实验来测定靶 DNA 和非靶 DNA 的纯样品和混合样品[27]。

从长远角度看,在 PCR 扩增时低密度的物种可能会因为通用引物的原因被忽视,这也就是 PCR 的偏向性。但是如果任由 PCR 的偏向性发生,会导致一些稀有的或者本身难以扩增的物种有数据丢失的情况,或者引入嵌合体等错误产物[21]。目前的第三代测序技术就是采用单分子读取技术,有着更快的数据读取速度。而且不依赖于 PCR 扩增,不仅进一步降低了测序成本,而且解决了在环境 DNA metabarcoding 的研究中 PCR 扩增偏向的制约问题[43]。

5　展望

在第三代测序技术的推动下,不需要经过 PCR 步骤的 metabarcoding(PCR-free metabarcoding)技术,相信在不久的将来就会实现。该技术的应用可以对物种中存在线粒体 DNA 的总量进行推断,还可以在生态学的研究中作为一种新兴方法对物种的生物量和相对丰度进行评估,将极大地改变生态学家对生态多样性检测方法的认知。所以在今后环境 DNAmetabarcoding 研究中,一方面要大力发展 PCR-free metabarcoding,不断完善数据库并且发展生物信息学工具增加数据处理的可信度[21]。另一方面应尽快形成环境 DNA metabarcoding 对不同环境采样的统一标准。虽然环境 DNA metabarcoding 并不能完全取代传统的野外工作者和专业分类学家的工作,但是对于提高受限制和保护资源的有效利用而言是一个十分有效的工具[5]。

参考文献(References):

[1] Taberlet P, Coissac E, Hajibabaei M, Rieseberg L H. Environmental DNA. Molecular Ecology, 2012, 21(8): 1789-1793.

[2] Haile J, Froese D G, Macphee R D, Roberts R G, Arnold L J, Reyes A V, Rasmussen M, Nielsen R, Brook B W, Robinson S, Demuro M, Gilbert M T, Munch K, Austin J J, Cooper A, Barnes I, M ller P, Willerslev E. Ancient DNA reveals late survival of mammoth and horse in interior Alaska. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(52): 22352-22357.

[3] Lydolph M C, Jacobsen J, Arctander P, Gilbert M T, Gilichinsky D A, Hansen A J, Willerslev E, Lange L. Beringian paleoecology inferred from permafrost-preserved fungal DNA. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(2): 1012-1017.

[4] Thomsen P F, Willerslev E. Environmental DNA - An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. Biological Conservation, 2015, 183: 4-18.

[5] Rees H C, Maddison B C, Middleditch D J, Patmore J R M, Gough K C. REVIEW: The detection of aquatic animal species using environmental DNA-a review of eDNA as a survey tool in ecology. Journal of Applied Ecology, 2014, 51(5): 1450-1459.

[6] Thomsen P F, Kielgast J, Iversen L L, Moller P R, Rasmussen M, Willerslev E. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. PLoS One, 2012, 7(8): e41732.

[7] Takahara T, Minamoto T, Doi H. Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds. PLoS One, 2013, 8(2): e56584.

[8] Goldberg C S, Pilliod D S, Arkle R S, Waits L P. Molecular detection of vertebrates in stream water: a demonstration using Rocky Mountain tailed frogs and Idaho giant salamanders. PLoS One, 2011, 6(7): e22746.

[9] Mahon A R, Jerde C L, Galaska M, Bergner J L, Chadderton W L, Lodge D M, Hunter M E, Nico L G. Validation of eDNA surveillance sensitivity for detection of Asian carps in controlled and field experiments. PLoS One, 2013, 8(3): e58316.

[10] Thomsen P F, Kielgast J, Iversen L L, Wiuf C, Rasmussen M, Gilbert M T, Orlando L, Willerslev E. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. Molecular Ecology, 2012, 21(11): 2565-2573.

[11] Epp L S, Boessenkool S, Bellemain E P, Haile J, Esposito A, Riaz T, Erséus C, Gusarov V I, Edwards M E, Johnsen A, Stenøien H K, Hassel K, Kauserud H, Yoccoz N G, Brathen K A, Willerslev E, Taberlet P, Coissac E, Brochmann C. New environmental metabarcodes for analysing soil DNA: potential for studying past and present ecosystems. Molecular Ecology, 2012, 21(8): 1821-1833.

[12] Yoccoz N G, Brathen K A, Gielly L, Haile J, Edwards M E, Goslar T, Von Stedingk H, Brysting A K, Coissac E, Pompanon F, Sønstebø J H, Miquel C, Valentini A, De Bello F, Chave J, Thuiller W, Wincker P, Cruaud C, Gavory F, Rasmussen M, Gilbert M T, Orlando L, Brochmann C, Willerslev E, Taberlet P. DNA from soil mirrors plant taxonomic and growth form diversity. Molecular Ecology, 2012, 21(15): 3647-3655.

[13] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, deWaard J R. Biological identifications through DNA barcodes. Proceeding of the Royal Society of London Series B: Biological Science, 2003, 270(1512): 313-321.

[14] Sogin M L, Morrison H G, Huber J A, Mark Welch D, Huse S M, Neal P R, Arrieta J M, Herndl G J. Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(32): 12115-12120.

[15] Lahaye R, van der Bank M, Bogarin D, Warner J, Pupulin F, Gigot G, Maurin O, Duthoit S, Barraclough T G, Savolainen V. DNA barcoding the floras of biodiversity hotspots. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(8): 2923-2928.

[16] Li D Z, Gao L M, Li H T, Wang H, Ge X J, Liu J Q, Chen Z D, Zhou S L, Chen S L, Yang J B, Fu C X, Zeng C X, Yan H F, Zhu Y J, Sun Y S, Chen S Y, Zhao L, Wang K, Yang T, Duan G W. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2011, 108(49): 19641-19646.

[17] 罗亚皇, 刘杰, 高连明, 李德铢. DNA 条形码在生态学研究中的应用与展望. 植物分类与资源学报, 2013, 35(6): 761-768.

[18] Meusnier I, Singer G A C, Landry J F, Hickey D A, Hebert P D N, Hajibabaei M. A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. BMC Genomics, 2008, 9: 214-214.

[19] Hajibabaei M. The golden age of DNA metasystematics. Trends in Genetics, 2012, 28(11): 535-537.

[20] Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Brochmann C, Willerslev E. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. Molecular Ecology, 2012, 21(8): 2045-2050.

[21] Ji Y Q, Ashton L, Pedley S M, Edwards D P, Tang Y, Nakamura A, Kitching R, Dolman P M, Woodcock P, Edwards F A, Larsen T H, Hsu W W, Benedick S, Hamer K C, Wilcove D S, Bruce C, Wang X Y, Levi T, Lott M, Emerson B C, Yu D W. Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. Ecology Letters, 2013, 16(10): 1245-1257.

[22] 唐敏, 伊廷双, 王欣, 谭美华, 周欣. Metabarcoding 技术在植物鉴定和多样性研究中的应用. 植物分类与资源学报, 2013, 35(6): 769-773.

[23] Piaggio A J, Engeman R M, Hopken M W, Humphrey J S, Keacher K L, Bruce W E, Avery M L. Detecting an elusive invasive species: a diagnostic PCR to detect Burmese python in Florida waters and an assessment of persistence of environmental DNA. Molecular Ecology Resources, 2014, 14(2): 374-380.

[24] Ficetola G F, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P. Species detection using enviromental DNA from water samples. Biology Letters, 2008, 4(4): 423-425.

[25] Rees H C, Bishop K, Middleditch D J, Patmore J R, Maddison B C, Gough K C. The application of eDNA for monitoring of the Great Crested Newt in the UK. Ecology and Evolution, 2014, 4(21): 4023-4032.

[26] Jerde C L, Mahon A R, Chadderton W L, Lodge D M. "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. Conservation Letters, 2011, 4(2): 150-157.

[27] Wilcox T M, McKelvey K S, Young M K, Jane S F, Lowe W H, Whiteley A R, Schwartz M K. Robust detection of rare species using environmental DNA: the importance of primer specificity. PLoS One, 2013, 8(3): e59520.

[28] Foote A D, Thomsen P F, Sveegaard S, Wahlberg M, Kielgast J, Kyhn L A, Salling A B, Galatius A, Orlando L, Gilbert M T P. Investigating the potential use of environmental DNA (eDNA) for genetic monitoring of marine mammals. PLoS One, 2012, 7(8): e41781.

[29] Sigsgaard E E, Carl H, Møller P R, Thomsen P F. Monitoring the near-extinct European weather loach in Denmark based on environmental DNA from water samples. Biological Conservation, 2015, 183: 46-52.

[30] Turner C R, Uy K L, Everhartb R C. Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water. Biological Conservation, 2015, 183: 93-102.

[31] Goldberg C S, Strickler K M, Pilliod D S. Moving environmental DNA methods from concept to practice for monitoring aquatic macroorganisms. Biological Conservation, 2015, 183: 1-3.

[32] Laramie M B, Pilliod D S, Goldberg C S. Characterizing the distribution of an endangered salmonid using environmental DNA analysis. Biological Conservation, 2015, 183: 29-37.

[33] Deiner K, Walser J C, Mächler E, Altermatt F. Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. Biological Conservation, 2015, 183: 53-63.

[34] Pompanon F, Deagle B E, Symondson W O, Brown D S, Jarman S N, Taberlet P. Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing. Molecular Ecology, 2012, 21(8): 1931-1950.

[35] Renshaw M A, Olds B P, Jerde C L, McVeigh M M, Lodge D M. 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.

[36] Pilliod D S, Goldberg C S, Arkle R S, Waits L P. 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.

[37] Leray M, Yang J Y, Meyer C P, Mills S C, Agudelo N, Ranwez V, Boehm J T, Machida R J. A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial COI region for metabarcoding metazoan diversity: application for characterizing coral reef fish gut contents. Frontiers in Zoology, 2013, 10: 34-34.

[38] Riaz T, Shehzad W, Viari A, Pompanon F, Taberlet P, Coissac É. ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. Nucleic Acids Research, 2011, 39(21): e145.

[39] 叶丹丹, 樊萌萌, 关琼, 陈红菊, 马占山. 宏基因组研究的生物信息学平台现状. 动物学研究, 2012, 33(6): 574-585.

[40] Liu L, Li Y H, Li S L, Hu N, He Y M, Pong R, Lin D N, Lu L H, Law M. Comparison of next-generation sequencing systems. Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2012, 2012: Article ID 251364.

[41] 贺纪正, 袁超磊, 沈菊培, 张丽梅. 土壤宏基因组学研究方法与进展. 土壤学报, 2012, 49(1): 155-164.

[42] 解增言, 林俊华, 谭军, 舒坤贤. DNA 测序技术的发展历史与最新进展. 生物技术通报, 2010, (8): 64-70.

[43] 张得芳, 马秋月, 尹佟明, 夏涛. 第三代测序技术及其应用. 中国生物工程杂志, 2013, 33(5): 125-131.

[44] Roberts R J, Carneiro M O, Schatz M C. The advantages of SMRT sequencing. Genome Biology, 2013, 14(7): 405-405.

[45] Bienert F, De Danieli S, Miquel C, Coissac E, Poillot C, Brun J J, Taberlet P. Tracking earthworm communities from soil DNA. Molecular Ecology, 2012, 21(8): 2017-2030.

[46] 杨晨雪, 季吟秋, 王晓阳, 杨春燕, Yu D W. 基于 18S rDNA 的 metabarcoading 技术分析土壤小型动物多样性 3 种方法的比较. 中国科学: 生命科学, 2012, 42(12): 993-1001.

[47] Yu D W, Ji Y Q, Emerson B C, Wang X Y, Ye C X, Yang C Y, Ding Z L. Biodiversity soup: metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring. Methods in Ecology and Evolution, 2012, 3(4): 613-623.

[48] Bohmann K, Monadjem A, Lehmkuhl N C, Rasmussen M, Zeale M R, Clare E, Jones G, Willerslev E, Gilbert M T. Molecular diet analysis of two african free-tailed bats (molossidae) using high throughput sequencing. PLoS One, 2011, 6(6): e21441.

[49] Shehzad W, Riaz T, Nawaz M A, Miquel C, Poillot C, Shah S A, Pompanon F, Coissac E, Taberlet P. Carnivore diet analysis based on next-generation sequencing: application to the leopard cat (*Prionailurus bengalensis*) in Pakistan. Molecular Ecology, 2012, 21(8): 1951-1965.

[50] Soininen E M, Ravolainen V T, Bråthen K A, Yoccoz N G, Gielly L, Ims R A. Arctic Small Rodents Have Diverse Diets and Flexible Food

Selection. PLoS One, 2013, 8(6): e68128.

[51] Quéméré E, Hibert F, Miquel C, Lhuillier E, Rasolondraibe E, Champeau J, Rabarivola C, Nusbaumer L, Chatelain C, Gautier L, Ranirison P, Crouau-Roy B, Taberlet P, Chikhi L. A DNA metabarcoding study of a primate dietary diversity and plasticity across its entire fragmented range. PLoS One, 2013, 8(3): e58971.

[52] Hope P R, Bohmann K, Gilbert M T P, Zepeda-Mendoza M L, Razgour O, Jones G. Second generation sequencing and morphological faecal analysis reveal unexpected foraging behaviour by *Myotis nattereri* (Chiroptera, Vespertilionidae) in winter. Frontiers in Zoology, 2014, 11: 39-39.

[53] Takahara T, Minamoto T, Yamanaka H, Doi H, Kawabata Z. Estimation of fish biomass using environmental DNA. PLoS One, 2012, 7(4): e35868.

[54] Pilliod D S, Goldberg C S, Arkle R S, Waits L P. Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. Molecular Ecology Resources, 2014, 14(1): 109-116.

[55] Jane S F, Wilcox T M, McKelvey K S, Young M K, Schwartz M K, Lowe W H, Letcher B H, Whiteley A R. Distance, flow and PCR inhibition: eDNA dynamics in two headwater streams. Molecular Ecology Resources, 2015, 15(1): 216-227.

[56] Maruyama A, Nakamura K, Yamanaka H, Kondoh M, Minamoto T. The release rate of environmental DNA from juvenile and adult fish. PLoS One, 2014, 9(12): e114639.