

DOI: 10.5846/stxb202111163208

徐梦珍, 杨瑶, 张家豪, 傅旭东. 环境 DNA 技术在贻贝入侵监测中的应用挑战. 生态学报, 2023, 43(11): 4423-4433.

Xu M Z, Yang Y, Zhang J H, Fu X D. Challenges in invasive mussel monitoring using environmental DNA technology. Acta Ecologica Sinica, 2023, 43(11): 4423-4433.

环境 DNA 技术在贻贝入侵监测中的应用挑战

徐梦珍*, 杨 瑶, 张家豪, 傅旭东

清华大学水利水电工程系, 水沙科学与水利水电工程国家重点实验室, 北京 100084

摘要: 沼蛤 (*Limnoperna fortunei*) 和斑马贻贝 (*Dreissena polymorpha*) 是淡水系统中常见的入侵贻贝物种, 对其种群规模的持续监测是入侵贻贝防治管控中的关键环节。随着分子生物学技术的发展, 入侵物种监测中逐渐尝试利用环境 DNA (eDNA) 技术实现快速、灵敏检测。然而, 在入侵物种引入-定植-扩散过程的监测中, eDNA 技术的灵敏度及定量效果受到诸多因素的影响, 给实际应用带来挑战。系统梳理了国内外学者利用 eDNA 技术监测沼蛤、斑马贻贝等入侵物种的研究进展; 分析了 eDNA 技术的采样方案、引物设计、定量分析、质量保证、原位便携仪器设计等影响监测效率与准确率的关键环节; 进一步探讨了 eDNA 技术在贻贝入侵监测中的优势和局限性, 以及未来的改进方向。

关键词: 沼蛤 (*L. fortunei*); 斑马贻贝 (*D. polymorpha*); 生物入侵; 环境 DNA (eDNA)

Challenges in invasive mussel monitoring using environmental DNA technology

XU Mengzhen*, YANG Yao, ZHANG Jiahao, FU Xudong

State Key Laboratory of Hydro science and Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China

Abstract: Golden mussel (*Limnoperna fortunei*) and zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) are representative species of invasive mussels in freshwater system. Benefiting from molecular biological technology development, the environmental DNA (eDNA) technology has been applied for rapid detection of mussel invasions. However, the sensitivity and quantitative efficiency of eDNA technology are significantly affected by abiotic and biotic environmental parameters when we undertake monitoring of the invasive species during their introduction, colonization, and diffusion processes. In this review, we systematically searched for publications about monitoring of mussel invasions using eDNA technology and analyzed key factors affecting the efficiency and accuracy of eDNA monitoring, including sampling scheme, primer design, quantitative analysis, quality assurance, and portable instrumentation. Based on the summary above, we explored the advantages and limitations of eDNA technology in the invasive mussel monitoring and proposed potential improvements of the technology for future application.

Key Words: Golden mussel (*L. fortunei*); zebra mussel (*D. polymorpha*); biological invasion; environmental DNA

沼蛤 (*Limnoperna fortunei*, 俗称淡水壳菜、金贻贝, 英文名 golden mussel) 和斑马贻贝 (*Dreissena polymorpha*, 英文名 zebra mussel) 的繁殖力强、扩散速度快, 易形成高密度附着^[1-3], 带来严重生物污损问题, 导致严重社会经济损失和生态失衡风险, 被认为是淡水生态系统中入侵能力最强的代表性物种^[4-5]。其中, 沼蛤原产于中国南方, 自 20 世纪 60 年代年代以来在亚洲其他国家和地区扩张, 20 世纪 90 年代年代初期入侵

基金项目: 十四五重点研发课题项目 (2021YFC3200905, 2021YFC3200902); 国家自然科学基金项目 (U2243222, 51779120)

收稿日期: 2021-11-16; 网络出版日期: 2023-02-07

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: mzxu@mail.tsinghua.edu.cn

到南美洲,对入侵地自然生态系统造成严重生态压力^[6-7]。同时,多个国家和地区的输调水工程、城市供水系统、工业设备技术供水系统等重要设施中发生沼蛤生物污损,造成管线堵塞和结构破坏,威胁工程安全^[8-9]。斑马贻贝原产于欧洲东南部的黑海和里海流域,是北半球最具入侵性和最成功的淡水入侵物种之一^[10],20世纪80年代迅速传播到北美五大湖及密西西比河流域^[11-12]。近年来,明尼苏达州红河流域内的湖泊也发生斑马贻贝入侵^[13]。在全球气候变化和引入途径(如国际航运、内河航运、输调水工程等)日益增加的背景下,沼蛤和斑马贻贝的入侵扩张风险不断增加^[14-17]。

烈性入侵物种一旦侵入,便难以彻底根除,因此,早期监测预警和防止入侵发生是最经济有效的策略^[18]。入侵物种的引入-定植-扩散等过程的持续监测是防治管控中的关键环节。针对沼蛤和斑马贻贝的入侵监测,传统手段依赖光学显微镜下观测、计数及生态统计分析完成,采样和分析的时间成本高,但数据精度和分辨率较低^[3,17];甚至常常因入侵早期密度低而未被及时发现,错过了最佳预警和防治时期。随着分子生物学技术的发展,入侵物种监测中逐渐尝试利用环境 DNA(eDNA)技术^[19]。eDNA 是生物体沉积或脱落到环境中的遗传物质,包括细胞内外的 DNA^[20]。eDNA 技术是指从环境样品(土壤、沉积物和水体等)中直接提取生物的 DNA 片段后进行定性或定量分析的技术^[21]。与传统调查手段相比,eDNA 技术省时省力、对调查环境干扰小,且灵敏度更高^[22]。因此,eDNA 技术如能成功应用在沼蛤和斑马贻贝入侵早期监测中,可快速识别入侵,帮助及时采取有效手段阻止进一步的扩张。

本文系统梳理了沼蛤和斑马贻贝入侵监测中 eDNA 技术的应用现状,重点分析了影响监测结果准确度的关键环节,包括操作流程、分析手段、环境因素、解译方法等,进一步探讨了该技术在贻贝入侵监测中的优势、局限性及未来的改进方向,为 eDNA 技术在入侵物种监测中的推广应用提供了科学指导。

1 eDNA 技术在贻贝入侵监测中的应用现状

如图 1,2000 年前北美学者已经开始探索 eDNA 技术在斑马贻贝幼虫监测中的应用^[23],如 Claxton 利用 eDNA 技术在五大湖流域区分斑马贻贝与斑驴贻贝^[24];2000—2010 年间,巴西和日本学者等开始利用 eDNA 技术监测沼蛤的入侵^[25-26],如巴西的伊瓜苏流域的沼蛤入侵,日本群馬县奥四湖的沼蛤种群变化。尤其是 2010 年以来,世界各国利用 eDNA 技术进行沼蛤和斑马贻贝入侵监测的研究与实际应用发展迅速^[27-41],近年来已开始尝试定量监测入侵贻贝的种群规模和入侵前后的群落结构组成。

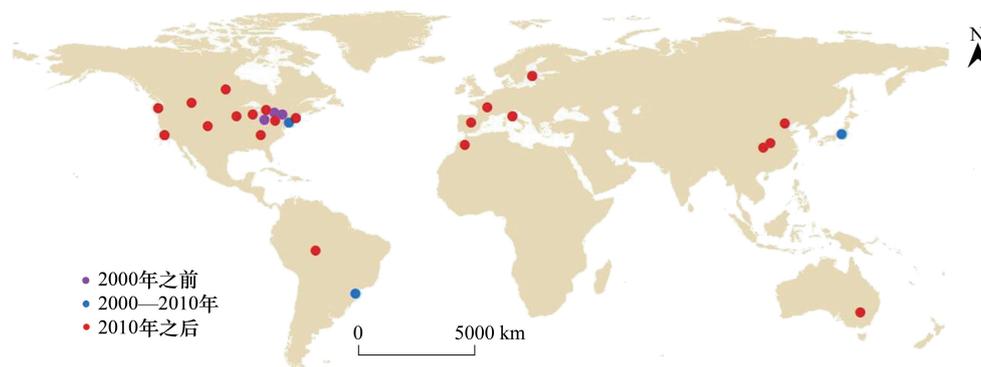


图 1 eDNA 技术在沼蛤、斑马贻贝入侵监测中的应用现状

Fig.1 The application of eDNA technology in monitoring of golden mussel and zebra mussel invasion

eDNA 技术应用于沼蛤和斑马贻贝入侵监测的已有研究中^[19-52],研究区域分布广泛,环境显著差异,加之关注的重点不同,研究方法和操作流程不尽相同,导致不同学者的研究结果存在差异甚至完全不同。为了提升 eDNA 技术在贻贝入侵监测中的稳定性和可靠性,本文依据 eDNA 发展历程中的关键技术突破节点(表 1),系统梳理了 eDNA 技术应用中的主要技术细节、成果特色、发展趋势等,建立了基于 eDNA 监测技术的主

要质量评价指标,包括精确性、准确性、特异性以及灵敏度(表 2)等,对各类 eDNA 技术进行比较和评估(图 2)。从评估结果看,样品的采集,eDNA 提取、扩增以及测序分析等操作流程的不同会直接影响监测结果的质量。不断发展革新的聚合酶链式反应方法一直是 eDNA 技术在入侵贻贝监测应用中关注的焦点。目前来看,基于 eDNA 技术的沼蛤、斑马贻贝的入侵监测仍以定性判别为主,半定量的聚合酶链式反应技术快速发展并占主导地位,在精确性、准确性、特异性以及灵敏度等各个方面都表现良好且稳健,而能够完全实现定量并可用于原位监测的数字微滴聚合酶链式反应是未来极具潜力的发展方向。

表 1 eDNA 发展历程中的关键技术

Table 1 Key Technologies in the Development of eDNA

技术 Technologies	简介 Introduction
双脱氧链终止法 Sanger sequencing	读取 聚合酶链式反应扩增产物中的核苷酸序列的方法。序列的方法。
聚合酶链式反应 Polymerase chain reaction	简称 PCR,是在模板 DNA、引物和 4 种 dNTP 等的情况下,依赖 DNA 聚合酶的酶促合成反应对 DNA 进行扩增。其中引物是具有特定核苷酸序列的大分子,是核苷酸聚合反应的起点,与模板 DNA 互补形成新的核苷酸链。
定性聚合酶链式反应 Conventional polymerase chain reaction	简称 cPCR,利用端点检测,扩增产物通常要经过桑格测序检测,以确认 DNA 序列与预期目标相匹配。
实时荧光定量聚合酶链式反应 Real-time quantitative polymerase chain reaction	简称 qPCR,在 PCR 反应体系中加入荧光基团,利用荧光信号积累实时监测整个 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法。
环介导等温扩增反应 Loop-mediated isothermal amplification	简称 LAMP,在恒定温度下进行的,不需要热循环仪的 DNA 扩增技术。
单分子荧光测序 Single Molecule Real Time	简称 SMRT,边合成边测序,无需对样品进行 PCR 扩增。
纳米孔测序 Nanopore	对单个 DNA 或 RNA 分子进行测序,无需对样品进行 PCR 扩增或化学标记。
数字微滴聚合酶链式反应 Droplet polymerase chain reaction	简称 ddPCR,基于水油乳液液滴技术进行数字 PCR 的方法。一个样品被分成多个液滴,模板分子的 PCR 扩增发生在每个单独的液滴中。
DNA 宏条形码 DNA metabarcoding	利用环境样本中分离的 DNA 进行多个物种(或高级分类单元)鉴定的方法。是 HTS 允许对大量的 DNA 片段进行平行测序)和条形码(短的可变基因,常用于分类标记)技术的结合。

dNTP: 脱氧核糖核苷三磷酸 deoxy-ribonucleoside triphosphate; HTS: 高通量测序技术 High-throughput sequencing

表 2 eDNA 监测技术的质量评价指标

Table 2 Quality evaluation index of eDNA monitoring technology

评价指标 Evaluation index	指标定义 Index definition
精确性 Precision	检测结果对目标组织的描述程度:分为定性(cPCR)——一级;相对定量(qPCR、LAMP、宏条形码)——二级;绝对定量(ddPCR)——三级;多种分析手段的对比以级别较高的分析手段为评价标准,简单测序为零级。
准确性 Accuracy	检测过程的质量控制程度:只记录采集方案(标本采集的时机、方式、保存、运送的过程)为一级,只记录分析过程(仪器的保养、操作的规范性等)为二级;采集方案和分析过程都记录为三级;均不交代为零级。
特异度 Specificity	实际阴性判别为阴性的能力;计算机软件、室内实验、原位测试三种特异性优化手段使用一种为一级;同时使用其中两种为二级;三种优化方式都有为三级;三种都无为零级。
灵敏度 Sensitivity	eDNA 技术的检测浓度限值:交待检测限(分析方法在规定实验条件下所能检出被测组分的最低浓度)为一级;交待定量限(样品中能够以规定的精度定量测定的最低分析值)为二级;检测限和定量限均有为三级;均无为零级。

基于上述比较和评估,eDNA 技术在贻贝类入侵监测应用中的改进应从技术应用的关键环节和主要方法突破,具体梳理和说明如下文所述。

2 eDNA 技术应用中的关键环节及主要方法

eDNA 技术的操作流程中的关键环节包括样品的采集、eDNA 提取、eDNA 扩增以及 eDNA 测序分析等(图 3)。其中,水样采集方法主要分为直接采集法和过滤法。直接采集法是指水样采集后不进行过滤,将水样直接进行保存来完成 eDNA 的采集。过滤法是指对水样进行过滤,将 eDNA 截留在滤膜上,保存滤膜从而

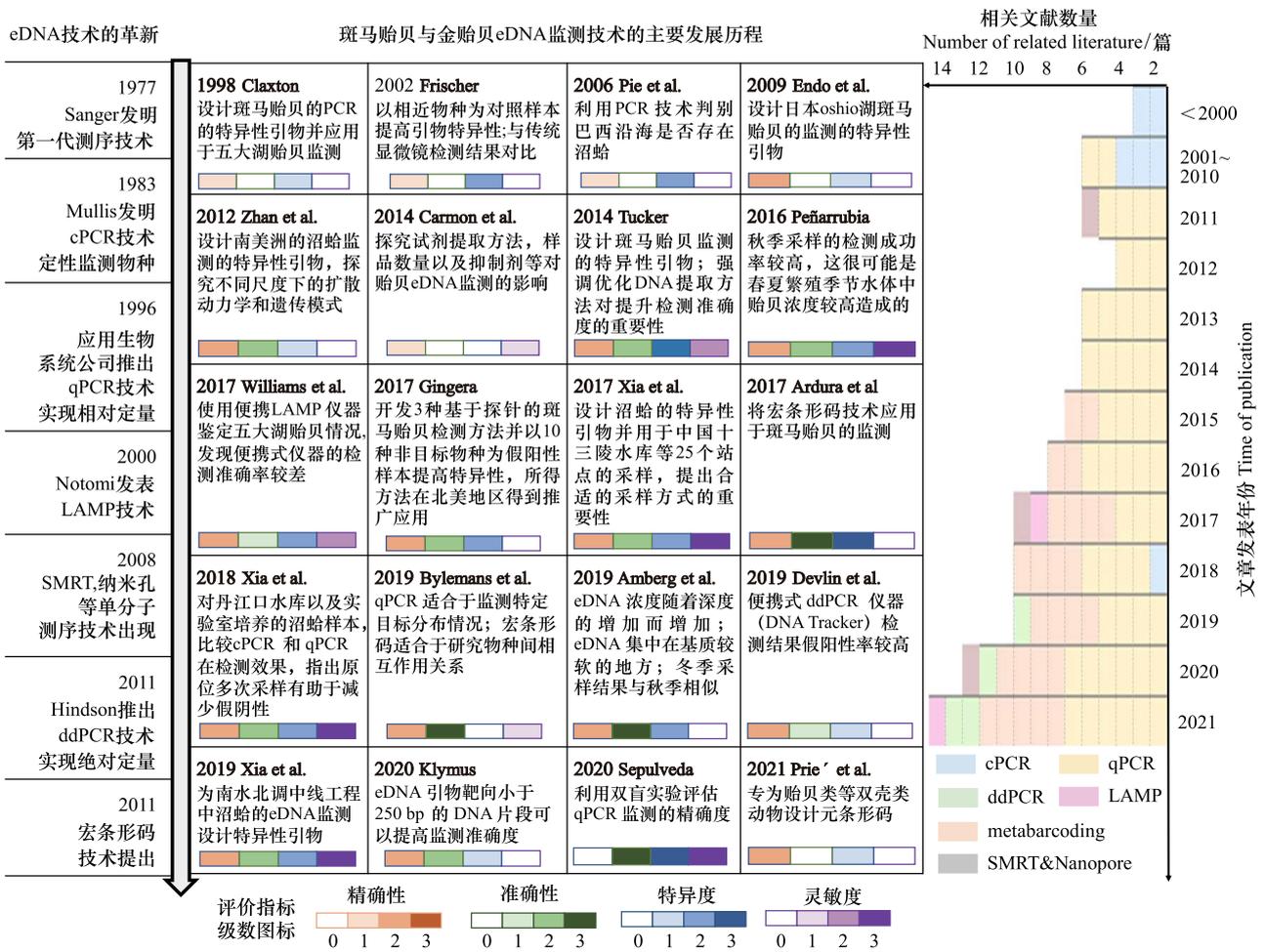


图2 eDNA技术在沼蛤、斑马贻贝入侵监测中的应用与发展

Fig.2 Application and development of eDNA technology in monitoring of golden mussel and zebra mussel invasion

cPCR: 定性聚合酶链式反应; qPCR: 实时荧光定量聚合酶链式反应; ddPCR: 数字微滴聚合酶链式反应; LAMP: 环介导等温扩增反应; Metabarcoding: 宏条形码; SMRT & Nanopore: 单分子荧光测序 Single Molecule Real Time & 纳米孔测序

实现对 eDNA 的采集,在不同的使用条件下两种方法中过滤法的 eDNA 捕获率有所差异^[47]。eDNA 提取常采用试剂盒与传统提取方式相结合的方式,常用的试剂盒类型有离心柱法和磁珠法,常见的传统提取方式有浓盐法、酚抽提法、阴离子去污剂法等。实验发现不同提取试剂盒和传统提取方式的搭配表现出的 eDNA 提取效率不同^[48]。在入侵物种早期监测、珍稀物种调查中,监测对象在环境中的 eDNA 含量一般极低,需要进行扩增。不同扩增方法需要的反应条件以及扩增效率不同,需要根据实际监测需求选择。常用的扩增技术是聚合酶链式反应(PCR),其他的核酸扩增技术,如环介导等温扩增反应(LAMP),以及重组酶聚合酶扩增(RPA)等免 PCR 的扩增技术也在不断发展^[49]。

eDNA 分析方法包括定性聚合酶链式反应(cPCR)、实时荧光定量聚合酶链式反应(qPCR)、数字微滴聚合酶链式反应(ddPCR)以及 DNA 宏条形码方法等,不同分析方法对结果的精确程度影响较大。cPCR 是最古老和最简单的 PCR 方法,它利用端点检测,可判断目标物种是否存在,但不能定量。qPCR 是根据荧光化学现象,监测整个反应过程,得到 DNA 扩增曲线,能够提供相对密度或生物量。ddPCR 是在 PCR 扩增前微滴化处理 eDNA 样品,即将含有核酸分子的反应体系分成数以万计的 nL 级微滴,其中每个微滴或不待检核酸靶分子,或含有一个至数个待检核酸靶分子。所需模板量少,检测灵敏度非常高,能够精确测定基因拷贝数,可对痕量突变定性和定量。对目标种特异性 PCR 扩增以检测存在情况是入侵贻贝的重要监测方式之一。Ardura^[28]等就贻贝设计开发特异性引物并在野外原位采样中评估了该方法的可行性,发现即使在种群规模较

小的情况下,也能监测到贻贝。PCR 技术为探查入侵物种的存在提供了一种快速反应方法。此外,为进一步明确入侵生物的入侵机理,研究者们将 PCR 技术用于分析入侵贻贝分布情况与遗传多样性,Peñarrubia^[51] 等利用 PCR 技术研究斑马贻贝种群遗传规律以分析贻贝的定殖路线,为贻贝入侵的机理解释提供证据。

随着测序技术的发展,eDNA 条形码与高通量测序技术(HTS)结合发展为 eDNA 宏条形码技术。HTS 可同时对众多目标进行测序,从而快速识别环境样本中存在的物种 DNA,常用于生物多样性调查。针对靶标物种设计引物是利用宏条形码技术监测入侵贻贝的重要方式,Prié^[41] 等为淡水贻贝设计两套特异性引物并进行实地测试。此外,设计通用引物对 eDNA 扩增并利用 HTS 技术以对非靶标生物监测,可以分析目标生境的生物多样性以及群落结构^[50]。

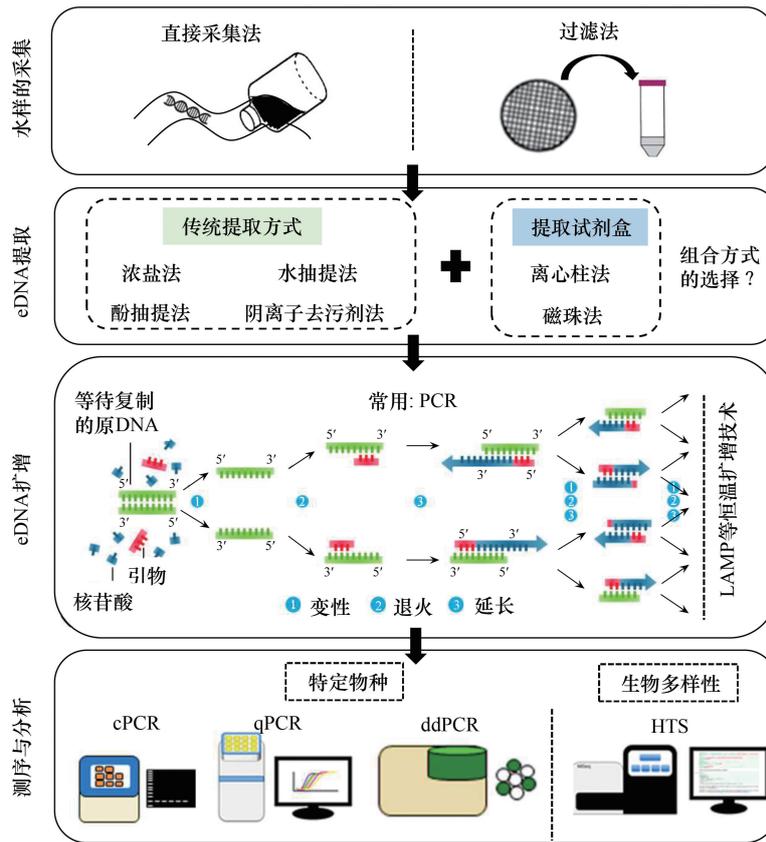


图 3 eDNA 技术操作流程图

Fig.3 Flow chart of eDNA technology operation

HTS: 高通量测序技术; PCR: 聚合酶链式反应; cPCR: 定性聚合酶链式反应; qPCR: 实时荧光定量聚合酶链式反应; ddPCR: 数字微滴聚合酶链式反应; LAMP: 环介导等温扩增反应; Metabarcoding: 宏条形码; SMRT & Nanopore: 单分子荧光测序 Single Molecule Real Time & 纳米孔测序

综合考虑 eDNA 技术的原理及操作流程差异,下文进一步梳理了 eDNA 技术应用于沼蛤、斑马贻贝等入侵物种的监测中的挑战和未来优化及改进的方向。

3 eDNA 技术在贻贝入侵监测中的挑战与发展

如图 4 所示,eDNA 技术在贻贝入侵监测中的挑战和未来优化方向,主要从样品采集、实验操作、数据分析过程,以及贻贝类物种的生活史特征等方面进行分析和说明。

3.1 样品采集与方案设计

基于特定的监测管理目标设计沼蛤和斑马贻贝 eDNA 样品采集方案时需要考虑的主要因素包括采样时间、位置、水深以及水样量等。样点选择时可综合考虑前期研究中报道的 eDNA 的时空分布特点。例如,

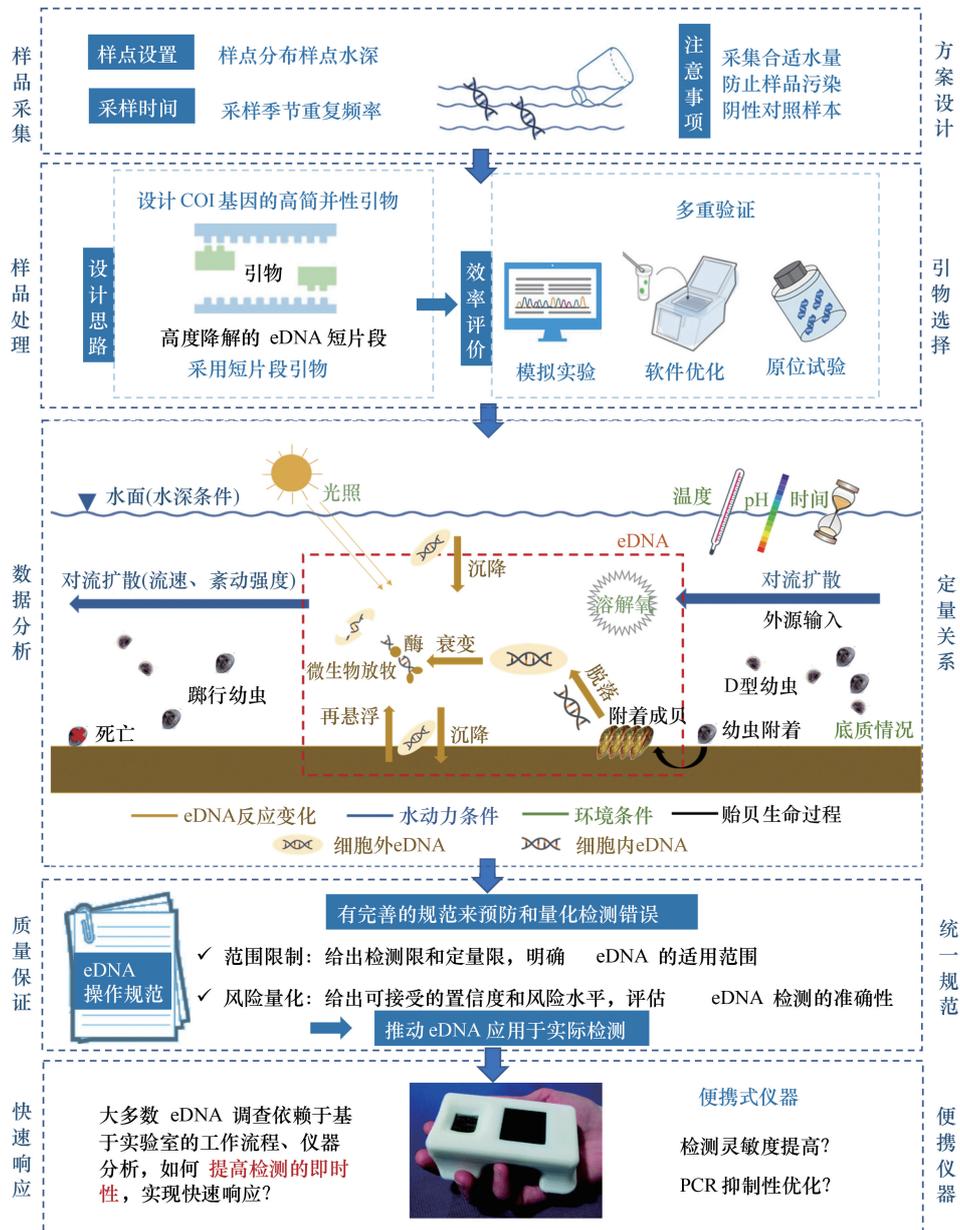


图 4 eDNA 技术在贻贝入侵监测中的挑战及改进方向

Fig.4 Challenges and potential improvement of eDNA technology application in monitoring of golden mussel and zebra mussel invasion

COI: 细胞色素 c 氧化酶亚基 I

Peñarrubia 等的研究经验^[51,53]表明水体中贻贝的 eDNA 浓度在产卵季节后较高,随着深度的增加而增加,且 eDNA 更容易集中在基质相对较软的地方。采集水样量也是影响物种检测准确度和检出率的重要因素。根据研究目标不同,每个重复水样的推荐采集量 15 mL 至 10 L 不等。一般来说采集量大时样品代表性较好,但同时采样难度和后续工作量也显著增加。当采样地点贻贝密度较低,或调查对象为江河、湖泊等大型水体时,应适当增加采样重复数以及单次水样采集量,水样量过少或缺乏重复样本都可能会导致物种检出率低甚至数据无效。检测的成功率还取决于物种的生活习性、物种丰度、密度等,因此,在同一水体中采样应设置多个水量梯度、多次和多位点采集。在样品采集过程中应避免采样工具、样品本身及样品间的污染,具体包括采样器皿在采样之前应进行消毒,采样人员要带好手套并及时更换,每次采样都要有一份等量纯净水作为阴性对照。

3.2 样品处理与引物选择

目前已报道多种引物可用于沼蛤和斑马贻贝的 eDNA 监测调查,但每种引物在不同环境下表现的效率水平各不相同^[51-53]。根据不同的监测环境和监测目标选择或者设计合适的引物-探针是得到高质量 eDNA 监测结果的关键。自从 Pie 等^[25]设计扩增沼蛤的线粒体细胞色素氧化酶 I(COI)基因引物以来,COI 类引物已经成为贻贝类 eDNA 监测引物设计中的常用选择,且已有研究整理了相关的引物集供查用^[49]。引物设计的另一种思路是选择短片段引物。短片段引物包含信息少,扩增的效率更高。Klymus 等指出当样品 DNA 降解程度较高时,eDNA 引物应靶向小于 250 bp 的 DNA 片段^[50],这样能够提升 eDNA 样本的检测准确性。引物设计后更关键的是对其特异性以及扩增效率的评价,即沼蛤或斑马贻贝的某一引物-探针组合大规模应用之前应经过计算机软件(如 NCBI-BLAST)、室内实验以及目标区域原位检测等多重验证,优化引物的特异性,并给出检测限和定量限,以明确引物的灵敏度情况。Pawlowski 等梳理了 qPCR 监测中引物设计和评价的规范流程^[22],按其推荐的步骤进行贻贝引物的设计和评价能够有效地降低错误率。

3.3 数据分析与定量关系

尽管技术方法的改进,如 ddPCR 的推广使用能提高 eDNA 的定量准确性,但目前仍然无法改变 eDNA 浓度与贻贝种群规模或密度之间相关关系不稳定的事实。如图 4 所示,不同时空条件下的 eDNA 浓度变化的规律受水动力条件(流速、紊流强度)、环境因子(光照、温度、pH 值等)以及 eDNA 自身的脱落、衰减、运输特性的影响。相关研究^[54]表明环境条件影响分子的释放、衰变和降解过程以及未能明确各类环境条件对监测情况的影响,是阻碍 eDNA 进一步用于实地调查的关键难点。笔者利用 eDNA 技术与传统的生态采样监测南水北调中线总干渠沼蛤的分布情况(图 5),可以看出,两种方法均定性准确,都能有效识别不同断面沼蛤的存在情况,但定量差异显著,不同断面间并不存在稳定的相关关系。

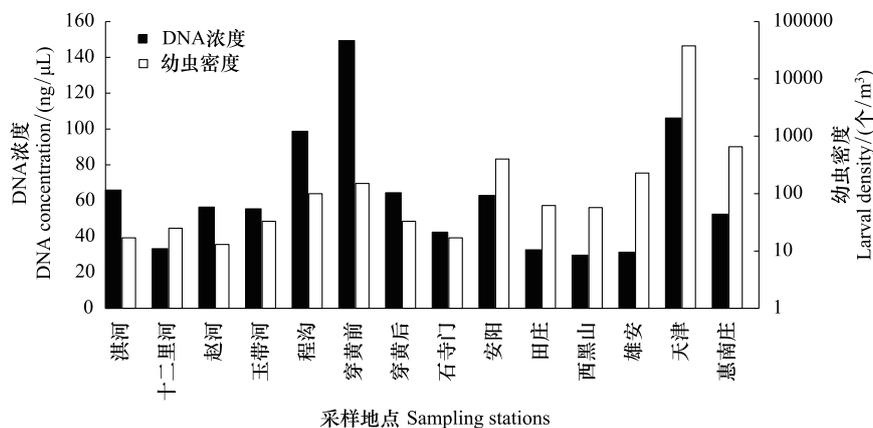


图 5 南水北调中线总干渠 eDNA 技术及传统采样监测沼蛤结果比较(2017 年 8 月)

Fig.5 Comparison of golden mussel monitoring results applying eDNA technology and traditional sampling for the middle route of South-to-North Water Diversion Project (August, 2017)

3.4 质量保证及统一规范

假阳性现象和假阴性现象^[55]导致结果的不准确,甚至为决策管理提供误导信息也是阻止 eDNA 技术推广应用的障碍之一。通常情况下,引起入侵物种 eDNA 监测的假阴性和假阳性问题的主要原因已整理列表 1 中^[55-58]。例如,导致假阳性的原因常包括样点 eDNA 的来源复杂或偶然、无害死亡个体产生、样品污染、测量手法的特异性不足等,而导致假阴性的原因则包括样品采集、保存、处理不当或测量手法的灵敏度低等。针对各种假阳性、假阴性的相应的改进优化手段包括制定合适的采样策略、改进分析方法、规范采样和实验手段、深入分析基因序列特征、测验与优化特异性等(表 1)。为保证监测的质量,需建立规范的采样流程、实验室分析方法以及统一的质量评价指标和标准。监测结果的分析报告中应明确 eDNA 分析结果的假阴性率以及假阳性率^[59],帮助管理人员认识监测可靠度水平并进行合理决策。

表 3 eDNA 监测的假阴性和假阳性问题的常见原因与优化手段

Table 3 Causes and optimization methods of false negative and false positive problems in eDNA monitoring

	问题原因 Reasons	优化手段 Improvement measures
假阳性 False positive	采样点贻贝 eDNA 的复杂来源,如流动系统中 eDNA 随水流或风等发生运动和扩散等	制定合适的采样策略,如考虑同一采样点多次重复采样降低;改进分析方法,如研究 eDNA 在特定环境中的脱落、运动以及衰减规律分辨 eDNA 来源
	无害或死亡个体产生的 eDNA	确定贻贝基因组序列在不同生命阶段的排列表达规律
	样品污染,如样品收集处理过程中操作不当	规范采样和实验手段,如所有阶段均设置空白样本以检测污染物
假阴性 False negative	测量手段的特异性不足,如识别目标模板的 DNA 探针可能与非目标序列发生反应	对调查环境中的与目标物种近亲缘关系的非目标种进行特异性测验与优化
	样品采集、保存、处理不当	所有阶段均设阳性对照,以确保检测正常
	测量手段的灵敏度低	明确检测方案的检测限,评估非目标种对灵敏度的影响

3.5 快速响应与便携仪器

沼蛤和斑马贻贝监测的主要目标是早期发现和快速响应。目前,大多数基于 eDNA 技术的调查依赖实验室的工作流程、仪器和分析,不利于快速监测的实施。采用现场便携式设备可以缩短获得结果的时间,是未来的发展方向。然而,市面上流通的便携式即时检测仪器都存在不同程度的不足。如背包式过滤系统(eDNA-Sampler)捷迈邦美的手持式 qPCR 装置相结合,可在大约 1 小时内得到检测结果,但该原位监测方式存在 PCR 抑制率较高、假阴性率高的问题。现场样品中过高的悬浮颗粒浓度可能是导致上述问题的主要原因,合理选择采样位点或通过降低样品中的悬浮颗粒浓度是可能的优化途径^[60]。在受 PCR 抑制因子影响较小的 ddPCR^[61] 和 LAMP^[62] 便携式仪器的使用过程中,存在假阳性或 eDNA 浓度低时表现不佳的问题。根据上述各类便携式仪器的使用情况,建议在预期的取样环境中选择合适的仪器进行试点研究来评估其可行性,以确定 PCR 抑制导致的假阴性或者低灵敏度导致的假阳性是否是关键问题。在敏感性和抑制性问题得到解决之前,各类便携式仪器尚不可靠,需要结合 eDNA 实验室标准方法补充验证。

4 讨论及结论

综上,eDNA 技术在沼蛤、斑马等贻贝的入侵监测中仍以定性判别为主,因为 eDNA 浓度与贻贝种群规模或密度之间关系复杂,实际定量入侵物种规模的效果欠佳。考虑到沼蛤、斑马贻贝入侵造成的负面影响,以及它们相对容易传播的特性,建议积极开展生态调查和实验,明晰 eDNA 浓度与贻贝种群规模或密度之间的定量关系,推广开展 eDNA 技术规范应用,逐步完善 eDNA 技术在贻贝入侵监测中的可靠性、灵敏度和准确性。如图 6,进一步针对性的改进可从如下方面突破:(1)水动力条件-环境因素-eDNA 输移规律与 eDNA 浓

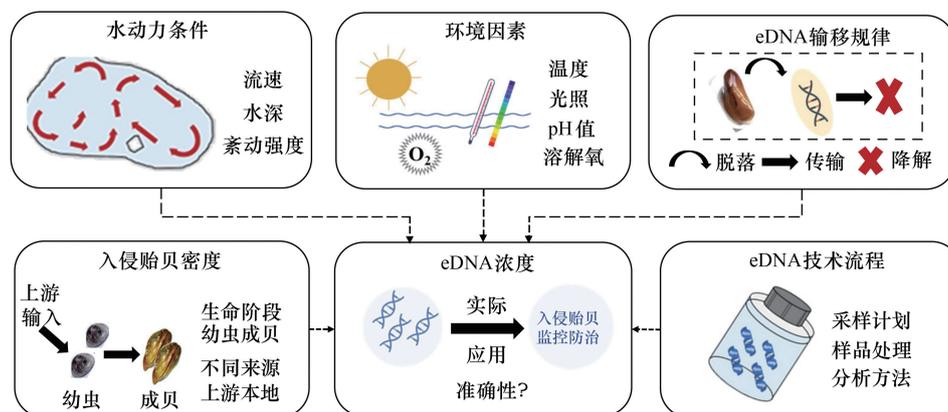


图 6 eDNA 技术应用于沼蛤、斑马贻贝入侵监测的改进与发展方向

Fig.6 Key issues and improvement of eDNA application in the monitoring and development of golden mussel and zebra mussel

度之间的耦合关系的刻画与耦合。在利用水动力模型刻画流场的基础上,筛选关键的环境因素作为模型自变量,选择合适的 eDNA 脱落、传输、降解关系构建综合因素影响下的 eDNA 浓度模型用于实测浓度的修正分析,提高监测的精确度;(2) eDNA 技术投入现场监测之前,利用传统调查手段得到的入侵贻贝密度作为校核和验证,提高监测的准确性;(3) 需要规范化的操作准则来落实 eDNA 监测技术的实际应用,指导制定合理的采样计划,开展样品收集处理工作并能够根据不同实际条件选择合适的分析手段。

总之,随着 eDNA 技术的逐渐发展完善,未来可望在生物入侵早期监测预警及入侵物种管理过程中提供高效可靠的高分辨率数据,为贻贝入侵的有效防控和生态系统监测与保护提供有力支撑。

参考文献 (References):

- [1] Darrigran G, Bonel N, Colautti D, Cazzaniga N J. An alternative method to assess individual growth of the golden mussel (*Limnoperna fortunei*) in the wild. *Journal of Freshwater Ecology*, 2011, 26(4): 527-535.
- [2] Darrigran A, Darrigran G, Damborenea C. Ecosystem engineering impact of *limnoperna fortunei* in South America. *Zoological Science*, 2011, 28(1): 1-7.
- [3] Johnson L E, Carlton J T. Post-establishment spread in large-scale invasions: dispersal mechanisms of the zebra mussel *Dreissena Polymorpha*. *Ecology*, 1996, 77(6): 1686-1690.
- [4] Karatayev A Y, Burlakova L E, Padilla D K. Growth rate and longevity of *Dreissena polymorpha* (Pallas): a review and recommendations for future study. *Journal of Shellfish Research*, 2006, 25(1): 23-32.
- [5] Karatayev A Y, Burlakova L E, Padilla D K. Zebra versus quagga mussels: a review of their spread, population dynamics, and ecosystem impacts. *Hydrobiologia*, 2015, 746(1): 97-112.
- [6] Boltovskoy D. *Limnoperna Fortunei: the Ecology, Distribution and Control of a Swiftly Spreading Invasive Fouling Mussel*. Cham: Springer, 2015.
- [7] Ricciardi A. Global range expansion of the Asian mussel *Limnoperna fortunei* (Mytilidae): another fouling threat to freshwater systems. *Biofouling*, 1998, 13(2): 97-106.
- [8] Zhao N, Xu M Z, Blanckaert K, Qiao C H, Zhou H M, Niu X L. Study of factors influencing the invasion of Golden Mussels (*Limnoperna fortunei*) in water transfer projects. *Aquatic Ecosystem Health & Management*, 2020, 22(4): 385-395.
- [9] Xu M Z, Wang Z Y, Lin C C, Pan B Z, Zhao N. Experimental study of invasion and biofouling of freshwater mussel *Limnoperna fortunei*. *International Journal of Geosciences*, 2013, 4(5B): 1-7.
- [10] Karatayev A Y, Padilla D K, Minchin D, Boltovskoy D, Burlakova L E. Changes in global economies and trade: the potential spread of exotic freshwater bivalves. *Biological Invasions*, 2007, 9(2): 161-180.
- [11] Ricciardi A. Predicting the impacts of an introduced species from its invasion history: an empirical approach applied to zebra mussel invasions. *Freshwater Biology*, 2003, 48(6): 972-981.
- [12] Nakano D, Kobayashi T, Sakaguchi I. Predation and depth effects on abundance and size distribution of an invasive bivalve, the golden mussel *Limnoperna fortunei*, in a dam reservoir. *Limnology*, 2010, 11(3): 259-266.
- [13] McCartney M A, Mallez S. The role of waterway connections and downstream drift of veliger larvae in the expanding invasion of inland lakes by zebra mussels in Minnesota, USA. *Aquatic Invasions*, 2018, 13(3): 393-408.
- [14] Petsch D K, dos Santos Ribas L G, Mantovano T, Pulzatto M M, Alves A T, Pinha G D, Thomaz S M. Invasive potential of golden and zebra mussels in present and future climatic scenarios in the new world. *Hydrobiologia*, 2021, 848(9): 2319-2330.
- [15] Depew D C, Krutzmann E, Watchorn K E, Caskenette A, Enders E C. The distribution, density, and biomass of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) on natural substrates in Lake Winnipeg 2017-2019. *Journal of Great Lakes Research*, 2021, 47(3): 556-566.
- [16] Xia Z Q, Barker J R, Zhan A B, Haffner G D, Macisaac H J. Golden mussel (*Limnoperna fortunei*) survival during winter at the northern invasion front implies a potential high-latitude distribution. *Diversity and Distributions*, 2021, 27(8): 1422-1434.
- [17] Stoeckel J A, Schneider D W, Soeken L A, Blodgett K D, Sparks R E. Larval dynamics of a riverine metapopulation: implications for zebra mussel recruitment, dispersal, and control in a large-river system. *Journal of the North American Benthological Society*, 1997, 16(3): 586-601.
- [18] Xu M Z, Wang Z Y, Zhao N, Pan B Z. Growth, reproduction, and attachment of the golden mussel (*Limnoperna fortunei*) in water diversion projects. *Acta Ecologica Sinica*, 2015, 35(4): 70-75.
- [19] Ficetola G F, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P. Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 2008, 4(4): 423-425.
- [20] 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.
- [21] Thomsen P F, Willerslev E. Environmental DNA-An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 2015, 183: 4-18.
- [22] Pawlowski J, Apothéloz-Perret-Gentil L, Altermatt F. Environmental DNA: what's behind the term? Clarifying the terminology and recommendations for its future use in biomonitoring. *Molecular Ecology*, 2020, 29(22): 4258-4264.
- [23] Hinlo R, Furlan E, Sutor L, Gleeson D. Environmental DNA monitoring and management of invasive fish: comparison of eDNA and fyke netting. *Management of Biological Invasions*, 2017, 8(1): 89-100.
- [24] Claxton W T, Boulding E G. A new molecular technique for identifying field collections of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) and quagga mussel (*Dreissena bugensis*) veliger larvae applied to eastern Lake Erie, Lake Ontario, and Lake Simcoe. *Canadian Journal of Zoology*, 1998, 76(1): 194-198.
- [25] Pie M R, Boeger W A, Patella L, Falleiros R M. A fast and accurate molecular method for the detection of larvae of the golden mussel *Limnoperna fortunei* (Mollusca: Mytilidae) in plankton samples. *Journal of Molluscan Studies*, 2006, 72(2): 218-219.
- [26] Endo N, Sato K, Nogata Y. Molecular based method for the detection and quantification of larvae of the golden mussel *Limnoperna fortunei* using real-time PCR. *Plankton and Benthos Research*, 2009, 4(3): 125-128.
- [27] Amberg J J, Merkes C M, Stott W, Rees C B, Erickson R A. Environmental DNA as a tool to help inform zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, management in inland lakes. *Management of Biological Invasions*, 2019, 10(1): 96-110.
- [28] Ardura A, Zaiko A, Borrell Y J, Samuiloviene A, Garcia-Vazquez E. Novel tools for early detection of a global aquatic invasive, the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 2017, 27(1): 165-176.
- [29] Sepulveda A J, Amberg J J, Hanson E. Using environmental DNA to extend the window of early detection for dreissenid mussels. *Management of Biological Invasions*, 2019, 10(2): 342-358.
- [30] Sepulveda A J, Hutchins P R, Jackson C, Ostberg C, Laramie M B, Amberg J, Counihan T, Hoegh A, Pilliod D S. A round-robin evaluation of the repeatability and reproducibility of environmental DNA assays for dreissenid mussels. *Environmental DNA*, 2020, 2(4): 446-459.
- [31] Williams M R, Stedtfeld R D, Engle C, Salach P, Fakhri U, Stedtfeld T, Dreelin E, Stevenson R J, Latimore J, Hashsham S A. Isothermal amplification of environmental DNA (eDNA) for direct field-based monitoring and laboratory confirmation of *Dreissena* sp. *PLoS One*, 2017, 12(10): e0186462.
- [32] Xia Z Q, Zhan A B, Gao Y C, Zhang L, Haffner G D, MacIsaac H J. Early detection of a highly invasive bivalve based on environmental DNA (eDNA). *Biological Invasions*, 2018, 20(2): 437-447.
- [33] Zhan A B, Perepelizin P V, Ghabooli S, Paolucci E, Sylvester F, Sardiña P, Cristescu M E, MacIsaac H J. Scale-dependent post-establishment spread and genetic diversity in an invading mollusc in South America. *Diversity and Distributions*, 2012, 18(10): 1042-1055.
- [34] Hassett W, Bollens S M, Counihan T D, Rollwagen-Bollens G, Zimmerman J, Katz S, Emerson J. Veligers of the invasive Asian clam *Corbicula fluminea* in the Columbia River Basin: Broad-scale distribution, abundance, and ecological associations. *Lake Reserv. Manag*, 2017, 33(3): 234-248.
- [35] Bylemans J, Gleeson D M, Duncan R P, Hardy C M, Furlan E M. A performance evaluation of targeted eDNA and eDNA metabarcoding analyses for freshwater fishes. *Environmental DNA*, 2019, 1(4): 402-414.
- [36] Hosler, D.M. Where is the body? Dreissenid mussels, raw water testing, and the real value of environmental DNA. *Manag. Biol. Invasions*, 2017, 8(3): 335-341.
- [37] Gingera T D, Bajno R, Docker M F, Reist J D. Environmental DNA as a detection tool for zebra mussels *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) at the forefront of an invasion event in Lake Winnipeg, Manitoba, Canada. *Management of Biological Invasions*, 2017, 8(3): 287-300.
- [38] Klymus K E, Merkes C M, Allison M J, Goldberg C S, Helbing C C, Hunter M E, Jackson C A, Lance R F, Mangan A M, Monroe E M, Piaggio A J, Stokdyk J P, Wilson C C, Richter C A. Reporting the limits of detection and quantification for environmental DNA assays. *Environmental DNA*, 2020, 2(3): 271-282.
- [39] Lozano L P. Genetic Characterization of the Iberian Populations of Two Invasive Mollusks: Zebra Mussel and Asiatic Clam[D]. Girona: Universitat de Girona, 2016.
- [40] Pie M R, Ströher P R, Agostinis A O, Lopes R B, Tadra-Sfeir M Z, Ostrensky A. Development of a real-time PCR assay for the detection of the golden mussel (*Limnoperna fortunei*, mytilidae) in environmental samples. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 2017, 89(2): 1041-1045.
- [41] Prié V, Valentini A, Lopes-Lima M, Froufe E, Rocle M, Poulet N, Taberlet P, Dejean T. Environmental DNA metabarcoding for freshwater bivalves biodiversity assessment: methods and results for the Western Palearctic (European sub-region). *Hydrobiologia*, 2021, 848(12): 2931-2950.
- [42] Sanger F, Nicklen S, Coulson A R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the*

- United States of America, 1977, 74(12): 5463-5467.
- [43] Higuchi R, Dollinger G, Sean Walsh P, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Bio/Technology*, 1992, 10(4): 413-417.
- [44] Frischer M E, Hansen A S, Wyllie J A, Wimbush J, Murray J, Nierzwicki-Bauer S A. Specific amplification of the 18S rRNA gene as a method to detect zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) larvae in plankton samples. *Hydrobiologia*, 2002, 487(1): 33-44.
- [45] Tucker C. Development of a New Quantitative PCR Methodology to Detect Exotic Mollusk Invasions in Freshwater[D]. Pueblo: Colorado State University, 2015.
- [46] Xia Z Q, Johansson M L, Gao Y C, Zhang L, Haffner G D, MacIsaac H J, Zhan A B. Conventional versus real-time quantitative PCR for rare species detection. *Ecology and Evolution*, 2018, 8(23): 11799-11807.
- [47] Liang Z B, Keeley A. Filtration recovery of extracellular DNA from environmental water samples. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(16): 9324-9331.
- [48] 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.
- [49] Feist S M, Lance R F. Advanced molecular-based surveillance of quagga and zebra mussels: a review of environmental DNA/RNA (eDNA/eRNA) studies and considerations for future directions. *NeoBiota*, 2021, 66: 117-159.
- [50] Ardura A, Borrell Y J, Fernández S, Arenales M G, Martínez J L, Garcia-Vazquez E. Nuisance algae in ballast water facing international conventions. Insights from DNA metabarcoding in ships arriving in Bay of Biscay. *Water*, 2020, 12(8): 2168.
- [51] Elbrecht V, Steinke D. Scaling up DNA metabarcoding for freshwater macrozoobenthos monitoring. *Freshwater Biology*, 2019, 64(2): 380-387.
- [52] Ito K, Shibaike H. Use of environmental dna to survey the distribution of the invasive mussel *Limnoperna fortunei* in farm ponds. *Plankton and Benthos Research*, 2021, 16(2): 100-108.
- [53] Klymus, Katy E., Dannise V. Ruiz Ramos, Nathan L. Thompson, and Catherine A. Richter. 'Development and Testing of Species-Specific Quantitative PCR Assays for Environmental DNA Applications'. *Journal of Visualized Experiments*, 2020, 165:1-25
- [54] Shogren A J, Tank J L, Egan S P, Bolster D, Riis T. Riverine distribution of mussel environmental DNA reflects a balance among density, transport, and removal processes. *Freshwater Biology*, 2019, 64(8): 1467-1479.
- [55] Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature*, 1989, 339(6221): 237-238.
- [56] Jerde C L. Can we manage fisheries with the inherent uncertainty from eDNA? *Journal of Fish Biology*, 2021, 98(2): 341-353.
- [57] Bustin S A, Benes V, Garson J A, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl M W, Shipley G L, Vandesompele J, Wittwer C T. The MIQE guidelines; *minimum* information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 2009, 55(4): 611-622.
- [58] Darling J A, Jerde C L, Sepulveda A J. What do you mean by false positive? *Environmental DNA*, 2021, 3(5): 879-883.
- [59] Goldberg C S, Turner C R, Deiner K, Klymus K E, Thomsen P F, Murphy M A, Spear S F, McKee A, Oyler-McCance S J, Cormman R S, Laramie M B, Mahon A R, Lance R F, Pilliod D S, Strickler K M, Waits L P, Fremier A K, Takahara T, Herder J E, Taberlet P. Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species. *Methods in Ecology and Evolution*, 2016, 7(11): 1299-1307.
- [60] Thomas A C, Howard J, Nguyen P L, Seimon T A, Goldberg C S. eDNA sampler: a fully integrated environmental DNA sampling system. *Methods in Ecology and Evolution*, 2018, 9(6): 1379-1385.
- [61] Hoshino T, Inagaki F. Molecular quantification of environmental DNA using microfluidics and digital PCR. *Systematic and Applied Microbiology*, 2012, 35(6): 390-395.
- [62] Koloren Z, Sotiriadou I, Karanis P. Investigations and comparative detection of *Cryptosporidium* species by microscopy, nested PCR and LAMP in water supplies of ordu, middle Black Sea, Turkey. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, 2011, 105(8): 607-615.