DOI:10.15928/j.1674-3075.202103040058

环境DNA技术及在鱼类监测中的应用

沈 梅,肖能文,卢 林,罗遵兰,史娜娜,孙 光

(中国环境科学研究院,北京 100012)

摘要:开展鱼类监测对鱼类多样性保护具有非常重要的意义。环境DNA(eDNA)技术使得鱼类调查更加省时省力、节约成本、无损伤,在鱼类监测中被广泛使用。文章从环境DNA技术及其优缺点、技术流程及方法、国内外研究现状以及该技术的未来展望4个方面进行了综述。eDNA技术存在着一定的缺陷,不能完全取代传统方法。eDNA技术包含了样品的采集及处理、eDNA提取、eDNA扩增、测序和生物信息学分析几个主要步骤,每个步骤又可采取不同的实验方案,进而影响eDNA的检测效率。eDNA技术主要应用于鱼类物种多样性监测、入侵物种检测、濒危物种检测和鱼类生物量的估算等方面。虽然国内eDNA的起步不晚,但相比国外研究方向较为单一,研究深度不高,需要进一步重视。

关键词:eDNA;鱼类多样性;鱼类监测

中图分类号:Q178.1 **文献标志码**:A **文章编号**:1674-3075(2022)02-0133-09

全球淡水鱼类物种丰富,有超过10 000种,约占全球鱼类的40%和全球脊椎动物的1/4(Dudgeon et al,2006;Lundberg et al,2000;Nelson et al,2016)。鱼类物种和遗传多样性是目前水生生态系统健康监测的一个关键指标(Zou et al,2020),具有重要的经济和生态价值(李栋,2015),但是由于水体污染、过度捕捞、物种入侵等各种因素导致鱼类资源急剧下降(Beverton,1991),因此有必要对鱼类展开调查。传统的鱼类调查一般是基于捕获(如网捕、笼捕、电捕)的方式,对研究的生物群落具有侵犯性,违背了生物多样性保护的初衷(Zhang et al,2020)。某些鱼类因个体小、数量少、善隐蔽等因素难以被捕获,有些处于不同生长发育阶段形态上差异较大而难以鉴定,使得鱼类资源调查极为困难(郝雅宾等,2018)。环境DNA技术能够避免上述问题且调查效率一般要高于传统方法(徐念等,2020),应用范围越来越广泛。

本文从环境DNA技术及其优缺点、技术流程及方法、国内外研究现状以及该技术的未来展望4个方面综述,为环境DNA技术在鱼类监测上的应用提供参考。

1 eDNA基础介绍及优缺点

环境DNA(Environment DNA,简称eDNA)是指可以从环境样品(如水、土壤、空气、冰芯等)中直接提取到的DNA片段的总和,是来自微生物、动物、植物等不同物种DNA的混合物,既包含生物体经由皮肤、尿液、粪便、粘液等释放到环境中的表皮细胞胞内DNA,也包括细胞死亡后裂解释放到环境中的胞外DNA(Rees et al,2014a;2014b)。而环境DNA技术则是从环境样本中捕获DNA,并对其进行保存、提取、扩增、测序和分类,进而确定取样环境中生物分布状况的方法(Deiner et al,2015)。该技术最初应用于土壤微生物学,2000年由Rondon等(2000)提出这一概念;2005年Martellini等(2005)从水样中提取DNA寻找地表水污染源,开启了该技术运用于水生生态系统的篇章;2008年Ficetola等(2008)利用eDNA技术追踪入侵物种美国牛蛙,使eDNA技术首次应用在水生生物的监测上,至此eDNA技术在水生生物领域的应用迅速发展。该技术检测水样可以来源于湖泊(Eichmiller et al,2014)、海洋(Aglieri et al,2020)、池塘(Takahara et al,2013)、人工水箱(Ficetola et al,2008)、河流(徐念等,2020)等;其监测的生物有两栖类(Rees et al,2014a)、爬行类(Hunter et al,2019)、哺乳动物(Harper et al,2019b)、鸟类(徐念等,2020)、鱼类(Tillotson et al,2018;Doi et al,2017a;Crookes et al,2020)等,其中鱼类是水生生物监测的主要对象,应用领域则涉及到生物多样性研究(Zou et al,2020; Aglieri et al,2020)、入侵物种监测(Miralles et al,2019)、濒危珍

收稿日期:2021-03-04

基金项目:科技部"典型脆弱生态修复与保护研究"重点研发项目(2016YFC0500206)。

作者简介:沈梅,1997年生,女,硕士,主要研究方向为生态学。E-mail:shenmei19@mails.ucas.ac.cn

通信作者:肖能文,男,研究员,主要研究方向为生物多样性保护。E-mail:xiaonw@ 163.com

稀物种监测(Thomsen et al，2012)、生物量估计(Tillotson et al，2018)等方面。

鱼类的传统调查方法有网捕法、电捕法、目视法以及结合走访调查等(刘焕章等，2016)，其结果的准确性往往依赖于调查者本身，具有一定的主观性。而环境DNA技术因为结合了生物分子技术，可以从基因的层次鉴别物种，在调查过程以及调查结果上都有很大的优势。两者比较见表1。

表1 鱼类传统调查方法与eDNA技术比较

Tab.1 Advantages and disadvantages of traditional methods and eDNA technology for fish resource survey

方法	优点	缺点
鱼类传统调查方法	能直接观察并记录到鱼类的形体与发育阶段。	会接触到鱼类，甚至会导致鱼类死亡，对生境也会造成一定的危害； 观察概率低； 需要有一定的鱼类分类学知识； 需要一些专门的设备。
eDNA技术	对鱼类以及生境的干扰极小； 即使在鱼类体积很小、密度较低也能够检测； 不需要掌握鱼类分类学知识； 省人力物力和时间，检测效率普遍较高。	无法观察到鱼类的形态以及发育价段，不直观； 采集的DNA可能是其他生物携带； 容易产生交叉污染； 需要一定的鱼类生物信息学知识。

eDNA技术监测鱼类虽然存在诸多优点，但也不是完美的，尤其要避免因为实验不当或者环境因素而出现假阴性或者假阳性的结果。假阴性是环境中存在该物种但是没有检测到，一般由于样本量过少使得检测效率低，可适当增加重复样本量。假阳性则是环境不存在该物种但是结果显示存在，样品之间的交叉污染或者经由媒介的传播导致本不存在的环境出现了目标DNA，对于污染产生的假阳性可通过试验装置的清洗和样品之间的隔离避免，环境因素产生的假阳性则可以通过在河流上游采样等方式尽可能地避免。

2 eDNA技术流程及方法

eDNA技术监测鱼类大体可分为实验过程和分析过程。实验过程有样品的采集与处理、eDNA的提取、eDNA扩增、eDNA测序，分析过程有生物信息学分析以及统计学分析。其技术路线见图1。

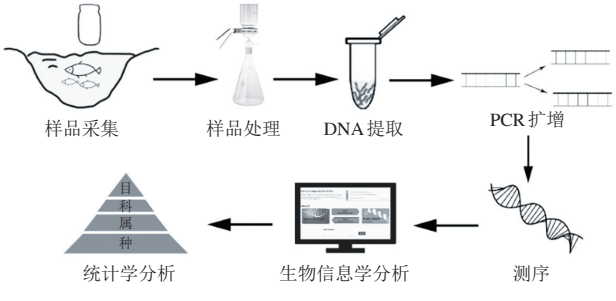


图1 eDNA技术监测鱼类流程

Fig. 1 Flow chart of the eDNA method of fish monitoring

2.1 样品的采集与处理

样品的采集取决于实验目的以及目标物种的丰度和体积，主要影响变量是采样时间、采样位置、采样水深、采样容量。采样时间最好集中而固定。研究表明，对于湖泊水库等的静水系统，岸边采样比水体内部采样捕获鱼种eDNA更多(Zhang et al，2019)。采样深度主要在水体表面，少数在水体中部或底部。采样容量有几十毫升(Ulibarri et al，2017)到几十升(Civade et al，2016)不等，但绝大部分都集中于1~2 L(Amberg et al，2015；Pfleger et al，2016)，且单个点位的重复采样可以增加物种的检出概率(Rees et al，2014b；Shaw et al，2016)。为了防止样品之间出现交叉污染，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。

样品的处理方式主要有沉淀法、离心法以及抽滤法。方法的选用和水样的采集容量有很大的关联，沉淀法和离心法通常处理小体积的水样(Thomsen et al，2012；Doi et al，2017b)，抽滤法则适用于大体积样品。抽滤又可分为现场抽滤和实验室抽滤。现场抽滤适用于远距离样点，减少运输过程中eDNA的降解，采样容量应尽量少(Sigsgaard et al，2017)；实验室抽滤是将采集好的水样，在冷藏条件下运输到实验室后抽滤，中间的时间间隔一般不超过24 h(Simmons et al，2016)。eDNA的获取与滤膜的材质及孔径也有很大的关系。实验表明，混合纤维素酯、硝酸纤维素滤膜因为具有吸附DNA和蛋白质的性质，提高了eDNA的收集效率而被广泛使用(Majaneva et al，2018，Tsuji et al，2019)；孔径大小不仅影响eDNA的获取率也影响着过滤速度，吴昀晟等(2019)比较4种孔径(10、5、1、0.45 μm)滤膜对鱼类eDNA获取效率，结果显示0.45 μm滤膜的获取率最高。对于杂质较多的水体可以选择预过滤，即使用一些纱网筛掉泥沙、浮游植物等大颗粒物质，防止抽滤时堵

塞滤膜，节约时间(Ma et al，2016)。同样，抽滤过程中也要避免污染，抽滤完成后得到的滤膜避光低温冷冻储存，降低鱼类eDNA的降解速度。

2.2 DNA提取

eDNA提取方式的选择很大程度上影响eDNA检测效率，目前研究中常用的提取方式有商用的DNA提取试剂盒和液相分离法（表2）。由于DNA提取试剂盒的实验简单性和较好的回收率(Tsuji et al，2019)，为多数实验研究使用。不同试剂盒对物种的提取效率也不同，Jessica等(2016)评估了6种常见的商用试剂盒对鲤eDNA的提取效果，得到了最适用鲤和其他鲤科鱼类的试剂盒。一般鱼类eDNA监测以DNeasy Blood and Tissue DNA提取试剂盒(DNeasy，Qiagen)、PowerWater DNA提取试剂盒(PowerWater，Mobio)使用最为广泛，DNeasy试剂盒相较于PowerWater试剂盒便宜且方便，而PowerWater试剂盒可以有效提高PCR扩增率和数据质量(Eichmiller et al，2016)。在较早研究中，多使用液相分离法来提取eDNA，液相分离法主要有十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法和苯酚-氯仿-异戊醇(PCI)法，实验表明液相分离法在一些情况下提取效率会优于试剂盒(Deiner et al，2015)，但因为含有毒物质而难以广泛使用。

2.3 PCR扩增

在影响eDNA方法检测准确性和有效性的诸多因素中，PCR引物和条形码区段的选择极为关键(Zhang et al，2020)，根据实验目的可分为特异性检测和宏条形码检测(Shu et al，2020；Wang et al，2020)（表2）。特异性检测针对入侵物种(Takahara et al，2013)、濒危珍稀物种(Thomsen et al，2012)或者生物量估算(Takahara et al，2012)等，使用传统PCR可以判断目标物种的有无，定量PCR估算目标物种的生物量(Tillotson et al，2018；Takahara et al，2012)。

宏条形码技术应用于鱼类多样性的监测，使用通用PCR引物同时从多个生物体中扩增DNA再结合高通量测序技术(Zhang et al，2020)可以快速鉴别多个物种，Miya等(2015)通过实验研究得到一种鱼类通用性引物MiFish，成为现在鱼类多样性监测最常使用的引物。对于不同研究区域或者生态系统，引物的适用性也会改变，一项研究的引物性能可能不完全适用于另一项研究，这要根据研究区域物种组成特性进行选择(Zhang et al，2020)。但总体来说，相比于细胞核DNA，线粒体DNA更适合作为eDNA宏条形码靶标 (李萌等，2019)，常用于扩增的目标序列区域有12S、16S、Cytb以及COI（表2）。

2.4 测序及数据分析

测序技术已经发展到第四代。相比于一代测序技术（Sanger Sequencing），第二代高通量测序（Next generation sequencing，NGS）速度快、准确性高、信息量大，具有边合成边测序的特点，现今应用最多的是第二代测序技术，基于二代测序技术的平台有罗氏公司的454焦磷酸测序平台、Illumina公司的Hisep和Misep平台等。单一或少量物种测序多使用桑格测序技术(Janosik & Johnston，2015)，多个物种（如对某个种群的多样性监测）测序则使用高通量测序以节省时间成本(徐念等，2020)。

特异性检测，使用特异性引物扩增后可通过电泳来初步判断目标物种的有无或者通过序列比对确定。宏条码检测是对已测序列进行质控、过滤和OTU（Operational Taxonomic Units，可操作性分类单元）聚类后，对代表性OTU序列进行BLAST比对和物种注释，得到每个序列所代表的物种信息。比对的数据库可以是根据历史数据建立的本地数据库，也可以是直接使用可靠的信息平台建立的数据库。

3 生态功能和生物多样性监测

自eDNA技术应用到生态学以来，在水生生物尤其是鱼类研究得到了飞快发展。王书平(Wang et al，2020)等对324篇鱼类eDNA文献进行分析，结果表明，相关出版文献的数量逐年增加，以美国、日本等国家居多，尽管中国鱼类多样性较高，但这方面的研究比例很低。研究方向集中于鱼类多样性监测、入侵物种检测、濒危物种检测、生物量的估算、以及技术方法的评估等（表2）。

3.1 国外研究进展

3.1.1 鱼类多样性监测　随着水生生态系统的破坏，生物多样性保护问题更加突出，已然成为生态学的研究热点，准确快速地鉴别物种尤为重要，eDNA技术则满足这一需求。Giorgio等(2020)结合了水下目视普查、诱饵水下录像以及小规模渔业捕捞3种传统方法和eDNA技术调查鱼类多样性（功能多样性），最终发现eDNA技术是能够显示出功能最多样化和最少冗余鱼类组合的方法。Valentini等(2016)通过实验发现，与传统调查或历史数据相比，eDNA宏条形码技术总体上显示出更好的检测概率；在89%的研究位点中，使用eDNA宏条形码方法检测到的类群数量高于或等同于使用传统方法。值得强调的是，虽然eDNA技术调查多样性的检测率高于传统方法，但因为方法本身存在一定的局限性，不能代替传统方法，而是可以作为很好的辅助工具协同调查。

表 2 国内外使用 eDNA 监测鱼类的应用

Tab. 2 Applications of eDNA technology for fish monitoring at home and abroad

国内国外	年份	研究方向	研究区域	引物名称	扩增区域	扩增长度/bp	DNA 提取	测序平台	文献来源
国外	2018	多样性	海洋	MiFish	12S	220	DNeasy (Qiagen)	Sanger Sequencing	Ushio et al，2018
	2019	多样性	海洋	Fish16SF/D 16S2R	16S	200	PCI	—	Jeunen et al，2019
	2020	多样性	海洋	MiFish	12S	167	DNeasy (Qiagen)	IlluminaMiSeq	Aglieri et al，2020
	2014	物种入侵	湖泊	Carpcytb	Cytb	200	QIAamp DNA Stool Mini Kit(Qigen)	—	Eichmiller et al，2014
	2013	物种入侵	池塘	Bluegill_Cytb	Cytb	100	DNeasy (Qiagen)	Sanger Sequencing	Takahara et al，2013
	2015	物种入侵	池塘河流	—	D-loop	100	CTAB	—	Turner et al，2015
	2019	珍稀濒危	池塘	CruCarp_Cytb	Cytb	50~150	PowerWater DNA kit(Mobio)	Next-Generation DNA Sequencing	Harper et al，2019a
	2012	珍稀濒危	池塘湖泊溪流	FishCB	Cytb	130	DNeasy (Qiagen)	—	Thomsen et al，2012
	2012	生物量估算	池塘/泻湖	CpCyB	Cytb	78	DNeasy (Qiagen)	Sanger Sequencing	Takahara et al，2012
	2016	生物量估算	海洋	—	Cytb	127	DNeasy (Qiagen)	—	Yamamoto et al，2016
国内	2020	多样性	河流	L14912-YB	Cytb	285	PowerWater DNA kit (Mobio)	IlluminaMiseq	徐念等，2020
	2020	多样性	海岸湿地	MiFish	12S	180	DNeasy (Qiagen)	BGISEQ-500	Zou et al，2020
	2020	多样性	湖泊	16S	16S	133~140	DNeasy (Qiagen)	IlluminaHiSeq 4000	Qu et al，2020
	2018	珍稀濒危	河流	GAS4 GAS4N	COI	313 113	PowerWater DNA kit (Mobio)	—	Xu et al，2018
	2018	珍稀濒危	河流	YFPDloop	D-loop	102	Water DNA Kit(Qiagen)	—	吴昀晟等，2019

注：“—”表示原文章没有具体表述。

Note: “—” indicates that the original article did not specify.

3.1.2 鱼类的生物入侵监测 近年来，由于生物入侵，对生态环境造成了严重破坏，经济也遭受巨大损失，人们对生物入侵的认识逐步加深(潘勇和曹文宣，2006)。入侵早期阶段进行监测，对控制外来物种的扩散具有很重要的意义(Hulme，2006)。传统方法耗时耗力，并且在低密度情况下难以监测到物种，eDNA 能很好地避免这些问题(Rees et al，2014a；Ficetola et al，2008)。Takahara 等(2013)从日本的 7 个大陆和 7 个岛屿的池塘中选取 70 个点，这些点位有些通过目视法就可以发现蓝鳃太阳鱼(*Lepomis macrochirus*)，有些则没有发现；每个点位取 1 L 水后使用 eDNA 方法检测，之前目视法观察到的池塘以及部分目视法没有观察到的池塘都检测到了蓝鳃太阳鱼。同样，Eichmiller 等(2016)也使用 eDNA 技术监测密西西比河流域淡水湖中鲤(*Cyprinus carpio*)的入侵情况，来降低鲤入侵造成的损失。因此，使用 eDNA 方法能够简单而快速地检测到入侵鱼类的存在，为预防入侵种的大面积扩散提供早期讯息。

3.1.3 珍稀与濒危鱼类监测 传统方法调查监测(如网捕、笼捕、电捕)很大程度上会影响到这些珍稀或者濒危物种的生存。由于具有灵敏度高、无损伤性采样等特征，eDNA 分析技术尤其适用于濒危水生物种的种群分布监测(Valentini et al，2016)。Philip 等(2012)在欧洲的 98 个天然池塘、湖泊和溪流采集水样，从池塘水中提取的环境 DNA，经高通量测序可以检测到两栖动物和鱼类的整个动物群。Schmelzle & Kinziger(2016)比较了传统方法与 eDNA 方法对加利福尼亚北部和俄勒冈州南部海岸线附近的濒危物种潮汐虾虎鱼 (*Eucyclogobius newberryi*)的检出率，利用模型分析发现 eDNA 方法的检出率几乎是传统方法的 2 倍，传统方法未检测到的点位 eDNA 法也检测到了靶物种。正是因为 DNA 在环境中无所不在的特点，eDNA 技术可以作为有效的工具在广泛的分类学类群中监测稀有和濒危物种，降低物种灭绝的风险。

3.1.4　*鱼类生物量估算*　一直以来，动物生物量评估方面的研究相对较少，其中一个重要的原因是动物好动、易躲藏且难以捕捉，调查不便(徐浩等，2014)。Takahara等(2012)通过室内和田间试验，建立一种估算鲤生物量的eDNA方法，结果表明在水产养殖和池塘中，eDNA浓度与鲤生物量均呈正相关，eDNA浓度估算的生物量数据能够反应普通鲤在自然环境中的潜在分布，并且这种方法简单、无创、快速。Tillotson等(2018)研究了eDNA浓度与产卵鲑数量之间在精细时空下的定量关系，根据实时监测数据显示，两者具有一定相关性，进而利用eDNA浓度可以预估鲑的丰富度。使用这种方法也要考虑鱼的活/死比、水温、在溪流中的位置等影响因素，排除诸多因素后，可以建立一个模型通过eDNA浓度来预测鱼类的生物量，有助于监测和管理。

除了以上主流的研究方向，也有国外学者展开了鱼类eDNA在水体中的持久性研究以及eDNA检测鱼类技术方法的评估。Dejean等(2011)探究了鱼类和两栖类的DNA在淡水生态系统中的持久性，在去除DNA源后，对照条件(水族箱)和田间(池塘)中DNA的可检测性都随时间而降低，正是该特性打开了eDNA应用于保护生物学的前景。Takahara等(2015)评估了不同样品处理方法(水样的冷冻与否、PCR时模板溶液体积)对检测水样鲤eDNA的影响，最后得出“建议使用非冷冻样品和使用更少PCR模板检测eDNA”的结论。这些方法理论的探究使得eDNA技术应用于鱼类监测更加成熟和标准。

3.2　国内研究进展

国内有关鱼类eDNA的研究虽然相对较少，但每年都在增加，研究方向以多样性和濒危物种为主。徐念等(2018)利用eDNA监测濒危动物中华鲟随季节的分布，该研究在长江设立了24个采样点进行eDNA分析，结果发现中华鲟的检出率在中游不变，而在下游发生显著变化，反映中华鲟季节性迁移规律，为中华鲟的保护提供了更好的技术支持。Zou等(2020)和舒璐等(2020)都利用eDNA宏条形码技术对鱼类多样性进行了研究，结果显示eDNA宏条形码技术可以快速检测鱼类多样性及其空间分布，克服了传统方法的局限性。此外，也有国内学者开展了研究区域鱼类eDNA引物的筛选研究(张爱菊等，2019；Zhang et al，2020)，对eDNA监测鱼类方法进行评估综述(郝雅宾等，2018；Shu et al，2020；Wang et al，2020)，为eDNA技术应用于鱼类监测方面提供了很好的参考方案。

eDNA技术仅仅作为一种调查手段解决鱼类生态学问题，具有非常广泛的应用前景，可应用于监测鱼类活动，有助于保护和管理鱼类多样性。Antognazza等(2019)建立了鲱(*Alosa* sp.)的eDNA检测方法，利用qPCR在英格兰西部Severn河的主要支流Teme河上进行检测，确定了鲱鱼产卵期的持续时间及其分布的空间范围，并对鲱的空间分布进行了评估。Sigsgaard等(2016)首次应用eDNA测序技术收集了世界上体型最大的鱼类——鲸鲨(*Rhincodon typus*)的整个种群的遗传学信息，为确定其最佳的种群管理方式奠定了基础。在诸多研究中经常使用基于传统方法的调查结果计算鱼类完整性指数(F-IBI)，并将其作为水体健康的一个评价指标，eDNA技术也完全可以应用到这方面，但现今还没有相关研究。

4　总结与展望

eDNA技术近十年来在生态学调查中起到了重要作用，越来越受重视，相比于传统方法，eDNA技术价格更低、省时省力、对生态系统以及生物也基本上不产生损伤。应用于鱼类的eDNA技术每一个步骤(样品采集与获取、DNA提取、PCR扩增等)也日臻完善，研究方向较为广泛，但应注意的是：

(1)eDNA技术在鱼类监测中也存在诸多缺点，不能代替传统方法使用。除了文中已经提到的问题外，物种的基因数据库序列的不足导致研究即使得到基因序列也无法比对和物种注释，会出现假阴性的结果。因此应该补充基因数据库，还应该建立切实可行的调查标准和规范，调查结果之间才具有可比性。

(2)相比于国外，国内eDNA的应用性研究较少，应加以重视。国内外关于eDNA研究的起步没有多大差距，但国内相关研究却很少。国外尤其是发达国家对于生物多样性的监测要求更加严格，例如欧洲一些国家法律规定必须每年都要对具有一定规模的水体进行物种多样性监测，eDNA技术因为具有方便、快速、省时等特点，成为很好的检测手段而被使用；使用eDNA技术监测鱼类对设备也有一定要求，要完成一个eDNA监测，需要PCR仪、测序平台和干净整洁的试验环境，对于一些生态学的研究团队难以达到条件，要依赖于一些公司完成。

(3)eDNA技术不仅仅能够应用于以上提到的几个方向，还可以结合目前的大数据、机器学习、遥感、GIS等拓展使用，使eDNA能够得到更加广阔的应用前景。eDNA作为一种调查手段，可以得到大

量的鱼类监测数据，将这些数据整合起来进行大数据分析或者结合3S技术会探究出更加可观的生态学结果。

参考文献

郝雅宾，张爱菊，刘金殿，等，2018. 环境DNA技术在鱼类资源研究中的应用[J]. 生物技术通报，34(12): 56−62.

李栋，2015. 鱼类生物资产价值评估研究[D]. 上海：上海海洋大学.

李萌，尉婷婷，史博洋，等，2019. 环境DNA技术在淡水底栖大型无脊椎动物多样性监测中的应用[J]. 生物多样性，(27): 480−490.

刘焕章，杨君兴，刘淑伟，等，2016. 鱼类多样性监测的理论方法及中国内陆水体鱼类多样性监测[J]. 生物多样性，(24): 1227−1233.

潘勇，曹文宣，2006. 国内外鱼类入侵的历史及途径[J]. 大连水产学院学报，21(1): 72−78.

舒璐，林佳艳，徐源，等，2020. 基于环境DNA宏条形码的洱海鱼类多样性研究[J]. 水生生物学报，(44): 1080−1086.

吴昀晟，唐永凯，李建林，等，2019. 环境DNA在长江江豚监测中的应用[J]. 中国水产科学，(26): 126−134.

徐浩，罗茜，李云，等，2014. 环境DNA研究技术及其在生态学领域的应用[J]. 生物技术通报，(10):49−55.

徐念，熊美华，邵科，等，2020. 长江中下游环境DNA宏条形码生物多样性检测技术初步研究[J]. 环境科学研究，33: 1187−1196.

张爱菊，郝雅宾，郭爱环，等，2019. 基于高通量测序技术的鱼类环境DNA研究中通用引物的筛选验证[J]. 浙江农业学报，31: 1615−1623.

Aglieri G，Baillie C，Mariani S，et al，2021. Environmental DNA effectively captures functional diversity of coastal fish communities[J]. Molecular Ecology，30（13）：3127−3139.

Amberg J J，Mccalla S G，Monroe E，et al，2015. Improving efficiency and reliability of environmental DNA analysis for silver carp[J]. Journal of Great Lakes Research，41(2): 367−373.

Antognazza C M，Britton J R，Potter C，et al，2019. Environmental DNA as a non−invasive sampling tool to detect the spawning distribution of European anadromous shads (*Alosa* spp.) [J]. Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems，29(1):148−152.

Beverton R，1991. Fish resources; threats and protection[J]. Netherlands Journal of Zoology，42(2/3): 139−175.

Civade R，Dejean T，Valentini A，et al，2016. Spatial representativeness of environmental DNA metabarcoding signal for fish biodiversity assessment in a natural freshwater system[J]. PloS one，11(6)，doi: 10.1371/journal.pone.0157366.

Crookes S，Heer T，Castañeda R A，et al，2020. Monitoring the silver carp invasion in Africa: a case study using environmental DNA (eDNA) in dangerous watersheds[J]. NeoBiota，(56): 31−47.

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

Dejean T，Valentini A，Duparc A，et al，2011. Persistence of environmental DNA in freshwater ecosystems[J]. PLoS One，6(8)，doi:10.1371/journal.pone.0023398.

Doi H，Stoeckle M Y，Soboleva L，et al，2017a. Aquatic environmental DNA detects seasonal fish abundance and habitat preference in an urban estuary[J]. PLoS One，12(4)，doi: 10.1371/journal.pone.0175186.

Doi H，Uchii K，Matsuhashi S，et al，2017b. Isopropanol precipitation method for collecting fish environmental DNA[J]. Limnology Oceanography: Methods，15(2): 212−218.

Dudgeon D，Arthington A H，Gessner M O，et al，2006. Freshwater biodiversity: importance，threats，status and conservation challenges[J]. Biol Rev Camb Philos Soc，81(2): 163−182.

Eichmiller J J，Bajer P G，Sorensen P W，2021. The Relationship between the distribution of common carp and their environmental DNA in a small lake[J]. PLoS One，9(11)，doi: 10.1371/journal.pone.0112611.

Eichmiller J J，Miller L M，Sorensen P W，2016. Optimizing techniques to capture and extract environmental DNA for detection and quantification of fish[J]. Molecular Ecology Resources，16(1): 56−68.

Ficetola G F，Miaud C，Pompanon F，et al，2008. Species detection using environmental DNA from water samples[J]. Biol Lett，4(4): 423−425.

Harper L R，Griffiths N P，Lawson Handley L，et al，2019a. Development and application of environmental DNA surveillance for the threatened crucian carp (*Carassius carassius*) [J].Freshwater Biology，64(1): 93−107.

Harper L R，Lawson Handley L，Carpenter A I，et al，2019b. Environmental DNA (eDNA) metabarcoding of pond water as a tool to survey conservation and management priority mammals[J]. Biological Conservation，238，doi: 10.1016/j.biocon.2019.108225.

Hulme P E，2006. Beyond control: wider implications for the management of biological invasions[J]. Journal of Applied Ecology，43(5): 835−847.

Hunter M E，Meigs−Friend G，Ferrante J A，et al，2019. Effica-

cy of eDNA as an early detection indicator for Burmese pythons in the ARM Loxahatchee National Wildlife Refuge in the greater Everglades ecosystem[J]. Ecological Indicators，(102): 617−622.

Janosik A M，Johnston C E，2015. Environmental DNA as an effective tool for detection of imperiled fishes[J]. Environmental Biology of Fishes，98(8):1889−1893.

Jeunen G J，Knapp M，Spencer H G，et al，2019. Environmental DNA (eDNA) metabarcoding reveals strong discrimination among diverse marine habitats connected by water movement[J]. Molecular Ecology Resources，19(2): 426−438.

Lundberg J G，Kottelat M，Smith G R，et al，2000. So many fishes，so little time: An overview of recent ichthyological discovery in continental waters[J]. Annals of the Missouri Botanical Garden，87(1): 26−62.

Ma H，Stewart K，Lougheed S，et al，2016. Characterization，optimization，and validation of environmental DNA (eDNA) markers to detect an endangered aquatic mammal[J]. Conservation Genetics Resources，8(4): 561−568.

Majaneva M，Diserud O H，Eagle S H，et al，2018. Environmental DNA filtration techniques affect recovered biodiversity[J]. Scientific Reports，8(1): 1−11.

Martellini A，Payment P，Villemur R，2005. Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human，bovine，porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water[J].Water Research，39(4): 541−548.

Miralles L，Parrondo M，Hernandez De Rojas A，et al，2019. Development and validation of eDNA markers for the detection of *Crepidula fornicata* in environmental samples[J]. Mar Pollut Bull，(146): 827−830.

Miya M，Sato Y，Fukunaga T，et al，2015. MiFish，a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species[J]. Royal Society Open Science，2(7)，doi: 10.1098/rsos.150088.

Nelson J S，Grande T C，Wilson M V H，2016. Fishes of the World[M]. New Jersey：John Wiley & Sons.

Pfleger M O，Rider S J，Johnston C E，et al，2016. Saving the doomed: Using eDNA to aid in detection of rare sturgeon for conservation (Acipenseridae)[J]. Global ecology conservation，(8): 99−107.

Qu C，Stewart K A，Clemente−Carvalho R，et al，2020. Comparing fish prey diversity for a critically endangered aquatic mammal in a reserve and the wild using eDNA metabarcoding[J]. Scientific Reports，10(1)，doi:10.1038/s41598−020−73648−2.

Rees H C，Bishop K，Middleditch D J，et al，2014a. The application of eDNA for monitoring of the Great Crested Newt in the UK[J].Ecol Evol，4(21): 4023−4032.

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

Rondon M R，August P R，Bettermann A D，et al，2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms[J]. Applied and Environmental Microbiology，66(6): 2541−2547.

Schmelzle M C，Kinziger A P，2016. Using occupancy modelling to compare environmental DNA to traditional field methods for regional−scale monitoring of an endangered aquatic species[J]. Molecular Ecology Resources，16(4): 895−908

Shaw J L A，Clarke L J，Wedderburn S D，et al，2016. Comparison of environmental DNA metabarcoding and conventional fish survey methods in a river system[J]. Biological Conservation，(197): 131−138.

Shu L，Ludwig A，Peng Z，2020. Standards for methods utilizing environmental DNA for detection of fish species[J]. Genes，11(3)，doi:10.3390/genes11030296.

Sigsgaard E E，Nielsen I B，Bach S S，et al，2016. Population characteristics of a large whale shark aggregation inferred from seawater environmental DNA[J]. Nature Ecology & Evolution，1(1):4.

Sigsgaard E E，Nielsen I B，Carl H，et al，2017. Seawater environmental DNA reflects seasonality of a coastal fish community[J]. Marine Biology，164(6)，doi: 10.1007/s00227−017−3147−4.

Simmons M，Tucker A，Chadderton W L，et al，2016. Active and passive environmental DNA surveillance of aquatic invasive species[J]. Canadian Journal of Fisheries Aquatic Sciences，73(1): 76−83.

Takahara T，Minamoto T，Doi H，2015. Effects of sample processing on the detection rate of environmental DNA from the Common Carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Biological Conservation，183: 64−69.

Takahara T，Minamoto T，Doi H，2013. Using environmental DNA to estimate the distribution of an invasive fish species in ponds[J]. PLoS One，8(2)，doi: 10.1371/journal.pone.0056584.

Takahara T，Minamoto T，Yamanaka H，et al，2012. Estimation of fish biomass using environmental DNA[J]. PLoS One，7(4)，doi:10.1371/journal.pone.0035868.

Thomsen P F，Kielgast J O S，Iversen L L，et al，2012. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmen-

tal DNA[J]. Molecular Ecology, 21(11): 2565-2573.

Tillotson M D, Kelly R P, Duda J J, et al, 2018. Concentrations of environmental DNA (eDNA) reflect spawning salmon abundance at fine spatial and temporal scales[J]. Biological Conservation, (220): 1-11.

Tsuji S, Takahara T, Doi H, et al, 2019. The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis—A review of methods for collection, extraction, and detection[J]. Environmental DNA, 1(2): 99-108.

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

Ulibarri R M, Bonar S A, Rees C, et al, 2017. Comparing efficiency of American Fisheries Society standard snorkeling techniques to environmental DNA sampling techniques[J]. North American Journal of Fisheries Management, 37(3): 644-651.

Ushio M, Sakurai S, Yamanaka H, et al, 2018. Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing[J]. Metabarcoding and Metagenomics, (2): 1-15.

Valentini A, Taberlet P, Miaud C, et al, 2016. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding[J]. Molecular Ecology, 25(4): 929-942.

Wang S, Yan Z, Hänfling B, et al, 2020. Methodology of fish eDNA and its applications in ecology and environment[J]. Science of The Total Environment, (755), doi: 10.1016/j.scitotenv.2020.142622.

Xu N, Zhu B, Shi F, et al, 2018. Monitoring seasonal distribution of an endangered anadromous sturgeon in a large river using environmental DNA[J]. Science of Nature, 105 (11/12), doi: 10.1007/s00114-018-1587-4.

Yamamoto S, Minami K, Fukaya K, et al, 2016. Environmental DNA as a 'snapshot' of fish distribution: A case study of Japanese jack mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan[J]. Plos One, 11(3), doi: 10.1371/journal.pone.0153291.

Zhang S, Lu Q, Wang Y, et al, 2019. Assessment of fish communities using environmental DNA: Effect of spatial sampling design in lentic systems of different sizes[J]. Molecular Ecology Resources, 20(1): 242-255.

Zhang S, Zhao J, Yao M, et al, 2020. A comprehensive and comparative evaluation of primers for metabarcoding eDNA from fish[J]. Methods in Ecology and Evolution, doi: 10.1111/2041-210x.13485.

Zou K, Chen J, Ruan H, et al, 2020. eDNA metabarcoding as a promising conservation tool for monitoring fish diversity in a coastal wetland of the Pearl River Estuary compared to bottom trawling[J].Sci Total Environ, 702, doi:10.1016/j.scitotenv. 2019.134704.

（责任编辑 郑金秀）

Review of Environmental DNA Detection Methods and Their Application to Fish Monitoring

SHEN Mei, XIAO Neng-wen, LU Lin, LUO Zun-lan, SHI Na-na, SUN Guang

（Chinese Research Academy of Environmental Sciences，Beijing　100012，P.R. China）

Abstract：Fish resources are declining sharply due to the impact of human activities and fish monitoring is crucial for the protection of fish diversity. Traditional fish monitoring methods can harm fish, the investigation workload is heavy and the investigator must have professional morphological knowledge. Environmental DNA (eDNA) technology is a new method widely used for fish surveys and has the advantages of speed, low cost and no negative impact on fish. In this paper, we reviewed the basic theory eDNA, its advantages and disadvantages, described the process of fish monitoring with eDNA, summarized progress at home and abroad and, finally, examined the outlook for using this technology for fish monitoring. The eDNA technique for fish monitoring suffers from cross-contamination and species morphology is not observed, so it cannot completely replace traditional methods. The entire process of using eDNA technology for fish surveys includes sample collection and processing (precipitation, centrifugation and filtration), eDNA processing (extraction, amplification and sequencing) and bioinformation analysis. Each step in the process is necessary and can affect the detection efficiency of fish eDNA. At present, investigators from many countries have developed a rich and comprehensive set of applications for using eDNA technology to monitor fish resources, such as biodiversity monitoring, biomass estimation, detection of invasive and endangered species, and new applications are constantly emerging. While research on eDNA technology in China is not too late, the domestic research direction has been relatively narrow and the research program should be expanded and intensified.

Key words：eDNA technology; fish diversity; fish monitoring