

基于 eDNA 技术的舟山近海中国团扇鲷定性与定量分析

高天翔¹, 张浩博², 王晓艳², 陈治^{3*}

(1. 浙江海洋大学水产学院, 浙江 舟山 316022;

2. 浙江海洋大学, 国家海洋设施养殖工程技术研究中心, 浙江 舟山 316022;

3. 海南热带海洋学院水产与生命学院, 海南 三亚 572022)

摘要: 为探讨环境 DNA (environmental DNA, eDNA) 技术用于中国团扇鲷监测方面的可行性, 同时开展基于 eDNA 技术的舟山近海中国团扇鲷定性与定量分析。本实验将中国团扇鲷与其同属汤氏团扇鲷 COI 基因片段序列进行比较分析, 使用 Primer Express 3.0 软件设计中国团扇鲷特异性引物与 TaqMan 探针。在舟山朱家尖近海设计了 A、B、C 共 3 个定置网调查站位, 定期收集中国团扇鲷样品。于 2017 年 12 月 19 日、2018 年 4 月 13 日和 2018 年 7 月 14 日分别采集水样(站位 A、B1、B2、C1、C2、D), 开展 eDNA 微滴式数字 PCR (droplet digital PCR, ddPCR) 检测, 并将检测结果与水温 and 采样点进行差异显著性分析。结果显示, 不同站位、不同时间的中国团扇鲷 eDNA 浓度不同, 水样采集点对中国团扇鲷 eDNA 浓度的影响极显著, 不同采样点 eDNA 在不同季节存在极显著差异。研究表明, eDNA 检测技术灵敏度高, 水温、底质和水深对中国团扇鲷的分布皆有影响。研究结果为其他海域的中国团扇鲷 eDNA 追踪监测奠定了基础。

关键词: 中国团扇鲷; 环境 DNA, eDNA; 细胞色素 c 氧化酶亚基 I(COI) 基因; TaqMan; 微滴式数字 PCR

中图分类号: S 932.4

文献标志码: A

生物都通过产生粪便、尿液、唾液、皮肤细胞的方式将 DNA 排出或脱落到周围环境中, 这类大量存在于环境中的 DNA 片段总和称之为环境 DNA(environmental DNA, eDNA)^[1]。eDNA 技术即以此为基础, 通过适当的研究手段实现对环境中的目标物种或生物群落进行监测。该技术具有低成本^[2], 高灵敏度^[3], 非侵入性等优势^[4], 能够有效克服传统水生生物调查方法的弊端, 已成为监测水生生物物种多样性、生物量及其时空分布的重要手段^[5-6]。目前, eDNA 分析技术已被证明可以有效地对目标物种进行定性和定量检测。例如,

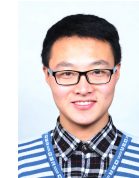
Parsons 等^[7]利用 eDNA 在阿拉斯加东南部内陆水域中检测到难以监测的鼠海豚 (*Phocoena phocoena*); Goutte 等^[8]的研究表明, eDNA 方法与电鱼调查结果中各个物种丰度相差无几, eDNA 在水生生物定量研究方面具有可靠性; Wang 等^[9-11]使用 TaqMan 探针在东海成功监测到大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)、小黄鱼 (*L. polyactis*) 以及入侵物种——眼斑拟石首鱼 (*Sciaenops ocellatus*) 的分布。总体而言, eDNA 分析既可以用于单个物种, 如入侵物种或稀有物种的调查^[12], 也可以与高通量测序技术结合, 研究整个群落的物种组成和多

收稿日期: 2022-05-11 修回日期: 2022-06-18

资助项目: 国家自然科学基金 (41806180, 32002389); 浙江省重点研发计划 (2021C02047)

第一作者: 高天翔, 从事渔业生态学研究, E-mail: gaotianxiang0611@163.com

通信作者: 陈治 (照片), 从事海洋鱼类分类学研究, E-mail: change@139.com



样性^[13]。研究表明, 单一物种特异性 PCR 方法可能比多物种高通量测序方法更为敏感和准确^[14-15]。荧光定量 PCR(qPCR) 是目前基于 eDNA 样本分析物种特异性最常见的方式。然而, 最近的研究表明, 与 qPCR 技术相比, 微滴式数字 PCR (ddPCR) 技术对环境样本中 eDNA 的检出率更高^[16-17]、对反应抑制物的耐受能力也更强^[18-19]。目前, ddPCR 技术已成功应用于鱼类 eDNA 检测^[16-17,20]。

中国团扇鳐 (*Platyrrhina sinensis*) 隶属于软骨鱼纲 (Chondrichthyes) 鳐目 (Myliobatiformes) 团扇鳐科 (Platyrrhinidae) 团扇鳐属 (*Platyrrhina*), 为小型底层软骨鱼类, 主要分布于北太平洋西部, 我国东海南部 (台湾海峡) 及南海海域, 是近海底拖网的重要渔获物之一。目前, 已有不少关于中国团扇鳐生长特性、肌肉水分、灰分与能值、年龄结构、生长特性、肝脏的生化组成以及鳐类的系统进化等研究报道^[21-23]。2018 年, Chen 等^[24] 对采自浙江舟山近海的中国团扇鳐进行了详细的形态描述和 DNA 条形码分析, 这是目前关于中国团扇鳐在中国境内的最北记录。中国团扇鳐系暖温性沿岸鱼类, 在台湾海峡以北分布数量并不多。由于其活动力差, 仅能利用其强壮尾部左右摆动前进, 故常蛰伏于近海底层, 通过传统渔业调查方式采集样品存在较大难度。因此, 使用 eDNA 分析技术能够更加有效地探测中国团扇鳐的潜在分布区及生物量。目前, 国内外尚未见关于中国团扇鳐

eDNA 分析方面的研究报道。本研究尝试使用 eDNA 定量检测技术, 探讨该技术用于中国团扇鳐监测方面的可行性。通过建立和检验中国团扇鳐的特异性引物和 *TaqMan* 探针, 以监测舟山近海中国团扇鳐的分布与生物量。本研究将为其他海域的中国团扇鳐资源 eDNA 追踪监测奠定基础。

1 材料与方方法

1.1 样品采集

采样地点位于浙江省舟山市朱家尖东沙海滩附近 (图 1)。中国团扇鳐样品主要委托当地渔民采集。采集方式为定置网 (采样位点处于朱家尖东沙风景区, 该海域禁止拖网作业)。eDNA 水样主要由作者采集完成。采样时间分别为 2017 年 12 月 19 日、2018 年 4 月 13 日和 2018 年 7 月 14 日。使用 6 个体积为 5 L 的矿泉水瓶进行取样, 采样前用浓度为 0.1% 的次氯酸钠溶液对矿泉水瓶进行消毒处理, 并取等量的纯净水作为阴性对照。水样采集过程中测量海水表层温度, 并观测取样点的底质。实验过程中操作人员严格遵守浙江海洋大学动物实验伦理规范, 并按照浙江海洋大学动物实验伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 DNA 提取及 PCR 扩增验证

采用苯酚-氯仿方法从中国团扇鳐肌肉中提取 DNA。使用硬骨鱼类细胞色素 c 氧化酶亚基 I

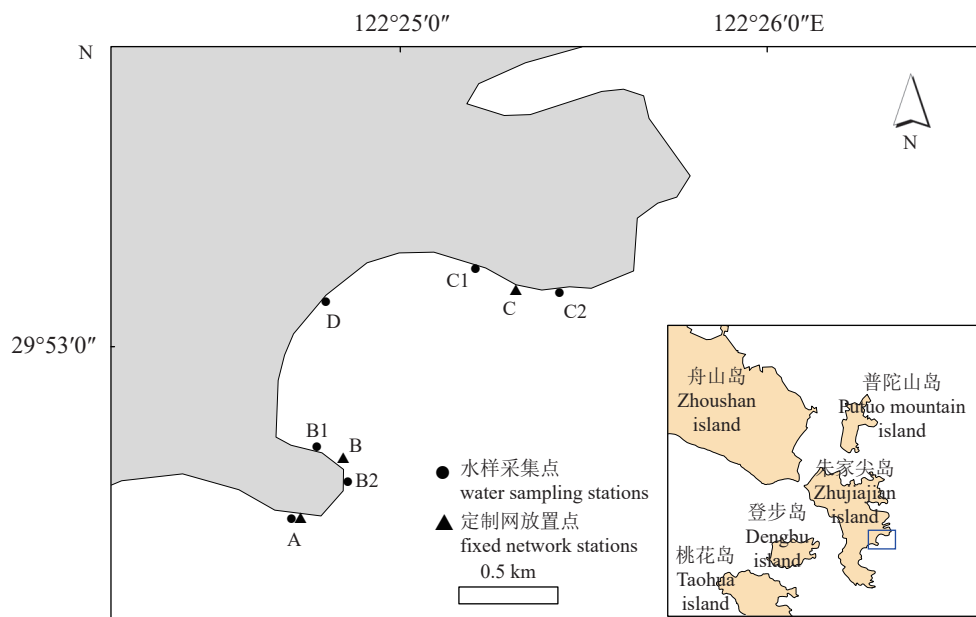


图 1 中国团扇鳐采样站位图

Fig. 1 Stations of *P. sinensis* and water samples

基因 (COI)通用引物 F₁(5'-TCAACCAACCACA AAGACATTGGCAC-3')、R₁(5'-TAGACTTCTG GGTGGCCAAAGAATCA-3')进行 PCR 扩增^[25]。反应体系: DNTPs 2 μL (2.5 μmol/L), 10×buffer (含 Mg²⁺) 2.5 μL, rTaq 0.15 μL (5 U/μL), 上下游引物各 1 μL (10 μmol/L), DNA 模板 1 μL (50 ng), 超纯水补齐总体积至 25 μL。反应程序: 95 °C 预变性 5 min; 40 次循环过程为 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 最终在 72 °C 延伸 10 min 后于 4 °C 保存。PCR 产物质量采用 1% 琼脂糖凝胶电泳法来检测, 挑选电泳条带单一且明亮的 PCR 产物送至生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行双向测序。测得的序列使用 SeqMan 软件进行拼接、比对及人工手动校对, 得到准确的中国团扇鲷 COI 基因片段序列。

1.3 中国团扇鲷特异性引物及探针的设计和验证

在中国近海, 中国团扇鲷的科内近缘种仅汤氏团扇鲷 (*P. tangi*) 一种, 因此本实验采用汤氏团扇鲷作为验证物种。使用 Primer Express 3.0 软件基于中国团扇鲷标准 COI 片段进行特异性引物与 TaqMan 探针的设计。设计好的引物和探针由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。TaqMan 探针 5'端使用 FAM (荧光素) 进行标记, 3'端用 TAMRA 进行修饰。使用实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 验证引物和探针的特异性。

qPCR 反应体系采用 20 μL 体系: Premix Ex Taq10 μL, 正反引物各 0.4 μL (10 μmol/L), DNA 模板 2 μL (50 ng), 探针 0.4 μL (10 μmol/L), 超纯水补齐至 20 μL。扩增反应程序: 预变性 94 °C 10 s; 94 °C 5 s, 60 °C 23 s, 45 个循环。qPCR 扩增仪器为 ThermoFisher 7300 Plus Real-Time PCR System。

1.4 eDNA 提取及定量检测

由于舟山近海水体较为浑浊, 因此使用优化后的方案提取 eDNA。具体提取步骤: 使用直径 47 mm、孔径 0.45 μm 的醋酸纤维素滤膜 (上海兴亚) 抽滤, 将 eDNA 富集到滤膜表面。将滤膜使用锡箔纸包裹后放入冻存管, 置于 -80 °C 保存。同时抽滤等体积的纯净水作为阴性对照。使用 DNeasy Blood and Tissue Kit 试剂盒进行 eDNA 提取, 随后用酶标仪及 iQuant™ BR dsDNA Quantitation Kit (0.05~1 000 ng/μL) 核酸定量检测试剂盒测定其质量浓度。对提取的 eDNA 样品使用

QuantStudio™ 3D 数字 PCR 仪进行 eDNA 定量分析。反应体系与“中国团扇鲷特异性引物及探针的设计和验证”中 qPCR 验证相同。热循环条件: 50 °C 孵育 2 min 进行 UNG 酶激活, 95 °C 预变性 2 min, 45 次循环过程为 95 °C 变性 5 s, 60 °C 退火/延伸 23 s。对于浓度极低的水样, 模板 eDNA 量加倍 (由 2 μL 增加到 4 μL) 后进行扩增。将反应体系加入电子芯片后进行油封并压紧, 随后放入反应箱进行 PCR 扩增, 最后直接用芯片读取 eDNA 浓度。

1.5 数据分析

使用 SPSS 18.0 软件对水样 eDNA 浓度与采样点、采样时间进行差异显著性分析。

2 结果

2.1 中国团扇鲷定置网样品采集情况

“2018 年 4 月 14 日—2018 年 7 月 14 日”期间共采集到中国团扇鲷 21 尾, 日均采集样品数最高, 为 0.228 2 尾/d。“2017 年 10 月 1 日—2017 年 12 月 19 日”期间共采集到 12 尾样品, 日均样品数约为 0.104 3 尾。“2017 年 12 月 20 日—2018 年 4 月 13 日”期间仅采集中国团扇鲷 5 尾, 在 3 个时间段中渔获尾数最少 (表 1)。

表 1 中国团扇鲷样品采集信息

Tab. 1 Sampling information of *P. sinensis*

采样时间 sampling date	样品总数/尾 total number of samples	日均样品数/尾 average number of samples
2017-10-01—2017-12-19	12	12/115
2017-12-20—2018-04-13	5	5/80
2018-04-14—2018-07-14	21	21/92

多数采样点底质为礁石和细沙。A、D 两点较为特殊, 分别为碎砾、礁石与细沙 (图 1)。7 月水温最高且均大于 26 °C, 12 月和 4 月水温差异不大, 在 15~16 °C 波动。采样水温及采样点底质具体信息如表 2 所示。

2.2 中国团扇鲷特异性引物和探针及其验证

通过中国团扇鲷与汤氏团扇鲷 COI 基因片段序列比对, 设计的特异性引物和探针位于中国团扇鲷线粒体基因组 2 636~2 769 bp 位置处 (图 2)。包括引物在内的扩增片段大小为 134 bp, 其引物为 ZF-F-2636: 5'-GCAGGAGCTTCTGTGGACT-

表 2 采样时的水温及采样点质地

Tab. 2 Water temperature and sediment information of sampling stations

采样点 stations	取样处底质 sediment	海水表层温度/°C surface temperature		
		2017年12月19日 Dec. 19, 2017	2018年4月13日 Apr. 13, 2018	2018年7月14日 Jul. 14, 2018
A	碎砾、礁石 gravels, reefs	15.2	15.4	26.7
B1	礁石、细沙 reefs, fine sand	15.3	15.6	26.6
B2	礁石、细沙 reefs, fine sand	15	15.6	26.4
C1	礁石、细沙 reefs, fine sand	15.1	15.9	26.8
C2	礁石、细沙 reefs, fine sand	15.3	15.7	26.6
D	细沙 fine sand	15.2	15.8	26.5

TAACTATT-3'、ZR-F-2769: 5'-ACATCTAGCGG-FAM-ACATCTAGCGGGAGTCTCTTCCATTCTG-GAGTCTCTTCCATTCTG-3', 探针为 Zpro-2671: TAMRA (表 3)。

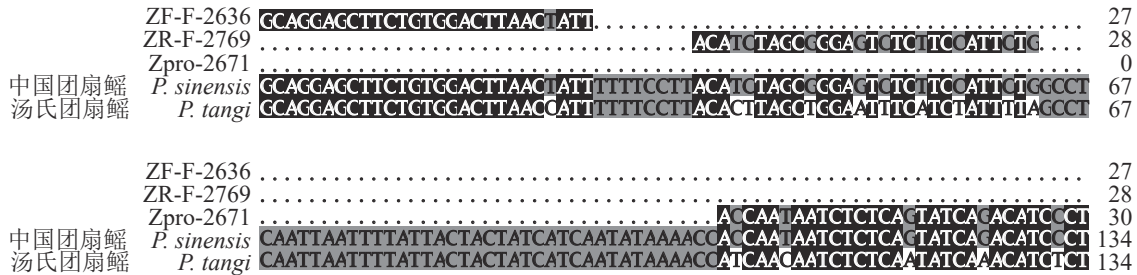


图 2 中国团扇鳐引物、探针序列与汤氏团扇鳐碱基差异情况

Fig. 2 Nucleotide variation of primers and probe between *P. sinensis* and *P. tangi*

表 3 中国团扇鳐特异性引物、探针信息

Tab. 3 Information of specific primers and probe of *P. sinensis*

引物及探针序列 sequences of primers and probe	退火温度/(°C) T_m	PCR产物长度/bp PCR product length	序列所在链 locations	与近缘种同源序列之间碱基差异数 different nucleotide number	
				汤氏团扇鳐 <i>P. tangi</i>	<i>P. sinensis</i>
ZF-F-2636: GCAGGAGCTTCTGTGGACTTAACTATT	60.4	134	L链	1	
Zpro-2671: FAM-ACATCTAGCGGGAGTCTCTCCAT TCTG-TAMRA	65.6		L链	9	
ZR-F-2769: ACATCTAGCGGGAGTCTCTTCCATTCTG	61.6		H链	5	

经 qPCR 扩增验证, 中国团扇鳐特异性引物和探针仅对中国团扇鳐样品出现强荧光信号, 表现为阳性扩增, 而其近缘种汤氏团扇鳐和空白对照均未获得扩增, 表现为阴性。qPCR 验证的 C_t 值见表 4。上述结果表明, 本研究所设计的引物

与探针具有高度的特异性, 可用于舟山近海中国团扇鳐的检测和区分。

表 4 基于荧光定量 PCR 的中国团扇鳐引物、探针特异性验证结果

Tab. 4 Specificity verification results of primers and probes of *P. sinensis* by qPCR

物种 species	C_t 值 C_t value
中国团扇鳐 <i>P. sinensis</i>	16.81 ± 0.2124
汤氏团扇鳐 <i>P. tangi</i>	未检出 undetected

2.3 数字 PCR 定量结果

数字 PCR 监测结果显示, 于 2018 年 7 月 14 日采集的水样中检测到的 eDNA 浓度最高, 其次是 2017 年 12 月 19 日采集的水样 (表 5)。于 2018 年 4 月 13 日期间采集的水样中, 仅在少数站位检出中国团扇鳐 eDNA, 且浓度较低 (图 3)。

2.4 显著性分析

同一时间不同采样点对中国团扇鳐 eDNA 浓度的影响 单因子方差分析结果显示, 2017

表 5 不同采样点的中国团扇鲷 eDNA 浓度

Tab. 5 eDNA concentration of *P. sinensis* from different stations

采样点 stations	eDNA浓度/(个/4 μL) eDNA concentration		
	2017-12-19	2018-04-13	2018-07-14
A	U	U	U
B1	21 ± 4.4	7 ± 3.6	43.3 ± 7.5
B2	24 ± 4.6	6.3 ± 2.5	80.7 ± 9.1
C1	14.3 ± 3.1	U	35 ± 5.3
C2	27 ± 4.6	U	122 ± 14.1
D	24.7 ± 5.5	U	42.3 ± 9.1

注: U表示低于检测极限, 表内数字为均值±标准差。
Notes: U indicates below the detection limit, the number are expressed as AVE ± SD.

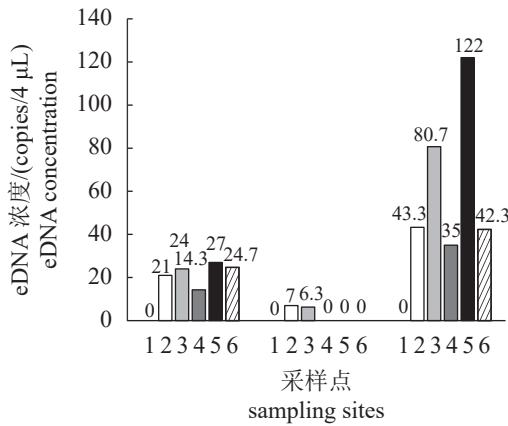


图 3 不同时间、不同地点的中国团扇鲷 eDNA 浓度
横坐标数字代表采样位点: 1. A, 2. B1, 3. B2, 4. C1, 5. C2, 6. D.

Fig. 3 eDNA concentration of *P. sinensis* at different time and stations

The numbers in the horizontal coordinates represent the sampling sites: 1. A, 2. B1, 3. B2, 4. C1, 5. C2, 6. D.

年12月19日、2018年4月13日、2018年7月14日 A、B1、B2、C1、C2、D等6个采样点之间的 eDNA 分子拷贝数之间皆存在极显著差异(表 6)。

同一采样点在不同采样时间内的差异使用单因素方差分析同一采样点在不同采样时间内

表 6 各采样点间 eDNA 浓度差异显著性分析

Tab. 6 Significance analysis of eDNA concentration difference among each sampling stations

采样时间 sampling date	F值 F-value	P值 P-value
2017-12-19	18.1	3.21×10 ⁻⁵
2018-04-13	11.08	3.56×10 ⁻⁴
2018-07-14	71.21	1.69×10 ⁻⁸

的差异结果如表 7 所示。除 A 采样点外, 其余 4 个采样点在 3 个采样时间组间均存在极显著差异。上述显著性分析表明, 季节和采样点底质可能是影响中国团扇鲷 eDNA 浓度的因素。

表 7 不同采样时间 eDNA 浓度差异显著性分析

Tab. 7 Significance analysis of eDNA concentration difference among different sampling date

采样点 sampling stations	F值 F-value	P值 P-value
A	65 535.00	—
B1	34.22	5.24×10 ⁻⁴
B2	123.77	1.33×10 ⁻⁵
C1	74.63	5.77×10 ⁻⁵
C2	167.99	5.40×10 ⁻⁵
D	24.51	1.30×10 ⁻³

3 讨论

3.1 中国团扇鲷的特异性引物和探针

使用特异性引物和探针监测单一物种是 eDNA 技术重要的应用之一。相比于扩增序列非特异性检测方法(如 SYBR green I 染料法), 特异性检测方法(如使用 TaqMan 探针)具有更强的特异性和更高的稳定性, 能够更好地排除假阳性结果的产生^[26]。目前基于 TaqMan 探针的 eDNA 检测技术已被广泛应用于各类水生生物。Ficetola 等^[27]对入侵物种美国牛蛙 (*Rana catesbeiana*) 的研究表明, 即使目标水域内的牛蛙数量很少, 亦可通过 eDNA 方式将其检测出来, 并且首次证明了 eDNA 方法在水生生态系统进行研究的可行性。Tillotson 等^[28]使用 TaqMan 探针在小溪中发现了 eDNA 浓度与红鲑 (*Oncorhynchus nerka*) 丰度之间存在强烈的定量关系。Knudsen 等^[29]针对大西洋鲱 (*Clupea harengus*)、大西洋鳕 (*Gadus morhua*)、欧洲比目鱼 (*Platichthys flesus*)、欧洲鳎 (*Pleuronectes platesa*) 和大西洋鲭 (*Scomber scombrus*) 开发和测试了 TaqMan 探针, 并成功应用于这些物种在波罗的海的检测。李苗等^[30]在建立和优化使用 eDNA 检测技术评估中国明对虾 (*Fenneropenaeus chinensis*) 生物量时也建议采用 TaqMan 探针法。最近, Wang 等^[9-11]使用 TaqMan 探针在东海成功监测到大黄鱼、小黄鱼以及入侵物种—眼斑拟石首鱼 (*Sciaenops ocellatus*) 的分布。本研究中, 将中国团扇鲷和汤氏团扇鲷的 COI 序列进行比对,

设计了中国团扇鳐的特异性引物和 TaqMan 探针。在引物探针的特异性验证过程中, 仅有中国团扇鳐样品检测出阳性信号。表明所设计的引物和 TaqMan 探针有效, 可用于舟山近海中国团扇鳐资源的定性与定量检测。

3.2 eDNA 检测技术的高灵敏度

本实验使用 eDNA 定量检测技术, 证明了该技术用于中国团扇鳐资源监测的可行性。根据中国团扇鳐定置网样品采集情况, 推测舟山近海中国团扇鳐资源量较少。定置网 A、B、C 等 3 个采样点的最大捕获量为 92 d21 尾, 平均每天 0.228 3 尾。但 eDNA 定量分析结果仍成功检测出了中国团扇鳐阳性信号。eDNA 定量检测技术在目标物种密度较低的情况下具有很高的灵敏度。这与已有的 eDNA 定量检测结果一致^[31-34]。然而, eDNA 定量检测技术的高灵敏度是有限度的。2018 年 7 月 14 日, 定置网 A 中出现一尾重量为 370.6 g 的中国团扇鳐, ddPCR 检测却并没有检出中国团扇鳐 eDNA 的存在。水体中的 eDNA 分子可能受到了水体体积、水体流速、水样采集点与定置网距离等诸多因素的影响, 导致水样中未能采集到中国团扇鳐 eDNA 分子。

3.3 栖息环境对中国团扇鳐分布的影响分析

底质对中国团扇鳐的分布影响显著。本次实验进行了 3 个时间点的样品采集。A 点 3 次取样都未能检测到水体中存在中国团扇鳐 eDNA, 该点是中国团扇鳐的一个“盲区”。单因子方差分析结果显示, A、B1、B2、C1、C2、D 6 个采样点之间的 eDNA 分子拷贝数存在极显著差异。造成 A 点中国团扇鳐数量较少的原因, 可能是因为 A 点的底质以“礁石、碎砾”为主(肉眼可见), 而其他采样点虽有礁石, 但却有面积较大的细沙。表明中国团扇鳐对栖息环境存在不同喜好, 这与已报道的中国团扇鳐的“喜沙”生态习性相一致^[35]。

水深对中国团扇鳐的分布亦有影响。B1、B2、C1、C2、D 5 个采样点中, 以 D 点的泥沙数量最多、粒径最细, 但该点的 eDNA 分子拷贝数却并非最高——B2、C2 2 处的 eDNA 浓度都高于或略高于该点。造成这种现象的原因, 很可能是 D 点的水深较浅(30~50 cm), 而 B2、C2 采样点由于离沙滩较远, 导致水下坡度急剧增大, 说明中国团扇鳐会寻找泥沙和水深的最适点。有研究表明, 中国团扇鳐主要栖息于水深 60 m 的海底^[33-34]。本

研究虽然在近岸水域发现并捕捞到中国团扇鳐个体, 但并未对其他水深区域进行 eDNA 调查, 离岸较远的深水区可能有更多数量的中国团扇鳐分布。

中国团扇鳐具有喜温性。同一采样点不同采样时间内的差异分析表明, 除 A 点外, 其余 5 个 eDNA 采样点中的任意一点在 2017 年 12 月 19 日、2018 年 4 月 13 日、2018 年 7 月 14 日 3 个时间组间均存在显著差异。这意味着季节对中国团扇鳐的分布具有极显著的影响。该特点在 C2 点表现得尤为典型: 4 月海水表面温度最低时(15.7 °C), 其 eDNA 浓度低于检测极限; 而 7 月水温较高时(26.6 °C)时, 其 eDNA 浓度高达(122.0 ± 14.1) 个/4 μL。定置网结果与 eDNA 结果比较相似, 均表明在“2017 年 12 月 20 日—2018 年 4 月 13 日”冬季到初春期间海水温度的降低, 造成了中国团扇鳐数量的减少。

近年来, 全球变暖影响了许多鱼种原有的栖息环境^[36-38], 使得许多鱼类的分布范围发生变动^[39-42]。此外, 黑潮暖流也是影响中国近海鱼类分布的重要因素^[43-45], 不同的水流和水团具有不同的温度和盐度特征, 从而影响鱼类的洄游^[46]。这些因素可能是中国团扇鳐向北迁移的重要原因。本研究中, 基于样品采集和环境 DNA 两种调查方式, 证实了中国团扇鳐在舟山海域 3 个季节的存在, 表明舟山海域环境适合于该鱼种栖息。尽管舟山是目前为止记录中国团扇鳐分布的最北界^[35], 但由于中国团扇鳐对栖息环境具有偏好性以及其它环境因素的存在, 长江径流、苏北浅滩^[47-49]等水流、底质环境因素是否会影响中国团扇鳐在舟山以北的分布尚不得而知, 需要进一步研究。

感谢舟山朱家尖东荷嘉园贺敏光先生帮助采样。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Stewart K A. Understanding the effects of biotic and abiotic factors on sources of aquatic environmental DNA[J]. *Biodiversity and Conservation*, 2019, 28(5): 983-1001.
- [2] Jerde C L, Mahon A R, Chadderton W L, et al. "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA[J]. *Conservation Letters*, 2011, 4(2): 150-157.

- [3] Yamamoto S, Masuda R, Sato Y, *et al.* Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7: 40368.
- [4] Smart A S, Weeks A R, Rooyen A R, *et al.* Assessing the cost-efficiency of environmental DNA sampling[J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2016, 7(11): 1291-1298.
- [5] Schadewell Y, Adams C I M. Forensics meets ecology – environmental DNA offers new capabilities for marine ecosystem and fisheries research[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2021, 8: 668822.
- [6] Hansen B K, Bekkevold D, Clausen L W, *et al.* The sceptical optimist: Challenges and perspectives for the application of environmental DNA in marine fisheries[J]. *Fish and Fisheries*, 2018, 19(5): 751-768.
- [7] Parsons K M, Everett M, Dahlheim M, *et al.* Water, water everywhere: Environmental DNA can unlock population structure in elusive marine species[J]. *Royal Society Open Science*, 2018, 5(8): 180537.
- [8] Goutte A, Molbert N, Guérin S, *et al.* Monitoring freshwater fish communities in large rivers using environmental DNA metabarcoding and a long-term electrofishing survey[J]. *Journal of Fish Biology*, 2020, 97(2): 444-452.
- [9] Wang X Y, Lu G Q, Zhao L L, *et al.* Assessment of fishery resources using environmental DNA: the large yellow croaker (*Larimichthys crocea*) in the East China Sea[J]. *Fisheries Research*, 2021, 235: 105813.
- [10] Wang X Y, Zhang H B, Lu G Q, *et al.* Detection of an invasive species through an environmental DNA approach: The example of the red drum *Sciaenops ocellatus* in the East China Sea[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 815: 152865.
- [11] Wang X Y, Lu G Q, Zhao L L, *et al.* Assessment of fishery resources using environmental DNA: small yellow croaker (*Larimichthys polyactis*) in East China Sea[J]. *PLoS One*, 2020, 15(12): e0244495.
- [12] Wilcox T M, Young M K, McKelvey K S, *et al.* Fine-scale environmental DNA sampling reveals climate-mediated interactions between native and invasive trout species[J]. *Ecosphere*, 2018, 9(11): e02500.
- [13] Sigsgaard E E, Nielsen I B, Carl H, *et al.* Seawater environmental DNA reflects seasonality of a coastal fish community[J]. *Marine Biology*, 2017, 164(6): 128.
- [14] Bylemans J, Gleeson D M, Duncan R P, *et al.* A performance evaluation of targeted eDNA and eDNA metabarcoding analyses for freshwater fishes[J]. *Environmental DNA*, 2019, 1(4): 402-414.
- [15] Harper L R, Lawson Handley L, Hahn C, *et al.* Needle in a haystack? A comparison of eDNA metabarcoding and targeted qPCR for detection of the great crested newt (*Triturus cristatus*)[J]. *Ecology and Evolution*, 2018, 8(12): 6330-6341.
- [16] Brys R, Halfmaerten D, Neyrinck S, *et al.* Reliable eDNA detection and quantification of the European weather loach (*Misgurnus fossilis*)[J]. *Journal of Fish Biology*, 2021, 98(2): 399-414.
- [17] McKee A M, Spear S F, Pierson T W. The effect of dilution and the use of a post-extraction nucleic acid purification column on the accuracy, precision, and inhibition of environmental DNA samples[J]. *Biological Conservation*, 2015, 183: 70-76.
- [18] Doi H, Akahara T, Minamoto T, *et al.* Droplet digital polymerase chain reaction (PCR) outperforms real-time PCR in the detection of environmental DNA from an invasive fish species[J]. *Environmental Science and Technology*, 2015, 49(9): 5601-5608.
- [19] Mauvisseau Q, Davy-Bowker J, Bulling M, *et al.* Combining ddPCR and environmental DNA to improve detection capabilities of a critically endangered freshwater invertebrate[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 14064.
- [20] Wood S A, Pochon X, Laroche O, *et al.* A comparison of droplet digital polymerase chain reaction (PCR), quantitative PCR and metabarcoding for species-specific detection in environmental DNA[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2019, 19(6): 1407-1419.
- [21] 刘金海. 闽南近海中国团扇鲷 *Platyrrhina sinensis* (Bloch *et* Schneider, 1801) 生殖及生化生态研究 [D]. 厦门: 厦门大学, 2006.
Liu J H. Research on the reproduction and biochemistry-ecology of *Platyrrhina sinensis* in Minnan marine water[D]. Xiamen: Xiamen University, 2006 (in Chinese).
- [22] 杜建国, 陈明茹, 杨圣云. 闽南近海中国团扇鲷和氏氏团扇鲷肌肉中水分含量、灰分含量及能值的分析[J]. 台湾海峡, 2009, 28(4): 509-515.
Du J G, Chen M R, Yang S Y. Water content, ash con-

- tent and calorific value of *Platyrrhina sinensis* and *Platyrrhina limboonkengi* in coastal waters of southern Fujian[J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2009, 28(4): 509-515 (in Chinese).
- [23] 刘金海, 杨圣云, 陈明茹. 闽南近海中国团扇鲷年龄与生长研究[J]. *海洋渔业*, 2011, 33(2): 144-150.
Liu J H, Yang S Y, Chen M R. On age and growth characteristics of *Platyrrhina sinensis*[J]. *Marine Fisheries*, 2011, 33(2): 144-150 (in Chinese).
- [24] Chen Z, Wang X Y, Zhang J, *et al.* First record of the Chinese fanray, *Platyrrhina sinensis* (Elasmobranchii: Myliobatiformes: Platyrrhinidae), in the seawaters of Zhujiajian, Zhoushan, China[J]. *Acta Ichthyologica et Piscatoria*, 2018, 48(4): 409-414.
- [25] Ward R D, Zemlak T S, Innes B H, *et al.* DNA barcoding Australia's fish species[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2005, 360(1462): 1847-1857.
- [26] Jamnikar Ciglencečki U, Grom J, Toplak I, *et al.* Real-time RT-PCR assay for rapid and specific detection of classical swine fever virus: comparison of SYBR Green and TaqMan MGB detection methods using novel MGB probes[J]. *Journal of Virological Methods*, 2008, 147(2): 257-264.
- [27] Ficetola G F, Miaud C, Pompanon F, *et al.* Species detection using environmental DNA from water samples[J]. *Biology Letters*, 2008, 4(4): 423-425.
- [28] Tillotson M D, Kelly R P, Duda J J, *et al.* Concentrations of environmental DNA (eDNA) reflect spawning salmon abundance at fine spatial and temporal scales[J]. *Biological Conservation*, 2018, 220: 1-11.
- [29] Knudsen S W, Ebert R B, Hesselsoe M, *et al.* Species-specific detection and quantification of environmental DNA from marine fishes in the Baltic Sea[J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2019, 510: 31-45.
- [30] 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[J]. *渔业科学进展*, 2020, 41(1): 51-57.
Li M, Shan X J, Wang W J, *et al.* Studying the retention time of *Fenneropenaeus chinensis* eDNA in water[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 51-57 (in Chinese).
- [31] Foote A D, Thomsen P F, Sveegaard S, *et al.* Investigating the potential use of environmental DNA (eDNA) for genetic monitoring of marine mammals[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e41781.
- [32] Tréguier A, Paillisson J M, Dejean T, *et al.* Environmental DNA surveillance for invertebrate species: advantages and technical limitations to detect invasive crayfish *Procambarus clarkii* in freshwater ponds[J]. *Journal of Applied Ecology*, 2014, 51(4): 871-879.
- [33] Biggs J, Ewald N, Valentini A, *et al.* Using eDNA to develop a national citizen science-based monitoring programme for the great crested newt (*Triturus cristatus*)[J]. *Biological Conservation*, 2015, 183: 19-28.
- [34] Minamoto T, Fukuda M, Katsuhara K R, *et al.* Environmental DNA reflects spatial and temporal jellyfish distribution[J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0173073.
- [35] Iwatsuki Y, Miyamoto K, Nakaya K, *et al.* A review of the genus *Platyrrhina* (Chondrichthys: Platyrrhinidae) from the northwestern Pacific, with descriptions of two new species[J]. *Zootaxa*, 2011, 2738(1): 26.
- [36] Miller K G, Browning J V, Schmelz W J, *et al.* Cenozoic sea-level and cryospheric evolution from deep-sea geochemical and continental margin records[J]. *Science Advances*, 2020, 6(20): eaaz1346.
- [37] Trisos C H, Merow C, Pigot A L. The projected timing of abrupt ecological disruption from climate change[J]. *Nature*, 2020, 580(7804): 496-501.
- [38] The IMBIE Team. Mass balance of the Greenland Ice Sheet from 1992 to 2018[J]. *Nature*, 2020, 579(7798): 233-239.
- [39] 王跃中, 孙典荣, 贾晓平, 等. 捕捞压力和气候变化对东海马面鲈渔获量的影响[J]. *南方水产科学*, 2013, 9(1): 8-15.
Wang Y Z, Sun D R, Jia X P, *et al.* Influence of fishing pressure and climate change on filefish catches in East China Sea[J]. *South China Fisheries Science*, 2013, 9(1): 8-15 (in Chinese).
- [40] Farrell A P. Environment, antecedents and climate change: Lessons from the study of temperature physiology and river migration of salmonids[J]. *Journal of Experimental Biology*, 2009, 212(23): 3771-3780.
- [41] Hermant M, Lobry J, Bonhommeau S, *et al.* Impact of warming on abundance and occurrence of flatfish populations in the Bay of Biscay (France)[J]. *Journal of Sea Research*, 2010, 64(1-2): 45-53.

- [42] Drinkwater K F. The response of Atlantic cod (*Gadus morhua*) to future climate change[J]. *ICES Journal of Marine Science*, 2005, 62(7): 1327-1337.
- [43] Hsieh H Y, Lo W T. Mesoscale distribution and assemblage structure of fish larvae in the Kuroshio waters off eastern Taiwan[J]. *Marine Biodiversity*, 2019, 49(4): 1971-1986.
- [44] Lu H J, Lee H L. Changes in the fish species composition in the coastal zones of the Kuroshio Current and China Coastal Current during periods of climate change: Observations from the set-net fishery (1993-2011)[J]. *Fisheries Research*, 2014, 155: 103-113.
- [45] Xu Y, Ma L, Sun Y, *et al.* Spatial variation of demersal fish diversity and distribution in the East China Sea: Impact of the bottom branches of the Kuroshio Current[J]. *Journal of Sea Research*, 2019, 144: 22-32.
- [46] 李圣法, 程家骅, 严利平. 东海大陆架鱼类群落的空间结构[J]. *生态学报*, 2007, 27(11): 4377-4386.
- Li S F, Cheng J H, Yan L P. Spatial structures of fish communities on the continental shelf of the East China Sea[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(11): 4377-4386 (in Chinese).
- [47] 熊瑛, 钟俊生, 汤建华, 等. 苏北浅滩生态监控区鱼卵的种类组成和数量分布[J]. *海洋渔业*, 2007, 29(3): 200-206.
- Xiong Y, Zhong J S, Tang J H, *et al.* The species composition and quantity distribution of fish eggs in the shoal-water area along the northern coast of Jiangsu Province[J]. *Marine Fisheries*, 2007, 29(3): 200-206 (in Chinese).
- [48] 陆丽云, 张忍顺, 陈君. 江苏沿海辐射沙洲开发利用的前景[J]. *南京师大学报(自然科学版)*, 2002, 25(3): 18-24.
- Lu L Y, Zhang R S, Chen J. The developing and utilizing foreground of Jiangsu coastal radiate sandbanks[J]. *Journal of Nanjing Normal University (Natural Science)*, 2002, 25(3): 18-24 (in Chinese).
- [49] Chang N N, Shiao J C, Gong G C, *et al.* Stable isotope ratios reveal food source of benthic fish and crustaceans along a gradient of trophic status in the East China Sea[J]. *Continental Shelf Research*, 2014, 34: 23-34.

Qualitative and quantitative analysis of *Platyrrhina sinensis* based on eDNA methods in Zhoushan offshore

GAO Tianxiang¹, ZHANG Haobo², WANG Xiaoyan², CHEN Zhi^{3*}

(1. School of Fishery, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;

2. National Engineering Research Center for Marine Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;

3. College of Fisheries and Life Science, Hainan Tropical Ocean University, Sanya 572022, China)

Abstract: Environmental DNA (eDNA) is the general term of DNA released by organisms in ice, soil, air, water, sediment and other environments, which has been widely used in field investigation of aquatic biological resources in recent years. *Platyrrhina sinensis* is mainly distributed in the western area of the North Pacific Ocean, and the coastal area of Zhoushan may be the northern limit of its distribution. In order to explore the feasibility of eDNA technology in the detection of *P. sinensis*, the qualitative and quantitative detection of *P. sinensis* in Zhoushan offshore was carried out based on eDNA technology at the same time. In this study, the *COI* gene sequences of *P. sinensis* and *Platyrrhina tangi* were compared and analyzed. Primer Express 3.0 software was used to design specific primers and TaqMan probe of *P. sinensis*. Three fixed net survey stations A, B and C were designed in Zhujiajian offshore, Zhoushan, and samples of *P. sinensis* were collected regularly. Water samples (stations A, B1, B2, C1, C2 and D) were collected on December 19, 2017, April 14, 2018 and July 14, 2018, respectively, and eDNA droplet digital PCR detection was carried out. Significant difference analysis was conducted between eDNA detection results and water temperature and sampling sites. The results showed that: the concentrations of eDNA of *P. sinensis* were different at different stations and at different times. The effects of water sampling sites on eDNA concentration of *P. sinensis* were significant, and there were significant differences in eDNA at different sampling sites in different seasons. This study showed that eDNA detection was sensitive. Water temperature, water depth and substrate quality all affected the distribution of *P. sinensis*. The results of this study lay a foundation for eDNA tracking and monitoring of *P. sinensis* in other sea areas.

Key words: *Platyrrhina sinensis*; environmental DNA, eDNA; cytochrome c oxidase subunit I (*COI*) gene; TaqMan; droplet digital PCR

Corresponding author: CHEN Zhi. E-mail: change@139.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (41806180, 32002389); the Key Research and Development Program of Zhejiang Province (2021C02047)