

环境 DNA 技术在软体动物资源中的应用

陈金萍, 李雄辉, 周春花*, 欧阳珊, 吴小平* (南昌大学生命科学学院, 江西南昌 330031)

摘要 环境 DNA (environmental DNA, eDNA) 是指有机体与外界进行物质交换 (摄食、排泄等) 时脱落的 DNA 片段。eDNA 技术是指从环境样品 (土壤、沉积物、水体等) 中直接提取 DNA 片段后, 利用测序技术对生物进行定性或定量分析。与传统方法相比, eDNA 技术具有效率高、分辨率高、采样无损性等优点。环境 DNA 技术自问世以来, 受到了广泛的应用, 主要应用于水生生物的生物监测、保护生物学 (单 (多) 种检测、丰度估计)、入侵生物学 (早期物种检测、被动监视) 和环境监测等。综述了环境 DNA 技术在软体动物研究中的取样方法、研究进展、优势、局限, 以及该方法在软体动物入侵物种防治、濒危物种保护、物种多样性评价和生物量检测中的研究现状, 同时对环境 DNA 在软体动物资源中的应用前景进行了展望, 以期对软体动物资源多样性的研究和保护提供新的技术和手段。

关键词 环境 DNA; 软体动物; 取样方法; 应用; 研究现状

中图分类号 Q 958.1 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2021)14-0022-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2021.14.006



开放科学 (资源服务) 标识码 (OSID):

Application of Environmental DNA Technology in the Study of Molluscs Resources

CHEN Jin-ping, LI Xiong-hui, ZHOU Chun-hua et al (School of Life Sciences, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330031)

Abstract Environmental DNA (eDNA) refers to DNA fragments that organisms shed in their surrounding environment when in exchange for material (ingestion, excretion, etc.) with outside, eDNA technology refers to the direct extraction of DNA fragments from environmental samples (soil, sediment and water, etc.), and the use of sequencing technology for qualitative or quantitative analysis of organisms. Compared with traditional methods, eDNA technology is more high efficiency, high resolution and no damage in sampling. eDNA technology has been widely used since it came into being. Mainly used for biomonitoring, conservation biology (single and multi-species detection, abundance estimates), invasion biology (early species detection, passive surveillance) and environmental assessment. This article reviewed the sampling method, research progress, advantages and limitations of eDNA technology in the research of mollusks, and the research status of this method in the prevention and control of mollusks invasion, the protection of endangered species, the evaluation of biodiversity and biomass. At the same time, the application prospect of eDNA in mollusks resources was prospected, it can provide new technique and methods for the research and protection of mollusks' biodiversity.

Key words Environmental DNA; Mollusks; Sampling method; Application; Research status

软体动物分布于淡水、海水、陆地上, 在生态系统中扮演着极其重要的作用, 如维持生态平衡、净化水环境等。但是由于近年来城市工业的迅速发展, 水域受到人为污染, 而软体动物一般迁移性较差, 一旦遭到水质污染, 较难回避。再加上外来物种入侵、气候变化等加剧了软体动物所面临的威胁^[1]。而之前的传统调查方法有一定的局限性, 对环境有较大的破坏性^[2], 所以急需一种行之有效的方法——环境 DNA (environmental DNA, eDNA) 技术来检测和管理软体动物资源。eDNA 技术的最大优势就是非侵入性取样, 对目标物种及周围环境不造成伤害。现在, 禁渔政策已开展, 所以该技术对于研究水体中生物尤为重要。

eDNA 是指从环境 (如土壤、水体沉积物、粪便等) 样品中提取的 DNA, 因为动物会与外界进行物质交换, 所以自身的皮毛、细胞组织、黏液等会在环境中保存一段或者很久时间, 这样就能提取 DNA 成功进行遗传检测^[3]。eDNA 技术是指从环境样品 (土壤^[4]、沉积物^[5]、水体^[6-8] 等) 中直接提取 DNA 片段后, 利用测序技术对生物进行定性或定量分析的方法^[9]。近年来, eDNA 技术已应用于不同生态系统的物种多样性研究、资源生物量检测、濒危种和入侵种的检测; 在国

外, 各种生物的检测也用到该技术, 如两栖类^[10-11]、鱼类^[12-14]、腹足类^[15] 等。笔者主要对 eDNA 技术在软体动物资源研究中的方法、优势以及局限、展望等进行了综述, 以期该类生物多样性的研究和保护提供新的技术和方法。

1 eDNA 技术在软体动物研究中的取样方法

1.1 eDNA 水样的采集及处理 eDNA 技术中采样是极为重要的一步。水样主要来源于实验室水箱、池塘、溪流、湖泊和海洋等。水样采集方法可分为沉淀法和过滤法。沉淀法适用于少量水样采集, 采样量通常为 15 mL^[10,16]; 过滤法适用于流水或静水的大型无脊椎动物, 需要大量水样^[3], 在软体类的研究中, 每个样点的采水量一般为 1~2 L^[12,17-18]。滤膜的种类有很多, 研究表明, 不同的滤膜具有不同的 DNA 回收率, 其中使用混合纤维滤膜或硝酸纤维素滤膜的 DNA 回收效果最佳^[19]。滤膜有很多种孔径, 对于清澈的溪流和海水, 0.45 μm 孔径最合适^[16]。

1.2 样品 DNA 提取 eDNA 提取主要有 CTAB 提取法、试剂盒提取法等。CTAB 提取法是将水样加至 33 mL 的无水乙醇和 1.5 mL 的 3 mol/L 醋酸钠, 再加入一定量的 CTAB 缓冲液、蛋白酶 K 缓冲液、一定比例的苯酚: 氯仿: 异戊醇, 其中经过离心等步骤。试剂盒提取法是指先用真空泵抽滤有 DNA 的滤膜, 再用试剂盒提取, 纯化 DNA, 把杂质去除。提取软体动物环境 DNA 的试剂盒的种类有很多, 提取双壳类的 DNA 一般采用 Qiagen DNeasy® Blood and Tissue Kits, 提取蜗牛的 DNA 采用 Omega Bio-tek E.Z.N.® Mollusc DNA 试剂盒^[20]。

基金项目 国家重点研发计划“蓝色粮仓”重点专项 (2018YFD09-00801)。

作者简介 陈金萍 (1995—), 女, 江西上饶人, 硕士研究生, 研究方向: 环境 DNA 水生生物。* 通信作者: 周春花, 副教授, 博士, 硕士生导师, 从事种群遗传研究; 吴小平, 教授, 博士, 博士生导师, 从事生物多样性研究。

收稿日期 2020-10-23

1.3 eDNA 分析

分析包括引物设计、PCR、高通量测序。①针对不同的目标物种选取 DNA 基因片段(软体动物环境 DNA 研究通常用的是线粒体 DNA 片段,通常有 16S rRNA^[20-21]、18S rRNA^[5]、COI^[22-23])来设计引物,用 Primer 5、QPrimer、Primer-BLAST 等软件来设计,一般来说,ecoPrimer 软件更常用,因为它可以基本满足环境 DNA 引物的要求^[24]。

②PCR 扩增,在 eDNA 分析方法中,PCR 的类型非常多,如普通 PCR^[25-26]、定量 PCR^[22,27-28]、巢式 PCR、数字 PCR^[6]等,最常用的是普通 PCR、定量 PCR(qPCR)^[29]。

③高通量测序及数据处理,先进行去噪,即除去低质量的序列,这些序列包括嵌合体/长度过短/重复的序列;聚类分析,即根据序列相似度进行归类,获得可操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs),每个 OTUs 应该只包含一个物种的序列;物种分类学注释,把这些 OTUs 在数据库中进行比对;数据分析,如 α -多样性分析、物种丰度分析、差异显著性统计检验分析等。

2 环境 DNA 技术在软体动物资源研究中的应用

2.1 软体动物濒危种和入侵种的检测

eDNA 技术应用较广,特别是对于濒危软体动物,因为濒危物种密度很低,传统方法(蚌耙、采泥器等)难以监测到,eDNA 技术避免了这些问题。针对濒危物种检测,需要设计一些特异性引物,既要保证濒危物种能被检测到,又要保证其他的尤其是亲缘关系较近的物种不会被检测到。研究者大多都是利用 COI 基因片段来扩增^[30]。目前,通过 eDNA 分析检测方法已经实现了对淡水珍珠蚌种群^[22]、珠母珍珠蚌(*Margaritifera margaritifera* L.)^[31]、淡水蚌(*Lampsilis fasciola*、*Ligumia nasuta*、*Ptychobranchus fasciolaris*、*Quadrula quadrula*)^[32]等物种的检测,证实了环境 DNA 监测方法在濒危物种和稀有物种的监测中颇具潜力。

目前外来物种的入侵情况日趋严重,当外来物种入侵时,它们对原本的生态平衡破坏较大,使生态系统结构不完善,从而对本地物种的种类和数量产生影响^[10]。但是在入侵早期阶段,外来物种的数量不多,很难发现,一旦发现时,就已经造成了危害,而 eDNA 技术使入侵物种的早期检测成为可能,如 Egan 等^[33]、Ardura 等^[34]在太平洋里海地区监测到了斑马贻贝(*Dreissena polymorpha*),并遏制它进一步传播;Clusa 等^[35]、Goldberg 等^[15]监测了新西兰泥螺(*Potamopyrgus antipodarum*)早期入侵;同样,Blackman 等^[36]设计特异性的引物来检测 *Dreissena rostriformis bugensis* 和 *D. polymorpha* 这 2 种入侵蚌在现场试验中的降解速率,从而可以初步判断它们入侵时间;除此之外,在入侵早期就有效遏制的还有金贻贝(*Limnoperna fortunei*)^[37]。

除了能在早期检测到入侵物种之外,eDNA 分析技术还能判断它们的入侵程度,Peñarrubia 等^[38]对伊比利亚半岛水域的扁贻贝(*Dreissena rostriformis*)进行了定量分析,判断了该蚌的入侵程度;Ardura 等^[39]在波罗的海发现北美楔蛤(*Rangia cuneata*)已经蔓延到了整个欧洲;Clusa 等^[40]检测河蚬(*Corbicula fluminea*)、背角无齿蚌(*Sinanodonta woodiana*)等贝类在伊比利亚河流的分布情况,发现其种群在扩张;

Klymus 等^[20]检测双壳纲和腹足纲某些类群的入侵程度,结果表明 eDNA 方法可以显著加强入侵物种的识别能力。eDNA 技术还可以检测到物种是如何入侵的,如欧洲泥螺(*Peringia ulvae*)^[41],通过压舱水入侵新环境。近年来利用 eDNA 对濒危物种进行检测的研究越来越多^[42],而对于入侵物种的研究一直是热门问题,eDNA 对濒危物种和入侵物种检测的有效性已经得到一定的证明,它能突破传统方法的局限性^[15],并且检测的效果与传统方法一致或略高于传统方法^[2,43-44]。

2.2 软体动物物种多样性检测

物种多样性的检测方法有很多,这些方法通常是特定的生物群体设计的,随着 eDNA 技术愈加成熟,将它应用于软体动物物种多样性研究成为一种新潮流。软体动物是淡水生态系统的一个重要组成部分,它们对环境变化很敏感,当生境条件下降时,软体动物往往是第一个被清除的动物,因此它们可以作为生态系统的物种多样性的检测指标。Deiner 等^[45]研究采样和提取方法如何影响淡水生物多样性,以蚌类(*Unio tumidus* 等 4 种生物)为目标,检测这些物种 eDNA 的检出率来判断哪种采样和提取方法最好,结果发现过滤和 PCI(酚-氯仿-异戊醇)提取法效果最好;Prié 等^[21]分别对蚌目和帘蛤目设计了 eDNA 通用引物 16S rRNA 来检测双壳类的生物多样性,并且与传统方法进行比较,结果发现 eDNA 分析的物种检出率更高。总之,环境 DNA 分析技术为生物多样性研究提供新的工具^[46]。

2.3 软体动物生物量检测

eDNA 对物种进行定量分析主要是检测物种存在与否,进而来判断其生物量^[18],然而估计物种生物量较复杂,虽然有部分研究表明,水体中环境 DNA 的浓度与目标物种的生物量呈正相关^[11,13],如 Carlsson 等^[27]研究发现在爱尔兰的某条河,珍珠蚌(*Margaritifera margaritifera*)数量最多的地方 eDNA 浓度也最高,并且预测了该属种群数量;Miralles 等^[26]在伊比利亚北部的某河研究发现侏儒贻贝(*Xenostrobus securis*)数量与 eDNA 的 PCR 产物量呈正相关。总之,eDNA 的浓度受到很多条件(温度、紫外线、微生物群落、DNA 降解速率等^[7,16])的影响,所以 eDNA 浓度与生物量之间的关系很复杂,既然这两者关系不好推测,那么有的研究者通过建立蚌类 eDNA 的下游传输模型来量化 eDNA 浓度与目标物种密度之间的联系^[28,47]。总之,研究者一直致力于研究一套 eDNA 浓度与生物量关系的模型,鱼类^[12-13]就有成功的例子,并且准确度较高。但是软体动物的生物量监测有一定的困难,因此 eDNA 技术进行软体动物生物量的检测还需探索。

3 eDNA 分析技术在软体动物研究中的优势与局限

eDNA 分析技术在软体动物研究中的优势如下:①省时、省力,监测效率高;②不会对生态系统或目标物种造成任何干扰,减少了外来物种和病原体的入侵风险;③允许在事先不知道哪些物种存在于水体中的情况下进行检测;④突破环境限制、有效性限制;⑤引物有通用性,可以用于全球生物多样性评估^[43];⑥试验操作较简单,不依赖于分类专家的专业知识来鉴定物种。

尽管如此,eDNA 技术仍存在一些局限,如 eDNA 不能区

分活的和死的生物;不能区分本地的 DNA 和异地的 DNA;不能获得目标生物体的大小、发育阶段和性别的信息;不容易准确估计调查物种的数量、密度和生物量信息;不能区分杂种和母系物种^[43]。

4 展望

eDNA 已成为阐明生态学和进化过程中的有力工具^[48]。近年来 eDNA 技术发展很快,但在软体动物中的研究起步稍晚。eDNA 技术不仅能用于监测濒危种和入侵种、评估生物量,还可以检测种群遗传^[49]、评估水生生态系统的生境^[50]等。我国的生物多样性丰富度在全球首屈一指,但是用 eDNA 技术对软体动物的多样性研究非常有限,究其原因一是软体动物的数据库不是很全面,二是研究者对软体动物的重要性认识不够,三是适合软体动物环境 DNA 研究的引物尚不成熟。所以我国要加强软体动物的研究。国外 eDNA 技术研究软体动物主要是研究入侵种和濒危种,对于软体动物生物多样性和资源量监测报道极其有限。那么今后需要加强物种多样性和资源量的检测,因为这对保护软体动物种质资源、生态环境的修复具有重要意义。当然,要用 eDNA 方法来评估物种多样性,首要就是设计针对动物类群的通用水环境 DNA 引物,因为目前通用引物大多是扩增动物组织提取的 DNA,所以是否能用来检测水环境 DNA 还需要探索。

参考文献

- [1] 蔡友琼,乔庆林,徐捷.我国贝类卫生现状及贝类净化概况[J].渔业现代化,2002,29(6):7-9.
- [2] LIM N K M,TAY Y C,SRIVATHSAN A,et al.Next-generation freshwater bioassessment:eDNA metabarcoding with a conserved metazoan primer reveals species-rich and reservoir-specific communities[J].Royal society open science,2016,3(11):1-12.
- [3] 陈焯,吴琳,刘燕,等.环境 DNA metabarcoding 及其在生态学中的应用[J].生态学报,2016,36(15):4573-4582.
- [4] CALATA F I C,CARANGUIAN C Z,MENDOZA J E M,et al.Analysis of environmental DNA and edaphic factors for the detection of the snail intermediate host *Oncomelania hupensis quadrasi*[J].Pathogens,2019,8(4):1-24.
- [5] FONSECA V G,CARVALHO G R,SUNG W,et al.Second-generation environmental sequencing unmasks marine metazoan biodiversity[J].Nature communications,2010,1(1):1-8.
- [6] HU X X.Development of genetic tools to detect three New Zealand indigenous freshwater mussels in environmental DNA [D].Hamilton,New Zealand:The University of Waikato,2017:82-90.
- [7] MÄCHLER E,OSATHANUNKUL M,ALTERMATT F,et al.Shedding light on eDNA:Neither natural levels of UV radiation nor the presence of a filter feeder affect eDNA-based detection of aquatic organisms[J].PLoS One,2018,13(4):1-15.
- [8] HOSLER D M.Where is the body? Dreissenid mussels,raw water testing, and the real value of environmental DNA[J].Management of biological invasions,2017,8(3):335-341.
- [9] 单秀娟,李苗,王伟继.环境 DNA (eDNA) 技术在水生生态系统中的应用研究进展[J].渔业科学进展,2018,39(3):23-29.
- [10] 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.
- [11] HARPER L R,HANDLEY L L,HAHN C,et al.Generating and testing ecological hypotheses at the pondscape with environmental DNA metabarcoding:A case study on a threatened amphibian[J].Environmental DNA,2019,2(2):1-47.
- [12] TAKAHARA T,MINAMOTO T,YAMANAKA H,et al.Estimation of fish biomass using environmental DNA[J].PLoS One,2012,7(4):1-8.
- [13] NEVERS M B,BYAPPANAHALLI M N,MORRIS C C,et al.Environmental DNA (eDNA):A tool for quantifying the abundant but elusive round goby (*Neogobius melanostomus*) [J].PLoS One,2018,13(1):1-22.
- [14] HAYAMI K,SAKATA M K,INAGAWA T,et al.Effects of sampling sea-

- sons and locations on fish environmental DNA metabarcoding in dam reservoirs[J].Ecology and evolution,2020,10(12):5354-5367.
- [15] GOLDBERG C S,SEPULVEDA A,RAY A,et al.Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*) [J].Freshwater science,2013,32(3):792-800.
- [16] THOMSEN P F,KIELGAST J,IVERSEN L L,et al.Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA[J].Molecular ecology,2012,21(11):2565-2573.
- [17] REES H C,MADDISON B C,MIDDLEDITCH D J,et al.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,2014,51(5):1450-1459.
- [18] 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.
- [19] MAJANEVA M,DISERUD O H,EAGLE S H C,et al.Environmental DNA filtration techniques affect recovered biodiversity [J].Scientific reports,2018,8:1-11.
- [20] KLYMUS K E,MARSHALL N T,STIEPIEN C A.Environmental DNA (eDNA) metabarcoding assays to detect invasive invertebrate species in the Great Lakes[J].PLoS One,2017,12(5):1-24.
- [21] PRIÉ V,VALENTINI A,LOPES-LIMA M,et al.Environmental DNA metabarcoding for freshwater bivalves biodiversity assessment: Methods and results for the Western Palearctic (European sub-region) [J].Hydrobiologia,2020(1):1-20.
- [22] CURRIER C A,MORRIS T J,WILSON C C,et al.Validation of environmental DNA (eDNA) as a detection tool for at-risk freshwater pearly mussel species (Bivalvia: Unionidae) [J].Aquatic conservation: Marine & freshwater ecosystems,2018,28(3):545-558.
- [23] AMBERG J J,MERKES C M.Environmental DNA Mapping of Zebra Mussel Populations [R].U.S.:Upper Midwest Environmental Sciences Center,2016.
- [24] RIAZ T,SHEHZAD W,VIARI A,et al.ecoPrimers: Inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis [J].Nucleic acids research,2011,39(21):1-11.
- [25] 刘军,赵良杰,凡迎春,等.鱼类环境 DNA 研究中通用引物的筛选验证 [J].淡水渔业,2016,46(1):9-17.
- [26] MIRALLES L,DOPICO E,DEVLO-DELVA F,et al.Controlling populations of invasive pygmy mussel (*Xenostrobus securis*) through citizen science and environmental DNA [J].Marine pollution bulletin,2016,110(1):127-132.
- [27] CARLSSON J E L,EGAN D,COLLINS P C,et al.A qPCR MGB probe based eDNA assay for European freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.) [J].Aquatic conservation: Marine & freshwater ecosystems,2017,27(6):1341-1344.
- [28] SHOGEN A J,TANK J L,EGAN S P,et al.Riverine distribution of mussel environmental DNA reflects a balance among density, transport, and removal processes[J].Freshwater biology,2019,64(8):1467-1479.
- [29] THOMSEN P F,WILLERSLEV E.Environmental DNA-An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity[J].Biological conservation,2015,183:4-18.
- [30] CHO A,MORRIS T,WILSON C,et al.Development of species-specific primers with potential for amplifying eDNA from imperilled freshwater unionid mussels[J].Genome,2016,59(12):1141-1149.
- [31] STOECKLE B C,KUEHN R,GEIST J.Environmental DNA as a monitoring tool for the endangered freshwater pearl mussel (*Margaritifera margaritifera* L.): A substitute for classical monitoring approaches? [J].Aquatic conservation: Marine and freshwater ecosystems,2016,26(6):1120-1129.
- [32] CURRIER C A.Detection of four at-risk freshwater pearly mussel species (Bivalvia: Unionoida: Unionidae) from environmental DNA (eDNA) [D].Peterborough: Trent University,2017:33-99.
- [33] EGAN S P,BARNES M A,HWANG C T,et al.Rapid invasive species detection by combining environmental DNA with light transmission spectroscopy[J].Conservation letters,2013,6(6):402-409.
- [34] ARDURA A,ZAIKO A,BORRELL Y J,et al.Novel tools for early detection of a global aquatic invasive, the zebra mussel *Dreissena polymorpha* [J].Aquatic conservation: Marine and freshwater ecosystems,2017,27(1):165-176.
- [35] CLUSA L,ARDURA A,GOWER F,et al.An easy phylogenetically informative method to trace the globally invasive *Potamopyrgus* mud snail from River's eDNA[J].PLoS One,2016,11(10):1-16.

有效改善盐胁迫对盐敏感材料胚根和根叶干重的危害,但能显著改善耐盐材料胚根和根叶干重的盐危害,恢复盐胁迫下胚根的伸长生长及侧根的发育和根叶干重。

目前很多学者针对激素与盐胁迫的调控机理做了大量的研究,但就某一种激素主要调控某个特定生理过程的研究报道较少,所以可以侧重研究不同激素主要参与的生理过程之间的对应关系,为今后通过激素手段增强植物特定抗性提供依据^[23]。该试验在 0.1 mol/L NaCl 胁迫下外源 IAA 对盐危害的缓解作用根叶处理的发芽势和发芽率较对照大,抗盐品种的缓解作用要比盐敏感品种大。这是由不同植物生长调节剂固有的特性和作用所致,而植物的抗逆性是多种指标综合反应的结果,因此下一步将探究外源钙和 IAA 结合对盐胁迫的控制作用。

4 结论

(1) 0.1 mol/L NaCl₂ 对水稻种子的发芽势和发芽率影响不显著,但显著抑制胚根的生长,降低根叶干重。

(2) 外源激素对盐胁迫的调控浓度效应主要体现在不同品种不同指标对 IAA 浓度的响应。

(3) 外源 IAA 只对 0.1 mol/L NaCl₂ 胁迫下的胚根生长和根叶干重的盐危害有缓解作用。

参考文献

- [1] 潘瑞琦.植物生理学[M].北京:高等教育出版社,2003:292-293.
- [2] CHITTEI B R, PENG Z H. Proteome and phosphoproteome differential expression under salinity stress in rice (*Oryza sativa*) roots[J]. J Proteome Res, 2007, 6(5): 1718-1727.
- [3] DOOKI A D, MAYER-POSNER F J, ASKARI H, et al. Proteomic responses of rice young panicles to salinity[J]. Proteomics, 2006, 6(24): 6498-6507.
- [4] PARKER R, FLOWERS T J, MOORE A L, et al. An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina[J]. J Exp Bot, 2006, 57(5): 1109-1118.
- [5] WALIA H, WILSON C, ZENG L H, et al. Genome-wide transcriptional analysis of salinity stressed japonica and indica rice genotypes during panicle initiation stage[J]. Plant Mol Biol, 2007, 63(5): 609-623.

- [6] 龚记熠, 彭毅秋, 张冬林, 等. 干旱胁迫对引种辣椒生长特性的影响[J]. 广东农业科学, 2014, 41(2): 54-56, 69.
- [7] 魏爱丽, 陈云昭. IAA 对盐胁迫下大豆幼苗膜伤害及抗盐力的影响[J]. 西北植物学报, 2000, 20(3): 410-414.
- [8] SAEIDI-SAR S, ABBASPOUR H, AFSHARI H, et al. Effects of ascorbic acid and gibberellin A₃ on alleviation of salt stress in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings[J]. Acta Physiol Plant, 2013, 35(3): 667-677.
- [9] 赵旭, 王林权, 周春菊, 等. 钙离子对两种基因型冬小麦萌发过程中盐胁迫效应的影响[J]. 土壤通报, 2006, 37(4): 748-751.
- [10] 杨艳波, 刘若岑, 崔欣, 等. CaCl₂ 对盐胁迫下大豆幼苗渗透调节物质含量的影响[J]. 安徽农业科学, 2016, 44(25): 33-34, 86.
- [11] 陈志杰, 张锋, 王琦. 常见植物激素的科学使用[J]. 西北园艺, 2007(1): 4-6.
- [12] 蔡蕾, 丁同楼, 王宝山. 外源 GA₃、ABA 和 Ca(NO₃)₂ 缓解盐对小麦种子萌发的抑制作用[J]. 西北植物学报, 2004, 24(4): 583-587.
- [13] 王贺正, 徐国伟, 陈明灿, 等. 外源物质对小麦芽期抗旱性的影响[J]. 作物杂志, 2012(4): 86-89.
- [14] WOLTERS H, JÜRGENS G. Survival of the flexible: Hormonal growth control and adaptation in plant development[J]. Nat Rev Genet, 2009, 10(5): 305-317.
- [15] 赵艳艳, 胡晓辉, 邹志荣, 等. 不同浓度 5-氨基乙酰丙酸 (ALA) 浸种对 NaCl 胁迫下番茄种子发芽率及芽苗生长的影响[J]. 生态学报, 2013, 33(1): 62-70.
- [16] 李振华, 王建华. 种子活力与萌发的生理与分子机制研究进展[J]. 中国农业科学, 2015, 48(4): 646-660.
- [17] 许智宏, 李家洋. 中国植物激素研究: 过去、现在和未来[J]. 植物学通报, 2006, 23(5): 433-442.
- [18] 洪丽芳, 苏帆, 付利波, 等. 生长素在烤烟钾素源关系改变时对根系呼吸作用生理指标的影响[J]. 中国农业科学, 2003, 36(12): 1604-1608.
- [19] 刘倩倩, 林红珍, 王盈盈, 等. 光对激素调控水稻幼苗主根生长的影响[J]. 山东农业科学, 2013, 45(10): 43-47.
- [20] YANG X, YANG Y N, XUE L J, et al. Rice ABI5-Like1 regulates abscisic acid and auxin responses by affecting the expression of ABRE-containing genes[J]. Plant Physiol, 2011, 156(3): 1397-1409.
- [21] 张福平, 魏玲玲. IAA 等对紫罗勒种子发芽及幼苗生长的影响[J]. 种子, 2007, 26(10): 94-97.
- [22] 叶利民, 徐芬芬, 周琴. 外源 GA₃ 对盐胁迫下水稻种子萌发的影响[J]. 湖北农业科学, 2010, 49(9): 2065-2067.
- [23] 张丽, 罗孝明, 蒙辉, 等. 盐胁迫下植物激素水的研究进展[J]. 蔬菜, 2017(3): 29-32.

(上接第 24 页)

- [36] BLACKMAN R C, BENUCCI M, DONNELLY R C, et al. Simple, sensitive and species-specific assays for detecting quagga and zebra mussels (*Dreissena rostriformis bugensis* and *D. polymorpha*) using environmental DNA [J]. Management of biological invasions, 2020, 11(2): 218-236.
- [37] XIA Z Q, ZHAN A B, GAO Y C, et al. Early detection of a highly invasive bivalve based on environmental DNA (eDNA) [J]. Biological invasions, 2018, 20(2): 437-447.
- [38] PEÑARRUBIA L, ALCARAZ C, DE VAATE A B, et al. Validated methodology for quantifying infestation levels of dreissenid mussels in environmental DNA (eDNA) samples [J]. Scientific reports, 2016, 6(1): 1-9.
- [39] ARDURA A, ZAIKO A, MARTINEZ J L, et al. eDNA and specific primers for early detection of invasive species-A case study on the bivalve *Rangia cuneata*, currently spreading in Europe [J]. Marine environmental research, 2015, 112: 48-55.
- [40] CLUSA L, MIRALLES L, BASANTA A, et al. eDNA for detection of five highly invasive molluscs. A case study in urban rivers from the Iberian Peninsula [J]. PLoS One, 2017, 12(11): 1-14.
- [41] ARDURA A, ZAIKO A, MARTINEZ J L, et al. Environmental DNA evidence of transfer of North Sea molluscs across tropical waters through ballast water [J]. Journal of molluscan studies, 2015, 81(4): 495-501.
- [42] SENAPATI D, BHATTACHARYA M, KAR A, et al. Environmental DNA (eDNA): A promising biological survey tool for aquatic species detection [J]. Proceedings of the zoological society, 2019, 72(3): 211-228.
- [43] VALENTINI A, TABERLET P, MIAUD C, et al. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding [J].

Molecular ecology, 2016, 25(4): 929-942.

- [44] DYSTHE J C, RODGERS T, FRANKLIN T W, et al. Repurposing environmental DNA samples-detecting the western pearlshell (*Margaritifera falcata*) as a proof of concept [J]. Ecology and evolution, 2018, 8(5): 2659-2670.
- [45] DEINER K, WALSER J C, MÄCHLER E, et al. Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA [J]. Biological conservation, 2015, 183: 53-63.
- [46] BLACKMAN R C, HÄNFLING B, LAWSON-HANDLEY L. The use of environmental DNA as an early warning tool in the detection of new freshwater invasive non-native species [J]. CAB reviews, 2018, 13: 1-15.
- [47] SANSOM B J, SASSOUBRE L M. Environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates to model freshwater mussel eDNA transport in a river [J]. Environmental science & technology, 2017, 51(24): 14244-14253.
- [48] GARLAPATI D, CHARANKUMAR B, RAMU K, et al. A review on the applications and recent advances in environmental DNA (eDNA) metagenomics [J]. Reviews in environmental science and bio/technology, 2019, 18: 389-411.
- [49] MOHAMMED-GEBA K, SHEIR S K, EL-AZIZ HAMED E A, et al. Molecular and morphological signatures for extreme environmental adaptability of the invasive mussel *Brachidontes pharaonis* (Fischer, 1870) [J/OL]. Molecular and cellular probes, 2020, 53 [2020-05-25]. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2020.101594>.
- [50] LIU Q, ZHANG Y, WU H, et al. A review and perspective of eDNA application to eutrophication and HAB control in freshwater and marine ecosystems [J]. Microorganisms, 2020, 8(3): 1-15.