

DOI: 10.12264/JFSC2020-0219

环境 DNA 技术在象山港水域鱼类多样性调查中的应用与评估

凌建忠, 姜亚洲, 孙鹏, 袁兴伟, 张辉, 唐保军

中国水产科学研究院东海水产研究所, 农业农村部东海与远洋渔业资源开发利用重点实验室, 上海 200090

摘要: 通过对象山港水域环境 DNA (eDNA) 样品的采集和高通量测序分析, 并结合渔业资源调查数据, 阐述象山港主要鱼类群落的种类组成和多样性特征, 探讨了环境 DNA 技术在典型海域鱼类多样性研究中的应用前景。结果显示, 共从象山港水域环境 DNA 样品中检测到 26 个常见鱼类物种, 隶属于辐鳍鱼纲(Actinopterygii)的 7 个目中的 21 个属。其中, 丰度最高的两个目为鲱形目(Clupeiformes)、鲈形目(Perciformes), 其相对丰度合计占到总鱼类物种丰度的 92.5%。在所有鱼类中, 象山港海域渔获物中资源量较高的斑鲹(*Konosirus punctatus*)和黑棘鲷(*Acanthopagrus schlegelii*) 在环境 DNA 调查中序列丰度最大, 分别占到鱼类总丰度的 45.85% 和 17.69%, 其次是髯须虾虎鱼(*Tridentiger barbatus*) 和花鲈(*Lateolabrax japonicus*), 几个门类序列丰度与渔获物种资源量组成变化趋势相似。与传统调查方法相比, 环境 DNA 测定灵敏性高、数据准确性高且成本低, 适用于相关海域的鱼类多样性研究。本研究不仅可以丰富象山港水域生态系统的结构功能信息, 还可以为系统开展该水域海洋生态系统管理与修复工作提供基础信息支持。

关键词: 环境 DNA (eDNA); 象山港; 渔业资源; 高通量测序; 鱼类多样性

中图分类号: S931

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)02-0205-10

生物多样性是生态系统维持稳定的关键因素, 也是其适应环境变化的重要指标, 准确掌握海洋环境中的生物量及其时空分布动态是开展海洋生物多样性保护的重要前提和基础^[1-2]。鱼类是海洋生态系统的关键类群之一, 其常处于海洋生物链顶端, 同时也是海洋渔业的主要利用对象, 掌握其多样性和分布特征不仅可为海洋生态系统的可持续开发和利用提供基础资料, 还能为评价海洋开发和渔业捕捞等人为干扰因素对海洋生态系统的影响提供理论依据^[3-4]。

象山港位于中国浙江省中部偏北沿海, 是一个半封闭的狭长形港湾。该海区生态环境优良, 水域生境类型多样, 既是多种渔业资源生物的集中分布区域, 又是许多经济型鱼类的繁殖和育幼场所^[5-6]。多年来, 由于过度捕捞、环境污染以及大规模的海

洋开发活动, 象山港海域的生态环境不断恶化, 渔业资源呈现衰退趋势^[7]。近年来, 科研人员虽然对象山港海域开展过鱼类资源调查^[5,8], 但整体上象山港海域生物资源研究仍不完善, 特别是鱼类群落结构特征与多样性等相关研究较为薄弱。

鱼类的皮肤、黏液和粪便等释放到环境水域中可形成游离性的环境 DNA (environment DNA, eDNA)^[9-10]。近年来, 随着生物技术的快速发展, eDNA 在水生生物多样性检测方面也得以广泛应用, 但国内针对海洋鱼类资源及其多样性的调查研究较少; 特别是在国内典型海域和典型渔场等方面的相关应用更为少见^[2]。本研究通过对象山港水域环境 DNA 样品的采集与高通量测序分析, 并结合前期渔业资源调查数据, 阐述象山港主要鱼类群落的种类组成和多样性特征, 探讨环境

收稿日期: 2020-07-27; 修订日期: 2020-08-12.

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项经费项目(201303047); 中国水产科学研究院基本科研业务费(2019ZD1102).

作者简介: 凌建忠(1970-), 男, 研究员, 研究方向为渔业资源与生态学. E-mail: lingjianzhong18@sina.com

通信作者: 孙鹏, 副研究员. E-mail: sunpeng1128@163.com

DNA 技术在典型海域鱼类多样性研究中的应用前景,以期丰富该水域生态系统的结构功能信息,并为系统地开展象山港海洋生态系统管理与修复工作提供指导。

1 材料与方法

1.1 环境样品采集

实验分析所用环境样品为 2019 年收集于宁波象山港海域(29°30'23"N, 121°35'10"E)附近的海水样品。本次调查共在调查航行过程中依次选取 5 个采集点,每个采样点(间隔 3 km 左右)以无菌可密封广口瓶采集 8 瓶 500 mL 中下层水样(距离表层约 5 m)。抽滤过程所涉及的器材需要进行无菌处理,并使用灭菌双蒸水(ddH₂O)作为阴性对照。利用直径 47 mm、孔径 0.45 μm 的硝酸纤维素滤膜过滤采集到的水样,将滤膜置于 2.0 mL 的无菌离心管中并采用干冰冷冻。样品再经干冰冻存运输至实验室后,采用海洋生物 DNA 提取试剂盒(北京天根)并参照说明书进行总 DNA 提取。为防止外源 DNA 的污染,所用提取和扩增等操作均采用新的试剂并在超净工作台中进行。所得总 DNA 经 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测,并采用紫外分光光度计定量,随后保存于-20 °C 备用。每个采样点随机选取 4 个样品(共计 20 个样品)用于高通量分析。

1.2 目的基因片段扩增与 Illumina Miseq 高通量测序

使用已报道的通用引物 MiFish-U-F: 5'-GTCGGTAAACTCGTGCCAGC-3'和 MiFish-U-R: 5'-CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG-3'^[11] 对样品 12S rDNA 区域进行 PCR 扩增,扩增片段长度约为 370 bp。PCR 反应采用 25 μL 体系,其中包含: 5×缓冲液 4 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μL, 正反引物(5 μmol/L)各 0.5 μL, Q5 高保真 Taq 酶(NEB, 北京) 0.5 μL 和 DNA 模板 10 ng。PCR 程序为: 94 °C 预变性 10 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 45 s, 最后 72 °C 延伸 10 min, 反应循环数为 30。PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳检测和纯化(AXYGEN)后,在 Illumina Miseq 测序平台(Illumina, 美国)上进行

双端测序。

1.3 数据分析

下机数据经过初步筛选,过滤去除低质量的序列并得到有效数据。再应用 QIIME 软件将拼接序列聚类为操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU),获得 OTU 代表序列。代表性 OTU 序列经 Nt 数据库进行物种注释分析,再结合象山港海域水生生物分布信息对所注释物种进行人工校对并手动去除非鱼类信息^[12-13]。并运用 QIIME 软件对所注释的 OTU 进行筛选,统计不同分类水平的物种数量和序列数量,计算物种序列的相对丰度。

2 结果与分析

2.1 OTU 划分与分类地位鉴定

本次下机数据经过筛选、过滤和拼接等处理,共获得 26477 个 OUT,按照 97%相似性聚类后得到 2247 个代表性 OTU 序列。图 1 为本次测序所得的鱼类物种稀疏曲线(rarefaction curve),由图可见测序量足以反映样本多样性,可以用于后续数据分析。

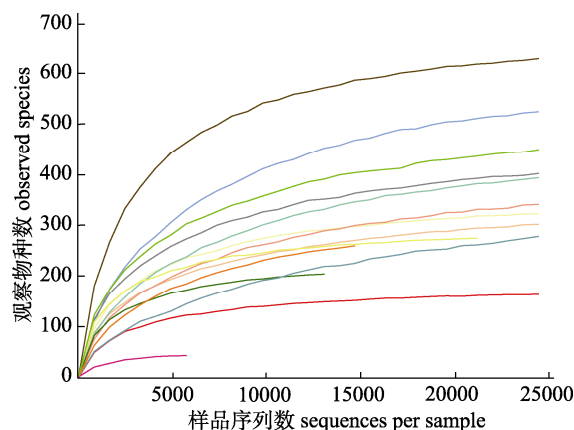


图 1 象山港水域鱼类物种稀疏曲线
Fig. 1 Rarefaction curve of the observed fish species in Xiangshan Bay

所得序列经 Nt 数据库进行物种注释分析和人工校对后,进行了 OTU 划分和分类地位鉴定统计。各个样品中的 OTU 数目和分类地位如图 2 所示。各组海水样品中检测到的 OTU 数量存在差异,而同一组内各个样品间的 OTU 检出量也存在

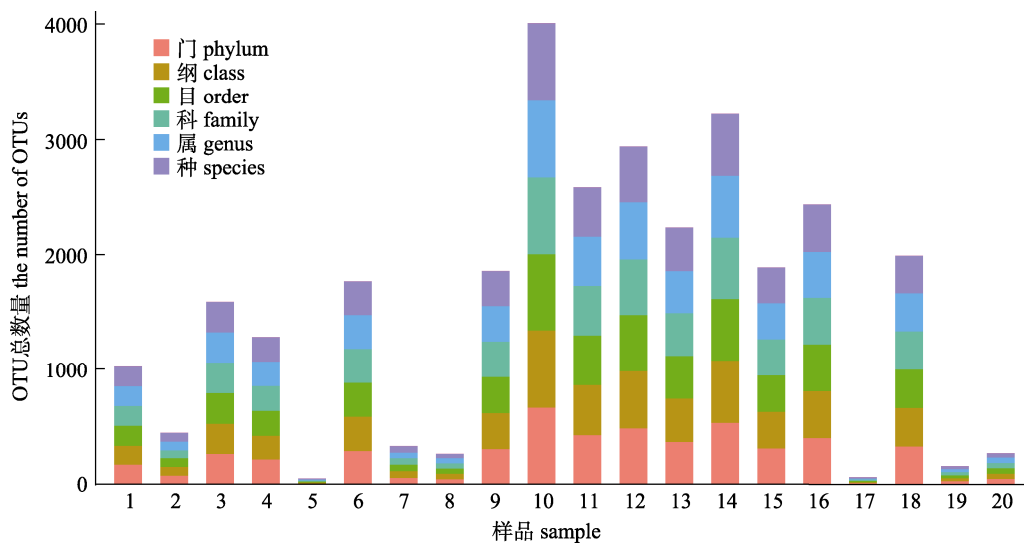


图 2 象山港水域 OTU 划分和分类地位鉴定结果统计
Fig. 2 Statistics of OTU division and classification status identification in Xiangshan Bay

差异。同时, 利用 R 软件根据获得的 OTU 丰度矩阵绘制了 5 组样本共有 OTU 的 Venn 图, 各组样品中共有和特有 OTU 比例如图 3 所示。由图可见, 5 个取样点(groups 1~5)共有 OTU 所占比例较高; 此外, group2、group3、group4 这 3 个采样点还具有较高比例的特有 OTU。

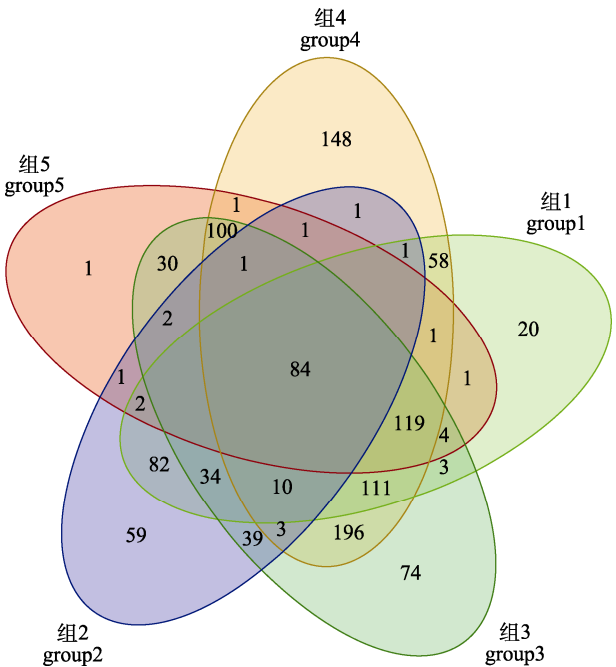


图 3 象山港水域不同取样组水样共有 OTU 的 Venn 图
Fig. 3 Venn diagram for shared OTUs in different groups of sea water samples in Xiangshan Bay

2.2 鱼类物种组成

经过数据库比对和人工校正, 共在 20 个海水样品中鉴定出 26 个象山港海域常见鱼类物种, 隶属于辐鳍鱼纲(Actinopterygii)的 7 个目。此外, 所得序列中还检出 10 种在象山港相对丰度较少或者未有过分布报道的鱼类物种。根据检测到的 OTU 种类丰度对 7 个目水平的分类单元从大到小进行排序, 其中鲱形目(Clupeiformes)和鲈形目(Perciformes)占比最高, 其次是鲻形目(Mugiliformes)和鳗鲡目(Anguilliformes), 而鲟形目(Acipenseriformes)、仙女鱼目(Aulopiformes)和鰈形目(Pleuronectiformes)等所占比例较小。图 4 显示了海水 eDNA 样本检出的鱼类生物相对丰度前 20 位的分类单元及其总体分类等级, 可直观反映检出鱼类物种的优势类群。由图可见, 丰度最高的两个目为鲱形目和鲈形目, 其相对丰度合计占到总丰度的 92.5%。而其中的棘鲷属(*Acanthopagrus*)、缟虾虎鱼属(*Tridentiger*)、花鲈属(*Lateolabrax*)和斑鲷属(*Konosirus*)为相对丰度较高的属。

表 1 列出了利用环境 DNA 分析技术检出的丰度前 15 位的鱼类优势物种, 占总相对丰度的 94.19%。在所检出的鱼类物种中, OTU 检出频率最高的鱼类包括斑鲷(*Konosirus punctatus*)、黑棘鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)和髯缟虾虎鱼(*Tridentiger barbatus*), 几乎存在于所有样品中。

- A: 脊索动物门 Chordata
B: 辐鳍鱼纲 Actinopterygii
C: 鲈形目 Perciformes
D: 狼鲈科 Moronidae
E: 花鲈属 *Lateolabrax*
F: 石首鱼科 Sciaenidae
G: 叫姑属 *Johnius*
H: 鲷科 Sparidae
I: 刺鲷属 *Acanthopagrus*
J: 鲹科 Scombridae
K: 马鲛属 *Scomberomorus*
L: 虾虎鱼科 Gobiidae
M: 缟虾虎鱼属 *Tridentiger*
N: 鲟形目 Acipenseriformes
O: 鲟科 Acipenseridae
P: 鲟属 *Acipenser*
Q: 鲱形目 Clupeiformes
R: 鲱科 Clupeidae
S: 斑鲹属 *Konosirus*
T: 鲹属 *Engraulidae*

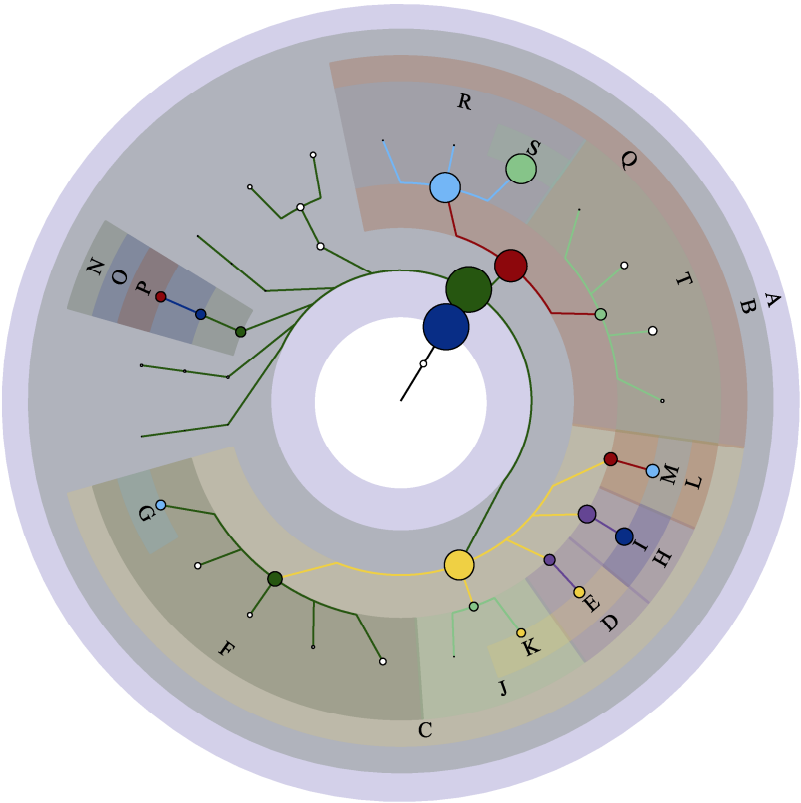


图 4 象山港水域鱼类生物的总体分类等级树
节点表示从门到属的所有分类单元，其大小对应于该分类单元的平均相对丰度；字母所示为相对丰度前 20 位的分类单元。

Fig. 4 General classification tree of fish species in Xiangshan Bay
All taxa were shown as nodes. Node sizes are proportional to the average relative abundance of the taxa.
Classification of the top 20 taxa are marked with letters.

表 1 通过象山港水域环境 DNA 检出的优势鱼类物种统计
Tab. 1 Statistics of dominant fishes species in Xiangshan Bay identified from eDNA analysis

编号 no.	检出物种 species identified	目水平分类 order level classification	相对丰度/% percentage of abundance	出现频率/% occurrence rate
1	斑鲹 <i>Konosirus punctatus</i>	鲱形目 Clupeiformes	45.85	100
2	黑棘鲷 <i>Acanthopagrus schlegelii</i>	鲈形目 Perciformes	17.69	95
3	髯缟虾虎鱼 <i>Tridentiger barbatus</i>	鲈形目 Perciformes	8.63	100
4	花鲈 <i>Lateolabrax japonicus</i>	鲈形目 Perciformes	4.96	75
5	蓝点马鲛 <i>Scomberomorus niphonius</i>	鲈形目 Perciformes	4.34	60
6	黄吻棱鲉 <i>Thyssa vitirostris</i>	鲱形目 Clupeiformes	3.05	25
7	小黄鱼 <i>Larimichthys polyactis</i>	鲈形目 Perciformes	2.59	60
8	中华侧带小公鱼 <i>Stolephorus chinensis</i>	鲱形目 Clupeiformes	2.31	30
9	棘头梅童鱼 <i>Collichthys lucidus</i>	鲈形目 Perciformes	2.23	60
10	鲻 <i>Mugil cephalus</i>	鲻形目 Mugiliformes	1.71	85
11	皮氏叫姑鱼 <i>Johnius belangerii</i>	鲈形目 Perciformes	1.27	20
12	棱鲮 <i>Liza carinatus</i>	鲻形目 Mugiliformes	2.54	80
13	鲢 <i>Miichthys miiuy</i>	鲈形目 Perciformes	0.75	15
14	黄姑鱼 <i>Nibea albiflora</i>	鲈形目 Perciformes	0.49	10
15	双带缟虾虎鱼 <i>Tridentiger bifasciatus</i>	鲈形目 Perciformes	0.36	20

2.3 鱼类多样性分析

表 2 所示为反映鱼类群落相对丰度的 α 多样性指数。其中, Chao1 指数范围为 8.00~676.72, ACE 指数范围为 8.46~674.16, 两个指数分布趋势基本一致; Simpson 指数范围为 0.20~0.88, Shannon 指数范围为 1.15~5.20, 两者分布趋势也基本

对应。各个样品所测得的鱼类物种 α 多样性指数存在差异, 其中 6 号和 10 号样品具有较高的 Simpson 指数和 Shannon 指数, 而 10 号和 14 号具有较高的 Chao1 指数和 ACE 指数。

利用 R 软件绘制基于属水平的鱼类组成热图(图 5)。如图所示, 不同属物种的组成在各个样品

表 2 象山港水域鱼类物种相对丰度的 α 多样性指数
Tab. 2 Alpha diversity indexes of fish species abundance in Xiangshan Bay

样品编号 sample code	α 多样性指数				样品编号 sample code	α 多样性指数			
	Simpson	Chao1	ACE	Shannon		Simpson	Chao1	ACE	Shannon
1	0.197513	172.33	172.15	1.15	11	0.70479	442	449.42	3.68
2	0.754795	74.89	78.25	3.56	12	0.735027	502.5	510.35	3.98
3	0.54438	288.03	306.06	2.34	13	0.773273	385.45	392.79	3.33
4	0.759257	210.75	215.89	3.53	14	0.838737	560.15	571.7	4.16
5	0.59349	8	8.46	1.89	15	0.835236	336.75	338.89	3.95
6	0.884896	283.89	288.71	4.62	16	0.735005	423.91	438.63	3.46
7	0.798877	42.5	51.11	3.44	17	0.732839	13	12.71	2.3
8	0.811573	47.5	50.65	3.34	18	0.710177	338.67	342.93	3.37
9	0.576144	342.5	354.2	2.52	19	0.738731	30.5	37.5	2.81
10	0.879524	676.72	674.16	5.2	20	0.583667	44	44	1.77

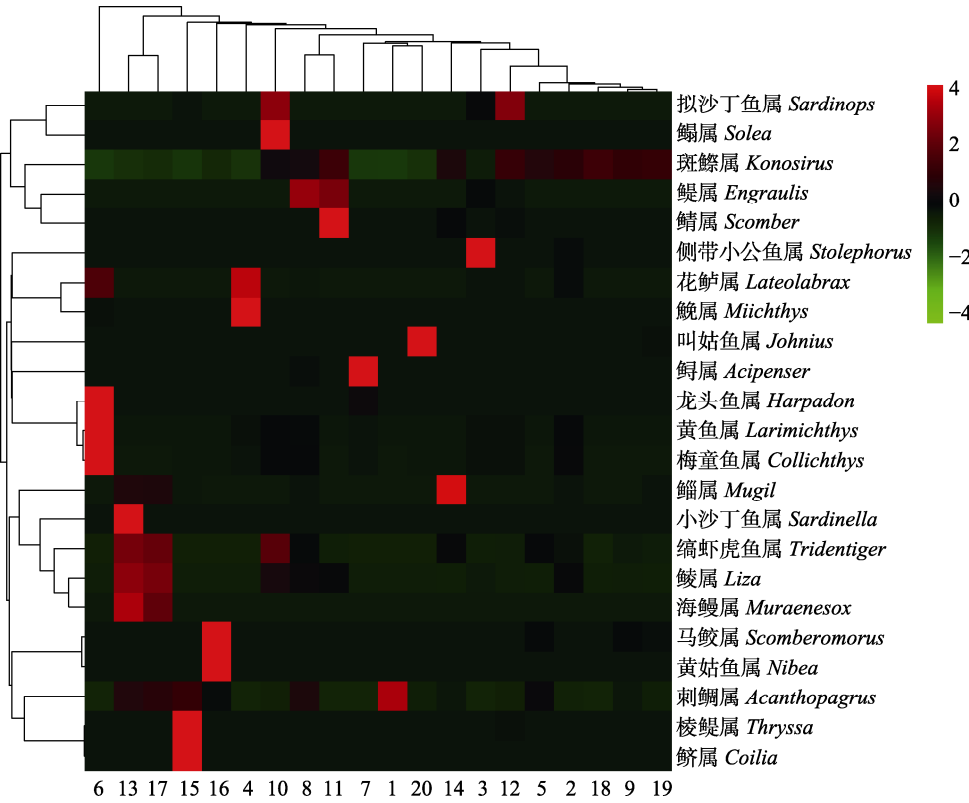


图 5 象山港水域属水平鱼类组成热图

横向所示为样品编号, 纵向所示为分类单元; 由红到绿色表示对应样本中该属丰度逐渐变低。

Fig. 5 Heat map of fish species composition based on genus level
Samples are shown horizontally, and taxa are arranged vertically. Colors from red to green indicate that the genus abundance in the corresponding samples decreases gradually.

间存在差异。其中,斑鲦和黑棘鲷相对丰度和分布频率最高,而海鳗属(*Muraenesox*)、叫姑鱼属(*Johnius*)和鲷属(*Solea*)等的分布频率较低,其趋势与 α 多样性指数结果一致。

3 讨论

3.1 基于 eDNA 高通量测序的象山港海域鱼类组成

象山港是浙江沿海地区的一个半封闭性狭长型港湾,多年来的人类活动使该区域生态系统面临的压力不断增大,生态问题不断涌现,而渔业资源也严重衰退^[11,14]。近年来的增殖放流和伏季休渔等人工养护措施对该海域的生态恢复有所帮助,但其渔业资源生物量和多样性水平下降的问题依旧严重。在此背景下,开展象山港海域的鱼类群落结构和多样性研究不仅能为生态恢复提供理论依据,还可以对科学管理方案的制定提供指导。本研究通过象山港海域水样中环境 DNA 的提取、扩增和高通量测序,共在海水样品中鉴定出 26 个象山港海域常见鱼类物种,其均为序列经数据库比对和人工校正所得。此外,所得序列中还检出部分象山港水域相对丰度较少或者未报道过的鱼类物种,包括少鳞鳢(*Sillago japonica*)、朴蝴蝶鱼(*Chaetodon modestus*)、多棘腔吻鲷(*Coe-lorhynchus multispinulosus*)、褐斑栉鳞鲷(*Aser-aggodes kobensis*)、拟三刺鲀(*Triacanthus ano-malus*)、刺海马(*Hippocampus histrix*)等。在所有检测到的鱼类物种中,斑鲦和黑棘鲷的丰度最高,其次是虾虎鱼(髯须虾虎鱼)、花鲈和蓝点马鲛等。

近年来,国内学者曾在象山港海域开展过鱼类生物资源调查。其中,姜亚洲等^[5]在不同季节开展了象山港水域渔业资源定点调查,分析了该水域游泳动物种类组成特征及群落结构的季节动态。与本研究结果相比,其在不同季节共调查到辐鳍鱼纲 10 个目中的 54 种鱼类,所调查到的该水域重要优势鱼种与本研究结果相似,包括黑棘鲷、花鲈和鲷等。此外,王宇坛等^[8]还利用 10 个调查航次研究了象山港内仔稚鱼的种类组成和结构特征。其所鉴定出的 34 种鱼类分属于鲈形目、

鲱形目、鲷形目、鲈形目、鲷形目和刺鱼目,主要鱼类分类也与本研究结果相似。其检测到的主要优势鱼种有斑鲦、鲛、虾虎鱼和黑棘鲷,而这些鱼类均可在本次的 eDNA 样品中检测到,且相对丰度较高;同样,调查发现的蓝点马鲛、鲷、黄姑鱼、花鲈、小黄鱼等众多经济鱼类也均出现于本研究丰度较高的鱼类物种目录中(表 1)。由此可见,本研究所检测到的优势鱼类物种与前期开展的资源调查结果基本一致^[5,8],这不仅说明象山港海域的优势鱼类物种较为固定,同时也显示了应用环境 DNA 技术进行象山港海域鱼类多样性研究的可行性。部分鱼类可在多个地点的样品中被检测到,如斑鲦、黑棘鲷、髯须虾虎鱼和棱鲛,这些鱼类均属于当地近岸定居或岩礁性鱼种,其活动区域较大、分布范围较广。与前期研究结果相比,本次研究并没有检出鲛目鱼类,推测可能与该目鱼类的资源量、分布区域和取样季节有关。

3.2 基于 eDNA 的象山港海域鱼类多样性分析

表 2 列举了反映鱼类群落丰度的 α 多样性指数。其中,Chao1 和 ACE 指数可体现鱼类群落中物种的 OTU 丰度量。本研究中的 Chao1 指数范围为 8.00~676.72, ACE 指数范围为 8.46~674.16,两个特征指数趋势基本一致,但各个样品间差异较大;这可能是由于单个样品(5 号样品)对整体的影响造成的,推测与海水样品中 eDNA 的质量和采样点差异有关。陈治等^[15]对比了不同保存方法下环境 DNA 的高通量测序效果,认为 eDNA 保存方法影响平行样本间的相似性,可导致其物种组成和丰度差异。因此,建议在 eDNA 研究过程中摸索和优化环境样品的收集与保存方法,并适当增加样品量以降低单个样品差异对实验结果的影响。

Shannon 和 Simpson 指数均能显示鱼类多样性水平^[16],本研究中的 Simpson 指数范围为 0.20~0.88, Shannon 指数范围为 1.15~5.20,两者趋势也基本对应。不同的指数衡量鱼类多样性的侧重点各不相同,因而样品群落丰富度高低并不能代表群落多样性高低;如 1 号样品 Simpson 多样性指数较低但丰富度较高,推测这与样品中少

数鱼类物种丰度过高有关。目前,对于象山港海域鱼类多样性的研究数据十分有限。对港内游泳动物的研究显示其春夏秋各季节 Shannon 多样性指数范围为 2.12~2.18^[5];对港内仔稚鱼调查的结果显示,随着航次中仔稚鱼种类数的增加,Shannon 多样性指数呈缓慢上升的趋势,最大值为 2.14^[8]。本研究中的 Shannon 多样性指数较之前研究结果高,其指数范围为 1.15~5.20,平均为 3.22±0.99。

3.3 环境 DNA 技术在象山港海域鱼类多样性研究中的应用

传统的鱼类资源调查常以网捕和声呐探测的方式进行,研究过程不仅耗时耗力,还会受到诸多因素的影响,造成调查结果的不确定性。例如,一些鱼类具有较强的游动性,出现水域不固定;一些小型鱼类和礁栖性鱼类分布区域特殊,难以拖网抓捕;同时,物种的形态学鉴定需要较高的专业知识和经验,其准确性也因科研人员的业务能力而异;此外,部分调查手段还会对调查对象和所在生境造成破坏^[17-20]。近年来,环境 DNA 技术以其灵敏性、准确性和成本方面的优势在生态学领域逐渐得以应用^[21-22]。在国外,应用环境 DNA 技术研究鱼类多样性的报道较多^[23-24]。而在国内,相关研究起步较晚且报道多为相关实验技术的摸索和优化。例如,姜维等^[17]利用 mtDNA D-loop 区域特异引物扩增检测了川陕哲罗鲑(*Hucho bleekeri*)养殖池水样中的 eDNA,分析验证了利用线粒体 DNA 控制区分子标记鉴定川陕哲罗鲑的可行性。与该研究不同的是,本研究并非针对单一物种进行,而是采用通用引物对海区鱼类多样性开展调查,该引物的扩增效果也已在前期研究中得以证实^[11]。又如刘军等^[25]对比了不同基因片段用于水环境中 eDNA 扩增和克隆的效果,认为引物 16S 在通用性和适用性上都更适合作为鱼类群落 eDNA 研究的通用引物,而这也在本研究中得以印证。然而,总体而言国内典型海域和典型渔场等方面的相关应用性研究十分缺乏。

截至目前,象山港水域生物资源研究仍不完善,鱼类群落结构与多样性特征相关研究较为薄弱。同时,由于象山港海域内存在多处人工鱼礁

和天然岛礁,相关区域常常无法开展鱼类拖网调查,这也限制了这部分区域鱼类(特别是礁栖鱼类)生物多样性的常规检测。因此,环境 DNA 分析技术的应用对象山港海域鱼类生物多样性及其资源量评估意义重大。本研究通过高通量测序技术对象山港海域海水样品中的 eDNA 进行测定和生物信息学分析,阐述了象山港主要鱼类群落的种类组成、结构和多样性特征。结果证实,基于环境 DNA 高通量测序技术的鱼类物种多样性检测比传统调查方法效率更高。以往基于传统方法的海洋鱼类调查往往需要多个航次的开展,不仅耗费大量的人力和物力,调查效果还受到天气、调查工具、鱼类生活习性以及科研工作者职业能力等多方面的制约。例如,前期对象山港海域不同季节游泳动物群落结构及多样性的调查涉及 3 个季节共计 12 d 的资源调查,其检测到的鱼类物种数目为 54 个^[5];而本次仅用 2 h 在 5 个连续水域的取样即可检测出 26 个优势鱼类物种和 10 多种资源量较少的鱼类,不但调查效率得以提升,其检测结果也与传统调查结果相一致;而其他多个研究的结果也证实基于 eDNA 测定的准确性以及定量结果与待测物种的实际数量的相对对应性^[26-28]。

值得注意的是,环境 DNA 调查也可能存在与传统渔业资源调查结果不一致的情况。例如,象山港海域是蓝点马鲛重要的产卵场之一,大量产卵群体于每年清明节时期进入港内产卵^[27],但前期拖网资源调查中并没有发现蓝点马鲛,这主要是由于蓝点马鲛为中上层鱼类,性格凶猛、行动敏捷,而底层拖网不具备捕捉其群体的条件;在本研究中检测到较高的蓝点马鲛资源量,这也显示了环境 DNA 技术在这些特定鱼类群体检测应用上的优势。同时,环境 DNA 含量与鱼类等生物的空间分布和特定环境下的降解速率等密切相关,故采用环境 DNA 技术进行资源调查时还需充分考虑所研究区域的地理环境、生态特征以及潜在物种的生活习性,并适当扩大采样量以保证取样的有效性。此外,由于环境 DNA 含量较低,故减少取样和测定各环节中的损失和 DNA 污染也十分重要。本研究早期的一批样品经高通量测序检测后,出现了较多的非鱼类物种,推测这与

实验过程中的污染有关;而在对相同来源的样品重新进行提取、扩增和测定后发现,原有的污染源的消除可显著地提高样品中各鱼类物种的表达量。今后,还将在本次调研的基础上进一步扩大取样量和取样范围,针对不同季节、不同生境类型开展更加全面的象山港海域生物多样性调查。而如果针对其他海洋生物类群进行引物开发,还可以对鱼类以外的其他物种(如虾蟹贝类等)以及单一目的物种进行资源量检测和追踪^[28-30]。可见,环境 DNA 分析技术应用于近海鱼类多样性评估具有重要的现实意义和良好的应用前景。

参考文献:

- [1] Lodge D M, Turner C R, Jerde C L, et al. Conservation in a cup of water: Estimating biodiversity and population abundance from environmental DNA[J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21(11): 2555-2558.
- [2] Gao T X, Chen Z, Wang X Y. Environmental DNA, a new method for fish diversity investigation in the coastal waters[J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2018, 37(1): 1-7. [高天翔, 陈治, 王晓艳. 近海鱼类多样性调查新方法——环境 DNA 分析技术[J]. *浙江海洋大学学报(自然科学版)*, 2018, 37(1): 1-7.]
- [3] Rice J C. Evaluating fishery impacts using metrics of community structure[J]. *ICES Journal of Marine Science*, 2000, 57(3): 682-688.
- [4] Rochet M J, Trenkel V M. Which community indicators can measure the impact of fishing? A review and proposals[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2003, 60(1): 86-99.
- [5] Jiang Y Z, Lin N, Yuan X W, et al. Community structure and species diversity of nektons in Xiangshan Bay of East China[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2013, 32(4): 920-926. [姜亚洲, 林楠, 袁兴伟, 等. 象山港游泳动物群落结构及多样性[J]. *生态学杂志*, 2013, 32(4): 920-926.]
- [6] Yang L L, Jiang Y Z, Yuan X W, et al. Evaluation on the ecosystem structure and function of Xiangshan Bay based on Ecopath model[J]. *Marine Fisheries*, 2015, 37(5): 399-408. [杨林林, 姜亚洲, 袁兴伟, 等. 象山港生态系统结构与功能的 Ecopath 模型评价[J]. *海洋渔业*, 2015, 37(5): 399-408.]
- [7] Lin N, Jiang Y Z, Yuan X W, et al. Reproductive biology of *Nibeia albiflora* in Xiangshan Bay[J]. *Marine Fisheries*, 2013, 35(4): 389-395. [林楠, 姜亚洲, 袁兴伟, 等. 象山港黄姑鱼的繁殖生物学[J]. *海洋渔业*, 2013, 35(4): 389-395.]
- [8] Wang Y T, Li S F, Yang L L, et al. Species composition of larval and juvenile fish in the Xiangshan Bay in spring and summer[J]. *Marine Fisheries*, 2017, 39(3): 286-296. [王宇坛, 李圣法, 杨林林, 等. 象山港春、夏季仔稚鱼种类组成结构特征[J]. *海洋渔业*, 2017, 39(3): 286-296.]
- [9] 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.
- [10] Hänfling B, Lawson Handley L, Read D S, et al. Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods[J]. *Molecular Ecology*, 2016, 25(13): 3101-3119.
- [11] Miya M, Sato Y, Fukunaga T, et al. 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*, 2015, 2(7): 150088.
- [12] You Z J, Jiao H F, et al. Ecological Environment Protection and Restoration Technology of Xiangshan Bay[M]. Beijing: China Ocean Press, 2011: 5-30. [尤仲杰, 焦海峰, 等. 象山港生态环境保护与修复技术研究[M]. 北京: 海洋出版社, 2011: 5-30.]
- [13] Zhao S L, Xu H X, Zhong J S, et al. Zhejiang Marine Ichthyology[M]. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Publishing House, 2016: 203-907. [赵盛龙, 徐汉祥, 钟俊生, 等. 浙江海洋鱼类志[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2016: 203-907.]
- [14] Wei Y J, He D H, Fei Y J, et al. Studies on the eco-regionalization in Xiangshan Bay, Zhejiang, China[J]. *Journal of Applied Oceanography*, 2015, 34(4): 509-517. [魏永杰, 何东海, 费岳军, 等. 象山港海域生态分区研究[J]. *应用海洋学学报*, 2015, 34(4): 509-517.]
- [15] Chen Z, Chen J W, Wang X Y, et al. Establishment and optimization of the eDNA preservation method for Zhoushan coastal waters[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2019, 50(5): 1098-1107. [陈治, 陈建威, 王晓艳, 等. 舟山近海环境 DNA 保存方法的建立及优化[J]. *海洋与湖沼*, 2019, 50(5): 1098-1107.]
- [16] Zhang T, Zhuang P, Liu J, et al. Species composition and biodiversity of fish community in Chongming Dongtan of Yangtze River estuary[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2009, 28(10): 2056-2062. [张涛, 庄平, 刘健, 等. 长江口崇明东滩鱼类群落组成和生物多样性[J]. *生态学杂志*, 2009, 28(10): 2056-2062.]
- [17] Jiang W, Wang Q J, Deng J, et al. Protocol optimization of

- eDNA analysis workflow for detecting *Hucho bleekeri*[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2016, 27(7): 2372-2378. [姜维, 王启军, 邓捷, 等. 以川陕哲罗鲑为目标物种的水样环境 DNA 分析流程的优化[J]. 应用生态学报, 2016, 27(7): 2372-2378.]
- [18] Robertson D R, Smith-Vaniz W F. Rotenone: An essential but demonized tool for assessing marine fish diversity[J]. BioScience, 2008, 58(2): 165-170.
- [19] Hopkins G W, Freckleton R P. Declines in the numbers of amateur and professional taxonomists: Implications for conservation[J]. Animal Conservation, 2002, 5(3): 245-249.
- [20] Lacoursière-Roussel A, Côté G, Leclerc V, et al. Quantifying relative fish abundance with eDNA: A promising tool for fisheries management[J]. Journal of Applied Ecology, 2016, 53(4): 1148-1157.
- [21] 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.
- [22] Bohmann K, Evans A, Gilbert M T P, et al. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring[J]. Trends in Ecology & Evolution, 2014, 29(6): 358-367.
- [23] 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.
- [24] Stat M, John J, DiBattista J D, et al. Combined use of eDNA metabarcoding and video surveillance for the assessment of fish biodiversity[J]. Conservation Biology, 2019, 33(1): 196-205.
- [25] Liu J, Zhao L J, Fan Y C, et al. Universal primer screening and verification for fish environment DNA research[J]. Freshwater Fisheries, 2016, 46(1): 9-17. [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] Wu Y S, Tang Y K, Li J L, et al. The application of environmental DNA in the monitoring of the Yangtze finless porpoise, *Neophocaena phocaenoides asaeorientalis*[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2019, 26(1): 124-132. [吴昀晟, 唐永凯, 李建林, 等. 环境 DNA 在长江江豚监测中的应用[J]. 中国水产科学, 2019, 26(1): 124-132.]
- [27] Harper L R, Handley L L, Hahn C, et al. Needle in a haystack? A comparison of eDNA metabarcoding and targeted qPCR for detection of great crested newt (*Triturus cristatus*)[J]. Ecology and Evolution, 2018, 8(12): 6330-6341.
- [28] Erickson R A, Merkes C M, Jackson C A, et al. Seasonal trends in eDNA detection and occupancy of bigheaded carps[J]. Journal of Great Lakes Research, 2017, 43(4): 762-770.
- [29] 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.
- [30] Song C, Wang Y T, Liu Z L, et al. Relationship between environmental factors and distribution of *Scomberomorus niphonius* eggs, larvae, and juveniles in Xiangshan Bay[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2016, 23(5): 1197-1204. [宋超, 王宇坛, 刘尊雷, 等. 象山港蓝点马鲛鱼卵、仔稚鱼的时空分布特征及其与环境因子关系[J]. 中国水产科学, 2016, 23(5): 1197-1204.]

Application and evaluation of environmental DNA technology in fish diversity research in Xiangshan Bay

LING Jianzhong, JIANG Yazhou, SUN Peng, YUAN Xingwei, ZHANG Hui, TANG Baojun

Key Laboratory of East China Sea and Oceanic Fishery Resources Exploitation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China

Abstract: Fish are one of the key groups of organisms in marine ecosystems and are also the main object of marine fisheries. Knowledge of their diversity and distribution not only provides basic data for the sustainable development and utilization of marine ecosystems but also set up a theoretical basis for evaluating the influence of human disturbance factors (such as marine development and fishing) on these ecosystems. With the rapid development of biotechnology in recent years, environmental DNA (eDNA) technology has been gradually applied in the field of ecology owing to its advantages in sensitivity, accuracy, and cost, but there have been few local surveys of marine fish resources and their diversity using eDNA, especially in the local marine areas and fishing grounds. Xiangshan Bay is a semi-closed narrow harbor that is located on the north coast of the central Zhejiang Province, China. For years, overfishing, environmental pollution, and large-scale marine development activities have caused the ecological environment to deteriorate, and fishery resources have declined. Biological resource studies in Xiangshan Bay are still insufficient, and research on fish community structure and diversity are lacking. However, owing to the existence of many artificial and natural reefs, fish trawling surveys cannot be carried out in the area, which also limits the routine detection of fish biodiversity (especially for reef-dwelling fish) in the area. Therefore, the application of eDNA technology is of great significance to the assessment of fish biodiversity in Xiangshan Bay. In the present study, by eDNA sample collection and high-throughput sequencing analysis, combined with survey data of fishery resources in the same region, the fish species composition and diversity characteristics of the main fish communities in Xiangshan Bay were expounded. The prospect of applying eDNA technology in fish diversity studies of typical sea areas was also discussed. The results showed that 26 common fish species (belonging to seven orders of Actinopterygii and from 21 genera) were detected from the aquatic eDNA samples from Xiangshan Bay. Two orders with the highest abundance were Clupeiformes and Perciformes, whose relative abundance accounted for 92.5% of the total fish species abundance. Among all the fish species identified from eDNA analysis, *Konosirus punctatus* and *Acanthopagrus schlegelii* had the highest abundance, which accounted for 45.85% and 17.69% of the total fish abundance, respectively. Both species also contributed the most to fisheries resources in Xiangshan Bay. The next most abundant species were *Tridentiger barbatus* and *Lateolabrax japonicus*. The sequence abundances of such taxa were similar to the trends in the fisheries catch data. Compared with traditional survey methods, the eDNA analysis had high sensitivity, high accuracy, and low cost and was suitable for studying the fish diversity of relevant sea areas. The present research not only enriched the structural and functional information of the Xiangshan Bay aquatic ecosystem but also provided basic information to support the management and restoration of marine ecosystems in this marine area.

Key words: environmental DNA (eDNA); Xiangshan Bay; fishery resources; high throughput sequencing; fish diversity

Corresponding author: SUN Peng. E-mail: sunpeng1128@163.com