

DOI: 10.12264/JFSC2024-0170

eDNA 技术在长江口中华绒螯蟹蟹苗资源监测上的应用

张方圆^{1,2,3}, 谭清元^{1,2,3}, 耿智^{1,2}, 杨刚^{1,2}, 赵峰^{1,2}, 张涛^{1,2}

1. 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;
2. 上海长江口渔业资源增殖和生态修复工程技术研究中心, 上海 200090;
3. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 本研究运用 eDNA 技术监测了中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)蟹苗(大眼幼体阶段)的资源量, 有助于揭示中华绒螯蟹蟹苗在长江口种群资源量的动态变化, 监测中华绒螯蟹的资源状况。通过建立室内定量曲线, 及对长江口水域 eDNA 样品的采集, 并结合了蟹苗的资源调查数据, 阐述了长江口中华绒螯蟹蟹苗资源的分布。结果显示, 72 h 内 4 个浓度实验组蟹苗的室内定量曲线, 幂函数拟合程度最高。去除蟹苗后, 水体中 eDNA 浓度与时间为负相关, 幂函数更符合 eDNA 降解与时间之间的关系。2023 年 6 月调查北八淤水域监测的蟹苗密度平均值为 (23.03 ± 55.10) 个/ m^3 , eDNA 浓度为 (9145.86 ± 31147.36) copies/mL。蟹苗密度与标准化处理后的 eDNA 浓度间极显著性相关, 幂函数方程拟合程度最高。团结沙水域浮游生物网监测的蟹苗密度为 (0.38 ± 0.99) 个/ m^3 , eDNA 浓度为 (29808.3 ± 95359.04) copies/mL。团结沙水域蟹苗密度与 eDNA 浓度之间具有时滞效应, 蟹苗密度变化早于 eDNA 浓度, 时滞时间为 5 d。时滞后的蟹苗密度与标准化后的 eDNA 浓度具有相关性, 最佳拟合方程为线性方程。研究表明目前利用 eDNA 技术分析中华绒螯蟹蟹苗资源的方法仅适用于离蟹苗发生较近的水域。

关键词: 中华绒螯蟹; 蟹苗; qPCR; 长江口; eDNA

中图分类号: S931

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2024)09–1129–11

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)隶属甲壳纲, 十足目, 方蟹科, 绒螯蟹属, 是我国重要的经济物种, 广泛分布于我国的黄河、长江等流域, 具有明显的索饵洄游和生殖洄游习性^[1–3]。中华绒螯蟹的幼体阶段, 按照形态学划分, 可以分为蚤状幼体和大眼幼体(蟹苗)两个阶段。根据历史监测数据可知, 每年 5 月亲蟹主要分布在横沙浅滩与九段沙附近, 蟹苗主要分布在顾园沙附近^[4]。长江口是世界第三大河口, 也是中国所有河口中的最大渔场^[5], 同时也是中华绒螯蟹幼体的重要栖息地, 许多幼体将其作为觅食的场所和逃避捕食者的避难所^[6]。长江口的中华绒螯蟹资源在历史上比较丰富, 但是由于过度捕捞^[7], 滩涂围垦, 大坝调

蓄^[8], 岸线硬化等原因, 导致长江口中华绒螯蟹资源减少。蟹苗资源在 1983—2003 年枯竭近 20 年^[9], 2004 年后, 通过多年的增殖放流, 长江口蟹苗的资源量有所回升^[10]。但总体上并没有每年持续上升, 不同年份间仍存在较大波动。

针对中华绒螯蟹资源保护相关监测工作, 以往的调查取样多采用传统调查方法, 属于侵入性取样, 容易对水生生物的栖息地造成不良影响。而且长江口的蟹类种类繁多, 监测时需要专业人员具有较高的分类学知识。中华绒螯蟹大眼幼体阶段时间较短, 一周左右就会变态为仔蟹, 传统调查方法监测蟹苗汛期较困难, 费用较高。自 2021 年起, 长江实行 10 年禁捕, 在长江禁渔的背

收稿日期: 2024-05-26; 修订日期: 2024-07-23.

基金项目: 国家自然科学基金项目(32102800); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2024XT1001); 上海市科学技术委员会科研计划项目(22dz1202703); 上海市科技兴农项目[沪农科创字(2022)第 2-1 号].

作者简介: 张方圆(1998–), 女, 硕士研究生, 研究方向为河口生态学. E-mail: zfy15236475212@163.com

通信作者: 张涛, 研究员, 主要从事鱼类生态学与繁育生物学研究. E-mail: zhangtaifi@163.com

景下, 很难再获得渔业数据, 因此需要采用一种长江禁渔背景下的中华绒螯蟹资源监测新方法, 对蟹苗汛期资源进行监测, 即环境 DNA(eDNA) 技术。

目前, eDNA 技术已在生物多样性分析^[11]、入侵物种监控^[12]、珍稀濒危物种监测^[13]、生物量评估^[14]等方面取得了初步应用, 但应用 eDNA 技术开展的水生生物资源定量评估研究较少。Baldigo 等^[15]使用 eDNA 技术评估溪流中溪鳊(*Squaliobarbus curriculus*) 的种群密度和生物量, 结果表明, eDNA 可以解释种群密度和生物量 44% 和 24% 的变化。Stoeckle 等^[16]的研究发现, 新泽西州海洋拖网调查到的鱼类 70% 的捕获量和 eDNA 调查结果一致。Sun 等^[17]运用 eDNA 技术评估中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) 在渤海水域中的生物量, 结果表明, 渤海水域每 240 m² 就有 1 只对虾分布。Chen 等^[18]运用 eDNA 技术监测了长江口水域的鱼类生物多样性, 结果表明, 被动式采样可以更加有效地监测生物多样性。张方圆等^[19]运用 eDNA 技术监测了 2022 年冬季长江口中华绒螯蟹亲蟹的资源状况。总体而言, eDNA 技术在不同环境中水生生物资源评估方面的研究结果不同, 如何准确地评估野外环境中的生物量还是一个难题。

本研究基于 eDNA 技术, 探讨其应用在长江口中华绒螯蟹蟹苗资源监测中的可行性, 该研究还有助于揭示中华绒螯蟹蟹苗在长江口种群资源量的动态变化, 评估中华绒螯蟹的资源状况, 同时还可以为其他水域监测中华绒螯蟹的资源变化提供参考。

1 材料与方法

1.1 室内定量曲线构建

实验对象为中华绒螯蟹苗, 捕自长江口水域。实验于 2023 年 6 月进行, 共设置 4 个密度梯度实验组, 1 个空白对照组, 每个实验组设置 3 个平行。每个实验组养殖水体积为 20 L, 浓度梯度分别为 20 L 水体 1 只蟹苗, 10 只蟹苗, 100 只蟹苗, 1000 只蟹苗, 对照组无蟹苗。选用的缸为长 39 cm, 宽 28 cm, 高 30 cm 的长方体, 开始实验前, 在缸中放入一定体积的水, 曝气 3 d 后, 每个缸取 1 L

水, 做阴性对照。结果为阴性后继续实验。为了避免饵料影响 eDNA 释放速率, 在实验期间不喂食, 实验时间为 72 h。开始实验后, 每个实验组分别在第 72 小时收集 1 L 水样。实验期间水温为 22.7~24.1 °C, 盐度为 0.16‰~0.18‰。

在定量曲线构建实验完成的基础上, 将养殖实验浓度为 20 L 水体 1000 只蟹苗的 3 个实验组, 进行 eDNA 降解实验, 蟹苗全部捞出, 其余实验条件不变。3 个实验组分别在第 1、3、5、7、14、21、28 天时采集 500 mL 水样, 每组 3 个重复。

每次取完水样, 需立即用 0.45 μm 的玻璃纤维滤膜完成对 eDNA 的富集, eDNA 富集完成后, 将样品放置 -80 °C 冰箱保存。

1.2 野外研究区域与采样方法

样品采集地点为上海市崇明岛附近的长江口水域(图 1), 采样时间为 2023 年 5 月 28 日至 6 月 13 日, 累计采样 14 次。通过查阅文献以及参考往年调查数据, 确定中华绒螯蟹蟹苗集中出现区域, 设置 2 个采样点, 分别为团结沙采样点与北八潞采样点, 每个站点采样次数均为 14 次。蟹苗发生地位于九段沙附近^[1], 北八潞采样点为距离蟹苗发生地较近采样点, 团结沙采样点位于中华绒螯蟹的主要洄游通道的采样点。传统调查通过浮游生物采样网水平拖拽采集中华绒螯蟹蟹苗样品, 采样网全长 145 cm, 网开口直径 50 cm。在采样的同时进行 eDNA 样品采集, eDNA 样品采集的为

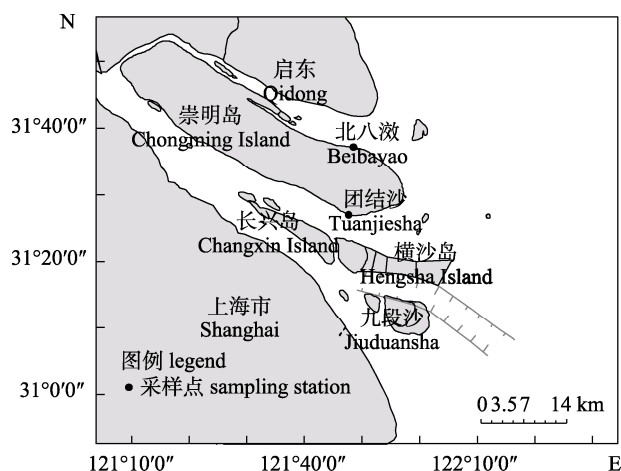


图 1 长江口中华绒螯蟹定点监测站点
Fig. 1 Monitoring stations for *Eriocheir sinensis* in the Yangtze River estuary

表层水水样,每次采集 2 个重复,每瓶水体积为 1 L。采样前需要将采样瓶清洗消毒,并用该点水样润洗 3 次。水样采集完成后,先后采用孔径为 1.2 μm 和 0.45 μm 的玻璃纤维滤膜在 12 h 内完成对 eDNA 的富集,防止 eDNA 的降解。每次富集时需提前将设备清洗干净,减少对样品的污染,eDNA 富集完成后,用镊子将滤膜放置到 2 mL 的离心管中,放置-80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

1.3 特异性引物及探针的设计

基于历史调查结果,长江口存在的主要蟹类有中华绒螯蟹、狭额绒螯蟹(*Eriocheir leptognathus*)、天津厚蟹(*Helice tientsinensis*)、三疣梭子蟹(*Portunus trituberculatus*)、拟穴青蟹(*Scylla paramamosain*)、谭氏泥蟹(*Ilyrplax deschampsii*)、无齿螳臂相手蟹(*Chiromantes dehaani*)等 7 种^[20]。根据 NCBI 数据库中中华绒螯蟹(GenBank: KM516908.1)及上述物种的 CO I 基因序列,利用 CLUSTALW [Multiple Sequence Alignment-CLUSTAL W (genome.jp)]比对上述物种的 CO I 基因序列,并使用 Primer Premier 5.0 软件设计中华绒螯蟹 CO I 基因定量 PCR 扩增特异性引物与探针。引物扩增的目的片段长度为 131 bp,前引物序列为 CO I-F: TCTGATTATCCTGACGCCTATG,后引物序列为 CO I-R: AAGATTACTGGGCGATTAGAAAC,探针序列为: CO I-P: AGCCGCATTAGGAT。引物的合成与测试由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.4 DNA 提取与标准品制备

DNA 提取采用 Ezup 柱式动物基因组 DNA 抽提试剂盒,并参照说明书对滤膜上的 DNA 进行提取。提取中华绒螯蟹肌肉组织中的基因组 DNA,采用 PCR 技术扩增 mtDNA CO I 基因,扩增反应为 25 μL 的体系: 2 μL 的 10 $\times$ PCR buffer, 0.5 μL 的 10 mM dNTPs, 上下游引物各 0.5 μL (10 μM), 0.5 μL 的 Taq Plus DNA Polymerase (5 U/ μL), 2 μL 的 25 mM MgCl_2 , 以及 2 μL 模板 DNA。PCR 扩增实验程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 上述 3 步骤进行 35 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 8 min。

扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后采用 SanPrep

柱式 DNA 胶回收试剂盒将目的片段进行回收纯化。使用生工生物工程(上海)股份有限公司质粒提取试剂盒 B518191 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒提取质粒,构建好的质粒经测序鉴定无误后用微量分光光度计测定质粒 OD₂₆₀ 的值,并换算成拷贝数(copies/ μL)。10 倍梯度稀释构建好的各质粒,90 μL 稀释液+10 μL 质粒,一共做 6 个点,每个点做 3 个重复,通过预实验选取合适标准品用于制备标准曲线。

1.5 荧光定量 PCR 检测

将 DNA 样品稀释 10 倍作为模板上机检测。定量 PCR 试剂: 2 $\times$ TaqMan Fast qPCR Master Mix (B639274, BBI)。使用的定量 PCR 仪为 LightCycler 480 II 型荧光定量 PCR 仪(Roche, Rotkreuz, Switzerland)。荧光定量 PCR 为 10 μL 的反应体系, 5 μL 的 2 $\times$ TaqMan Fast qPCR Master Mix, 上下游引物和探针各 0.2 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), 3.4 μL 的 ddH₂O, 以及 1 μL 模板 DNA。反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 45 个循环(94 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s)。

1.6 数据处理

通过已知拷贝数的标准品绘制标准曲线,从而计算待检基因的拷贝值,拷贝值(x_0)的计算公式为:

$$C_t = -k \times \lg x_0 + b \quad (1)$$

此时计算出的拷贝值为每微升 DNA 的含量,需要乘以每个样品提取的 DNA 总量后,才是每个样品中的拷贝值,即单位为 copies/L。采用 SPSS 18.0 软件中的 Pearson 相关性分析方法对水样 eDNA 浓度与蟹苗密度之间进行相关性分析。以调查时间为基础,绘制每次调查的蟹苗密度和 eDNA 浓度的柱状图;以蟹苗密度为基础,建立 eDNA 浓度与蟹苗密度之间的关系,以上绘图与建立模型均采用 Origin2021 软件进行。

采用错位相关法量化 eDNA 浓度与蟹苗密度之间的时滞效应^[21]。按照观测时间将蟹苗密度时间序列 x_t 与 eDNA 浓度时间序列 y_t 一一对应,其次将数据以步长一天进行移动并计算两者之间的相关关系,当相关系数达到最大时,此时移动的时间即为两者的时滞时间,其中相关系数 R 的计算公式为:

$$R_k = \frac{\sum_{i=1}^{n-k} (x_i - \bar{x})(y_{i+k} - \bar{y}_{i+k})}{\sqrt{\sum_{i=1}^{n-k} (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^{n-k} (y_{i+k} - \bar{y}_{i+k})^2}} \quad (2)$$

式中, R_k 为当移动数为 k 时的相关系数; n 为样本量; x_i 蟹苗密度; y_{i+k} 为 eDNA 浓度; $\bar{x}$ 蟹苗密度均值; $\bar{y}_{i+k}$ eDNA 浓度均值。其中 $k=0, \pm 1, \pm 2, \dots, \pm n$, 当 $k>0$ 时表示蟹苗密度变化提前于 eDNA 浓度, 反之则表示蟹苗密度变化滞后于 eDNA 浓度。

最大相关系数 R_m 为:

$$R_m = \max(R_k) \quad (3)$$

当相关系数达到最大时, 时滞时间计算公

式为:

$$T_L = m \quad (4)$$

式中, T_L 为时滞时间, d ; m 为相关系数最大时蟹苗密度序列的移动数。

2 结果与分析

2.1 引物特异性验证

将引物和探针序列与其他蟹类进行了序列比对, 结果显示该序列能够明显区分中华绒螯蟹与其他近缘物种(表 1)。登录 NCBI 数据库对测序获得的序列进行相似性对比, 对比结果表明 qPCR 扩增所得的产物与中华绒螯蟹核苷酸序列相似性达 100%。

表 1 中华绒螯蟹与其他近缘物种的序列比对

Tab. 1 Sequence alignment of *Eriocheir sinensis* and other closely related species

物种 species	前引物 preprimer	后引物 post-primer	探针 probe
中华绒螯蟹 <i>E. sinensis</i>	TCTGATTATCCTGACGCCTATG	GTTTCTAATCGCCCAGTAATCTT	AGCCGCATTAGGAT
狭额绒螯蟹 <i>E. leptognathus</i>	TCTGATTATCCAGATGCTTATG	GTATCAAAACCGCCCAGTAATTTT	AGCCGCACCTAGGAT
天津厚蟹 <i>H. tientsinensis</i>	TCAGATTACCCAGACGCCTATG	GTCTCTAATCGCCCAGTTATCTT	CGCTGCGTTAGGAT
三疣梭子蟹 <i>P. trituberculatus</i>	TCTGATTATCCAGACGCTTATA	ATTTCAGTCGGCCTGTATATT	TGCTATACCTTATT
拟穴青蟹 <i>S. paramamosain</i>	TCAGACTACCCAGATGCTTACA	GTTTCTAACCGACCTGTCTATT	TGCTATATTAATCT
谭氏泥蟹 <i>I. deschampsii</i>	TCAGACTACCTGACGCCTATG	ATTTCAAATCGACCGTCCATT	TGCCGCCCTTACAT
无齿螳臂相手蟹 <i>C. dehaani</i>	TCTGATTACCTGACGCCTATG	GTGTCAAATCGACCTGTATT	TGCTGCATTAGGAT

注: 灰色背景为其他近缘物种与中华绒螯蟹引物不同的碱基序列。

Note: The gray background indicates nucleotide sequences of closely related species that differ from the primers of the *Eriocheir sinensis*.

2.2 标准曲线构建

将构建好的各质粒, 稀释不同倍数后用荧光定量 PCR 仪扩增, 根据标准品浓度与扩增的 C_t 值生成标准曲线(图 2)。标准曲线的方程如下:

$$y = -3.509x + 41.07, R^2 = 0.9985 \quad (5)$$

稀释的质粒标准品 DNA 浓度范围内具有良好的线性关系, 表明建立的标准曲线能够准确地反映河蟹 CO I 基因的扩增。

2.3 eDNA 定量曲线的构建

室内条件下, 72 h 内 4 个密度梯度实验组蟹苗的 eDNA 浓度分别为 171.07 ± 149.18 、 607.37 ± 543.41 、 14024.49 ± 2899.73 、 32445.44 ± 4694.30 copies/mL, 对照组中未检出蟹苗的 CO I 基因。将标准化后的蟹苗 eDNA 浓度与其个体数量间分别进行对数函数、线性方程与幂函数方程拟合(图 3), 结果显示, 二

者之间的最佳方程为幂函数方程(表 2) $y = 2.94x^{0.43}$, $R^2 = 0.9921$ 。

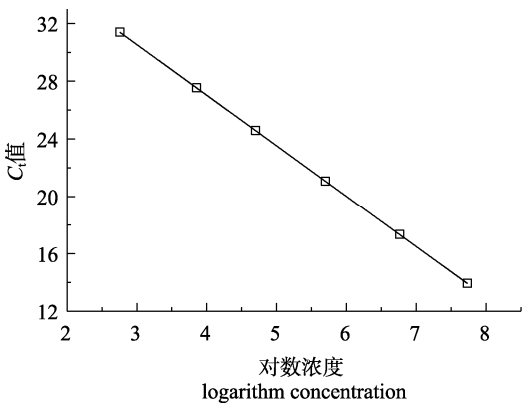


图 2 中华绒螯蟹 CO I 基因引物标准曲线
Fig. 2 Standard curve of CO I gene primer in *Eriocheir sinensis*

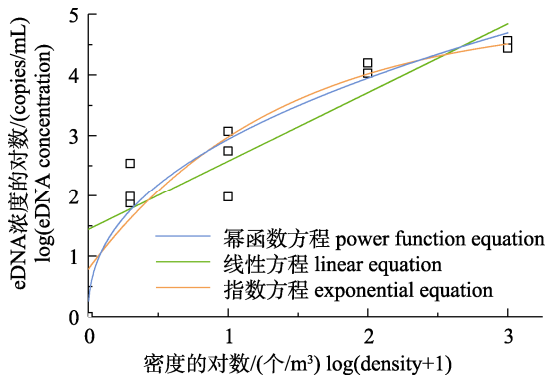


图 3 中华绒螯蟹蟹苗密度与 eDNA 浓度间的关系
Fig. 3 Relationship between *Eriocheir sinensis* megalopa density and eDNA concentration

表 2 中华绒螯蟹蟹苗密度与 eDNA 浓度间定量曲线拟合结果
Tab. 2 Quantitative curve fitting results of *Eriocheir sinensis* megalopa density and eDNA concentration

方程 equation	<i>F</i>	<i>R</i> ²
线性方程 linear equation	49.24	0.8008
指数方程 exponential equation	36.75	0.8563
幂函数方程 power equation function	75677.35	0.9921

2.4 eDNA 降解曲线

eDNA 降解结果显示,在蟹苗去除后,水体中 eDNA 含量与时间为负相关。第 1 天检测时水体中 eDNA 浓度为 2233.62 copies/mL,第 5 天检测时 eDNA 浓度为 695.78 copies/mL,而后 eDNA 浓度逐渐降低,在第 28 天降解为 65.71 copies/mL。用幂函数、线性方程和二次项方程拟合 eDNA 降解与时间之间的关系(图 4),发现最佳方程为幂函数方程(表 3),拟合方程为 $y=1102.29x^{-0.68}$, $R^2=5715$ 。

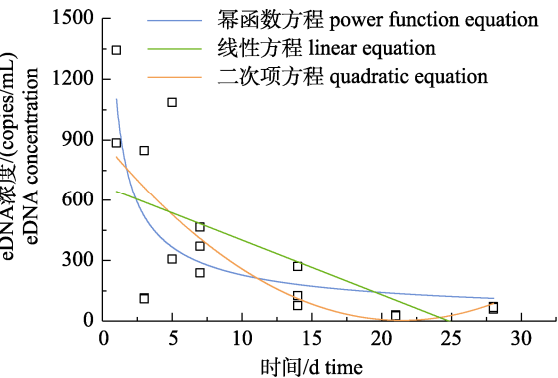


图 4 中华绒螯蟹蟹苗 eDNA 在不同时间的降解
Fig. 4 Degradation of *Eriocheir sinensis* megalopa eDNA over time

表 3 eDNA 在不同时间的降解曲线拟合结果
Tab. 3 Curve fitting results of eDNA degradation over time

方程 equation	<i>F</i>	<i>R</i> ²
线性方程 linear equation	12.63	0.3925
幂函数方程 power function equation	28.73	0.5715
二次项方程 quadratic equation	9.15	0.4751

2.5 野外资源定量评估

浮游生物网监测结果显示(图 5),2023 年 5—6 月调查北八溆水域蟹苗的密度为 (23.03 ± 55.10) 个/ m^3 。除 5 月 28 日、6 月 9 日、6 月 12 日和 6 月 14 日外,其余时间均监测到蟹苗的存在,6 月 4 日的蟹苗密度达到最大值。

eDNA 监测结果表示(图 5),北八溆水域 eDNA 浓度为 (9145.86 ± 31147.36) copies/mL。其中,6 月 4 日 eDNA 浓度达到最大值,总体上呈现先升后降的趋势。eDNA 浓度与蟹苗密度的变化趋势一致,且在同一天达到最高值。

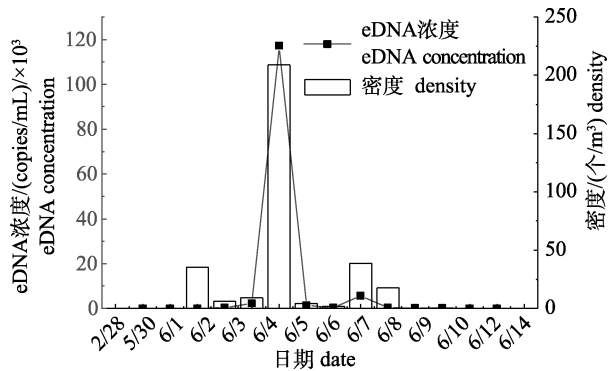


图 5 北八溆水域中华绒螯蟹蟹苗密度与 eDNA 浓度的时间变化
Fig. 5 Temporal variation of *Eriocheir sinensis* megalopa density and eDNA concentration in the Beibayao waters

将北八溆水域的 eDNA 浓度数据进行标准化处理后, Pearson 相关分析结果表明,北八溆水域蟹苗密度与 eDNA 浓度间极显著性相关($P<0.01$),相关系数为 0.735。对蟹苗密度与标准化后的 eDNA 浓度进行线性、对数、幂函数拟合(图 6),结果表明,蟹苗密度与 eDNA 浓度间的幂函数方程拟合程度最高(表 4),方程为 $y=2.05\times(x+0.17)^{0.14}$, $R^2=0.6712$ 。

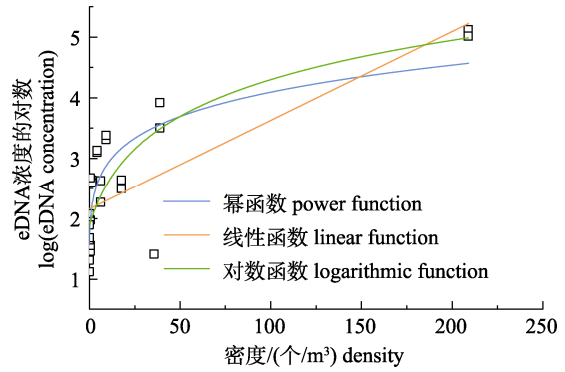


图 6 北八溆水域中华绒螯蟹蟹苗密度与 eDNA 浓度间的关系

Fig. 6 Relationship between *Eriocheir sinensis* megalopa density and eDNA concentration in the Beibayao waters

表 4 北八溆水域中华绒螯蟹蟹苗密度与 eDNA 浓度间拟合结果

方程 equation	<i>F</i>	<i>R</i> ²
幂函数方程 power function equation	166.91	0.6712
线性方程 linear equation	32.98	0.5516
对数方程 logarithmic equation	220.99	0.6306

团结沙水域监测结果显示(图 7), 2023 年 5—6 月浮游生物网监测的蟹苗密度为 (0.38 ± 1.03) 个/ m^3 , 除 5 月 28 日、6 月 12 日和 6 月 13 日外, 其余时间均监测到蟹苗的存在, 6 月 2 日的蟹苗密度达到最大值。eDNA 浓度为 (29808.3 ± 98958.76) copies/mL, 其中 6 月 7 日 eDNA 浓度达到最大值, 总体上呈现先升后降的趋势。团结沙水域的 eDNA 浓度与

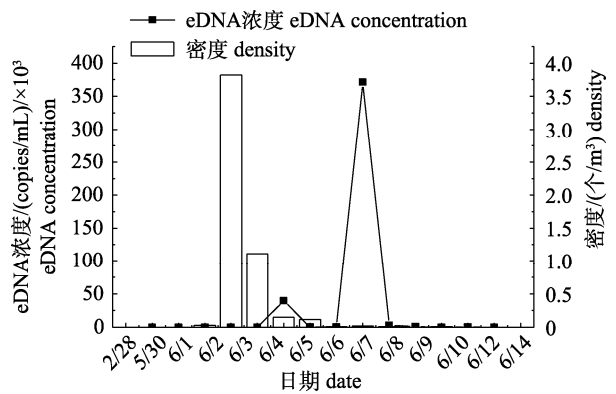


图 7 团结沙水域中华绒螯蟹蟹苗密度与 eDNA 浓度的时间变化

Fig. 7 Temporal variation of *Eriocheir sinensis* megalopa density and eDNA concentration in Tuanjiesha waters

蟹苗密度的变化趋势均为先升后降, 但最高值出现的时间相隔 5 d。

将团结沙水域的 eDNA 浓度数据进行标准化处理后, Pearson 相关分析结果表明, 蟹苗密度与 eDNA 浓度之间不具有相关性($P>0.05$)。对蟹苗密度与标准化后的 eDNA 浓度进行线性、对数、二次项方程拟合, 结果表明, 蟹苗密度与 eDNA 浓度间的拟合方程 R^2 数值较低(表 5、图 8), 结合前述峰值日期差异, 所以考虑二者之间是否具有时滞效应。

表 5 团结沙水域中华绒螯蟹蟹苗密度与 eDNA 浓度间拟合结果

方程 equation	<i>F</i>	<i>R</i> ²
对数方程 logarithmic equation	47.68	0.1053
线性方程 linear equation	1.84	0.0303
二次项方程 quadratic equation	1.06	0.0046

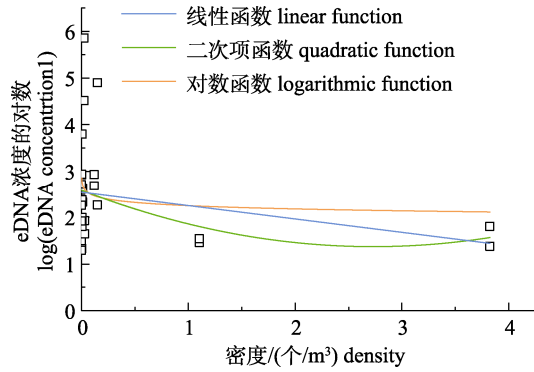


图 8 团结沙水域中华绒螯蟹蟹苗密度与 eDNA 浓度间的关系

Fig. 8 Relationship between *Eriocheir sinensis* megalopa density and eDNA concentration in the Tuanjiesha waters

2.6 团结沙水域的时滞效应

采用错位相关法量化两个采样点蟹苗密度与 eDNA 浓度之间的时滞效应。结果显示, 北八溆水域不具有时滞效应, 团结沙水域具有时滞效应。团结沙水域结果表明, 当 $k=5$ 时相关系数 R 最大, 最大相关系数 R_m 为 864.96, 蟹苗密度变化早于 eDNA 浓度。当相关系数最大时, 时滞时间为 5 d。时滞后的 Pearson 相关分析结果表明, 团结沙蟹苗密度与 eDNA 浓度间极显著性相关($P<0.01$),

相关系数为 0.949。时滞后的蟹苗密度与 eDNA 浓度如图 9 所示。

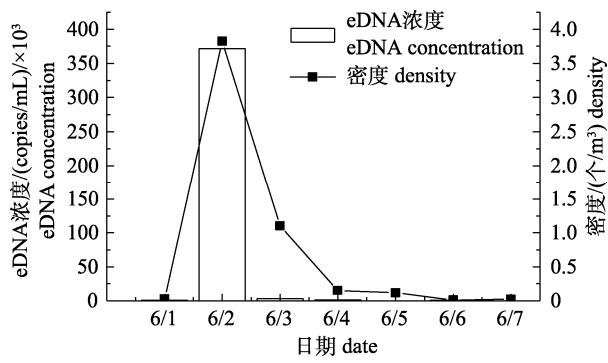


图 9 时滞修正后中华绒螯蟹蟹苗密度与 eDNA 浓度的时间变化

Fig. 9 Temporal variation of *Eriocheir sinensis* megalopa density and eDNA concentration after time delay correction

将时滞后的 eDNA 浓度数据标准化处理后,对蟹苗密度与标准化后的 eDNA 浓度进行线性、幂函数、二次项函数拟合(图 10),结果表明蟹苗密度与 eDNA 浓度间的线性方程拟合程度最高(表 6), $y=0.78x+2.23$, $R^2=0.7470$ 。

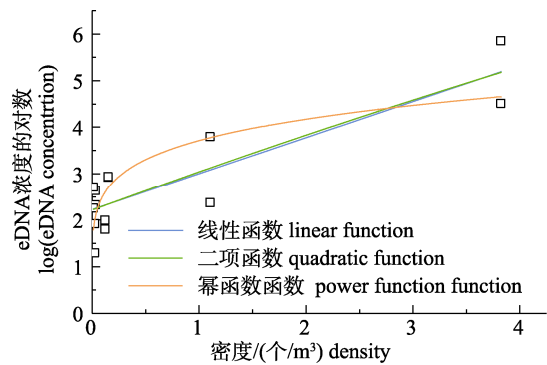


图 10 时滞修正后中华绒螯蟹蟹苗密度与 eDNA 浓度间的关系

Fig. 10 Relationship between *Eriocheir sinensis* megalopa density and eDNA concentration after time delay correction

表 6 时滞修正方程中华绒螯蟹蟹苗密度与 eDNA 浓度间拟合结果

Tab. 6 Fitting results of *Eriocheir sinensis* megalopa density and eDNA concentration equation after time delay correction

方程 equation	<i>F</i>	<i>R</i> ²
幂函数方程 power function equation	113.56	0.6243
线性方程 linear equation	39.39	0.7470
二次项方程 ouadratic equation	18.07	0.7243

3 讨论

3.1 定量曲线的构建

本研究中,室内养殖 72 h 的条件下,4 个浓度实验组蟹苗的 eDNA 浓度与其个体数量间幂函数方程拟合程度最高,二者之间具有正相关关系。这与 Maruyama 等^[22]对蓝鳃太阳鱼(*Lepomis macrochirus*)的定量研究,以及 Takahara 等^[23]对鱼类生物量的研究相似,都得出 eDNA 浓度与生物量之间具有正相关关系的结论。Joseph 等^[24]的研究表明,eDNA 的降解会影响物种的发生和分布数据。本研究中去除蟹苗后,eDNA 降解结果显示,水体中 eDNA 含量与时间为负相关,eDNA 浓度与时间的拟合方程,幂函数方程拟合程度最高。1 个月的时间内,eDNA 浓度从 2233.62 copies/mL 降解到 65.71 copies/mL,eDNA 会在 1 个月左右的时间内降解到较低浓度。这与李苗等^[25]的研究相似。李苗等^[25]发现室内条件下中国明对虾的 eDNA 可在水体中存留 30 d,eDNA 浓度与其生物量间的关系同样也是幂函数方程拟合程度最高。但是如何将室内定量曲线和野外实验研究很好地结合起来,目前还没有较好的解决方法。

3.2 蟹苗密度与 eDNA 浓度间的拟合

运用 eDNA 技术进行定量研究,按照其具有处于不同的环境划分,可分为室内定量实验和野外应用实验,野外应用实验又可分为相对封闭水体(湖泊、水库等)与相对开放水体(江河、海洋等)。目前,eDNA 技术在梯田、湖泊等环境较稳定的水域中应用效果较好,结合室内模拟结果,eDNA 浓度变化可以较好地反映湖泊水域中物种生物量的变化情况。例如,郭娟等^[26]比较了不同生物量条件下养殖水体麦穗鱼(*Pseudorasbora parva*) eDNA 浓度的差异,结果显示 eDNA 浓度与生物量间呈正相关的线性关系。Spear 等^[27]比较了湖泊中大眼狮鲈(*Sander vitreus*)的丰度与 eDNA 浓度之间的关系,发现 eDNA 浓度与丰度之间存在显著性正相关关系。张方圆等^[19]发现中华绒螯蟹亲蟹 CPUE 与表层水及底层水的 eDNA 浓度间均呈极显著相关关系。而李苗^[28]与闫智聪等^[29]的研究表明,海洋生物的生物量与其 eDNA 浓度之间并无

显著的相关关系,这可能与海洋生态系统具有更加复杂的环境因素有关,eDNA 浓度受其影响较大,从而导致研究对象的生物量与其 eDNA 浓度之间无显著关系。

本研究中在中华绒螯蟹蟹苗汛期监测的两个采样点,为北八溇水域和团结沙水域,两个采样点的 eDNA 浓度与生物量的变化,都呈现了先上升后下降的趋势。将两个采样点的 eDNA 浓度数据进行标准化处理后,分别做 Pearson 相关分析,结果表明,团结沙采样点的蟹苗密度与 eDNA 浓度之间不具有相关性,北八溇采样点的蟹苗密度与 eDNA 浓度之间具有极显著相关。本研究北八溇采样点的蟹苗密度与 eDNA 浓度之间具有较好的拟合方程,可能与选取实验的时间与物种有关,实验时间为 5 月下旬,正处于蟹苗汛期,实验物种较集中。而本研究两个实验地点,同一物种,同一时间进行实验,得到相关性不同的一个结果,可能与两个实验地点的环境有关。长江口具有其独特的生态系统,是区分于湖泊生态系统和海洋生态系统的一个生态系统。河口是受海洋和河流影响的海洋、咸水和淡水环境,并且河口在大小、水文环境和其他重要特征方面与海洋和淡水差异较大^[30]。两个实验地点相比,北八溇采样点处于崇明岛北支,涨急流速相比落急流速偏大,在此区域潮水动力起主要作用。团结沙采样点处于崇明岛南支,虽然受到外海潮流影响,但是周围的围填工程会对潮流流速起减小作用,主要受径流作用影响^[31]。

3.3 时滞效应原因的探讨

时滞是时间滞后的简称,时滞效应最先运用到经济领域^[32],时滞效应的特点不仅表现为行动与效果之间存在时间差异,而且表现为传导过程中初始效果与最终证实效果之间存在差异。目前在全球植被对气候变化方面^[33],海洋初级生产力与输出生产力方面^[34]都有关时滞效应的研究。采用错位相关法量化团结沙水域中华绒螯蟹蟹苗密度与 eDNA 浓度之间的时滞效应,发现蟹苗密度变化早于 eDNA 浓度,时滞时间为 5 d。将时滞后的 eDNA 浓度数据标准化处理后,对蟹苗密度与标

准化后的 eDNA 浓度进行方程拟合,结果表明蟹苗密度与 eDNA 浓度间的线性方程拟合程度最高。

本研究中团结沙水域传统方法监测中华绒螯蟹蟹苗与 eDNA 监测蟹苗同时间取样,结果显示蟹苗密度与 eDNA 之间的结果存在差异,蟹苗密度变化早于 eDNA 浓度。猜测原因如下:顾园沙水域附近为中华绒螯蟹蟹苗发生地^[35],根据中华绒螯蟹的洄游路线可知,从蟹苗发生地到达团结沙水域的时间大于到达北八溇水域的时间。在蟹苗洄游途中,生物体本身产生 DNA 的同时,DNA 也会同步降解。团结沙水域虽然会受径流与潮流影响,但是周围具有围填工程,会对潮流流速起减小作用,所以团结沙水域主要受径流影响较大^[36]。据堵南山^[37]推测,蟹苗是垂直迁移,水平移动的行进方式,蟹苗在涨潮时借助潮水缘河而上,退潮时隐伏水底,并利用腹部附着在石块之下,等到下一次涨潮再继续上迁,即蟹苗迁移速度大于水体交换速度,最终蟹苗比其产生的 eDNA 先到达团结沙水域。所以团结沙水域的蟹苗密度与 eDNA 浓度之间具有时滞效应,蟹苗密度变化早于 eDNA 浓度。

蟹苗汛期监测期间,北八溇水域蟹苗的密度与标准化处理后的 eDNA 浓度间极显著性相关,对数方程拟合程度最高。团结沙水域蟹苗密度与 eDNA 浓度之间具有时滞效应,蟹苗密度变化提前于 eDNA 浓度,时滞时间为 5 d。目前 eDNA 技术适用于蟹苗近发生地监测,不适用于蟹苗汛期远离发生地监测。

3.4 不足与展望

由于河口环境较为复杂,室内模拟的 eDNA 定量曲线与降解规律暂时无法运用到野外环境,无法区分检测到的 eDNA 浓度是当天产生,还是多天累计产生。由于监测站点较少,导致现有数据无法解释蟹苗到达北八溇水域的时间,以及产生时滞效应的原因。

eDNA 技术在水生生物资源评估中的应用具有高效、简便、对环境影响小等优点,但针对物种、地理环境、水文情况等不同其检测效果各异,定量评估资源量的方法仍需进一步完善。建立室

内定量曲线与 eDNA 降解曲线时,要参照野外环境的水文因素等,或者要研究在开放水体的条件下,单个环境因子与多个环境因子与 eDNA 浓度与生物量之间的关系,以及单个环境因子与多个环境因子对 eDNA 降解速率的影响。增加蟹苗发生地到达北八潝水域之间的采样点,结合水动力模型研究蟹苗到达北八潝水域的时间,以及产生时滞效应的原因。

参考文献:

- [1] Geng Z, Feng G P, Zhao F, et al. The application of ultrasonic telemetry in the study of spawning ground of *Eriocheir sinensis*[J]. Chinese Journal of Ecology, 2018, 37(12): 3795-3801. [耿智, 冯广朋, 赵峰, 等. 超声波遥测在中华绒螯蟹产卵场研究中的应用[J]. 生态学杂志, 2018, 37(12): 3795-3801.]
- [2] Zhao F, Huang X F, Song C, et al. Selection and use of artificial floating wetland habitats for larval Chinese mitten crab in the Yangtze River Estuary[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2020, 27(9): 1003-1009. [赵峰, 黄孝锋, 宋超, 等. 长江口中华绒螯蟹幼蟹对人工漂浮湿地生境的选择利用[J]. 中国水产科学, 2020, 27(9): 1003-1009.]
- [3] Zhang L S, Lu J T. Study progress on molting and growth of the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. Fisheries Science & Technology Information, 2001, 28(6): 246-250. [张列士, 陆锦天. 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)蜕壳和生长的研究进展[J]. 水产科技情报, 2001, 28(6): 246-250.]
- [4] Geng Z. The environment adaptability and conservation strategy of *Eriocheir sinensis* in estuarine life stages[D]. Shanghai: East China Normal University, 2018: 19-25. [耿智. 中华绒螯蟹河口生活史阶段的环境适应性及保护策略[D]. 上海: 华东师范大学, 2018: 19-25.]
- [5] Yang S L, Milliman J D, Li P, et al. 50,000 dams later: Erosion of the Yangtze River and its delta[J]. Global and Planetary Change, 2011, 75(1-2): 14-20.
- [6] Wu Y L, Wang S K, Zhao F, et al. Habitat selection and behavior characteristics of Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2024, 48(1): 019608. [伍烨菱, 王思凯, 赵峰, 等. 中华绒螯蟹幼体的栖息生境选择与行为特征[J]. 水产学报, 2024, 48(1): 019608.]
- [7] Liu K, Duan J R, Xu D P, et al. Studies on current resource and causes of catch fluctuation of brooders of mitten crab in estuary of the Changjiang River[J]. Journal of Lake Sciences, 2007, 19(2): 212-217. [刘凯, 段金荣, 徐东坡, 等. 长江口中华绒螯蟹亲体捕捞量现状及波动原因[J]. 湖泊科学, 2007, 19(2): 212-217.]
- [8] Shi W G, Zhou X, Du X Y. Studies on dynamic change of matured mitten crab resource in the middle and lower reaches of the Yangtze River[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2002, 26(6): 641-647. [施炜纲, 周昕, 杜晓燕. 长江中下游中华绒螯蟹亲体资源动态研究[J]. 水生生物学报, 2002, 26(6): 641-647.]
- [9] Yu L F, Li C S, Chen W Z, et al. The abundance and distribution of *Eriocheir sinensis* larvae in the mouth of Changjiang River and its preservation strategy[J]. Journal of Fisheries of China, 1999, 23(S1): 34-38. [俞连福, 李长松, 陈卫忠, 等. 长江口中华绒螯蟹蟹苗数量分布及其资源保护对策[J]. 水产学报, 1999, 23(S1): 34-38.]
- [10] Chen X H, Zhu Q S, Yan W H, et al. Chinese mitten-crab's resource current situation and countermeasure for protection in the Jiangsu section of the Yangtze River[J]. Journal of Aquaculture, 2007, 28(2): 8-10. [陈校辉, 朱清顺, 严维辉, 等. 长江江苏段中华绒螯蟹资源现状及保护对策初探[J]. 水产养殖, 2007, 28(2): 8-10.]
- [11] Shen M, Xiao N W, Zhao Z Y, et al. eDNA metabarcoding as a promising conservation tool to monitor fish diversity in Beijing water systems compared with ground cages[J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): Article No.11113.
- [12] Robinson C V, de Leaniz C G, Consuegra S. Effect of artificial barriers on the distribution of the invasive signal crayfish and Chinese mitten crab[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1): Article No.7230.
- [13] Budd A M, Cooper M K, Le Port A, et al. First detection of critically endangered scalloped hammerhead sharks (*Sphyrna lewini*) in Guam, Micronesia, in five decades using environmental DNA[J]. Ecological Indicators, 2021, 127: 107649.
- [14] 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.
- [15] Baldigo B P, Sporn L A, George S D, et al. Efficacy of environmental DNA to detect and quantify brook trout populations in headwater streams of the adirondack mountains, New York[J]. Transactions of the American Fisheries Society, 2017, 146(1): 99-111.
- [16] Stoeckle M Y, Adolf J, Charlop-Powers Z, et al. Trawl and eDNA assessment of marine fish diversity, seasonality, and relative abundance in coastal New Jersey, USA[J]. ICES Journal of Marine Science, 2021, 78(1): 293-304.
- [17] Sun S, Lyu D, Qian T Y, et al. Evaluate the biomass of *Fenneropenaeus chinensis* from the southern coast of Shandong Peninsula using eDNA[J]. Water, 2023, 15(2): 342.
- [18] Chen X Y, Li S, Zhao J D, et al. Passive eDNA sampling

- facilitates biodiversity monitoring and rare species detection [J]. *Environment International*, 2024, 187: 108706.
- [19] Zhang F Y, Wang R X, Yang G, et al. Application of environmental DNA technology in monitoring the broodstock resources of *Eriocheir sinensis* in the Yangtze Estuary[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2024, 48(6): 950-957. [张方圆, 王汝贤, 杨刚, 等. 环境 DNA 技术在长江口中华绒螯蟹亲蟹资源监测中的应用[J]. *水生生物学报*, 2024, 48(6): 950-957.]
- [20] Li C S, Yu L F, Dai G L, et al. Survey for egolopa of *Eriocheir sinensis* and other species megalopa in the estuary of Changjiang river and adjacent waters[J]. *Journal of Fisheries of China*, 1997, 21(S1): 111-114. [李长松, 俞连福, 戴国梁, 等. 长江口及其邻近水域中华绒螯蟹大眼幼体和其它蟹类大眼幼体的调查研究[J]. *水产学报*, 1997, 21(S1): 111-114.]
- [21] Zhang Z T, Zhang Q, Yang N, et al. Time lag effect between winter wheat canopy temperature and atmospheric temperature and its influencing factors[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2023, 54(11): 359-368. [张智韬, 张秋, 杨宁, 等. 冬小麦冠层温度对大气温度的时滞效应与影响因素探究[J]. *农业机械学报*, 2023, 54(11): 359-368.]
- [22] Maruyama A, Nakamura K, Yamanaka H, et al. The release rate of environmental DNA from juvenile and adult fish[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114639.
- [23] Takahara T, Minamoto T, Yamanaka H, et al. Estimation of fish biomass using environmental DNA[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35868.
- [24] Joseph C, Faiq M E, Li Z Y, et al. Persistence and degradation dynamics of eDNA affected by environmental factors in aquatic ecosystems[J]. *Hydrobiologia*, 2022, 849(19): 4119-4133.
- [25] 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. [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.]
- [26] Guo J, Zeng Y, Zheng Y C, et al. Fitting and comparative analysis of the correlation curve between the environmental DNA concentration and biomass of *Pseudorasbora parva* under laboratory rearing conditions[J]. *Tianjin Agricultural Sciences*, 2023, 29(6): 45-49. [郭娟, 曾燭, 郑羽晨, 等. 实验室养殖条件下麦穗鱼(*Pseudorasbora parva*)eDNA 浓度与生物量相关性曲线的拟合与比较分析[J]. *天津农业科学*, 2023, 29(6): 45-49.]
- [27] Spear M J, Embke H S, Krysan P J, et al. Application of eDNA as a tool for assessing fish population abundance[J]. *Environmental DNA*, 2021, 3(1): 83-91.
- [28] Li M. Qualitative and quantitative detection using eDNA technology: A case study of *Fenneropenaeus chinensis* in Bohai Sea[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019: 38-44. [李苗. 基于 eDNA 技术对渤海中国对虾的定性与定量检测[D]. 上海: 上海海洋大学, 2019: 38-44.]
- [29] Yan Z C, Xing J J, Cai W Q, et al. Study on the population distribution of *Acanthaster planci* in the reef area of the Xisha Islands based on environmental DNA technology[J]. *Haiyang Xuebao*, 2023, 45(3): 76-83. [闫智聪, 邢家杰, 蔡文启, 等. 基于环境 DNA 技术的西沙礁区长棘海星种群丰度研究[J]. *海洋学报*, 2023, 45(3): 76-83.]
- [30] Nagarajan R P, Bedwell M, Holmes A E, et al. Environmental DNA methods for ecological monitoring and biodiversity assessment in estuaries[J]. *Estuaries and Coasts*, 2022, 45(7): 2254-2273.
- [31] Li W J, Shen Y M. Influence of the North Branch middling narrowing on hydrodynamics and seawater quality in Yangtze Estuary[J]. *Port & Waterway Engineering*, 2017(12): 42-50, 70. [李文杰, 沈永明. 长江口北支中束窄工程对周边水动力及水质的影响[J]. *水运工程*, 2017(12): 42-50, 70.]
- [32] Zheng J P, Hu Y S. Research on the synergistic time-delay effect of port and city based on the similarity model of time series network[J]. *Logistics Sci-Tech*, 2021, 44(10): 12-18. [郑建平, 胡永仕. 基于时间序列网络相似度模型的港城协同时滞效应研究[J]. *物流科技*, 2021, 44(10): 12-18.]
- [33] Wu D H, Zhao X, Liang S L, et al. Time-lag effects of global vegetation responses to climate change[J]. *Global Change Biology*, 2015, 21(9): 3520-3531.
- [34] Bao M, Xiao W P, Huang B Q. Progress on the time lag between marine primary production and export production[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2023, 62(3): 314-324. [鲍敏, 肖武鹏, 黄邦钦. 海洋初级生产力与输出生产力的时滞效应研究进展[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2023, 62(3): 314-324.]
- [35] Luan K F, Li H, Pan Y J, et al. Characterization of suspended sand concentrations in the Yangtze River Estuary and adjacent waters[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2023, 10: 1178862.
- [36] Hu D C, Wang M, Yao S M, et al. Study on the spillover of sediment during typical tidal processes in the Yangtze Estuary using a high-resolution numerical model[J]. *Journal of Marine Science and Engineering*, 2019, 7(11): 390.
- [37] Du N S. Migration of Chinese mitten-handed crab *Eriocheirs sinensis*[J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 2004, 31(2): 56-57, 94. [堵南山. 中华绒螯蟹的洄游[J]. *水产科技情报*, 2004, 31(2): 56-57, 94.]

Application of eDNA technology for monitoring megalopa resources of *Eriocheir sinensis* in the Yangtze River estuary

ZHANG Fangyuan^{1,2,3}, TAN Qingyuan^{1,2,3}, GENG Zhi^{1,2}, YANG Gang^{1,2}, ZHAO Feng^{1,2}, ZHANG Tao^{1,2}

1. Key Laboratory of East China Sea & Oceanic Fishery Resources Exploitation and Utilization, Ministry of Agriculture and Rural affairs; East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;
2. Shanghai Engineering Research Center of Fisheries Stock Enhancement and Habitat Restoration of the Yangtze Estuary, Shanghai 200090, China;
3. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: *Eriocheir sinensis* is an important economic species in China. It is widely distributed in the Yellow River, Yangtze River, and other river basins in China. It exhibits distinct feeding migrations and reproductive migrations. However, since the implementation of a 10-year fishing ban in the Yangtze River, it has been difficult to obtain fishery data. Therefore, a new method for monitoring *E. sinensis* resources under the background of the fishing ban in the Yangtze River needs to be established to monitor megalopa resources during the flood season. In this study, eDNA technology was used to monitor the abundance of *E. sinensis* megalopae, which helped reveal the dynamic changes in the population size of megalopae in the Yangtze River estuary and monitor the resource status of *E. sinensis*. By establishing an indoor quantitative curve and collecting eDNA samples from the Yangtze River Estuary, combined with megalopa resource survey data, the distribution of *E. sinensis* megalopa resources in the Yangtze River estuary was elucidated. The indoor quantitative curve of megalopae in the four concentration experiments (with concentration gradients of 1 megalopa per 20 liters of water, 10 megalopae, 100 megalopae, and 1000 megalopae) within 72 hours had the best fit with a power function. After removing the larvae, the eDNA concentration in the water was negatively correlated with time, and the power function best represented the relationship between eDNA degradation and time, which was consistent with previous research results for other crustaceans. In June 2023, the average density of megalopae in the Beibayao waters was (23.03 ± 55.10) ind/m³, and the eDNA concentration range was (9145.86 ± 31147.36) copies/mL. There was a highly significant correlation between the density of megalopae and the standardized eDNA concentration, and the power function equation had the best fit. The density of megalopae monitored using a plankton net in the Tuanjiesha waters was (0.38 ± 0.99) individuals/m³, and the eDNA concentration was (29808.3 ± 95359.04) copies/mL. There was a time-lag effect between megalopae density and eDNA concentration in the Tuanjiesha waters, with changes in density preceding changes in eDNA concentration by 5 days. After the lag, the density of megalopae was correlated with the standardized eDNA concentration, and the best-fit equation was a linear equation. The main reason for the lag effect was that the migration speed of megalopae was faster than the water exchange speed; thus, the megalopae arrived at the Tuanjiesha waters before the eDNA they produced. This study demonstrates that the current method of using eDNA technology to analyze *E. sinensis* megalopa resources is only applicable to waters close to the occurrence of the megalopae.

Key words: *Eriocheir sinensis*; megalopa; qPCR; Yangtze River estuary; eDNA

Corresponding author: ZHANG Tao. E-mail: zhangtaifi@163.com