

eDNA 技术在河流—水库生境鱼类多样性评估中的应用 ——以重庆玉滩湖为例*

沈子伟^{1**}, 谢浪^{1**}, 刘寒文¹, 邓华堂¹, 田辉伍¹, 薛洋², 陈大庆¹, 段辛斌^{1***}

(1: 中国水产科学研究院长江水产研究所, 国家农业科学重庆观测实验站, 武汉 430223)

(2: 重庆市水产技术推广总站, 重庆 400020)

摘要: 玉滩湖是重庆市西部四大供水工程之一, 有 2 条入河河流, 是一个典型的多栖境生态系统。截至目前, 尚未见玉滩湖鱼类组成和多样性的相关报道。本研究采用环境 DNA (eDNA) 技术, 与传统鱼类网具调查结果进行对比分析, 研究玉滩湖鱼类群落多样性和结构特征, 探索 eDNA 技术在河流—水库生境鱼类多样性中的应用潜力。结果显示: 应用 eDNA 技术共检测出鱼类 36 种, 隶属于 4 目 11 科 32 属, 物种相对序列丰度分析发现鳊 (*Hypophthalmichthys nobilis*)、鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 的相对丰度较高; 传统鱼类网具调查共检测出 21 种鱼类, 隶属于 3 目 9 科 20 属。eDNA 技术与传统鱼类网具调查共检测出鱼类 42 种, 其中 15 种为共有物种, 占传统鱼类网具调查鱼类总数的 71.43%。基于序列丰度的 α 和 β 多样性分析表明, 湖区、河口和入库缓冲区鱼类组成和多样性呈现出一定的差异, 河口和入库缓冲区的鱼类多样性高于湖区。综上, eDNA 技术在鱼类物种检出率上高于传统鱼类网具调查, eDNA 可作为一项重要的无损性鱼类资源监测辅助手段, 在河流—水库生境资源监测中进一步增加监测的可靠性。

关键词: 玉滩湖; eDNA; 鱼类多样性; 河流—水库生境

The application of eDNA technology in assessing fish diversity in river-reservoir habitats—A case study of Lake Yutan, Chongqing*

Shen Ziwei^{1**}, Xie Lang^{1**}, Liu Hanwen¹, Deng Huatang¹, Tian Huiwu¹, Xue Yang², Chen Daqin¹ & Duan Xinbin^{1***}

(1: National Agricultural Science Observing and Experimental Station of Chongqing, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, P.R.China)

(2: Chongqing Fisheries Technical Extension Center, Chongqing 400020, P.R.China)

Abstract: Lake Yutan is one of the four main water supply initiatives in western Chongqing, with two inflow rivers. It is a typical multi-habitat ecosystem. To date, the fish composition and diversity in Lake Yutan have been scarcely reported. In this study, environmental DNA (eDNA) technology combined with the traditional fish survey was used to investigate the fish community and diversity in Lake Yutan, aiming to explore the potentials of eDNA technology in assessing fish diversity within river-reservoir habitats. The results showed that a total of 36 fish species categorized into 4 orders, 11 families, and 32 genera were identified by eDNA technology. The analysis of relative sequence abundance revealed higher relative abundance for *Hypophthalmichthys nobilis* and *Hypophthalmichthys molitrix*. A total of 21 fish species, categorized into 3 orders, 9 families, and 20 genera, were captured by the traditional fish survey. A total of 42 fish species were detected using the eDNA technology and traditional fish survey, with 15 species being jointly investigated, accounting for 71.43% of the total fishes captured through the traditional fish survey. The results of

* 2024-08-21 收稿; 2024-11-25 收修改稿。

国家重点研发计划项目 (2022YFC3202001)、中华人民共和国农业农村部财政专项 (西南地区重点水域渔业资源与环境调查)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金 (YFI202414) 和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 (2023TD09) 联合资助。

** 并列第一作者。

*** 通信作者; E-mail: duan@yfi.ac.cn。

α and β diversity analysis based on sequence abundance revealed variations in fish composition and diversity across the lake region, estuary, and the buffer zone at the inlet. The fish diversity in the estuary and inlet buffer zone were higher than that observed in the lake region. In summary, our findings demonstrated that the application of eDNA technology had a superior detection rate for fish species compared with the traditional fish survey, and thereby could serve as an invaluable non-invasive supplementary tool for monitoring fishery resources and enhancing the reliability of river-reservoir habitat resource survey.

Keywords: Lake Yutan; environmental DNA; fish diversity; river-reservoir ecosystem

近年来,受人类活动的影响,长江水生态系统遭到严重破坏,淡水鱼类多样性严重下降。全面、准确的鱼类多样性调查是开展鱼类生物多样性保护的重要前提^[1]。传统的鱼类形态学调查通常基于网捕、电捕、视觉观察和诱捕等方式,存在调查结果不全面、估算误差大且对水域生态环境具有一定程度的破坏性等问题^[2-5],难以对鱼类多样性现状与变化进行准确评估。此外,传统鱼类形态学调查的鱼类物种鉴定对从业人员专业水平要求高且方法难以标准化,影响物种鉴定的准确率^[6],亟需探索新的渔业资源调查与监测方法。环境DNA宏条形码技术(eDNA技术)作为一种新兴的鱼类调查手段,具有克服传统调查方法局限性的潜力,并有望成为生物多样性评估的重要工具。

eDNA技术通过分析环境样本(如空气、土壤或水)中的DNA,以确定目标物种的存在,从而实现对生物群落的快速监测^[7]。Thomsen等^[8]在湖泊、溪流等环境中首次利用eDNA技术检测鱼类及其他生物的多样性,开创了eDNA技术在鱼类多样性监测中的应用。eDNA技术作为一种非侵入性取样方法,已被广泛应用于淡水鱼类多样性调查^[9-11]、珍稀濒危物种监测^[12]以及外来入侵种检测等多个领域^[13-14]。eDNA技术作为一种非接触、无损伤、高灵敏度和低成本的监测手段^[15-16],弥补了传统渔业资源调查方法的不足,为水生生物资源和多样性监测提供了新思路。目前,已有的研究主要集中于利用eDNA技术评估特定生境的鱼类群落特征,而利用eDNA技术评估复杂的多栖境生态系统鱼类群落结构特征是该技术在鱼类多样性评估应用中的重要挑战。

玉滩湖(又名玉滩水库)位于重庆市大足区境内,有2条河流流入,上游主要支流为窟窿河和濑溪河,是一个典型的多栖境生态系统。2008年玉滩湖扩建后,由于无序开发以及过度施肥、用药等,该湖水体富营养化严重,水生态系统健康状况下降,渔业资源衰退。2018年,玉滩湖生态环境保护被纳入国家《良好湖泊生态环境保护规划(2011—2020年)》,通过生态安全调查、规范化水源地建设、生态保护与修复等方式推进玉滩湖生态环境保护。鱼类在维持水生生态系统的结构与功能稳定性方面扮演着关键角色,其群落组成和多样性的变化可用作评估不同水域健康状况的重要指标^[17-18]。截至目前,尚无玉滩湖鱼类多样性现状的相关研究,无法满足当前玉滩湖生态渔业发展和生态修复实践的需要,亟需对玉滩湖鱼类组成和多样性进行全面评估。目前,eDNA技术在监测湖泊或水库鱼类多样性的可行性已得到部分研究的验证,如成屏水库^[19]、太湖^[20]、密云水库^[21]、东平湖^[22]等。本研究拟采用eDNA技术与传统鱼类网具调查结果进行比较分析,对玉滩湖鱼类多样性和群落结构进行评估,探讨eDNA技术在河流—水库生境鱼类多样性评估中的应用潜力,并为玉滩湖渔业资源的保护和利用提供重要数据支撑。

1 材料与方法

1.1 采样点设置及样品采集

在玉滩湖坝前、湖区、窟窿河河口、濑溪河河口、入库缓冲区等共设置13个(S1~S13)鱼类资源调查点,采样位点分布见图1。于2023年7月分别在S1~S13位点用采水器采集6L表层水样(在水面以下约30~60cm)。为避免外源DNA的污染,所有采样器具和采样瓶在采样前用10%的氯酸钠溶液进行清洗,并用纯水彻底冲洗。在采样和样品过滤过程中,实验人员佩戴一次性手套和口罩以确保防护。为了防止eDNA降解,水样采集后立即在冷藏条件下保存,并在8h内使用0.45 μm 硝酸纤维素滤膜(Whatman,英国)进行过滤。过滤后的样品存放在5mL无菌无酶的离心管中,并在液氮中保存备用。为评估eDNA提取过程中可能的污染,本研究使用了空白滤膜(即每个采样点每次抽滤2L去离子水)作为1个采样阴性对照。此外,本研究于2023年7月和2024年6月在S2、S3、S5、S8、S10位点进行传统鱼类网具调查,每个位点每次调查持续5d。每个位点布置了3条定置串联笼壶和多网目复合刺网,其中多网目复合刺网网目分别为4、6、8、10

和 14 cm, 长、高分别为 125、1.5 m, 定置串联笼壶网目为 1.6 cm, 长、宽、高分别为 10、0.4、0.4 m。网具放置 12 h 后, 于次日收集所有渔获物, 并依据《中国动物志》^[23-24] 和《四川鱼类志》^[25] 进行鱼类物种鉴定。

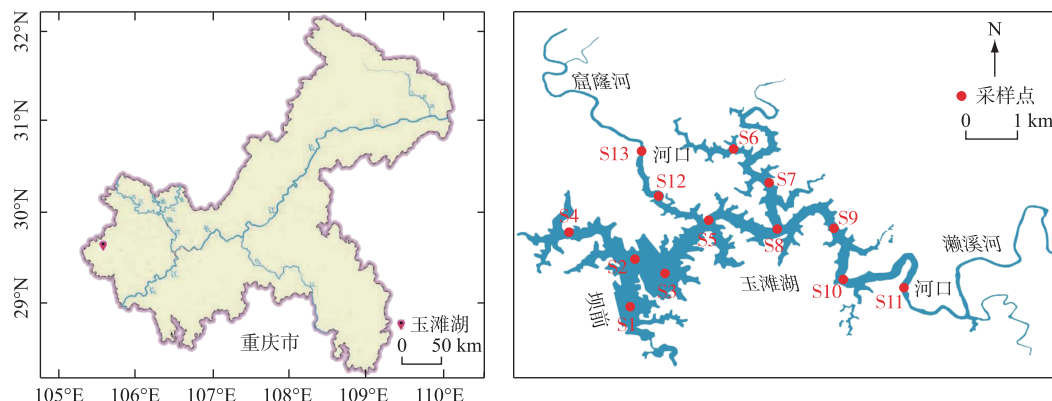


图 1 玉滩湖采样位点

Fig.1 Distribution of sampling sites in Lake Yutan

1.2 eDNA 扩增及高通量测序

总 DNA 按照说明书使用 Power Water DNA Isolation Kits 试剂盒提取, 随后用 1% 琼脂糖凝胶电泳对 DNA 进行质量检测。提取的 eDNA 样品存储在 -20°C 以备后续 PCR 扩增。本研究使用针对线粒体 12S rRNA 基因的鱼类通用引物 (Tele02_F: 5'-AAACTCGTGCCAGCCACC-3', Tele02_R: 5'-GGGTATCTAATCCCAGTTTG-3')^[26]。PCR 反应体系及其条件参考舒璐等的方法^[16], 在 PCR 实验中, 使用 ddH₂O 作为阴性对照。PCR 产物通过 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测目的条带, 然后送往上海凌恩生物科技有限公司, 使用 Illumina NovaSeq 6000 测序平台进行高通量测序^[27], 具体步骤为: 1) DNA 片段的一端与引物碱基互补, 固定在芯片上; 2) 另一端随机与附近的另外一个引物互补, 也被固定住, 形成“桥”; 3) PCR 扩增, 产生 DNA 簇; 4) DNA 扩增子线性化成为单链; 5) 加入改造过的 DNA 聚合酶和带有 4 种荧光标记的 dNTP, 每次循环只合成一个碱基; 6) 用激光扫描反应板表面, 读取每条模板序列第一轮反应所聚合上去的核苷酸种类; 7) 将“荧光基团”和“终止基团”化学切割, 恢复 3' 端粘性, 继续聚合第二个核苷酸; 8) 统计每轮收集到的荧光信号结果, 获知模板 DNA 片段的序列。本研究总共 39 个样本, 每个样本单独构建文库。

1.3 数据分析

在对原始数据进行过滤、拼接、筛选和 OTU (operational taxonomic unit) 聚类后, 将相似度 $\geq 97\%$ 的 OTU 序列与上海凌恩公司自建的淡水鱼类 eDNA 数据库进行比对和注释 (阈值条件为: Identity $> 97\%$, Cover $> 90\%$, E-value $< 10^{-5}$)^[28], 随后通过人工筛选校正, 得到鱼类物种注释结果和 OTU 序列丰度表。通过整合同一物种的 OTU 数据, 进而在目、科、属、种 4 个分类水平上可视化数据组成分布, 从而展示不同分类水平的种类数和序列丰度。使用 R 4.2.1 的 vegan 包和 ape 包进行 Chao1 指数^[29]、Shannon 指数^[30]、Simpson 指数^[31]和 Pielou 均匀度指数^[32]分析以评估玉滩湖各采样位点的鱼类多样性; 基于 Bray-Curtis 距离矩阵进行主坐标分析 (principal coordinates analysis, PCoA)^[33], 探讨不同采样点鱼类群落组成空间分布差异。

2 结果

2.1 鱼类物种组成

2.1.1 基于传统鱼类网具调查的鱼类组成 通过传统鱼类网具调查, 共记录到 21 种鱼类, 隶属于 3 目 9 科 20 属 (表 1)。在所有鱼类中, 鲤形目 (Cypriniformes) 数量最多, 共 14 种, 占总数的 66.67%; 其次是鲈形目 (Perciformes), 共 5 种, 占总数的 23.81%; 鲇形目 (Siluriformes) 共 2 种, 占总数的 9.52%。从科水平上分类, 鲤科 (Cyprinidae) 鱼类最多, 共 12 种, 占 57.14%; 其次是鳅科 (Cobitidae), 2 种, 占 9.52%; 鲢科 (Channidae)、慈鲷科 (Cichlidae)、太阳鱼科 (Centrarchidae)、虾虎鱼科 (Gobiidae)、斗鱼科 (Belontiidae)、鲮科 (Bagridae)、鲴科

(Ameiuridae)鱼类各 1 种,分别占总数的 4.76%。本次调查共发现 3 种外来鱼类,分别是斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)、绿太阳鱼(*Lepomis auritus*)和尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)。

表 1 基于传统鱼类网具调查和 eDNA 技术的玉滩湖鱼类物种组成

Tab.1 List of fish species based on conventional net fishing and environmental DNA technology in Lake Yutan

目	科	属	种	拉丁名	网具调查	eDNA 技术
鲤形目	鲤科	鲮属	大鳍鲮	<i>Acheilognathus macropterus</i>	+	+
	鲤科	鲮属	高体鲮	<i>Rhodeus ocellatus</i>		+
	鲤科	鲮属	中华鲮	<i>Rhodeus sinensis</i>	+	+
	鲤科	鲫属	鲫	<i>Carassius auratus</i>	+	+
	鲤科	鲤属	鲤	<i>Cyprinus carpio</i>	+	+
	鲤科	孟加拉鲮属	伦氏孟加拉鲮	<i>Bangana rendahli</i>		+
	鲤科	棒花鱼属	棒花鱼	<i>Abbottina rivularis</i>	+	
	鲤科	鲮属	花鲮	<i>Hemibarbus maculatus</i>		+
	鲤科	鳊属	黑鳍鳊	<i>Sarcocheilichthys nigripinnis</i>		+
	鲤科	银鲃属	银鲃	<i>Squalidus argentatus</i>		+
	鲤科	麦穗鱼属	麦穗鱼	<i>Pseudorasbora parva</i>	+	+
	鲤科	鲢属	鲢	<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	+	+
	鲤科	鲢属	鲢	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	+	+
	鲤科	草鱼属	草鱼	<i>Ctenopharyngodon idella</i>	+	+
	鲤科	鳊属	鳊	<i>Hemiculter leuciscus</i>	+	+
	鲤科	鳊属	宽鳍鳊	<i>Zacco platypus</i>		+
	鲤科	鲂属	团头鲂	<i>Megalobrama amblycephala</i>		+
	鲤科	赤眼鲮属	赤眼鲮	<i>Squaliobarbus curriculus</i>		+
	鲤科	鲮属	黄尾鲮	<i>Xenocypris davidi</i>		+
	鲤科	鳊属	鳊	<i>Elopichthys bambusa</i>		+
	鲤科	鳊属	鳊	<i>Parabramis pekinensis</i>		+
	鲤科	原鲃属	红鳍原鲃	<i>Chanodichthys erythropterus</i>		+
	鲤科	鲃属	翘嘴鲃	<i>Culter alburnus</i>	+	+
	鲤科	鲃属	拟尖头鲃	<i>Culter oxycephaloides</i>		+
	鲤科	鲃属	蒙古鲃	<i>Culter mongolicus</i>	+	
	鲤科	鲃属	达氏鲃	<i>Culter dabryi</i>		+
	鲃科	泥鳅属	泥鳅	<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	+	+
	鲃科	副泥鳅属	大鳞副泥鳅	<i>Paramisgurnus dabryanus</i>	+	+
	亚口鱼科	胭脂鱼属	胭脂鱼	<i>Myxocyprinus asiaticus</i>		+
鲈形目	虾虎鱼科	吻虾虎属	波氏吻虾虎鱼	<i>Rhinogobius cliffordpopei</i>		+
	虾虎鱼科	吻虾虎属	子陵吻虾虎鱼	<i>Rhinogobius giurinus</i>	+	
	鳊科	鳊属	乌鳊	<i>Channa argus</i>	+	+
	太阳鱼科	黑鲈属	大口黑鲈	<i>Micropterus salmoides</i>		+
太阳鱼科	太阳鱼属	绿太阳鱼	绿太阳鱼	<i>Lepomis auritus</i>	+	
	罗非鱼属	尼罗罗非鱼	尼罗罗非鱼	<i>Oreochromis niloticus</i>	+	+
	斗鱼属	叉尾斗鱼	叉尾斗鱼	<i>Macropodus opercularis</i>	+	
	甲鲮科	翼甲鲮属	豹纹翼甲鲮	<i>Pterygoplichthys pardalis</i>		+
鲇形目	鲇科	鲇属	鲇	<i>Silurus asotus</i>		+
	黄颡科	黄颡鱼属	黄颡鱼	<i>Tachysurus fulvidraco</i>	+	+
	拟鲈科	短尾拟鲈	短尾拟鲈	<i>Pseudobagrus brevicaudatus</i>		+
	鲇科	真鲇属	斑点叉尾鲇	<i>Ictalurus punctatus</i>	+	
鲈形目	胎鲈科	食蚊鱼属	食蚊鱼	<i>Gambusia affinis</i>		+

2.1.2 基于 eDNA 技术的鱼类组成及群落结构 通过 eDNA 技术对玉滩湖的鱼类多样性进行检测,共获得了 7990068 条有效拼接序列,平均序列长度为 170.82 bp。对 OTU 进行注释后,本研究共识别出 36 种鱼类,隶属于 4 目 11 科 32 属,包括国家二级保护鱼类胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)和长江上游特有鱼类伦氏孟加拉鲃(*Bangana rendahli*) (表 1)。在所有鱼类中,鲤形目鱼类最多,共 27 种,占总数的 75%;其次是鲇形目和鲈形目,各有 4 种,各占总数的 11.11%;鲶形目(Cyprinodontiformes)鱼类最少,仅有 1 种,占总数的 2.78%。从科水平上分类,鲤科鱼类最多,共 24 种,占 66.67%;其次是鳅科和鲶科,分别为 2 种,分别占总数的 5.36%;亚口鱼科(Catostomidae)、虾虎鱼科、鳊科、太阳鱼科、慈鲷科、甲鲈科(Loricariidae)、鲇科(Siluridae)、胎鳉科(Poeciliidae)鱼类只有 1 种,分别占总数的 2.78%。eDNA 技术共检测出 3 种外来鱼类,分别是尼罗罗非鱼、大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)和豹纹翼甲鲈(*Pterygoplichthys pardalis*)。

各采样位点 OTU 序列相对丰度(物种序列数占总序列数的比值)分析结果显示:在物种水平上,不同采样点的鱼类组成存在差异(图 2)。鲢(*H. nobilis*)和鳙(*H. molitrix*)相对序列丰度最高,其次是尼罗罗非鱼、波氏吻虾虎鱼(*R. cliffordpopei*)、草鱼(*C. idella*)、鲮(*H. leucisculus*)、鲫(*C. auratus*)、鲤(*C. carpio*),且在各位点广泛分布。

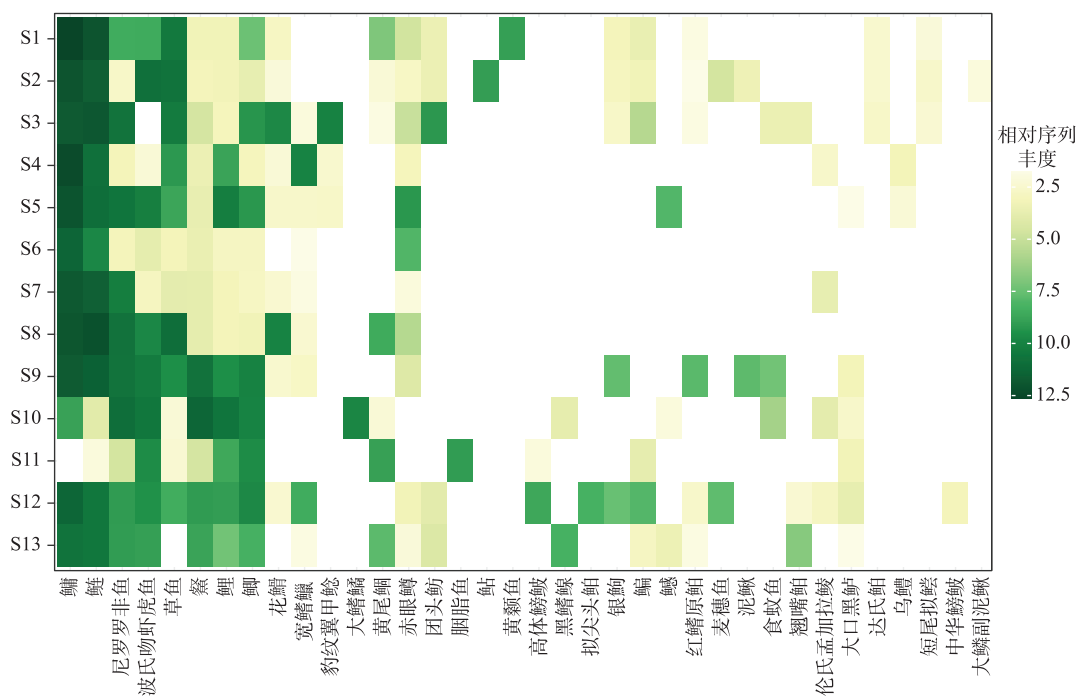


图 2 基于 eDNA 技术的各位点鱼类相对序列丰度

Fig.2 Relative sequence abundance of fish at each sampling site based on environmental DNA technology

2.1.3 eDNA 技术与传统鱼类网具调查结果比较 eDNA 技术与传统鱼类网具调查共检测出鱼类 4 目 13 科 36 属 42 种。在调查的 42 种鱼类中,两种方法均检测到的鱼类有 15 种,占传统鱼类网具调查鱼类总数的 71.43%。为了更直观比较 eDNA 技术与传统鱼类网具调查在鱼类物种检出率上的差异,对湖区 S2、S3、S5、S8、S10 位点的 eDNA 调查结果和传统鱼类网具调查结果进行了对比分析。在 S2、S3、S5、S8、S10 位点, eDNA 技术共调查到鱼类 31 种, eDNA 技术与传统鱼类网具调查共检测出鱼类 39 种(图 3)。在这 39 种鱼类中,两种方法均检测到的鱼类有 13 种,占传统鱼类网具调查总数的 61.9%。传统鱼类网具调查结果中,有 8 种鱼类是 eDNA 技术未检测到的,分别是棒花鱼(*A. rivularis*)、蒙古鲃(*C. mongolicus*)、绿太阳鱼、子陵吻虾虎鱼(*R. giurinus*)、叉尾斗鱼(*M. opercularis*)、中华鲮(*R. sinensis*)、黄颡鱼(*T. fulvidraco*)和斑点叉尾鲷。

2.2 基于 eDNA 技术的鱼类多样性分析

α 多样性分析结果显示,Chao1 指数范围为 10~22, Shannon 指数范围为 0.59~1.99, Simpson 指数范围为 0.33~0.81, Pielou 指数范围为 0.26~0.69(表 2),其中 S10(瀨溪河入库缓冲区)、S11(瀨溪河河口)、S12(窟窿河入库缓冲区)、S13(窟窿河河口)具有较高的 Shannon 指数、Simpson 指数和 Pielou 指数,而 S6 位点 α 多样性指数与其他位点相比最低,表明湖区、河口、入库缓冲区的鱼类多样性存在一定差异。

基于计算 Bray-Curtis 距离矩阵的 PCoA 分析结果表明:湖区、河口和入库缓冲区鱼类群落结构存在较大差异,其中, S6、S10(瀨溪河入库缓流区)、S11(瀨溪河河口)、S12(窟窿河入库缓流区)、S13(窟窿河河口)具有明显不同于其他位点的鱼类组成(图 4)。

3 讨论

3.1 eDNA 宏条形码技术与传统鱼类网具调查方法比较

玉滩湖是重庆市西部四大供水工程之一,也是重要的饮用水水源地。截至目前,尚无玉滩湖鱼类多样性现状的相关研究,其鱼类组成和多样性仍然未知。本研究基于 eDNA 技术和传统鱼类网具调查共发现玉滩湖鱼类 42 种,其中 eDNA 技术共检测出鱼类 36 种,传统鱼类网具调查共发现鱼类 21 种。对湖区主要位点(S2、S3、S5、S8、S10)的 eDNA 调查结果与传统网具调查结果对比分析发现,在 S2、S3、S5、S8、S10 位点,eDNA 技术共检测出鱼类 31 种,eDNA 技术检测出的鱼类种类数高于传统鱼类网具调查。目前,传统鱼类网具调查过程中存在一些挑战,如水域环境条件的差异、鱼类组成的变化以及渔具和网目尺寸的限制,这使得传统鱼类网具调查难以全面覆盖所有鱼类^[34]。eDNA 技术通过采集细胞死亡后释放到水体中的胞外 DNA,能够有效检测到一些生物量较低且容易被传统鱼类网具调查遗漏的物种,从而具有更高的检测效率^[35-36]。研究表明:在美国加利福尼亚北部以及俄勒冈南部海岸线,eDNA 技术对潮汐虾虎鱼的物种检出率几乎是传统围网法的 2 倍^[12]; Valentini 等对两栖类和鱼类的调查结果显示,eDNA 技术可检测到的种群数量要高于或等于传统鱼类形态学调查方法^[37];此外,在物种检出率上 eDNA 技术比连续 3~6 年的电捕调查方法更高,但相当或略低于连续 14 年的电捕调查结果^[38]。在国内,曲疆奇等通过 eDNA 技术在密云水库共监测到 86 种鱼类,高于传统鱼类形态学调查的 43 种^[21]; 顾志刚等通过 eDNA 技术在高碧溪和成屏水库共监测到 31 种鱼类,高于传统鱼类形态学调查的种类(24 种),表明 eDNA 技术与传统鱼类形态学调查方法相比具有更高的敏感性^[19]。目前也有研究表明 eDNA 技术在鱼类物种检出率上低于传统鱼类形态学调查,然而在这些研究中,传统鱼类调查结果往往是基于长时间序列的鱼类调

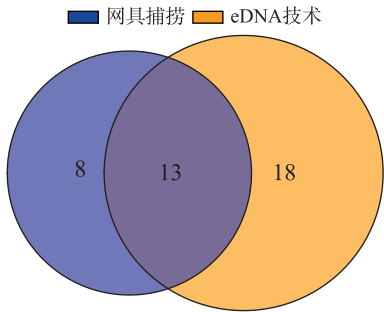


图 3 湖区主要位点传统鱼类网具调查与 eDNA 技术获得鱼类总数比较

Fig.3 Comparison of total fish number of main sites in the lake area obtained by conventional net fishing and eDNA technology

表 2 α 多样性指数统计

Tab.2 α diversity index statistics

采样点	Chao1	Shannon	Simpson	Pielou
S1	18	1.05	0.56	0.36
S2	21	1.33	0.69	0.43
S3	20	1.66	0.75	0.55
S4	14	0.91	0.45	0.34
S5	15	1.62	0.72	0.60
S6	10	0.59	0.33	0.26
S7	12	0.95	0.58	0.38
S8	12	1.52	0.73	0.61
S9	16	1.90	0.81	0.69
S10	15	1.76	0.80	0.65
S11	12	1.57	0.77	0.63
S12	22	1.99	0.78	0.64
S13	17	1.69	0.75	0.60

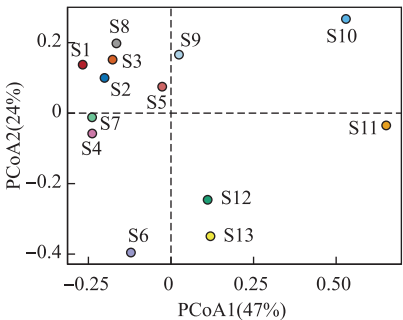


图 4 各采样位点的鱼类群落主坐标分析
Fig.4 PCoA analysis of fish communities at each sampling site

查的历史数据收集^[39-40]。刘燕山等发现在鱼类多样性调查中,单次、单位点物种检出数,eDNA 技术要显著高于传统鱼类形态学调查方法^[20]。由此可见,eDNA 技术在长期鱼类调查中检出的物种数可能少于传统形态学方法,而在短期或单次、单位点物种检出数上,eDNA 技术要高于传统鱼类形态学调查方法。在本研究中,eDNA 技术在鱼类物种检出率上明显高于传统鱼类网具调查,表明在河流—水库生境中 eDNA 技术对鱼类物种检测的灵敏度高于传统鱼类网具调查,尤其是对丰度较低鱼类的检出率,eDNA 技术可能更加灵敏。此外,在湖区 S2、S3、S5、S8、S10 位点,传统鱼类网具调查发现的 21 种鱼中有 13 种成功被 eDNA 技术检测出,表明 eDNA 技术与传统鱼类网具调查在鱼类种类上有一定的相似性,可作为河流—水库鱼类监测的辅助手段,提升调查的可靠性。

3.2 基于 eDNA 技术的玉滩湖鱼类多样性

目前,通常通过 α 多样性指数反映物种群落的丰度和多样性^[28,40]。鱼类群落的 α 多样性分析结果显示,玉滩湖不同采样位点间的鱼类多样性和群落结构呈现出一定的差异。其中,S6 位点的 Chao1 指数、Shannon 指数、Simpson 以及 Pielou 指数均明显低于其他位点,表明其群落丰富度、鱼类多样性最低。研究表明,频繁的人类活动可能对鱼类群落影响较大^[22,41-42]。S6 位点处于玉滩湖北部边缘区域且未被划入禁钓水域,人为捕捞和垂钓较频繁,这可能导致了该位点鱼类群落丰富度和多样性降低。与 S6 相比,由于捕捞、垂钓等人为活动的明显减少,S7 采样位点的鱼类群落丰富度和多样性明显升高,表明人类活动可能是导致 S6 采样位点鱼类多样性降低的主要因素。PCoA 分析结果显示,S10/S11 及 S12/S13 位点具有明显不同于其他采样位点的鱼类组成,并且 Simpson 指数与 Shannon 指数表明 S10/S11 及 S12/S13 位点鱼类多样性水平较高。研究认为在“河—库”或“江—湖”复合生态系统中,上游的流水进入库区的缓流区域后,所携带的有机颗粒物在此区域中悬浮并沉积,从而为该水域的鱼类提供了丰富的饵料资源^[43]。此外,研究表明上游河流对入库缓流区的鱼类群落具有重要的补充作用^[40,44]。本研究中,S11/S10 和 S13/S12 位点鳊、鲫丰度较高。S11 和 S10 位点分别位于濂溪河河口和入库缓流区,S13 和 S12 位点分别位于窟窿河河口和入库缓流区,属于典型的“河流—水库型”生境,上游的濂溪河和窟窿河可能对 S10/S11 及 S12/S13 位点的鱼类群落具有一定的补充功能。

3.3 eDNA 技术的局限性

相比传统鱼类调查的高成本和生态破坏性,eDNA 技术在鱼类多样性监测中更具优势,该方法在不破坏生态系统环境的同时可实现生物快速监测。此外,eDNA 技术灵敏度高,可以检测出传统方法未捕捞到的鱼类,且 eDNA 技术在调查鱼类多样性与传统形态学调查方法结果相比具有较高的相似性^[37,45],目前已广泛应用于水生生物多样性调查、珍稀濒危物种及外来入侵物种预警等工作^[46-47]。然而,eDNA 技术在鱼类多样性研究中的可信度问题一直是目前讨论的热点。由于鱼类 eDNA 在水体中的分布不均匀,其产生和降解受到多种因素的影响,例如水动力条件、紫外线、水温、pH 值以及水域底质^[48-49]。因此,eDNA 调查结果可能与实际情况存在一定的偏差,这就需要进一步研究 eDNA 与影响因素之间的关系。考虑到 eDNA 的降解速率和环境因子的复杂性,Carraro 等基于水文学模型进行了模拟计算,以确定 eDNA 监测的最佳采样方案^[50]。然而,该模型因动力学参数复杂,难以准确模拟 eDNA 降解过程。截至目前,由于采样地点、水文环境及实验条件等多方面变量的影响,eDNA 技术尚无统一的标准化技术操作规范。此外,由于 eDNA 数据库参考序列覆盖度不全,导致 eDNA 条形码数据得不到准确注释,大量的鉴定和标记错误易造成物种漏检或错误鉴定^[51]。在本次传统网具调查结果中,有 6 种鱼类未被 eDNA 技术检测出,可能的原因是 eDNA 参考数据库物种覆盖度不全而导致部分鱼类漏检。因此,优化 eDNA 技术操作规范,建立规范统一的操作方案与流程,构建和完善类群覆盖全、准确性高的 eDNA 条形码数据库将有利于 eDNA 技术在水生生态监测中的广泛应用。

4 结论

本研究通过 eDNA 技术在玉滩湖共检测出 36 种鱼类,通过传统鱼类网具调查监测到 21 种鱼类,综合两种方法的监测结果,共发现玉滩湖鱼类 42 种。相比传统鱼类网具调查,eDNA 技术在物种检出率上高于传统鱼类网具调查。基于序列丰度的鱼类多样性分析结果表明,玉滩湖湖区、河口、入库缓冲区鱼类组成和多

样性呈现出一定的差异,河口和入库缓冲区的鱼类多样性高于湖区。在现有研究基础和背景条件下,eDNA 技术虽然无法完全替代传统的鱼类网具调查,但可作为其有效补充,在河流—水库生境资源监测中进一步增加监测调查的可靠性。

5 参考文献

- [1] Cobos ME, Bosch RA. Breeding sites of a narrowly distributed amphibian, a key element in its conservation in the face of global change. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 2018, **28**(5): 1089-1098. DOI: 10.1002/aqc.2967.
- [2] Yao M, Zhang S, Lu Q *et al.* Fishing for fish environmental DNA: Ecological applications, methodological considerations, surveying designs, and ways forward. *Molecular Ecology*, 2022, **31**(20): 5132-5164. DOI: 10.1111/mec.16659.
- [3] Qin CX, Zuo T, Yu G *et al.* Advances in research of environmental DNA (eDNA) in biomass assessment of aquatic ecosystems. *South China Fisheries Science*, 2020, **16**(5): 123-128. DOI: 10.12131/20190256. [秦传新, 左涛, 于刚等. 环境 DNA 在水生生态系统生物量评估中的研究进展. 南方水产科学, 2020, **16**(5): 123-128.]
- [4] Knudsen SW, Ebert RB, Hesseløe M *et al.* Species-specific detection and quantification of environmental DNA from marine fishes in the Baltic Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2019, **510**: 31-45. DOI: 10.1016/j.jembe.2018.09.004.
- [5] Hao YB, Zhang AJ, Liu JD *et al.* Application of environmental DNA technology in the study of fish resources. *Biotechnology Bulletin*, 2018, **34**(12): 56-62. [郝雅宾, 张爱菊, 刘金殿等. 环境 DNA 技术在鱼类资源研究中的应用. 生物技术通报, 2018, **34**(12): 56-62.]
- [6] Beng KC, Corlett RT. Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and conservation: Opportunities, challenges and prospects. *Biodiversity and Conservation*, 2020, **29**(7): 2089-2121. DOI: 10.1007/s10531-020-01980-0.
- [7] Kasai A, Takada S, Yamazaki A *et al.* The effect of temperature on environmental DNA degradation of Japanese eel. *Fisheries Science*, 2020, **86**(3): 465-471. DOI: 10.1007/s12562-020-01409-1.
- [8] Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL *et al.* Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 2012, **21**(11): 2565-2573. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x.
- [9] Blabolil P, Harper LR, Říčanová Š *et al.* Environmental DNA metabarcoding uncovers environmental correlates of fish communities in spatially heterogeneous freshwater habitats. *Ecological Indicators*, 2021, **126**: 107698. DOI: 10.1016/j.ecolind.2021.107698.
- [10] Zhang S, Lu Q, Wang YY *et al.* Assessment of fish communities using environmental DNA: Effect of spatial sampling design in lentic systems of different sizes. *Molecular Ecology Resources*, 2020, **20**(1): 242-255. DOI: 10.1111/1755-0998.13105.
- [11] Zou KS, Chen JW, Ruan HT *et al.* eDNA metabarcoding as a promising conservation tool for monitoring fish diversity in a coastal wetland of the Pearl River Estuary compared to bottom trawling. *Science of the Total Environment*, 2020, **702**: 134704. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2019.134704.
- [12] Schmelzle MC, Kinziger AP. Using occupancy modelling to compare environmental DNA to traditional field methods for regional-scale monitoring of an endangered aquatic species. *Molecular Ecology Resources*, 2016, **16**(4): 895-908. DOI: 10.1111/1755-0998.12501.
- [13] Thomsen PF, Willerslev E. Environmental DNA—An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 2015, **183**: 4-18. DOI: 10.1016/j.biocon.2014.11.019.
- [14] Larson ER, Graham BM, Achury R *et al.* From eDNA to citizen science: Emerging tools for the early detection of invasive species. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 2020, **18**(4): 194-202. DOI: 10.1002/fee.2162.
- [15] Stat M, Huggett MJ, Bernasconi R *et al.* Ecosystem biomonitoring with eDNA: Metabarcoding across the tree of life in a tropical marine environment. *Scientific Reports*, 2017, **7**(1): 12240. DOI: 10.1038/s41598-017-12501-5.
- [16] Shu L, Lin JY, Xu Y *et al.* Investigating the fish diversity in Erhai Lake based on environmental DNA metabarcoding. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, **44**(5): 1080-1086. DOI: 10.7541/2020.125. [舒璐, 林佳艳, 徐源等. 基于环境 DNA 宏条形码的洱海鱼类多样性研究. 水生生物学报, 2020, **44**(5): 1080-1086.]
- [17] Nogueira C, Buckup PA, Menezes NA *et al.* Restricted-range fishes and the conservation of Brazilian freshwaters. *PLoS One*, 2010, **5**(6): e11390. DOI: 10.1371/journal.pone.0011390.
- [18] Yan YZ, Xiang XY, Chu L *et al.* Influences of local habitat and stream spatial position on fish assemblages in a dammed watershed, the Qingyi Stream, China. *Ecology of Freshwater Fish*, 2011, **20**(2): 199-208. DOI: 10.1111/j.1600-0633.2010.00478.x.
- [19] Xie ZG, Ruan G. Sensitivity and effectiveness evaluation of environmental DNA metabarcoding for monitoring fish species diversity in stream and reservoir waters. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2023, **39**(6): 157-164. [颀志刚, 阮高. 环境 DNA 宏条形码技术应用于溪流和水库鱼类物种多样性监测的敏感性和有效性评估. 中国农学通报, 2023, **39**(6): 157-164.]
- [20] Liu YS, Sun JY, Zhu MS *et al.* Investigation of fish diversity in lake taihu based on eDNA metabarcoding. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2023, **18**(6): 16-26. DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20230717002. [刘燕山, 孙晶莹, 朱明胜等. 基于 eDNA 技术的太湖鱼类多样性调查. 生态毒理学报, 2023, **18**(6): 16-26.]

- [21] Qu JQ, Hao TF, Li YG *et al.* Analysis of fish community structure and ecological niche changes in Miyun Reservoir based on environmental DNA technology. *Journal of Dalian Ocean University*, 2024, **39**(2): 298-307. [曲疆奇, 郝桐锋, 李永刚等. 基于 eDNA 技术的密云水库鱼类群落结构及生态位变化分析. 大连海洋大学学报, 2024, **39**(2): 298-307.]
- [22] Tong YD, Kuang Z, Liu PF *et al.* Fish diversity in the Dongping Lake based on environmental DNA techniques. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2023, **30**(12): 1530-1542. DOI: 10.7541/2020.125. [全亚东, 匡箴, 刘鹏飞等. 基于环境 DNA 技术的东平湖鱼类多样性研究. 中国水产科学, 2023, **30**(12): 1530-1542.]
- [23] 陈宜瑜. 中国动物志——硬骨鱼纲鲤形目(中卷). 北京: 科学出版社, 1998.
- [24] 乐佩琦. 中国动物志——硬骨鱼纲鲤形目(下卷). 北京: 科学出版社, 2000.
- [25] 丁瑞华. 四川鱼类志. 成都: 四川科学技术出版社, 1994.
- [26] Xue FL, Yao DD, Yang YW *et al.* Fish diversity analysis of artificial lakes in karst plateau based on eDNA metabarcoding technology. *Journal of Southern Agriculture*, 2022, **53**(10): 2725-2735. [许龙飞, 姚邓雕, 杨原伟等. 基于 eDNA 宏条形码技术的喀斯特高原人工湖泊鱼类多样性分析. 南方农业学报, 2022, **53**(10): 2725-2735.]
- [27] Lv HS, Wang AX, Dong ZL *et al.* Selection and verification of eDNA universal primers for fish in the upper Yangtze River. *Journal of Fisheries of China*, 2024, **48**(6): 72-84. DOI: 10.11964/jfc.20220813650. [吕宏森, 王安香, 董智玲等. 长江上游鱼类环境 DNA 通用引物的选择与验证. 水产学报, 2024, **48**(6): 72-84.]
- [28] Dong ZL, Chen SS, Lv HS *et al.* Study on fish diversity in Chongqing Jiangbei section of upper reaches of Yangtze River based on environmental DNA technology. *Asian. Journal of Ecotoxicology*, 2023, **18**(6): 1-15. DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20230529002. [董智玲, 陈莎莎, 吕宏森等. 基于环境 DNA 技术的长江上游重庆市江北段鱼类多样性研究. 生态毒理学报, 2023, **18**(6): 1-15.]
- [29] Causey BD. Parametric estimation of the number of classes in a population. *Journal of Applied Statistics*, 2002, **29**(6): 925-934. DOI: 10.1080/02664760220136221.
- [30] Shannon CE. A mathematical theory of communication. *ACM SIGMOBILE Mobile Computing and Communications Review*, 2001, **5**(1): 3-55. DOI: 10.1145/584091.584093.
- [31] Simpson EH. Measurement of diversity. *Nature*, 1949, **163**(4148): 688. DOI: 10.1038/163688a0.
- [32] Pielou EC. The measurement of diversity in different types of biological collections. *Journal of Theoretical Biology*, 1966, **13**: 131-144. DOI: 10.1016/0022-5193(66)90013-0.
- [33] Dixon P. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *Journal of Vegetation Science*, 2003, **14**(6): 927-930. DOI: 10.1111/j.1654-1103.2003.tb02228.x.
- [34] MacKenzie DI, Nichols JD, Sutton N *et al.* Improving inferences in population studies of rare species that are detected imperfectly. *Ecology*, 2005, **86**(5): 1101-1113. DOI: 10.1890/04-1060.
- [35] Harper LR, Griffiths NP, Handley LL *et al.* Development and application of environmental DNA surveillance for the threatened crucian carp (*Carassius carassius*). *Freshwater Biology*, 2019, **64**(1): 93-107. DOI: 10.1111/fwb.13197.
- [36] Yamamoto S, Masuda R, Sato Y *et al.* Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Scientific Reports*, 2017, **7**: 40368. DOI: 10.1038/srep40368.
- [37] Valentini A, Taberlet P, Miaud C *et al.* Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 2016, **25**(4): 929-942. DOI: 10.1111/mec.13428.
- [38] 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. *Journal of Fish Biology*, 2020, **97**(2): 444-452. DOI: 10.1111/jfb.14383.
- [39] Li XQ, Wu KY, Ni DF *et al.* Impacts of cascade dams on the diversity of fish species in an important tributary of the upper reaches of Yangtze River based on environmental DNA technology: A case study of Qijiang River. *Acta Ecologica Sinica*, 2024, **44**(19): 8865-8883. DOI: 10.20103/j.stxb.202307181531. [李筱芹, 吴开阳, 倪达富等. 基于环境 DNA 技术的梯级水坝对长江上游重要支流鱼类多样性的影响研究. 生态学报, 2024, **44**(19): 8865-8883.]
- [40] Yang W, Shu ZB, Zhang XB *et al.* Fish diversity in fluctuating backwater area of the Three Gorges Reservoir based on eDNA metabarcoding. *Journal of Hydroecology*, 2023, **46**(2): 122-133. DOI: 10.15928/j.1674-3075.202211210467. [杨威, 舒政博, 张先炳等. 基于环境 DNA 宏条形码的三峡水库变动回水区鱼类多样性研究. 水生态学杂志, 2023, **46**(2): 122-133.]
- [41] Jiang XL, Li MZ, Yang SR *et al.* Temporal variation of fish biodiversity in Poyang Lake. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2023, **47**(3): 376-388. DOI: 10.7541/2023.2022.0317. [蒋祥龙, 黎明政, 杨少荣等. 鄱阳湖鱼类多样性的时空变化特征研究. 水生生物学报, 2023, **47**(3): 376-388.]
- [42] Wang S, Duan XB, Chen WJ *et al.* Status and changes of fish resources in the Hukou area of Poyang Lake. *Freshwater Fisheries*, 2016, **46**(6): 50-55. [王生, 段辛斌, 陈文静等. 鄱阳湖湖口鱼类资源现状调查. 淡水渔业, 2016, **46**(6): 50-55.]
- [43] Lin PC, Liu F, Li MZ *et al.* Spatial pattern of fish assemblages along the river-reservoir gradient caused by the Three Gorge Reservoir (TGR). *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, **42**(6): 1124-1134. DOI: 10.7541/2018.138. [林鹏程, 刘飞, 黎明政等. 三峡水库蓄水后长江上游鱼类群聚沿河流-水库梯度的空间格局. 水生生物学报, 2018, **42**(6): 1124-1134.]

- [44] Wang Z, Sathrajith AT, Xie SG *et al.* Effect of the impoundment of dam cascade in Jinsha River and increased water level of the Three Gorges Reservoir on the distribution and abundance of *Pseudolaubuca engraulis* (*nichols*) larvae in the upper mainstream of the Yangtze River. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, **43**(3): 606-611. DOI: 10.7541/2019.073. [王震, Sathrajith AT, 谢松光等. 金沙江梯级大坝运行和三峡水库运行水位增高对长江上游干流寡鳞鲃鱼仔鱼丰度和分布的影响. 水生生物学报, 2019, **43**(3): 606-611.]
- [45] Ling JZ, Jiang YZ, Sun P *et al.* Application and evaluation of environmental DNA technology in fish diversity research in Xiangshan Bay. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, **28**(2): 205-214. DOI: 10.12264/JFSC2020-0219. [凌建忠, 姜亚洲, 孙鹏等. 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. 中国水产科学, 2021, **28**(2): 205-214.]
- [46] Lin YY, Zhao Z. Application of environmental DNA technologies in monitoring aquatic invasive species. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2021, **16**(6): 1-12. DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20210122001. [林渊源, 赵峥. 环境 DNA 技术在水生入侵生物监测中的应用. 生态毒理学报, 2021, **16**(6): 1-12.]
- [47] Wu YS, Tang YK, Li JL *et al.* The application of environmental DNA in the monitoring of the Yangtze finless porpoise, *Neophocaena phocaenoides asaeorientalis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, **26**(1): 124-132. DOI: 10.3724/SP.J.1118.2019.18133. [吴昫晟, 唐永凯, 李建林等. 环境 DNA 在长江江豚监测中的应用. 中国水产科学, 2019, **26**(1): 124-132.]
- [48] Barnes MA, Turner CR. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics. *Conservation Genetics*, 2016, **17**(1): 1-17. DOI: 10.1007/s10592-015-0775-4.
- [49] Pilliod DS, Goldberg CS, Arkle RS *et al.* Factors influencing detection of eDNA from a stream-dwelling amphibian. *Molecular Ecology Resources*, 2014, **14**(1): 109-116. DOI: 10.1111/1755-0998.12159.
- [50] Carraro L, Stauffer JB, Altermatt F. How to design optimal eDNA sampling strategies for biomonitoring in river networks. *Environmental DNA*, 2021, **3**(1): 157-172. DOI: 10.1002/edn3.137.
- [51] Bush A, Compson ZG, Monk WA *et al.* Studying ecosystems with DNA metabarcoding: Lessons from biomonitoring of aquatic macroinvertebrates. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 2019, **7**: 434. DOI: 10.3389/fevo.2019.00434.