*J. Lake Sci.(湖泊科学)*, 2026, 38(3):000-000
DOI 10.18307/2026.0331


# 走航式大体积 eDNA 采样法开发及其在长江鱼类监测中的应用*

王一帆[1]，钟文军[1]，张 颜[1]，张 松[1]，李 栩[1]，张效伟[1,2,3**]
（1：国家环境保护长江中下游水生态健康重点实验室，南京大学环境学院，南京 210023）
（2：云南大学生态与环境学院&云南省高原山地生态与退化环境修复重点实验室，昆明 650500）
（3：植被结构功能与建造全国重点实验室，云南大学，昆明 650500）

**摘 要：**全面获取水生生物数据是有效开展水生态系统保护与修复的重要基础。在大型河流中高效监测水生生物的动态变化仍面临诸多挑战。环境 DNA（eDNA）技术作为一种新兴的监测手段，因其快速、高效的特点而备受关注。然而，传统的断面小体积 eDNA 采样方法在稀有鱼类物种的检测上存在明显局限。为此，本研究开发了一种新型走航式大体积 eDNA 采样方法，采用胶囊过滤技术（Capsule Filtration）大幅提升单一样品的水体富集体积，并结合走航采样策略，有效提高了 eDNA 宏条形码监测的效率。我们在长江下游两个典型断面开展了走航大体积与断面小体积采样方法的对比研究，所有 eDNA 样本均使用 Tele02 引物进行扩增与测序分析。结果表明：（1）走航大体积采样法平均每个样本检出鱼类 38 种，较断面小体积法（12 种）提升超过两倍（216.7%）；（2）走航大体积法在生物多样性检测的准确性及平行样本的稳定性方面均优于断面小体积法；（3）走航大体积法共检出 24 种重点关注鱼类（包括 IUCN 红色名录中的珍稀濒危物种、中国国家重点保护经济鱼类及中国特有鱼类），较断面小体积法（16 种）增加 50%，其中 14 种为共有物种。研究表明，基于大容量过滤的走航大体积 eDNA 采样方法在鱼类物种检出率、检测准确性与稳定性，以及重点关注鱼类检出能力方面均具有显著优势。
**关键词：**鱼类 eDNA；淡水生态系统；珍稀濒危鱼类；大型河流；大容量过滤法

## A cruise-based large-volume eDNA sampling Method for fish monitoring in the Yangtze River*

Wang Yifan[1], Zhong Wenjun[1], Zhang Yan[1], Zhang Song[1], Li Xu[1]&Zhang Xiaowei[1,2*]
*（1：State Environmental Protection Key Laboratory of Water Ecological Health in the Middle and Lower Reaches of the Yangtze River, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210023, P.R.China）*
*（2：School of Ecology and Environment & Key Laboratory of Plateau Mountain Ecology and Degraded Environment Restoration in Yunnan Province, Kunming 650500, P.R.China）*
*（3：State Key Laboratory of Vegetation Structure, Function and Construction, Yunnan University, Kunming 650500, P.R.China）*

Abstract: Comprehensive data on aquatic organisms are fundamental for the effective conservation and restoration of aquatic ecosystems. However, efficiently monitoring biodiversity dynamics in large river systems remains a significant challenge. Environmental DNA (eDNA) technology is an emerging monitoring approach that offers rapid and high-throughput advantages.

* 2024-11-08 收稿;2025-10-13 收修改稿。
国家重点研究计划项目 (2022YFC3202101)资助。
** 通信作者；E-mail: zhangxw@nju.edu.cn.

Yet, conventional small-volume cross-sectional eDNA sampling methods have clear limitations, particularly in detecting rare fish species. To address this, we developed a novel mobile large-volume eDNA sampling method. This method substantially increases the filtered water volume per sample using capsule filtration and integrates a mobile sampling strategy to enhance the efficiency and representativeness of eDNA metabarcoding surveys. We conducted comparative surveys at two representative cross-sections in the lower Yangtze River to evaluate differences in fish diversity detection between the mobile large-volume method and the conventional small-volume cross-sectional method. All eDNA samples were amplified and sequenced using the Tele02 primer set. The results demonstrated that: (1) Each large-volume mobile sample detected an average of 38 fish species, a 216.7% increase compared to the small-volume cross-sectional method (12 species); (2) The mobile large-volume method exhibited greater accuracy in biodiversity detection and higher consistency among replicates; (3) The mobile large-volume method detected 24 fish species of conservation concern, including rare and endangered species on the IUCN Red List, species listed in China's Catalogue of National Key Protected Economic Aquatic Animals and Plants, and Chinese endemic species. This represents a 50% increase compared to the 16 species detected by the cross-sectional small-volume method, with 14 species shared between the approaches. In summary, this study confirms that the mobile large-volume eDNA sampling method offers significant advantages in species detection rates, precision, stability, and the identification of fish species of primary conservation concern in large river systems.
Keywords: fish eDNA; freshwater ecosystems; rare and endangered fish; large rivers; Capsule Filtration

全面的水生生物多样性数据是评估生态系统变化和政策保护成效的必要前提。长江、多瑙河、尼罗河和湄公河等全球性大河孕育着丰富的鱼类生物多样性[1, 2]。鱼类生物多样性，尤其是重点保护鱼类（一般为珍稀濒危鱼类及特有种），广泛用于指示河流生态系统的稳定性和恢复力[3, 4, 5]。长江作为全球第三大河流和鱼类特有物种分布的热点区域[6, 7, 8]，其鱼类生物多样性变化速度超过了传统形态学监测方法能够监测的频率和尺度[9]。

与传统形态学监测方法相比，eDNA 技术为实施快速、高效地掌握水生生物群落的变化和生态修复措施的成效提供新的技术手段，是一种潜在补充甚至替代传统形态学的生物监测方法[10, 11]。然而，目前 eDNA 技术在大型河流的研究中面临大型水体尺度和保护物种低 DNA 浓度的挑战[12, 13]。采用合理的 eDNA 采样策略，是实施快速、精准监测的前提[14, 15, 16]，传统断面小体积 eDNA 采样法曾成功应用于长江的 eDNA 采样，即使用 0.5~1.5 L 水经 0.45 μm 聚醚砜（PES）滤膜进行 eDNA 富集采样，常规采用少量水样（<6 L）的 eDNA 过滤方法被证明难以对低密度目标物种如稀有鱼类物种进行有效监测[17]。然而较大的水样体积可提高样本中目标 DNA 的浓度，并改善 eDNA 的检测效果[18]。除 eDNA 的检测效果外，通常还需要考虑采样成本[19]，操作简便性等问题。

相较于断面小体积 eDNA 采样法，大体积水样 eDNA 监测在物种检出上往往可以实现更多物种的检出[20, 21, 22, 23]。目前，大体积水样 eDNA 监测技术已在溪流、小型河流、海洋和湖泊等水体中得到应用，但在大尺度河流生态系统中的测试研究相对较少[24, 25]。

本研究开发了一种新型走航式大体积 eDNA 采样方法，采用胶囊过滤技术（Capsule Filtration）大幅提升单一样品的水体富集体积，并结合走航采样策略，有效提高了 eDNA 宏条形码监测的效率。以长江近河口区为典型研究区域，系统开展了走航大体积采样法与断面小体积采样法在鱼类多样性监测效率方面的对比研究。研究主要从三个维度进行深入分析：（1）采样效率，包括单个样品及相同滤水体积（60 L）条件下的鱼类物种的检出情况；（2）精准性与稳定性；（3）珍稀濒危鱼类等重点关注物种的监测效率。

## 1 方法

### 1.1 生物监测位点选择

研究区域位于长江下游近长江口江段（121.025°-121.038°N,31.763°-31.785°E; 121.102°-

121.104°N,31.725°-31.769°E），该区域渔业资源丰富（图 1AB）。在河流的两个横断面上布设采样点：每个断面设置左岸 1500 m、左岸 300 m、右岸 300 m 和右岸 1500 m 四个水平点位；在每个点位上分别布设表层、中层和底层三个垂直采样层，从而形成 12 个点位 ×2 断面，共计 24 个采样点。

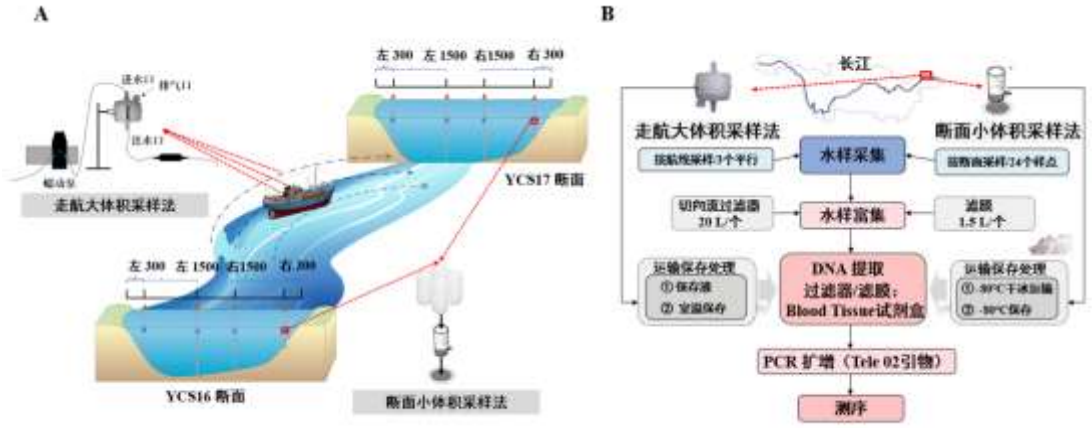


图 1 长江鱼类监测的走航式大体积 eDNA 采样法方法（A）与实验分析流程（B）

Fig.1 Map of sampling sites of the two sampling methods (A) and Experimental procedure of the two sampling methods (B).

**1.2 eDNA 样品采集**

在断面小体积采样中，本研究在 24 个采样点位采用标准采水器采集水样，每点采集 4.5 L 作为基础样本量。采集后立即使用真空泵（南京易基诺环保科技有限公司）进行过滤处理，每 4.5 L 水样分配至三张孔径为 0.45 μm 的聚醚砜滤膜（天津市津腾实验设备有限公司），即每张滤膜过滤 1.5 L 水样，每点位形成 3 个平行样品。所有样品均在采集后 5 分钟内完成抽滤操作，以最大程度保持 eDNA 完整性。最终共获得 72 个独立样品（总过滤体积 108 L），每个富集 eDNA 的滤膜均单独封装于 5 mL 无菌离心管中，并在−20 ℃条件下冷冻保存，直至后续 DNA 提取实验 [26]。

在走航大体积采样中，所用大容量过滤器基于切向流过滤（Tangential-Flow Filtration, TFF）原理。这是一种动态过滤方式，其核心特征为液体流动方向与滤膜表面平行，而非传统死端过滤中液体垂直穿透滤膜。采样装置由蠕动泵（南京易基诺环保科技有限公司）驱动，并通过一次性无菌管路将蠕动泵与孔径为 0.45 μm 的聚醚砜滤膜切向流过滤器（杭州大立过滤设备股份有限公司）连接[27]。现场 eDNA 采样过程中，一艘平行于河岸线行驶的船自 YCS16 断面启动蠕动泵进行过滤，于抵达 YCS17 断面时停止，记录过滤水量。每 20 L 水样过滤至一个切向流过滤器，整个过程设置 3 个平行，共获得 3 个样品（总计 60 L 水样）。每次过滤结束后，将过滤器内的水排空，并使用一次性注射器向其注入 50 mL DNA 保存缓冲液（南京易基诺环保科技有限公司），充分摇匀后以封口膜密封进出水口。与此同时，我们过滤了两个 20 L 的自来水样本作为空白对照。所有过滤器均单独置于独立塑封袋内，于室温条件下保存，直至统一进行 DNA 提取（图 1B）。

**1.3 DNA 提取及 PCR 扩增**

采用 Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit 试剂盒（Qiagen，德国）提取 eDNA，所有样品一次性进行了 DNA 提取，提取后的所有 DNA 样品均各自转移 20 uL 至 96 孔板。利用 Tele02 引物[28]（Primer-F: 5'-AAACTCGTGCCAGCCACC-3'；Primer-R: 5'-GGGTATCTAATCCCAGTTTG-3'）扩增鱼类 12S-rDNA 基因的目标区域，扩增片段长度约 180 bp，其中 Primer-R 引物带有一段唯一的短核苷酸序列，用于标记不同样品。PCR 的扩增体系为 25 μL，包括 12.5 μL TB Green® Premix Ex Taq™ II （RR820A, TaKaRa, 日本） , 10 μM 的上、下游引物各 0.5 μL，0.5 μL 的 ROX Reference Dye (RR820A, TaKaRa, 日本)，0.5 μL 的 BSA solution (PCR Grade) （RFT161, 北京百奥莱博科技有限公司, 中国），1.8 uL 的 DNA 模板及 8.7 uL 的 DEPC 水。PCR 反应在 SureCycler 8800 热循环仪（Agilent Technologies, 美国）

上进行，反应程序为 95℃预变性 30 s，31 个循环反应：95℃变性 30 s，56.3℃退火 30 s 以及 72℃延伸 20 s，最后 72℃持续 10 分钟的最终延伸步骤，4℃保存。PCR 扩增实验中包含 3 个采样空白对照、3 个 DNA 提取空白对照和 2 个 PCR 空白对照。eDNA 的提取和 PCR 均在专门的实验室进行。

### 1.4 文库构建及测序

随后使用 2%的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物，并将扩增产物按照等体积进行混库。使用 VAHTS® DNA Clean Beads（N411, 南京诺唯赞生物科技股份有限公司，中国）并按照制造商提供的步骤纯化混库样品。使用 VAHTS Universal DNA Library Prep Kit for Illumina V3（南京诺唯赞生物科技股份有限公司，中国）进行文库构建，并用 Qubit™ Flex 荧光计（Thermo Fisher Scientific, 美国）测定文库浓度。文库通过 Illumina 测序平台进行双端测序（上海凌恩生物科技有限公司，中国）。

### 1.5 生物信息学分析

测序完成后，首先使用 VSEARCH[29]对产生的双末端 reads 进行组装，然后根据所使用的上下游引物序列通过 Cutadapt 软件[30]对每个样品中的所有序列开展测序文库拆分和引物修整，允许的最大错配率为 0.1。使用 SWARM[31]的无监督算法将所有序列聚类为扩增子序列变体（ASVs），每个序列之间至少有一个核苷酸的距离（d=1）。通过 OBITools 工具包中的最低共同祖先（LCA）算法对所有独特 ASVs 进行分类学分配[32]。根据本土物种分布名录[33]生成仅含本土物种的本地物种条形码参考数据库，优先按序列相似性 100%进行物种注释，注释仅在种水平上进行。对于未注释到种的 ASVs，再通过原始条形码参考数据库进行二次注释。在此过程中，仅目标序列与参考数据库中序列相似性大于等于 98%的序列被认定到种，相似性在 96~98%的序列被认定到属，相似性在 90~96%的序列被认定到科，相似性在 90%以下的序列被认定到目水平。使用名为 TaxonKit[34]的跨平台且高效的 NCBI 分类工具包来加载每个序列的信息，如果可以从 fishbase.org 中找到 ASV 的目水平名称，则该 ASV 被判断为鱼。剔除长度小于 160bp、大于 200 bp 的序列或错配序列[35]，然后使用 LULU 算法[36]根据 ASV 之间的序列一致性移除高通量测序得到的错误的 ASVs。

### 1.6 样品精确性与稳定性评价指标计算

1.6.1 样品精确性评价指标 精确性指重复测量值之间的偏差。精确性越高，证明监测方法更稳定，监测结果更可信。在张丽娟等[37]的研究基础上，我们对于平行在目或科的交叉情况的计算方法如下：

$$\text{三个平行在科或属的交叉率}=\frac{3\times\text{共有的科或属数目}}{\text{平行 A 的 科或属数目}+\text{平行 B 的 科或属数目}+\text{平行 C 的 科或属数目}}$$

$$\text{至少出现在两个平行中的科或属的交叉率}=\frac{2\times\text{只在两个平行共有的科或属数目}+3\times3\text{ 个平行共有的科或属数目}}{\text{平行 A 的 科或属数目}+\text{平行 B 的科或属数目}+\text{平行 C 的 科或属数目}}$$

### 1.7 本研究重点关注物种的界定标准

基于生态保护价值与渔业资源管理需求，本研究将以下三类鱼类群体界定为重点关注物种（Fish of Primary Concern）：（1）列入国际自然保护联盟（IUCN）濒危物种红色名录的珍稀濒危鱼类；（2）列入中国《国家重点保护经济水生动植物资源名录（第一批）》中的鱼类；（3）中国特有鱼类。

## 2 结果

### 2.1 走航大体积采样法方法对长江鱼类物种的识别

走航大体积采样法共获得 408,134 条高质量序列，断面小体积采样法共获得了 2,076,576 条高质量序列。走航大体积采样法使用大容量过滤器，在多个指标上均显著优于采用滤膜的断面小体积采样法。在 DNA 浓度方面，大容量过滤器的平均浓度为 35.64±2.12 ng/μL，显著高于滤膜的 10.40±4.01 ng/μL，提升幅度达 242.7%。在物种检出效率方面，大容量过滤器样品平均检出鱼类 38 种，较滤膜的 12 种提高了 216.7%（图 2A）。测序数据量方面，大容量过滤器平均每个样品获得 136,044 条序列，是断面小体积采样法滤膜（28,841 条）的 4.7 倍。

当滤水体积达到 60 L 时，断面小体积采样法的物种累积曲线已趋于饱和，而走航大体积采样法在同样过滤 60 L 水样的条件下，检出的鱼类物种数量为 42 种，较断面法的 38 种提高了 10.5%。（图 2B）。

本研究通过两种方法共鉴定出鱼类 56 种。

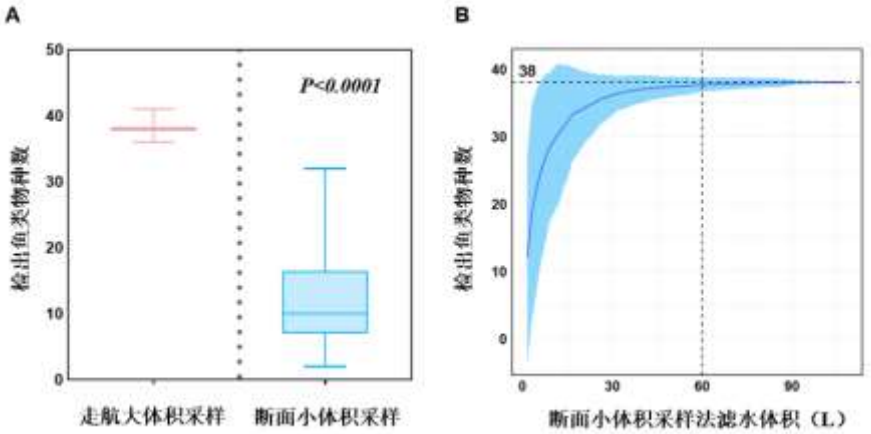


图 2 两种采样方法鱼类物种检出结果比较 A. 单样品鱼类物种检出数量对比；B. 断面小体积采样法物种累积曲线

Fig. 2 Comparison of fish species detection efficiency between two sampling methods. A. Comparison of fish species richness per sample; B. Species accumulation curve.

### 1.2 长江鱼类物种全类群可注释结果（科和属分类单元）的精确性与稳定性评价

走航大体积采样法在平行样品的分类单元交叉率方面显著优于断面小体积采样法。在科水平上，走航大体积采样法的三个平行样品中均检出的交叉率为 85.2%，较断面小体积采样法的 64.0%提高了 32.8%；在至少两个平行样品中检出的交叉率为 94.3%，较断面小体积采样法的 90.0%提高了 4.8%。在属水平上，走航大体积采样法的三个平行样品中均检出的交叉率为 71.4%，较断面小体积采样法的 48.4%提高了 47.5%；在至少两个平行样品中检出的交叉率为 90.5%，较断面小体积采样法的 83.4%提高了 8.5%（表 1）。

表 1 两种采样方法监测数据的精确性评价结果/%

Tab.1 Biodiversity Precision assessment based on two sampling methods/%

| | 分类单元交叉率<br>走航大体积采样法 | | 分类单元交叉率<br>断面小体积采样法 | |
|---|---|---|---|---|
| | 3 个平行均出现 | 至少出现在两个平行 | 3 个平行均出现 | 至少出现在两个平行 |
| 属水平 | 71.4 | 90.5 | 48.4 ± 4.5 | 83.4 ± 3.9 |
| 科水平 | 85.2 | 94.3 | 64.0 ± 2.6 | 90.0 ± 2.0 |

### 2.3 长江重点关注物种监测效率比较

本研究采用两种采样方法共检测到 26 种具有重要生态和经济价值的重点关注鱼类（表 2），涵盖多个生态功能类群，包括：珍稀濒危物种（如刀鲚 *Coilia nasus*）、国家重点保护经济鱼类（如鲢 *Hypophthalmichthys molitrix*）以及中国特有种（如多纹颌须鮈 *Gnathopogon polytaenia*）。其中，走航大体积采样法共检出重点关注鱼类 24 种，较断面小体积采样法的 16 种增加 50%。断面小体积采样法检出的重点关注鱼类中有 14 种（占其检出物种的 87.5%）也被走航大体积采样法检出。

走航大体积采样法在各类重点关注鱼类的检出高度覆盖传统断面小体积采样法，且检出更多物种。走航大体积采样法在珍稀濒危鱼类的检出对于断面小体积采样法覆盖率为 100%；对于国家重点保护经济鱼类，覆盖率为 100%，检出物种数量为断面小体积采样法的 1.7 倍；在中国特有鱼类检测中，覆盖率为 80%，检出物种数量为断面小体积采样法的 1.4 倍（图 3）。

表 2 两种采样方法对重点关注鱼类物种检出结果

Tabl.2 The results of the two sampling methods were used to detect fish of primary concern.

| 序号 | 中文学名 | 拉丁学名 | 走航大体积采样 | 断面小体积采样 |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 似鳎 [c] | *Toxabramis swinhonis* | × | √ |
| 2 | 黏皮鰕虎鱼 [c] | *Mugilogobius* | × | √ |
| 3 | 寡鳞鱎 [a,c] | *Acheilognathus* | √ | √ |
| 4 | 刀鲚 [a,b] | *Coilia nasus* | √ | √ |
| 5 | 草鱼 [b] | *Ctenopharyngodon idella* | √ | √ |
| 6 | 鲤 [a,b] | *Cyprinus carpio* | √ | √ |
| 7 | 鲢 [b] | *Hypophthalmichthys* | √ | √ |
| 8 | 福建小鳔鮈 [c] | *Microphysogobio* | √ | √ |
| 9 | 鲻 [b] | *Mugil cephalus* | √ | √ |
| 10 | 青鱼 [b,c] | *Mylopharyngodon piceus* | √ | √ |
| 11 | 太湖大银鱼 [b,c] | *Protosalanx chinensis* | √ | √ |
| 12 | 南方拟鲿 [a,c] | *Pseudohemiculter dispar* | √ | √ |
| 13 | 波氏吻虾虎鱼 [c] | *Rhinogobius cliffordpopei* | √ | √ |
| 14 | 溪吻虾虎鱼 [c] | *Rhinogobius duospilus* | √ | √ |
| 15 | 高体鳑鲏 [c] | *Rhodeus ocellatus* | √ | √ |
| 16 | 光泽黄颡鱼 [c] | *Tachysurus nitidus* | √ | √ |
| 17 | 鲫 [b] | *Carassius auratus* | √ | × |
| 18 | 长吻鮠 [b,c] | *Leiocassis longirostris* | √ | × |
| 19 | 鳢 [b] | *Elopichthys bambusa* | √ | × |
| 20 | 多纹颌须鮈 [c] | *Gnathopogon polytaenia* | √ | × |
| 21 | 细纹颌须鮈 [c] | *Gnathopogon taeniellus* | √ | × |
| 22 | 海鳗 [b] | *Muraenesox cinereus* | √ | × |
| 23 | 尖头鱲 [c] | *Phoxinus oxycephalus* | √ | × |
| 24 | 方氏鲴 [a,c] | *Xenocypris fangi* | √ | × |
| 25 | 短吻银鱼 [c] | *Hemisalanx* | √ | × |
| 26 | 赤眼鳟 [b] | *Squaliobarbus curriculus* | √ | × |

注释：[a] 珍稀濒危鱼类； [b] 国家重点保护经济鱼类；[c] 中国特有鱼类

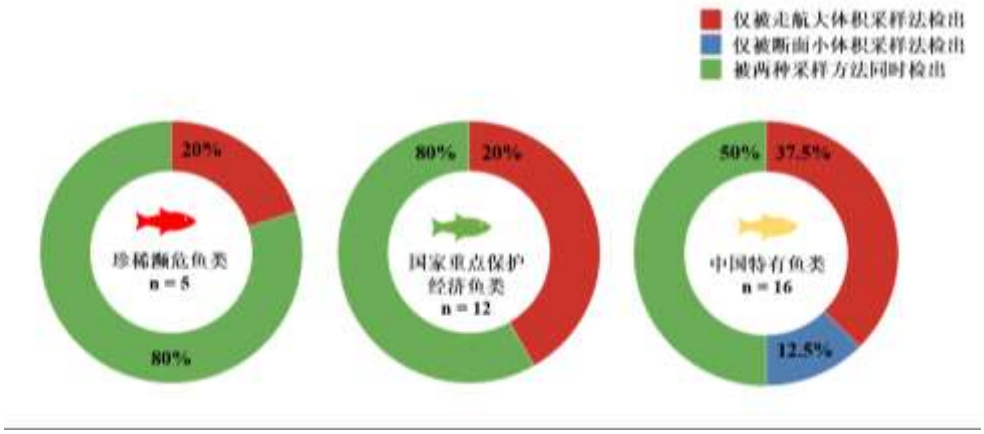


图 3 两种采样方法检测到的珍稀濒危鱼类、国家重点保护经济鱼类、以及中国特有鱼类的数量。

Fig.3 Percentage of rare and endangered fish, key protected fish, and endemic fish to China detected by the two sampling methods

## 3 讨论

### 3.1 走航大体积采样法方法对长江鱼类物种的识别

走航大体积采样法通过增加 eDNA 富集水样体积，提升了样品的 DNA 的浓度以及样品的 DNA 浓度检测结果稳定性，从而显著提升了鱼类物种的检出效率。具体而言，该方法使 DNA 浓度提高了 242.7%。这些改进直接导致单个样品平均检出鱼类物种数达到断面法的 3.4 倍（提高 240%），且样本间变异显著降低（标准差从 7.63 降至 2.52，降幅达 67.0%）。值得注意的是，尽管两种方法使用 100 μL 等体积的 AE 缓冲液进行最终 DNA 洗脱，但由于处理体积差异，大容量过滤器的单位体积 DNA 提取效率反而比传统滤膜低 18.5%。这一发现证实，走航大体积采样法的性能优势主要源于其更大的水样处理能力（提升 500%），而非提取效率的提高。这些结果为优化 eDNA 监测方案提供了重要依据，特别是在需要高灵敏度检测的应用场景中。

本研究结果表明，走航大体积采样法能够有效弥补传统断面小体积采样法在大型河流鱼类多样性监测中的不足。当断面小体积采样法的滤水体积达到 60 L 时，其物种检出能力即达到饱和状态。断面法仅能检出两种方法共同鉴定出的总鱼类物种数的 64.4%（36/56 种），而走航大体积采样法则额外检出 21 种（35.6%）未被断面法发现的鱼类物种。特别值得注意的是，这些未被断面法检出的物种中包含多个生态关键种和重点保护物种。所以在实施常规断面监测的同时，有必要结合走航大体积采样法对断面间区域进行系统调查。这种组合监测策略可使鱼类物种总检出率提升 55.6%，从而为河流生态系统健康评估和保护管理提供更全面的生物多样性数据基础。

### 3.2 鱼类物种多样性监测的精确性和稳定性评价

物种分类单元的交叉率是当前评估 eDNA 监测结果重复性的重要指标[37]。本研究发现，无论是走航大体积采样法还是断面小体积采样法，其平行样本在科水平上的交叉率均显著高于属水平，表明更高阶元的分类单元具有更强的检测重复性。具体而言，走航大体积采样法在属水平的交叉率达 90.5%，断面小体积采样法则为 83.4%，两者均显著高于 50%的阈值。这一结果与张丽娟等[37]的研究结论一致，即当真核藻类属水平交叉率超过 50%时，表明平行样本间具有高度重复性，其数据可合并用于后续生物多样性分析。因此，本研究采用的两种采样方法均能满足平行样本的重复性要求，为后续比较两种方法的检测精确性提供了可靠的数据基础。

走航大体积采样法在科和属水平的平行样品间重复性与稳定性均显著优于断面小体积采样法，其中属水平 3 个平行样均检出的交叉率提升最为明显，达 47.5%。这种优势可能主要源于走航大体积采样法的单次滤水量显著更高,约为断面法的 13 倍，说明在 eDNA 监测中增加单一样本的滤水体积能够有效提高数据的精确性和可重复性。然而，需要强调的是，平行样品间的生物多样性监测差异可能受多种因素影响，包括采样不均匀性、技术误差以及潜在的采样或实验室污染[38,39]。因此，为确保数据可靠性，在 eDNA 监测过程中需要采集平行样品，并对样品处理全流程做好质控，同时通过设置过程对照来识别和校正潜在误差，从而提升最终结果的准确性和可信度。

在本研究中，走航大体积采样法与断面小体积采样法采用了不同的样品保存方法。具体而言，走航大体积采样法在添加 DNA 保存液后采用常温运输保存，而断面小体积采样法样品则采用干冰（-78℃）运输并在实验室-80℃超低温条件下保存。虽然走航大体积采样法的保存方法显著简化了操作流程并提高了运输便利性，但考虑到不同保存条件可能对 eDNA 完整性和检测结果产生影响，我们进行了以下分析：（1）DNA later 在常温下可有效抑制核酸酶活性；（2）超低温保存虽理论上更优，但运输过程中的温度波动可能导致样品反复冻融；（3）两种方法均采用相同的 DNA 提取和扩增流程，可降低后续实验的系统误差。尽管如此，我们建议后续研究应开展系统的保存方法对比实验，以进一步验证不同保存条件对 eDNA 检测效率的影响。

### 3.3 重点关注鱼类的监测效果

走航大体积采样法在重点关注鱼类的监测中表现出显著优势，其检出物种数量较断面小体积采样法提高 50%，并覆盖了后者所检出重点关注鱼类的 87.5%。这一发现与 Coutant 等人[40]的研究结论相吻合，

即大体积采样方法能有效应对大型水体中低密度物种 DNA 检测的挑战。本研究创新性地采用走航式采样设计，通过增大单个样品过滤体积（60L）并结合走航连续采样策略，不仅显著提高了 eDNA 捕获效率，还实现了鱼类物种检出效率的提升，从而为保护物种监测提供了更可靠的技术方案。这些结果进一步证实，在大型河流生态系统监测中，增加水样体积与改进采样设计的协同效应是提升生物多样性监测效能的关键。

## 4 结论

（1）相较于断面小体积采样法，走航大体积采样法检出的鱼类物种数量显著提高了 10.5%。走航大体积采样法在 eDNA 监测效率上全面优于传统断面小体积采样法。DNA 浓度显著提升 242.7%，单个样品平均物种检出量增加 216.7%。在相同 60L 滤水条件下，走航法仍能多检出 10.5%的物种。

（2）走航大体积采样法显著提高了平行样品的精确性与稳定性。走航大体积采样法的平行样品在科与属两个分类阶元的交叉率均高于断面小体积采样法，样品精确性与稳定性相较断面小体积采样法有了显著提升。

（3）走航大体积采样法在各类重点关注鱼类的监测中表现出显著优势，检出物种总数较断面小体积采样法增加 50%，且覆盖其所检出重点关注鱼类的 87.5%，显示出更高的检测灵敏性与生态代表性。

（4）本研究验证了走航大体积采样法在大型河流鱼类多样性监测中的整体适用性与方法学优势。该方法在物种检出率、样品间稳定性及监测效率方面均优于传统断面小体积采样，能够为大型河流鱼类多样性与生态健康评估提供更可靠的数据支撑。未来研究可在更大空间尺度上进一步优化采样设计，以充分发挥该方法在鱼类群落结构识别及热点分布探测中的潜力。

## 5 参考文献


[1] The World's Forgotten Fishes. World Wildlife Fund, 2021.

[2] Altermatt, F. Diversity in riverine metacommunities: a network perspective. Aquatic Ecology, 2013, **47**(3):365-377. DOI: 10.1007/s10452-013-9450-3.

[3] Villéger S, Brosse S, Mouchet M et al. Functional ecology of fish: Current approaches and future challenges. Aquatic Sciences, 2017, 79:783-801. DOI:10.1007/s00027-017-0546-z.

[4] Rashid Hassan, Robert J. Scholes, Neville Ash et al. Ecosystems and Human Well-Being: Current State and Trends: Findings of the Condition and Trends Working Group (Millennium Ecosystem Assessment Series), Island, 2005.

[5] D. Dudgeon, Arthington AH, Gessner MO et al. Freshwater biodiversity: Importance, threats, status and conservation challenges. Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society, 2006, **81**(2):163-82. DOI:10.1017/S1464793105006950.

[6] Wang H, Chen J, Wang P et al. How to manage fish within and after the 10-year fishing ban? The Innovation, 2024, **S2666-6758**(24):00132-2. DOI: 10.1016/j.xinn.2024.100694.

[7] Wang H, Wang P, Xu C et al. Can the “Ten-Year Fishing Ban” Rescue Biodiversity of the Yangtze River? The Innovation, 2022, **3** (3):100235. DOI: 10.1016/j.xinn.2022.100235.

[8] Fu C, Wu J, Chen J et al. Freshwater fish biodiversity in the Yangtze River basin of China: patterns, threats and conservation. Biodiversity & Conservation, 2003, **12** (8):1649-1685. DOI: 10.1023/A:1023697714517.

[9] Yang HL, Wu JM, Zhang H et al. Environmental DNA metabarcoding utilization efficiency in monitoring large river fish species composition: a case study in the Wuhan transect of the Yangtze River. Journal of Fishery Sciences of China, 2021, **28**(6):796-807. DOI:10.12264/JFSC2021-0556. [杨海乐,吴金明,张辉等. 大型河流中鱼类组成的 eDNA 监测效率:以长江武汉江段为例.中国水产科学, 2021, **28**(6):796-807.]

[10] Zhang X. Environmental DNA Shaping a New Era of Ecotoxicological Research. Environmental Science & Technology, 2019, **53**(10):5605-5612. DOI: 10.1021/acs.est.8b06631.

[11] Debroas D, Domaizon I, Humbert JF et al. Overview of freshwater microbial eukaryotes diversity: a first analysis of publicly available metabarcoding data, FEMS Microbiology Ecology, 2017, **93**(4). DOI: 10.1093/femsec/fix023.

[12] Jin K, Zhang L, Zhang W et al. Benthic Macroinvertebrate Biomonitoring and Ecological Assessment in Taihu Lake Basin Based on Environmental DNA Metabarcoding. Environmental Monitoring In China, 2022, **38** (1): 175-188. DOI: 10.19316/j.issn.1002-6002.2022.01.17.[金珂,张丽娟,张伟等. 基于环境 DNA 宏条形码的太湖流域底栖动物监测与生态健康评价. 中国环境监测, 2022, **38** (1): 175-188.]

[13] Zhang Y, Zhang X, Li F et al. Fishing eDNA in One of the World's Largest Rivers: A Case Study of Cross-Sectional and Depth Profile Sampling in the Yangtze. Environmental Science & Technology, 2023, **57**(51):21691-21703. DOI: 10.1021/acs.est.3c03890.

[14] Kirtane, A, Atkinson JD, Sassoubre L. Design and Validation of Passive Environmental DNA Samplers Using Granular Activated Carbon and Montmorillonite Clay. Environmental Science & Technology, 2020, **54** (19):11961-11970. DOI: 10.1021/acs.est.0c01863.

[15] Blackman R, Couton M, Keck F et al. Environmental DNA: The next chapter. Molecular Ecology, 2024, **33**(11): e17355. DOI: 10.1111/mec.17355.

[16] Zhang S, Lu Q, Wang Y 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.

[17] McKee AM, Klymus KE, Lor Y et al. Dead-end hollow fiber ultrafiltration capture of environmental DNA for freshwater mussel (Unionidae) species detection with metabarcoding. Environmental DNA, 2023, **5**(6): 1148-1162. DOI: 10.1002/edn3.464.

[18] Hunter ME, Oyler-McCance SJ, Dorazio RM et al. Environmental DNA (eDNA) sampling improves occurrence and detection estimates of invasive Burmese pythons. PLoS One, 2015, **10**(4): e0121655. DOI: 10.1371/journal.pone.0121655.

[19] Smart AS, Weeks AR, van Rooyen AR et al. Assessing the cost-efficiency of environmental DNA sampling. Methods in Ecology and Evolution, 2016, **7**(11):1291-1298. DOI:10.1111/2041-210x.12598.

[20] 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.

[21] Fernández AP, Marques V, Fopp F et al. Comparing environmental DNA metabarcoding and underwater visual census to monitor tropical reef fishes. Environmental DNA, 2021, **3**(1): 142-156. DOI: 10.1002/edn3.140.

[22] 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). Hydrobiologia, 2021, 848:2931-2950. DOI: 10.1007/s10750-020-04260-8.

[23] Miaud C, Arnal V, Poulain M et al. eDNA Increases the Detectability of Ranavirus Infection in an Alpine Amphibian Population. Viruses, 2019, **11**(6):526. DOI:10.3390/v11060526.

[24] Hervé A, Domaizon I, Baudoin JM et al. Spatio-temporal variability of eDNA signal and its implication for fish monitoring in lakes. PloS one, 2022, **17** (8): e0272660. DOI: 10.1371/journal.pone.0272660.

[25] Muff M, Jaquier M, Marques V et al. Environmental DNA highlights fish biodiversity in mesophotic ecosystems. Environmental DNA, 2022, **5**(1): 56-72. DOI: 10.1002/edn3.358.

[26] 汤楠. 环境 DNA 鱼类监测采样及前处理方法研究[学位论文]. 南京: 南京大学，2022.

[27] Pont D, Rocle M, Valentini A et al. Environmental DNA reveals quantitative patterns of fish biodiversity in large rivers despite its downstream transportation. Scientific Reports, 2018, **8**(1):1-13. DOI: 10.1038/s41598-018-28424-8.

[28] Taberlet P, Bonin A, Zinger L et al. Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring. Oxford University Press, Oxford, United Kindom, 2018.

[29] Rognes T, Flouri T, Nichols B et al. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics. PeerJ. 2016, 4: e2584. DOI: 10.7717/peerj.2584.

[30] Martin Marcel. Cutadapt removes adapter sequences from high throughput sequencing reads. EMBnet.journal, 2011, 17:10−12. DOI: 10.1111/ecog.05049.

[31] Marques V, Guérin PÉ, Rocle M et al. Blind assessment of vertebrate taxonomic diversity across spatial scales by clustering environmental DNA metabarcoding sequences. ECOGRAPHY, 2020, **43** (12):1779−1790. DOI: 10.1111/ecog.05049.

[32] Boyer F, Mercier C, Bonin A et al. OBITOOLS: a UNIX-inspired software package for DNA metabarcoding. Molecular ecology resources, 2016, **16** (1):176−182. DOI: 10.1111/1755-0998.12428.

[33] 庄平. 长江中下游土著和外来鱼类.上海:上海科学技术出版社, 2014.

[34] Shen W, Ren H. TaxonKit: A practical and efficient NCBI taxonomy toolkit. Journal of Genetics and Genomics. 2021, **48**(9):844-850. DOI: 10.1016/j.jgg.2021.03.006.

[35] Froslev, TG, Kjoller R, Bruun HH et al. Algorithm for post-clustering curation of DNA amplicon data yields reliable biodiversity estimates. Nature Communications, 2017, **8**:1188. DOI: 10.1038/s41467-017-01312-x.

[36] Banchi E, Ametrano CG, Tordoni E et al. Environmental DNA assessment of airborne plant and fungal seasonal diversity. Sci Total Environ, 2020, **10**(738):140249. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.140249.

[37] Zhang L, Xu S, Zhao Z et al. Precision of eDNA metabarcoding technology for biodiversity monitoring of eukaryotic phytoplankton in lakes. Environmental Science, 2021, **42**(2): 796-807. DOI: 10.13227/j.hjkx.202007236. [张丽娟, 徐杉, 赵峥等. 环境 DNA 宏条形码监测湖泊真核浮游植物的精确性. 环境科学, 2021, **42**(2): 796-807.]

[38] Zhan AB, He S, Brown EA et al. Reproducibility of pyrosequencing data for biodiversity assessment in complex communities. Methods in Ecology and Evolution, 2014, **5**(9):881-890. DOI: 10.1111/2041-210X.12230.

[39] Wen C, Wu L, Qin Y et al. Evaluation of the reproducibility of amplicon sequencing platform. PLoS One, 2017, **12**(4). DOI: 10.1371/joummal.pone.0176716.

[40] Coutant O, Cantera I, Cilleros K et al. Detecting fish assemblages with environmental DNA: Does protocol matter? Testing eDNA metabarcoding method robustness. Environmental DNA, 2021, **3**(3):619-630. DOI: 10.1002/edn3.158.