

环境 DNA 宏条形码技术与底拖网采样相结合的 辽河口鱼类多样性调查与评价

王小林, 闫龙, 吉光, 董婧, 胥延钊, 王爱勇*, 刘修泽, 王彬, 孔业富

(辽宁省海洋水产科学研究院, 农业农村部水产种质资源保护与发掘利用重点实验室, 辽宁省海洋生物资源与生态学重点实验室, 大连市渔业资源养护重点实验室, 辽宁 大连 116023)

摘要: 为了解辽河口及其邻近海域秋季鱼类组成和多样性特征, 研究环境 DNA 技术 (environmental DNA, eDNA) 在辽河口鱼类多样性监测中的适用性, 于 2023 年 10 月在辽河口及其邻近海域同时采集了 10 个站位的海水 eDNA 样本和底拖网调查鱼类样本, 分别进行高通量测序和生物学测定分析。结果表明, eDNA 样本扩增子序列变体 (amplicon sequence variants, ASVs) 注释结果共鉴定到鱼类 38 种, 其中 2 种仅鉴定到属水平, 底拖网调查共采集到鱼类 16 种, eDNA 技术检测到的鱼类种类数是其 2.3 倍, 共有物种为 13 种; 基于 eDNA 技术的不同站位间鱼类 Alpha 多样性指数无显著性差异 ($P>0.05$), 主成分分析 (PCA) 显示, 前两个主成分能够解释 57.04% 的鱼类群落差异 (PC1 为 43.04%, PC2 为 14.0%), 采样站位间的鱼类群落组成差异不大; 皮尔逊 (Pearson) 相关性分析显示, eDNA 相对丰度与底拖网相对渔获量 (质量、数量) 间的相关性较高, r 值分别为 0.921 和 0.888, 且相关性极显著 ($P<0.01$); 冗余分析 (RDA) 结果显示, 各水环境因子 (温度、盐度、pH、溶解氧和水深) 与鱼类群落结构的相关性不显著 ($P>0.05$)。研究表明, eDNA 技术较底拖网调查方法具有更高的物种检出率, 且 eDNA 的相对丰度与相对渔获量间具有显著相关性, eDNA 技术可以有效运用于辽河口及邻近海域鱼类多样性监测和评估。

关键词: eDNA 技术; 底拖网调查; 辽河口; 鱼类多样性

中图分类号: S 932.4

文献标志码: A

辽河口位于辽东湾北部, 附近有辽河、大辽河、大凌河和小凌河等入海河流, 营养盐充足、饵料生物丰富, 是重要的渔业生产区域, 同时也是辽东湾北部众多渤海经济鱼类的索饵场和产卵场^[1]。近年来, 受环境污染、过度开发及人类活动等因素的影响, 辽河口水域鱼类多样性急剧下降, 甚至出现鱼类群体小型化、低龄化等现象^[2]。因此, 及时准确掌握辽河口海域鱼类生物多样性变化, 对维护辽东湾乃至渤海区渔业生物种群的稳定性及渔业生态健康可持续发展均具有重要意义。

目前, 中国开展海洋渔业资源调查评估的主要手段有底拖网调查法、声学调查法和潜水观测调查法等, 但这些方法均具有一定的局限性^[3]。例如, 底拖网调查法成本高、对资源环境的破坏性较强、覆盖面局限性大 (即无法覆盖礁石区、浅水区

等); 声学调查法和潜水观测调查法对设备和操作人员的要求高、受天气的局限性强 (如风浪天气、水质浑浊等)。而环境 DNA (environmental DNA, eDNA) 技术作为一种新兴的高通量测序技术, 因其采样成本低、普适性强、监测灵敏度高、对生境破坏性小等特点已在水生生态系统鱼类生物多样性调查与监测中得到广泛应用^[4-6], 在渔业资源调查中具有很大应用潜力, 可作为传统渔业资源调查方法的有效补充。eDNA 是指生物体的皮肤、黏液、唾液、粪便、尿液和腐烂体等释放到外界环境介质中的游离 DNA 分子或片段^[7]。eDNA 技术是指通过定量 PCR 和高通量测序, 对环境样品中提取的 eDNA 进行定性和定量分析, 从而推测和评估目标环境中生物的存在、种类、丰度和分布^[8-9]。目前, eDNA 技术已广泛应用于海洋鱼类资源调查评估。

收稿日期: 2024-05-09

基金项目: 大连市创新基金项目 (2023JJ13SN066, 2021JJ11CG001); 辽宁省兴辽英才项目 (XLYC2007068); 国家农业科学渔业资源环境沙河观测实验站项目 (NAESO63FS09); 辽宁省百千万人才资助项目 (2020921064)

作者简介: 王小林 (1986—), 男, 副研究员。E-mail: WangXL8693@qq.com

通信作者: 王爱勇 (1982—), 男, 副研究员。E-mail: wangaiyong@live.com

相关研究中,Stoeckle 等^[10]同时使用底拖网捕捞和 eDNA 技术对美国新泽西海岸的鱼类资源进行了调查;Thomsen 等^[11]运用 eDNA 技术与底拖网技术结合对极地和深海区域的鱼类进行了种类鉴定和生物量评估;言苛程等^[12]运用 eDNA 技术与底拖网技术相结合的方式对南黄海西部鱼类多样性进行调查;另有诸多学者运用 eDNA 技术与底拖网调查相结合的方式分别对黄河口、长江口和珠江口的鱼类生物多样性进行了调查^[13-15]。

迄今,运用 eDNA 技术对辽河口及其邻近海域鱼类多样性调查的研究还比较缺乏,仅在崔晓宇等^[16]基于 eDNA 宏条形码对辽东半岛重要河口鱼类多样性研究中有所涉及,但其仅在辽河口区域设置了 1 个 eDNA 调查站位且缺乏底拖网调查数据,不能准确全面地反映辽河口及其邻近海域鱼类多样性的真实情况。本研究在辽河口及其邻近海域同时开展了 eDNA 采样和拖网调查,通过对拖网调查结果与 eDNA 分析结果的比较,揭示了该海域鱼类种类、丰度和多样性分布特征,旨在为评价辽河口及其邻近海域鱼类种群动态变化及渔业资源可持续利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 拖网调查样品采集及处理

拖网调查采样于 2022 年 10 月 20—23 日进行,调查区域位于辽河口及其邻近海域,站位设置如图 1 所示,调查网具为单船有翼单囊拖网(网口宽度为 10 m,网口高度为 3 m,囊网网目为 20 mm),拖速为 3 kn,每站拖网时间为 30 min。使用 YSI EXO 多参数水质检测仪检测每个站位的水深、温度、盐度、pH 和溶氧等水环境因子。渔获样品带回实验室进行分析处理,渔获种类鉴定到种,并对每种鱼类进行称量(精确到 0.01 g)和数量统计,将数据量化成相对渔获质量(g/h)和相对渔获数量(ind./h)进行分析。采样及样品分析方法参照《海洋调查规范》(GB/T 12763.6—2007)。鱼类鉴定及区系划分参照《辽宁省动物志·鱼类》^[17]《中国海洋生物名录》^[18]和《中国海洋鱼类》^[19]。

1.2 eDNA 样品采集及处理

1.2.1 eDNA 样品采集 eDNA 样品采集与拖网调查采样同步进行。调查船舶在到达预设调查站位后,先行完成 eDNA 水样采集工作,然后放网拖拽作业。在 10 个调查站位共计采集到 30 个 eDNA 样

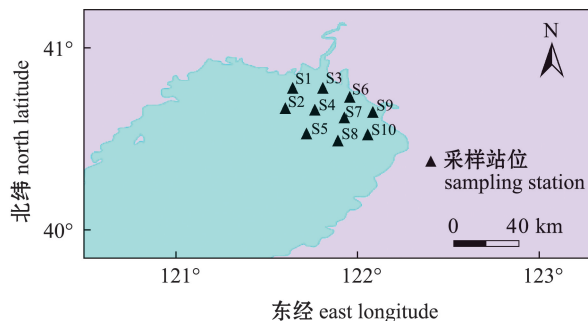


图 1 辽河口调查站位

Fig. 1 Sampling stations in the Liaohe Estuary

本。eDNA 采样方法为先用分层采水器在每个采样站位的表层(距海面<2 m)、中层、底层(距海底<2 m)各采集 1 L 海水,混合储存于容量为 3 L 的一次性无菌采样袋中。然后从无菌采样袋中取 1 L 水样作为 eDNA 样本,每个站位设置 3 个平行样。水样采集后立即在调查船上选用孔径为 0.45 μm 的混合纤维无菌滤膜(Sartorius,德国)和津腾无油真空泵(GM-0.33A)进行水样抽滤。为避免交叉污染,每个样品抽滤前后均使用体积分数为 10% 的次氯酸钠溶液将抽滤容器浸泡消毒 5 min,并用超纯水清洗,且每个样品抽滤使用单独的一次性橡胶手套。每次抽滤设置 1 个阴性对照(过滤 1 L 超纯水),以评估是否存在交叉污染。抽滤后将滤膜保存于 5 mL 的无菌离心管中,用锡箔纸包裹离心管后置于液氮中速冻,带回实验室置于-80 ℃冰箱中保存备用。

1.2.2 eDNA 提取 选用 DNeasy Blood&Tissue kit 试剂盒(Qiagen,德国)进行水样 eDNA 提取,提取好的 eDNA 用 100 μL 的 AE 缓冲液洗脱保存后用 20 g/L 的琼脂凝胶进行电泳检测。将合格的 DNA 提取溶液于-20 ℃冰箱中保存用于后续扩增测序。

1.2.3 PCR 扩增及高通量测序 选用海洋硬骨鱼类线粒体 12S rRNA 基因部分序列通用引物(Mi-Fish-U/E)进行 eDNA 的 PCR 扩增^[20]。PCR 扩增采用 20 μL 反应体系进行:5×FastPfu Buffer 4 μL, dNTPs 2 μL, 正、反向引物各 0.8 μL, FastPfu Polymerase 0.4 μL, 模板 DNA 10 ng, 补 dd H₂O 至 20 μL。扩增条件:95 ℃下预变性 3 min, 98 ℃下变性 20 s, 65 ℃下退火 15 s, 72 ℃下延伸 15 s, 共进行 40 次循环, 72 ℃下终延伸 5 min。为保证后续数据分析的准确性及可靠性,需满足两个条件:1) 尽可能使用低循环数扩增;2) 保证每个样本扩增的循环数一致。随机选取具有代表性的样本进行预试验,确保在最低循环数中使绝大多数样本能够扩增出浓度合适的产物,每个样本重复 3 次,

将同一样本的 PCR 产物混合后用 20 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测,使用 AxyPrepDNA 凝胶回收试剂 (AXYGEN 公司) 切胶回收 PCR 产物, Tris_ HCl 洗脱, 20 g/L 琼脂糖电泳检测及纯化。参照电泳初步定量结果, 将 PCR 产物用 QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统 (Promega 公司) 进行检测定量, 之后按照每个样本的测序量要求, 进行相应比例的混合。最后将 PCR 产物送上海凌恩生物科技有限公司, 使用 Illumina PE250 测序平台 (美国) 对文库进行双端测序。

1.3 数据处理

采用 MiFish pipeline 对下机原始数据过滤, 采用 Usearch 软件和 gold 数据库, 采用 denovo 和 reference 结合的方式去除嵌合体。选用 QIIME2 生物组分析软件基于 DADA2 法进一步降噪得到不含扩增与测序错误、不含嵌合体的扩增子序列变体 (Amplicon Sequence Variants, ASVs)。采用 blastn 比对法将测序数据质控后的 ASVs 与鱼类线粒体数据库 (<https://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/>)、NCBI 数据库进行物种分类注释, 并分别在各个分类

阶元统计各样本的群落组成。结合渤海水生生物历史分布资料^[17-19]对所注释物种进行人工校对, 手动剔除非海洋鱼类信息及阴性对照所包含的鱼类扩增子序列信息, 以排除对后续分析干扰。基于 R 语言 (4.1.2 版本) 进行结果可视化分析, 采用 ggplot2、vegan 和 ggpubr 包进行群落组成多样性分析, 采用 ade4 和 ggplot2 包完成主成分分析 (PCA), 采用 SPSS 20.0 软件进行线性回归分析。

2 结果与分析

2.1 高通量测序及底拖网采样

采样结果表明, 10 个站位采集的 30 个水样均成功提取扩增到了 eDNA。经过质量控制和筛选, 10 个采样站位获得的序列数为 54 887~65 520 条, 序列平均长度为 169~172 bp。10 个底拖网调查站位中, 除 S6 站位由于网衣破裂未采集到样品, 其余 9 个站位均采集到了鱼类样本。其中, 相对渔获数量为 83.57~1 057.84 ind./h, 相对渔获质量为 2 163.21~51 968.10 g/h。eDNA 测序及相对渔获量结果见表 1。

表 1 eDNA 测序结果及底拖网相对渔获量

Tab. 1 eDNA sequencing results and relative catch of bottom trawl

调查站位 survey station	序列数目 number of reads	平均序列长度 average read length	相对渔获数量/ (ind. · h ⁻¹) relative fish quantity caught	相对渔获质量/ (g · h ⁻¹) relative fish biomass caught
S1	65 520	169	83.57	2 163.21
S2	54 887	168	561.81	6 937.09
S3	58 585	171	1 006.65	36 954.26
S4	63 541	172	749.43	13 520.62
S5	60 896	171	4 760	51 968.10
S6	60 945	169	—	—
S7	65 314	169	270	6 806.33
S8	60 099	171	949.50	7 051.14
S9	63 936	169	171.56	5 759.15
S10	62 413	170	1 057.84	14 424.64

2.2 eDNA 与底拖网调查鱼类种类组成

两种调查方法共采集到鱼类 40 种 (表 2)。ASVs 注释结果表明, 调查海域共采集到鱼类 37 种, 隶属于 8 目 21 科 34 属, 其中 35 种注释到了种水平, 蛇鲭属和绿鳍鱼属的 2 种鱼类仅鉴定到属水平; 底拖网调查共采集到鱼类 16 种, 隶属于 3 目 7 科 15 属, eDNA 技术检测到的鱼类种类数是底拖网调查的 2.3 倍。底拖网采集到的 16 种鱼类中除普氏栉虾虎鱼、中华栉孔虾虎鱼和短鳍鲷 3 种外, 其他 13 种鱼类均被 eDNA 技术监测到。从分

类来看, eDNA 技术监测到的鱼类主要为虾虎鱼科 (Gobiidae), 占总种类数的 24.3%, 其次为鲷科 (Engraulidae), 占总种类数的 10.8%; 底拖网调查采集到的鱼类也以虾虎鱼科为主, 占总种类数的 43.75%, 其次为鲷科 (Callionymidae)、鲷科和舌鲷科 (Cynoglossidae), 均占 12.5%。

2.3 eDNA 与底拖网调查鱼类群落结构及多样性

基于 eDNA 的鱼类群落多样性 Alpha 多样性分析结果表明, 10 个调查点观测度指数 (observed-species) 为 16~22, 平均值为 19; 香农指数

(Shannon) 为 0.958~1.897，平均值为 1.442；辛普森指数 (Simpson) 为 0.417~0.811，平均值为 0.648。差异显著性检验结果表明，各 Alpha 多样性指数 (观测度指数、香农指数和辛普森指数) 的组间无显著性差异。基于 eDNA 的主要优势物种相对丰度如图 2 所示，相对丰度前五位的鱼类分别

为矛尾虾虎鱼、斑尾刺虾虎鱼、短吻红舌鲷、棘头梅童鱼和鳀，出现频率均为 100%。基于底拖网调查各站位鱼类组成丰度如图 3 所示，相对丰度前五位的优势物种依次为矛尾虾虎鱼、短吻红舌鲷、斑尾刺虾虎鱼、棘头梅童鱼和六丝钝尾虾虎鱼，且前五位优势种出现频率也为 100%。调查结果表面显

表 2 基于 eDNA 技术和底拖网调查监测到的鱼类

Tab. 2 Fish species detected by eDNA technology and bottom trawl survey			
科 family	种 species	环境 DNA eDNA	底拖网 bottom trawl
虾虎鱼科 (Gobiidae)	黄鳍刺虾虎鱼 (<i>A. flavimanus</i>)	+	
	髯缟虾虎鱼 (<i>T. barbatus</i>)	+	+
	小头栉孔虾虎鱼 (<i>C. microcephalus</i>)	+	
	斑尾刺虾虎鱼 (<i>S. ommaturus</i>)	+	+
	六丝钝尾虾虎鱼 (<i>A. hexanema</i>)	+	+
	眼睛蝌蚪虾虎鱼 (<i>L. ocellicauda</i>)	+	
	红狼牙虾虎鱼 (<i>O. rubicundus</i>)	+	+
	波氏吻虾虎鱼 (<i>R. cliffordpopei</i>)	+	
	普氏栉虾虎鱼 (<i>C. pflaumi</i>)		+
	中华栉孔虾虎鱼 (<i>C. chinensis</i>)		+
	矛尾虾虎鱼 (<i>C. stigmatias</i>)	+	+
鲷科 (Mugilidae)	鲮 (<i>L. haematocheilus</i>)	+	
石首鱼科 (Sciaenidae)	叫姑鱼 <i>J. belengeri</i>)	+	+
	小黄鱼 (<i>L. polyacti</i>)	+	
	棘头梅童鱼 (<i>C. lucidus</i>)	+	+
花鲈科 (Lateolabracidae)	中国花鲈 (<i>L. maculatus</i>)	+	
鲹科 (Carangidae)	日本竹筴鱼 (<i>T. japonicus</i>)	+	
鲭科 (Scombridae)	日本鲭 (<i>S. japonicus</i>)	+	
鲷科 (Strommateidae)	银鲷 (<i>P. argenteu</i>)	+	
线鲷科 (Stichaeidae)	伯氏网鲷 (<i>D. burgeri</i>)	+	
锦鲷科 (Pholidae)	长绵鲷 (<i>Z. elongatus</i>)	+	
	方氏云鲷 (<i>E. fangi</i>)	+	
鲷科 (Callionymidae)	瓦氏鲷 (<i>R. valenciennei</i>)	+	+
	短鳍鲷 (<i>C. kitaharae</i>)		+
带鱼科 (Trichiurida)	小带鱼 (<i>E. muticus</i>)	+	
	带鱼 (<i>T. lepturus</i>)	+	
鳀科 (Engraulidae)	鳀 (<i>E. japonicus</i>)	+	+
	赤鼻棱鳀 (<i>T. kammalensis</i>)	+	
	刀鲚 (<i>C. nasus</i>)	+	
	黄鲫 (<i>S. tenuifilis</i>)	+	+
	斑鲚 (<i>K. punctatus</i>)	+	+
舌鲷科 (Cynoglossidae)	半滑舌鲷 (<i>C. semilaevis</i>)	+	+
	短吻红舌鲷 (<i>C. joyneri</i>)	+	+
狗母鱼科 (Synodontidae)	长蛇鲷 (<i>S. elongate</i>)	+	
六线鱼科 (Hexagrammidae)	大泷六线鱼 (<i>H. otakii</i>)	+	
鳎科 (Rajidae)	孔鳎 (<i>R. porosa</i>)	+	
鲆科 (Bothidae)	褐牙鲆 (<i>P. olivaceus</i>)	+	
鲽科 (Sphyraenidae)	油鲽 (<i>S. pinguis</i>)	+	

注：+表示该物种在调查站位被监测到。
Note: + indicates the species was detected in the sampling area.

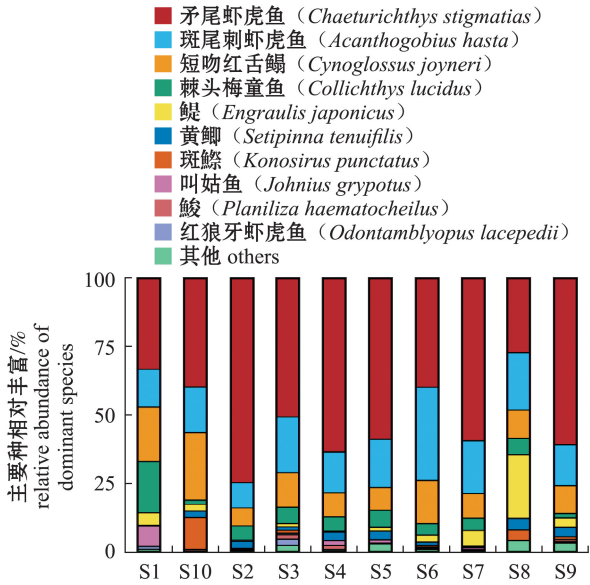


图 2 基于 eDNA 的各站点优势鱼类组成

Fig. 2 Composition of dominant fish species at each station based on eDNA

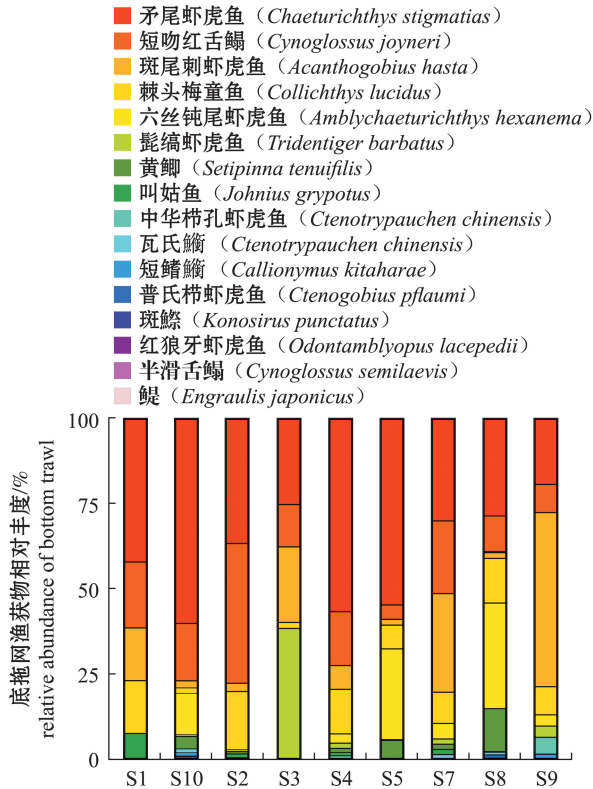


图 3 底拖网调查各站点优势鱼类组成

Fig. 3 Composition of dominant fish species at each station by bottom trawl survey

示，eDNA 与底拖网调查鱼类优势种呈现出较高的一致性。

主成分分析 (principal component analysis, PCA) 是一种对数据进行降维排序的特征值分析方法，通过分析不同样品物种和基因组分，将多组数据的差异反映在二维坐标图上，坐标轴取能够最大

化反映方差值的两个特征值。本研究 PCA 结果如图 4 所示。从图 4 可见，PC1 能够解释 43.04% 的鱼类群落组成差异，PC2 能够解释 14.0% 的鱼类群落组成差异，前两个主成分能够解释 57.04% 的鱼类群落差异。10 个调查站位的 30 个样本交错混合分布于 PCA 的二维坐标平面上，大多样本的组内差异大于组间差异，不存在样本有规律的显著聚集现象，说明 10 个调查站位间的鱼类群落组成无显著性差异 ($P>0.05$)。组间差异 ANOSIM 分析结果 R 值为 0.42，统计检验 P 值为 0.09，表明样本组间差异较小，且无显著性差异 ($P>0.05$)。

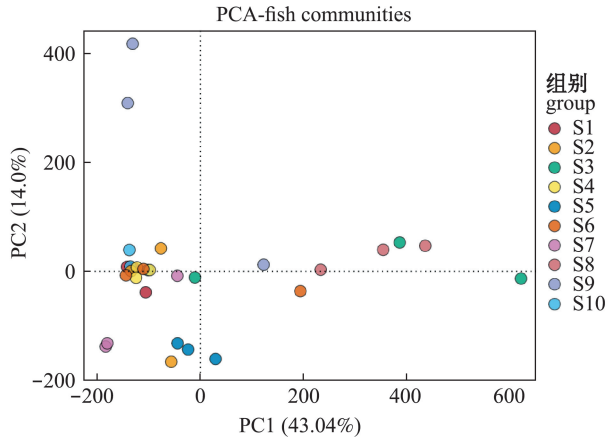


图 4 基于 ASVs 的主成分分析

Fig. 4 Analysis diagram of PCA based on ASVs

2.4 底拖网相对渔获量与 eDNA 相对丰度比较

10 个查站位中，有 9 个站位同时采集到鱼类样本和 eDNA 样本。对 9 个站位鱼类样本的平均生物量与 eDNA 样本的平均相对丰度进行比较分析，两种调查方法的共有物种为 13 种。13 种鱼类的生物量数据与 eDNA 相对丰度数据见表 3。从表 3 可见，在底拖网调查中，相对渔获质量排前三的物种分别为矛尾虾虎鱼 (6 297.77 g/h)、斑尾刺虾虎鱼 (4 700.23 g/h) 和短吻红舌鳎 (1 563.65 g/h)；相对渔获数量排前三的物种为矛尾虾虎鱼 (507.19 ind./h)、六丝钝尾虾虎鱼 (191.21 ind./h) 和短吻红舌鳎 (114.96 ind./h)；eDNA 相对丰度排前三的物种分别为矛尾虾虎鱼 (254 574)、斑尾刺虾虎鱼 (89 512) 和短吻红舌鳎 (64 539)。

为探讨运用 eDNA 高通量测序技术来评估鱼类群落生物量和数量组成的可行性，本研究中还开展了 eDNA 相对丰度与相对渔获质量、相对渔获数量及平均个体质量间的皮尔逊 (Pearson) 相关性分析。从表 4 可见，eDNA 相对丰度与相对渔获质量、相对渔获数量呈极强的相关性， r 值分别为

0.921 和 0.888, 且相关性检验均达到极显著性水平 ($P<0.01$), 说明 eDNA 相对丰度与底拖网相对渔获量间存在较强的线性相关性。另一方面, eDNA 相对丰度与个体平均体质量间相关系数为 -0.046 , 说明 eDNA 相对丰度与个体平均体质量间的线性相关性极弱。

表 3 13 个物种的 eDNA 相对丰度与相对渔获量对比

Tab. 3 Comparison between eDNA relative abundance and relative catchrate of 13 fish species

物种 species	相对渔获质量/ relative fish biomass caught	相对渔获数量/ relative fish quantity caught	平均体质量/g average body mass	eDNA 相对丰度 eDNA relative abundance
斑鲦 (<i>K. punctatus</i>)	38.35	1.48	25.90	8 807
鳊 (<i>E. japonicus</i>)	0.85	0.25	3.39	22 571
黄鲫 (<i>S. tenuifilis</i>)	157.24	48.21	3.26	10 900
斑尾刺虾虎 (<i>S. ommaturus</i>)	4 700.23	64.83	72.50	89 512
六丝钝尾虾虎鱼 (<i>A. hexanema</i>)	1 066.27	191.21	5.58	143
矛尾虾虎鱼 (<i>C. stigmatias</i>)	6 297.77	507.19	12.42	254 574
红狼牙虾虎鱼 (<i>O. rubicundus</i>)	0.52	0.25	2.08	2 109
髯须虾虎鱼 (<i>T. barbatus</i>)	994.93	46.57	21.36	5 346
棘头梅童鱼 (<i>C. lucidus</i>)	1 215.55	81.35	14.94	30 117
叫姑鱼 (<i>J. belengeri</i>)	67.76	3.18	21.31	6 783
短吻红舌鲷 (<i>C. joyneri</i>)	1 563.65	114.96	13.60	64 539
半滑舌鲷 (<i>C. semilaevis</i>)	44.37	0.25	176.37	209
瓦氏鲷 (<i>R. valenciennei</i>)	11.30	2.44	4.64	216

表 4 eDNA 相对丰度与相对渔获量及平均体质量相关性

Tab. 4 Relationship between relative abundance of eDNA, relative catch rate, and average body mass

	eDNA 相对丰度 eDNA relative abundance	相对渔获质量/ relative fish biomass caught	相对渔获数量/ relative fish quantity caught	平均个体质量/g average body mass
eDNA 相对丰度 eDNA relative abundance	—	0.000	0.000	0.876
相对渔获质量/ relative catch quality	0.921 *	—	0.000	0.867
相对渔获数量/ relative catchnumber	0.888 *	0.814 *	—	0.596
平均体质量 average body mass/g	-0.046	0.049	-0.156	—

注: 对角线下为相关性指数, 对角线上为显著性检验值; * 表示在 0.01 水平相关性极显著 ($P<0.01$)。
Note: below the diagonal is correlation index, and above the diagonal is the significance test value; * indicates the correlation were highly significant at 0.01 level.

2.5 鱼类群落结构与环境因子关系

调查采样区域的水环境因子调查监测结果见表 5。从表 5 可见, 采样区域温度分布为 13.80℃~15.21℃; 盐度分布为 20.00~21.90; 水深分布为 5.82~9.18 m; pH 分布为 8.74~9.03; 溶氧分布为 6.62~7.82 mg/L。基于 eDNA 高通量测序数

据和采样期间测定的环境因子数据进行 RDA 分析结果如图 5 所示。从图 5 可见, RDA1 对鱼类群落结构差异的解释量为 70.59%, RDA2 对鱼类群落结构差异解释量为 17.2%。前两个主成分可以解释 87.79% 的群内差异。温度和深度与鱼类群落分布间的相关性不高(相关系数 R 分别为 0.470 和

表 5 采样站位水环境因子监测结果

Tab. 5 Monitoring results of water environmental factor of sampling station

调查站位 survey station	温度 temperature/℃	盐度 salinity	水深 depth/m	pH	溶氧 DO/ (mg · L ⁻¹)
S1	13.80	20.00	6.20	8.74	7.16
S2	14.61	21.60	5.82	8.76	7.03
S3	14.15	20.60	6.05	8.79	6.98
S4	14.55	20.20	6.02	8.76	6.91
S5	15.21	23.70	7.58	8.88	7.70
S6	14.79	20.90	8.25	8.85	7.36
S7	15.08	21.90	7.97	8.88	7.42
S8	15.01	22.10	9.18	8.97	6.81
S9	14.68	21.10	6.08	8.88	6.62
S10	14.36	21.20	4.36	9.03	7.82

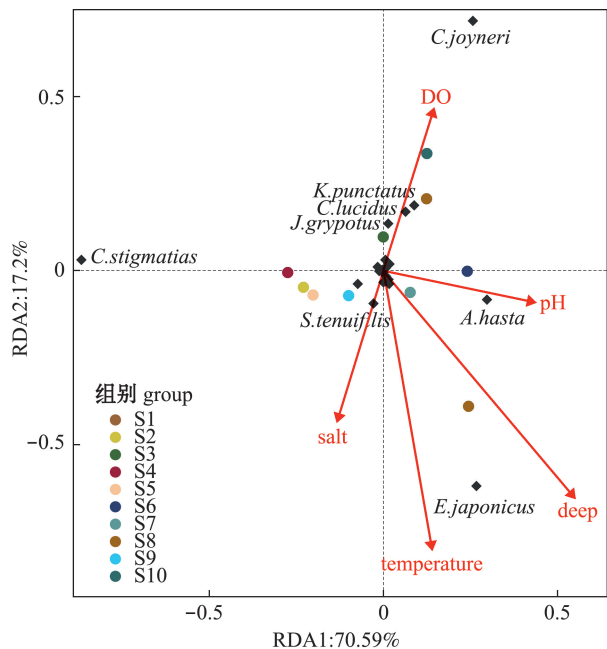


图 5 环境因子对鱼类群落组成影响的 RDA 分析

Fig. 5 Influence of environmental factors on fish community based on RDA analysis

0.487), 相关性统计检验均不显著 ($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 拖网调查与 eDNA 技术的鱼类种类比较

传统的渔业资源调查采样方法 (如底拖网、流刺网) 可以第一时间获取调查区域鱼类的种类、丰度和分布等信息。尽管传统方法在调查过程中具有许多局限性, 但拖网调查仍为目前渔业资源调查中最常用的方法^[21]。近年来, eDNA 技术因其成本低、普适性强和监测灵敏高等特点已广泛应用于鱼类生物多样性调查与监测, 但由于其固有的不确定性 (温度、水流、生命史和代谢对其影响) 而不能完全取代传统方法^[22]。将拖网调查和 eDNA 方法相结合, 综合对比调查区域历史鱼类分布情况, 可以实现更准确全面的渔业资源评价。

本研究中运用 eDNA 技术监测到的 37 种鱼类, 其中, 35 种注释到了种水平, 另有 2 种仅注释到属水平 (蛇鲻属和绿鳍鱼属)。李晨虹等^[23]研究表明, 全面准确的比对数据库是 eDNA 技术高效应用的前提, 而有限的 DNA 参考数据库是目前 eDNA 技术在水生生物监测中应用面临的挑战之一。本研究中两种鱼类仅定位到属水平, 就是缺乏针对调查海域全面系统的 eDNA 比对数据库所致, 如果有参考数据库, 这两个物种可能精确定位到种, 因此, 建立专门的渤海鱼类 DNA 参考数据库意义重大。

本研究中底拖网调查采集到鱼类 16 种, 其中除普氏栉虾虎鱼、中华栉孔虾虎鱼、短鳍鲷 3 种外, 其他 13 种鱼类如髯须虾虎鱼、斑尾刺虾虎鱼、六丝钝尾虾虎鱼、红狼牙虾虎鱼、矛尾虾虎鱼、叫姑鱼、棘头梅童鱼、瓦氏鲷、鲉、黄鲫、斑鲷、半滑舌鲷和短吻红舌鲷均被 eDNA 技术监测到。eDNA 技术鉴定到种的 35 种鱼类中, 有 22 种鱼类仅被 eDNA 技术检测出。经过与《辽宁省动物志·鱼类》^[17]《中国海洋生物名录》^[18]和《中国海洋鱼类》^[19]等鱼类鉴定及区系划分材料对比, 该 22 种鱼类在辽河口及附近海域均有历史分布记录。22 种鱼类包括黄鳍刺虾虎鱼、小头栉孔虾虎鱼、眼睛蝌蚪虾虎鱼、波氏吻虾虎鱼、大泷六线鱼、孔鲷、褐牙鲆、长蛇鲷、小黄鱼、中国花鲈、长绵鲷、方氏云鲷、伯氏网鲷和油鲈等 14 种底栖鱼类, 以及鲛、银鲳、日本竹筴鱼、日本鲭、小带鱼、带鱼、赤鼻棱鲛和刀鲚等 8 种中上层鱼类。造成两种调查方法采样种类数显著差异的主要原因可能有两方面: 一是底拖网采样的局限性, 底拖网采集底层鱼类具明显优势, 但其采集中层鱼类具有很大的局限性, 本研究中仅被 eDNA 技术检测而未被底拖网采集到的样本大多为中上层鱼类, 如日本竹筴鱼、日本鲭、银鲳、赤鼻棱鲛和刀鲚等, 此外, 底拖网在岩礁区适用性差, 导致大泷六线鱼等鱼类采集不到; 二是目标鱼种相对稀少。长蛇鲷、孔鲷和褐牙鲆等潜沙性底层鱼类在河口区域分布相对较稀少, 虽能被 eDNA 技术监测到遗传信号, 但被底拖网采集到的概率较低。由此可见, eDNA 技术可以有效地弥补底拖网采样的不足, 可采集到调查海域稀有物种和底拖网难以采集到的鱼类样本信息。

3.2 基于 eDNA 的鱼类生物多样性比较

利用 eDNA 高通量测序技术, 不仅可以监测到比拖网采样方法更多的鱼类, 而且还可以分析不同站位间物种组成的差异^[24]。在本研究中, 笔者还根据 ASVs 的注释结果, 对 10 个调查站位间的物种组成、群落差异进行了对比分析。结果表明, 各调查站位观测度指数、香农指数和辛普森指数间的差异不大。PCA 结果也表明, 大多样本的组内差异大于组间差异, 不存在样本有规律的显著聚集现象。如上均表明调查区域调查站位间的鱼类群落组成差异不显著。本次调查同时对调查站位开展的水环境因子与群落结构的 RDA 分析结果表明, 各水环境因子 (温度、盐度、pH、溶解氧和水深) 与鱼类群落结构的相关性不显著, 生境的相似性可能

是调查区域调查站位间鱼类群落组成差异不显著的根本原因。Keck 等^[25]研究表明,eDNA 宏条形码与传统的生物群落评估方法具有一致性和互补性。本研究中表明,eDNA 技术与底拖网调查分析的优势种结果具有高度一致性,前 4 种优势种均为矛尾虾虎鱼、斑尾刺虾虎鱼、短吻红舌鲷和棘头梅童鱼。这表明 eDNA 技术在辽河口海域进行快速、高效的鱼类生物多样性调查监测中具有很高的适用性。

3.3 基于 eDNA 的生物量评估

准确的渔业资源生物量评估是进行有效渔业管理的前提。近年来,诸多学者运用 eDNA 高通量测序技术揭示了海洋鱼类 eDNA 相对丰度与鱼类群落组成之间的相关性。相关研究表明,调查水域目标生物量越高,监测到的 eDNA 相对丰度也越高^[26-28]。Urban 等^[29]研究探讨了应用 eDNA 方法评估捕捞渔获物组成的可行性,并建立了 eDNA-生物量的广义线性混合模型,结果表明,鲭 eDNA 相对丰度与渔获物中鲭质量百分比间存在强烈的相关性(r 值 0.812, $P<0.001$),eDNA 相对丰度越高,渔获物中鲭鱼质量占比也越高。Lyu 等^[13]和 Jiang 等^[14]分别运用 eDNA 宏基因组技术与底拖网调查相结合的方法对黄海口和珠江口的秋季渔业资源生物多样性进行调查评估,结果表明,在黄河口及其附近海域鱼类运用两种方法同时采集到的 22 种鱼类中,eDNA 的相对丰度与底拖网相对渔获质量和相对渔获数量间存在较高的线性相关性(r 值分别为 0.921 和 0.888),且相关性极显著($P<0.01$);珠江口及其附近海域鱼类运用两种方法同时采集到的 35 种鱼类中,eDNA 的相对丰度与底拖网相对渔获质量和相对渔获数量间存在线性相关性(r 值分别为 0.53 和 0.56),且相关性极显著($P<0.01$),两者均呈现出水环境中 eDNA 相对丰度越高,拖网采样中相应鱼类的相对渔获质量和相对渔获数量越高的趋势。本研究结果与上述研究结果具有较高的一致性,结果表明,在辽河口及附近海域鱼类 eDNA 相对丰度与底拖网调查的相对渔获质量和相对渔获数量间存在较强的线性正相关性,相关系数处于较高水平(r 值分别为 0.921 和 0.888),且相关性达到极显著水平($P<0.01$)。eDNA 相对丰度最高的鱼类为矛尾虾虎鱼,其相对渔获质量和数量在底拖网采集的 13 种鱼类样品中也位居首位。在 eDNA 相对丰度排名 2~4 位的斑尾刺虾虎鱼、短吻红舌鲷、棘头梅童鱼中,短吻红舌鲷的相对渔

获质量和数量排第 3 位,棘头梅童鱼的相对渔获质量和数量排第 4 位,斑尾刺虾虎鱼的相对渔获质量和数量分别排第 2 位和第 5 位,两种调查结果均呈现出较高的一致性。虽然本研究中通过底拖网调查法和 eDNA 技术检测到的 13 种鱼类中,大多数都证实了 eDNA 丰度与相对渔获质量和数量之间存在正相关性,但也有 eDNA 与拖网法检测的差异在少数鱼类中发现。如鳀和红狼牙虾虎鱼的 eDNA 相对丰度较高但相对渔获数量和相对渔获质量值较低,六丝钝尾虾虎鱼的相对渔获数量和相对渔获质量值较高,但 eDNA 相对丰度较低(表 4)。Thomsen 等^[11]的研究中也出现了类似的结果,表明拖网捕捞方法可能不适合某些大型或快速游动的中上层鱼类。此外,尽管生物量可能直接影响 eDNA 浓度,但许多其他因素也可能间接影响 eDNA 浓度,同一物种的两个个体即使体质量相等,但生长年龄、摄食量及摄食种类的不同,也会导致其 eDNA 释放量存在差异^[30]。在未来研究应用中,为了更好地了解 eDNA 浓度与生物量的相关性,需综合考虑温度、盐度、发育阶段、降解、饲养和营养水平等诸多影响因子。

4 结论

1) eDNA 技术较底拖网调查具有更高的物种检出效率。对调查海域稀有物种和中上层鱼类具有更好的监测效果。

2) eDNA 技术可以作为传统渔业资源调查方法的有效补充,运用于辽河口海域鱼类群落生物多样性的监测评估。

3) 运用 eDNA 的相对丰度评估辽河口海域鱼类资源生物量具有较高的可行性。通过底拖网调查法和 eDNA 技术都监测到的 13 种鱼类中,大多数都证实了 eDNA 相对丰度与相对渔获质量和数量之间存在显著的正相关性。

总之,eDNA 技术与传统渔业资源调查评估方法具有一致性和互补性,利用 eDNA 高通量测序不仅可以监测到比拖网捕捞方法更多的鱼种,而且可以分析不同站位间物种组成的差异,在辽河口及附近海域鱼类生物多样性监测评估方面具有较大的应用潜力。

参考文献:

[1] 董婧,刘修泽,王爱勇.辽宁近海与河口区渔业资源[M].北京:中国农业出版社,2018.
DONG J,LIU X Z,WANG A Y.Fishery resources in the coastal

- and estuarine areas of Liaoning Province [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2018. (in Chinese)
- [2] 叶金清, 柳圭泽, 袁秀堂, 等. 基于生物学特征的辽河口鲈资源开发与保护[J]. 大连海洋大学学报, 2020, 35(2): 302-307.
YE J Q, LIU G Z, YUAN X T, et al. Exploitation and protection of mullet *Liza haematocheila* stocks in Liaohe Estuary based on biological characteristics [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2020, 35(2): 302-307. (in Chinese)
- [3] 陈刚, 陈卫忠. 渔业资源评估中声学方法的应用[J]. 上海水产大学学报, 2003, 12(1): 40-44.
CHEN G, CHEN W Z. The application of acoustic method in fishery resources survey [J]. Journal of Shanghai Fisheries University, 2003, 12(1): 40-44. (in Chinese)
- [4] 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[J]. 南方水产科学, 2020, 16(5): 123-128.
QIN C X, ZUO T, YU G, et al. Advances in research of environmental DNA (eDNA) in biomass assessment of aquatic ecosystems [J]. South China Fisheries Science, 2020, 16(5): 123-128. (in Chinese)
- [5] 陈炼, 吴琳, 刘燕, 等. 环境 DNA metabarcoding 及其在生态学研究中的应用[J]. 生态学报, 2016, 36(15): 4573-4582.
CHEN L, WU L, LIU Y, et al. Application of environmental DNA metabarcoding in ecology [J]. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(15): 4573-4582. (in Chinese)
- [6] 沈梅, 肖能文, 卢林, 等. 环境 DNA 技术及在鱼类监测中的应用[J]. 水生生态学杂志, 2022, 43(2): 133-141.
SHEN M, XIAO N W, LU L, et al. Review of environmental DNA detection methods and their application to fish monitoring [J]. Journal of Hydroecology, 2022, 43(2): 133-141. (in Chinese)
- [7] 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.
- [8] ADAMS C I M, KNAPP M, GEMMELL N J, et al. Beyond biodiversity: can environmental DNA (eDNA) cut it as a population genetics tool? [J]. Genes, 2019, 10(3): 192.
- [9] BARRENECHEA ANGELES I, LEJZEROWICZ F, CORDIER T, et al. Planktonic foraminifera eDNA signature deposited on the seafloor remains preserved after burial in marine sediments [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 20351.
- [10] 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.
- [11] THOMSEN P F, MØLLER P R, SIGSGAARD E E, et al. Environmental DNA from seawater samples correlate with trawl catches of subarctic, deepwater fishes [J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0165252.
- [12] 言柯程, 李建超, 田永军, 等. 基于环境 DNA metabarcoding 和底拖网调查的南黄海水域鱼类多样性比较[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2023, 53(5): 71-81.
YAN K C, LI J C, TIAN Y J, et al. Comparison of fish biodiversity in western south Yellow Sea based on environmental DNA metabarcoding and trawl survey [J]. Periodical of Ocean University of China (Nature Science Edition), 2023, 53(5): 71-81. (in Chinese)
- [13] LYU D, QIAN T Y, LI F, et al. Monitoring and assessing the species diversity and abundance of marine teleost around the Yellow River Estuary in June using environmental DNA [J]. Frontiers in Marine Science, 2023, 10: 1123831.
- [14] JIANG P W, ZHANG S, XU S N, et al. Comparison of environmental DNA metabarcoding and bottom trawling for detecting seasonal fish communities and habitat preference in a highly disturbed estuary [J]. Ecological Indicators, 2023, 146: 109754.
- [15] 王汝贤, 杨刚, 耿智, 等. 环境 DNA 技术在长江口鱼类多样性分析中的应用[J]. 水生生物学报, 2023, 47(3): 365-375.
WANG R X, YANG G, GENG Z, et al. Application of environmental DNA technology in fish diversity analysis in the Yangtze River Estuary [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2023, 47(3): 365-375. (in Chinese)
- [16] 崔晓玉, 张云雷, 张金勇, 等. 基于环境 DNA 宏条形码的辽东半岛重要河口鱼类多样性特征[J]. 大连海洋大学学报, 2024, 39(4): 578-588.
CUI X Y, ZHANG Y L, ZHANG J Y, et al. Fish diversity in important estuaries in Liaodong Peninsula based on environmental DNA metabarcoding [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2024, 39(4): 578-588. (in Chinese)
- [17] 刘蝉馨, 秦克静, 丁耕芜, 等. 辽宁省动物志·鱼类[M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 1987: 1-229.
- LIU C X, QIN K J, DING G W, et al. Zoology of Liaoning Province · Fish [M]. Shenyang: Liaoning Science and Technology Press, 1987: 1-229. (in Chinese)
- [18] 刘瑞玉. 中国海洋生物名录[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 887-1066.
- LIU R Y. Checklist of marine biota of China Seas [M]. Beijing: Science Press, 2008: 887-1066. (in Chinese)
- [19] 陈大刚, 张美昭. 中国海洋鱼类[M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2015.
- CHEN D G, ZHANG M Z. Marine fishes of China [M]. Qingdao: China Ocean University Press, 2015. (in Chinese)
- [20] 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.
- [21] HONGO Y, NISHIJIMA S, KANAMORI Y, et al. Fish environmental DNA in Tokyo Bay: a feasibility study on the availability of environmental DNA for fisheries [J]. Regional Studies in Marine Science, 2021, 47: 101950.
- [22] JERDE C L. Can we manage fisheries with the inherent uncertainty from eDNA? [J]. Journal of Fish Biology, 2021, 98(2): 341-353.
- [23] 李晨虹, 凌岚馨, 谭娟, 等. 环境 DNA 技术在水生生物监测中的挑战、突破和发展前景[J]. 上海海洋大学学报, 2023, 32(3): 564-574.
LI C H, LING L X, TAN J, et al. Challenge, breakthrough and future perspectives of environmental DNA technology in monitoring aquatic organisms [J]. Journal of Shanghai Ocean University,

- 2023,32(3):564-574.(in Chinese)
- [24] HALLAM J,CLARE E L,JONES J I,et al.High frequency environmental DNA metabarcoding provides rapid and effective monitoring of fish community dynamics [J]. Environmental DNA, 2023,5(6):1623-1640.
- [25] KECK F,BLACKMAN R C,BOSSART R,et al.Meta-analysis shows both congruence and complementarity of DNA and eDNA metabarcoding to traditional methods for biological community assessment[J].Molecular Ecology,2022,31(6):1820-1835.
- [26] 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.
- [27] TAKAHARA T,MINAMOTO T,YAMANAKA H,et al.Estimation of fish biomass using environmental DNA[J].PLoS One,2012,7(4):e35868.
- [28] KNUDSEN S W,EBERT R B,HESSLETSØE M,et al.Species-specific detection and quantification of environmental DNA from marine fishes in the Baltic Sea[J].Journal of Experimental Marine Biology and Ecology,2019,510:31-45.
- [29] URBAN P,BEKKEVOLD D,HANSEN B K,et al.Using eDNA to estimate biomass of bycatch in pelagic fisheries[J].Environmental DNA,2024,6(1):e377.
- [30] KLYMUS K E,RICHTER C A,CHAPMAN D C,et al.Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* [J].Biological Conservation,2015,183:77-84.

Fish biodiversity survey and assessment in the Estuary of Liaohe River with the environmental DNA metabarcoding technology and bottom trawl sampling method

WANG Xiaolin, YAN Long, JI Guang, DONG Jing, XU Yanzhao, WANG Aiyong*,
LIU Xiuze, WANG Bin, KONG Yefu

(Liaoning Ocean And Fishery Science Research Institute, Key Laboratory of Protection and Utilization of Aquatic Germplasm Resource, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Liaoning Key Laboratory of Marine Biological Resources and Ecology, Dalian Key Laboratory of Conservation of Fishery Resources, Dalian 116023, China)

Abstract: To evaluate fish diversity in the Liaohe Estuary and adjacent sea at autumn and to explore the applicability of environmental DNA (eDNA) metabarcoding in monitoring fish diversity, both seawater samples for eDNA and fish samples by bottom trawl survey were taken at ten survey stations in the Liaohe Estuary and adjacent sea in October 2023. High throughput sequencing and biological analysis were conducted separately. In total, 37 fish species were detected in the eDNA sample ASV annotation results, 2 of which were identified only at the genus level, and 16 fish species were identified in the fish samples by bottom trawl survey. 13 fish species were totally identified by these two methods. The number of fish species detected by the eDNA metabarcoding technology was 2.3 times more than that by the bottom trawl survey. The differences in alpha diversity indices among the different stations based on the eDNA detection data were not significant. Principal component analysis (PCA) showed that the first two principal components could explain 57.04% of differences in fish communities (PC1 43.04%, PC2 14.0%), and there was little difference in fish community composition among sampling stations. Pearson correlation analysis showed a high correlation between the relative abundance of eDNA and relative catch (biomass, number of individuals) of bottom trawl surveys, with r values of 0.921 and 0.888, respectively, and the correlation was highly significant ($P < 0.01$). Redundancy analysis (RDA) results showed that there was no significant correlation between various water environmental factors (temperature, salinity, pH, DO, water depth) and fish community structure ($P > 0.05$). In summary, the eDNA technology had higher species detection efficiency than bottom trawl survey method, and there was a significant correlation between the relative abundance of the eDNA and the relative catch, indicating that the eDNA technology can be effectively applied to monitor and evaluate fish diversity in the Liaohe Estuary and its adjacent waters.

Key words: eDNA technology; bottom trawl survey; Liaohe River estuary; fish diversity