

基于环境DNA宏条形码的珠江河口鱼类种类组成

李红婷, 邹柯姝, 张帅, 曹漪婷, 卢芷程, 陈作志, 李敏

Species composition of fishes in the Pearl River estuary based on environmental DNA metabarcoding

LI Hongting, ZOU Keshu, ZHANG Shuai, CAO Yiting, LU Zhicheng, CHEN Zuozhi, LI Min

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12024/jsou.20210603476>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

巢湖鱼类群落结构及多样性

The community structure and diversity of fish in the Chaohu Lake

上海海洋大学学报. 2022, 31(6): 1445 <https://doi.org/10.12024/jsou.20211003589>

钱塘江西湖段鱼类群落结构特征

Current situation of fish community structure in West Lake section of Qiantang River

上海海洋大学学报. 2021, 30(3): 525 <https://doi.org/10.12024/jsou.20200503027>

淮河入海通道及其附近水系鱼类群落空间分布格局

Spatial distribution pattern of fish community in the passage from Huaihe River to sea and its adjacent river system

上海海洋大学学报. 2020, 35(6): 914 <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2019-305>

环境DNA技术与传统捕捞揭示崇明岛内河鱼类多样性

Integrating environmental DNA technology and traditional fish survey to reveal the diversity of fishes in the rivers on the Chongming Island

上海海洋大学学报. 2022, 31(6): 1434 <https://doi.org/10.12024/jsou.20220303794>

基于DNA条形码的如东海域浒苔附着鱼卵的物种鉴定

Molecular identification of fish eggs in Enteromorpha of Rudong sea area based on DNA barcode

上海海洋大学学报. 2018, 27(1): 1 <https://doi.org/10.12024/jsou.20170301981>

文章编号: 1674-5566(2022)06-1423-11

DOI:10.12024/jsou.20210603476

基于环境 DNA 宏条形码的珠江河口鱼类种类组成

李红婷^{1,2}, 邹柯姝³, 张 帅^{1,2}, 曹漪婷^{1,4}, 卢芷程^{1,2}, 陈作志^{1,5}, 李 敏^{1,5}

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所 农业农村部外海渔业开发重点实验室, 广东省渔业生态环境重点实验室, 广东 广州 510300; 2. 上海海洋大学 海洋科学学院, 上海 201306; 3. 华南农业大学 海洋学院, 广东 广州 510642; 4. 大连海洋大学 水产与生命学院, 辽宁 大连 116023; 5. 南方海洋科学与工程广东省实验室, 广东 广州 511458)

摘要: 利用环境 DNA 宏条形码技术对珠江河口区的鱼类组成进行初步探究。采用线粒体 12S 部分序列作为条形码标记, 对采自珠江口伶仃洋 7 个采样点的水样滤膜 DNA 进行扩增, 共获得有效序列 26 777 条, 聚类得到 35 种可操作分类单元(OTU)序列。经比对共检测出 35 种鱼类, 隶属于 9 目 20 科 29 属。其中, 30 种鉴定到种水平, 5 种仅鉴定到属水平。在 7 个采样点中分别检测到 9~31 个种类, 种类数量最多的是鲈形目, 共 22 种。在 A 和 F 点检测到易危(Vulnerable)物种——迈氏条尾魮(*Taeniura meyeni*)。通过与珠江河口不同海域的两项类似的研究对比发现, 研究区域、样品采集策略和采用的条形码标记的不同使得检测到的鱼类种类的数量和组成上有明显差异。研究表明, 环境 DNA 宏条形码技术适用于珠江河口伶仃洋鱼类种类组成调查, 可以作为传统调查方法的一种补充手段, 用于河口区鱼类多样性调查和研究。

关键词: 环境 DNA(eDNA); 珠江河口; 物种检测; 鱼类多样性

中图分类号: S 932 **文献标志码:** A

河口水域生态系统是海洋生态系统的重要组成部分, 也是多种海洋性鱼类索饵、产卵和育肥的重要场所, 对海洋生态系统中鱼类资源的补充及可持续利用具有重要作用^[1]。鱼类多样性是水生生态系统健康监测的关键指标, 研究鱼类多样性可以有效了解水生生态系统的变化和状态, 为资源保护、生态系统恢复、渔业资源的可持续利用和科学管理提供重要的参考^[2]。以往鱼类多样性的研究主要是通过捕捞的方式进行采样的, 然后进行形态学鉴定和计数称重, 以此识别鱼类种类并统计鱼类丰度与生物量^[3-4]。传统的调查采样方法普遍存在调查费用高、所需时间久、采样效率低、对生物的破坏性大以及严格依赖鱼类分类学专家等缺点, 使鱼类多样性的研究受到一定的限制。

环境 DNA(environmental DNA, eDNA)宏条形码(metabarcoding)技术通过直接提取环境样品

(如水、沉积物、土壤等)中的 DNA, 运用高通量测序(high-throughput sequencing, HTS)技术, 可同时对环境样本中存在的多个物种进行识别^[5]。环境 DNA 宏条形码技术具有操作简单、灵敏度高、对生物体以及生态系统无破坏性、不受水域以及休渔制度的影响等一系列优势, 能够弥补传统鱼类资源调查方法的不足, 非常适合用于河口等生态系统鱼类多样性的研究, 是调查和评估鱼类多样性的一个潜在的强大工具。目前, 基于环境 DNA 宏条形码技术的鱼类多样性的研究中, 常用的分子标记有 12S 基因^[6-8]、COI 基因^[9-11]以及 *Cyt b* 基因^[12-14], 其中 MIYA^[15]等设计的引物 MiFish-U 使用最为广泛, 该引物以鱼类 12S rRNA 基因高变区(163~185 bp)为靶标, 该区域包含了足够的信息, 可用于鱼类在科、属和种水平上的分类鉴定, 且非常适合读长短的高通量测序^[16]。

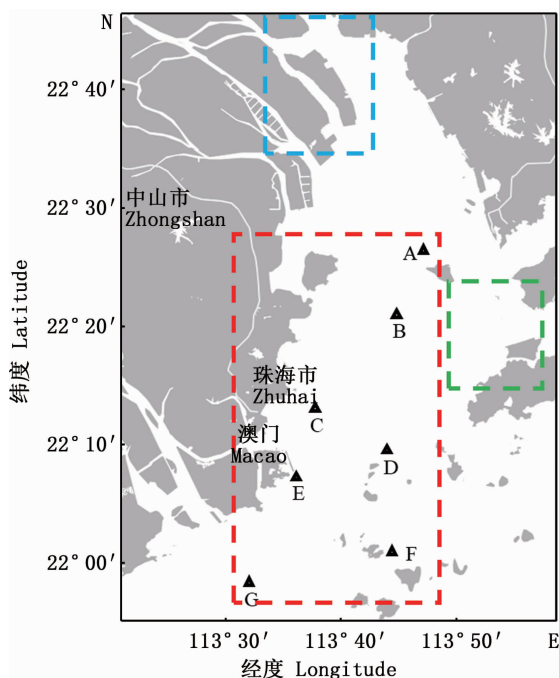
收稿日期: 2021-06-07 修回日期: 2021-09-22

基金项目: 中国水产科学研究院南海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2019TS13, 2021SD18); 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州)人才团队引进重大专项(GML2019ZD0605); 广东省科技计划项目(2019B121201001)

作者简介: 李红婷(1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为海洋生物环境 DNA 研究。E-mail:1604790319@qq.com

通信作者: 李 敏, E-mail:limin@scsfri.ac.cn

近年来,环境 DNA 宏条形码技术发展迅速,已在多个类型水域得到应用,如淡水河流^[17]、湖泊^[18]和海洋^[19]等。该技术因其具备的众多优势逐渐被科研工作者重视,目前国内运用环境 DNA 宏条形码技术进行河口鱼类多样性的研究非常有限,在珠江河口海域,仅有 ZOU 等^[20]和 CHEANG 等^[21]分别对内河口的南沙湿地附近水域和香港西部海域(图 1)进行过研究,所涉及的样品采集范围较小。本研究选取珠江河口伶仃洋相对靠外的海域(图 1)为研究区域,以 12S rRNA 基因短序列为标记,运用环境 DNA 宏条形码技术对鱼类种类组成进行初步探究,并与上述两个不同采样范围的研究进行对比,分析珠江河口不同区域的鱼类种类组成差异,为珠江河口伶仃洋鱼类多样性监测以及空间变化的研究提供新的思路。



红色虚线框代表本文样品采集区域,蓝色虚线框代表 ZOU 等的样品采集区域,绿色虚线框代表 CHEANG 等的样品采集区域。

The study area of this paper is indicated by the red rectangle, the study area of ZOU, et al is indicated by the blue rectangle, the study area of CHEANG, et al is indicated by the green rectangle.

图 1 珠江口伶仃洋环境 DNA 水样采集位点示意图

Fig. 1 eDNA sampling locations in Lingding Bay of the Pearl River Estuary

1 材料与方法

1.1 水样采集

水体样本于 2017 年 8 月采集于珠江口伶仃洋海域,共采集了 7 个位点(图 1)。每个位点利用采水器采集近表层和近底层水样各 1 L,混合保存于无菌塑料瓶中带回实验室。使用直径 47 mm、孔径 0.45 μm 的硝酸纤维滤膜(WhatmanTM,美国 GE Healthcare Life Sciences)进行真空过滤。每张滤膜过滤一个采样点的水样(共 2 L),用无水乙醇浸透并装入 5 mL 无菌冻存管中,置于 $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 低温保存箱保存。为了避免交叉污染,过滤装置依次经过次氯酸钠浸洗、蒸馏水冲洗和水样润洗。每个采样点均以相同的方式过滤 2 L 蒸馏水作为阴性对照。

1.2 环境 DNA 的提取

使用血液与组织基因组 DNA 提取试剂盒(Qiagen)提取滤膜上的环境 DNA。提取步骤依据试剂盒说明书并稍作修改,具体步骤如下:(1)取 1 张滤膜置于 2 mL 的离心管中,剪碎;(2)加入 800 μL Buffer ATL 和 80 μL 蛋白酶 K 后,加入 2 颗直径 5 mm 的小钢珠,使用快速组织细胞破碎仪(Bullet Blender STORM,美国)研磨 15 s 后,置于 $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 2.5 h,每 30 min 旋涡震荡 15 s;(3)加入 400 μL Buffer AL,混匀, $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温水浴 20 min,12 000 r/min 离心 30 s,取 900 μL 上清液转移至新的 2 mL 离心管中。(4)加入 400 μL 无水乙醇,混匀后分两次将混合物转移至吸附柱中,12 000 r/min 离心 30 s,弃去滤液和收集管。(5)将吸附柱放入新的收集管中,加入 500 μL Buffer AW1,12 000 r/min 离心 30 s,弃去滤液及收集管。(6)将吸附柱放入新的收集管中,加入 500 μL Buffer AW2,12 000 r/min 离心 3 min,弃去滤液及收集管。(7)将吸附柱转移至新的 1.5 mL 离心管中,加入 100 μL Buffer AE 以洗脱 DNA,室温($15\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$)放置 2 min,12 000 r/min 离心 2 min。重复洗脱 2~3 次以提高 DNA 产率。

所有试剂和耗材自购置后分装成小份,每个样本的提取均使用独立的 1 份,以防止交叉污染,提取过程在超净工作台中进行。并使用同样的方法提取蒸馏水滤膜样本作为空白对照组。提取产物用微量分光光度计检测浓度,并用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测对照组有无污染。

1.3 目的序列的获取

环境总 DNA 使用引物 MiFish-U^[15] (正向: 5'-GTCCGTA AAACTCGTGCCAGC-3', 反向: 5'-CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG-3') 进行扩增。为提高目的序列的浓度,对提取的 DNA 产物进行两次扩增。扩增体系如下: TaKaRa Ex Taq (5U/L) 0.25 μ L, 10 x Ex Taq buffer (20 mmol/L Mg²⁺ plus) 2.5 μ L, dNTP mixture 2 μ L, 上游引物 (5'端, 10 pmol/ μ L) 0.7 μ L, 下游引物 (3'端, 10 pmol/ μ L) 0.7 μ L, DNA 模板 2 μ L, 补充灭菌去离子水至总体积 25 μ L。扩增程序如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 共进行 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min。将第一次 PCR 扩增产物稀释 10 倍并作为第二次 PCR 扩增的模板, 在原始引物的 5'端 (上游和下游) 添加 6 个碱基的 barcode 序列作为第二次 PCR 扩增引物, 其余组分保持不变。两次 PCR 扩增程序不变。PCR 产物均经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 最终产物送至华大基因公司 (青岛) 进行测序。

1.4 数据处理

下机数据经过数据过滤, 滤除低质量的读长 (Reads), 剩余高质量的净数据 (Clean datas) 可用于后期分析; 通过读长之间的重叠关系将读长拼接成序列标签 (Tags); 在给定的相似度下将序列标签聚成可操作分类单元 (Operational taxonomic units, OTU), 然后通过 OTU 与数据库比对, 对 OTU 进行物种注释; 基于 OTU 和物种注释结果进行样品物种组成和组间物种差异分析。

为了获得高质量的净数据, 对原始数据进行过滤处理, 以消除质量低、接头污染、含 N 以及复杂度低的读长。使用软件 FLASH (v1.2.11)^[22] 通过序列之间的重叠关系将序列拼接成原始标签数据 (Raw Tags), 拼接得到的原始标签经过严格的过滤处理得到高质量的标签数据。为剔除重复序列获取物种的 OTU, 利用软件 USEARCH (v7.0.1090)^[23] 对有效序列进行聚类 (相似性 $\geq 97\%$), 选取丰度最高的序列作为 OTU, OTUs 序列通过之前实验室建立的珠江口鱼类 12S 序列库及 NCBI 数据库的 BLASTn 功能进行比对和物种注释。若序列全长与 NT 和 NCBI 数据库的序列相似度 $\geq 96\%$, 则该序列被指定为一个物种; 若同一属内仅有一个物种的序列可供比较 (且相

似率 $< 96\%$), 并且该物种的分布与珠江口的公开记录相匹配, 则也认定该序列为一个物种^[24], 若一条序列可以匹配多个物种 (匹配率 $\geq 99\%$), 并且物种属于同一属, 则分类学分辨率下降到属水平^[20]。若序列不符合以上原则或未注释到物种, 则舍去该序列。

2 结果

2.1 OTU 划分与分类地位鉴定

本次下机数据经筛选、过滤和拼接处理后, 7 个采样点共获得有效拼接序列 26 777 条, 有效拼接序列数目最少的是 E 点, 共 3 227 条, 最多的站点是 F 点, 共 5 287 条, 平均序列数为 (3 883 \pm 721) 条。按照 97% 相似性聚类后得到 35 个 OTU 代表序列。图 2 为本次测序所得的鱼类物种稀疏曲线 (Rarefaction curve), 由图可见曲线逐渐趋于平缓, 则认为测序深度已经基本覆盖到样品中所有的物种, 测序量足以反映样本多样性, 可以用于后续数据分析。

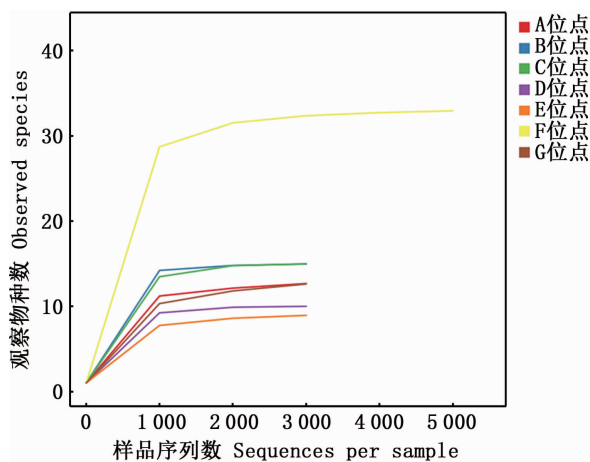


图 2 珠江口伶仃洋鱼类物种稀疏曲线

Fig. 2 Rarefaction curve of the observed fish species in Lingding bay of the Pearl river estuary

2.2 鱼类种类组成

OTU 序列经比对, 共检测到 35 种鱼类, 隶属于 9 目 20 科 29 属, 有 5 个物种仅鉴定到属水平, 分别为叫姑鱼属 (*Johnius*)、鳀属 (*Sillago*)、燕鱼属 (*Platax*)、鲷属 (*Dasyatis*)、平鲈属 (*Sebastes*) 的种类 (表 1)。在 35 种鱼类中, 不同目水平的鱼类数量有明显的差异 (表 1 和图 3)。种类数量最多的是鲈形目, 共 22 种, 占总种类组成的 62.8%, 是珠江口伶仃洋鱼类的优势类群; 鲈形目、鲭形

目、鲤形目、鲮形目、鲱形目鱼类各 2 种,合计占 类各 1 种,合计占比 8.6%。
总种类组成的 28.6% ; 鲉鱼目、鼠鲬目、鲉形目鱼

表 1 基于环境 DNA 宏条形码的珠江河口 7 个采样点检测到的鱼类物种

Tab.1 List of fish species detected by eDNA metabarcoding at 7 sampling sites in the Pearl River estuary

亚纲 Subclass	目 Order	科 Family	属 Genus	种 Species	采样点 Sampling site							合计 Total ^b			
					A	B	C	D	E	F	G				
板鳃亚纲 Elasmobranchii	鲭形目 Myliobatiformes	鲟科 Dasyatidae	条尾鲟属 <i>Taeniura</i>	迈氏条尾鲟 <i>Taeniura meyeni</i>	+						+		2		
			鲟属 <i>Dasyatis</i>	鲟属未定种 <i>Dasyatis</i> sp.					+				+	2	
辐鳍亚纲 Actinopterygii	鲈形目 Perciformes	石首鱼科 Sciaenidae	黄鱼属 <i>Larimichthys</i>	小黄鱼 <i>Larimichthys polyactis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	7		
			叫姑鱼属 <i>Johnius</i>	叫姑鱼 <i>Johnius grypotus</i>					+			+	+	3	
				皮氏叫姑鱼 <i>Johnius belangerii</i>									+	1	
				叫姑鱼属未定种 <i>Johnius</i> sp.									+	+	2
			虾虎鱼科 Gobiidae	矛尾虾虎属 <i>Chaeturichthys</i>	矛尾虾虎鱼 <i>Chaeturichthys stigmatias</i>							+		2	
				孔虾虎属 <i>Trypauchen</i>	孔虾虎鱼 <i>Trypauchen vagina</i>								+	1	
				钝尾虾虎属 <i>Amblychaeturichthys</i>	六丝钝尾虾虎鱼 <i>Amblychaeturichthys hexanema</i>								+	1	
				鲹科 Carangidae	无齿鲹属 <i>Gnathanodon</i>	无齿鲹 <i>Gnathanodon speciosus</i>	+	+	+			+	+	+	6
					竹筴鱼属 <i>Trachurus</i>	竹筴鱼 <i>Trachurus japonicus</i>	+							+	2
					圆鲹属 <i>Decapterus</i>	蓝圆鲹 <i>Decapterus maruadsi</i>							+		1
		鲳科 Sillaginidae	沙鲛属 <i>Sillago</i>	多鳞鲳 <i>Sillago sihama</i>	+	+	+	+				+	5		
				少鳞鲳 <i>Sillago japonica</i>								+	1		
			鲳属 <i>Sillago</i>	鲳属未定种 <i>Sillago</i> sp.								+	1		
		笛鲷科 Lutjanidae	笛鲷属 <i>Lutjanus</i>	紫红笛鲷 <i>Lutjanus argentimaculatus</i>	+							+	2		
				隆背笛鲷 <i>Lutjanus gibbus</i>								+	1		
		带鱼科 Trichiuridae	沙带鱼属 <i>Lepturacanthus</i>	沙带鱼 <i>Lepturacanthus savala</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	7		
			带鱼属 <i>Trichiurus</i>	带鱼 <i>Trichiurus japonicus</i>	+	+	+	+				+	6		
		丝足鲈科 Osphronemidae	搏鱼属 <i>Betta</i>	暹罗斗鱼 <i>Betta splendens</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	7		
		石鲷科 Oplegnathidae	石鲷属 <i>Oplegnathus</i>	斑石鲷 <i>Oplegnathus punctatus</i>				+	+			+	3		

续表 1

亚纲 Subclass	目 Order	科 Family	属 Genus	种 Species	采样点 Sampling site							合计 Total ^b	
					A	B	C	D	E	F	G		
		鲭科 Scombrida	马加鲹属 <i>Scomberomorus</i>	蓝点马鲛 <i>Scomberomorus niphonius</i>	+	+		+	+	+		5	
		鲷科 Serranidae	下美鲷属 <i>Epinephelus</i>	鞍带石斑鱼 <i>Epinephelus lanceolatus</i>		+	+			+	+	4	
		白鲳科 Ehippidae	燕鱼属 <i>Platax</i>	燕鱼属未定种 <i>Platax</i> sp.							+	1	
	鲈形目 Tetraodontiformes	鲈科 Tetraodontidae	多纪鲈属 <i>Takifugu</i>	双斑多纪鲈 <i>Takifugu bimaculatus</i>	+	+	+	+	+	+	+	7	
				铅点多纪鲈 <i>Takifugu alboplumbeus</i>	+	+	+	+	+	+	+	7	
	鲤形目 Cypriniformes	鲤科 Cyprinidae	鲮属 <i>Aristichthys</i>	鲮 <i>Hypophthalmichthys nobilis</i>							+	1	
			罗汉鱼属 <i>Pseudorasbora</i>	麦穗鱼 <i>Pseudorasbora parva</i>							+	1	
	鲮形目 Mugiliformes	鲮科 Mugilidae	副鲮属 <i>Liza</i>	前鳞鲮 <i>Liza affinis</i>		+						1	
			鲮属 <i>Mugil</i>	鲮 <i>Mugil cephalus</i>					+	+		2	
	鲱形目 Clupeiformes	鲱科 Engraulidae	梭鲈属 <i>Thryssa</i>	赤鼻梭鲈 <i>Thryssa kammalensis</i>			+					1	
		锯腹鲱科 Pristigasteridae	鲱属 <i>Ilisha</i>	鲱 <i>Ilisha elongata</i>		+						1	
	鲉形目 Aulopiformes	狗母鱼科 Synodontidae	镰齿鱼属 <i>Harpadon</i>	龙头鱼 <i>Harpadon nehereus</i>						+	+	2	
	鲷形目 Scorpaeniformes	平鲷科 sebastidae	平鲷属 <i>Sebastes</i>	平鲷属未定种 <i>Sebastes</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	7	
	鼠鲬目 Gonorhynchiformes	遮目鱼科 Chanidae	虱目鱼属 <i>Chanos</i>	遮目鱼 <i>Chanos chanos</i>							+	+	2
合计 Total ^a					13	15	14	10	9	31	13		

注:a. 各采样点检出物种总数; b. 各物种被检测到的次数。

Notes: a. The total number of detected species at each sampling site; b. the occurrence times of each species.

2.3 采样点间的物种组成异同

不同采样点间检测到的鱼类种类数和共有种类数如图 4 所示。所有采样点共同检测到的鱼类共有 6 种, 分别是双斑多纪鲈 (*Takifugu bimaculatus*)、沙带鱼 (*Lepturacanthus savala*)、暹罗斗鱼 (*Betta splendens*)、小黄鱼 (*Larimichthys polyactis*)、铅点多纪鲈 (*Takifugu alboplumbeus*) 和平鲷属 (*Sebastes* sp.) 鱼类。7 个采样点中, 采样点 E 检测到的鱼类种类数最少 (9 种), F 点检测到的种类数最多 (31 种)。其余采样点分别检测到的鱼类种类数为 10 ~ 15 种。有 9 种鱼类仅在 F 点被检测到, 分别是孔虾虎鱼 (*Trypauchen vagina*)、六丝钝尾虾虎鱼 (*Amblychaeturichthys*

hexanema)、少鳞鳉 (*Sillago japonica*)、隆背笛鲷 (*Lutjanus gibbus*)、皮氏叫姑鱼 (*Johnius belangerii*)、鳉属 (*Sillago* sp.) 和燕鱼属 (*Platax* sp.) 种类, 以及 2 种淡水鱼: 鲮 (*Hypophthalmichthys nobilis*) 和麦穗鱼 (*Pseudorasbora parva*)。另外有 3 种鱼类 (前鳞鲮 *Liza affinis*, 鲱 *Ilisha elongata* 和蓝圆鲹 *Decapterus maruadsi*) 仅在 B 点被检测到。赤鼻梭鲈 (*Thryssa kammalensis*) 仅在 C 点被检测到。不同采样点之间的物种组成差异以及物种分布热图 (图 5) 显示, C 点和 G 点以及 D 点和 E 点间拥有相似的物种组成。

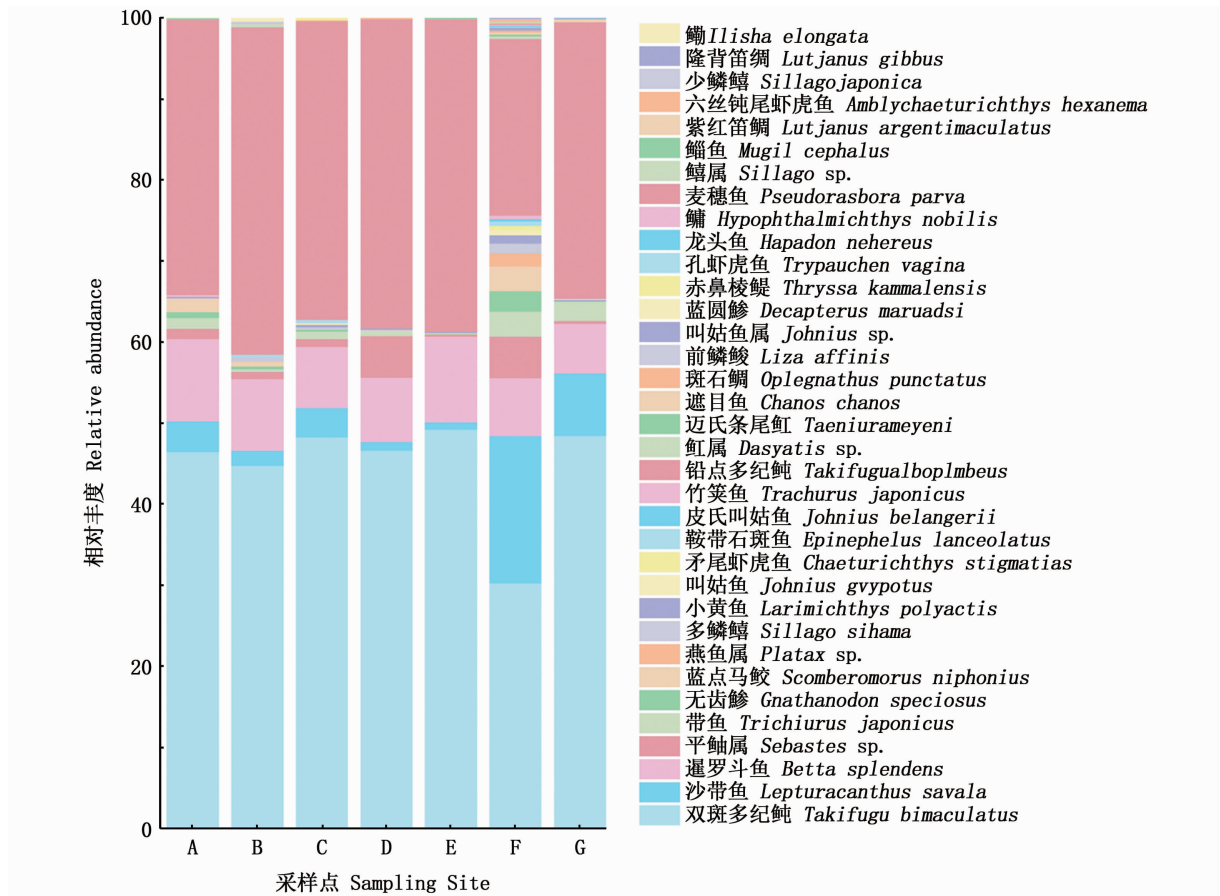


图3 各采样点的鱼类物种组成

Fig.3 Composition of fish species at each sampling site

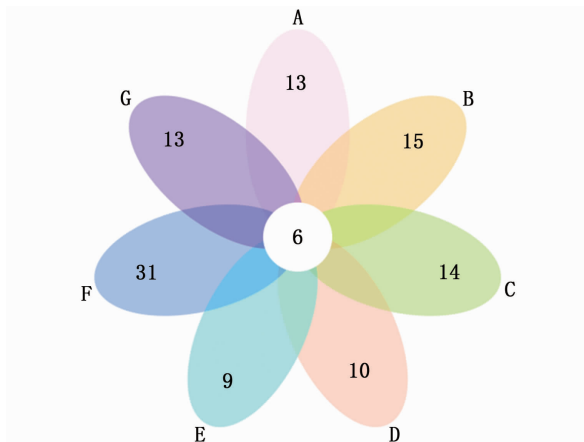


图4 不同采样点间的物种数量差异

Fig.4 Variations of the number of species in different sampling sites

2.4 相对优势种类

7个采样点共获得有效序列 26 777 条。其中：鲷形目鱼类的序列数量最多，共 20 867 条，占比 77.9%；其次是鲈形目，共 5 177 条，占比

19.3%；其余目的鱼类仅占 2.6%。在 35 种鱼类中，序列数排名前 4 位的物种为双斑多纪鲷、铅点多纪鲷、暹罗斗鱼和沙带鱼，序列数占比分别为 43.9%、34%、8% 和 6%（表 2），采样点间物种分布热图（图 5）也显示，这 4 种鱼类的序列在各个采样点的丰度都很高。

2.5 与珠江口其他海域鱼类种类组成研究的比较

ZOU 等^[20]在珠江口南沙湿地附近水域 6 个采样点中共检测到 24 科 57 种鱼类，CHEANG 等^[21]在香港西部海域 5 个采样点中共检测到了 17 科 22 种鱼类。本研究在与上述 2 个研究区域均不重叠的珠江口伶仃洋海域 7 个采样点共检测到 20 科 35 种鱼类。对比 3 个研究区域检测到的鱼类种类（图 6）发现，南沙湿地附近水域的研究中有 14 种鱼类在本研究中也检测到了，分别是鞍带石斑鱼（*Epinephelus lanceolatus*）、双斑多纪鲷、铅点多纪鲷、沙带鱼、蓝圆鲹、六丝钝尾虾虎鱼、少鳞鳕、带鱼（*Trichiurus japonicus*）、多鳞鳕（*Sillago sihama*）、竹筴鱼（*Trachurus japonicus*）、遮

目鱼 (*Chanos chanos*)、斑石鲷 (*Oplegnathus punctatus*)、鲮鱼 (*Mugil cephalus*)、紫红笛鲷 (*Lutjanus argentimaculatus*)。香港西部海域的研究中仅有 2 种鱼类在本研究中被检测到,分别是

鞍带石斑鱼和前鳞鲛。香港西部海域和南沙湿地附近水域均检测到的种类只有鞍带石斑鱼,也是 3 个研究区域中唯一被检测到的共同种类。

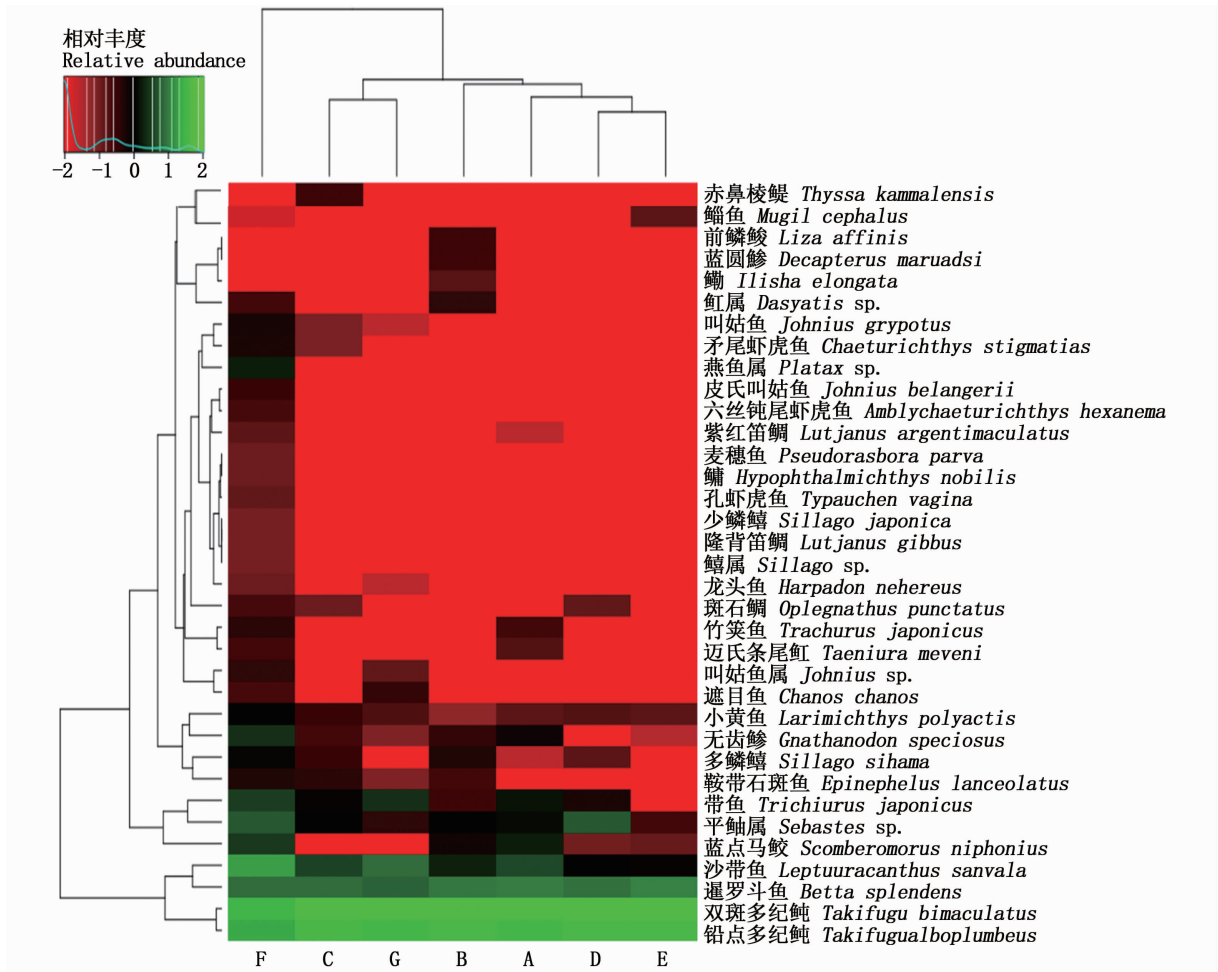


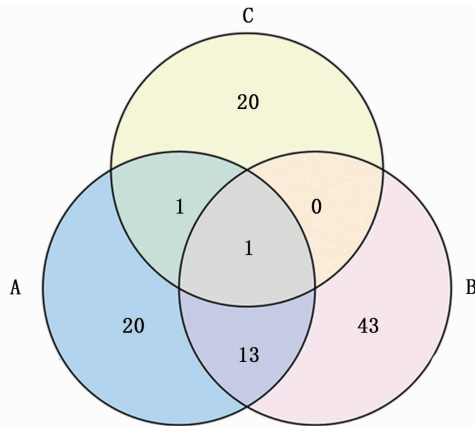
图 5 采样点间的物种分布 heatmap

Fig. 5 The distribution heatmap of species between sampling sites

表 2 不同采样点 4 种优势物种的序列数

Tab. 2 The number of sequences of 4 dominant species at different sampling sites

物种 Species	各采样点的物种序列数 Read counts of each species at each site							合计 Total
	A	B	C	D	E	F	G	
双斑多纪鲷 <i>Takifugu bimaculatus</i>	1 616	1 598	1 742	1 808	1 590	1 602	1 808	11 764
铅点多纪鲷 <i>Takifugu alboplumbeus</i>	1 181	1 444	1 330	1 477	1 244	1 155	1 272	9 103
暹罗斗鱼 <i>Betta splendens</i>	352	314	273	308	342	377	228	2 194
沙带鱼 <i>Lepturacanthus savala</i>	133	68	131	41	28	960	287	1 648



A 为本研究海域; B 为珠江口南沙湿地; C 为香港西部海域。
A indicates this study; B indicates Nansha District Coast of Pearl River estuary; C indicates Hong Kong's waters.

图 6 珠江口不同研究区域的鱼类物种数量比较
Fig. 6 The comparison of fish species numbers in different study areas of Pearl River estuary

3 讨论

3.1 基于环境 DNA 宏条形码技术检测的鱼类物种组成

本研究基于环境 DNA 宏条形码技术在珠江口伶仃洋 7 个采样点共检测到 35 种鱼类, 绝大部分种类都是传统调查中出现过的种类, 或是区域指南、文献以及数据库中已有记载的种类^[25-26]。在检测到的鱼类中, 鲈形目鱼类在物种数量上占绝对优势, 但总的序列数仅占总序列数的 19.3%。鲈形目鱼类仅有 2 种, 但鲈形目鱼类的序列数占总序列数的 77.9%。一方面, 物种序列的相对丰度在一定程度上受物种数量的影响, 序列相对丰度体现了物种在环境中可能具有的丰度^[7]; 另一方面, 检测结果中的序列相对丰度受多种因素的影响, 如模板 DNA 的来源、检测物种的分布、生活史和生态位、引物的扩增偏向性等^[27-28]。因此推测, 出现上述结果的原因可能与采样时这些物种在采样点的种群大小、释放的 DNA 总量和速度或所处生态位有关。

本研究从海水样本中检测出 3 种淡水鱼类: 鳊、麦穗鱼和暹罗斗鱼。原因可能是带有这些鱼类 DNA 的介质通过水流或者其他途径的传播进入采样区域而被检测到。相关研究^[29]发现鲤的 DNA 会通过多种环境介质传播, 如: 人类排放的生活污水、鸟类误食鱼体产生的粪便、丢弃入河的鲤残尸以及船舶运输的间接污染。由于鳊和麦穗鱼是常见的经济食用鱼类^[30], 渔民在船上食

用后将残渣倒入海里或者食用后排泄到海水里, 因此可能产生污染。也可能由珠江的淡水将这些鱼的组织或死亡个体带入到海洋中, 因而被检测出来。暹罗斗鱼是一种观赏鱼, 有商贩会在海边、海岛上进行售卖, 死亡个体和暂养水体可能得以进入海水中。另外, 周边水族市场的排污也可能将带有其 DNA 的水体带入采样区域, 从而被检测出来。

3.2 环境 DNA 技术检测的高灵敏性

此次在 A 和 F 两个采样点检测到 1 种易危物种——迈氏条尾魮 (*Taeniura meyeni*)^[31], 在以往基于传统网捕方法调查中没有查阅到该物种的记录。香港鱼类学会 (www.hkis.hk) 和 IUCN 数据库记录显示, 珠江河口水域属于该物种的分布区域^[32], 但种群数量极少, 目前处于“易危”级别, 利用传统的调查方法可能难于发现其踪迹。环境 DNA 技术可以更加灵敏地检测物种丰度低、生物量少的稀有物种。与传统调查方法相比, 对水样中环境 DNA 进行检测可以获得更多的物种种类, 同时也提高了对珍稀濒危物种、迁徙物种以及目视监测法易忽视的隐蔽物种的检出效率^[33-34]。

3.3 环境 DNA 宏条形码技术对鱼类种类鉴定的有效性

在进行物种注释时, 有 5 种鱼类仅能鉴定到属水平, 包括: (1) 鉴定到叫姑鱼属的物种序列与卡氏叫姑鱼最为匹配, 但匹配度仅有 87% 而未能定种。(2) 鉴定到鳊属的物种与小鳞鳊 (*Sillago parvisquamis*) 匹配度为 95%, 和中国鳊 (*Sillago sinica*) 匹配度为 94%, 匹配度也均比较低而未能定种。(3) 有 2 个 OTU 序列可与多个物种匹配, 且匹配度均为 100%, 由于无法进行区分而未能定种, 如鉴定到平鲷属的物种与日本平鲷 (*Sebastes ventricosus*)、汤氏平鲷 (*Sebastes thompsoni*) 和许氏平鲷 (*Sebastes schlegelii*) 的匹配度均为 100%。鉴定到燕鱼属的物种与尖翅燕鱼 (*Platax teira*)、波氏燕鱼 (*Platax boersii*) 和圆眼燕鱼 (*Platax orbicularis*) 的匹配度均为 100%。(4) 鉴定到魮属的物种由于数据库的不完善, 数据库中没有收录相对应的序列, 故只能确定到属的水平。利用环境 DNA 进行物种检测时有一些局限性, 如本底数据库中 DNA 序列及其完整性成为环境 DNA 宏条形码物种注释的重要限制因素。

此外,所选目标序列针对某些类群的区分力不够也将导致难以区分近缘物种,如平鲉属鱼类和燕鱼属鱼类等。

3.4 珠江口不同海域研究的对比

在检测到的鱼类种类的数量和组成上,本研究与珠江口其他 2 个区域的研究有较大的差异。在物种数量上,本研究检测到的鱼类种类(35 种)低于南沙湿地附近水域(57 种),高于香港西部海域(22 种)。在种类组成上,本研究与南沙湿地周围水域检测到的共同种类较多,而与更为邻近的香港西部海域的共同种类则很少。这与研究区域、样品采集策略和采用的条形码标记有很大的关系。南沙湿地周围水域为咸淡水交汇处,同时是淡水鱼类和海水鱼类的栖息地,鱼类种类可能本身就比海水海域要丰富;同时,在样品采集上,本研究仅在雨季采集了水体样本,而南沙湿地周围水域的研究则在旱季和雨季均采集了水样,其研究结果表明两个时间段的物种组成有明显的不同,旱季的鱼类多样性大于雨季^[20]。因此也可能是检测到的鱼类种类数要多于本研究的原因。本研究的鱼类种类组成与地理距离较远、生境差别较大的南沙湿地周围水域更为接近,而与地理距离上邻近的香港西部海域差别明显,原因很可能是本研究和南沙湿地周围水域的研究采用了相同的线粒体 12S 序列作为条形码标记,而香港西部海域的研究采用的标记是线粒体 COI 序列。不同引物对模板的匹配程度和扩增效率等都可以影响目标序列的产出,从而影响种类组成^[35-37]。这可能也是香港西部海域检测到的种类数偏少的原因。综合以上分析得知,在利用环境 DNA 宏条形码研究鱼类多样性时,选取扩增的序列种类多的条形码标记引物、增加采样的时间跨度可以提高检出率,从而更真实地反应研究区域的多样性指标。

4 结论

本研究使用环境 DNA 宏条形码技术对珠江河口伶仃洋的鱼类组成进行了初步探究,在 7 个采样点共检测出 9 目 20 科 29 属 35 种鱼类,证实了环境 DNA 宏条形码技术在珠江河口鱼类种类组成和分布调查研究应用上的可行性,并通过与其他两项研究比较了解了珠江河口不同区域的鱼类种类组成差异。虽然环境 DNA 宏条形码技

术具有对数据库的依赖性、无法评估鱼类的个体状况、无法进行生物学测量等缺点。不能完全替代传统的鱼类调查方法,但该技术具有对生物体以及生态环境无害、操作简单、高灵敏度以及高检测率等诸多优势。随着数据库的持续完善,该技术的适用性会越来越强。环境 DNA 宏条形码技术可以作为对传统调查方法的补充,用于河口鱼类多样性的调查研究,为资源调查评估的开展提供有力的技术支持。

参考文献:

- [1] 郑亮,吕振波,李凡,等. 黄河口、长江口和珠江口水域鱼类分类学多样性的对比研究[J]. 大连海洋大学学报, 2014, 29(5): 530-535.
ZHENG L, LYU Z B, LI F, et al. Comparison of ontaxonomic diversity of fish community among the Yellow River estuary, Yangtze River estuary, Pearl River estuary and their adjacent waters [J]. Journal of Dalian Ocean University, 2014, 29(5): 530-535.
- [2] CAHILL A E, PEARMAN J K, BORJA A, et al. A comparative analysis of metabarcoding and morphology-based identification of benthic communities across different regional seas [J]. Ecology and Evolution, 2018, 8(17): 8908-8920.
- [3] BONAR S A, MERCADO-SILVA N, HUBERT W A, et al. Standard methods for sampling freshwater fishes: opportunities for international collaboration [J]. Fisheries, 2017, 42(3): 150-156.
- [4] BAYLEY P B, PETERSON J T. An approach to estimate probability of presence and richness of fish species [J]. Transactions of the American Fisheries Society, 2001, 130(4): 620-633.
- [5] OLDS B P, JERDE C L, RENSHAW M A, et al. Estimating species richness using environmental DNA [J]. Ecology and Evolution, 2016, 6(12): 4214-4226.
- [6] YAMAMOTO S, MASUDA R, SATO Y, et al. Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 40368.
- [7] USHIO M, MURAKAMI H, MASUDA R, et al. Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing [J]. Metabarcoding and Metagenomics, 2018, 2: e23297.
- [8] BLABOLIL P, HARPER L R, RÍ ČANOVA Š, et al. Environmental DNA metabarcoding uncovers environmental correlates of fish communities in spatially heterogeneous freshwater habitats [J]. Ecological Indicators, 2021, 126: 107698.
- [9] SINGER G A C, FAHNER N A, BARNES J G, et al. Comprehensive biodiversity analysis via ultra-deep patterned

- flow cell technology: a case study of eDNA metabarcoding seawater[J]. *Scientific Reports*, 2019, 9(1): 5991.
- [10] KELLY R P, CLOSEK C J, O' DONNELL J L, et al. Genetic and manual survey methods yield different and complementary views of an ecosystem [J]. *Frontiers in Marine Science*, 2017, 3: 283.
- [11] BAKKER J, WANGENSTEEN O S, CHAPMAN D D, et al. Environmental DNA reveals tropical shark diversity in contrasting levels of anthropogenic impact [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 16886.
- [12] MINAMOTO T, YAMANAKA H, TAKAHARA T, et al. Surveillance of fish species composition using environmental DNA[J]. *Limnology*, 2012, 13(2): 193-197.
- [13] THOMSEN P F, KIELGAST J, IVERSEN L L, et al. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e41732.
- [14] THOMSEN P F, KIELGAST J, IVERSEN L L, et al. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA [J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21(11): 2565-2573.
- [15] 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.
- [16] GOLD Z, CURD E E, GOODWIN K D, et al. Improving metabarcoding taxonomic assignment: A case study of fishes in a large marine ecosystem [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2021, 21(7): 2546-2564.
- [17] CIVADE R, DEJEAN T, VALENTINI A, et al. Spatial representativeness of environmental DNA metabarcoding signal for fish biodiversity assessment in a natural freshwater system[J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0157366.
- [18] HÄNFLING B, HANDLEY L L, READ D S, et al. Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods[J]. *Molecular Ecology*, 2016, 25(13): 3101-3119.
- [19] SIGSGAARD E E, NIELSEN I B, CARL H, et al. Seawater environmental DNA reflects seasonality of a coastal fish community[J]. *Marine Biology*, 2017, 164(6): 128.
- [20] ZOU K S, CHEN J W, RUAN H T, 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 [J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 702: 134704.
- [21] CHEANG C C, LEE B Y, IP B H Y, et al. Fish and crustacean biodiversity in an outer maritime estuary of the Pearl River Delta revealed by environmental DNA [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2020, 161: 111707.
- [22] MAGO Ó T, SALZBERG S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [23] EDGAR R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. *Nature Methods*, 2013, 10(10): 996-998.
- [24] 李桂峰, 庄平. 珠江口鱼类多样性与资源保护[M]. 北京: 中国农业出版社, 2018.
LI G F, ZHUANG P. *Conservations of fish diversity and resource in the Pearl River estuary* [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2018.
- [25] 何国民. 珠江口水域水生生物生态研究文集[M]. 北京: 科学出版社, 2004.
HE G M. *A collection of ecological studies on aquatic organisms in the Pearl River estuary* [M]. Beijing: Science Press, 2004.
- [26] 詹海刚. 珠江口及邻近水域鱼类群落结构研究[J]. *海洋学报*, 1998, 20(3): 91-97.
ZHAN H G. *Study on fish community structure in the Zhujiang estuary and adjacent waters* [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 1998, 20(3): 91-97.
- [27] 李晗溪, 黄雪娜, 李世国, 等. 基于环境 DNA-宏条形码技术的水生生态系统入侵生物的早期监测与预警[J]. *生物多样性*, 2019, 27(5): 491-504.
- [28] LI H X, HUANG X N, LI S G, et al. Environmental DNA (eDNA)-metabarcoding-based early monitoring and warning for invasive species in aquatic ecosystems[J]. *Biodiversity Science*, 2019, 27(5): 491-504.
- [28] 徐念, 熊美华, 邵科, 等. 长江中下游环境 DNA 宏条形码生物多样性检测技术初步研究[J]. *环境科学研究*, 2020, 33(5): 1187-1196.
- [29] XU N, XIONG M H, SHAO K, et al. Preliminary study on environmental DNA metabarcoding for detecting biodiversity in the middle and lower reaches of the Yangtze River[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2020, 33(5): 1187-1196.
- [29] LODGE D M, TURNER C R, JERDE C L, et al. Conservation in a cup of water: estimating biodiversity and population abundance from environmental DNA[J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21(11): 2555-2558.
- [30] 帅方敏, 李新辉, 李跃飞, 等. 珠江东塔产卵场鳊繁殖的生态水文需求[J]. *生态学报*, 2016, 36(19): 6071-6078.
- [31] SHUAI F M, LI X H, LI Y F, et al. Analysis of the ecohydrological demands of bighead carp breeding in the Dongta spawning grounds of the Pearl River, via cross-wavelet analysis[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2016, 36(9): 6071-6078.
- [31] KYNE P M, WHITE W T. *Taeniurops meyeri*. The IUCN red list of threatened species 2015: e. T60162A68646736 [EB/OL]. <https://www.iucnredlist.org/species/60162/68646736>.
- [32] SCARPONI P, CORO G, PAGANO P. A collection of Aquamaps native layers in NetCDF format[J]. *Data in Brief*, 2018, 17: 292-296.

- [33] O'DONNELL J L, KELLY R P, SHELTON A O, et al. Spatial distribution of environmental DNA in a nearshore marine habitat[J]. PeerJ, 2017, 5: e3044.
- [34] PORT J A, O'DONNELL J L, ROMERO-MARACCINI O C, et al. Assessing vertebrate biodiversity in a kelp forest ecosystem using environmental DNA[J]. Molecular Ecology, 2016, 25(2): 527-541.
- [35] MIYA M, GOTOH R O, SADO T. MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples[J]. Fisheries Science, 2020, 86(6): 939-970.
- [36] COLLINS R A, BAKKER J, WANGENSTEEN O S, et al. Non-specific amplification compromises environmental DNA metabarcoding with COI [J]. Methods in Ecology and Evolution, 2019, 10(11): 1985-2001.
- [37] DEINER K, BIK H M, MÄCHLER E, et al. Environmental DNA metabarcoding: transforming how we survey animal and plant communities[J]. Molecular Ecology, 2017, 26(21): 5872-5895.

Species composition of fishes in the Pearl River estuary based on environmental DNA metabarcoding

LI Hongting^{1,2}, ZOU Keshu³, ZHANG Shuai^{1,2}, CAO Yiting^{1,4}, LU Zhicheng^{1,2}, CHEN Zuozhi^{1,5}, LI Min^{1,5}

(1. Key Laboratory of Open-Sea Fishery Development, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Guangdong Provincial Key Laboratory of Fishery Ecology and Environment, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, Guangdong, China; 2. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. College of Marine Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China; 4. College of Fisheries and Life Science, Dalian Ocean University, Dalian 116023, Laoning, China; 5. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory, Guangzhou 511458, Guangdong, China)

Abstract: In this study, we investigated the fish species composition of the Pearl River estuary using environmental DNA (eDNA) metabarcoding. DNA were extracted from water samples collected from 7 sites in Lingding bay of Pearl River estuary and partial sequences of the mitochondrial 12S were amplified. 26 777 effective sequences were obtained in total and the sequences were clustered into 35 OTUs (operational taxonomic units). A total of 35 fish species were identified from 9 orders, 22 families and 29 genera. Among them, 30 species were identified to the species level, and 5 species were only identified to the genus level. 9–31 species were detected separately in 7 sampling sites. Most of the species belongs to Perciformes, with 22 species in total. The vulnerable species (*Taeniura meyeni*) was detected at sites A and F. By comparing with two similar studies the Pearl River estuary, we found that the difference of the sampling area, sample collection strategy and the molecular marker adopted makes significant differences in the number and composition of the fish species detected. The results show that the environmental DNA metabarcoding technology is suitable for the investigation of fish species composition in Lingding Bay of the Pearl River estuary, which can be used as a supplementary method for the investigation and assessments of fish diversity in the estuary area.

Key words: environmental DNA (eDNA); Pearl River estuary; species detection; fish diversity