

李晓玲, 刘洋, 王丛丛, 等. 基于环境 DNA 技术的夏季东海鱼类物种多样性研究[J]. 海洋学报, 2022, 44(4): 74–84, doi:10.12284/hyxb2022088

Li Xiaoling, Liu Yang, Wang Congcong, et al. Study on fish species diversity in the East China Sea in summer based on environmental DNA technology[J]. Haiyang Xuebao, 2022, 44(4): 74–84, doi:10.12284/hyxb2022088

基于环境 DNA 技术的夏季东海鱼类物种多样性研究

李晓玲¹, 刘洋^{1,2,3,4,5}, 王丛丛^{1,2,3,4,5*}, 俞晔伟¹, 李纲^{1,2,3,4,5*}

(1. 上海海洋大学 海洋科学学院, 上海 201306; 2. 大洋渔业资源可持续开发教育部重点实验室, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 国家远洋渔业工程技术研究中心, 上海 201306; 4. 农业农村部大洋渔业开发重点实验室, 上海 201306; 5. 农业农村部大洋渔业资源环境科学观测实验站, 上海 201306)

摘要: 为了解东海海域主要鱼类群落的种类组成, 监测和保护其多样性, 本研究利用环境 DNA 技术对东海鱼类进行物种多样性分析。通过海水样品的采集, 环境 DNA 提取、扩增和高通量测序分析, 从东海 14 个站点的环境 DNA 样本中共检测出 2 纲, 23 目, 29 科, 42 属, 44 种海水鱼类, 大部分种类在东海传统渔业资源调查中均有出现。其中, 相对丰度较高的物种为赤鼻棱鲷 (*Thryssa kammalensis*)、蓝点马鲛 (*Scomberomorus niphonius*)、日本鲈 (*Scomber japonicus*)、小黄鱼 (*Larimichthys polyactis*) 和鲮 (*Mugil cephalus*)。站点间 α 多样性差异较大, 总体上呈现近海站点生物多样性高, 远海站点生物丰度高的特点。研究表明, 环境 DNA 技术可以作为传统渔业资源调查的补充, 也可以对东海海域鱼类物种多样性及空间分布进行快速检测。

关键词: 环境 DNA; 东海; 生物多样性; 鱼类

中图分类号: S932.4

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2022)04-0074-11

1 引言

生物多样性在支撑生态系统稳定性方面发挥着重要作用, 是实现全球可持续发展目标的重要基础^[1], 通常由遗传多样性、物种多样性和生态系统多样性 3 个部分组成, 其中物种多样性是生物多样性的核心。海洋生态系统是地球上最大的水生生态系统, 而鱼类是海洋生态系统的关键类群, 也是人类的重要蛋白质来源^[2]。在人类活动和全球气候变化的影响下, 海洋鱼类物种多样性受到了严重威胁^[3], 包括大量物种的丧失以及濒危物种的增多, 特别是人类活动较为频繁的一些陆缘海, 情况更为严重。因此, 监测鱼类物种多样性对此类典型海域的生态系统科学管理和

资源可持续利用至关重要。

东海海域地处北太平洋西部, 海岸线曲折, 大陆架面积广阔, 是一个较大的陆缘海^[4]。由于独特的地理位置, 许多河流, 包括长江、钱塘江、甬江等均汇入东海, 此外, 东海东南部受到黑潮暖流的影响, 使得其初级生产力高、生物种类丰富、渔业资源量大。东海中有带鱼 (*Trichiurus japonicus*)、小黄鱼 (*Larimichthys polyactis*)、日本鲈 (*Scomber japonicus*) 等重要经济物种, 形成了我国重要的渔场^[5-6]。为了能够合理利用渔业资源, 我国对东海海域的鱼类资源开展了大量调查, 调查方法主要为底拖网调查^[7-9], 此方法往往耗时耗力, 对生物体本身也会造成直接伤害。

为避免调查对生物系统的破坏, 非侵略性调查方

收稿日期: 2021-07-21; 修订日期: 2021-12-17。

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFD0901404); 国家自然科学基金 (31702312)。

作者简介: 李晓玲 (1997—), 女, 江苏省海安市人, 主要从事环境 DNA 的研究。E-mail: 1103198570@qq.com

* 通信作者: 王丛丛, 女, 讲师, 主要从事环境 DNA、种群遗传进化的研究。E-mail: ccwang@shou.edu.cn; 李纲, 男, 副教授, 主要从事渔业资源评估的研究。E-mail: g-li@shou.edu.cn

法将会成为生物调查的主流。近年来,环境 DNA (Environmental DNA, eDNA) 技术越来越多地被应用于生态调查^[10-12]。eDNA 是指从环境中而不是从生物个体中收集的 DNA^[13], 比如鱼类释放到水中的体表碎片、黏液和排泄物等。而 eDNA 技术是指从环境样本(采集的海水)中直接提取 DNA 片段后利用 PCR 和测序技术进行定性或定量分析, 从而确定目标生物在该环境中的分布的研究方法^[14], 研究过程中无需与研究生物直接接触。Sigsgaard 等^[15]通过 eDNA 技术检测到丹麦沿海 29 种鱼类, 与浮潜观察所得结果有高度的一致性。Fraija-Fernández 等^[16]利用 eDNA 技术揭示了东北大西洋鱼类群落组成, 且物种序列读数和生物量之间存在总体相关性。目前, 国内对于 eDNA 的研究也日趋丰富, 在象山港水域^[17]和洱海^[18]的两项研究中, 通过 eDNA 序列丰度获得的优势鱼类物种和渔业资源调查结果基本一致。Wang 等^[19]基于 eDNA 浓度对东海小黄鱼进行渔业资源评价, 发现其区域分布和水层分布与传统拖网捕捞结果一致。本研究利用 eDNA 技术初步分析东海海域鱼类物种的多样性, 以期为鱼类物种的保护和合理利用以及东海海域生态系统的稳定性保护提供参考。

2 材料与方法

2.1 环境样本采集

本实验所用环境样本为 2020 年 9 月 19-21 日采自东海海域的海水样本。本次调查共在航行过程中依次选取 14 个站点(间隔 50~160 km), 具体采样站点见图 1, 甲板上采水器的下放点远离调查船出水

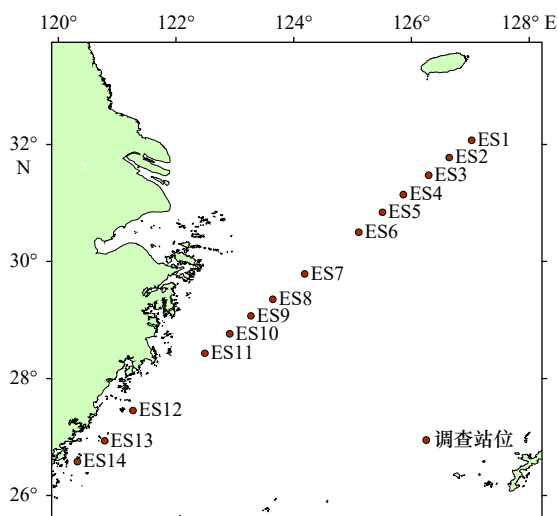


图 1 2020 年 9 月东海采样站点
Fig. 1 Sampling stations in the East China Sea in September 2020

口, 每个站点采集 5 L 表层水。水样采集完毕立即在调查船实验室中使用滤膜对海水中的 eDNA 进行富集, 所选滤膜为直径 47 mm、孔径 0.45 μm 的尼龙膜 (Nynon)。过滤所用器材提前经过稀释配置的 84 消毒液(有效氯含量为 0.3%)浸泡消毒处理, 过滤实验水样前必须先过滤 3 个空白水样, 然后再过滤实验水样, 用规格 1 L 的无菌可密封广口瓶量取过滤水样, 每张滤膜过滤 2.5 L, 过滤后得到的滤膜用镊子卷曲放入 1.5 mL 棕色离心管中密封, 标记站点和采样时间, -80°C 冷冻保存至提取 DNA。使用 DNeasy Blood and Tissue Kit 试剂盒 (Qiagen, Hilden, Germany) 进行 eDNA 提取, 提取方法参照试剂盒说明书并做适当调整, 提取的 eDNA 混匀后分装, 每管 20 μL , 并立即使用琼脂糖凝胶电泳法和 Nanodrop 分光光度计对其进行质量检测, 记录对应样本 eDNA 测定浓度及 OD260/280 值(即 260 nm 波长和 280 nm 波长下吸光度的比值), 剩余 eDNA 置于 -80°C 冰箱中保存备用。

2.2 PCR 扩增与测序

使用已报道的 FISH eDNA 通用引物 MiFish-E-F: 5'-GTTGGTAAATCTCGTGCCAGC-3'和 MiFish-E-R: 5'-CATAGTGGGGTATCTAATCCTAGTTTG-3'进行 PCR 扩增, 该引物针对 12S rRNA 基因的一个高变区^[20]。扩增体系 25 μL , 包含 5 \times 反应缓冲液和 5 \times GC 缓冲液各 5 μL , dNTP(2.5 mmol/L) 2 μL , 正反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , 模板 DNA(20 ng/ μL) 2 μL , 双蒸水 8.75 μL , Q5DNA 聚合酶 0.25 μL 。采用两步 PCR 方法制备成对末端文库, PCR 扩增参数: 95°C 预变性 5 min, 95°C 变性 30 s, 60°C 退火 30 s, 然后进行 55 个循环。PCR 扩增仪器为 ABI 2720 型 PCR 扩增仪。同时建立阴性对照, 检测来自环境或试剂的微生物污染。在随后的实验中, 任何有条带扩增的阴性对照组都没有被使用。最后, 在 Illumina MiSeq 平台(委托上海派森诺生物科技有限公司)上对文库进行双端测序。

2.3 数据分析

测序原始数据以 FASTQ 格式保存, 并根据序列质量进行初步筛查; 对问题样本进行重测、补测。使用 Vsearch(v2.13.4_linux_x86_64)、cutadapt(v2.3)软件对原始双端测序数据进行拼接、去重, 再按照 97% 相似度水平聚类为可操作分类单元 (Operational Taxonomic Unit, OTU), 并获得代表序列和 OTU 表。代表 OTU 序列与参考序列数据库 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 MitoFish(<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/download.html>) 进行比对物种分类学注释。统计各样本不同分类水平各自含有的分类单元的数量, 并在

种水平上对优势物种做进一步分析。使用 QIIME2 软件^[21]进行 α 多样性分析, α 多样性指数表征物种在生境内的多样性^[22], 其中 Chao1 指数^[23]和观察到的物种数(Observed species)指数表征丰富度, Shannon 指数^[24-25]和 Simpson 指数^[26]表征多样性, Pielou 指数^[27]表征均匀度, 具体计算方法参考 <http://scikit-bio.org/docs/latest/generated/skbio.diversity.alpha.html#module-skbio.diversity.alpha>。基于各采样点物种序列丰度, 利用 R 语言 phetmap 包绘制物种组成热图。并使用 R 语言 VennDiagram 包绘制 OTU 花瓣图, 分析不同采样点的共有 OTU 和独有 OTU。

3 结果与分析

3.1 eDNA 测序的结果

共测定 14 个样本, 经原始双端测序数据处理, 总共获得 656 863 条原始序列, 其中高质量序列 547 435 条。eDNA 样本的高通量测序统计结果如表 1 所示。

表 1 各站点的序列量 (eDNA) 结果

Table 1 Sequence quantity (eDNA) results of each station

样本编号	输入	拼接	过滤	去除嵌合体	去除稀有个体
ES1	49 783	44 714	44 391	42 432	42 408
ES2	46 901	41 393	40 861	38 840	38 805
ES3	40 025	32 226	31 836	28 594	28 582
ES4	51 372	46 714	46 342	44 584	44 577
ES5	48 368	42 888	42 569	38 711	38 693
ES6	40 211	36 323	36 045	35 215	35 191
ES7	45 536	37 148	36 896	33 504	33 477
ES8	42 894	38 350	37 916	36 222	36 206
ES9	39 905	35 718	35 365	33 794	33 779
ES10	36 894	34 166	33 866	33 029	33 025
ES11	47 798	42 483	42 025	40 463	40 452
ES12	48 212	44 930	44 405	42 827	42 818
ES13	57 782	52 829	52 126	50 612	50 594
ES14	61 182	52 154	51 314	48 608	48 582

注: 表中第二列为原始数据中能同时匹配到正向和反向引物的序列量; 第三列为拼接后的序列量; 第四列为去除低质量序列后的数据量; 第五列为聚类后去除嵌合体后序列量, 即为高质量序列量; 第六列为去除 singleton OTUs(在所有样本中绝对丰度为 1 的 OTU) 后的序列量。

3.2 鱼类物种组成

高质量序列最终聚成的 OTU 与数据库 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 MitoFish (<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/download.html>) 进行比对注释, 并手动移除非鱼类的 OTU, 非鱼类的注释序列主要包括鸟类、两栖类和藻类。鱼类注释序列的 OTU 划分和分类地位鉴定结果如图 2 所示。筛选并删除淡水鱼类物种, 共检测到 11 种淡水鱼类, 主要为鲤形目鱼类, 出现这种现象的原因很可能是样品出现污染, 需对阴性对照进行测序分析, 找到污染源头。共检测出海水鱼类 2 纲, 23 目, 29 科, 42 属, 44 种, 具体结果如表 2 所示。

图 2 展示了利用 eDNA 分析技术检出的丰度前 10 位的鱼类优势物种, 分别为赤鼻棱鳀 (*Thryssa kamalensis*)、蓝点马鲛 (*Scomberomorus nipponius*)、日本鲈 (*Scomber japonicus*)、小黄鱼 (*Larimichthys polyactis*)、鲻 (*Mugil cephalus*)、日本鳀 (*Engraulis japonicus*)、远东拟沙丁鱼 (*Sardinops melanostictus*)、海鳗 (*Muraenesox cinereus*)、七星底灯鱼 (*Benthosema pterotum*) 和龙头鱼 (*Harpadon nehereus*)。其中赤鼻棱鳀、日本鳀和远东拟沙丁鱼均属于鲱形目 (Clupeiformes), 日本鲈和蓝点马鲛均属于鲭形目 (Scombriformes)。

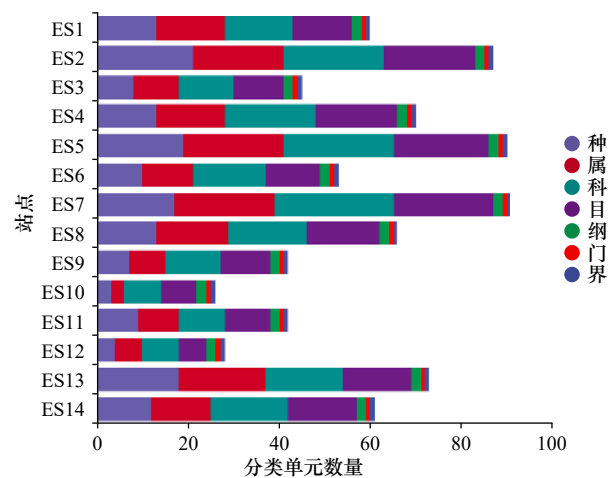


图 2 东海鱼类 OTU 划分和分类地位鉴定结果

Fig. 2 Result of OTU division and classification taxon identification of fish in the East China Sea

图 3 展示了利用 eDNA 分析技术检出的丰度前 10 位的鱼类优势物种, 分别为赤鼻棱鳀 (*Thryssa kamalensis*)、蓝点马鲛 (*Scomberomorus nipponius*)、日本鲈 (*Scomber japonicus*)、小黄鱼 (*Larimichthys polyactis*)、鲻 (*Mugil cephalus*)、日本鳀 (*Engraulis japonicus*)、远东拟沙丁鱼 (*Sardinops melanostictus*)、海鳗 (*Muraenesox cinereus*)、七星底灯鱼 (*Benthosema pterotum*) 和龙头鱼 (*Harpadon nehereus*)。其中赤鼻棱鳀、日本鳀和远东拟沙丁鱼均属于鲱形目 (Clupeiformes), 日本鲈和蓝点马鲛均属于鲭形目 (Scombriformes)。

3.3 鱼类物种多样性分析

图 4 为本次测序所得的鱼类物种稀疏曲线, 由图可见所有站点测序深度均达到了平台期, 反映当前测序数据足够用于后续多样性分析。

表 3 所示为反映鱼类群落相对丰度的 α 多样性指数。其中, Chao1 指数范围为 52.628 ~ 180.581, Observed species 指数范围为 41.3 ~ 158.0, 两个指数的分布趋势基本一致; Simpson 多样性指数范围为 0.028 676 ~ 0.644 819, Shannon 多样性指数范围为 0.168 019 ~

表 2 东海环境 DNA 检出的鱼类物种

Table 2 Fish species detected by eDNA in the East China Sea

目	科	属	种
Anguilliformes	Muraenesocidae	<i>Muraenesox</i>	褐海鳗 <i>Muraenesox bagio</i>
			海鳗 <i>Muraenesox cinereus</i>
Aulopiformes	Synodontidae	<i>Harpadon</i>	龙头鱼 <i>Harpadon nehereus</i>
Carangaria	Polynemidae	<i>Polydactylus</i>	黑斑多指马鲛 <i>Polydactylus sextarius</i>
Carangiformes	Carangidae	<i>Trachurus</i>	日本竹筴鱼 <i>Trachurus japonicus</i>
Centrarchiformes	Terapontidae	<i>Rhynchopelates</i>	尖突吻鲷 <i>Rhynchopelates oxyrhynchus</i>
Clupeiformes	Clupeidae	<i>Konosirus</i>	斑鲹 <i>Konosirus punctatus</i>
		<i>Sardinops</i>	远东拟沙丁鱼 <i>Sardinops melanostictus</i>
	Engraulidae	<i>Encrasicholina</i>	银灰半棱鲷 <i>Encrasicholina punctifer</i>
		<i>Engraulis</i>	日本鲷 <i>Engraulis japonicus</i>
		<i>Setipinna</i>	太的黄鲫 <i>Setipinna taty</i>
Pristigasteridae		<i>Thryssa</i>	赤鼻棱鲷 <i>Thryssa kammalensis</i>
			黄吻棱鲷 <i>Thryssa vitrirostris</i>
		<i>Ilisha</i>	鲷 <i>Ilisha elongata</i>
Elopiformes	Elopidae	<i>Elops</i>	夏威夷海鲢 <i>Elops hawaiiensis</i>
Eupercaria	Sciaenidae	<i>Chrysochir</i>	尖头黄鳍牙鲷 <i>Chrysochir aureus</i>
		<i>Larimichthys</i>	小黄鱼 <i>Larimichthys polyactis</i>
		<i>Pennahia</i>	银姑鱼 <i>Pennahia argentata</i>
Labriformes	Labridae	<i>Scarus</i>	青点鹦嘴鱼 <i>Scarus ghobban</i>
Mugiliformes	Mugilidae	<i>Mugil</i>	鲻 <i>Mugil cephalus</i>
Myctophiformes	Myctophidae	<i>Benthoosema</i>	七星底灯鱼 <i>Benthoosema pterotum</i>
		<i>Diaphus</i>	帕尔眶灯鱼 <i>Diaphus parri</i>
Ophidiiformes	Ophidiidae	<i>Hoplobrotula</i>	棘黼鲷 <i>Hoplobrotula armata</i>
Pempheriformes	Lateolabracidae	<i>Lateolabrax</i>	中国花鲈 <i>Lateolabrax maculatus</i>
Perciformes	Pholidae	<i>Pholis</i>	方氏锦鲷 <i>Pholis fangi</i>
	Triglidae	<i>Chelidonichthys</i>	棘绿鳍鱼 <i>Chelidonichthys spinosus</i>
Pleuronectiformes	Cynoglossidae	<i>Cynoglossus</i>	焦氏舌鲷 <i>Cynoglossus joyneri</i>
		<i>Paraplagusia</i>	日本须鲷 <i>Paraplagusia japonica</i>
	Pleuronectidae	<i>Pleuronichthys</i>	木叶鲽 <i>Pleuronichthys cornutus</i>
Priacanthiformes	Priacanthidae	<i>Polydactylus</i>	长尾大眼鲷 <i>Priacanthus tayenus</i>
Scombriformes	Centrolophidae	<i>Hyperoglyphe</i>	日本栉鲳 <i>Hyperoglyphe japonica</i>
		<i>Psenopsis</i>	刺鲳 <i>Psenopsis anomala</i>
	Scombridae	<i>Auxis</i>	双鳍舵鲳 <i>Auxis rochei</i>
		<i>Scomber</i>	日本鲈 <i>Scomber japonicus</i>
	<i>Scomberomorus</i>	蓝点马鲛 <i>Scomberomorus niphonius</i>	

续表 2

目	科	属	种
		<i>Thunnus</i>	长鳍金枪鱼 <i>Thunnus alalunga</i>
	Trichiuridae	<i>Trichiurus</i>	日本带鱼 <i>Trichiurus japonicus</i>
Spariformes	Sparidae	<i>Acanthopagrus</i>	黑棘鲷 <i>Acanthopagrus schlegelii</i>
Stomiiformes	Sternoptychidae	<i>Polyipnus</i>	闪电烛光鱼 <i>Polyipnus stereotype</i>
Syngnathiformes	Callionymidae	<i>Repomucenus</i>	饰鳍斜棘鲷 <i>Repomucenus ornatipinnis</i>
Tetraodontiformes	Balistidae	<i>Canthidermis</i>	疣鳞鲀 <i>Canthidermis maculata</i>
Uranoscopiformes	Uranoscopidae	<i>Uranoscopus</i>	日本鰺 <i>Uranoscopus japonicus</i>
		<i>Xenocephalus</i>	青鰺 <i>Xenocephalus elongatus</i>
Carcharhiniformes	Carcharhinidae	<i>Carcharhinus</i>	镰状真鲨 <i>Carcharhinus falciformis</i>

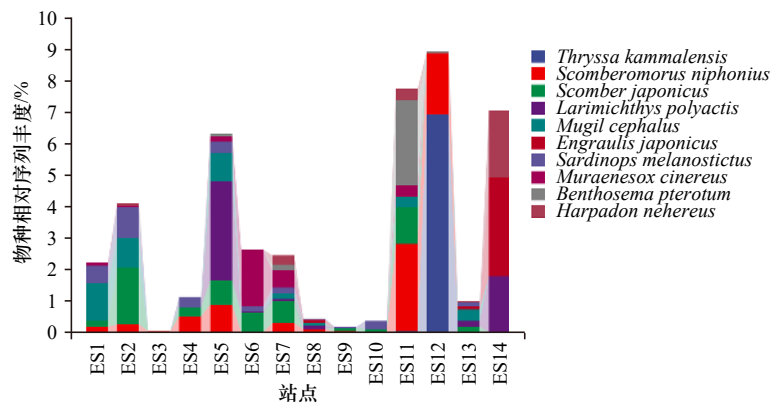


图 3 各采样站点优势鱼类物种组成

Fig. 3 The composition of dominant fish species at each sampling station

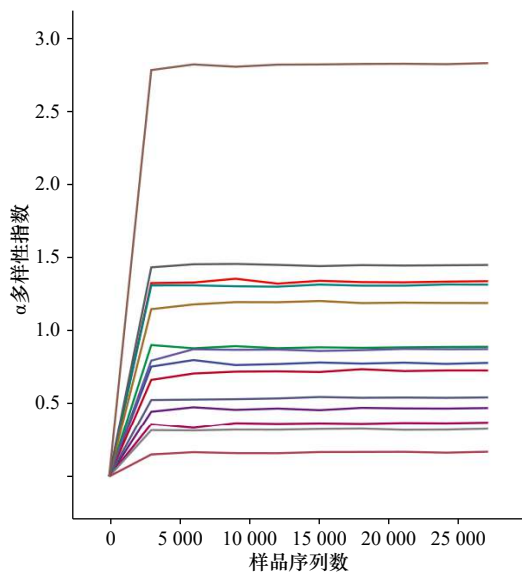
图 4 东海不同采样站点(每条线代表一个站点)物种 α 多样性指数稀疏曲线

Fig. 4 Sparse curve of species alpha diversity index at different sampling stations (each line represents a different station) in the East China Sea

2.827 730, 两者分布趋势也基本对应。Pielou 均匀度指数范围为 0.031 302~0.396 211。各个样品所测得的鱼类物种 α 多样性指数存在差异, 其中 ES12 和 ES14 样品具有较高的 Simpson 和 Shannon 多样性指数, 而 ES5 和 ES7 具有较高的 Chao1 和 Observed species 指数。

3.4 样本间鱼类物种差异分析

利用 R 软件根据获得的样本 OTU 统计表绘制了 14 个采样站点样本共有 OTU 的花瓣图, 各样本中共有和特有 OTU 比例如图 5a 所示。由图可见, 14 个采样站点共有 OTU 所占比例较低, 且 ES14、ES5、ES6、ES2 和 ES7 这 5 个采样点具有较高比例的特有 OTU。为了比较不同海域鱼类物种的组成情况, 按照离岸远近, 将研究区域从空间上分为近岸、近海和远海 3 个部分, 每个部分随机选取相同数量的站点进行分析, 即 ES12、ES13、ES14 为近岸组, ES7、ES8、ES9 为近海组, ES1、ES2、ES3 分为远海组, 3 部分 OTU 比例如图 5b 所示, 近海海域的特有 OTU 数量最多, 近岸海

表3 东海鱼类物种相对丰度的 α 多样性指数

Table 3 Alpha diversity index of relative abundance of fish species in the East China Sea

样本编号	α 多样性指数				
	Chao1 指数	Observed species指数	Pielou 均匀度指数	Shannon 多样性指数	Simpson 多样性指数
ES1	136.067	110.9	0.114 603	0.778 447	0.146 170
ES2	141.298	118.8	0.194 134	1.338 000	0.279 125
ES3	66.306	52.5	0.155 547	0.888 807	0.210 343
ES4	87.058	70.4	0.076 428	0.469 034	0.087 745
ES5	180.581	158.0	0.179 919	1.313 980	0.260 339
ES6	146.008	131.1	0.103 214	0.726 042	0.137 918
ES7	179.801	156.1	0.120 015	0.874 447	0.159 080
ES8	123.483	104.2	0.055 219	0.370 140	0.060 713
ES9	96.789	73.4	0.052 500	0.325 372	0.055 633
ES10	52.628	41.3	0.031 302	0.168 019	0.028 676
ES11	128.553	113.0	0.174 276	1.188 490	0.266 132
ES12	76.652	65.1	0.240 004	1.445 680	0.358 558
ES13	97.967	84.7	0.085 121	0.545 044	0.099 298
ES14	155.352	140.8	0.396 211	2.827 730	0.644 819

域次之,远海海域最少。图6展示了每一优势鱼种在不同采样站点的相对丰度,其中,OTU检出频率较高的鱼类为蓝点马鲛、日本鲈、鲷和远东拟沙丁鱼,在14个采样站点中的检出频率均为0.7以上。值得注意的是,OTU相对丰度最高的物种赤鼻棱鲛在采样站点中的出现位置最为集中,为ES12站点,该站点位于福建、浙江沿海。

利用R软件绘制基于种水平的鱼类组成热图(图7)。如图所示,不同物种的组成在各个站点(样

本)间存在差异,从样本聚类上看,地理上相邻的站点ES9和ES10被最先聚在一起,而与ES9和ES10物种组成差异最大的为站点ES2,并不是地理上与ES9和ES10相距最远的站点。从物种聚类上看,闪电烛光鱼(*Polyipnus stereope*)和焦氏舌鲷(*Cynoglossus joyneri*)最先聚在一起,除了在站点ES2有较高的相对丰度,在其余站点的相对丰度均较低;鲷、日本鲈和蓝点马鲛均为相对丰度前10的优势物种且在各站点的组成较为相似。整体看来,多样性和丰富度的趋势与3.3节所述 α 多样性指数结果一致,其中ES5、ES2和ES14站点均有较高的多样性和丰富度。

4 讨论

东海海域海岸线曲折,浅滩面积广阔,渔业资源丰富,但近年来,由于人类活动(主要为过度捕捞)的影响,其传统渔业资源遭到严重破坏,如曾属于四大经济鱼类之一的大黄鱼(*Larimichthys crocea*)早已濒临灭绝,各大渔场的主要渔获物逐渐被年龄结构简单、经济价值低、个体小和营养级层次低的种类所替代^[28]。因此,开展东海海域鱼类群落结构和多样性研究,可以为相关鱼类物种的保护和合理利用提供参考资料,进一步实现东海海域生态系统的科学管理。然而,东海传统的渔业资源调查主要为底拖网调查,不仅耗费大量人力物力,还会破坏海洋底质,进而破坏海底生态系统的稳定性,此外,渔获物的鉴定比较依赖鱼类专家,研究周期较长。本研究使用eDNA技术进行东海鱼类多样性研究,仅需采集少量海水样本即可,对生物较为友好,且对专业人员比如鱼类专家的要求不高,一定程度上降低了研究成本并减少了研究时间^[29-30]。此外,对于一些密度较低的物种,eDNA技术与传统的研究方法相比更为灵敏和准确^[12],其

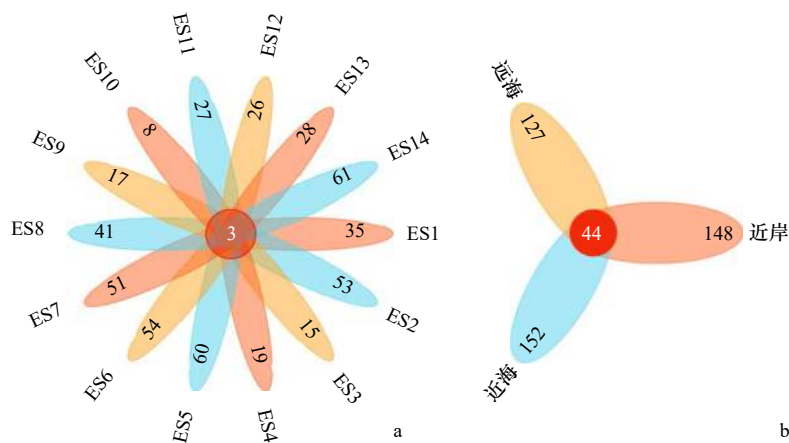


图5 东海水域不同采样站点共有 OTU 的花瓣图

Fig. 5 Petal map of OTU shared by different sampling stations in the East China Sea

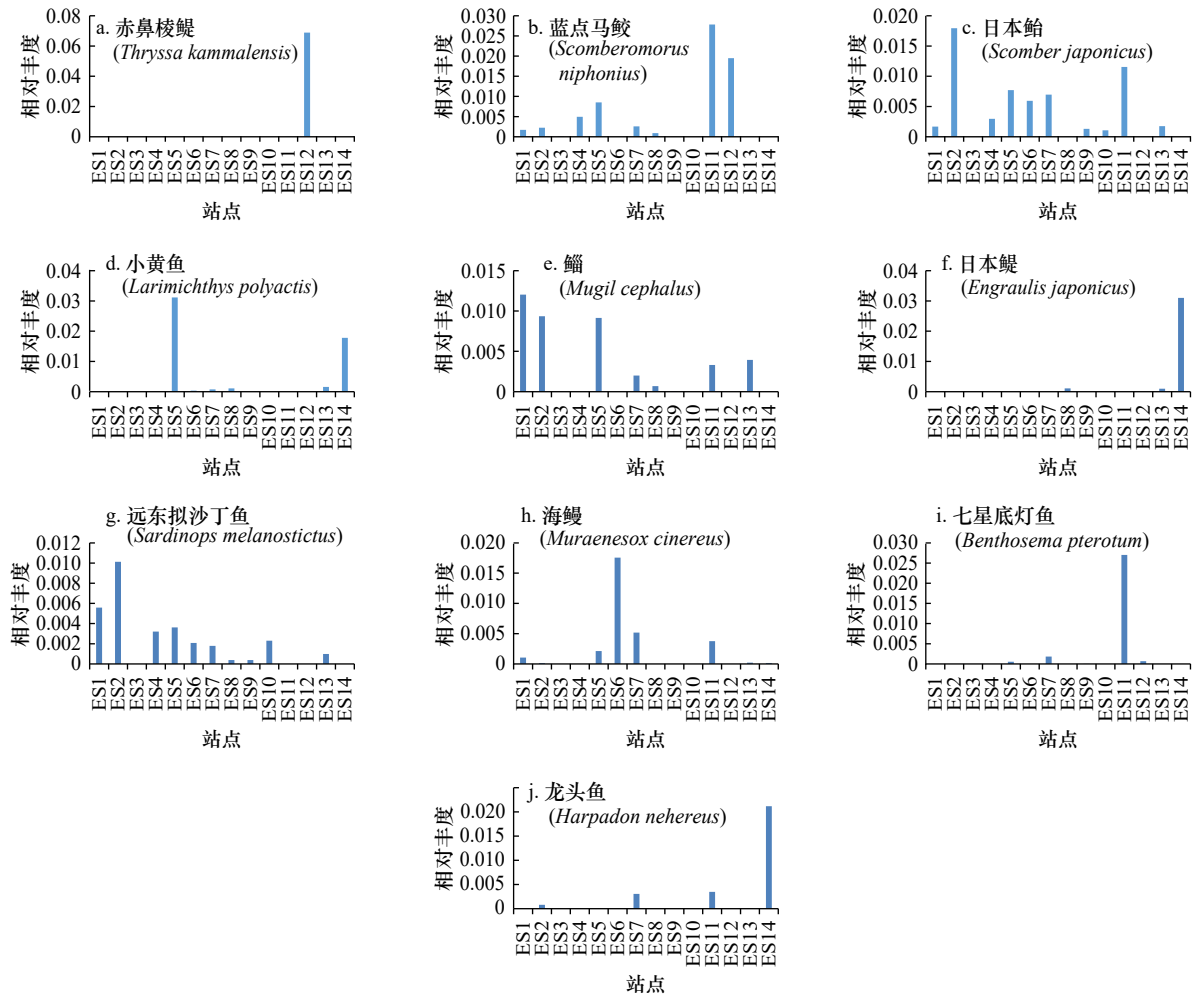


图6 各优势鱼种在不同采样站点的相对丰度

Fig. 6 Relative abundance of dominant fish species at different sampling stations

结果可作为传统方法的补充。

本研究在 14 个站点的海水样本中共检测出 2 纲, 23 目, 29 科, 42 属, 44 种海水鱼类(表 2), 大部分种类在东海传统渔业资源调查结果中均有出现。前人对东海海域进行底拖网渔业资源调查^[7-8, 31], 发现多年来各季节主要的优势鱼类物种较为固定, 9 月份的优势物种主要为带鱼、小黄鱼、刺鲷(*Psenopsis anomala*)、日本鲷、龙头鱼(*Harpadon nehereus*)等, 这些物种在本次取样的分析结果中也均有出现。此外, 与东海传统渔业资源调查相比, 存在一些未曾报道或报道较少的鱼类, 如尖突吻鲷(*Rhynchopelates oxyrhynchus*)、黄吻棱鲷(*Thryssa vitrirostris*)、银灰半棱鲷(*Encrasicholina punctifer*)、尖头黄鳍牙鲷(*Chrysochir aureus*)、双鳍舵鲳(*Auxis rochei*)、疣鳞鲷(*Canthidermis maculata*)等。其中一些鱼类通过传统的形态学方法进行鉴定或区分会存在一定的偏差, 如同属于棱鲷属(*Thryssa*)的黄吻棱鲷和赤鼻棱鲷, 形态学上主要根据上颌骨末端的长度来区分^[32], 但长期生活在

同一环境中可能会使得这一骨骼特征表现出高度的相似性^[33], 因此, 仅根据形态学方法来区分近缘种有一定的局限性。

本次采样时间为 2020 年 9 月, 环境 DNA 分析结果中的优势物种组成(图 3, 图 6)与近 20 年传统调查的结果有所不同, 比如 2000 年 9 月丰富度最高的带鱼以及丰富度第 3 的刺鲷^[34]在本次结果中丰富度相对较低, 未被列入优势物种, 而本次环境 DNA 分析结果中丰富度前 10 的鱼类中赤鼻棱鲷和鲷在以往的东海传统渔业资源调查中丰富度较低或报道较少。这些差异的产生可能与目标物种的生活习性以及环境 DNA 在特定环境中的降解速率有关, 比如传统调查中的优势物种带鱼, 属暖水性中下层鱼类, 具有昼夜垂直移动的习性, 且昼沉夜浮^[35], 这一生活习性可能会影响到样品的采集质量, 即白天采集的表层水样中所含有的带鱼环境 DNA 可能会相对较少, 这需要在样品采集中适当增加采样深度或增加夜间采样量。而本次 14 个站点采样检测出的相对丰度最高的物种

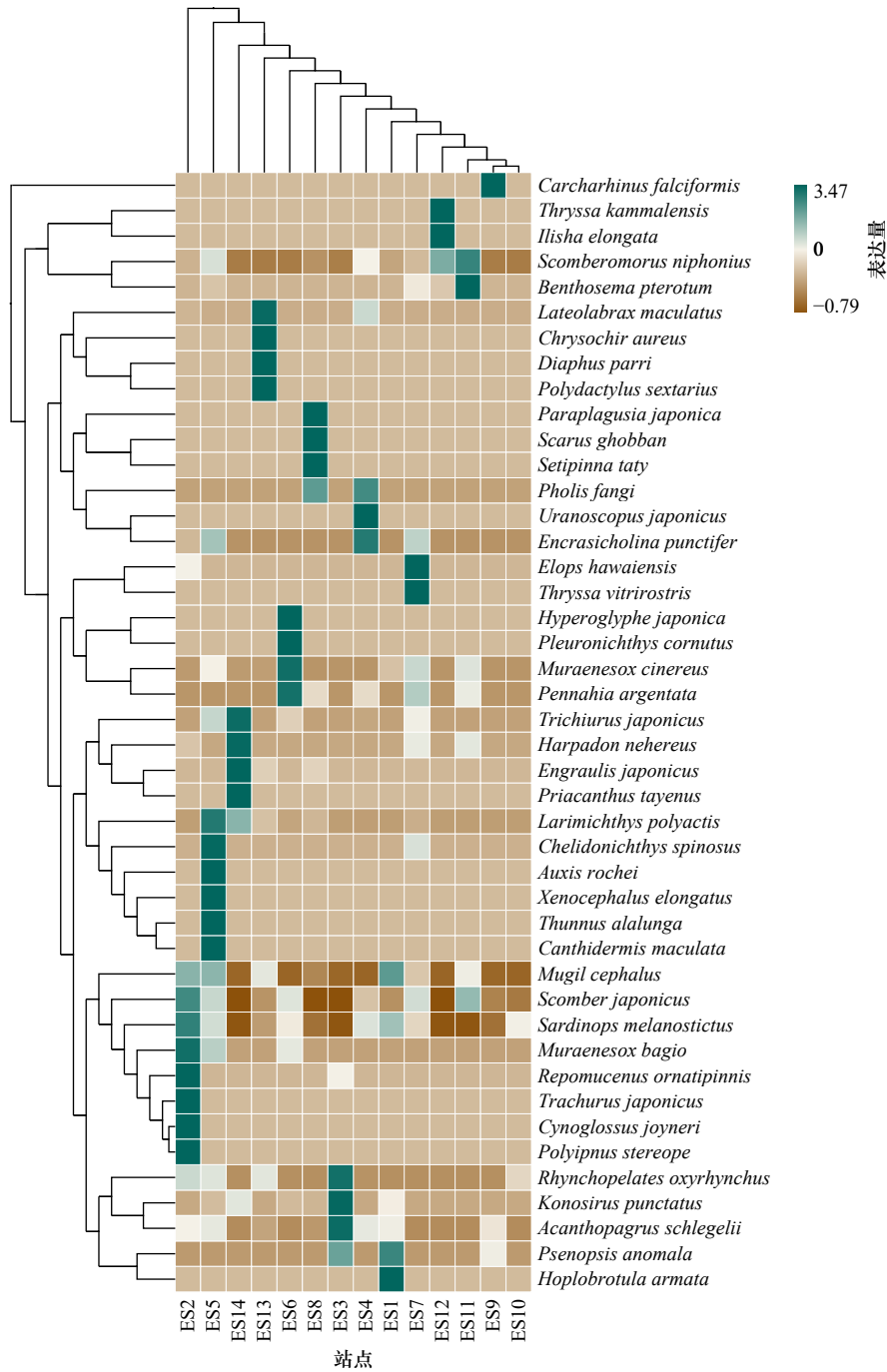


图7 环境 DNA 检出的东海鱼类物种组成热图

Fig. 7 Heat map of fish species composition in the East China Sea detected by eDNA

样本按照物种组成数据的欧式距离进行 UPGMA 聚类, 并根据聚类结果排列; 物种按照其组成数据的 Pearson 相关性系数矩阵进行 UPGMA 聚类, 并根据聚类结果排列; 不同色标代表不同物种在不同样本中的表达量, 色标数值通过物种丰度数据取 Z 值得, 由绿到棕表示对应样本中该种丰度逐渐降低

Samples are clustered by UPGMA according to the euclidean distance of species composition data, and arranged according to the clustering results; UPGMA clustering is carried out according to Pearson correlation coefficient matrix of species composition data, and arranged according to the clustering results; different color codes represent the expression of different species in different samples, and the value of color codes is obtained by taking Z value of species abundance data, and from green to brown, the abundance in corresponding samples gradually decreases

赤鼻棱鲷, 仅存在于 ES12 站点, 一方面说明采样季节 ES12 站点即福建、浙江沿海有丰富的赤鼻棱鲷资源, 另一方面也说明单次采样所得到的数据并不全

面, 对于面积较大的研究海域, 需要设计多个站点且同一季节多次采样, 并将结果进行综合分析, 从而减少个别样品差异对整个实验结果的影响。

本研究采用 α 多样性指数(表3)来表征东海海域的鱼类物种多样性, α 多样性指数数值大小很大程度上由群落自身特点所决定,该指数的主要优势在于可反映多样性空间变化规律和时间尺度的变化趋势^[36],包括丰富度、多样性和均匀度几个指标。Chao1和Observed species指数表征丰富度,14个站点中该指数在ES5和ES7站点数值较高,表明相比于其他站点具有较高的鱼类物种丰富度;Shannon和Simpson多样性指数表征多样性,14个站点中该指数在ES12和ES14站点数值较高,表明相比于其他站点具有较高的鱼类物种多样性,且这两个站点均离岸较近,大陆架浅滩有江河淡水汇入,初级生产力高,利于海洋鱼类的繁衍聚集,所以生物多样性高。在另一项不同年份不同季节(2015年冬季)的同类研究^[37]中,设立10个站点对东海、黄海的鱼类进行多样性调查,其中Shannon多样性指数范围为1.97~4.22,Pielou均匀度指数范围为0.35~0.70,均高于本研究的对应数据,即多样性和均匀度更高,主要原因可能是研究区域的差异,该研究中10个站点分别位于黄海海域和东海海域,各自较为集中,而本研究14个站点仅位于东海海域,且跨度大呈直线分布;而季节性以及年际差异

也可能造成一定影响,冬季的东海为一些重要经济鱼类的越冬场所,而本研究采样季节主要是鱼类的产卵及索饵育肥季节,且产卵场和索饵场主要分布在大陆架和近海海区^[38],在一项2001年的底拖网调查^[39]中也发现,12月份东海中部鱼类群落多样性指数高于9月,伏季休渔结束后对主要经济鱼类物种的捕捞使得东海鱼类群落多样性和均匀度更高。

本研究首次利用eDNA技术分析了东海海域夏季鱼类物种多样性,且采样站点跨度大,研究海域范围广,站点间多样性差异较大,获得了丰富的鱼类物种信息,鉴定所得44种海水鱼类有8种属于鲱形目,7种属于鲭形目。eDNA技术的便捷、经济、高效以及无损性使其在东海这类典型海域的生物多样性研究中有良好的应用前景。不过本研究在采样上仍有不足,首先采样站点在一条东北-西南走向的直线上,缺乏同一经纬度的数据对比;其次采样深度仅为表层,而采样时间随机,这可能会使分析结果缺乏生活水深较深和昼夜活跃度不同的鱼类物种数据。因此,今后在基于eDNA的东海鱼类物种多样性调查中应增加同一经纬度的站点设计,同一站点应尽量分别采集昼夜样本,合理设计采样深度,并进行长期监测。

参考文献:

- [1] Edlinger A, Saghai A, Herzog C, et al. Towards a multidimensional view of biodiversity and ecosystem functioning in a changing world[J]. *New Phytologist*, 2020, 228(3): 820–822.
- [2] Noor N M, Das S K. Effects of elevated carbon dioxide on marine ecosystem and associated fishes[J]. *Thalassas: An International Journal of Marine Sciences*, 2019, 35(2): 421–429.
- [3] Worm B, Barbier E B, Beaumont N, et al. Impacts of biodiversity loss on ocean ecosystem services[J]. *Science*, 2006, 314(5800): 787–790.
- [4] 李圣法,程家骅,严利平.东海大陆架鱼类群落的空间结构[J]. *生态学报*, 2007, 27(11): 4377–4386.
Li Shengfa, Cheng Jiahua, Yan Liping. Spatial structures of fish communities on the continental shelf of the East China Sea[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2007, 27(11): 4377–4386.
- [5] Liu J Y. Status of marine biodiversity of the China Seas[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e50719.
- [6] Takayanagi K, Nishiuchi K, Yokouchi K, et al. A possible collaboration with China on marine ecosystem research in the East China Sea[J]. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, 2006, 40(1): 59–64.
- [7] 林龙山,程家骅,李惠玉.东海底拖网渔业资源现状[J]. *现代渔业信息*, 2006, 21(9): 13–15.
Lin Longshan, Cheng Jiahua, Li Huiyu. Recent status of bottom trawl fishery resources in the East China Sea[J]. *Modern Fisheries Information*, 2006, 21(9): 13–15.
- [8] 刘勇,程家骅.东海及黄海南部渔业资源水文环境类群划分及其相关特征的初步分析[J]. *中国水产科学*, 2019, 26(4): 796–810.
Liu Yong, Cheng Jiahua. Preliminary analysis on the division of fishery resources based on hydrological environment factors in the East China Sea and south of the Yellow Sea[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(4): 796–810.
- [9] 戴芳群,朱玲,陈云龙.黄、东海渔业资源群落结构变化研究[J]. *渔业科学进展*, 2020, 41(1): 1–10.
Dai Fangqun, Zhu Ling, Chen Yunlong. Variations of fishery resource structure in the Yellow Sea and East China Sea[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2020, 41(1): 1–10.
- [10] 高天翔,陈治,王晓艳.近海鱼类多样性调查新方法——环境DNA分析技术[J]. *浙江海洋大学学报(自然科学版)*, 2018, 37(1): 1–7.
Gao Tianxiang, Chen Zhi, Wang Xiaoyan. Environmental DNA, a new method for fish diversity investigation in the coastal waters[J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition)*, 2018, 37(1): 1–7.
- [11] 张辉,线薇薇.环境DNA技术在生态保护和监测中的应用[J]. *海洋科学*, 2020, 44(7): 96–102.
Zhang Hui, Xian Weiwei. Application of environmental DNA technology in ecological conservation and monitoring[J]. *Marine Science*,

- 2020, 44(7): 96–102.
- [12] 吴昫晨, 唐永凯, 李建林, 等. 环境DNA在长江江豚监测中的应用[J]. *中国水产科学*, 2019, 26(1): 124–132.
Wu Yunsheng, Tang Yongkai, Li Jianlin, et al. The application of environmental DNA in the monitoring of the Yangtze finless porpoise, *Neophocaena phocaenoides asaeorientalis*[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(1): 124–132.
- [13] Lear G, Dickie I, Banks J, et al. Methods for the extraction, storage, amplification and sequencing of DNA from environmental samples[J]. *New Zealand Journal of Ecology*, 2018, 42(1): 10.
- [14] 单秀娟, 李苗, 王伟继. 环境DNA(eDNA)技术在水生生态系统中的应用研究进展[J]. *渔业科学进展*, 2018, 39(3): 23–29.
Shan Xiujian, Li Miao, Wang Weiji. Application of environmental DNA technology in aquatic ecosystem[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 23–29.
- [15] 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.
- [16] Fraija-Fernández N, Bouquieaux M C, Rey A, et al. Marine water environmental DNA metabarcoding provides a comprehensive fish diversity assessment and reveals spatial patterns in a large oceanic area[J]. *Ecology and Evolution*, 2020, 10(14): 7560–7584.
- [17] 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[J]. *中国水产科学*, 2021, 28(2): 205–214.
Ling Jianzhong, Jiang Yazhou, Sun Peng, et al. Application and evaluation of environmental DNA technology in fish diversity research in Xiangshan Bay[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(2): 205–214.
- [18] 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[J]. *水生生物学报*, 2020, 44(5): 1080–1086.
Shu Lu, Lin Jiayan, Xu Yuan, et al. Investigating the fish diversity in Erhai Lake based on environmental DNA metabarcoding[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(5): 1080–1086.
- [19] Wang Xiaoyan, Lu Guoqing, Zhao Linlin, et al. Assessment of fishery resources using environmental DNA: small yellow croaker (*Larimichthys polyactis*) in East China Sea[J]. *PLoS One*, 2020, 15(12): e0244495.
- [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] Bolyen E, Rideout J R, Dillon M R, et al. Author correction: reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2[J]. *Nature Biotechnology*, 2019, 37(9): 1091.
- [22] Whittaker R H. Evolution and measurement of species diversity[J]. *Taxon*, 1972, 21(2/3): 213–251.
- [23] Chao Anne. Nonparametric estimation of the number of classes in a population[J]. *Scandinavian Journal of Statistics*, 1984, 11(4): 265–270.
- [24] Shannon C E. A mathematical theory of communication part I: discrete noiseless systems[J]. *The Bell System Technical Journal*, 1948, 27(3): 379–423.
- [25] Shannon C E. A mathematical theory of communication part II: the discrete channel with noise[J]. *The Bell System Technical Journal*, 1948, 27(3): 623–656.
- [26] Simpson E H. Measurement of diversity[J]. *Nature*, 1949, 163(4148): 688.
- [27] Pielou E C. The measurement of diversity in different types of biological collections[J]. *Journal of Theoretical Biology*, 1966, 13: 131–144.
- [28] 赵淑江, 吕宝强, 李汝伟, 等. 物种灭绝背景下东海渔业资源衰退原因分析[J]. *中国科学: 地球科学*, 2015, 45(11): 1628–1640.
Zhao Shujiang, Lü Baoqiang, Li Ruwei, et al. A preliminary analysis of fishery resource exhaustion in the context of biodiversity decline[J]. *Science China: Earth Sciences*, 2015, 45(11): 1628–1640.
- [29] Bergman P S, Schumer G, Blankenship S, et al. Detection of adult green sturgeon using environmental DNA analysis[J]. *PLoS One*, 2016, 11(4): e0153500.
- [30] Lugg W H, Griffiths J, Van Rooyen A R, et al. Optimal survey designs for environmental DNA sampling[J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2018, 9(4): 1049–1059.
- [31] 刘勇, 李圣法, 陈学刚, 等. 东、黄海2000年冬季底层鱼类群落结构及其多样性[J]. *海洋科学*, 2007, 31(10): 19–24.
Liu Yong, Li Shengfa, Chen Xuegang, et al. The structure and diversity of demersal fish communities in winter 2000 in the East China Sea and the Yellow Sea[J]. *Marine Science*, 2007, 31(10): 19–24.
- [32] 宫亚运, 章群, 曹艳, 等. 基于线粒体CO I基因的中国近海梭鲷属鱼类DNA条形码[J]. *水产学报*, 2016, 40(10): 1513–1520.
Gong Yayun, Zhang Qun, Cao Yan, et al. DNA barcoding of *Thryssa* in coastal waters of China based on the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I sequence[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(10): 1513–1520.
- [33] 马春艳, 马凌波, 倪勇, 等. 基于形态特征和线粒体16S rRNA基因序列探讨梭鲷属的系统进化[J]. *中国水产科学*, 2010, 17(3): 471–477.
Ma Chunyan, Ma Lingbo, Ni Yong, et al. Phylogenetic relationship of *Thryssa* inferred from morphologic characteristic and mitochondrial 16S rRNA gene sequences[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(3): 471–477.
- [34] 程家骅, 张秋华, 李圣法, 等. 东黄海渔业资源利用[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006.
Cheng Jiahua, Zhang Qiuhua, Li Shengfa, et al. Fishery Resource Utilization in the Yellow Sea and East China Sea[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2006.

- [35] 杜萍, 陈全震, 李尚鲁, 等. 东海带鱼资源变动及其栖息地驱动因子研究进展[J]. *广东海洋大学学报*, 2020, 40(1): 126–132.
Du Ping, Chen Quanzhen, Li Shanglu, et al. Advances in the *Trichiurus lepturus* changes and habitat driving factors in the East China Sea[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2020, 40(1): 126–132.
- [36] 杨青, 李宏俊, 李洪波, 等. 海洋生物多样性评价方法综述[J]. *海洋环境科学*, 2013, 32(1): 157–160.
Yang Qing, Li Hongjun, Li Hongbo, et al. Review on assessment methods of marine biodiversity[J]. *Marine Environmental Science*, 2013, 32(1): 157–160.
- [37] 赵梦迪. 利用环境DNA分析冬季中国东黄海水域鱼类多样性[D]. 上海: 上海海洋大学, 2017.
Zhao Mengdi. Analysis of the fish diversity of the East China Sea and the Yellow Sea in winter using environmental DNA[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2017.
- [38] 周永东, 李圣法. 东海区主要经济种类三场一通道及保护区图集[M]. 北京: 海洋出版社, 2018.
Zhou Yongdong, Li Shengfa. Atlas of Spawning Grounds, Feeding Grounds, Overwintering Grounds, Migratory Channels and Protected Areas of the Main Economic Species in the East China Sea[M]. Beijing: China Ocean Press, 2018.
- [39] 李圣法, 程家骅, 李长松, 等. 东海中部鱼类群落多样性的季节变化[J]. *海洋渔业*, 2005, 27(2): 113–119.
Li Shengfa, Cheng Jiahua, Li Changsong, et al. Seasonal changes on fish community diversity in the middle part of the East China Sea[J]. *Marine Fisheries*, 2005, 27(2): 113–119.

Study on fish species diversity in the East China Sea in summer based on environmental DNA technology

Li Xiaoling¹, Liu Yang^{1,2,3,4,5}, Wang Congcong^{1,2,3,4,5}, Yu Yewei¹, Li Gang^{1,2,3,4,5}

(1. College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Sustainable Exploitation of Oceanic Fisheries Resources, Ministry of Education, Shanghai 201306, China; 3. National Distant-water Fisheries Engineering Research Center, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 4. Key Laboratory of Ocean Fisheries Exploitation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China; 5. Scientific Observing and Experimental Station of Oceanic Fishery Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai 201306, China)

Abstract: To understand the species composition of the dominant fish species communities in the East China Sea and to monitor and protect their diversity, environmental DNA technology to analyze the species diversity of fish in the East China Sea was used in this study. Through the collection of seawater samples, eDNA extraction, amplification and high-throughput sequencing analysis, a total of 44 species of marine fishes in 2 classes, 23 orders, 29 families and 42 genera were detected, and most of the species were found in the traditional fishery resources survey in the East China Sea. Among them, the species with high relative abundance were red nose anchovy (*Thryssa kammalensis*), blue-spotted horse mackerel (*Scomberomorus niphonius*), Japanese mackerel (*Scomber japonicus*), small yellowtail (*Larimichthys polyactis*) and mullet (*Mugil cephalus*). The alpha diversity among stations was significant difference, and generally showed high biodiversity at coastal stations and high biological abundance at offshore stations. The results suggested that environmental DNA technology could quickly explore the diversity and spatial distribution of fish species in the East China Sea, as an effective supplementary to traditional fisheries resource monitoring.

Key words: environmental DNA; East China Sea; biodiversity; fish