



## 基于环境 DNA metabarcoding 的中街山列岛鱼类物种多样性

钟兰萍<sup>1</sup>, 高天翔<sup>2</sup>, 张浩博<sup>1</sup>, 陈治<sup>3</sup>, 王晓艳<sup>1\*</sup>

(1. 浙江海洋大学, 国家海洋设施养殖工程技术研究中心, 浙江 舟山 316022;

2. 浙江海洋大学水产学院, 浙江 舟山 316022;

3. 海南热带海洋学院水产与生命学院, 海南 三亚 572022)

**摘要:** 岛礁生境支撑着极高的水生生物多样性, 而鱼类物种多样性是水生生物多样性的重要组成部分。为准确了解岛礁海域的鱼类时空分布格局和多样性特征, 依靠传统的渔业资源调查方式存在诸多的困难与挑战, 亟需建立灵敏、高效的生物多样性监测方法。本研究于 2019 年在中街山列岛海域设置了 4 个采样站位, 并在 2、5、8 和 11 月等 4 个时间采集海水表层样品, 采用环境 DNA metabarcoding 技术进行高通量测序。结果显示, 中街山列岛近岸海区共检测出鱼类 37 种, 隶属于 10 目 26 科 36 属; 鱼类种数呈现夏季>冬季>秋季>春季的趋势; 四季共有种仅 2 种, 约占鱼类总种数的 5.41%; 只在一个季节被检测出的鱼类约占总种数的 54.05%。结合 NMDS 分析和 ANOSIM 检验的结果显示, 鱼类群落在不同季节间有显著差异, 而在不同站位间无显著差异。鱼类群落的均匀度较为稳定, 多样性和丰富度指数在站位间无明显变化, 但在季节间表现为夏季最高、春季最低。研究表明, 中街山列岛近岸海区的鱼类分布受季节影响较大, 而在不同采样站位的差异不大, 可能受站位较为集中的影响。

**关键词:** 鱼类; 环境 DNA metabarcoding; 物种多样性; 中街山列岛

中图分类号: S 931

文献标志码: A

生物多样性是衡量生态系统健康的重要指标, 具有重要的经济和生态价值<sup>[1-2]</sup>。鱼类多样性是水生生物多样性的重要组成部分, 对水生生态系统的健康和稳定有重要意义。近年来, 由于气候变化, 全球生物多样性不断降低<sup>[1]</sup>, 而鱼类物种持续衰退的现状在人类活动频繁的近岸海区更为突出<sup>[3]</sup>。因此, 鱼类多样性的监测有利于海洋生态系统的管理和资源可持续利用。

中街山列岛位于舟山渔场的中心区域, 是国

家级海洋特别保护区和国家级海洋牧场示范区之一。该海域多岩礁, 因地处长江、钱塘江入海口, 在台湾暖流和黄海水团的交互影响下, 形成了有利于鱼类摄食、繁殖和生长的水文环境, 主产大黄鱼 (*Larimichthys crocea*)、小黄鱼 (*L. polyactis*) 和日本带鱼 (*Trichiurus japonicus*) 等, 历史上素有“东海鱼仓”的美称<sup>[4-7]</sup>。近年来, 受过度捕捞、海洋环境恶化、栖息地破坏和气候变化等影响, 该海域传统的经济鱼类逐渐被体型小、经济价值低

收稿日期: 2022-06-06 修回日期: 2022-10-22

资助项目: 浙江省重点研发计划 (2021C02047); 国家自然科学基金 (41806180)

第一作者: 钟兰萍 (照片), 从事渔业资源追踪监测研究, E-mail: zhonglanping678@163.com

通信作者: 王晓艳, 从事海洋生物学研究, E-mail: wangxiaoyan@zjou.edu.cn



的鱼类取代<sup>[8-9]</sup>。为更加有效地对中街山列岛的渔业资源进行合理的管理和保护, 亟需对该海域的鱼类物种多样性及其受季节变化的动态分布趋势进行调查。此前, 已有诸多学者和研究人员对该海域展开渔业资源调查, 但大多采用传统的拖网、流刺网、延绳钓等方式进行, 耗时费力, 且不利于鱼类多样性保护<sup>[5,7,10]</sup>。因此, 建立快速、高效、环境友好的物种监测, 准确了解海洋环境中的鱼类群落组成及其时空分布动态, 有利于实现对鱼类多样性的有效管理与保护<sup>[11-12]</sup>。

环境 DNA(environmental DNA, eDNA) 技术, 是通过采集自然环境(土壤、底泥、空气、水体等)中的生物分泌物(细胞组织、黏液)及排泄物(尿液、粪便)作为样品, 不接触目标物种就能获取物种 DNA 从而对其进行鉴定的方法<sup>[13]</sup>。环境 DNA metabarcoding (eDNA metabarcoding) 技术是一种由 DNA 条形码与高通量测序的有效结合, 灵敏且广泛适用于生物多样性研究的工具<sup>[14]</sup>。已有研究表明, 环境 DNA 技术可以成功检测淡水样品中的两栖类、鱼类、鸟类、昆虫、甲壳类和哺乳动物类群<sup>[15-16]</sup>。此外, 环境 DNA metabarcoding 已成功在海水和水族馆中检测出海洋鱼类的种类组成<sup>[17-18]</sup>。该技术不仅摆脱了传统生物多样性调查中对分类学专家鉴定物种的严格依赖, 还可对来自不同营养水平的各种生物物种进行快速识别, 有效节约了人力和时间成本<sup>[19-21]</sup>。本研究运用环境 DNA metabarcoding 技术在中街山列岛近岸海区开展鱼类多样性四季调查, 了解该海域的鱼类

种类组成及其群落结构的分布特征, 以期海洋渔业资源的可持续发展调查提供新途径。

## 1 材料与方法

### 1.1 水样采集与过滤

在中街山列岛近岸海域 30°11'0"~30°13'0"N, 122°40'0"~122°43'0"E 共设 4 个采样站位, 分别于 2019 年 2 月(冬季)、5 月(春季)、8 月(夏季)和 11 月(秋季)进行海水采样(图 1)。采集水样时, 使用一次性无菌采样袋在每个站位采集 1 L 表层水样。采样后 24 h 内对水样进行真空抽滤: 抽滤设备使用 10% 的次氯酸浸泡 5 min 消毒, 并用市售纯净水(杭州娃哈哈集团有限公司)清洗。使用 0.45 μm 孔径的玻璃纤维滤膜(上海兴亚, 中国)抽滤 1 L 水样富集环境 DNA; 每次抽滤设置一个空白滤膜(过滤 1 L 纯净水)来评估是否存在交叉污染, 用铝箔纸包裹滤膜置于 2 mL 冻存管[生工生物工程(上海)股份有限公司]中, 速冻于液氮后转移至-80 °C 冰箱保存, 直至环境 DNA 提取。

### 1.2 环境 DNA 提取

使用 DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, 德国)进行环境 DNA 提取<sup>[22]</sup>。DNA 提取后用 100 μL 的 AE 缓冲液 (Qiagen, 德国)洗脱于 EP 管中。用 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测所提取 DNA 的完整性和空白过滤组是否存在交叉污染, 将合格的 DNA 提取溶液存储于-20 °C 冰箱备用。

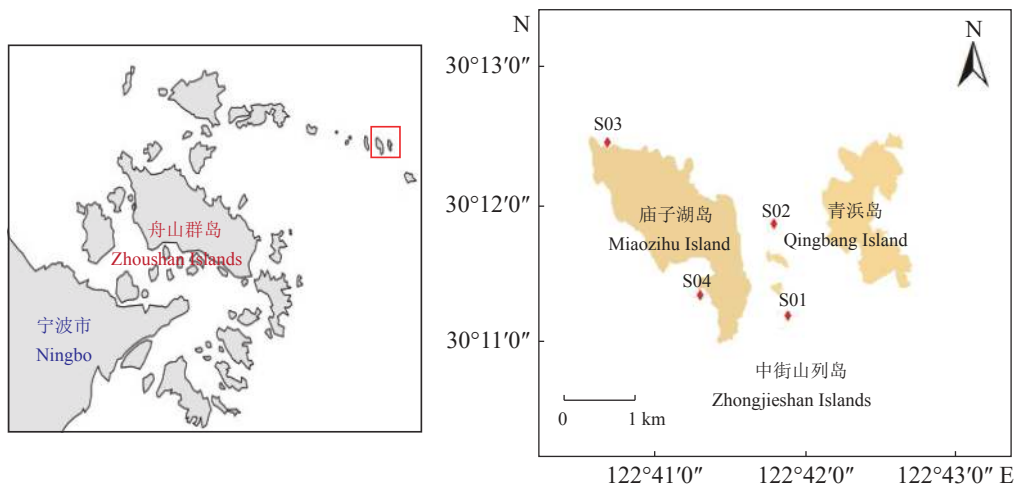


图 1 中街山列岛采样站位图

Fig. 1 Sampling stations of Zhongjieshan archipelago

### 1.3 PCR 扩增及高通量测序

选择鱼类通用引物 MiFish-U/E 进行 PCR 扩增<sup>[23]</sup>, 采用两步 PCR 法获得线粒体 12S rRNA 扩增子文库<sup>[24]</sup>。PCR 反应体系 12  $\mu$ L: 6.0  $\mu$ L 2 $\times$ KAPA HiFi Hot Start Ready Mix (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, 美国), 正、反向引物各 1.0  $\mu$ L, 模板 1.0  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补齐至 12  $\mu$ L。扩增条件: 95  $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 98  $^{\circ}$ C 变性 20 s, 65  $^{\circ}$ C 退火 15 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 15 s, 进行 40 个循环, 72  $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。将第一次 PCR 的产物纯化、稀释后作为后续 PCR 的模板。第二次 PCR 的总反应体系为 12  $\mu$ L: 2 $\times$ KAPA HiFi Hot Start Ready Mix 6.0  $\mu$ L, 正、反向引物各 1.0  $\mu$ L, 模板 1.0  $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 补齐至 12  $\mu$ L。第二次 PCR 的热循环条件为 95  $^{\circ}$ C 3 min, 98  $^{\circ}$ C 20 s, 72  $^{\circ}$ C 20 s, 进行 12 个循环, 72  $^{\circ}$ C 孵育 5 min。每个样品设置 3 个生物学重复, 并用 ddH<sub>2</sub>O 建立一组阴性对照。用 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳对扩增产物进行质量检测及纯化 (AXYGEN), 使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 和 Qubit fluorometer 2 (Thermo Fisher Scientific, 美国) 对文库浓度进行量化, 之后使用灭菌蒸馏水将文库的浓度调整到 4 nmol/L。最后在 iSeq 100 平台 (Illumina, 美国) 上使用 iSeq 100 il 试剂盒 (Illumina, 美国) 对文库进行 2 $\times$ 150 bp 双端测序。

### 1.4 数据分析

各样品的原始 Miseq 测序数据经组装、过滤、质控, 得到有效数据<sup>[24]</sup>。使用 USEARCH 软件 (7.0.1090 版本) 将有效数据以 97% 的一致性聚类为操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU), 获得 OTU 代表序列。代表性 OTU 序列经 Nt 数据库进行物种注释分析, 再结合舟山群岛近海区域水生生物分布信息对所注释物种进行人工校对并手动去除非海洋鱼类信息。从阴性对照中检测到 reads 说明样品可能被污染, 手动将实际样品检测到的 reads 减去阴性对照中的 reads 以排除对后续分析的干扰。基于 R 语言 (4.1.2 版本) 对结果进行可视化分析, 采用非度量多维尺度分析 (NMDS) 来表征鱼类群落结构在时间和空间上的分布格局, 以胁强系数 (Stress) 来衡量 NMDS 结果是否可信, 结合单因子相似性分析 (ANOSIM) 来检验鱼类群落结构的差异性, NMDS 分析使用 bray 包; 使用 ggplot2、vegan 和 ggpubr 包进行 Alpha 多样性指数分析。

## 2 结果

### 2.1 鱼类种类组成

从 16 个海水样本 (4 个季节的 4 个站位) 中检测出 37 个鱼类物种, 隶属 10 目 26 科 36 属 (其中竿虾虎鱼属只能定位到属阶)(表 1)。检测到的鱼类物种均属辐鳍鱼纲 (Actinopterygii), 在目阶水平上鲈形目 (Perciformes) 种类最多, 共 13 科 20 属 21 种, 鱼类物种数约占总种数的 57.76%; 其次是鲉形目 (Scorpaeniformes), 共 3 科 4 属 4 种, 种类数所占百分比约为 10.81%; 鲱形目 (Clupeiformes) 排名第三, 共 2 科 3 属 3 种, 约占鱼类种类总数的 8.11%。之后的鱼类物种数排序依次为鲷形目 (Mugiliformes)、鳗鲡目 (Anguilliformes) 各 2 科 2 属 2 种; 鲀形目 (Tetraodontiformes)、仙女鱼目 (Aulopiformes)、颌针鱼 (Beloniformes)、灯笼鱼目 (Myctophiformes) 和银汉鱼目 (Atheriniformes), 各 1 科 1 属 1 种。

表 1 鱼类不同分类阶元的季节组成

Tab. 1 Seasonal distribution of fish species in different taxonomic orders

季节 season	目 order	科 family	属 genus	种 species
春季 spring	3	3	3	3
夏季 summer	10	25	33	33
秋季 autumn	4	5	5	5
冬季 winter	8	16	20	20
总计 total	10	26	36	37

### 2.2 鱼类相对丰度的季节变化及优势种分布

鱼类的种类在夏季分布最多 (33 种), 冬季次之 (20 种), 秋季第三 (5 种), 春季最少 (3 种) (表 2)。调查海域不同季节鱼类种类组成差别较大, 四季共有种较少, 仅 2 种, 分别为鲷 (*Mugil cephalus*) 和褐菖鲉 (*Sebastiscus marmoratus*), 约占鱼类总种数的 5.41%。花鲈 (*Lateolabrax maculatus*)、日本鲭 (*Scomber japonicus*) 和海鳗 (*Muraenesox cinereus*) 在 3 个季节中被检测出。只在夏季和冬季检测到的鱼类有 12 种, 约占鱼类总种数的 32.43%。而只在一个季节出现的鱼类有 20 种, 约占鱼类总种数的 54.05%, 表明调查海域的鱼类以洄游性种类的季节性分布为主。将 reads 数排名前 10 的优势种在时空上的分布进行分析 (图 2), 结果显示鲷是绝对优势种, 在所有站位均被检出,

表 2 基于环境 DNA metabarcoding 的不同季节鱼类物种列表

Tab. 2 Fish species detected in different seasons based on environmental DNA metabarcoding

物种 species	冬季 winter	春季 spring	夏季 summer	秋季 autumn
鲮 <i>Mugil cephalus</i>	√	√	√	√
前鳞鲷 <i>Planiliza affinis</i>	√		√	
小口鲈 <i>Scorpaena miostoma</i>	√			
褐菖鲈 <i>Sebastes marmoratus</i>	√	√	√	√
棘绿鳍鱼 <i>Chelidonichthys spinosus</i>	√		√	
斑头六线鱼 <i>Hexagrammos agrammus</i>	√		√	
花鲈 <i>Lateolabrax maculatus</i>	√		√	√
赖氏犁齿鲷 <i>Entomacrodus lighti</i>	√		√	
斑点肩鳃鲷 <i>Omobranchus punctatus</i>			√	
八部副鲷 <i>Parablennius yatabei</i>	√		√	
日本鲭 <i>Scomber japonicus</i>	√	√	√	
蓝圆鲹 <i>Decapterus maruadsi</i>	√		√	
日本鲷 <i>Uranoscopus japonicus</i>	√			
小黄鱼 <i>L. polyactis</i>			√	
大黄鱼 <i>L. crocea</i>	√			
黑鲷 <i>Acanthopagrus schlegelii</i>			√	
平鲷 <i>Rhabdosargus sarba</i>			√	
横带髯鲷 <i>Hapalogenys analis</i>				√
三线矶鲈 <i>Parapristipoma trilineatum</i>			√	
紫红笛鲷 <i>Lutjanus argentimaculatus</i>			√	
刺鲷 <i>Psenopsis anomala</i>			√	
花尾唇指鲷 <i>Cheilodactylus zonatus</i>			√	
断纹紫胸鱼 <i>Stethojulis terina</i>	√		√	
竿虾虎鱼属 <i>Luciogobius</i> sp.			√	
六丝钝尾虾虎鱼 <i>Amblychaeturichthys hexanema</i>	√		√	
拟矛尾虾虎鱼 <i>Parachaeturichthys polynema</i>			√	
阔头深虾虎鱼 <i>Bathygobius cotticeps</i>			√	
海鳗 <i>Muraenesox cinereus</i>	√		√	√
前肛鳗 <i>Dysomma anguillare</i>			√	
丝背细鳞鲷 <i>Stephanolepis cirrhifer</i>			√	
斑鲷 <i>Konosirus punctatus</i>	√		√	
黄泽小沙丁鱼 <i>Sardinella lemuru</i>			√	
赤鼻棱鯧 <i>Thryssa kammalensis</i>			√	
龙头鱼 <i>Harpadon nehereus</i>			√	
鳄形圆颌针鱼 <i>Tylosurus crocodilus</i>	√		√	
七星底灯鱼 <i>Benthoosema pterotum</i>	√		√	
浪花银汉鱼 <i>Isoflosmaris</i>	√		√	
总计 total	20	3	33	5

注：“√”表示该物种在相应季节被检出。

Notes: "√" means the fish species was detected in the corresponding season.

<https://www.china-fishery.cn>

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

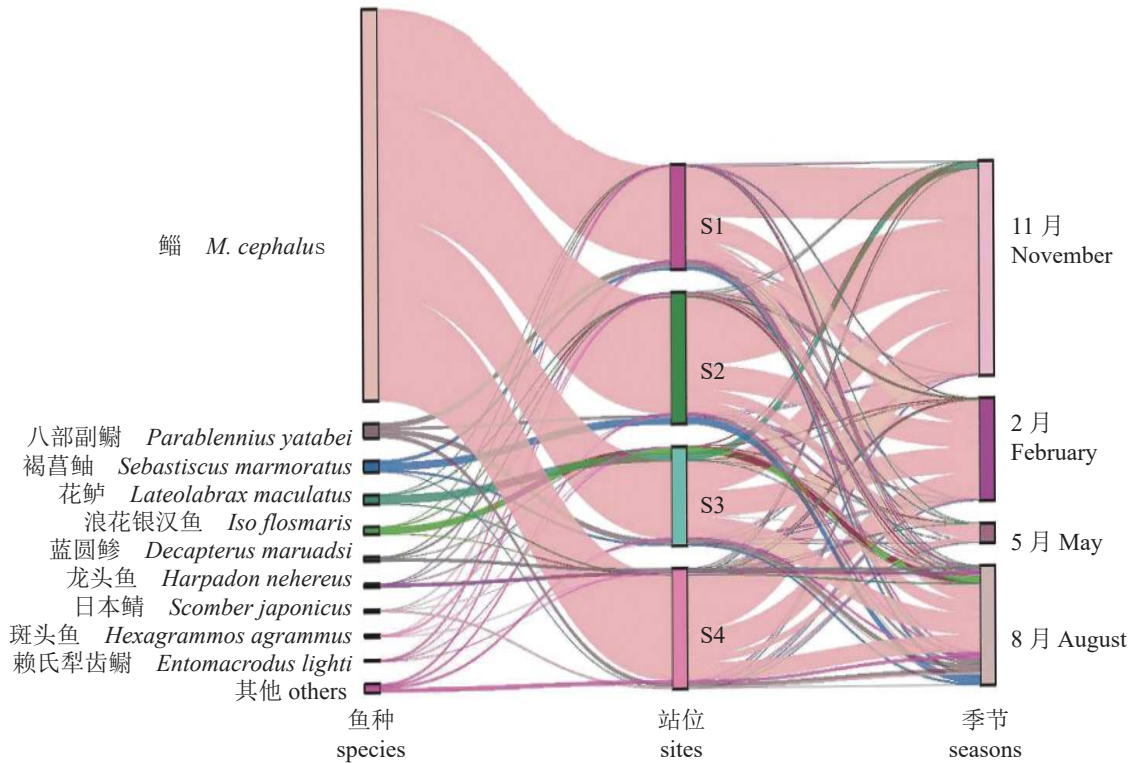


图2 前10位优势鱼种的时空组成

Fig. 2 Spatial and temporal composition patterns of the top 10 fish species

其 reads 数约占总 reads 数的 85.93%；其次是八部副鲷 (*Parablennius yatabei*)，reads 数约占总 reads 的 3.18%，在夏季和冬季所有站位被检出，是夏季的优势鱼种；褐菖鲈排第三，约占总 reads 的 2.50%，在 4 个站位中被检测出 10 次，是夏季优势种；之后是花鲈，约占 reads 的 2.09%，是秋季 (S3) 和冬季 (S2) 的优势鱼种；其余物种的 reads 占比均在 2.00% 以下。

### 2.3 鱼类群落结构的时空分布

在 NMDS 分析的二维排序图中 (图 3)，按采样站位和采样季节可将其各分为 4 个组群，不同的点在各组群中表示不同的样本，而样本在图中距离的远近代表鱼类群落组成的相似程度。NMDS 分析的结果显示，采样站位 (图 3-a) 的肋强系数为 0.102 3，采样季节 (图 3-b) 的肋强系数为 0.102 9，二者均在 0.1~0.2 范围内，因此可对排序结果进行解释。站位间排序点的距离相对较近且集中，说明站位间的群落组成差异不大；季节间排序点的距离相对分散，尤其是春季与其他 3 个季节的距离分散很明显，说明季节间群落组成差异较大。ANOSIM 检验结果表明，鱼类群落在站位间无显著差异 ( $R=-0.141$ ,  $P=0.994>0.05$ )，在季节间具有

极显著差异 ( $R=0.554$ ,  $P=0.001<0.01$ )。

### 2.4 鱼类群落多样性变化

物种多样性指数可作为反映环境变化对鱼类群落结构影响的指标。在本次调查的 4 个采样站位中，S2 站位检出的鱼种最多，为 20 种；其次是 S1 和 S4 站位，检出鱼种均为 19 种；最后是 S3 站位，检出 18 种鱼类。各样本在站位间的 Alpha 多样性指数均无显著差异 (图 4-a~c)，各项多样性指数显示，Chao1 指数的平均值为 7.19，在站位 S1 和 S2 出现最高值，高低值波动范围为 6.75~7.50；Shannon 指数的平均值为 0.452，最高值出现在 S3 站位，高低值波动范围为 0.369~0.482；Pielou 指数的平均值为 0.215，最高值出现在 S3 站位，高低值波动范围为 0.137~0.314。在季节间，Chao1 指数 (图 4-d) 和 Shannon 指数 (图 4-e) 在相邻的季节间均有显著差异 ( $P<0.05$ )，Pielou 指数 (图 4-f) 在春季、夏季和冬季间有显著差异 ( $P<0.05$ )。Chao1 指数在夏季出现最高值，高低值的波动范围为 2.50~14.25，平均值为 7.19。Shannon 指数在夏季出现最高值，高低值波动范围为 0.015~1.441，平均值为 0.452。均匀度为 0.016~0.545，平均值为 0.215，最高值在夏季。

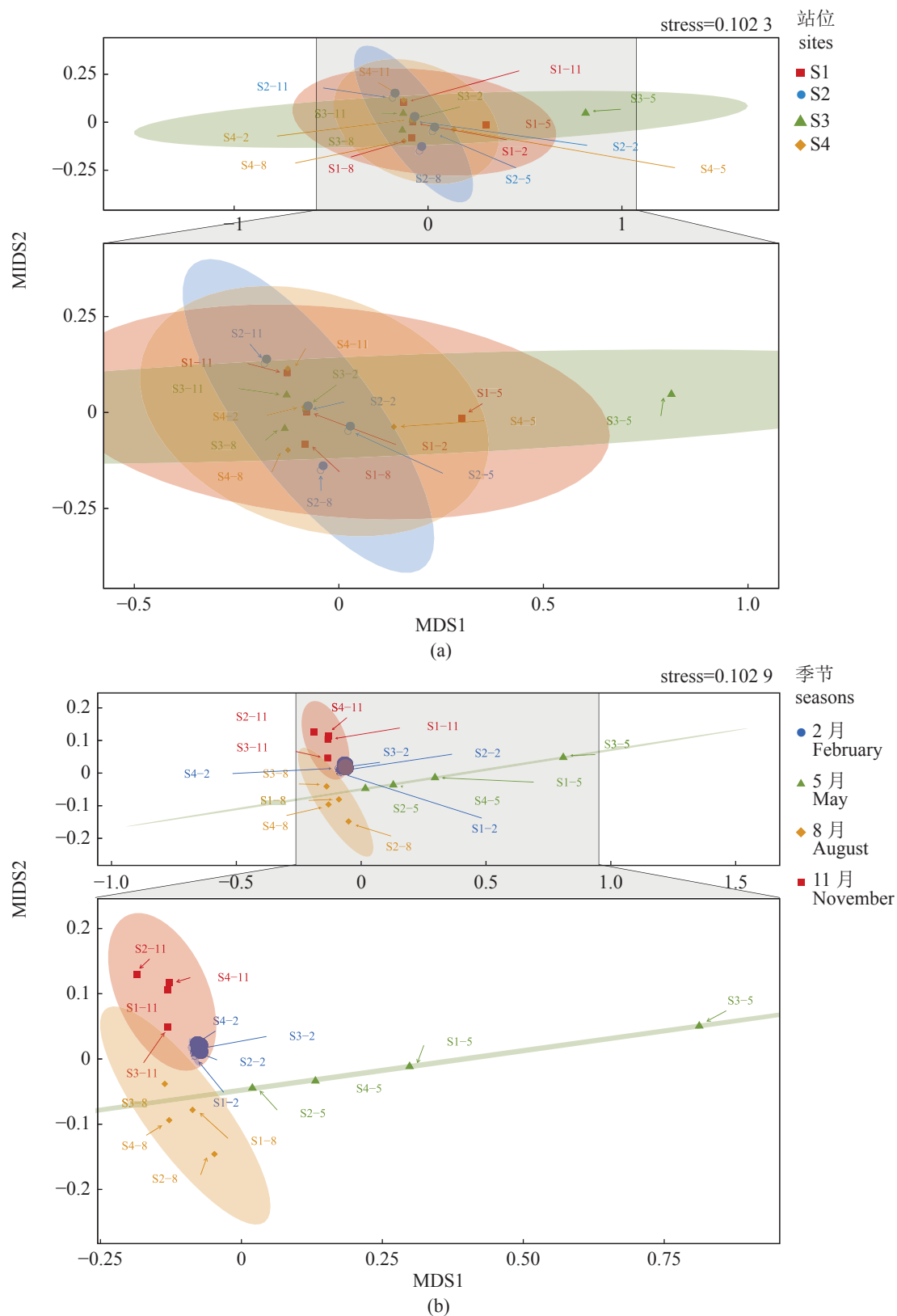


图3 鱼类群落结构的 NMDS 分析

(a) 站点, (b) 季节; 下同。

Fig. 3 NMDS analysis of fish community structure

(a) sites, (b) seasons; the same below.

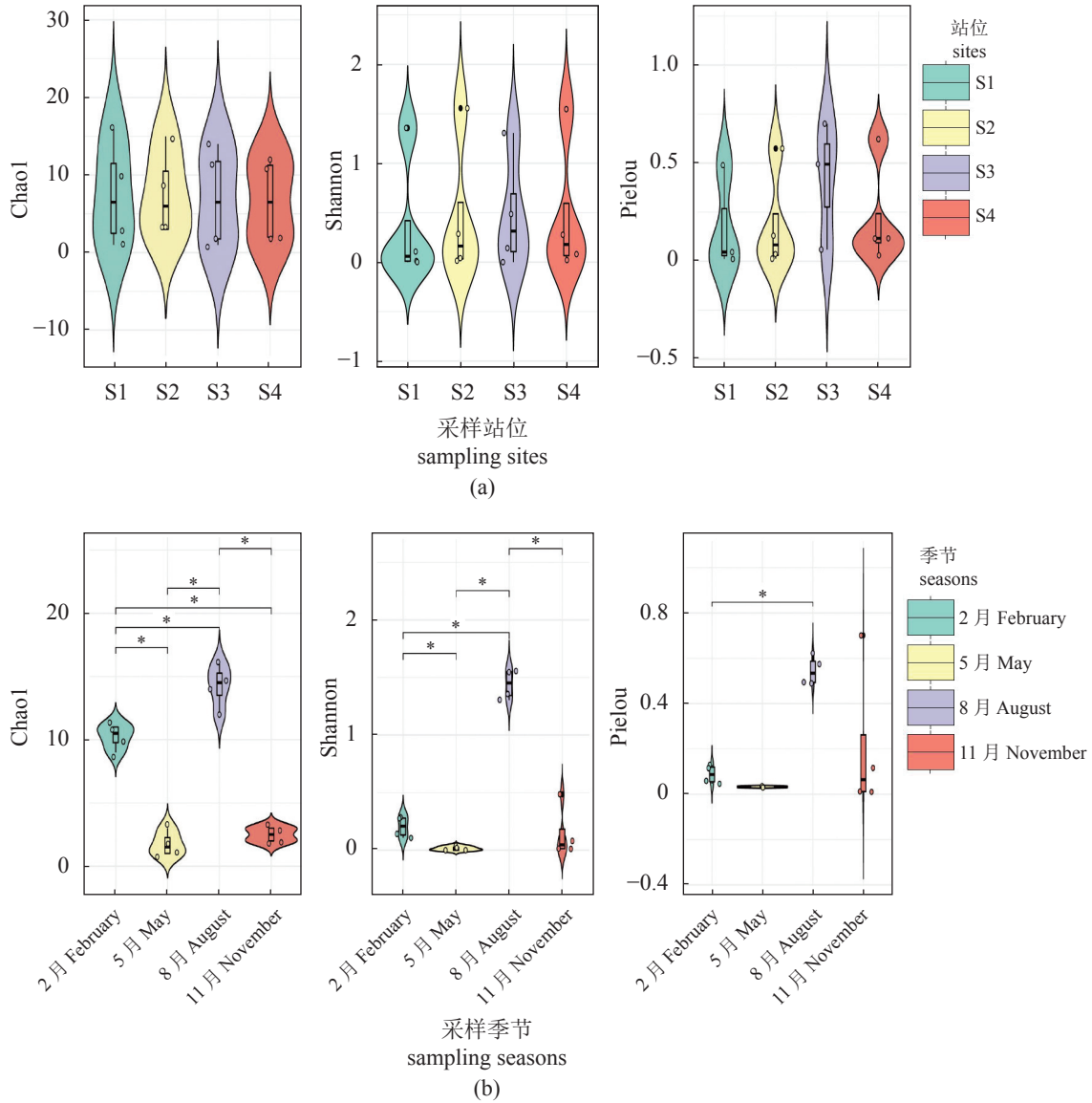


图 4 Alpha 多样性指数分析  
Fig. 4 Alpha diversity index analysis

### 3 讨论

#### 3.1 基于环境 DNA metabarcoding 的中街山列岛海域鱼类组成

基于分子生物学的快速发展和高通量测序技术的广泛应用, 运用环境 DNA metabarcoding 技术来表征鱼类的种类组成, 已经成为渔业资源调查的变革性工具<sup>[17,25-26]</sup>。本研究共鉴定出 37 个鱼类物种, 以鲈形目、鲷形目和鲱形目为主, 与前人在该海域进行拖网的结果相似<sup>[27]</sup>, 说明了环境 DNA metabarcoding 在鱼类生物多样性检测上具有适用性。本次调查检测到的海洋鱼类以鲷、八部

副鲈、褐菖鲈和花鲈为主, 而大黄鱼、小黄鱼等传统的经济鱼类检出频率较低, 这与赵淑江等<sup>[28]</sup>的观点一致, 曾经的主要海捕经济鱼类受人为大力捕捞和生境破坏等影响导致资源锐减, 大大降低了相关鱼种的环境 DNA 检出率。此外, 将 NCBI 数据库与本地建立的数据库结合分析发现, 本次调查检测出的小口鲈、紫红笛鲷、阔头深虾虎鱼均不在传统调查的常见鱼种内<sup>[29]</sup>。这可能是受采样地形和物种数量的影响, 在径流复杂的岩礁海区, 拖网等传统方式难以开展且不易获得稀有鱼种的样本, 而环境 DNA metabarcoding 技术在稀有种检出方面更具优势<sup>[30-31]</sup>。

### 3.2 鱼类物种的季节性变化

2014年梁君等<sup>[32]</sup>用刺网对中街山列岛的鱼类资源及群落多样性季节调查结果显示, 该海域不同季节的鱼类种类以夏季最多(38种), 春季(27种)和秋季(27种)相当, 冬季最少(22种); 本研究的调查则是夏季(33种)>冬季(20种)>秋季(5种)>春季(3种), 鱼类物种数量分布趋势与陆延等<sup>[33]</sup>在舟山邻近海域拖网调查的研究结果一致。与夏、冬季节的调查结果相比, 春、秋季节的鱼类种类数较少, 造成这种现象的原因一方面可能是春、秋季节的样本在进行环境 DNA metabarcoding 分析过程中被偶然污染, 为排除污染物种对分析结果的判断, 在进行 reads 数比对时, 实际环境样本监测到的 reads 数减去阴性对照中监测到的 reads 数为负值, 则剔除相对应的物种<sup>[24]</sup>, 从而导致了秋季和春季的检出鱼种较少。另一方面可能由于舟山近海海域泥沙含量高、水体浊度大, 其中含有大量的 PCR 抑制剂(腐殖酸等)会抑制 PCR 扩增和高通量建库测序分析, 使得结果产生偏差<sup>[34-37]</sup>。本研究的优势鱼类物种鲷、八部副鲷、褐菖鲉、花鲈、日本鲭、海鳗和蓝圆鲹均出现在 2 个季节以上, 且序列丰度较高。而汪洋等<sup>[10]</sup>在中街山列岛以延绳钓和流刺网方式调查的优势种为花鲈、小黄鱼、黑鲷、星康吉鳗(*Conger myriaster*)、黄姑鱼(*Nibea albiflora*)、褐菖鲉、海鳗、赤鼻棱鳀、鲩(*Miichthys miiuy*)、鲷。在本次调查中鲷为绝对优势种, 这可能与该海域鲷本身数量多且是中上层鱼类有关<sup>[11]</sup>, 还可能与环境 DNA metabarcoding 的引物偏好有关<sup>[38]</sup>。

### 3.3 鱼类群落结构时空格局与多样性分析

结合 NMDS 分析和 ANOSIM 检验的结果显示, 鱼类群落在不同站位的种类分布差异较小, 表明不同栖息环境对中街山列岛鱼类组成格局影响不大, 也可能与本次调查设置的采样站位较少且集中有关。同时, ANOSIM 检验显示, 鱼类群落在不同季节有显著性差异, 说明该海域鱼类群落组成更依赖于整片海域大环境, 且受季节变化影响更大, 这一结论与俞存根等<sup>[39]</sup>提出的舟山渔场及邻近海域的鱼类以洄游性种类或季节性种类为主的结论一致。本研究中采样站位间的 Alpha 多样性指数虽无明显差异, 但在序列丰度水平和鱼类种类水平上仍揭示了细微的空间分布差异。采样季节间的 Alpha 多样性指数分析显示, 本次

调查的鱼类物种丰富度、多样性和均匀度均在夏季最高, 这可能与夏季是长江口径流量最大的季节, 饵料生物在该季节繁殖生长, 而中街山列岛所在海域正处长江口延伸带, 是良好的幼鱼成育场所<sup>[5,11,40]</sup>。

### 3.4 环境 DNA metabarcoding 技术在鱼类生物多样性调查上的潜力

环境 DNA metabarcoding 无疑是一种高效评估海洋生物多样性的新方法, 不仅克服了传统调查耗时费力、对物种栖息地破坏大、对捕捞的物种有选择性等弊端, 还可对现有的调查和生物多样性评估进行补充<sup>[41-43]</sup>。本研究中, 环境 DNA metabarcoding 技术的调查结果与传统调查相似性较高, 进一步说明了其在鱼类生物多样性调查上的可靠性, 且与目标物种无接触, 充分展现了对目标物种及其生境友好的优势, 有利于海洋生态系统的恢复。然而, 环境 DNA metabarcoding 只能从环境样本的遗传信息来识别物种的存在, 而不能对目标物种的生理状态、年龄结构以及种群大小等做出判断<sup>[44]</sup>, 且环境 DNA 在水体环境中停留时间有限<sup>[45-46]</sup>。此外, 环境 DNA metabarcoding 依赖于分子数据库的完整, 可能会导致假阴性<sup>[47]</sup>, 如皮氏叫姑鱼(*Johnius belangerii*)<sup>[32]</sup>、鲩<sup>[10]</sup>等拖网常见的鱼种在本次调查中可能存在假阴性而没有被检测出。因此, 环境 DNA metabarcoding 技术并不能完全取代传统调查, 但可作为传统调查强有力的补充工具, 减少人为对生态系统的干扰, 缩短调查周期, 降低调查成本<sup>[26]</sup>。同时, 通过将不同类型水体中的环境 DNA 降解率与潮汐流的海洋学模型相结合, 将有可能预测海洋生物的分布概率; 或结合声学和水下视频监控等方式, 来设置更有利于研究鱼类多样性的采样站位, 从而提高环境 DNA 中目标物种的检出率<sup>[48-49]</sup>, 以此改进环境 DNA 检测的不足, 为准确制定有效的鱼类多样性保护政策提供技术支撑。

## 4 总结

本次调查基于环境 DNA metabarcoding 技术检测出中街山列岛近岸海区的鱼类物种数, 分析了鱼类多样性时空变化规律, 证明了环境 DNA metabarcoding 技术在鱼类多样性检测方面的潜力, 同时为中街山列岛的增殖放流工作和生物多样性的管理、保护提供了技术支撑。



感谢日本神户大学人间发达环境学研究科源利文教授实验室邱倩倩博士和吴卢汉帮助获得实验数据。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

### 参考文献 (References):

- [ 1 ] Oliver T H, Heard M S, Isaac N J B, *et al.* Biodiversity and resilience of ecosystem functions[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2015, 30(11): 673-684.
- [ 2 ] 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.
- [ 3 ] 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.  
Li X L, Liu Y, Wang C C, *et al.* Study on fish species diversity in the East China Sea in summer based on environmental DNA technology[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2022, 44(4): 74-84 (in Chinese).
- [ 4 ] 于南京, 俞存根, 许永久, 等. 舟山群岛外海域春秋季节鱼类群落结构及生物多样性[J]. *水产学报*, 2021, 45(8): 1374-1383.  
Yu N J, Yu C G, Xu Y J, *et al.* Fish community structure and biodiversity in the offshore waters of Zhoushan Islands in spring and autumn[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2021, 45(8): 1374-1383 (in Chinese).
- [ 5 ] 梁君, 徐汉祥, 王伟定. 中街山列岛海洋保护区鱼类物种多样性[J]. *生态学报*, 2013, 33(18): 5905-5916.  
Liang J, Xu H X, Wang W D. Fish species diversity in Zhongjieshan Islands marine protected area (MPA)[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33(18): 5905-5916 (in Chinese).
- [ 6 ] 徐开达, 张洪亮, 谢汉阳, 等. 中街山列岛水域甲壳类资源及其群落多样性[J]. *海洋渔业*, 2012, 34(3): 308-315.  
Xu K D, Zhang H L, Xie H Y, *et al.* Resource density and community diversity of crustaceans in the waters of Zhongjieshan Islands[J]. *Marine Fisheries*, 2012, 34(3): 308-315 (in Chinese).
- [ 7 ] 张龙, 徐开达, 张洪亮, 等. 中街山海域渔业动物群落结构的季节变化[J]. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2012, 31(4): 290-294.  
Zhang L, Xu K D, Zhang H L, *et al.* Seasonal variety of fishery biology community structure in Zhongjieshan Sea[J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2012, 31(4): 290-294 (in Chinese).
- [ 8 ] 刘坤, 俞存根, 郑基, 等. 舟山群岛东侧海域春秋季节主要鱼类空间生态位及其分化[J]. *中国水产科学*, 2021, 28(1): 100-111.  
Liu K, Yu C G, Zheng J, *et al.* The spatial niche and differentiation of major fish species in the waters east of the Zhoushan Islands in spring and autumn[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(1): 100-111 (in Chinese).
- [ 9 ] Xu Y, Ma L, Sun Y, *et al.* Spatial variation of demersal fish diversity and distribution in the East China Sea: impact of the bottom branches of the Kuroshio Current[J]. *Journal of Sea Research*, 2019, 144: 22-32.
- [ 10 ] 汪洋, 吴常文. 中街山列岛岩礁海域鱼类群落多样性研究[J]. *海洋与湖沼*, 2015, 46(4): 776-785.  
Wang Y, Wu C W. Fish community diversities in reef waters of Zhongjieshan islands[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(4): 776-785 (in Chinese).
- [ 11 ] 陈炼, 吴琳, 刘燕, 等. 环境DNA metabarcoding及其在生态学中的应用[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).
- [ 12 ] 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.
- [ 13 ] Seymour M, Durance I, Cosby B J, *et al.* Acidity promotes degradation of multi-species environmental DNA in lotic mesocosms[J]. *Communications Biology*, 2018, 1: 4.
- [ 14 ] 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]. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2018, 37(1): 1-7.  
Gao T X, Chen Z, Wang X Y. Environmental DNA, a new method for fish diversity investigation in the coastal waters[J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2018, 37(1): 1-7 (in Chinese).
- [ 15 ] 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.
- [16] Pilliod D S, Goldberg C S, Arkle R S, *et al.* Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2013, 70(8): 1123-1130.
- [17] 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.
- [18] Kelly R P, Port J A, Yamahara K M, *et al.* Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm[J]. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86175.
- [19] Seymour M, Edwards F K, Cosby B J, *et al.* Executing multi-taxa eDNA ecological assessment via traditional metrics and interactive networks[J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 729: 138801.
- [20] Dejean T, Valentini A, Miquel C, *et al.* Improved detection of an alien invasive species through environmental DNA barcoding: the example of the American bullfrog *Lithobates catesbeianus*[J]. *Journal of Applied Ecology*, 2012, 49(4): 953-959.
- [21] Kelly R P, Port J A, Yamahara K M, *et al.* Harnessing DNA to improve environmental management[J]. *Science*, 2014, 344(6191): 1455-1456.
- [22] Wang X Y, Zhang H B, Lu G Q, *et al.* Detection of an invasive species through an environmental DNA approach: the example of the red drum *Sciaenops ocellatus* in the East China Sea[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 815: 152865.
- [23] 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.
- [24] Wu Q Q, Sakata M K, Wu D Y, *et al.* Application of environmental DNA metabarcoding in a lake with extensive algal blooms[J]. *Limnology*, 2021, 22(3): 363-370.
- [25] Bylemans J, Furlan E M, Hardy C M, *et al.* An environmental DNA-based method for monitoring spawning activity: a case study, using the endangered Macquarie perch (*Macquaria australasica*)[J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2017, 8(5): 646-655.
- [26] Rey A, Carney K J, Quinones L E, *et al.* Environmental DNA metabarcoding: a promising tool for ballast water monitoring[J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(20): 11849-11859.
- [27] Zhou S, Fan C R, Xia H M, *et al.* Combined use of eDNA metabarcoding and bottom trawling for the assessment of fish biodiversity in the Zhoushan Sea[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2022, 8: 809703.
- [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*, 2016, 59(2): 223-235.
- Zhao S J, Lü B Q, Li R W, *et al.* A preliminary analysis of fishery resource exhaustion in the context of biodiversity decline[J]. *Science China:Earth Sciences*, 2016, 59(2): 223-235 (in Chinese).
- [29] Liang J, Wang W D, Xu H X, *et al.* Diel and seasonal variation in fish communities in the Zhongjieshan marine island reef reserve[J]. *Fisheries Research*, 2020, 227: 105549.
- [30] Balasingham K D, Walter R P, Mandrak N E, *et al.* Environmental DNA detection of rare and invasive fish species in two Great Lakes tributaries[J]. *Molecular Ecology*, 2018, 27(1): 112-127.
- [31] Ficetola G F, Miaud C, Pompanon F, *et al.* Species detection using environmental DNA from water samples[J]. *Biology Letters*, 2008, 4(4): 423-425.
- [32] 梁君, 王伟定, 虞宝存, 等. 中街山列岛海洋保护区岛礁生境鱼类资源及群落多样性季节性变化[J]. *海洋与湖沼*, 2014, 45(5): 979-989.
- Liang J, Wang W D, Yu B C, *et al.* Seasonal variations of fish resources and community diversity of reef habitat in marine protected area of Zhongjieshan Islands[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2014, 45(5): 979-989 (in Chinese).
- [33] 陆延, 牛威震, 程爱勇, 等. 舟山岛北部海域鱼类群落结构及其生物多样性[J]. *大连海洋大学学报*, 37(6): 1022-1031.
- Lu Y, Niu W Z, Cheng A Y, *et al.* Fish community structure and biodiversity in the northern sea area of Zhoushan island[J]. *Journal of Dalian Ocean University*, 37(6): 1022-1031. (in Chinese)
- [34] Deiner K, Altermatt F. Transport distance of invertebrate environmental DNA in a natural river[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e111111.

- 2014, 9(2): e88786.
- [35] Faber K L, Person E C, Hudlow W R. PCR inhibitor removal using the NucleoSpin® DNA Clean-Up XS kit[J]. *Forensic Science International: Genetics*, 2013, 7(1): 209-213.
- [36] Herrera A, Cockell C S. Exploring microbial diversity in volcanic environments: a review of methods in DNA extraction[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2007, 70(1): 1-12.
- [37] Rodríguez-Mejía J L, Martínez-Anaya C, Folch-Mallol J L, *et al.* A two-step electro dialysis method for DNA purification from polluted metallic environmental samples[J]. *Electrophoresis*, 2008, 29(15): 3239-3244.
- [38] Deiner K, Walser J C, Mächler E, *et al.* Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA[J]. *Biological Conservation*, 2015, 183: 53-63.
- [39] 俞存根, 陈全震, 陈小庆, 等. 舟山渔场及邻近海域鱼类种类组成和数量分布[J]. *海洋与湖沼*, 2010, 41(3): 410-417.
- Yu C G, Chen Q Z, Chen X Q, *et al.* Species composition and quantitative distribution of fish in the Zhoushan Fishing Ground and its adjacent waters[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2010, 41(3): 410-417 (in Chinese).
- [40] 汪振华, 章守宇, 陈清满, 等. 马鞍列岛岩礁生境鱼类群落生态学. I. 种类组成和多样性[J]. *生物多样性*, 2012, 20(1): 41-50.
- Wang Z H, Zhang S Y, Chen Q M, *et al.* Fish community ecology in rocky reef habitat of Ma'an Archipelago. I. Species composition and diversity[J]. *Biodiversity Science*, 2012, 20(1): 41-50 (in Chinese).
- [41] Closek C J, Santora J A, Starks H A, *et al.* Marine vertebrate biodiversity and distribution within the central California current using environmental DNA (eDNA) metabarcoding and ecosystem surveys[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2019, 6: 732.
- [42] Jerde C L, Mahon A R, Chadderton W L, *et al.* "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA[J]. *Conservation Letters*, 2011, 4(2): 150-157.
- [43] Song J W, Small M J, Casman E A. Making sense of the noise: the effect of hydrology on silver carp eDNA detection in the Chicago area waterway system[J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 605-606: 713-720.
- [44] 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.
- [45] Jo T, Murakami H, Yamamoto S, *et al.* Effect of water temperature and fish biomass on environmental DNA shedding, degradation, and size distribution[J]. *Ecology and Evolution*, 2019, 9(3): 1135-1146.
- [46] Collins R A, Wangenstein O S, O'Gorman E J, *et al.* Persistence of environmental DNA in marine systems[J]. *Communications Biology*, 2018, 1: 185.
- [47] Duarte S, Vieira P E, Lavrador A S, *et al.* Status and prospects of marine NIS detection and monitoring through (e)DNA metabarcoding[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 751: 141729.
- [48] Sansom B J, Sassoubre L M. Environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates to model freshwater mussel eDNA transport in a river[J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(24): 14244-14253.
- [49] Jones D T, Wilson C D, De Robertis A, *et al.* Evaluation of rockfish abundance in untrawlable habitat: combining acoustic and complementary sampling tools[J]. *Fishery Bulletin*, 2012, 110(3): 332-343.

## Fish species diversity in the Zhongjieshan Islands based on environmental DNA metabarcoding

ZHONG Lanping<sup>1</sup>, GAO Tianxiang<sup>2</sup>, ZHANG Haobo<sup>1</sup>, CHEN Zhi<sup>3</sup>, WANG Xiaoyan<sup>1\*</sup>

(1. National Engineering Research Center of Marine Facilities Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;

2. School of Fishery, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;

3. College of Fisheries and Life Science, Hainan Tropical Ocean University, Sanya 572022, China)

**Abstract:** Rocky reef habitats are critical for supporting exceptionally high fish species diversity, a vital element of biodiversity. However, monitoring fish species in these habitats using traditional fisheries resource survey methods poses significant challenges. Therefore, there is an urgent need to develop sensitive and efficient methods for biodiversity monitoring. Four sampling stations were strategically selected around the Miaozihu Islands within the Zhongjieshan archipelago, and surface seawater samples were collected across four seasons (February, May, August and November in 2019). The spatial and temporal distribution of fish was analyzed using environmental DNA metabarcoding technology. The findings revealed a total of 37 fish species across 10 orders 26 families 36 genera. The seasonal abundance of fish species followed a trend of summer > winter > autumn > spring. Remarkably, only 2 fish species were observed in all four seasons, representing approximately 5.41% of the total species count, while 54.05% of the species were detected in a single season only. The non-metric multidimensional scaling (NMDS) analysis and the analysis of similarities (ANOSIM) test indicated significant variation in fish composition among seasons ( $P < 0.05$ ), but not among stations. The fish community's uniformity remained relatively stable. Although the diversity and richness indices did not exhibit significant differences among stations, they peaked in summer and troughed in spring. Overall, the distribution of fish in the coastal waters of the Zhongjieshan Islands is significantly influenced by the seasonal changes rather than station locations. This study introduces an innovative, environmentally friendly approach to fish diversity assessment in marine environments akin to those of the Zhoushan islands and reefs, offering valuable technical insights for the management and conservation of fisheries resources.

**Key words:** fish; environmental DNA metabarcoding; species diversity; Zhongjieshan Islands

**Corresponding author:** WANG Xiaoyan. E-mail: [wangxiaoyan@zjou.edu.cn](mailto:wangxiaoyan@zjou.edu.cn)

**Funding projects:** Zhejiang Provincial Key Research and Development Program (2021C02047); National Natural Science Foundation of China (41806180)