



基于环境 DNA metabarcoding 的舟山及其邻近海域 鱼类空间分布格局的初步研究

张浩博¹, 王晓艳¹, 陈治², 钟兰萍¹, 高天翔^{3*}

(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. 海南热带海洋学院水产与生命学院, 海南 三亚 572022;

3. 浙江海洋大学水产学院, 浙江 舟山 316022)

摘要: 为了解舟山及其邻近海域主要鱼类群落的种类组成, 监测和保护其多样性, 本研究于 2019 年 5 月在舟山及其邻近海域 9 个站位共采集了 27 个水样, 采用环境 DNA (environmental DNA, eDNA) metabarcoding 技术确定了各站位鱼类群落组成和生物多样性。结果显示, 舟山及其邻近海域共检出 52 种鱼类, 隶属于 18 目 37 科 49 属, 有 4 种鱼类仅注释到属级分类阶元。其中, 鲈形目和鲭形目占比最高, 分别为 28.85% 和 15.38%, 不同海域优势种存在较大差异。多样性 (Shannon 指数、Simpson 指数和 Pielou 指数) 表现趋势基本相同, 均表现为舟山近海海域>长江河口海域>舟山外海海域。各鱼种 eDNA 在不同水层变化趋势大致可以分为 3 种, 且多数鱼种序列丰度在水层间的变化趋势与其栖息水层偏好高度吻合。此外, 通过与其他学者的研究结果进行比较分析, 发现同一时间相同海域的 eDNA metabarcoding 研究结果差异较大, 表明目前 eDNA 技术仍不能完全替代传统调查方法。未来可以将 eDNA metabarcoding 技术作为一种辅助手段应用于渔业资源监测, 提高检测效率并减少对生态系统的干扰。本研究可为岛礁海域的鱼类群落调研提供新的思路和方法。

关键词: 海洋鱼类; 环境 DNA metabarcoding; 生物多样性; 空间分布; 舟山近海; 岛礁海域

中图分类号: S 932.4

文献标志码: A

海洋生物多样性控制着最基本的海洋生态过程和功能, 同时也维持着海洋生态系统的稳定^[1]。阐明海洋生物多样性与海洋生态系统之间的关系依赖于准确了解和掌握海洋生物多样性的时空分布。因此, 监测和了解海洋生物多样性的时空分布是保护海洋生物资源和生态系统健康的前提, 也是海洋可持续发展的基础^[2]。

传统的渔业资源调查广泛采用拖网捕捞^[3]。然而, 使用拖网进行鱼类调查取决于渔具自身的特征 (如网目大小、开口面积) 和拖网速度、深度等相关参数^[4], 这使得拖网捕鱼在很大程度上具

有选择性, 从而影响鱼类多样性的监测结果^[5]。此外, 光学 (水下目视普查) 和声学 (声呐雷达) 等其他鱼类调查方法也存在入侵性、费时、费力、成本高和分析难度较大等问题^[6]。鉴于传统调查方式的诸多弊端, 亟需开发简单、迅速且准确的鱼类物种多样性调查新方法。

环境 DNA 技术的发展和应用于生态和生物多样性监测提供了全新的手段。相比传统调查方式, 环境 DNA 技术更省时、经济、环保, 已被应用于海洋生物时空分布监测和生物群落评估^[7-8]。早期环境 DNA 技术使用物种特异性分子标记的方

收稿日期: 2022-07-27 修回日期: 2022-11-01

资助项目: 国家自然科学基金 (41806180, 41976083); 浙江省重点研发计划项目 (2021C2047)

第一作者: 张浩博 (照片), 从事渔业资源追踪监测研究, E-mail: z1393679095@163.com

通信作者: 高天翔, 从事渔业生态学研究, E-mail: gaotianxiang0611@163.com



法对单一物种进行监测^[9-11]。然而当监测调查对象扩展至多个类群时, 这种有针对性的方法会变得昂贵且耗时。通用引物与高通量测序技术相结合形成的 eDNA metabarcoding 技术为从多个目标类群中扩增 eDNA 提供了便利^[12-13]。目前 eDNA metabarcoding 已在诸多水生生态系统中被广泛应用^[2,14-16], 然而国内使用 eDNA metabarcoding 技术进行研究的区域主要集中在河流、湖泊、河口以及港口等封闭水域和半封闭水域^[17-21], 关于岛礁海域的应用鲜有研究^[22]。

舟山群岛位于浙江东北部海域, 由 2 085 个岛屿组成, 是我国最大的群岛。由于其地处长江、钱塘江、甬江和台湾暖流的交汇区, 从而形成了独特复杂的水文环境, 为鱼类提供了丰富的营养来源和适宜的栖息环境^[23-24], 在此也形成了我国最大的近海渔场——舟山渔场。但由于过度捕捞、各类海岸工程的建设以及人类活动造成的环境污染, 该海域的生态系统正面临巨大的威胁^[25-27]。然而, 在岛礁密布的舟山海域通常无法开展鱼类多样性拖网调查, 因此极大限制了鱼类多样性的常规监测^[28]。

本实验以舟山及其邻近海域作为研究区域,

采用 eDNA metabarcoding 技术进行鱼类多样性监测。通过不同海域、不同水层的鱼类物种组成分析, 评估不同海域鱼类多样性差异, 探究舟山及其邻近海域鱼类群落的分布格局。此外, 通过对比其他学者的研究结果, 探讨 eDNA metabarcoding 技术在评估鱼类群落组成方面存在的问题, 为舟山及其邻近海域渔业资源管理和可持续利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

调查时间为 2019 年 5 月 (春季), 研究区域为 121.50°E~125.90°E, 29.54°N~32.34°N, 根据采样点所处海域将其划分为 3 个区域——A (长江河口海域)、B (舟山近海海域) 和 C (舟山外海海域)。根据实测深度, 共采集了 9 个站位共 27 个水样 (图 1), 使用带有 SBE 911 Plus CTD 系统 (Sea-Bird Scientific, 美国) 的 Niskin 瓶 (24×20 L) 在不同水层采集海水样品, 随后将其储存在无菌一次性塑料袋 (3.5 L) 中, 同时以等量商业纯净水 (杭州娃哈哈集团有限公司) 作为采集样品的阴性对照。使

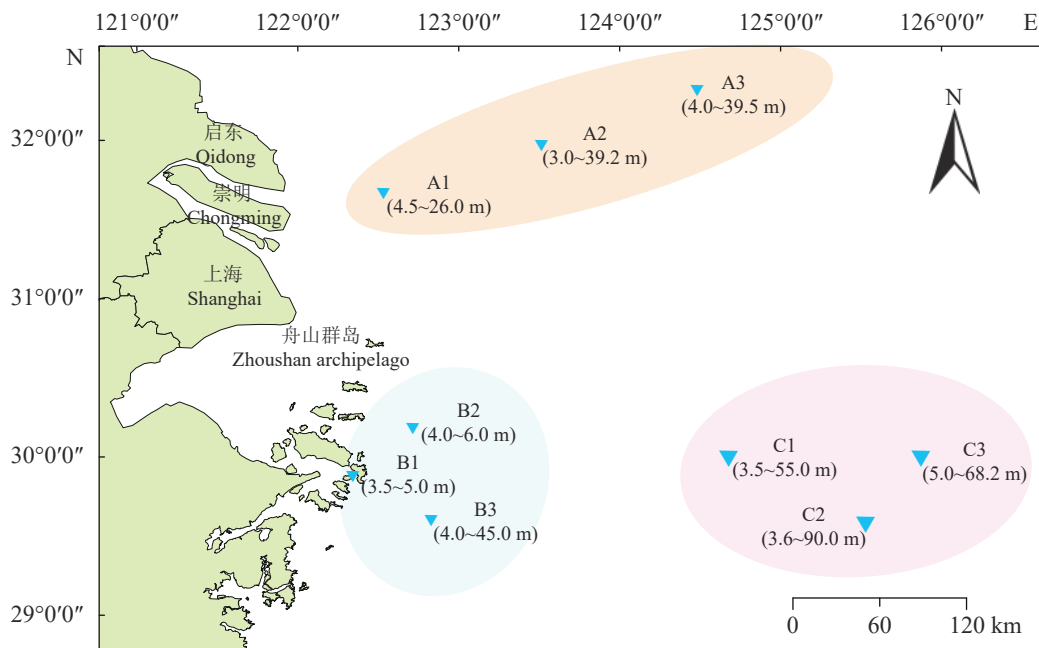


图 1 2019 年 5 月舟山及其邻近海域各采样站位分布图及采样水深范围

蓝色三角图标代表采样点; 括号内为采样深度; 不同海域用不同颜色的椭圆形区分, A. 长江河口海域, B. 舟山近海海域, C. 舟山外海海域。

Fig. 1 Distribution map and sampling depth range of each station in Zhoushan and its adjacent waters in May 2019

The blue triangle icon indicates the sampling sites; the sampling depth in brackets; different sea areas are distinguished by different coloured ovals, A. Yangtze River estuary sea area, B. Zhoushan coastal waters, C. Zhoushan offshore sea area.

用 0.45 μm 孔径玻璃过滤器 (上海兴亚净化材料厂) 对海水进行真空抽滤富集 eDNA, 每个水样抽滤 1.5 L, 同时抽滤等量纯净水作为阴性对照。为减少交叉污染, 每个样品抽滤前后均将过滤设备在 10% 次氯酸钠 (漂白剂) 溶液中浸泡 15 min 消毒, 然后用自来水彻底冲洗, 最后使用商业纯净水进行冲洗。每个样品使用单独的一次性手套, 抽滤全程佩戴口罩。将滤膜包裹在铝箔纸中, 放入 2 mL 冻存管 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司] 中, 并在 -196°C 的液氮中储存。

1.2 PCR 扩增及高通量测序

将滤膜冷冻保存并运至日本神户大学人间发达环境学研究科源利文教授实验室, 参考 Wu 等^[29] 进行总 eDNA 提取、eDNA 浓度测定、扩增子文库构建和高通量测序。选择鱼类通用引物 MiFish-U/E^[30] 进行 PCR 扩增, 采用两步 PCR 法获得线粒体 12S *rRNA* 扩增子文库^[29]。PCR 反应体系 12 μL : 6.0 μL 2 \times KAPA HiFi Hot Start Ready Mix (KAPA Biosystems, Wilmington, MA, 美国), 正、反向引物各 1.0 μL , 模板 1.0 μL , ddH₂O 补齐至 12 μL 。扩增条件: 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 3 min, 98 $^\circ\text{C}$ 变性 20 s, 65 $^\circ\text{C}$ 退火 15 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 15 s, 共 40 次循环, 72 $^\circ\text{C}$ 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 的总反应体系与第一次体系相同, 热循环条件为 95 $^\circ\text{C}$ 3 min, 98 $^\circ\text{C}$ 20 s, 72 $^\circ\text{C}$ 20 s, 共计 12 次循环, 72 $^\circ\text{C}$ 孵育 5 min。每个样品设置 3 个生物学重复, 并用 ddH₂O 作为阴性对照。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, 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 i1 试剂盒 (Illumina, 美国) 对文库进行 2×150 bp 双端测序。

使用 MiFish pipeline^[31] 对下机数据进行质控。将高质量序列最终聚成的可操作分类单元 (operational taxonomic unit, OTU) (按照 98% 进行聚类) 与 MiFish Database 进行比对注释并进行人工校对。统计不同分类水平的物种数量和序列数量, 计算物种序列的相对丰度 (物种序列数除以总序列数)。基于各采样点的鱼种序列丰度进行后续分析。 α 多样性分析与非度量多维尺度分析 (Non-metric multidimensional scaling, NMDS) 均使用 R 软件

(4.1.2) 中的 vagan 包。其中 α 多样性分析参数设置为默认值, NMDS 分析基于 Bray-curtis 距离, 预先设定 4 个轴 ($k=4$) 进行排序。使用 ggplot2 包、ggpubr 包和 ggbiplot 包对上述结果进行可视化。使用 ggstream 包绘制鱼种 eDNA 相对丰度在不同水层变化趋势流程图。

2 结果

2.1 物种注释及其分类学地位

所有样品共检测出 52 种鱼类, 隶属于 18 目 36 科 49 属, 其中有 4 种鱼类仅注释到属级分类阶元 (图 2)。鲈形目和鲭形目占比最高, 分别为 28.85% 和 15.38%, 其次是鲹形目、鲀形目和仙女鱼目, 而鲱形目、颌针鱼目、刺鱼目、鲛鰈目和鲾形目所占比例较小。图 2-c 展示了各物种种类和物种序列丰度。主要优势种为日本鲭、日本鳀、七星底灯鱼、少鳞鳢、褐菖鲈、多棘腔吻鲈、龙头鱼、蓝圆鲈和银腰犀鲈。

通过查询数据库并查阅文献获得鱼种的栖息水层偏好, 将鱼种分为中表层鱼类、中下层鱼类和底层鱼类。其中下层鱼类最多, 约占所有鱼类的 55%, 主要为少鳞鳢、褐菖鲈、多棘腔吻鲈、银腰犀鲈等。中表层鱼类代表鱼种为日本鳀、日本鲭、七星底灯鱼、龙头鱼、刺鲳和蓝点马鲛。底层栖息鱼类种类最少, 包括秋刀鱼和前鳞鲛。图 2-e 显示了各鱼种在不同水层序列占比。

利用 FishBase 数据库中鱼类营养级评分将鱼类营养等级分为高级 (H)、中级 (M) 和低级 (L)。其中高营养级鱼类为肉食性鱼类, 处于高营养级的鱼种包括褐菖鲈、多棘腔吻鲈、龙头鱼、大泷六线鱼和黄鲛鰈等。中营养级鱼类主要为日本鲭、日本鳀、七星底灯鱼、少鳞鳢和蓝圆鲈等以浮游动物、桡足类为食物的鱼种。低营养级为植食性鱼类, 包括前鳞鲛、斑点肩鳃鲷、鲹和鲛。

2.2 不同海域鱼种分布情况

图 2-f 显示了鱼种在 3 个不同区域序列数的占比情况。鱼类数目在舟山外海海域较多 (C, 29 种), 主要优势种为日本鲭、日本鳀、少鳞鳢、多棘腔吻鲈、银腰犀鲈、大泷六线鱼、黄鲛鰈、短鰈齿鱼、斑鳍钝尾虾虎鱼和蓝点马鲛。舟山近海海域 (B) 和长江河口海域 (A) 检出鱼种数均为 23 种。前者主要优势种为日本鳀、日本鲭、龙头鱼、鲹、蓝圆鲈、刺鲳、花鲈、海鳗和东方狐鲣。

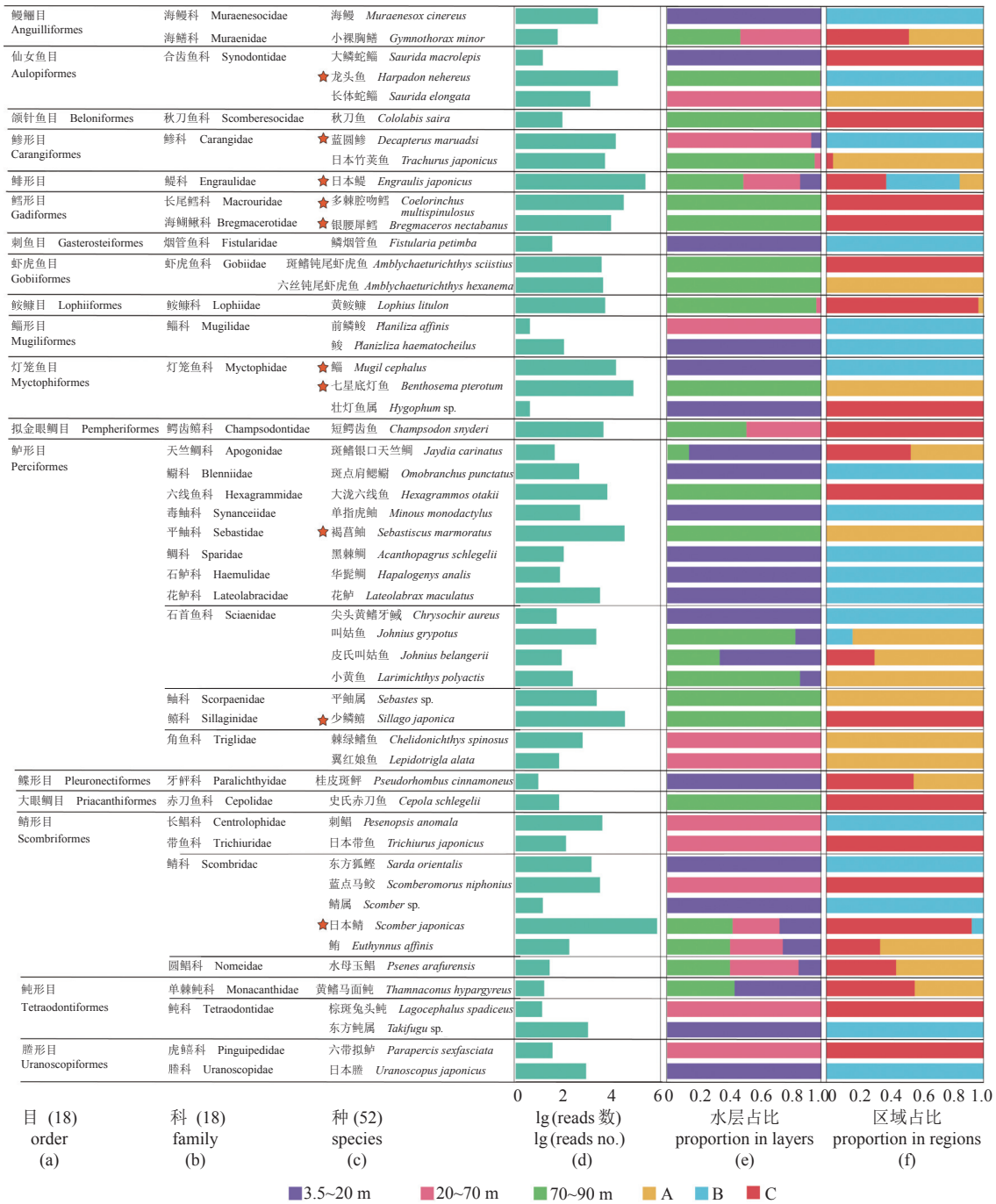


图 2 各鱼种在不同海域和水层的 eDNA 丰度和分布情况

(a)-(c) 为各鱼种分类学地位; (d) 列为对数变换后的 reads 数; (e) (f) 两列分别表示鱼种 eDNA 在不同水层和不同区域的占比; reads 数最多的前 10 鱼种用红星标识。

Fig. 2 eDNA abundance and distribution of each fish species in different sea areas and layers

(a)-(c) show the taxonomic lineages of each species; (d) the log-transformed number of species reads; (e) (f) indicate the proportion of species in different layers and in different regions, respectively; red star signs for the top 10 fish species with the most reads.

后者主要优势种为七星底灯鱼、日本鲱、褐菖鲈、日本竹荚鱼、六丝钝尾虾虎鱼、叫姑鱼、长体蛇鲻、棘绿鲷、日本鲱、小黄鱼和黄鲛。各海域中共有和特有鱼种数如图 3-a 所示, A 区和 C

区检出鱼种较为相似, 为 11 种。A、B、C 3 个海域共有鱼种为日本鲱、日本鲱和龙头鱼。A 区、B 区相较于 C 区洄游鱼类占比较少。B 区鱼类营

基于 NMDS 分析, 用二维排序图描述了不同海域群落结构 (图 4)。图中不同颜色或形状的点代表不同海域的样本点, 两样本点越接近, 表明两样本组成越相似。NMDS 分析 Stress 值为 0.013, 远小于 0.2, 说明 NMDS 分析可以准确反映样品间的差异程度。由图可知 A 海域和 C 海域鱼种组成差异较大, B 海域与 A 海域、B 海域与 C 海域鱼种组成差异较小。上述结果表明, 不同海域鱼种组成存在差异。

不同海域鱼类群落相对丰度的 α 多样性指数显示, 3 个海域对应 Shannon 多样性指数范围分别为 0.73~1.42(A)、0.03~2.06(B) 和 0.11~1.34(C); Simpson 多样性指数范围为 0.38~0.69 (A)、

0.01~0.82(B) 和 0.04~0.64(C); Pielou 均匀度指数范围为 0.38~0.56 (A)、0.03~0.73 (B) 和 0.04~0.52 (C) (图 5), 三种指数分布趋势基本相同, 并且不同海域鱼类物种 3 种指数均不存在差异。

2.3 不同水层鱼种分布情况

各鱼种 eDNA 丰度在不同水层变化趋势显示, 大致可以分为 3 种趋势, 第一种为 3.5~20 m 相对丰度最高; 第二种为 20~70 m 层丰度高, 其他水层丰度较低 (B); 第三种为 70~90 m 丰度较其他两水层高 (C)。表层相对丰度较高的鱼种为鳮、花鲈、海鳗、东方狐鲣、日本鳢和单指虎鲂等。第二种趋势包含蓝圆鲈、日本竹荚鱼、刺鲃、蓝点马鲛

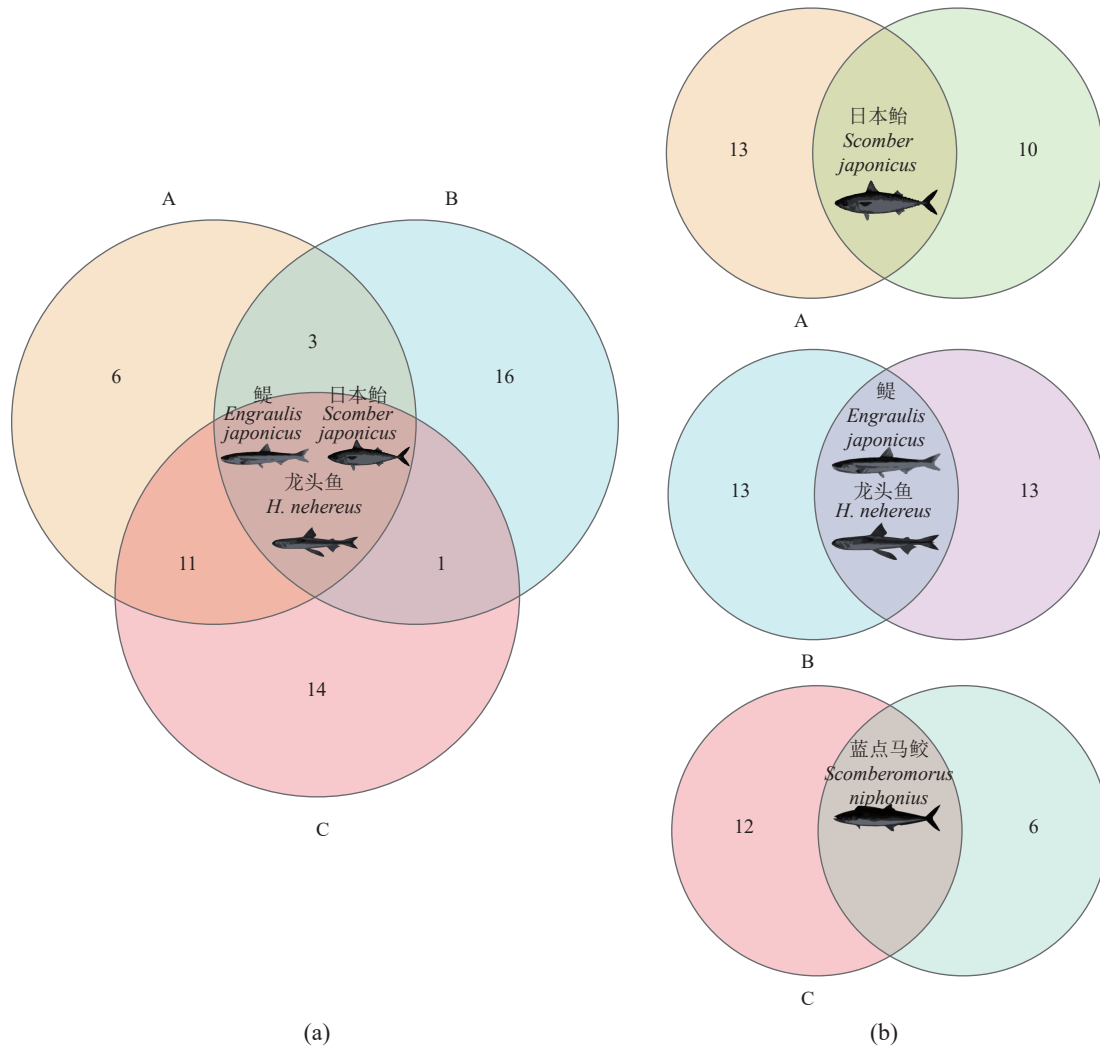


图 3 基于 eDNA metabarcoding 检测到的不同海域鱼类物种 (a) 及相同海域的调查结果 (b)

A、B 和 C 分别对应长江河口海域、舟山近海海域和舟山外海海域; (b) 调查结果来自文献 [14-15, 25]。

Fig. 3 Fish species detected by eDNA metabarcoding in different regions (a) and the other results in the same waters (b)

A, B and C correspond to the Yangtze River estuary sea area, Zhoushan coastal waters and Zhoushan offshore sea area, respectively; (b) the survey results are from literature [14-15, 25].

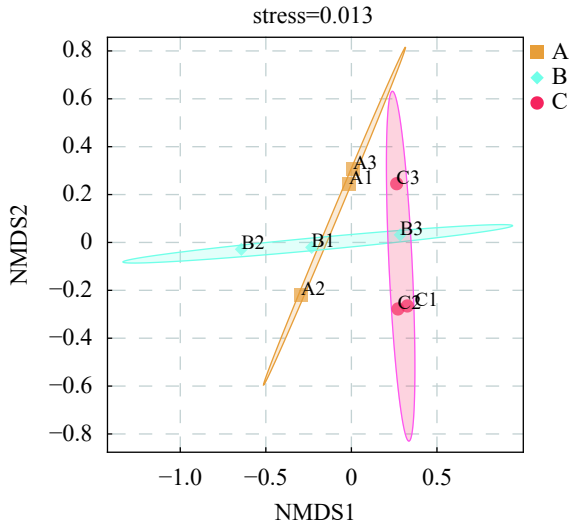


图 4 不同海域的 NMDS 分析图

Fig. 4 The NMDS analysis results of different regions

和长体蛇鲻等。70~90 m 水深范围内 reads 丰度较高的鱼种为日本鲭、日本鳀、七星底灯鱼、少鳞鳢、褐菖鲈和多棘腔吻鳕等(等(图 6)。大部分鱼种 eDNA 丰度在水层间的变化趋势与其栖息水层偏好相吻合。

3 讨论

3.1 舟山及其邻近海域鱼类群落组成及其分布格局

以往对于岛礁海域的拖网调查通常要耗费大量时间和精力, 而且物种鉴定也依赖于鱼类分类专家^[32-34]。本研究在春季通过 eDNA metabarcoding 技术对舟山及其邻近海域进行了鱼类多样性分

析, 通过采集少量的海水样本实现了对岛礁海域鱼种多样性的快速统计。目前, 国外诸多学者均已证明环境 DNA 监测大面积海域或岛礁海域鱼类多样性的可行性。Thomsen 等^[35]首次将 eDNA metabarcoding 应用到海洋中, 证明了测序读数和海洋鱼类丰度具有一致性。Jeunen 等^[36]使用多种分子标记对 4 个海洋栖息地进行研究, 验证了 eDNA metabarcoding 技术在海洋生物多样性保护和管理方面的有效性。Fraija-Fernández 等^[3]在大西洋东北部约 $1.2 \times 10^5 \text{ km}^2$ 的大规模海洋调查中进行采样, 根据 eDNA metabarcoding 结果推断出的物种分布模式与目前对物种所掌握的生态学信息相吻合, 这些研究结果均表明 eDNA metabarcoding 技术可以得出可靠的生态学结论, 并且可用于大规模海洋鱼类多样性监测。本研究在 3 个不同海域设置采样点, 并且在不同水层采集水样, 共检测出 18 目 36 科 49 属 52 种海水鱼类。然而, 由于缺少同步开展的网具调查结果(渔获物), 无法同时验证环境 DNA 与鱼类资源之间的相关性。因此通过查阅对比先前使用传统底拖网的调查结果以佐证本研究的结果。表 1 的汇总结果显示, 本研究所检测到的优势鱼类物种与前期开展的资源调查结果基本一致, 表明应用环境 DNA 技术监测岛礁海域鱼类物种多样性研究的可行性, 同时也为岛礁海域整体的鱼类群落调研提供了新的思路和方法。

不同海域的鱼类群落组成存在较大的差异。 α 多样性分析结果显示, 不同海域的 3 种指数分布趋势基本相同, 均呈现为舟山近海>长江口外侧海域>舟山外海, 各项指数的数值范围与同海域同

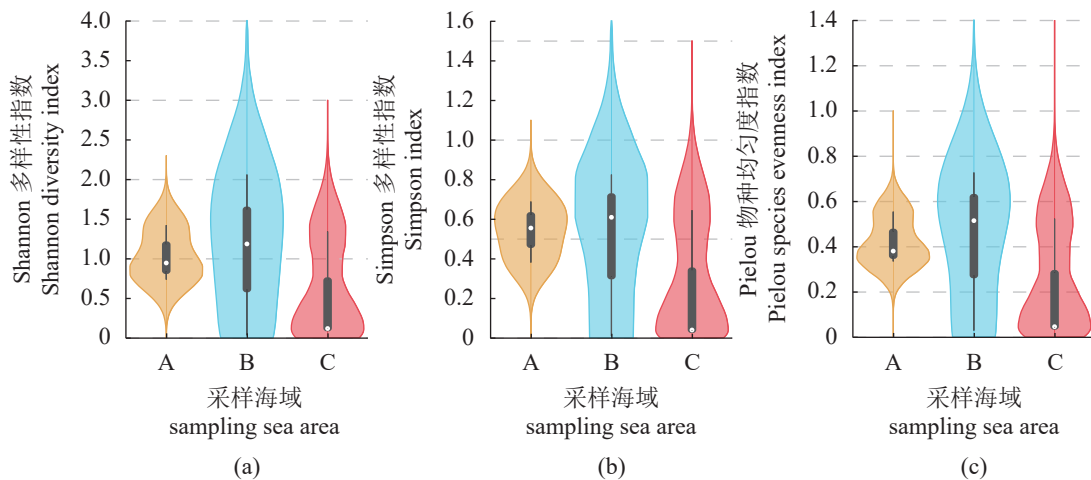


图 5 不同海域的多样性指数组间差异图

Fig. 5 Diversity index differences between groups in different regions

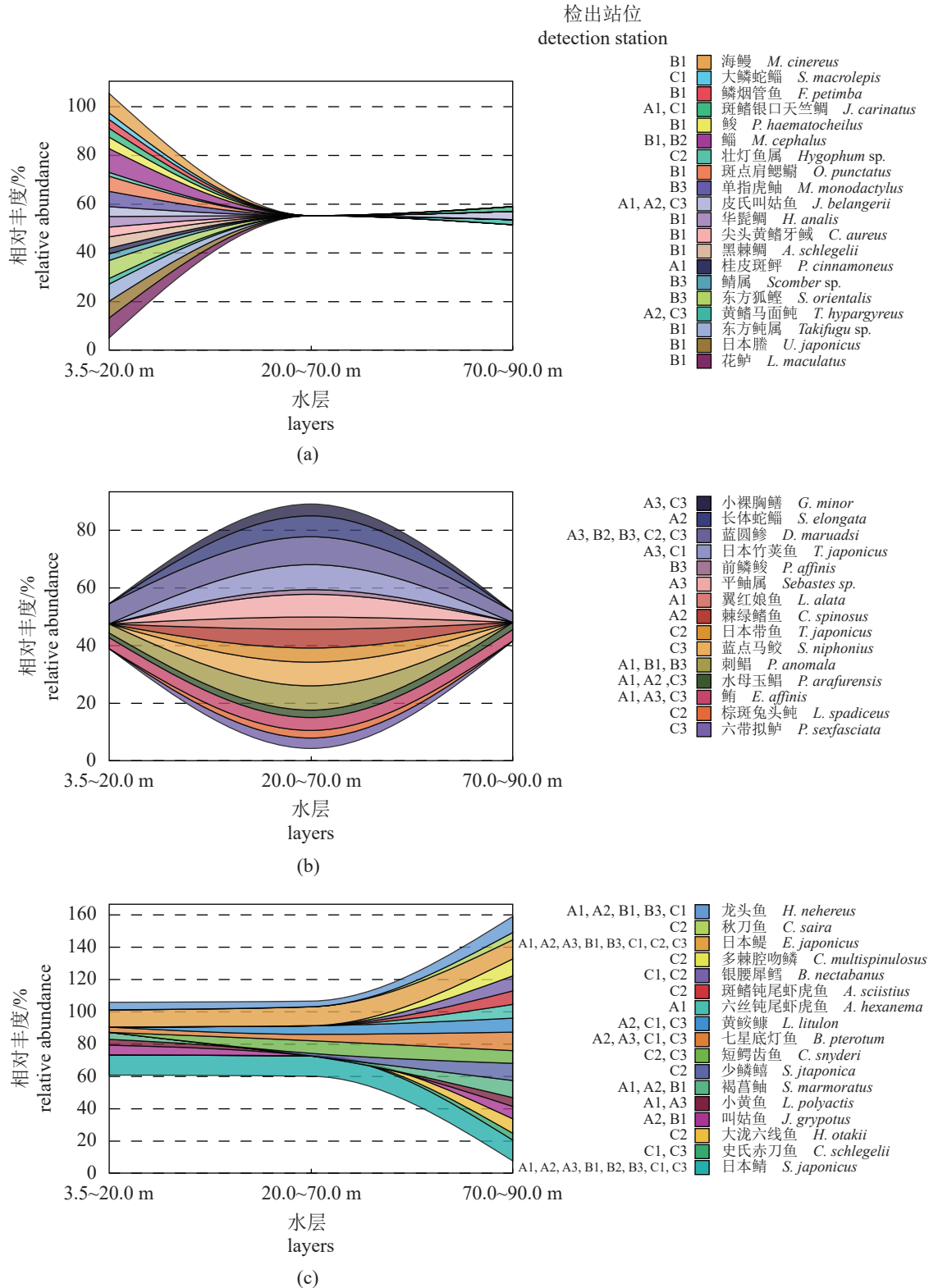


图 6 鱼种的 eDNA 相对丰度在不同水层变化趋势

(a) 趋势 1, (b) 趋势 2, (c) 趋势 3。

Fig. 6 Trends in the relative eDNA abundance of fish in different water layers

(a) trend 1, (b) trend 2, (c) trend 3.

表 1 相同海域使用底拖网调查结果的优势鱼种

Tab. 1 The dominant species in the same sea area using bottom trawl survey results

海域 sea area	优势种 dominant species	参考文献 reference
长江口海域 Yangtze River estuary	日本鳀 <i>E. japonicus</i> 、日本竹荚鱼 <i>T. japonicus</i> 、小黄鱼 <i>L. polyactis</i> 、黄鲛鳀 <i>L. litulon</i> 、七星底灯鱼 <i>B. pterotum</i> 、刀鲚 <i>Coilia nasus</i> 、六丝钝尾虾虎鱼 <i>A. hexanema</i> 、凤鲚 <i>Coilia mystus</i> 、棘头梅童鱼 <i>Collichthys lucidus</i>	[37-40]
舟山近海海域 Zhoushan inshore	黄鲛鳀 <i>L. litulon</i> 、日本红娘鱼 <i>Lepidotrigla japonice</i> 、海鳗 <i>M. cinereus</i> 、龙头鱼 <i>H. nehereus</i> 、花鲈 <i>L. maculatus</i> 、六丝钝尾虾虎鱼 <i>A. hexanema</i> 、细条天竺鲷 <i>Jaydia lineata</i> 、褐菖鲈 <i>S. marmoratus</i> 、日本带鱼 <i>T. japonicus</i> 、蓝点马鲛 <i>S. niphonius</i> 、棘绿鲭鱼 <i>C. spinosus</i>	[41-45]
舟山外海海域 Zhoushan offshore	日本鳀 <i>E. japonicus</i> 、蓝圆鲈 <i>D. maruadsi</i> 、日本鲭 <i>S. japonicus</i> 、刺鲳 <i>P. anomala</i> 、日本带鱼 <i>T. japonicus</i> 、小黄鱼 <i>L. polyactis</i> 、绿鳍马面鲀 <i>T. modestus</i> 、龙头鱼 <i>H. nehereus</i>	[46-48]

调查时间的拖网调查结果高度相似^[37-38,43,48]。研究表明, 东海鱼类丰富度和多样性指数均呈现为北低南高, 西低东高的空间格局^[46], 本研究结果与上述空间分布格局有所出入, 造成这种空间分布的差异可能与特定的洋流和初级生产力有关^[49]。长江口和舟山渔场处于沿岸流及黄海水团南下和黑潮分支台湾暖流的综合作用区域, 由于这两个海域近岸冲淡水, 基础饵料丰富, 成为众多鱼类的产卵场和索饵场。本研究采样时间为 5 月, 长江和钱塘江处于丰水期^[50], 同时台湾暖流势力增强, 水温上升, 大量海洋鱼类洄游到近海进行生殖产卵和索饵活动, 因而近海海域的生物多样性较高^[43]。此外, 由于远海检出洄游鱼类占比较大, 且这些鱼类生物量较高, 而生物量较高会造成这些鱼种的优势度增加, 从而导致远海海域多样性指数整体较低。

基于 eDNA 的分析可以应用于鱼类营养水平分析, 是联系和理解营养生态系统相互作用的重要手段^[51]。从群落营养等级来看, 舟山近海鱼类营养级较另外两个海域低, 这可能是由于近海捕捞严重和环境污染所致。舟山近海的渔业资源结构发生了重大变化, 原有体型大、经济价值高、营养级较高的资源结构解体, 取而代之的是体型小、经济价值低、营养级较低的种群, 这在之前的研究中已经得到证实^[41]。

3.2 环境 DNA 在渔业资源监测的应用

通过比对已有相同海域的 eDNA metabarcoding 研究结果, 发现与本研究检出鱼种存在较大差异。与 Zhang 等^[14]对长江口的研究相比, 共有优势种为小黄鱼和日本鲭; 与 Zhou 等^[15]对舟山近海的研究相比, 共有优势种为日本鳀和龙头鱼; 与李晓玲等^[52]对东海夏季调查结果相比, 共有优势种为蓝点马鲛和日本鲭。本研究中特有优势种在三个海域的优势种分别为七星底灯鱼、日本鳀、

褐菖鲈、日本竹荚鱼、六丝钝尾虾虎鱼、叫姑鱼、长体蛇鲻、棘绿鲭鱼和黄鲛鳀(长江口海域); 日本鲭、鲻、蓝圆鲈、刺鲳、花鲈、海鳗和东方狐鲣(舟山近海海域); 日本鳀、少鳞鳕、多棘腔吻鲷、银腰犀鲷、大泷六线鱼、黄鲛鳀、短鰐齿鱼和斑鳍钝尾虾虎鱼(舟山外海海域)。

造成以上优势鱼种差异的原因是多方面的。首先, 采样方法和 eDNA 提取方法均会显著影响样本的 DNA 产量^[53]。研究表明在扩增低丰度类群时, 不同的采样和提取方案会导致 eDNA 产量相差 9 倍, 较高的 eDNA 产量可以增加物种丰度占比并提高重复之间的一致性^[54]。对于舟山具有独特的高浊度水文环境^[55-56], 陈治等^[57]的研究表明, 建立和优化 eDNA 获取方法可以显著提高后续分析结果的可靠性。因此应根据研究对象、研究水域等具体条件进行采样方法和 eDNA 提取方法的优化, 以降低成本和降低污染风险, 提高 eDNA metabarcoding 的监测效率和适用性。

其次, 采样时间和采样点的不同也是导致不同研究结果差异较大的原因之一。鱼类在不同季节的体型、年龄和生命阶段各不相同, 同一个体的不同生命阶段会产生不同量的 eDNA, 可能会影响随后分析结果。研究表明, 总生物量相同的一条大鱼与数条小鱼相比, 后者会释放更多的 eDNA, 这妨碍了对 eDNA 和生物量之间关系的推断^[58-59]。然而, 某些鱼类在幼鱼阶段, 体型大小和代谢率之间的关系往往与生物量无关^[60], 这使得将代谢废物(包括 eDNA)的数量与鱼类的数量或生物量联系起来变得更加困难。因此对于不同采样时间, eDNA metabarcoding 检出的优势种也有所不同。不同采样点的水环境是有所差异的, 而温度、太阳辐射和 pH 值等环境因素也直接影响了 eDNA 在水中的持久性^[61-62]。此外, 在一个地区仅仅检测到某些物种的 eDNA 并不一定只反

映当地物种的存在与否和丰度大小, 而是依赖于 eDNA 在未知的空间和时间两个维度的生产、持续时间和实际运输情况^[35,63-64]。eDNA 的垂直分布往往取决于生物的位置及其行为。本研究根据实际水深进行了垂直采样, 发现多数鱼种在不同水层 eDNA 丰度的变化趋势与其栖息水层的偏好性高度相似。通过对鱼种垂直分布的调查研究, 可以更全面地掌握物种分布和生境偏好, 然而之前的研究仅进行表层水的采集而忽略了 eDNA 的垂直分布, 这也会对结果有所影响^[14-15,52]。在基于 eDNA metabarcoding 的海洋调查中, 应考虑深度、季节和水化学等因素的影响, 因为 eDNA 的持久性在不同水层之间可能有很大差异。

最后, 假阴性和假阳性也是 eDNA metabarcoding 结果产生偏差的重要因素。在采集水样之前采水器被污染或近海捕鱼区采样都会造成假阳性^[65-66]。由于捕鱼区内大范围的拖网捕捞使许多鱼被拖入网中, 这可能会极大地增加水中的 eDNA 浓度, 从而可能使一些鱼种检测 reads 数值偏高, 并可能影响到鱼种有无的检出^[67]。在进行密集捕捞的海域有大量被丢弃的非经济鱼种和鱼类尸体^[68], 这也是一个潜在的污染源。随着生物量和密度的增加, 这些被丢弃的鱼(或尸体)产生的 eDNA 浓度和持久性也会增加, 这种假阳性使得优势鱼种的判定产生偏差。因此需要更多的阴性对照以消除假阳性结果的产生。eDNA metabarcoding 的分析结果往往依赖于参考数据库的准确性和全面性^[62]。参考数据库的缺失会导致假阴性或者多个物种无法区分。由于属内物种之间扩增区域的序列高度相似, 部分 DNA 序列未被成功鉴定, 导致一些同属物种无法区分, 例如本研究中存在 4 个仅注释到属级分类阶元的鱼种。大部分鱼类 eDNA metabarcoding 研究主要采用公共数据库^[14-15,51], 如 NCBI、BOLD、MitoFish 和 FISH-BOL, 而不同的数据库必然使得鉴定结果产生偏差。有研究表明自建数据库优于公共数据库^[69-70], 然而目前国内针对鱼类 eDNA metabarcoding 研究的参考数据库较少。因此, 在未来的研究中, 针对研究区域建立一个正确和完整的数据库是必要的。

环境 DNA metabarcoding 技术是海洋监测中迅速兴起的工具, 越来越多地被用于海洋生物多样性研究。尽管 eDNA metabarcoding 技术在实践中不断地进行完善和突破, 但其仍处于尚未完全成熟的阶段, 还面临诸多挑战。因此将 eDNA

metabarcoding 作为一种独立的监测手段进行渔业资源调查仍需深入研究。

致谢: 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提供的测序平台, 感谢邬倩倩和吴卢汉在实验过程中给予的帮助。感谢中国科学院海洋研究所张辉研究员对本文提出的宝贵意见。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] Loreau M, Naeem S, Inchausti P, *et al.* Biodiversity and ecosystem functioning: current knowledge and future challenges[J]. *Science*, 2001, 294(5543): 804-808.
- [2] Zhang Y, Pavlovska M, Stoica E, *et al.* Holistic pelagic biodiversity monitoring of the Black Sea via eDNA metabarcoding approach: from bacteria to marine mammals[J]. *Environment International*, 2020, 135: 105307.
- [3] 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.
- [4] Heino M, Porteiro F M, Sutton T T, *et al.* Catchability of pelagic trawls for sampling deep-living nekton in the mid-North Atlantic[J]. *ICES Journal of Marine Science*, 2011, 68(2): 377-389.
- [5] Fraser H M, Greenstreet S P R, Piet G J. Taking account of catchability in groundfish survey trawls: implications for estimating demersal fish biomass[J]. *ICES Journal of Marine Science*, 2007, 64(9): 1800-1819.
- [6] Aylagas E, Borja Á, Irigoien X, *et al.* Benchmarking DNA metabarcoding for biodiversity-based monitoring and assessment[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2016, 3: 96.
- [7] Thomsen P F, Willerslev E. Environmental DNA-An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity[J]. *Biological Conservation*, 2015, 183: 4-18.
- [8] Taberlet P, Coissac E, Hajibabaei M, *et al.* Environmental DNA[J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21(8): 1789-1793.

- [9] 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.
- [10] Wang X Y, Lu G Q, Zhao L L, *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.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] Li F L, Peng Y, Fang W D, *et al.* Application of environmental DNA metabarcoding for predicting anthropogenic pollution in rivers[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(20): 11708-11719.
- [14] Zhang H, Yoshizawa S, Iwasaki W, *et al.* Seasonal fish assemblage structure using environmental DNA in the Yangtze Estuary and its adjacent waters[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2019, 6: 515.
- [15] 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.
- [16] Yang J H, Zhang X W, Xie Y W, *et al.* Zooplankton community profiling in a eutrophic freshwater ecosystem-lake Tai Basin by DNA metabarcoding[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 1773.
- [17] 徐念, 常剑波. 长江中下游干流环境DNA样本鱼类物种检测的初步研究[J]. *水生态学杂志*, 2016, 37(5): 49-55.
- Xu N, Chang J B. Preliminary study on fish species detection in the middle and lower Yangtze River using environmental DNA[J]. *Journal of Hydroecology*, 2016, 37(5): 49-55 (in Chinese).
- [18] 蒋佩文, 李敏, 张帅, 等. 基于环境DNA宏条形码和底拖网的珠江河口鱼类多样性[J]. *水生生物学报*, 2022, 46(11): 1701-1711.
- Jiang P W, Li M, Zhang S, *et al.* Investigating the fish diversity in Pearl River Estuary based on environmental DNA metabarcoding and bottom trawling[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, 46(11): 1701-1711 (in Chinese).
- [19] 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 L, Lin J Y, Xu Y, *et al.* Investigating the fish diversity in Erhai Lake based on environmental DNA metabarcoding[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(5): 1080-1086 (in Chinese).
- [20] 王晨, 陶孟, 李爱民, 等. 基于环境DNA宏条形码技术的秦淮河生物多样性研究[J]. *生态学报*, 2022, 42(2): 611-624.
- Wang C, Tao M, Li A M, *et al.* Research on the biodiversity of Qinhuai River based on environmental DNA metabarcoding[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2022, 42(2): 611-624 (in Chinese).
- [21] 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 J Z, Jiang Y Z, Sun P, *et al.* Application and evaluation of environmental DNA technology in fish diversity research in Xiangshan Bay[J]. *Journal of Fisheries Sciences of China*, 2021, 28(2): 205-214 (in Chinese).
- [22] 徐欣靖, 皮杰, 李德亮, 等. 环境DNA技术在湖泊生物资源调查中的应用进展[J]. *水产养殖*, 2022, 43(3): 1-7.
- Xu X J, Pi J, Li D L, *et al.* Advances in the application of environmental DNA technology in the survey of lake biological resources[J]. *Journal of Aquaculture*, 2022, 43(3): 1-7 (in Chinese).
- [23] 金显仕, 单秀娟, 郭学武, 等. 长江口及其邻近海域渔业生物的群落结构特征[J]. *生态学报*, 2009, 29(9): 4761-4772.
- Jin X S, Shan X J, Guo X W, *et al.* Community structure of fishery biology in the Yangtze River estuary and its adjacent waters[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2009, 29(9): 4761-4772 (in Chinese).
- [24] 赵盛龙, 钟俊生. 舟山海域鱼类原色图鉴 [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2006.
- Zhao S L, Zhong J S. Fish primary color map in Zhoushan Sea area[M]. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Publishing House, 2006 (in Chinese).
- [25] 吴鹏, 倪勇强, 孙毛明, 等. 舟山钓梁围垦一期工程对附近海域生态系统影响研究[J]. *海洋通报*, 2013, 32(5): 540-547, 552.
- Wu P, Ni Y Q, Sun M M, *et al.* Research on the impact of the first phase of the Zhoushan Fishing Beam Reclamation Project on the adjacent marine ecosystem[J]. *Marine Science Bulletin*, 2013, 32(5): 540-547, 552.

- Wu P, Ni Y Q, Sun M M, *et al.* Influence of phase 1 of Diaoliang reclamation project on the ecosystem of adjacent sea area[J]. *Marine Science Bulletin*, 2013, 32(5): 540-547,552 (in Chinese).
- [26] 俞存根, 张平, 郭朋军, 等. 围填海区渔业生态损害的补偿标准定量研究——以舟山近岸海域为例[J]. *生态学报*, 2019, 39(4): 1416-1425.
- Yu C G, Zhang P, Guo P J, *et al.* Quantitative study on compensation standards for ecological damage to fishery in reclaimed areas: a case study from Zhoushan coast[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2019, 39(4): 1416-1425 (in Chinese).
- [27] 叶文建, 杜萍, 寿鹿, 等. 舟山海域大中型浮游动物群落时空变化及受控要素[J]. *生态学报*, 2021, 41(1): 254-267.
- Ye W J, Du P, Shou L, *et al.* Spatio-temporal variation of marco and mesozooplankton communities and the controlling factors around Zhoushan archipelago[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2021, 41(1): 254-267 (in Chinese).
- [28] 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 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).
- [29] 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.
- [30] 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.
- [31] Sato Y, Miya M, Fukunaga T, *et al.* MitoFish and MiFish pipeline: a mitochondrial genome database of fish with an analysis pipeline for environmental DNA metabarcoding[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1553-1555.
- [32] Hering D, Borja A, Jones J I, *et al.* Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the European Water Framework Directive[J]. *Water Research*, 2018, 138: 192-205.
- [33] Knudsen S W, Ebert R B, Hesselsoe 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.
- [34] Lacoursière-Roussel A, Côté G, Leclerc V, *et al.* Quantifying relative fish abundance with eDNA: a promising tool for fisheries management[J]. *Journal of Applied Ecology*, 2016, 53(4): 1148-1157.
- [35] 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.
- [36] Jeunen G J, Knapp M, Spencer H G, *et al.* Environmental DNA (eDNA) metabarcoding reveals strong discrimination among diverse marine habitats connected by water movement[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2019, 19(2): 426-438.
- [37] 史赞荣, 晁敏, 全为民, 等. 长江口鱼类群落的多样性分析[J]. *中国水产科学*, 2012, 19(6): 1051-1059.
- Shi Y R, Chao M, Quan W M, *et al.* Fish community diversity analyses in the Yangtze River estuary, China[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2012, 19(6): 1051-1059 (in Chinese).
- [38] 李建生, 李圣法, 程家骅. 长江口渔场鱼类组成和多样性[J]. *海洋渔业*, 2006, 28(1): 37-41.
- Li J S, Li S F, Cheng J H. The composition and diversity of fishes on fishing grounds of Changjiang estuary[J]. *Marine Fisheries*, 2006, 28(1): 37-41 (in Chinese).
- [39] 张涛, 庄平, 刘健, 等. 长江口崇明东滩鱼类群落组成和生物多样性[J]. *生态学杂志*, 2009, 28(10): 2056-2062.
- Zhang T, Zhuang P, Liu J, *et al.* Species composition and biodiversity of fish community in Chongming Dongtan of Yangtze River estuary[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2009, 28(10): 2056-2062 (in Chinese).
- [40] 单秀娟, 金显仕. 长江口近海春季鱼类群落结构的多样性研究[J]. *海洋与湖沼*, 2011, 42(1): 32-40.
- Shan X J, Jin X S. Diversity of fish community structure in the spring-time offshore waters at the Yangtze River estuary[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2011, 42(1): 32-40 (in Chinese).
- [41] 于南京, 俞存根, 许永久, 等. 舟山群岛外海域春秋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).
- [42] 戴小杰, 杨志金, 田思泉, 等. 浙江南部近海鱼类分类多样性研究[J]. *海洋学报*, 2019, 41(8): 43-51.
Dai X J, Yang Z J, Tian S Q, *et al.* Taxonomic diversity of fish species in the off southern Zhejiang, East China Sea[J]. *Haiyang Xuebao*, 2019, 41(8): 43-51 (in Chinese).
- [43] 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/OL]. *大连海洋大学学报*, 2022: 1-14. (2022-03-21). <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2022-006>.
Lu Y, Niu Z W, Chen A Y, *et al.* Fish community structure and biodiversity in the northern sea area of Zhoushan island[J/OL]. *Journal of Dalian Ocean University*, 2022: 1-14. (2022-03-21). <https://doi.org/10.16535/j.cnki.dlhyxb.2022-006> (in Chinese).
- [44] 叶深, 俞存根, 周青松, 等. 舟山嵛头洋海域春秋季节鱼类种类组成及数量分布[J]. *福建水产*, 2014, 36(1): 35-46.
Ye S, Yu C G, Zhou Q S, *et al.* Species composition and quantitative distribution of fishes in the Qitou Sea, Zhoushan[J]. *Journal of Fujian Fisheries*, 2014, 36(1): 35-46 (in Chinese).
- [45] 赵盛龙. 浙江鱼类资源大集合[J]. *海洋世界*, 2013(9): 14-17.
Zhao S L. Large collection of fish resources in Zhejiang province[J]. *Ocean World*, 2013(9): 14-17 (in Chinese).
- [46] 林楠, 苗振清, 卢占晖. 东海中部夏季鱼类群落结构及其多样性分析[J]. *广东海洋大学学报*, 2009, 29(3): 42-47.
Lin N, Miao Z Q, Lu Z H. Structure and diversity of fish communities in summer in the middle of the East China Sea[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2009, 29(3): 42-47 (in Chinese).
- [47] 李圣法. 东海大陆架鱼类群落生态学研究—空间格局及其多样性 [D]. 上海: 华东师范大学, 2005.
Li S F. The ecological study for fish community in the East China Sea continental shelf: the spatial pattern and diversity[D]. Shanghai: East China Normal University, 2005 (in Chinese).
- [48] 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 S F, Cheng J H, Li C S, *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 (in Chinese).
- [49] 苏奋振, 张甲坤, 杜云艳, 等. 东海区中上层鱼类资源的时空分异[J]. *自然资源学报*, 2004, 19(5): 591-596.
Su Z F, Zhang J, Du Y Y, *et al.* Spatiotemporal variations of pelagic fishery resources in East China Sea[J]. *Journal of Natural Resources*, 2004, 19(5): 591-596 (in Chinese).
- [50] 蒋巧丽, 许永久, 俞存根, 等. 2016年夏季长江口邻近海域浮游动物群落结构[J]. *应用生态学报*, 2018, 29(9): 3078-3084.
Jiang Q L, Xu Y J, Yu C G, *et al.* Community structure of zooplankton in adjacent area of Changjiang Estuary, China in summer 2016[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2018, 29(9): 3078-3084 (in Chinese).
- [51] Zhong W J, Zhang J Y, Wang Z H, *et al.* Holistic impact evaluation of human activities on the coastal fish biodiversity in the Chinese coastal environment[J]. *Environmental Science & Technology*, 2022, 56(10): 6574-6583.
- [52] 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]. *Haiyang Xuebao*, 2022, 44(4): 74-84 (in Chinese).
- [53] 陈治, 宋娜, 源利文, 等. 舟山近海水样环境DNA获取方法的建立[J]. *水生生物学报*, 2020, 44(1): 50-58.
Chen Z, Song N, Minamoto T, *et al.* The eDNA collection method of Zhoushan coastal waters[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(1): 50-58 (in Chinese).
- [54] Jeunen G J, Knapp M, Spencer H G, *et al.* Species-level biodiversity assessment using marine environmental DNA metabarcoding requires protocol optimization and standardization[J]. *Ecology and Evolution*, 2019, 9(3): 1323-1335.
- [55] 张启龙, 王凡, 赵卫红, 等. 舟山渔场及其邻近海域水团的季节特征[J]. *海洋学报*, 2007, 29(5): 1-9.
Zhang Q L, Wang F, Zhao W H, *et al.* Seasonal characteristics in the water masses in Zhoushan fishing ground

- and adjacent region[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2007, 29(5): 1-9 (in Chinese).
- [56] 侯伟芬, 俞成根, 陈小庆. 舟山渔场的水温分布特征分析[J]. *宁波大学学报(理工版)*, 2013, 26(3): 31-34.
- Hou W F, Yu C G, Chen X Q. Temperature distribution in Zhoushan fishing ground[J]. *Journal of Ningbo University (Natural Science & Engineering Edition)*, 2013, 26(3): 31-34 (in Chinese).
- [57] 陈治, 陈建威, 王晓艳, 等. 舟山近海环境DNA保存方法的建立及优化[J]. *海洋与湖沼*, 2019, 50(5): 1098-1107.
- Chen Z, Chen J W, Wang X Y, *et al.* Establishment and optimization of the eDNA preservation method for Zhoushan coastal waters[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2019, 50(5): 1098-1107 (in Chinese).
- [58] 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.
- [59] Maruyama A, Nakamura K, Yamanaka H, *et al.* The release rate of environmental DNA from juvenile and adult fish[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e114639.
- [60] Post J R, Lee J A. Metabolic ontogeny of teleost fishes[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1996, 53(4): 910-923.
- [61] Strickler K M, Fremier A K, Goldberg C S. Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms[J]. *Biological Conservation*, 2015, 183: 85-92.
- [62] Hansen B K, Bekkevold D, Clausen L W, *et al.* The sceptical optimist: Challenges and perspectives for the application of environmental DNA in marine fisheries[J]. *Fish and Fisheries*, 2018, 19(5): 751-768.
- [63] Jane S F, Wilcox T M, Mckelvey K S, *et al.* Distance, flow and PCR inhibition: eDNA dynamics in two headwater streams[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2015, 15(1): 216-227.
- [64] Roussel J M, Paillisson J M, Tréguier A, *et al.* The downside of eDNA as a survey tool in water bodies[J]. *Journal of Applied Ecology*, 2015, 52(4): 823-826.
- [65] Merkes C M, Mccalla S G, Jensen N R, *et al.* Persistence of DNA in carcasses, slime and avian feces may affect interpretation of environmental DNA data[J]. *PLoS One*, 2014, 9(11): e113346.
- [66] 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.
- [67] Yamamoto S, Minami K, Fukaya K, *et al.* Environmental DNA as a 'Snapshot' of fish distribution: a case study of Japanese Jack Mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan[J]. *PLoS One*, 2016, 11(3): e0149786.
- [68] Heath M R, Cook R M, Cameron A I, *et al.* Cascading ecological effects of eliminating fishery discards[J]. *Nature Communications*, 2014, 5: 3893.
- [69] 陈治, 蔡杏伟, 张清凤, 等. 海南岛淡水鱼类环境DNA宏条形码参考数据库的初步构建及比较分析[J]. *南方水产科学*, 2022, 18(3): 1-12.
- Chen Z, Cai X W, Zhang Q F, *et al.* Preliminary construction and comparative analysis of environmental DNA metabarcoding reference database of freshwater fishes in Hainan Island[J]. *South China Fisheries Science*, 2022, 18(3): 1-12 (in Chinese).
- [70] 蒋佩文, 李敏, 张帅, 等. 基于线粒体CO I和12S *rDNA* 基因构建珠江河口鱼类DNA宏条形码数据库[J]. *南方水产科学*, 2022, 18(3): 13-21.
- Jiang P W, Li M, Zhang S, *et al.* Construction of DNA meta-barcode database of fish in Pearl River Estuary based on mitochondrial cytochrome CO I and 12S *rDNA* gene[J]. *South China Fisheries Science*, 2022, 18(3): 13-21 (in Chinese).

Preliminary study on spatial distribution pattern of fish in Zhoushan and its adjacent waters based on environmental DNA metabarcoding

ZHANG Haobo¹, WANG Xiaoyan¹, CHEN Zhi², ZHONG Lanping¹, GAO Tianxiang^{3*}

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

2. College of Fisheries and Life Science, Hainan Tropical Ocean University, Sanya 572022, China;

3. College of Fisheries, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China)

Abstract: As an irreplaceable and important ecosystem, island reef waters meet the needs of fish communities for growth, reproduction, development and protection from natural predators. They are good habitats for many species. Environmental DNA (eDNA) metabarcoding technology, which combines universal primers with high-throughput sequencing (high-throughput sequencing, HTS) technology, facilitates the amplification of eDNA from multiple target groups and has great potential in establishing or improving the assessment of species diversity. Zhoushan archipelago is the largest archipelago in China, which consisting of 2 085 islands. A total of 27 water samples were collected from nine stations in Zhoushan and its adjacent waters in May 2019 in this study to better understand the species composition of the major fish communities in Zhoushan and its adjacent waters and to monitor and protect their diversity. eDNA metabarcoding technique was used to determine the fish community composition. The results showed that 52 species of fish were detected in Zhoushan and its adjacent waters, belonging to 19 orders, 36 families and 49 genera. Four species were only annotated to genus-level. Perciformes and Scombriformes account for the highest proportion, 28.85% and 15.38%, respectively. The dominant species in different sea areas were quite different. The distribution trends of the Shannon, Simpson, and Pielou indices were basically the same. They all showed the trend as Zhoushan offshore waters > Yangtze River estuary > Zhoushan offshore waters. The variation of eDNA in different water layers could be roughly divided into three trends, and the trend of most fish species' sequence abundance between water layers was highly consistent with their habitat preference. In addition, by comparing the results with other scholars, it was found that the eDNA metabarcoding results in the same sea area at the same time varied greatly, which indicated that the repeatability of the eDNA technology was less reproducible and should be used with caution in the field of fisheries resources monitoring. Therefore, eDNA technology can only partially replace traditional survey methods at present. In the future, eDNA metabarcoding can be used as an adjunct to fishery resource monitoring to improve detection efficiency and reduce interference with ecosystems. This study can provide new ideas and methods for the study of fish communities in island reef waters.

Key words: marine fish; environmental DNA metabarcoding; biodiversity; spatial distribution; Zhoushan offshore; island reef waters

Corresponding author: GAO Tianxiang. E-mail: gaotianxiang0611@163.com

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (41806180, 41976083); the Zhejiang Provincial Key Research and Development Program (2021C02047)