

doi: 10.7541/2022.2021.0265

基于环境DNA宏条码和底拖网的珠江河口鱼类多样性

蒋佩文^{1,2,3} 李敏^{1,3} 张帅¹ 陈作志^{1,3} 徐姗楠^{1,3}

(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, 广州 510300; 2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306; 3. 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州), 广州 511458)

摘要: 文章采用环境DNA宏条码和底拖网对珠江河口鱼类多样性进行了研究, 并对两种方法进行了比较。利用环境DNA宏条码检测到了175种鱼类, 而利用底拖网采集到了47种鱼类, 结合两种方法共检测出179种鱼类, 隶属于15目63科128属。其中两种方法共同识别了鱼类43种, 占总检测物种的24.02%。基于底拖网的调查未能收集到基于环境DNA宏条码检测到的大多数物种。根据Shannon指数和Simpson指数显示, DNA宏条码所检测珠江河口鱼类群落 α 多样性显著高于底拖网方法($P < 0.05$)。两种方法的PCoA结果均显示珠江河口鱼类群落存在空间结构, 基于环境DNA宏条码的分析显示空间重叠更多。两种方法基于冗余分析均显示溶解氧和盐度是影响鱼类群落结构的主要环境因子。研究表明, 环境DNA宏条形码是一种环保且可靠的评估方法, 将其搭载到现有调查可以更好地了解河口鱼类多样性。

关键词: 12S rRNA基因; 环境DNA; 宏条码; 鱼类多样性; 珠江河口

中图分类号: S932.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2022)11-1701-11



河口生态系统一直频繁往复地发生着物质交汇、咸淡水混合、径流和潮汐相互作用, 形成了环境独特、资源富庶的自然条件和生物生境, 被认为是全球最具有生产力的生态系统之一^[1-3]。鱼类多样性是当今水生生态系统健康监测的关键指标, 对河口生态系统的生态学研究、管理和保护也起着至关重要的作用^[4]。传统的鱼类多样性的监测方法主要通过直接捕获样本和视觉或声学观察, 其中直接捕获样本通过底拖网, 地笼网及流刺网等方式, 但这些方式不仅会破坏海床和底栖群落, 而且采样效率低下, 成本高, 依赖经验丰富的分类学专家, 一直受到限制^[5-8]。视觉或声学观察相对环保, 不会损伤鱼类, 但河口生态系统的水质浑浊, 严重影响其观察的效率和准确性。

环境DNA宏条码 (Environmental DNA metabar-

coding) 技术很大程度上避开了这些限制^[9]。环境DNA (Environmental DNA)指水生生物通过粪便、黏液和皮肤的脱落及尸体降解物, 残留在其生活水体中的DNA片段^[10]。在收集环境样本并提取DNA后, 研究人员可以使用针对多个物种中单个基因区域的保守引物进行扩增, 然后获得有关它们在样本中的存在和相对丰度的数据^[8, 11, 12]。该方法不需要利用目标物种的组织或这个生物体, 可以无创地检测目标生物。现场工作也仅限于收集水样, 且水样所需较少, 相比于传统方法缩短了现场采样时间和成本, 非专业人员也能在较短的时间内进行大规模采样^[13-15]。

珠江河口是中国南部十分重要的河口型生态系统^[16]。珠江径流挟带的大量营养盐和有机物质输入大海为鱼类带来丰富的营养物质, 使珠江河口

收稿日期: 2021-10-11; 修订日期: 2022-07-04

基金项目: 国家重点研发计划 (2018YFD0900902); 广东省科技计划项目 (2019B121201001); 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); 中国水产科学研究院基本科研业务费 (2020TD05); 中国水产科学研究院南海水产研究所基本科研业务费 (2019TS13、2021SD18和2021SD01); 广东省重点领域研发计划项目 (2020B1111030001) 资助 [Supported by National Key R & D Program (2018YFD0900902); Guangdong Science and Technology Planning Project (2019B121201001); Guangdong Provincial Laboratory of Southern Marine Science and Engineering (Guangzhou) Major Project of Talent Team Introduction (GML2019ZD0605); Basic Scientific Research Business Fee of Chinese Academy of Fishery Sciences (2020TD05); Basic Scientific Research Business fee of Nanhai Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences (2019TS13, 2021SD18 and 2021SD01); R & D Plan Project in Key Areas of Guangdong Province (2020B1111030001)]

作者简介: 蒋佩文 (1997—), 男, 硕士研究生; 研究方向为水生生物学。E-mail: wdnmd19974529@163.com

通信作者: 徐姗楠 (1979—), 女, 博士, 研究员; 主要从事海洋生物学研究。E-mail: xushannan@scsfri.ac.cn

成为鱼类多样性和渔业资源非常丰富的海域^[17,18]。由于过大的捕捞强度和海洋开发,以及生态环境恶化,导致鱼类多样性下降和渔业资源衰退^[19]。在过去,珠江河口鱼类多样性的评估主要采用底拖网方式进行。黄吉万等^[20]在珠江口伶仃洋使用拖网船调查捕获鱼类57种,Shannon-Weiner多样性指数表现为秋季高于春季。袁梦等^[21]珠江口南沙海域通过底拖网获得24种鱼类,Shannon-Wiener多样性指数为2.07,显示群落结构相对简单。此外了解环境因子对鱼类群落结构的影响对保护其多样性有着重要意义。Kuang等^[22]研究表明浊度、总氮和 NO_3^- 影响珠江口鱼类群落的功能性状和多样性。肖瑜璋等^[23]研究表明盐度和溶解氧含量为影响仔稚鱼个体数量的较显著因子。Hou等^[24]研究显示鱼类浮游生物组合结构受到海平面异常、盐度、水深、10 m深度温度和离岸距离的强烈影响。

目前,环境DNA宏条码技术也已经初步应用于珠江河口海域鱼类多样性研究。Zou等^[4]结合环境DNA宏条码(以线粒体12S rRNA片段为标记)和底拖网方法调查了珠江入海口南沙湿地生态系统中鱼类的多样性及其季节性变化,检测出33科78种鱼类,表明环境DNA宏条码方法可用于鱼类多样性季节性波动的监测。Cheang等^[25]在珠江口香港水域使用环境DNA宏条码(以线粒体CO I片段为标记)检测到22种鱼类。然而,这两项研究的区域均较小,为了全面了解珠江河口鱼类多样性现状,本研究利用底拖网和环境DNA宏条码技术对整个珠江河口海域进行了研究,并分析了鱼类多样性空间差异以及与环境因子的关系,以期对珠江河口生物多样性监测和水生生物保护提供新的技术参考。

1 材料与方法

1.1 研究水域

珠江河口位于南海北部,广东省南部,属咸淡水的交汇区域,属亚热带海洋季风气候,是重要的河口型生态系统。地理坐标为 $21^{\circ}50'—23^{\circ}00'N$, $113^{\circ}30'—114^{\circ}00'E$,面积约为 3200 km^2 ,水深8—30 m,盐度1‰—35‰(图1)。珠江年径流量3200多亿 m^3 ,居全国江河水系的第二位,流挟带的大量营养盐入海使珠江河口成为我国近岸海域最具生产力的水域之一。4—9月为丰水期,其河口增水现象显著;10月至次年3月,河口径流变小,为枯水期。

1.2 样本采集

在珠江河口设置11个站点,盐度2.65‰—32.52‰,基本覆盖珠江河口水域(图1)。于2020年3月进行了水样采集和拖网采样。

利用环境DNA宏条码检测的水样通过采水器采集,采样站位共11个,分别采取采集表层水(水下1 m)、中层水(水深小于10 m未取中层水)和底层水(离底1 m),每层水各5 L,混合后进行过滤,滤膜为 $0.45 \mu\text{m}$ 玻璃纤维滤膜(金晶,上海),1张膜过滤1 L水样,每个站点过滤8张滤膜,滤膜置于离心管中,液氮保存。每个站点使用1 L蒸馏水进行过滤作为空白过滤对照。所有采水器和水壶在采样前均经过10%次氯酸钠消毒。相关环境因子数据如深度、透明度、水温、盐度、pH及溶解氧等采用多功能水质参数仪与水样同步采集,每个站位各1次。

底拖网站位共9个(A1和A11站点由于处于航道和垃圾沉积物过多无法进行拖网),具体如图1。单拖网网具的上纲长度为36 m,网口口目为5 cm,囊网网目为3 cm,网衣全长50 m,拖网时间0.5 h。底拖网获取的渔获物经初步分类后,冷冻保存于船舱,航次结束后冷藏运回实验室并于 -20°C 保存。鱼类物种鉴定根据形态学特征进行鉴定,鉴定标准参照《中国鱼类系统检索》^[26]。

1.3 目的片段的获取

为减少外来环境DNA的污染,本实验中所有实

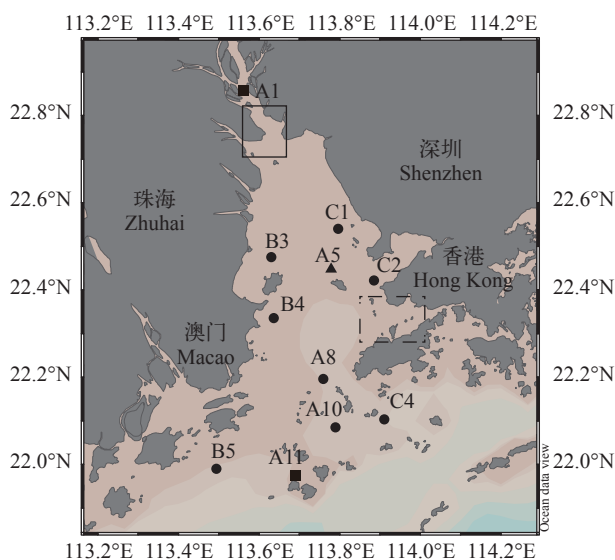


图1 珠江河口采样站位

Fig. 1 Sampling stations in the Pearl River Estuary

正方形图标表示该站点只进行了环境DNA宏条码研究,三角形图标表示该站点只进行了底拖网研究,圆形图标表示该站点同时使用了两种方法。实线矩形代表Zou等^[4]研究区域,虚线矩形代表Cheang等^[25]研究区域

The square icon indicates that the site only conducts environmental DNA macro bar code research, the triangle icon indicates that the site only conducts bottom trawling research, and the circular icon indicates that the site uses two methods at the same time. The solid rectangle represents the research area of Zou *et al.*^[4], and the dotted rectangle represents the research area of Cheang *et al.*^[25]

验耗材均都先经过10%漂白剂消毒, 然后经过2h紫外线照射消毒。PCR扩增实验均使用蒸馏水作为阴性对照, 检测实验室是否存在污染。将滤膜剪碎, 使用DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, 德国)依照使用说明进行提取。

使用引物MiFish-U/E-F: 5'-GTCGGTAAAWCTCGTGCCAGC-3'和MiFish-U/E-F: 5'-CATAGTGGGGTATCTAATCCYAGTTTG-3'^[27]扩增线粒体12S rRNA片段序列作为标记。使用2× Pro Taq Master Mix 试剂盒(艾瑞克公司), 扩增体系(总体积50 μL)如下: 25 μL Mix, 3 μLDNA模板, 正反引物各1 μL, 20 μL去离子水。反应程序: 98℃预变性2min, 98℃变性10s, 60℃复性30s, 72℃延伸20s; 进行25个循环, 最后72℃延伸5min。将PCR产物用去离子水稀释10倍作为第二次扩增的模板, 在原始引物的5'端添加12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。两步PCR扩增后, PCR产物在2%琼脂糖凝胶中检测, 过滤空白或阴性对照均未显示扩增。此外A5站点所有样品也未显示扩增, 故去掉A5站点环境DNA分析, 剩余10个站点, 每个站点实验3个重复样品, 共30个样品。每份样品重复扩增3次, 将同一样品的PCR产物混合后, 使用AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (AXYGEN)纯化, 送公司使用Novaseq 6000测序仪器进行高通量测序。

1.4 历史数据调查

对照往年珠江河口鱼类资源调查文献[4, 16, 20—22, 28, 29], 整理得到珠江河口鱼类名录。珠江河口水域已有两项基于环境DNA宏条码的鱼类多样性研究^[4, 25], 对其所检测鱼类物种进行统计, 物种的有效学名以Fishbase数据库(www.fishbase.org)为准(图1)。

1.5 数据分析

高通量测序数据利用fastp软件(<https://github.com/OpenGene/fastp>)对双端的Raw Reads数据进行滑窗质量剪裁, 根据cutadapt 软件(<https://github.com/marcelm/cutadapt/>)去除首尾两端的引物序列, 利用usearch(<http://www.drive5.com/usearch/> 预设参数包含最小 overlap 长度设置为 16 bp, 拼接序列的 overlap 区允许的最大错配 5 bp 等), 过滤不符合的Tags, 获得原始的拼接序列(Raw Tags)。然后利用 fastp 对Raw Tags数据进行滑窗质量剪裁, 得到有效的拼接片段(Clean Tags)。最后使用UPARSE以97%阈值对OTU进行聚类^[30]。

将得到的OTU与Mitofish数据库^[31]和Gen-Bank数据库^[32]进行序列比对。在使用12S rRNA序

列进行环境DNA宏条码分析时, 研究者一般采用96%—100%作为种的相似度阈值^[4, 12, 33—35]。我们在之前的研究中收集珠江河口172种鱼类12S rRNA序列, 经过比较得出最大种内遗传距离为0.017, 等同于98.3%的种的相似度阈值^[36]。故在本研究中, 选用98.3%作为种的相似度阈值。当OTU序列相似度小于98.3%, 直接被排除。此外本研究只进行鱼类多样性分析, 故剔除了非鱼物种。每个采样点3个重复样品匹配到物种的序列数进行合并处理。

使用Excel统计环境DNA宏条码和底拖网检测到的鱼类目、科、属和种。为比较环境DNA宏条码和底拖网方这两种方法的研究结果, 仅选取共有的8个站位数据, 具体站位如图1。为比较两种方法所检测地区Alpha多样性, 使用R软件中的vegan包计算基于物种丰富度数据计算Shannon指数和Simpson指数, 随后采用t检验进行两种指数的差异分析^[37]。为比较两个方法在检测各个站点空间分布差异, 使用R软件的vegan包基于Bray-Curtis距离进行主坐标分析(Principal coordinates analysis, PCoA)^[37]。为了解鱼类群落与环境因子的关系, 使用R软件中的vegan包进行去趋势对应分析(Detrended correspondence analysis, DCA), 基于环境DNA宏条码和底拖网两种方法的Axis length前4个轴均小于4, 所以选用冗余分析(Redundancy analysis, RDA)进行环境因子分析^[37]。

2 结果

2.1 珠江河口鱼类多样性

环境DNA宏条码方法获得已知物种12S rRNA序列2099125条, 共比对出15目63科125属175种鱼类(表1)。在珠江河口9个站点底拖网采样中, 发现9目22科39属47种鱼类。综合两种方法, 共获得15目63科128属179种鱼类(表1)。共有鱼类43种(占底拖网91.49%), 36属(占总检测属94.87%), 22科(占总检测科100%; 图2), 此外通过环境DNA宏条码未能检测到4种物种分别是斑鲦(*Konosirus punctatus*)、南方鲇(*Callionymus meridionalis*)、尖嘴鲃(*Dasyatis zugei*)和硬头骨鲻(*Osteomugil strongylocephalus*), 这些物种仅由底拖网检测到。

通过环境DNA宏条码所检测reads数最多的8个物种依次是棘头梅童鱼(*Collichthys lucidus*; 21.04%)、黄泽小沙丁(*Sardinella lemuru*; 19.82%), 大黄鱼(*Larimichthys crocea*; 7.05%)、眶棘双边鱼(*Ambassis gymnocephalus*; 6.52%)、中华小公鱼(*Stolephorus chinensis*; 5.93%)、凤鲚(*Coilia mystus*; 5.86%)、银鲳(*Pampus argenteus*; 5.04%)和龙头鱼

(*Harpadon nehereus*; 4.14%), 这8种鱼类在10个采样点的总序列丰度远高于其他物种, 是环境DNA宏条码调查的优势种(图 3A)。通过底拖网所采集最多的6个物种依次是赤鼻棱鲷(*Thryssa kammalensis*; 18.62%)、颈带鲷(*Nuclequula nuchalis*; 16.28%)、鹿斑鲷(*Secutor ruconius*; 16.01%)、杜氏棱鲷(*Thryssa dussumieri*; 10.50%)、中华小公鱼(*Stolephorus chinensis*; 10.20%)和凤鲚(*Coilia mystus*; 8.06%), 这6种鱼类在9个采样点的总数目远高于其他物种, 表明这6种鱼类是底拖网调查的优势种(图 3B)。

2.2 珠江河口历史调查数据

综合文献调查, 我们统计得出10年内珠江河口底拖网捕获鱼类332种, 与本研究环境DNA宏条码方法共同检测出115种(图 3A)。Zou等^[4]通过环境DNA宏条码在珠江河口南沙湿地检测鱼类57种, 与本研究环境DNA宏条码方法共同检测出22种(图 3B); Cheang等^[25]通过环境DNA宏条码在珠江河口外海口检测出鱼类22种, 与本研究环境DNA宏条码方法共同检测出1种, 为双带缟虾虎(*Tridentiger bifasciatus*; 图 3C)。

2.3 不同调查方法的比较

底拖网8个站点的平均Shannon指数为2.58, 而环境DNA宏条码的平均Shannon指数为3.37, 环境DNA宏条码显著大于底拖网方法($P < 0.001$; 图 4A); 底拖网8个站点的平均Simpson指数为0.77, 环境

DNA宏条码的平均Simpson指数为0.82, 环境DNA宏条码显著大于底拖网方法($P < 0.05$; 图 4B)。两种指数均表示环境DNA宏条码所检测的珠江河口鱼类群落 α 多样性显著大于底拖网方式。

由图 5A可知, 在使用环境DNA宏条码检测珠江河口鱼类空间分布时, 基于Bray-Curtis距离的PcoA结果显示C1、C2、C4、B4和B5十分接近, 表示这5个站点鱼类群落结构具有很大的相似性, 其余A8、A10和B3三个站点相距较远, 形成了4种鱼类群落结构。而使用底拖网方法基于Bray-Curtis距离PCOA分析结果表示, 8个站点之间鱼类群落结构均存在差异, 其中C1和C2较为接近, A8和B5较为接近, B3和B4较为接近, C4和A10较为接近(图 5B)。这表示两种方法在检验珠江河口鱼类群落结构的分布存在差异。

2.4 环境因子对珠江河口鱼类群落的影响

利用环境因子与各站点鱼类序列丰富度进行RDA分析(图 6A), 在使用环境DNA宏条码时, 第1排序轴(RDA1)特征值为42.69%, 第2排序轴(RDA2)特征值为24.59%, 累积百分率为67.28%。透明度、溶解氧和盐度与第1排序轴的相关系数分别是0.44、0.38和0.34, 即沿RDA排序轴第一轴从左到右透明度、溶解氧和盐度逐渐升高, 在所有6个环境因子中, 透明度与第一轴的相关性最大。结果表明使用环境DNA宏条码时, 透明度、溶解氧和盐度是珠江河口鱼类群落结构的主要影响因子。

表 1 通过环境DNA宏条码和底拖网检测珠江河口鱼类类群数量

Tab. 1 The number of fish taxa detected in the Pearl River Estuary from eDNA metabarcoding and bottom trawling

目Order	科Family			属Genus			种Species		
	环境DNA eDNA	底拖网 Bottom trawling	合计 Total	环境DNA eDNA	底拖网 Bottom trawling	合计 Total	环境DNA eDNA	底拖网 Bottom trawling	合计 Total
真鲨目Carcharhiniiformes	1	0	1	1	0	1	1	0	1
鳐形目Rajiformes	2	1	2	2	1	2	2	1	3
鲈形目Perciformes	37	12	37	78	22	79	104	23	105
鲱形目Clupeiformes	3	3	3	12	7	13	24	12	25
鲽形目Pleuronectiformes	3	0	3	5	0	5	12	0	12
鲷形目Mugiliformes	1	1	1	3	3	4	5	4	6
鲉形目Scorpaeniformes	3	0	3	5	0	5	5	0	5
海龙目Syngnathiiformes	1	0	1	2	0	2	2	0	2
胡瓜鱼目Osmeriformes	1	1	1	2	1	2	2	1	2
巨口鱼目Stomiiformes	1	0	1	1	0	1	1	0	1
鲤形目Cypriniformes	1	0	1	2	0	2	2	0	2
鳗鲡目Anguilliformes	4	1	4	4	1	4	5	1	5
鲑形目Siluriformes	3	1	3	3	1	3	3	1	3
鲉形目Tetraodontiformes	1	1	1	3	1	3	3	1	3
仙女鱼目Aulopiformes	1	1	1	2	2	2	4	3	4
总计Total	63	22	63	125	39	128	175	47	179

在使用底拖网方法时,第1排序轴(RDA1)特征值为90.62%,第2排序轴(RDA2)特征值为5.02%,累积百分率高达95.64%,表明第一轴含有鱼类群落与环境因子之间关系的90%以上信息(图6B)。深度、溶解氧、盐度和pH与第1排序轴的相关系数分别是0.88、0.81、0.64和-0.58,即沿RDA排序轴第一轴从左到右深度,溶解氧,盐度逐渐升高,pH逐渐降低,在所有6个环境因子中,深度与第一轴的相关性最大。结果表明使用底拖网时,深度、溶解氧、盐度和pH是珠江河口鱼类群落结构的主要影响因子。

3 讨论

3.1 环境DNA宏条码适用于珠江河口鱼类多样性的评估

在本研究中,环境DNA宏条码的物种检测率为97.77%(175种),而底拖网方式的物种检测率为26.26%(47种),表明环境DNA宏条码在检测鱼类物种丰富度上要优于拖网方法,并且检测到了真鲨目(Carcharhiniformes)、鲈形目(Pleuronectiformes)、鲉形目(Scorpaeniformes)、海龙目(Syngnathiformes)、巨口鱼目(Stomiiformes)及鲤形目(Cypriniformes)的物种。根据Shannon指数和Simpson指

数显示,环境DNA宏条码所检测的 α 多样性也显著高于底拖网,这表示环境DNA宏条码能更加全面地反映鱼类丰富度和均匀度。因为传统的底拖网调查方法需要训练有素的分类学专家的参与,因此受限制比较大,并且由于栖息地异质性的不同,尤其是地形复杂的河口地区,例如珠江河口地区多航道、河砂开采区和潮汐通道等,水下地貌特征变化大,传统的拖网调查就很难实施,导致无法捕获到所有种类的鱼类,从而低估其鱼类多样性^[38,39]。而环境DNA在空间上是流动的,可以在小的空间和时间尺度上整合生物多样性,并规避由栖息地类型和鱼类行为差异造成的影响^[40,41]。由于单航次的短时间的底拖网捕捞会造成底拖网采集的鱼类多样性偏低,因此需要与多次的历史数据进行比较。

对比历史数据,环境DNA宏条码检测出115种鱼类出现在珠江河口底拖网检测中,占自身检测物种的66%,这表明环境DNA宏条码具有较高的准确率。此外虽然存在34%的物种没有出现在本研究历史统计数据中,例如黄魮(*Dasyatis bennetti*)、日本燕魮(*Gymnura japonica*)和花点鲷(*Hilsa kelee*)等的近海物种,这可能由于珠江河口外海口的底拖网数据十分稀少,导致本研究鱼类目录收集不完整,而本研究有5个环境DNA采样点处于外海口,所以

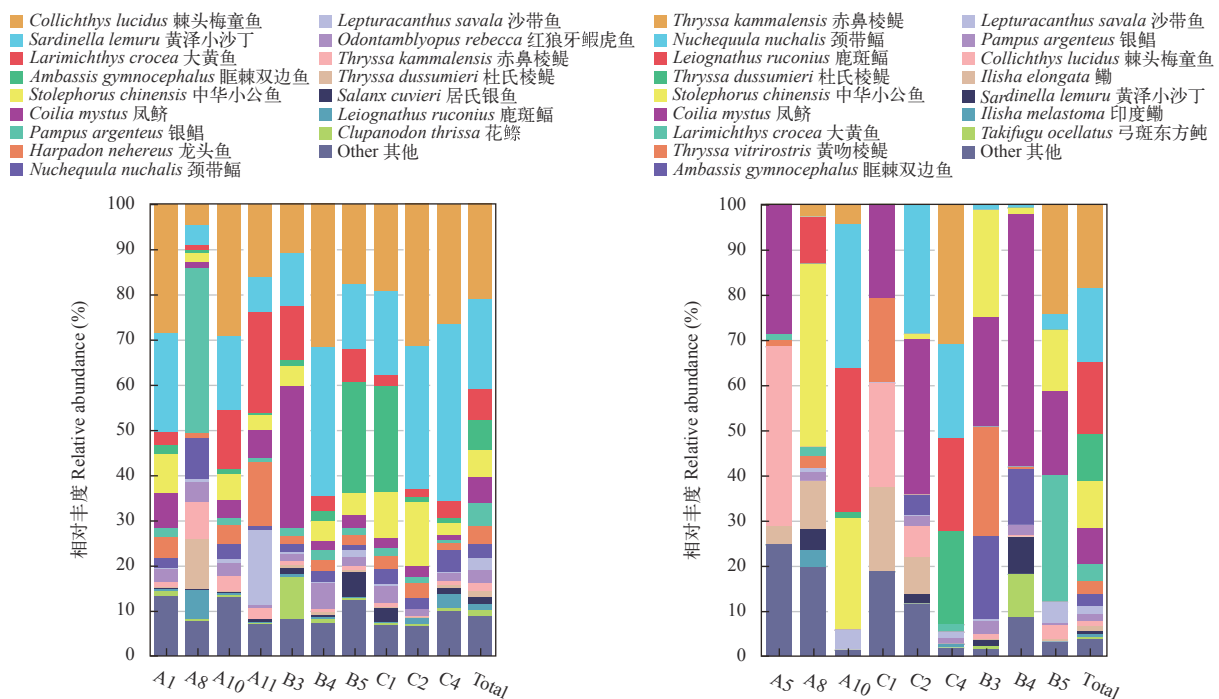


图2 基于环境DNA宏条码(A)和底拖网(B)检测到的各采样点的鱼类物种组成

Fig. 2 The composition of fish species at each sampling site detected by environmental DNA metabarcoding (left) and bottom trawling (right)

Total表示所有站点的鱼类组成集合

Total represents a collection of fish from all sites

造成部分检测物种没有出现在历史统计数据中^[42, 43]。

相比于之前关于珠江河口水域环境DNA宏条码的研究, 本研究所检测物种远多于Zou等^[4]和Cheang等^[25], 这可能由于研究区域大小的不同(图1), 我们的研究范围盐度跨度大, 因此检测鱼类包括了

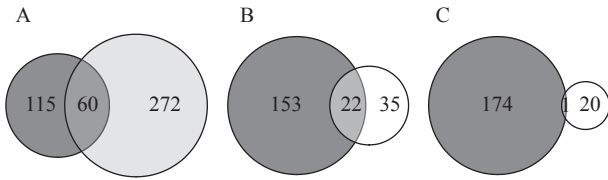


图3 基于环境DNA宏条码检测到的鱼类物种和珠江河口历史调查数据的维恩图

Fig. 3 Venn diagrams based on fish species detected by environmental eDNA metabarcoding and historical survey data of the Pearl River Estuary

灰色区域代表本研究环境DNA宏条码所检测物种, 白色区域分别代表历史底拖网调查(A)、Zou等^[4](B)、Cheang等^[25](C)

The grey area represents the species detected by the environmental DNA metabarcoding in this study, and the white area represents the historical bottom trawling survey (A), Zou, *et al.*^[4] (B), Cheang, *et al.*^[25] (C)

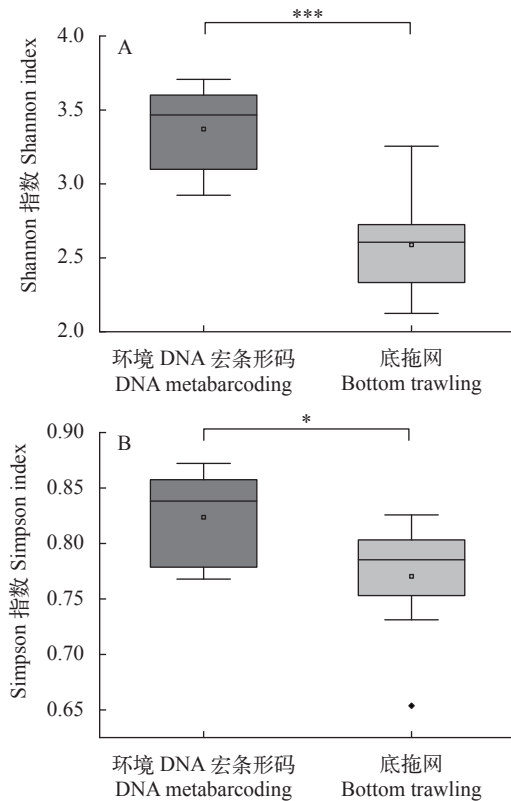


图4 基于Shannon指数(A)和Simpson指数(B)珠江河口鱼类群落 α 多样性

Fig. 4 Fish community α diversity based on Shannon index (left) and Simpson index (right) in the Pearl River Estuary

*表示 $P < 0.05$, ***表示 $P < 0.001$

* indicates $P < 0.05$, *** indicates $P < 0.001$

淡水鱼类、咸淡水鱼类和海水鱼类。此外我们的采样点(A10、A11和C4)处于万山群岛, 该地区是珠江河口海水鱼类重要的产卵育肥场, 鱼类种类繁多, 所以本研究能检测到更多的鱼类^[43]。Zou等^[4]在盐度偏低的南沙湿地进行环境DNA采样, 所以检测到较多淡水鱼, 例如胡子鲇(*Clarias fuscus*)、广东鲂(*Megalobrama terminalis*)和草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)等, 故能单独检测出35种鱼类。本研究与Cheang等^[25]仅检测出1种相同鱼类, 相似的是Zou等^[4]与Cheang等^[25]也仅检测出1种相同鱼类, 这很大程度上由于选取引物的不同。本研究 and Zou等^[4]选用扩增12S rRNA基因区域的Mifish通用引物, 该引物在最近的研究中已证明其性能优于其他竞争引物^[5, 44]。而Cheang等^[25]选用扩增CO I 基因区域的mICOIntF-jgHCO2198引物进行扩增, 该引物针

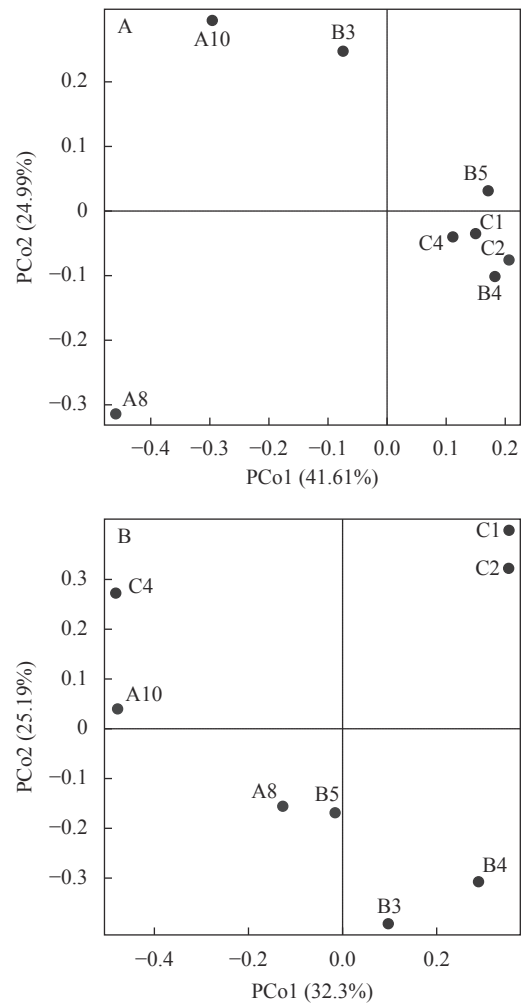


图5 基于环境DNA宏条码(A)和底拖网(B)各站点所检测鱼类的组成相似性

Fig. 5 The composition similarity of fish detected at each site is based on the environmental DNA metabarcoding (A) and bottom trawling (B)

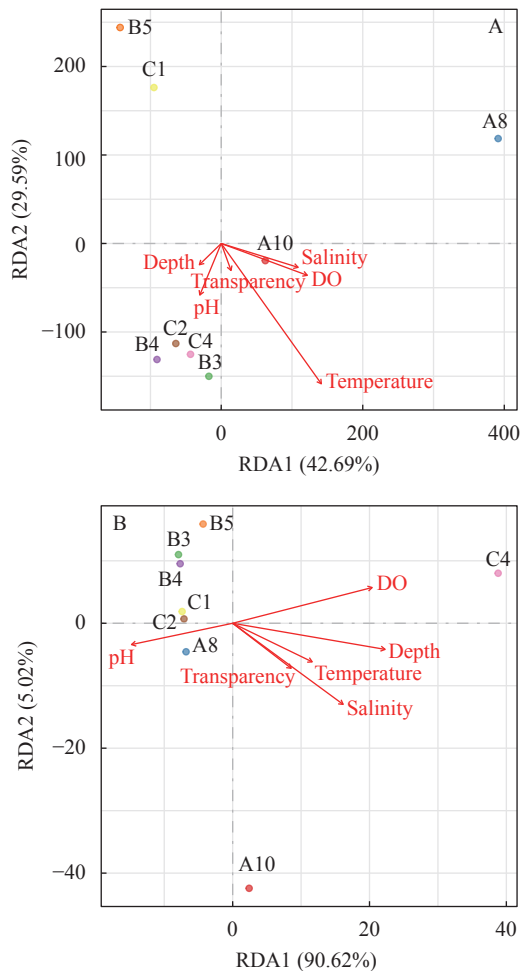


图 6 基于环境DNA宏条码(A)和底拖网(B)所检测鱼类群落与环境因子的关系

Fig. 6 The relationship between fish community and environmental factors based on environmental DNA metabarcoding (A) and bottom trawling (B)

对后生动物, 而Collins等^[45]研究显示扩增 $CO\ I$ 基因区域的引物对原核生物和非鱼类真核生物DNA的非特异性扩增会导致大量的测序浪费, 使其在鱼类环境DNA宏条码中的应用较为困难, 所以造成本研究与该研究物种检测差距巨大。

与本研究底拖网检测相比, 有4种鱼类未被环境DNA宏条码所检测到。其中南方鲇和硬头骨鲷在公共数据库中记录很少, 这可能造成序列未能匹配到。因此一个完整的比对数据库对环境DNA宏条码是十分必要的, 以前的环境DNA宏条码研究也将错误识别归因于比对数据库的不完善^[17, 39]。此外, 在PCR过程中引物和引物结合位点之间的亲和力较低时, 导致有些物种序列无法扩增, 从而导致一些种类不能被识别出来, 这可能是斑鲈和尖嘴鲈无法检测到的原因。为避免今后出现此类情况, 可以使用多对通用引物进行研究^[46, 47]。

3.2 珠江河口鱼类群落结构的特征

在本研究中, 我们采用环境DNA宏条码和底拖网两种方式, 在珠江河口共检测到16目64科128属的179种鱼类。其中, 物种最多的目为鲈形目, 共104种, 占58.10%, 鲱形目次之, 占13.67%, 这与早期珠江口水域鱼类群落结构研究结果一致, 珠江口鱼类鲈形目占绝对优势^[48]。对照往年珠江口鱼类资源实地调查文献^[20, 49—53]显示, 珠江口咸淡水鱼类优势种为棘头梅童鱼、凤鲚、杜氏棱鲷和赤鼻棱鲷, 海水优势种为丽叶鲹(*Alepes djedaba*)、带鱼(*Trichiurus lepturus*)和银鲳; 而本研究综合环境DNA宏条码和底拖网两种方式, 得出珠江河口3月优势种为棘头梅童鱼、黄泽小沙丁、赤鼻棱鲷、颈带鲳、鹿斑鲳、中华小公鱼、凤鲚、杜氏棱鲷、大黄鱼和眶棘双边鱼。与历史数据相比, 本研究优势种缺少3种海水鱼类, 它们主要生活在珠江河口以南的近海, 而在历史数据中, 珠江口水域包括淡水, 河口, 近海3个区域, 而本研究采样点主要集中在河口区域, 虽然也检测到丽叶鲹、带鱼和银鲳, 但物种比例较少, 不能形成优势种^[48, 51]。此外珠江河口不同季节鱼类优势种存在显著差异, 本研究只得出3月鱼类优势种, 故与往年珠江口鱼类优势种存在些许不同^[52]。珠江河口的软骨鱼类一直少有记录, 本研究检测到日本燕魮、尖头斜齿鲨(*Scoliodon laticaudus*)和黄魮, 其中黄魮在近年珠江口鱼类资源实地调查未被发现, 可能由于该物种属于海水种, 栖息在珠江口外围海域, 此外该物种还存在季节性洄游性, 所以在珠江河口内极少捕获^[53]。此外对于珠江河口濒危物种——黄唇鱼(*Bahaba taipingensis*), 通过环境DNA宏条码和底拖网两种方式均未检测到, 表明该物种可能已十分稀少, 应积极开展保护工作。

鱼类群落结构在不同区域存在着差异, 这种组成差异性在维持生态系统功能方面起着至关重要的作用^[33, 54]。在本研究中, 环境DNA宏条码方法通过PCoA分析显示C1、C2、C4、B4和B5这5个站点鱼类群落结构十分相似, 而在地理位置上, C1、C2和B4三个站点与C4和B5两个站点相差较远, 且A8和A10处于该区域中间, 这造成了鱼类群落结构空间重叠。这可能由于在珠江河口潮汐和径流的作用下, 形成了强大的水动力, 导致环境DNA在水体中移动, 一个站点很有可能检测到另一个站点的物种, 即使该物种留在水体的DNA极其稀少^[55]。此外, 在进行高通量测序之前, 多次的PCR扩增可能会放大某些鱼的DNA, 所以这可能最终导致相距较远的鱼类群落结构十分相似。而在底拖网检测中,

通过PCoA分析显示每个站点之间鱼类群落结构存在较大差异, B3和B4站点处于珠江河口西面, 该水域淡水入海口多, 受径流影响大, 盐度相对较低, 存在淡水鱼类; C1和C2站点处于珠江河口东面, 受径流影响小, 盐度适中, 以咸淡水鱼类为主; 剩余B5、A10、A8及C4站点基本处于海洋环境, 盐度较大, 以咸淡水鱼和海水鱼为主^[56]。当然只基于8个站点的数据无法展现出完整的珠江河口鱼类群落空间分布格局, 如需展示更加完整的珠江河口鱼类群落结构图, 需要增加更加密集的站位进行研究。

3.3 盐度和溶解氧对珠江河口鱼类群落结构的影响

鱼类生长繁殖受外界环境因子的影响, 例如温度会影响鱼类新陈代谢的反应速率, 盐度会影响鱼类呼吸代谢和消化能力, 水深影响游泳动物的生长、发育和分布等^[57-59]。本研究对珠江河口鱼类与环境因子进行RDA分析, 基于环境DNA宏条码和底拖网方法均显示盐度和溶解氧是影响该地区鱼类群落的主要环境因子, 均呈正相关。珠江河口鱼类优势种一直以咸淡水种为主, 能适应盐度的变化。珠江河口3月处于枯水期, 地表径流小, 珠江河口内湾水交换能力变弱, 食物能量变少^[60]。此外在徐姗姗等^[61]的研究中, 浮游植物群在枯水期也与盐度呈正相关, 表示浮游植物群在盐度高的水域更适合生长, 为鱼类提供更多的食物, 导致鱼类更喜欢在盐度更高的外湾, 所以与盐度呈正相关。由于珠江河口湾内海域接近广州市区, 珠江径流带来大量有机污染物降解消耗了溶解氧, 导致溶解氧含量较低, 此外, 珠江河口处于枯水期, 湾内水交换条件差, 也是导致溶解氧较低的另一个原因。而鱼类在此期间活动在溶解氧高的外围, 所以导致溶解氧与鱼类群落呈现正相关^[62]。

4 结论

在本研究中, 环境DNA宏条码应用于复杂的河口生态系统, 所检测鱼类大部分符合珠江河口历史调查鱼类, 表明该方法具有较高的准确性。对比同一航次底拖网调查, 环境DNA宏条码可以检测到更多物种, 这意味着在未来可以大量减少采样时间和降低检测频率。两种方法均能展示珠江河口鱼类群落存在空间结构, 不过基于环境DNA宏条码的分析显示空间重叠更多。基于环境DNA宏条码和底拖网均显示溶解氧和盐度是影响鱼类群落结构的主要环境因子。当然比对数据库的不完善及通用引物的局限性, 还是可能会导致我们可能低估鱼类多样性, 并且不能替代提供表型信息和目标物种准确位置的传统方法, 我们建议现代生物监测程

序应将环境DNA宏条码与传统调查结合起来, 可以提供更可靠、更清晰的鱼类多样性图景。

参考文献:

- [1] Jennerjahn T C, Mitchell S B. Pressures, stresses, shocks and trends in estuarine ecosystems-An introduction and synthesis [J]. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2013(130): 1-8.
- [2] Mahoney P C, Bishop M J. Assessing risk of estuarine ecosystem collapse [J]. *Ocean & Coastal Management*, 2017(140): 46-58.
- [3] O'Meara T A, Hillman J R, Thrush S F. Rising tides, cumulative impacts and cascading changes to estuarine ecosystem functions [J]. *Scientific Reports*, 2017(7): 10218.
- [4] Zou K, Chen J, Ruan H, 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.
- [5] Oka S I, Doi H, Miyamoto K, et al. Environmental DNA metabarcoding for biodiversity monitoring of a highly diverse tropical fish community in a coral reef lagoon: estimation of species richness and detection of habitat segregation [J]. *Environmental DNA*, 2021, 3(1): 55-69.
- [6] Afzali S F, Bourdages H, Laporte M, et al. Comparing environmental metabarcoding and trawling survey of demersal fish communities in the Gulf of St. Lawrence, Canada [J]. *Environmental DNA*, 2021, 3(1): 22-42.
- [7] Kaiser M J, Collie J S, Hall S J, et al. Modification of marine habitats by trawling activities: prognosis and solutions [J]. *Fish and Fisheries*, 2002, 3(2): 114-136.
- [8] Clark M R, Althaus F, Schlacher T A, et al. The impacts of deep-sea fisheries on benthic communities: a review [J]. *ICES Journal of Marine Science*, 2015(73): 51-69.
- [9] Stoeckle M Y, Adolf J, Charlop-Powers Z, et al. Trawl and eDNA assessment of marine fish diversity, seasonality, and relative abundance in coastal New Jersey, USA [J]. *ICES Journal of Marine Science*, 2020, 78(1): 293-304.
- [10] 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.
- [11] Rees H C, Maddison B C, Middleditch D J, et al. REVIEW: The detection of aquatic animal species using environmental DNA - a review of eDNA as a survey tool in ecology [J]. *Journal of Applied Ecology*, 2014, 51(5): 1450-1459.
- [12] Berger C S, Hernandez C, Laporte M, et al. Fine-scale environmental heterogeneity shapes fluvial fish communities as revealed by eDNA metabarcoding [J]. *Environmental DNA*, 2020, 2(4): 647-666.
- [13] Jerde C L, Mahon A R, Chadderton W L, et al. "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmen-

- tal DNA [J]. *Conservation Letters*, 2011, **4**(2): 150-157.
- [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] 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.
- [16] Lin K, Mai G M, Wang L F, *et al.* Structure and stability of the fish community in the Pearl River Estuary coastal waters from 2015 to 2018 [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2020, **44**(11): 1841-1850. [林坤, 麦广铭, 王力飞, 等. 2015—2018年珠江口近岸海域鱼类群落结构及其稳定性 [J]. 水产学报, 2020, **44**(11): 1841-1850.]
- [17] Shuai Y P, Chen Y C, Liu Z J, *et al.* Distribution of Pearl diluted water and its ecological characteristics during spring monsoon transitional period in 2016 [J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2021, **40**(5): 63-71. [帅义萍, 陈寅超, 刘子嘉, 等. 2016年春季季风转换期的珠江冲淡水分布与生态特征分析 [J]. 热带海洋学报, 2021, **40**(5): 63-71.]
- [18] Dai M H, Zhai W D, Cai W J, *et al.* Effects of an estuarine plume-associated bloom on the carbonate system in the lower reaches of the Pearl River Estuary and the coastal zone of the northern South China Sea [J]. *Continental Shelf Research*, 2008, **28**(12): 1416-1423.
- [19] Xiao Y Z, Wang R, Zhang B X. Analysis and suggestions on the current situation of marine fishery resources in Pearl River Estuary [J]. *Heilongjiang Science and Technology Information*, 2010(28): 233. [肖瑜璋, 王蓉, 张保学. 珠江口海域海洋渔业资源现状分析与建议 [J]. 黑龙江科技信息, 2010(28): 233.]
- [20] Huang J W, Sun D R, Liu Y, *et al.* Diversity of fish community in *Sousa chinensis* nature reserve of Pearl River Estuary [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2018, **49**(5): 1000-1007. [黄吉万, 孙典荣, 刘岩, 等. 珠江口中华白海豚自然保护区鱼类群落多样性分析 [J]. 南方农业学报, 2018, **49**(5): 1000-1007.]
- [21] Yuan M, Tang Y, Xu S N, *et al.* Community structure of fishery resources from the Nansha waters of Pearl River Estuary in autumn [J]. *South China Fisheries Science*, 2017, **13**(2): 18-25. [袁梦, 汤勇, 徐姗姗, 等. 珠江口南沙海域秋季渔业资源群落结构特征 [J]. 南方水产科学, 2017, **13**(2): 18-25.]
- [22] Kuang T X, Chen W J, Huang S H, *et al.* Environmental drivers of the functional structure of fish communities in the Pearl River Estuary [J]. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2021(263): 107625.
- [23] Xiao Y Z, Wang R, Ou Q, *et al.* Relationship between abundance distribution of fish eggs, larvae and juveniles and environmental factors in the Pearl River Estuary waters in spring [J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2010, **29**(4): 488-495. [肖瑜璋, 王蓉, 欧强, 等. 春季珠江口水域鱼卵和仔稚鱼的分布及其与环境因子的关系 [J]. 台湾海峡, 2010, **29**(4): 488-495.]
- [24] Hou G, Wang J, Liu L, *et al.* Assemblage structure of the ichthyoplankton and its relationship with environmental factors in spring and autumn off the Pearl River Estuary [J]. *Frontiers in Marine Science*, 2021(8): 732970.
- [25] 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.
- [26] Chen T Q, Zheng B S. Chinese Fish System Retrieval [M]. Beijing: Science Press, 1990: 55-536. [成庆泰, 郑葆珊 (1990) 中国鱼类系统检索 [M]. 北京: 科学出版社, 1990: 55-536.]
- [27] 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.
- [28] Yan L, Tan Y G, Yang L, *et al.* The resources community structure of stow-net fishery in the Pearl River Estuary coastal waters of the South China Sea [J]. *Journal of Biology*, 2015, **32**(5): 52-57. [晏磊, 谭永光, 杨吝, 等. 南海珠江口沿岸张网渔业资源群落结构分析 [J]. 生物学杂志, 2015, **32**(5): 52-57.]
- [29] Zhou L, Wang G, Kuang T, *et al.* Fish assemblage in the Pearl River Estuary: spatial-seasonal variation, environmental influence and trends over the past three decades [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2019, **35**(4): 884-895.
- [30] Edgar R C. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. *Nature Methods*, 2013, **10**(10): 996-998.
- [31] Benson D A, Boguski M S, Lipman D J, *et al.* GenBank [J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, **27**(1): 12-17.
- [32] Iwasaki W, Fukunaga T, Isagozawa R, *et al.* MitoFish and MitoAnnotator: a mitochondrial genome database of fish with an accurate and automatic annotation pipeline [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, **30**(11): 2531-2540.
- [33] Lamy T, Pitz K J, Chavez F P, *et al.* Environmental DNA reveals the fine-grained and hierarchical spatial structure of kelp forest fish communities [J]. *Scientific Reports*, 2021(11): 14439.
- [34] Fernández A P, Marques V, Fopp F, *et al.* Comparing environmental DNA metabarcoding and underwater visual census to monitor tropical reef fishes [J]. *Environmental DNA*, 2021, **3**(1): 142-156.
- [35] Valdivia-Carrillo T, Rocha-Olivares A, Reyes-Bonilla H, *et al.* Integrating eDNA metabarcoding and simultaneous underwater visual surveys to describe complex fish communities in a marine biodiversity hotspot [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2021, **21**(5): 1558-1574.

- [36] 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 COI and 12S rDNA gene [J]. *South China Fisheries Science*, 2022, **18**(3): 13-21. [蒋佩文, 李敏, 张帅, 等. 基于线粒体COI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.]
- [37] Dixon P. VEGAN, a package of R functions for community ecology [J]. *Journal of Vegetation Science*, 2003, **14**(6): 927-930.
- [38] Xia Z. Characters of underwater topography and geomorphology in inner lingdingyang firth of the Pearl River (Zhujiang River) estuary [J]. *Marine Geology & Quaternary Geology*, 2005, **25**(1): 19-24. [夏真. 珠江口内伶仃洋水下地形地貌特征 [J]. *海洋地质与第四纪地质*, 2005, **25**(1): 19-24.]
- [39] Li T J. Analysis of lingding bay landform stage evolution and trends [D]. Wuhan: China University of Geosciences, 2017: 10-12. [李团结. 伶仃洋地形地貌阶段性演变过程及趋势分析 [D]. 武汉: 中国地质大学, 2017: 10-12.]
- [40] Stat M, John J, DiBattista J D, *et al.* Combined use of eDNA metabarcoding and video surveillance for the assessment of fish biodiversity [J]. *Conservation Biology*, 2019, **33**(1): 196-205.
- [41] 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.
- [42] Wu H L, Zhong J S, Zhao S L, *et al.* Key to Marine and Estuarial Fisher of China [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2021: 20-888. [伍汉霖, 钟俊生, 赵盛龙. 中国海洋及河口鱼类系统检索 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2021: 20-888.]
- [43] Dai M, Liu H X, Wu F X, *et al.* Net-phytoplankton community and its relationship with environmental factors in the Wanshan Islands adjacent sea [J]. *Marine Environmental Science*, 2019, **38**(4): 540-547. [戴明, 刘华雪, 吴凤霞, 等. 万山群岛海域网采浮游植物与环境因子的关系 [J]. *海洋环境科学*, 2019, **38**(4): 540-547.]
- [44] Bylemans J, Gleeson D M, Lintermans M, *et al.* Monitoring riverine fish communities through eDNA metabarcoding: determining optimal sampling strategies along an altitudinal and biodiversity gradient [J]. *Metabarcoding and Metagenomics*, 2018(2): e30457.
- [45] Collins R A, Bakker J, Wangenstein O S, *et al.* Non-specific amplification compromises environmental DNA metabarcoding with COI [J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2019, **10**(11): 1985-2001.
- [46] 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.
- [47] Elbrecht V, Leese F. PrimerMiner: An R package for development and in silico validation of DNA metabarcoding primers [J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2017, **8**(5): 622-626.
- [48] Li Y Q. Study on fish community structure in Pearl River Estuary waters [D]. Zhanjiang: Guangdong Ocean University, 2008: 2-10. [李因强. 珠江口水域鱼类群落结构研究 [D]. 湛江: 广东海洋大学, 2008: 2-10.]
- [49] Xiao Y Z, Wang R, Zheng Y J, *et al.* Species composition and abundance distribution of ichthyoplankton in the Pearl River Estuary [J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2013, **32**(6): 80-87. [肖瑜璋, 王蓉, 郑琰晶, 等. 珠江口鱼类浮游生物种类组成与数量分布 [J]. *热带海洋学报*, 2013, **32**(6): 80-87.]
- [50] Li Y Z, Chen G B, Sun D R. Analysis of the composition of fishes in the Pearl River estuarine waters [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2000, **24**(4): 312-317. [李永振, 陈国宝, 孙典荣. 珠江口鱼类组成分析 [J]. *水产学报*, 2000, **24**(4): 312-317.]
- [51] Zhan H G. Study on fish community structure in the Zhujiang estuary and adjacent waters [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 1998, **20**(3): 91-97. [詹海刚. 珠江口及邻近水域鱼类群落结构研究 [J]. *海洋学报(中文版)*, 1998, **20**(3): 91-97.]
- [52] Wang D, Lin Z J. Spatial and temporal variations of fish community structure in the Pearl River Estuary waters [J]. *South China Fisheries Science*, 2006, **2**(4): 37-45. [王迪, 林昭进. 珠江口鱼类群落结构的时空变化 [J]. *南方水产*, 2006, **2**(4): 37-45.]
- [53] Chen G B, Liang P W, Zeng L, *et al.* Primary color atlas of marine fish in the South China Sea (II) [M]. Beijing: Science Press, 2019: 40-41. [陈国宝, 梁沛文, 曾雷, 等. 南海海洋鱼类原色图谱(二) [M]. 北京: 科学出版社, 2019: 40-41.]
- [54] Mori A S, Isbell F, Seidl R. β -diversity, community assembly, and ecosystem functioning [J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2018, **33**(7): 549-564.
- [55] 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.
- [56] Heise B, Bobertz B, Harff J. Classification of the Pearl River Estuary via principal component analysis and regionalisation [J]. *Journal of Coastal Research*, 2010(264): 769-779.
- [57] Wang Y, Wu C W. Fish community diversities in reef waters of Zhongjieshan Islands [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, **46**(4): 776-785. [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.]
- [58] Wang X L, Xu B D, Ji Y P, *et al.* Fish community structure and its relationships with environmental factors in Haizhou Bay and adjacent waters of East China in winter [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2013, **24**(6):

- 1707-1714. [王小林, 徐宾铎, 纪毓鹏, 等. 海州湾及邻近海域冬季鱼类群落结构及其与环境因子的关系 [J]. 应用生态学报, 2013, **24**(6): 1707-1714.]
- [59] Huang L C. Research progress on adaptation of teleost to salinity change and osmotic pressure regulation mechanism [J]. *Science and Technology Innovation Herald*, 2016, **13**(9): 87-88. [黄丽聪. 硬骨鱼类对盐度变化的适应及其渗透压调节机制的研究进展 [J]. 科技创新导报, 2016, **13**(9): 87-88.]
- [60] Ding R. Three-dimensional high-resolution numerical study of the tide and circulation in the Pearl River Estuary and its adjacent waters [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2015: 5-10. [丁芮. 珠江口及邻近海域
- 环流潮汐高分辨率数值模拟研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015: 5-10.]
- [61] Xu S N, Yang Y T, Su L, *et al.* Community structure of phytoplankton in the Nansha Sea area of Pearl River Estuary [J]. *South China Fisheries Science*, 2017, **13**(4): 26-33. [徐姗姗, 杨玉滔, 粟丽, 等. 珠江口南沙海域浮游植物群落结构特征 [J]. 南方水产科学, 2017, **13**(4): 26-33.]
- [62] Zeng D N, Niu L X, Tao W, *et al.* Nutrient dynamics in Pearl River Estuary and their eutrophication evaluation [J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2020, **40**(3): 73-82. [曾丹娜, 牛丽霞, 陶伟, 等. 夏季珠江口水域营养盐分布特征及其富营养化评价 [J]. 广东海洋大学学报, 2020, **40**(3): 73-82.]

INVESTIGATING THE FISH DIVERSITY IN PEARL RIVER ESTUARY BASED ON ENVIRONMENTAL DNA MATEBARCODING AND BOTTOM TRAWLING

JIANG Pei-Wen^{1,2,3}, LI Min^{1,3}, ZHANG Shuai¹, CHEN Zuo-Zhi^{1,3} and XU Shan-Nan^{1,3}

(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, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Guangzhou), Guangzhou 511458, China)

Abstract: Fish biodiversity in the Pearl River Estuary is declining due to excessive fishing intensity and marine development. Fish biodiversity assessment is an important part of ecosystem protection and management. However, traditional fish biodiversity assessment tools often have limitations, and the new environmental DNA (eDNA) metabarcoding is a potential biodiversity assessment tool, which can monitor the whole ecosystem quickly and comprehensively. In this study, fish biodiversity was studied at 10 sites in the Pearl River Estuary in March 2020 through a standardized process of eDNA metabarcoding analysis, including water collection, water filtration, eDNA extraction, genetic marker amplification, sequencing and bioinformatic analyses. In addition, bottom trawling method was used for sampling at 9 stations at the same time. We compared the detection results of the two methods. 175 species of fish were detected by eDNA metabarcoding, and 47 species were collected by bottom trawling. Combined with the two methods, 179 species of fish were detected, belonging to 15 orders, 63 families and 128 genera. The two methods jointly identified 43 species of fish, accounting for 24.02% of the total detected species, the survey based on bottom trawling failed to collect most species detected based on eDNA metabarcoding. According to shannon index and Simpson index, the Alpha diversity of fish community detected by eDNA metabarcoding in the Pearl River Estuary was significantly higher than that of bottom trawling ($P < 0.05$). The PCoA results of the two methods provided insight on the spatial structure of fish community in Pearl River Estuary, in which the analysis based on eDNA metabarcoding showed that there is more spatial overlap. Both methods based on redundancy analysis (RDA) showed that dissolved oxygen and salinity are the main environmental factors affecting fish community structure. This study shows that the eDNA metabarcoding is an environmentally friendly and reliable assessment method, and it can be better understood in the estuary fish diversity by carrying it into the existing survey.

Key words: 12S rRNA gene; Environmental DNA; Metabarcoding; Fish biodiversity; Pearl River Estuary