

doi: 10.7541/2021.2021.132

基于eDNA技术的长江上游珍稀特有鱼类国家级自然保护区 重庆段鱼类多样性研究

王梦¹ 杨鑫¹ 王维² 段聪² 刘智皓¹ 陈启亮¹ 李英文^{1*} 沈彦君^{1*}

(1. 重庆师范大学重庆市动物生物学重点实验室, 重庆 401331; 2. 重庆市珍稀特有鱼类国家级自然保护区管理处, 重庆 402260)

摘要: 利用环境DNA宏条形码(environmental DNA metabarcoding; eDNA metabarcoding)检测长江上游珍稀特有鱼类国家级自然保护区重庆段鱼类多样性, 探索适用于长江鱼类多样性监测和保护的新方法, 为后期长江“十年禁渔”效果评估提供一定的基础资料。研究于2021年3月在保护区重庆段共设置6个采样点, 通过水样采集、eDNA捕获及提取、PCR扩增及测序和数据库对比分析等环境DNA宏条形码标准化分析流程来检测鱼类的多样性组成。结果表明保护区重庆段6个采样点中共检测出74种鱼类(不包括未鉴定到种水平的3属), 隶属于6目16科52属, 其中国家级保护鱼类2种, 长江上游特有鱼类10种, 重庆市重点保护鱼类1种, 外来物种8种。鲤属(*Cyprinus*)、鲫属(*Carassius*)、草鱼属(*Ctenopharyngodon*)和黄颡鱼属(*Tachysurus*)在各采样点均被检测到且为优势种。各样点鱼类组成的Alpha和Beta多样性的各项指数差异不大, 表明保护区鱼类的生态结构较为均衡和稳定。总体上, 在现阶段的长江流域鱼类资源监测中, 可根据监测任务的需要, 将环境DNA技术与传统的监测方法结合使用, 用于快速调查长江流域鱼类的多样性组成及分布等。

关键词: 环境DNA; 鱼类多样性; 自然保护区; 长江上游; 珍稀特有鱼类

中图分类号: S932.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2022)01-0002-15



环境DNA(Environmental DNA, eDNA)是指从生物体的皮肤、唾液和分泌物等释放到环境中的混合DNA分子^[1, 2], 其广泛存在于水体、土壤、沉积物和空气等环境介质中。eDNA metabarcoding通常指直接提取环境样本中的总DNA, 并使用特异或通用引物进行聚合酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR), 通过测序、生物信息学分析来识别环境中目标物种序列的一种新兴的生物多样性检测手段^[3, 4]。eDNA技术最早起源于环境微生物学领域^[5], 在2000年之后得到广泛认可和应用^[6]。Ficetola等^[7]在2008年首次利用eDNA技术监测出池塘中存在入侵物种美国牛蛙(*Rana catesbeiana*), 余玥^[8]基于eDNA技术成功检测出长江中下游干流中的15种鱼类, Zhang等^[9]利用eDNA技术研究了长江口及其邻近水域鱼类群落结构的季节变化特征。总之, eDNA技术的出现为水生生态系统生物多样性

性的研究开辟了一条新道路, 整个过程无需采集目标生物个体, 弥补了传统方法调查成本大、缺乏标准化流程和对生态系统干扰高等的不足, 在水生生物多样性评估方面具有极大的应用潜能^[10]。

长江上游珍稀特有鱼类国家级自然保护区(以下简称“保护区”)是长江上游最大的水生生物自然保护区, 涉及三省一市(云南、贵州、四川和重庆), 其流域复杂的地形地貌和发达的河网水系等孕育了丰富的鱼类种类^[11-14], 是我国重要的淡水鱼类资源宝库^[15]。其中重庆段(28°55'—29°20'N, 105°53'—106°24'E)起于重庆市江津区石蟆镇羊石街道, 止于珞璜镇地维大桥, 全长118.8 km, 分为核心区、缓冲区和实验区3个部分, 其主要的保护对象为达氏鲟(*Acipenser dabryanus*)和胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)等珍稀特有鱼类^[16]。重庆段是保护区最下游的江段, 是关系到上游保护区内珍稀特有鱼类

收稿日期: 2021-07-09; 修订日期: 2021-10-12

基金项目: 重庆市林业局渔业资源监测专项(02060403/202009000101); 重庆市自然科学基金面上项目(cstc2019jcyj-msxmX0157)资助
[Supported by the Special Project of Fishery Resources Monitoring of Chongqing Forestry Bureau (02060403/202009000101);
Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2019jcyj-msxmX0157)]

作者简介: 王梦(1996—), 女, 硕士研究生; 研究方向为水域生态学。E-mail: wmyjy1123@163.com

通信作者: 李英文, 教授; E-mail: 377683289@qq.com 沈彦君, E-mail: shenyanjun@cqu.edu.cn *共同通信作者

生存和三峡库区渔业资源增殖的重要通道,对维系我国淡水鱼类种质资源、鱼类生物多样性及三峡库区水域生态系统稳定性具有重要意义^[17]。然而,近年来,由于过度捕捞、水体污染、鱼类繁殖场所的破坏和航道整治工程建设等的影响^[18],长江上游的鱼类资源呈现出明显下降的趋势,在一定程度上打破了原有的水生态系统平衡。

当前,在长江大保护的背景下,为了修复长江流域生态,保护鱼类自然资源,迫切需要了解长江流域鱼类资源的现状及存在的问题,为渔业管理以及生态保护政策的制定与实施提供科学依据。但传统捕捞调查方法费时费力,不仅对鱼类具有伤害性,还必须依赖鱼类分类学家对采集样本进行鉴定^[19],且目前正是“十年禁渔”时期,传统调查方法工作的开展受到很大程度的限制。因此,本文首次运用eDNA技术对保护区重庆段鱼类多样性进行初步评估,探索适用于长江鱼类资源监测和保护的新方法^[20],并为后期长江“十年禁渔”效果评估提供一定的基础资料。

1 材料与方法

1.1 采样时间及采样点的设置

本次调查于2021年3月28日进行,为提高环境DNA检测成功率,本研究结合地理环境和有关鱼类“三场”分布的历史资料,在该江段共布设了三抛河(SPH)、松溉(SJ)、高占滩(GZT)、丁家沱(DJT)、綦江口(QJK)和马夫沱(MFT)6个采样点,各采样点具体分布见图1。

1.2 水样的采集与处理

当前正处于长江“十年禁渔”期,本次调查经过相关渔业主管部门的批准后进行。到达指定采样点后,在每个取样位置记录水体温度、深度和地理坐标,待调查船关闭发动机15min后,用采水器从表层水体采集2 L水样放置于聚乙烯瓶中^[21]。各采样点采集3瓶平行水样。采水器及采样瓶在使用前均用10%漂白粉溶液进行消毒,且在采集过程中,采集人员每次取样后需更换一次性手套^[22]。收集到的水样储存于冷藏条件下,运送回实验室,于24h内使用真空泵抽滤到孔径为0.45 μm的混合纤维素滤膜(Whatman, UK)上。若水样较浑浊,则先将水样用无菌的医用纱布进行粗过滤后再进行抽滤^[19]。每份样品抽滤前后,均对器材进行消毒以清除装置中残余的DNA,避免样品间的交叉污染。且在每次抽滤时,还需设置1个阴性对照来评估是否存在外源DNA污染。最后将滤膜置于4.5 mL无酶冻存管(Thermo)中于-80℃冷冻保存,直至DNA提取。

1.3 水样总DNA提取

使用PowerWater DNA Isolation Kits(Qiagen公司)试剂盒提取滤膜中捕获的水样总DNA,为了减少DNA降解,用无菌TE溶液代替PW6(无菌洗脱液)进行最后一步洗脱。最后用1%的琼脂糖凝胶电泳检测提取到的基因组DNA质量^[23]。每份样品独立提取,为评估提取过程是否存在污染,需设置空白滤膜作为阴性对照。最后将DNA样品置于-20℃下冰箱保存,直至PCR扩增。

1.4 PCR扩增及高通量测序

本研究以鱼类多样性监测中使用最广泛的分

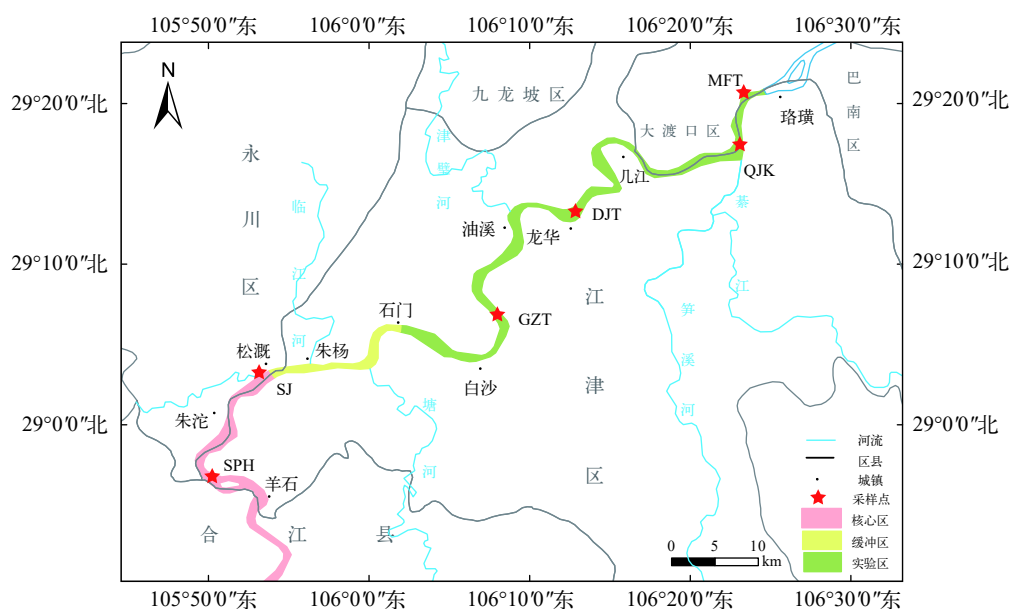


图1 样品采样点分布图

Fig. 1 Information of sampling locations

子标记——线粒体基因12S rRNA为靶点,选取Valentini等^[24]开发的鱼类特异引物“Teleo”(teleo-F: 5'-ACACCGCCCGTCACTCT-3'; teleo-R: 5'-CTTCCGGTACACTTACCATG-3')进行扩增,并添加样本特异性的Barcode序列。PCR采用TransStart Fastpfu DNA Polymerase,扩增为20 μ L反应体系: 4 μ L 5 $\times$ FastPfu Buffer、2 μ L dNTPs、0.4 μ L FastPfu Polymerase、2—5 μ L模板DNA(10 ng/ μ L)和上下游引物各0.8 μ L(10 μ mol/L),最后用ddH₂O将体系补至20 μ L。PCR反应程序:预变性95 $^{\circ}$ C 5min,变性95 $^{\circ}$ C 30s,退火55 $^{\circ}$ C 30s,延伸72 $^{\circ}$ C 45s,终延伸72 $^{\circ}$ C 10min,于10 $^{\circ}$ C保存(变性-延伸-退火为27个循环)。为评估PCR扩增中是否出现污染,需要使用ddH₂O为模板进行PCR阴性对照。进行PCR扩增时,每个样本进行3次重复,并将PCR产物混合。经2%琼脂糖凝胶电泳检测PCR产物。在本研究中,18个样品均获得了可检测的PCR产物。PCR产物胶回收后送至上海凌恩生物科技有限公司通过Illumina NovaSeq 6000测序平台进行高通量测序。

1.5 数据处理

数据质量控制 Illumina PE250测序序列首先根据barcode得到所有样品的有效序列;然后对reads的质量进行质控过滤;再根据PE reads之间的overlap关系,将成对的reads拼接(merge)成一条序列;最后按照barcode和引物序列拆分得到每个样本的优质序列,并在过程中根据正反barcode和引物方向校正序列方向。

OTU聚类与注释 按序列相似性 $\geq 97\%$ 进行OTU聚类分析后将OTU代表序列与MitoFish(<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/>)和NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库进行比对、分类注释,并得到相应的OTU丰度表。在各采样点的平行样品中未匹配到的物种序列被剔除,匹配到物种的序列数按均值处理。

统计分析 本研究以OTU聚类分析结果为基础,进行了物种组成分析、Alpha多样性和Beta多样性分析(包括未鉴定到种水平的3属)。(1)物种组成分析。去除比对到非鱼类(如细菌、鸟类、两栖类和哺乳类等)的数据信息后,筛选出比对至鱼类且identity值 $\geq 97\%$, $E\text{-value} \leq 10^{-5}$ 的OTU,再将比对至同一物种的OTU进行合并。若有OTU无法比对至种水平,则向上一级如属、科等进行统计。在Excel中统计各个样本中每种鱼的有效序列数占比并参考Fishbase数据库和《中国内陆鱼类物种与分布》注释、完善鱼类分类学信息。最后通过R语言绘制各个采样点鱼类组成柱状图等。(2)Alpha多样性分

析。本文选取Chao1指数(Chao1 index)、香农指数(Shannon index)、辛普森指数(Gini-Simpson index)及覆盖度(Coverage)指数,分别反映群落丰富度(Community richness)、群落多样性(Community diversity)及群落覆盖度(Community coverage)。(3)Beta多样性。本研究基于Bray-Curtis距离矩阵进行PCoA分析,探索不同分组样本间的群落组成差异性 or 相似性。

2 结果

2.1 鱼类物种组成

从6个采样点共获得1565条OTU,不同采样点OTU数量差异见图2。由图2可看出,6个采样点有724个共有的OTU。其中QJK的OTU数量最多,共1252条;DJT最少,仅有1054条。对OTU进行注释后,本次调查共检测出鱼类74种(不包括未鉴定到种水平的3属;表1),隶属6目16科52属,含有圆口铜鱼(*Coreius guichenoti*)和长鳍吻鲈(*Rhinogobio ventralis*)两种国家级保护鱼类;长江上游特有鱼类10种;重庆市重点保护鱼类1种。鲤形目(Cypriniformes)的鲤科鱼类最多,总计38种,占鱼类物种总数的48.72%;而鲟形目(Acipenseriformes)、鲟形目(Cypsinodontiformes)和鲑形目(Salmoniformes)的种类最少,均仅含1种。根据序列比对结果,本次调查中的鲫属(*Carassius*)、罗非鱼属(*Oreochromis*)及鲟属(*Acipenser*)未鉴定到种水平。

基于各采样点的序列丰度,在属水平的物种组成情况见图3。由图3可知,鲤属(*Cyprinus*)、鲫属(*Carassius*)、草鱼属(*Ctenopharyngodon*)和黄颡鱼

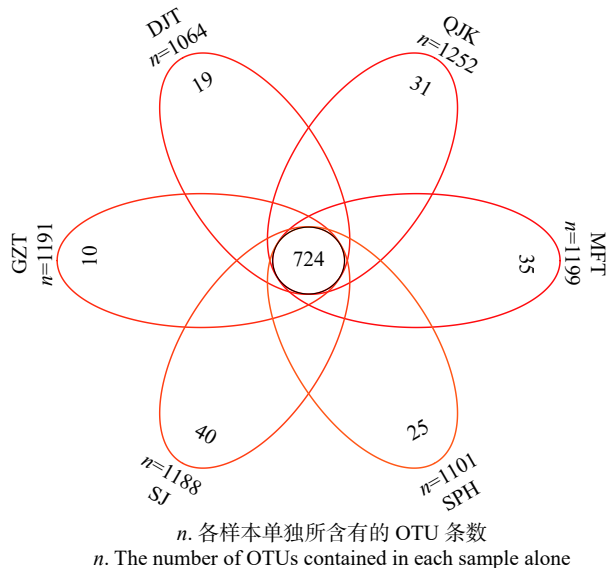


图2 各采样点的韦恩图展示

Fig. 2 Venn diagram display of each sampling point

续表 1

目 Order	科 Family	属 Genus	种 Species	国家级保护鱼 类 National protected fishes	长江上游特有鱼类 Endemic fish in the upper reaches of the Yangtze River	重庆市重点保护鱼类 Key protected fishes in Chongqing	各采样点物种序列数 Read counts of each species at each site					
							MFT	QJK	DJT	GZT	SJ	SPH
鲈形目 Acipenseriformes	鲟科 Acipenseridae	草鱼属 <i>Ctenopharyngodon</i>	草鱼 <i>C. idellus</i>				38946	109725	49241	28934	179716	18471
		赤眼鲱属 <i>Squaliobarbus</i>	赤眼鲱 <i>S. curriculus</i>				44	2419	67	6095	52	26
		鲟属 <i>Rhodus</i>	中华鲟 <i>R. sinensis</i>				3	1	2	2	3	0
		裂腹鱼属 <i>Schizothorax</i>	齐口裂腹鱼 <i>S. prenanti</i>				46	80	108	22	48	55
		鲟属 <i>Carassius</i>	— <i>C. sp.</i>				64709	92255	25467	95326	112548	80187
		鲟属 <i>Hypophthalmichthys</i>	鲢 <i>H. molitrix</i>				342	688	58507	199	247	126
		鲟属 <i>Cyprinus</i>	鳊 <i>H. nobilis</i>				149	600	10682	3416	140	187
		盘鮠属 <i>Discogobio</i>	鲤 <i>C. carpio</i>				136015	215503	195163	109802	210032	154924
		(鱼丹)属 <i>Danio</i>	云南盘鮠 <i>D. yunnanensis</i>				1	2	0	1	0	1
		马口鱼属 <i>Opsariichthys</i>	斑马鱼 <i>D. rerio</i>				1220	9	10	12	1267	1134
		鲟属 <i>Xenocypris</i>	马口鱼 <i>O. bidens</i>				12	23	9	5	3358	17
		薄鲮属 <i>Leptobotia</i>	黄尾鲮 <i>X. davidi</i>		★		152	12368	228	10338	152	80
		副沙鲮属 <i>Parabotia</i>	小眼薄鲮 <i>L. microphthalmia</i>			■	40	3	2	1	2	4
		沙鲮属 <i>Sinibotia</i>	紫薄鲮 <i>L. taeniops</i>				9876	48	30	32	2088	22
		泥鲮属 <i>Misgurnus</i>	花斑副沙鲮 <i>P. fasciatus</i>				49	3500	11	14	14	5
			宽体沙鲮 <i>S. reevesae</i>		★		0	1	0	0	7	1
			中华沙鲮 <i>S. superciliaris</i>				27	17	17	20	7457	19
			泥鲮 <i>M. anguillicaudatus</i>				8	1768	7	2	4	4
			大鳞泥鲮 <i>M. mizolepis</i>				37	42	864	45	9506	15
		副泥鲮属 <i>Paramisgurnus</i>	大鳞副泥鲮 <i>P. dabryanus</i>				116	94	356	1930	27949	65
		高原鲮属 <i>Triplophysa</i>	前鳍高原鲮 <i>T. anterodorsalis</i>				23	17	47	5478	25	70
			长身高原鲮 <i>T. tenuis</i>				13	11	14	891	15	4570
			玫瑰高原鲮 <i>T. rosa</i>				11466	197	388	26001	308	22511
		副鲮属 <i>Paracobotia</i>	短体副鲮 <i>P. potanini</i>		★		18877	280	486	12774	29383	2036
			红尾副鲮 <i>P. variegatus</i>				3669	15	12	13	8	4
		华吸鲮属 <i>Sinogastromyzon</i>	西昌华吸鲮 <i>S. sichangensis</i>				4132	64	143	12373	65	42
		鲟科 <i>Acipenser</i>	— <i>A. sp.</i>				6671	37	41	988	1658	10630

续表 1

目 Order	科 Family	属 Genus	种 Species	国家级保护鱼 类 National protected fishes	长江上游特有鱼类 Endemic fish in the upper reaches of the Yangtze River	重庆市重点保护鱼类 Key protected fishes in Chongqing	各采样点物种序列数 Read counts of each species at each site					
							MFT	QJK	DJT	GZT	SJ	SPH
鲈形目 Perciformes	鲢科Channidae	鲢属Channa	乌鲢C. argus				466	9	1809	5	8	5
	塘鲢科Eleotridae	黄鲃鱼属 Micropercops	小黄鲃鱼 M. swinhonis				17	9	17	10	9	1
	丽鱼科Cichlidae	罗非鱼属 Oreochromis	—O. sp.				3	6	5	10	1502	3
	鲈虎鱼科 Gobiidae	吻鲈虎鱼属 Rhinogobius	波氏吻鲈虎鱼 R. cliffordpopei				3375	10532	5456	88	19191	45
	鲷科Serranidae	鳊属Siniperca	鳊S. chuatsi				57	35	19	39	22	31
			大口鳊S. knerii				7	1	0	1	1	2
			斑鳊S. scherzeri				4447	52	109	6063	44	5246
			小口黑鲈				8	4	9	982	5	3
	太阳鱼科 Centrarchidae	黑鲈属Micropterus	M. dolomieu				4717	8	10	6	10	6
			大口黑鲈 M. salmoides				6318	14675	154	12301	79	65
鲇形目 Siluriformes	鲇科Sisoridae	纹胸鮡属 Glyptothorax	中华纹胸鮡 G. sinensis				3	158	2	0	0	0
		石爬鮡属 Euchiloglanis	黄石爬鮡 E. kishinouyei				28	5183	6	18	21	12
	鲶科Bagridae	鲶属Hemibagrus	大鳍鲶 H. macropterus				178	161	714	435	105	14
		鮡属Leiocassis	长吻鮡L. longirostris				14	10	2030	6	2	2
		拟鲶属Pseudobagrus	短尾拟鲶 P. brevicaudatus				6565	12993	31253	44674	13181	3774
			粗唇鲶 P. crassilabris				5	53	17	64	17	6
			中臀拟鲶 P. medianalis				4	2	3	4	2	1
			细体拟鲶P. pratti				22318	79648	43233	36544	23302	15176
		黄颡鱼属 Pelteobagrus	黄颡鱼 P. fulvidraco				7499	3300	709	40	44	35
			光泽黄颡鱼 P. nitidus				715	6665	187	8588	38	35
鲢形目 Cyprinodontiformes 鲈形目 Salmoniformes	钝头鲈科 Amblycipitidae	鱼央属Liobagrus	白缘鲈 P. vachellii				14757	52	62	3094	48	32
	鲈科Siluridae	鲈属Silurus	L. marginatus				9350	28	23	20	882	6
			鲈S. asotus				20	2123	892	5	482	7
			大口鲈				27	5361	12	8	13	7
	青鲈科	青鲈属Oryzias	青鲈O. latipes				2391	81	122	278	471	444
	Cyprinodontiformes	间银鱼属 Hemilax	短吻间银鱼 H. brachyrostralis				461051	758332	477740	525250	715739	455364
	银鱼科Salangidae											
	鲑形目											
	鲑形目											
	鲑形目											

注：“—”代表能检测到的最大分辨率未能到该分类阶元

Note: “—”means the highest resolution not reach to this taxa level

属(*Tachysurus*)等在各采样点均被监测到并显示出相对较高的序列丰度。此外,由表1的物种序列数可知,除了峨眉鱖(*Acheilognathus omeiensis*)、倒刺鲃(*Spinibarbus denticulatus*)、圆口铜鱼(*C. guichenoti*)和宽体沙鳅(*Sinibotia reevesae*)等12种鱼类仅在个别采样点中检测到,其余鱼类在6个采样点中均被检测到,但在鱼类序列数上呈现出了明显的差异,例如大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)、赤眼鳟(*Squaliobarbus curriculus*)和半鲈(*Hemiculterella sauvagei*)等在各采样点的序列数相差较大。

2.2 Alpha多样性分析

本研究通过计算Chao1、Shannon和Simpson多样性指数及覆盖度Coverage来对该保护区鱼类群落进行Alpha多样性分析,各样本的Alpha多样性指数见表2。由表2可知,各采样点Alpha多样性的各项指数较为均匀。各个样本的Coverage值范围为0.9996—0.9998,表明测序基本覆盖到了全部的OTU数据,能反映样本的真实情况。

2.3 Beta多样性分析

本研究基于各采样点的序列丰度,采用Bray-

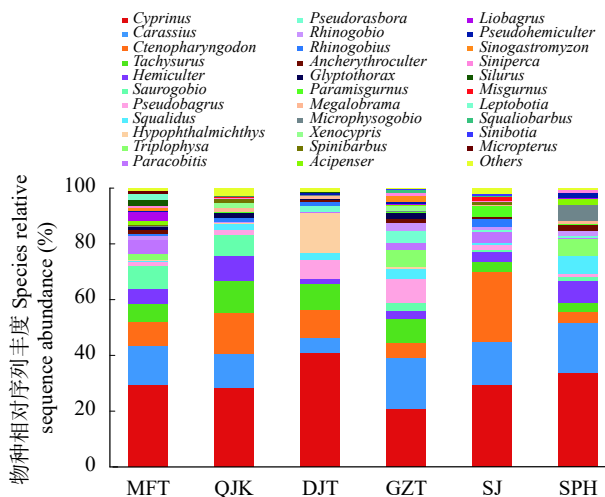


图3 各采样点的鱼类物种组成

Fig. 3 The composition of fish species at each sampling site

表2 各样本的Alpha多样性指数统计

Tab. 2 Alpha diversity index of each sample

样本 Sample	Chao1指数 Chao1	香农指数 Shannon	辛普森指数 Simpson	覆盖度 Coverage
MFT	1272	3.89	0.0714	0.9997
QJK	1360	3.74	0.0830	0.9998
DJT	1218	3.20	0.1336	0.9996
GZT	1285	4.02	0.0521	0.9997
SJ	1296	3.33	0.1142	0.9998
SPH	1204	3.65	0.0940	0.9996

Curtis距离矩阵进行PCoA分析(图4),对比样本间鱼类种类组成的相似性或差异性。由图4可知,采样点MFT与SPH及QJK与SJ具有相似的鱼类多样性,而DJT和GZT具有不同于其他采样点的鱼类组成。

3 讨论

3.1 基于环境DNA的长江鱼类组成

本研究首次运用eDNA技术分析了长江上游珍稀特有鱼类国家级自然保护区重庆段鱼类多样性,共检测出鱼类74种(不包括未鉴定到种水平的3属),其中鲫属(*Carassius*)、罗非鱼属(*Oreochromi*)及鲟属(*Acipenser*)未鉴定到种水平。罗非鱼属(*Oreochromi*)未鉴定到种是因为数据库中没有相应的参考序列;而鲫属(*Carassius*)及鲟属(*Acipenser*)只能鉴定到属,其原因是比对到不同的物种但有相同的比对质量。这可能与扩增片段较短及数据库所含物种信息不完整有一定的关系。

根据相关资料记载,近年来通过刺网和撒网等传统方法监测到有103种渔获物(表3),其中吻鲈属(*Rhinogobio*)、铜鱼属(*Coreius*)、黄颡鱼属(*Pelteobagrus*)及蛇鲈属(*Saurogobio*)等为主要优势种群^[25-30]。在本次调查中,鲤属(*Cyprinus*)、鲫属(*Carassius*)和草鱼属(*Ctenopharyngodon*)鱼类的丰度和占到50%以上,这可能与采样时间和地点有较大关系。为提高环境DNA检测成功率,本研究布设的6个采样点均为历史资料记载的产卵场。其次,本次调查于2021年3月28日进行,这正处于鲤鱼等鱼类的繁殖季节。因此造成鲤属(*Cyprinus*)、鲫属(*Carassius*)和草鱼属(*Ctenopharyngodon*)鱼类的丰度较高。除

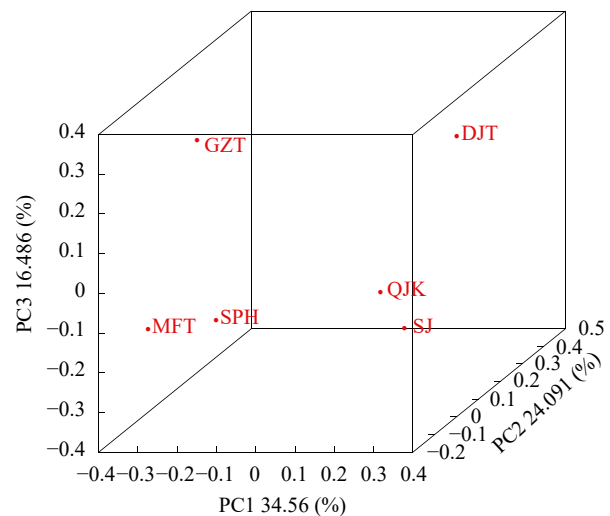


图4 基于Bray-Curtis距离矩阵的鱼类的主坐标分析(PCoA)

Fig. 4 Analysis of fish principal coordinates based on Bray-Curtis distance matrix

表 3 基于传统方法在保护区监测到的渔获物种类

Tab. 3 Types of catches monitored in protected areas based on traditional methods

目 Order	科 Family	属 Genus	种 Species	国家级 保护鱼类 National protected fishes	长江上游特有鱼类 Endemic fish in the upper reaches of the Yangtze River	重庆市重点 保护鱼类 Key protected fishes in Chongqing
鲤形目 Cypriniformes	鲤科Cyprinidae	鲮属 <i>Acheilognathus</i>	兴凯鲮 <i>A. chankaensis</i>			
			无须鲮 <i>A. gracilis</i>			
			大鳍鲮 <i>A. macropterus</i>			
			峨眉鲮 <i>A. omeiensis</i>			
		鲴属 <i>Megalobrama</i>	厚颌鲴 <i>M. pellegrini</i>		★	
			青梢红鲴 <i>C. dabryi</i>			
		红鲴属 <i>Chanodichthys</i>				
		鲃属 <i>Culter</i>	翘嘴鲃 <i>C. alburnus</i>			
			蒙古鲃 <i>C. mongolicus</i>			
		原鲃属 <i>Cultrichthys</i>	红鳍原鲃 <i>C. erythropterus</i>			
			鲮属 <i>Hemiculter</i>		★	
			张氏鲮 <i>H. tchangi</i>		★	
			贝氏鲮 <i>H. bleekeri</i>			
		半鲮属 <i>Hemiculterella</i>	半鲮 <i>H. sauvagei</i>		★	
		飘鱼属 <i>Pseudolaubuca</i>	银飘鱼 <i>P. sinensis</i>			
			寡鳞飘鱼 <i>P. aengraulis</i>			
		铜鱼属 <i>Coreius</i>	圆口铜鱼 <i>C. guichenoti</i>	●	★	
			铜鱼 <i>C. heterodon</i>			
		麦穗鱼属 <i>Pseudorasbora</i>	麦穗鱼 <i>P. parva</i>			
		吻鲃属 <i>Rhinogobio</i>	吻鲃 <i>R. typus</i>			
			圆筒吻鲃 <i>R. cylindricus</i>		★	
			长鳍吻鲃 <i>R. ventralis</i>		★	
			蛇鲃属 <i>Saurogobio</i>			
		银鲃属 <i>Squalidus</i>	银鲃 <i>S. argentatus</i>			
		倒刺鲃属 <i>Spinibarbus</i>	中华倒刺鲃 <i>S. sinensis</i>			
			草鱼属 <i>Ctenopharyngodon</i>			
		赤眼鲮属 <i>Squaliobarbus</i>	赤眼鲮 <i>S. curriculus</i>			
		鲫属 <i>Carassius</i>	鲫 <i>C. auratus</i>			
		鲢属 <i>Hypophthalmichthys</i>	鲢 <i>H. molitrix</i>			
		鲤属 <i>Cyprinus</i>	鲤 <i>C. carpio</i>			
		青鱼属 <i>Mylopharyngodon</i>	青鱼 <i>M. piceus</i>			
		鲢属 <i>Hemibarbus</i>	唇鲢 <i>H. labeo</i>			
			花鲢 <i>H. maculatus</i>			
		棒花鱼属 <i>Abbottina</i>	棒花鱼 <i>A. rivularis</i>			
		鳅鲃属 <i>Gobiobotia</i>	宜昌鳅鲃 <i>G. filifer</i>			
			裸体鳅鲃 <i>G. nudicorpa</i>			
		异鳅鳅属 <i>Xenophysogobio</i>	异鳅鳅 <i>X. boulengeri</i>		★	
		白甲鱼属 <i>Onychostoma</i>	白甲鱼 <i>O. sima</i>			

续表 3

目 Order	科 Family	属 Genus	种 Species	国家级 保护鱼类 National protected fishes	长江上游特有鱼类 Endemic fish in the upper reaches of the Yangtze River	重庆市重点 保护鱼类 Key protected fishes in Chongqing
		鲮属 <i>Cirrhinus</i>	麦瑞加拉鲮 <i>C. mrigala</i>			
		原鲤属 <i>Procypris</i>	岩原鲤 <i>P. rabaudi</i>		★	■
		华鲮属 <i>Sinilabeo</i>	华鲮 <i>S. rendahli</i>			
		麦穗鱼属 <i>Pseudorasbora</i>	麦穗鱼 <i>P. parva</i>			
		鲮属 <i>Sarcocheilichthys</i>	华鲮 <i>S. sinensis</i>			
			黑鳍鲮 <i>S. nigripinnis</i>			
		片唇鲃属 <i>Platysmacheilus</i>	裸腹片唇鲃 <i>P. nudiventris</i>		★	
		马口鱼属 <i>Opsariichthys</i>	马口鱼 <i>O. bidens</i>			
		华鳊属 <i>Sinibrama</i>	华鳊 <i>S. wuitypus</i>			
			四川华鳊 <i>S. taeniatus</i>		★	
		鳊属 <i>Parabramis</i>	鳊 <i>P. pekinensis</i>			
		近红鲃属 <i>Ancherythroculter</i>	黑尾近红鲃 <i>A. nigrocauda</i>		★	
			汪氏近红鲃 <i>A. wangi</i>		★	
			高体近红鲃 <i>A. kurematsui</i>		★	
		似鳊属 <i>Pseudobrama</i>	似鳊 <i>P. simoni</i>			
		鲮属 <i>Xenocypris</i>	黄尾鲮 <i>X. davidi</i>			
			银鲮 <i>X. argentea</i>			
		圆吻鲮属 <i>Distoechodon</i>	圆吻鲮 <i>D. tumirostris</i>			
		鲮属 <i>Rhodeus</i>	中华鲮 <i>R. sinensis</i>			
	胭脂鱼科 Catostomidae	胭脂鱼属 <i>Myxocyprinus</i>	胭脂鱼 <i>M. asiaticus</i>	●		
	鳅科 Cobitidae	薄鳅属 <i>Leptobotia</i>	长薄鳅 <i>L. elongata</i>	●	★	■
			红唇薄鳅 <i>L. rubrilaris</i>		★	■
			紫薄鳅 <i>L. taeniaps</i>			
		沙鳅属 <i>Sinibotia</i>	中华沙鳅 <i>S. superciliaris</i>			
		副泥鳅属 <i>Paramisgurnus</i>	大鳞副泥鳅 <i>P. dabryanus</i>			
		泥鳅属 <i>Misgurnus</i>	泥鳅 <i>M. anguillicaudatus</i>			
		副鳅属 <i>Paracobitis</i>	短体副鳅 <i>P. potanini</i>		★	
			红尾副鳅 <i>P. variegatus</i>			
		副沙鳅属 <i>Parabotia</i>	花斑副沙鳅 <i>P. fasciata</i>		★	
			双斑副沙鳅 <i>P. bimaculata</i>			
		高原鳅属 <i>Triplophysa</i>	贝氏高原鳅 <i>T. bleekeri</i>			
			短尾高原鳅 <i>T. brevicauda</i>			
	平鳍鳅科 Homalopteridae	犁头鳅属 <i>Lepturichthys</i>	犁头鳅 <i>L. fimbriata</i>			
		金沙鳅属 <i>Jinshaia</i>	短身金沙鳅 <i>J. abbreviata</i>		★	

续表 3

目 Order	科 Family	属 Genus	种 Species	国家级 保护鱼类 National protected fishes	长江上游特有鱼类 Endemic fish in the upper reaches of the Yangtze River	重庆市重点 保护鱼类 Key protected fishes in Chongqing	
鲟形目 Acipenseriformes 鲟形目 Perciformes	鲟科		中华金沙鳊 <i>J. sinensis</i>		★	■	
		后平鳊属 <i>Metahomaloptera</i>	峨眉后平鳊 <i>M. omeiensis</i>			■	
	鲟属	<i>Acipenser</i>	达氏鲟 <i>A. dabryanus Duméril</i>	●	★		
	鳢科	<i>Channidae</i>	鳢属	<i>Channa</i>	乌鳢	<i>C. argus</i>	
	鰕虎鱼科		吻鰕虎鱼属		子陵吻鰕虎鱼		
	Gobiidae		<i>Rhinogobius</i>		<i>R. giurinus</i>		
	鲈科	<i>Serranidae</i>	鳊属	<i>Siniperca</i>	鳊	<i>S. chuatsi</i>	
			大眼鳊	<i>S. knerii</i>			
			斑鳊	<i>S. scherzeri</i>			
		太阳鱼科	花鲈属	<i>Lateolabrax</i>	花鲈	<i>L. japonicus</i>	
鲈形目 Siluriformes	Centrarchidae		黑鲈属	<i>Micropterus</i>	大口黑鲈	<i>M. salmoides</i>	
	塘鳢科	<i>Eleotridae</i>	黄魮鱼属		黄魮鱼		
			<i>Hypseleotris</i>		<i>H. swinhonis</i>		
	丽鱼科	<i>Cichlidae</i>	罗非鱼属		罗非鱼		
			<i>Oreochromis</i>		<i>O. mossambicus</i>		
	鲃科	<i>Sisoridae</i>	纹胸鮡属		中华纹胸鮡		
			<i>Glyptothorax</i>		<i>G. sinensis</i>		
					福建纹胸鮡	<i>G. fukiensis</i>	
	鲿科	<i>Bagridae</i>	鲿属	<i>Hemibagrus</i>	大鳍鲿		
					<i>H. macropterus</i>		
		鮠属	<i>Leiocassis</i>	粗唇鮠			
				<i>P. crassilabris</i>			
				长吻鮠			
				<i>L. longirostris</i>			
		拟鲿属	<i>Pseudobagrus</i>	凹尾拟鲿			
				<i>P. emarginatus</i>			
		黄颡鱼属		黄颡鱼			
			<i>Pelteobagrus</i>	<i>P. fulvidraco</i>			
				光泽黄颡鱼			
				<i>P. nitidus</i>			
				瓦氏黄颡鱼			
				<i>P. vachellii</i>			
				长须黄颡鱼			
				<i>P. eupogon</i>			
	鲃科	<i>Siluridae</i>	鲃属	<i>Silurus</i>	鲃	<i>S. asotus</i>	
				大口鲃			
				<i>S. meridionalis</i>			
	钝头鮠科		鮠属	<i>Liobagrus</i>	白缘鮠		
	Amblycipitidae				<i>L. marginatus</i>		
					拟缘鮠		
					<i>L. marginatoides</i>		
					黑尾鮠		
					<i>L. nigricauda</i>		
鲴形目 Salmoniformes	鲴科	<i>Ictaluridae</i>	真鲴属	<i>Ictalurus</i>	斑点叉尾鲴		
					<i>I. punctatus</i>		
	银鱼科	<i>Salangidae</i>	新银鱼属	<i>Neosalanx</i>	太湖新银鱼		
					<i>N. taihuensis</i>		
			大银鱼		<i>Protosalanx</i>		
					大银鱼		
					<i>P. hayloccranius</i>		
合鳃鱼目	合鳃科		黄鳝属	<i>Monopterus</i>	黄鳝	<i>M. albus</i>	
	Synbranchidae						
鳅形目	胎鳅科	<i>Poeciliidae</i>	食蚊鱼属	<i>Gambusia</i>	食蚊鱼	<i>G. affinis</i>	
总计Total				103	4	21	5

上述3个属以外的鱼类与传统方法监测的结果相比, 鱼类结构组成较为一致, 蛇鮈属(*Saurogobio*)、黄颡鱼属(*Pelteobagrus*)、鲮属(*Hemiculter*)及吻鮈属

(*Rhinogobio*)等鱼类为当前优势种。这也凸显了eDNA技术作为一种新兴的生物多样性调查方法,在水生生物监测和保护的应用中具有检测灵敏度

高等特点^[31, 32]。

此外, 本研究还检测出短吻间银鱼(*H. brachyrostralis*)、罗非鱼(*O. sp.*)、大口黑鲈(*M. dolomieu*)和团头鲂(*M. amblycephala*)等7个外来物种, 这可能是该保护区流域周边的渔业养殖场缺乏必要的物种隔离设施及防逃手段, 造成上述外来物种的逃逸而进入长江^[33]。严太明等^[34]的相关研究表明, 外来物种的引入可能会给土著鱼类和生态系统带来巨大的灾难。因此, 对于保护区上游周边的养殖场应当建造物种隔离及防逃设施, 防止外来物种的入侵对保护区土著鱼类资源造成一定的生态胁迫。

3.2 基于环境DNA的长江鱼类多样性分析

表3反映了鱼类群落丰度的Alpha多样性指数^[35]。本研究中的Chao1指数范围为1204—1360, 其中QJK采样点值最大, 表明该采样点的群落丰富度最高; 而SPH采样点指数最小, 表明群落丰富度最低。这可能与各采样点的地理位置和环境有密切关系。QJK位于支流(綦江)与干流(长江)的交汇口, 其水域的复杂性可能使该处的群落丰富度最高; 而SPH采样点位于赵家中坝内浩附近, 内浩进、出口水流紊乱, 激流回旋, 可能在一定程度上导致了鱼类分布量相对较少, 从而使群落丰富度较低。其他样点的Chao1指数较为均匀, 表明该保护区鱼类生态结构较为稳定^[36]。Shannon和Simpson指数均揭示了鱼类的多样性水平^[37]。在本研究中, Shannon和Simpson指数表明GZT鱼类多样性最高, 这可能与小口黑鲈(*M. dolomieu*)、西昌华吸鳅(*S. sichangensis*)和赤眼鳟(*S. curriculus*)等物种的序列丰度较高有关。而DJT鱼类多样性最低, 这可能与该样点的DNA提取浓度偏低有关。不同指数评估鱼类多样性的侧重点具有一定差异, 群落丰富度指数并不能完全衡量群落多样性高低^[38]。如SJ位点的Simpson多样性指数较低但群落丰富度较高, 推测可能与样品中少数鱼类物种序列丰度过高有关。

基于Bray-Curtis距离矩阵的Beta多样性分析显示DJT和GZT两个采样点与其他样点的鱼类组成相似度较低, 共有物种较少(图4)。这可能是受到了自然因素和人为因素的共同影响。DJT和GZT分别位于保护区的高占滩和丁家沱附近, 其周围人为活动频繁。如耕种养殖及浣洗衣物等活动会改变河流中氮磷含量, 从而影响到鱼类营养物质的获取及鱼类多样性^[39, 40]。从自然因素来看, 刘军等^[41]探究了长江上游主要河流的鱼类分布与流域面积、含沙量和平均径流量等自然地理、水文变量有着密切关系。其中以含沙量为代表的悬浮物浓度会对鱼类的生存和生长产生影响, 从而改变鱼类多样

性^[42, 43]。DJT和GZT两个采样点较其他采样点水样更为浑浊, 所以与其他样点的鱼类组成相比, 在一定程度上表现出了差异性。而其他各样点共有物种较为集中, 这可能与采样点之间距离较近, 鱼类可以进行频繁的交流有关。

3.3 影响eDNA检测的因素

由于长江流域环境的复杂性, eDNA的产生及降解速率易受水温、pH、流速、紫外线和水域底质等诸多环境因素的影响^[44, 45]。本次调查共设置6个采样点, 18个样品。其中仅DJT采样点的PCR扩增结果不理想, 在3个平行样品中, 一个样品PCR产物浓度偏低, 其余2个样品PCR产物目的条带太弱或未检测到。而其余5个采样点PCR扩增结果达到A, 即产物目的条带大小正确, 浓度合适, 符合测序要求。本研究认为造成这种差异性可能与该采样点的环境有密切关系。eDNA得率除了水样本身所包含的生物物质多少之外, 还受到单张滤膜抽滤体积、水样泥沙含量和抽提操作等多种因素影响^[46]。DJT采样点位于保护区重庆段丁家沱附近, 该处水样浑浊, 泥沙含量较高, 在进行eDNA抽提时, 这些泥沙导致抽滤速度慢、耗时长。这就有可能使部分DNA片段在抽滤时发生了降解, 从而影响了DNA的提取结果和浓度。此外, 泥沙可能会吸附一些脱落游离的DNA, 这也可能会对DNA抽提效率产生一定的影响^[23]。因此, 在进行采样时应尽量选择泥沙较少的区域, 或者在过滤时用一次性的医用纱布进行粗过滤后再对水样进行过滤^[19]。此外, 还可以选用孔径较大的滤膜进行预过滤后再将滤液重新过滤到孔径较小的滤膜上。

3.4 长江流域鱼类资源保护建议

在本次调查中, 6个采样点共监测到的鱼类种类为74种(不包括未鉴定到种水平的3属), 其中包含小眼薄鳅(*L. microphthalmus*)、圆口铜鱼(*C. guichenoti*)、汪氏近红鲌(*A. wangi*)和短体副鳅(*P. potanini*)等长江上游特有鱼类。然而, 环境DNA未检测到有历史资料记载的达氏鲟(*A. dabryanus*)和岩原鲤(*P. rabaudi*)等珍稀特有鱼类, 可能是因为上述长江特有鱼类在该江段的资源量较为稀少, 从而在环境中缺少对应的物种DNA。如不采取有效措施, 可能会导致这些长江鱼类的资源量进一步下降。而鱼类作为水生态系统的重要组成部分, 其物种多样性及组成结构的变化会影响水生态系统的健康状态^[47]。因而, 保护鱼类多样性对于水生态系统的稳定具有重大的意义。为此, 针对长江流域鱼类资源的保护提出了以下两点建议: (1)严格监督、合理解决保护区段流域生态安全问题。比如合理

搭建人工鱼巢和人工鱼礁; 及时关注流域内生物入侵情况, 筑好生态安全屏障; 增殖放流应合法合理, 征求相关科研人员专业建议; 密切关注沿江城镇和企业排污问题, 从源头控制污染负荷; 严格监管两岸消落带及中坝上作物种植和畜禽养殖, 避免面源污染对鱼类生境产生影响^[11, 48]。(2)加强科学研究, 建立适应性管理机制。尽管长江流域鱼类资源丰富, 但缺乏绝大部分鱼类的基本生物学信息, 使得我们无法对其种群状态进行准确评估, 同时也不利于人工繁殖等相关保护工作的开展^[49]。因此, 建议全面调查长江流域鱼类的物种数量、种群状况和受威胁程度等, 系统开展鱼类基础生物学和生态学研究, 重点研究珍稀特有鱼类的人工繁殖技术; 同时加强水生态系统的健康监测^[50], 建立适应性管理机制。

4 结论

传统的鱼类资源调查耗时费力, 而eDNA技术在灵敏度、标准化和种类鉴别等方面均优于传统方法, 且操作简单, 在鱼类多样性的监测与保护工作中具有巨大的应用前景。本研究首次运用eDNA技术调查长江上游珍稀特有鱼类国家级自然保护区重庆段鱼类多样性, 共检测出鱼类74种(不包括未鉴定到种水平的3属), 成功验证了eDNA技术检测长江鱼类物种组成的有效性和可行性。各样点的鱼类Alpha和Beta多样性分析结果差异较小, 表明该保护区鱼类的生态结构较为稳定。在现阶段的长江鱼类资源监测中, 虽然eDNA技术无法完全取代传统的鱼类监测方法, 但可根据监测任务的需要, 与传统监测方法结合使用, 用于快速调查长江鱼类的多样性组成及分布等, 为后期长江“十年禁渔”效果评估提供一定的基础资料。

致谢:

感谢陶晔、查富蓉和刘静(上海凌恩生物公司)在生物信息学分析工作中提供的帮助; 感谢重庆市珍稀特有鱼类国家级自然保护区管理处工作人员在本次采样中所提供的帮助。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] Edgardo E D, Gregory R M. History, applications, methodological issues and perspectives for the use of environmental DNA (eDNA) in marine and freshwater environments [J]. *Revista de Biología Tropical*, 2014, **62**(4): 1273-1284.
- [3] Deiner K, Walser J, 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.
- [4] Ruppert K M, Kline R J, Rahman M S. Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA [J]. *Global Ecology and Conservation*, 2019(17): e547.
- [5] Goldberg C S, Turner C R, Deiner K, *et al.* Critical considerations for the application of environmental DNA methods to detect aquatic species [J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2016(7): 1299-1307.
- [6] Hänfling B, Lawson Handley L, Read D S, *et al.* Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods [J]. *Molecular Ecology*, 2016(25): 3101-3119.
- [7] Ficetola G F, Miaud C, Pompanon F, *et al.* Species detection using environmental DNA from water samples [J]. *Biology Letters*, 2008(4): 423-425.
- [8] Yu Y. Study on fish diversity of Yueqing Bay based on environmental DNA technology [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2020: 2-6. [余玥. 基于环境DNA技术的乐清湾鱼类多样性研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2020: 2-6.]
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Liu F, Lin P C, Li M Z, *et al.* Status quo of fish resources in the Yangtze River basin and countermeasures for protection [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2019, **43**(S1): 144-156. [刘飞, 林鹏程, 黎明政, 等. 长江流域鱼类资源现状与保护对策 [J]. *水生生物学报*, 2019, **43**(S1): 144-156.]
- [12] Tang Q Y, Li M Z. Fish biodiversity and fisheries in the Yangtze River [J]. *China Nature*, 2014(2): 2-11. [唐琼英, 黎明政. 休渔十年何时实现——长江鱼类多样性及长江渔业 [J]. *大自然*, 2014(2): 2-11.]
- [13] Peng C L, Chen W Z, Ye D X, *et al.* Status quo of fish resources and analysis of community structure in the Yichang section of the Yangtze River [J]. *Express Water Resources & Hydropower Information*, 2019, **40**(2): 79-83. [彭春兰, 陈文重, 叶德旭, 等. 长江宜昌段鱼类资源现状及群落结构分析 [J]. *水利水电快报*, 2019, **40**(2): 79-83.]
- [14] Zhang X B, Yang S F, Yang W, *et al.* A study on early fish resources distribution in the Yibin-Jiangjin and Fuling-Fengdu sections of the upper Yangtze River [J].

- Freshwater Fisheries*, 2021, **51**(5): 51-59. [张先炳, 杨胜发, 杨威, 等. 长江上游宜宾-江津与涪陵-丰都江段鱼类早期资源分布研究 [J]. *淡水渔业*, 2021, **51**(5): 51-59.]
- [15] Fish Research Laboratory, Hubei Institute of Hydrobiology. Yangtze River Fish [M]. Beijing: Science Press, 1976: 20-58. [湖北省水生生物研究所鱼类研究室. 长江鱼类 [M]. 北京: 科学出版社, 1976: 20-58.]
- [16] Sun Z Y, Wang D C. Practical innovation of nature reserve management under the conditions of hydropower development: taking the national nature reserve of rare and endemic fish in the upper reaches of the Yangtze River as an example [J]. *Journal of Yangtze River Scientific Research Institute*, 2020, **37**(11): 1-7. [孙志禹, 王殿常. 水电开发条件下自然保护区管理的实践创新——以长江上游珍稀特有鱼类国家级自然保护区为例 [J]. *长江科学院院报*, 2020, **37**(11): 1-7.]
- [17] Tian H W, He C, Liu M D, *et al.* A study on the structure of the three-layer gillnet catch in the upper mainstream of the Yangtze River [J]. *Freshwater Fisheries*, 2016, **46**(5): 37-42. [田辉伍, 何春, 刘明典, 等. 长江上游干流三层流刺网渔获物结构研究 [J]. *淡水渔业*, 2016, **46**(5): 37-42.]
- [18] Liu M D, Gao L, Tian H W, *et al.* Status of early fish resources in Yichang section of the middle reaches of the Yangtze River [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, **25**(1): 147-158. [刘明典, 高雷, 田辉伍, 等. 长江中游宜昌江段鱼类早期资源现状 [J]. *中国水产科学*, 2018, **25**(1): 147-158.]
- [19] Xu N, Chang J B. Preliminary study on the detection of fish species in environmental DNA samples of the middle and lower Yangtze River [J]. *Journal of Hydroecology*, 2016, **37**(5): 49-55. [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.]
- [20] Xu L, Lin J Y, Xu Y, *et al.* Study on fish diversity of Erhai lake based on environmental DNA macrobarcode [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, **44**(5): 1080-1086. [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.]
- [21] Luo J S. Using environmental DNA to explore the fish diversity of lakes in central Yunnan plateau [D]. Yunnan: Yunnan University, 2019: 19-20. [罗加山. 利用环境DNA探究滇中高原湖泊的鱼类多样性 [D]. 云南: 云南大学, 2019: 19-20.]
- [22] Pillioddavid S, Goldbergcaren S, Arklerobert 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.
- [23] Chen Y C. Application of environmental DNA technology in the investigation of fish resources in the upper reaches of Liuchong River [D]. Chongqing: Southwest University, 2020: 25-28. [陈云川. 环境DNA技术在六冲河上游鱼类资源调查中的应用研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2020: 25-28.]
- [24] Valentini A, Taberlet P, Miaud C, *et al.* Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding [J]. *Molecular Ecology*, 2016(25): 929-942.
- [25] Wu Q W. Scientific Investigation Report on the National Nature Reserve of Rare and Endemic Fish in the Upper Yangtze River [M]. Beijing: Science Press, 2012: 208-214. [危起伟. 长江上游珍稀特有鱼类国家级自然保护区科学考察报告 [M]. 北京: 科学出版社, 2012: 208-214.]
- [26] He T, Wei Y D, Lu Q, *et al.* Investigation of fishery resources status in Chongqing section of the rare and endemic fish nature reserve in the upper Yangtze River [J]. *Open Journal of Fisheries Research*, 2018, **5**(2): 85-97. [何滔, 魏耀东, 卢群, 等. 长江上游珍稀特有鱼类自然保护区重庆段渔业资源现状调查 [J]. *水产研究*, 2018, **5**(2): 85-97.]
- [27] Li Y. Identification of early fish resources in the Jiangjin section of the upper Yangtze River based on DNA barcoding [D]. Chongqing: Southwest University, 2016: 21-24. [李洋. 基于DNA条形码的长江上游江津段鱼类早期资源种类鉴定 [D]. 重庆: 西南大学, 2016: 21-24.]
- [28] Yang Z, Tang H Y, Xu W, *et al.* Interannual variation of fish community structure in the Jiangjin section of the upper reaches of the Three Gorges Reservoir [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2014, **33**(6): 1565-1572. [杨志, 唐会元, 万力, 等. 三峡库区上游江津江段鱼类群落结构的年际变化 [J]. *生态学杂志*, 2014, **33**(6): 1565-1572.]
- [29] Xiong F, Liu H Y, Duan X B, *et al.* Fish community structure and resource utilization in the Jiangjin section of the upper reaches of the Yangtze River [J]. *Journal of Anhui University (Natural Science Edition)*, 2014, **38**(3): 94-102. [熊飞, 刘红艳, 段辛斌, 等. 长江上游江津江段鱼类群落结构及资源利用 [J]. *安徽大学学报(自然科学版)*, 2014, **38**(3): 94-102.]
- [30] Gao T H, Tian H W, Ye C, *et al.* Fish composition and diversity in the mainstream of the National Nature Reserve for Rare and Endemic Fish in the Upper Yangtze River [J]. *Freshwater Fisheries*, 2013, **43**(2): 36-42. [高天珩, 田辉伍, 叶超, 等. 长江上游珍稀特有鱼类国家级自然保护区干流段鱼类组成及其多样性 [J]. *淡水渔业*, 2013, **43**(2): 36-42.]
- [31] Dan X J, Li M, Wang W J. Research progress in the application of environmental DNA (eDNA) technology in aquatic ecosystems [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, **39**(3): 23-29. [单秀娟, 李苗, 王伟继. 环境DNA(eDNA)技术在水生生态系统中的应用研究进展 [J]. *渔业科学进展*, 2018, **39**(3): 23-29.]
- [32] 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): 953-959.
- [33] Ba J W, Chen D Q. Preliminary study on invasive fishes in the three gorges reservoir area and the impact of water storage in the reservoir [J]. *Journal of Lake Sciences*, 2012, **24**(2): 185-189. [巴家文, 陈大庆. 三峡库区的入侵鱼类及库区蓄水对外来鱼类入侵的影响初探 [J]. *湖泊科学*, 2012, **24**(2): 185-189.]
- [34] Yan T M, He J Y, Luo J, *et al.* Evaluation of the health status of the middle and upper reaches of the Nanhe River Basin based on fish diversity and integrity index [J]. *Freshwater Fisheries*, 2021, **51**(5): 3-12. [严太明, 何佳洋, 罗杰, 等. 基于鱼类多样性及完整性指数评价南河中上游流域健康状况 [J]. *淡水渔业*, 2021, **51**(5): 3-12.]
- [35] Chen S J. Analysis of fish and plankton diversity in Chongde lake of Southwest University based on eDNA macrobarcoding technology [D]. Chongqing: Southwest University, 2020: 21-25. [陈世静. 基于eDNA宏条形码技术的西南大学崇德湖鱼类与浮游生物多样性分析 [D]. 重庆: 西南大学, 2020: 21-25.]
- [36] Tang S K, Qian S F, Shen D D, *et al.* Preliminary study on the detection of zooplankton species in Shaobo Lake by environmental DNA technology [J]. *Journal of Aquaculture*, 2021, **42**(3): 13-20. [唐晟凯, 钱胜峰, 沈冬冬, 等. 应用环境DNA技术对邵伯湖浮游动物物种检测的初步研究 [J]. *水产养殖*, 2021, **42**(3): 13-20.]
- [37] He M F. Fish diversity and its influencing factors in the upper and middle reaches of Tingjiang River [J]. *Fujian Journal of Agriculture Sciences*, 2016, **31**(6): 566-574. [何美峰. 汀江中上游鱼类多样性及其影响因子 [J]. *福建农业学报*, 2016, **31**(6): 566-574.]
- [38] Ling J Z, Jiang Y Z, Sun P, *et al.* Application and evaluation of environmental DNA technology in the investigation of fish diversity in Xiangshan Harbor [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, **28**(2): 205-214. [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.]
- [39] Erickson R A, Merkes C M, Jackson C A, *et al.* Seasonal trends in eDNA detection and occupancy of bigheaded carps [J]. *Journal of Great Lakes Research*, 2017, **43**(4): 762-770.
- [40] Shi R J, Tang L H, Gao G D, *et al.* Analysis of the relationship between fish diversity and watershed characteristics in the Yangtze River Basin [J]. *Journal of Tsinghua University (Science and Technology)*, 2018, **58**(7): 650-657. [石睿杰, 唐莉华, 高广东, 等. 长江流域鱼类多样性与流域特性关系分析 [J]. *清华大学学报(自然科学版)*, 2018, **58**(7): 650-657.]
- [41] Liu J, Cao W X, Chang J B. The relationship between fish diversity and watershed characteristics in the main rivers of the upper Yangtze River [J]. *Journal of Jishou University (Natural Sciences Edition)*, 2004(1): 42-47. [刘军, 曹文宣, 常剑波. 长江上游主要河流鱼类多样性与流域特征关系 [J]. *吉首大学学报(自然科学版)*, 2004(1): 42-47.]
- [42] Zheng C Q, Wu W, Wei J, *et al.* Analysis of fish diversity and influencing factors in Dawen River, a Tributary of the lower Yellow River [J]. *Water Resources Protection*, 2020, **36**(6): 31-38, 52. [郑从奇, 武玮, 魏杰, 等. 黄河下游支流大汶河鱼类多样性及影响因子分析 [J]. *水资源保护*, 2020, **36**(6): 31-38, 52.]
- [43] Bai Y B L H, Chen X R. Research progress on the impact of reservoir sediment discharge on fishes in downstream rivers [J]. *Journal of Sediment Research*, 2012(1): 74-80. [白音包力皋, 陈兴茹. 水库排沙对下游河流鱼类影响研究进展 [J]. *泥沙研究*, 2012(1): 74-80.]
- [44] Chen Z, Song N, Minamoto Toshifumi, *et al.* The edna collection method of Zhoushan coastal waters [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, **44**(1): 50-58. [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.]
- [45] 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.
- [46] Wu Y S, Tang Y K, Lin J L, *et al.* Application of environmental DNA in monitoring of Yangtze finless porpoise [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, **26**(1): 124-132. [吴昀晟, 唐永凯, 李建林, 等. 环境DNA在长江江豚监测中的应用. *中国水产科学*, 2019, **26**(1): 124-132.]
- [47] Ma J. Investigation of fish resources and suggestions for protection in Zhengzhou section of the Yellow River [J]. *Henan Fisheries*, 2020(3): 42-44. [马娟. 黄河郑州段鱼类资源调查及保护建议 [J]. *河南水产*, 2020(3): 42-44.]
- [48] Wang J B. Measures for the development of large and medium-sized surface ecological fishery [J]. *South China Agriculture*, 2021, **15**(15): 129-130. [王继斌. 大中型水面生态渔业发展措施 [J]. *南方农业*, 2021, **15**(15): 129-130.]
- [49] Cao L, Zhang E, Zang C X, *et al.* Research on the threatened status and causes of inland fishes in China through the Red List assessment [J]. *Biodiversity Science*, 2016, **24**(5): 598-609. [曹亮, 张鹗, 臧春鑫, 等. 通过红色名录评估研究中国内陆鱼类受威胁现状及其成因 [J]. *生物多样性*, 2016, **24**(5): 598-609.]
- [50] Cao W X. Ecological protection of water area in hydro-elevator grading development in the upper reaches of the Yangtze River [J]. *Technology and Economy of Changjing*, 2017(1): 25-30. [曹文宣. 长江上游水电梯级开发的水域生态保护问题 [J]. *长江技术经济*, 2017(1): 25-30.]

FISH DIVERSITY IN CHONGQING SECTION OF THE NATIONAL NATURE RESERVE FOR RARE AND ENDEMIC FISH IN THE UPPER YANGTZE RIVER BASED ON EDNA TECHNOLOGY

WANG Meng¹, YANG Xin¹, WANG Wei², DUAN Cong², LIU Zhi-Hao¹, CHEN Qi-Liang¹,
LI Ying-Wen¹ and SHEN Yan-Jun¹

(1. *Chongqing Key Laboratory of Animal Biology, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China*; 2. *Chongqing National Nature Reserve Management Office of Rare and Endemic Fish, Chongqing 402260, China*)

Abstract: The aims of this study are: (1) to detect fish diversity in Chongqing section of the national nature reserve of rare and endemic fishes in the upper Yangtze River by using environmental DNA metabarcoding (eDNA metabarcoding), (2) exploring new methods applicable to the monitoring and protection of fish diversity in the Yangtze River, (3) providing certain basic data for the evaluation of the effect of the “10-year ban on fishing in the Yangtze River” later. A total of 6 sampling points were set up in the Chongqing section of the reserve in March 2021. The fish diversity was detected by following procedures, water sample collection, eDNA capture and extraction, PCR amplification and sequencing, database comparison analysis and other environmental DNA metabarcoding standardized analysis. The results showed that 74 fish species were detected (excluding 3 genera that have not been identified at the species level), belonging to 6 orders, 16 families and 52 genera, including 2 national-level protected fish, 10 endemic fish in the upper reaches of the Yangtze River, 1 key protected fish in Chongqing, and 8 invasive species. The genus *Cyprinus*, *Carassius*, *Ctenopharyngodon* and *Tachysurus* were detected at each sampling site and became the dominant species in each site. The various indexes of Alpha and Beta diversity of fish at various points are relatively uniform, indicating that the ecological structure of fish in the reserve is relatively balanced and stable. In summary, this study showed that although environmental DNA metabarcoding cannot completely replace traditional fish resource monitoring methods, it is a good strategy to combine them to quickly investigate the diversity composition and distribution of fish species in the Yangtze River Basin.

Key words: Environmental DNA; Fish diversity; Nature reserve; Upper Yangtze River; Rare and endemic fish