



• 研究报告 •

基于eDNA metabarcoding探究北京市主要河流鱼类分布及影响因素

沈梅¹, 郭宁宁¹, 罗遵兰¹, 郭晓晨², 孙光¹, 肖能文^{1*}

1. 中国环境科学研究院, 北京 100012; 2. 山西农业大学林学院, 山西晋中 030801

摘要: 使用eDNA宏条形码(eDNA metabarcoding)和地笼法检测了北京市3条水系在夏季和秋季两个季节的鱼类多样性, 旨在研究北京市鱼类群落的空间格局特征, 探索适用于北京鱼类生物多样性监测及保护的新方法。结果表明: 在北京市的34个采样点中, 利用eDNA metabarcoding共检测出鱼类55种, 显著高于传统方法所捕获的鱼类种数(35种), 鱼类组成以鲤形目和鲈形目为主。山区河流清水鱼的多样性要显著高于城区河流, 城区河流(北运河水系)群落结构较为单一, 以鲫(*Carassius auratus*)、麦穗鱼(*Pseudorasbora parva*)、泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)等耐污种为优势种; 山区河流(潮白河水系及大清河水系)以宽鳍鱲(*Zacco platypus*)、拉氏鱥(*Rhynchocypris lagowskii*)、马口鱼(*Opsariichthys uncirostris*)等为优势种。不同季节影响清水鱼群落结构的环境因子不同, 夏季主要是总溶解固体和电导率, 秋季主要是海拔和温度。清水鱼丰富度与环境因子及人类活动的相关性表明, 清水鱼的丰富度随着总溶解固体及灯光指数增加而显著降低, 且均与海拔、温度等存在显著相关性。本研究证明了eDNA metabarcoding方法用于监测北京市鱼类多样性及其时空分布的可行性。

关键词: eDNA宏条形码; 鱼类群落; 清水鱼; 生物多样性; 河流

沈梅, 郭宁宁, 罗遵兰, 郭晓晨, 孙光, 肖能文 (2022) 基于eDNA metabarcoding探究北京市主要河流鱼类分布及影响因素. 生物多样性, 30, 22240. doi: 10.17520/biods.2022240.

Shen M, Guo NN, Luo ZL, Guo XC, Sun G, Xiao NW (2022) Explore the distribution and influencing factors of fish in major rivers in Beijing with eDNA metabarcoding technology. Biodiversity Science, 30, 22240. doi: 10.17520/biods.2022240.

Explore the distribution and influencing factors of fish in major rivers in Beijing with eDNA metabarcoding technology

Mei Shen¹, Ningning Guo¹, Zunlan Luo¹, Xiaochen Guo², Guang Sun¹, Nengwen Xiao^{1*}

1 State Environmental Protection Key Laboratory of Regional Eco-Process and Function Assessment, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012

2 College of Forestry, Shanxi Agricultural University, Jinzhong, Shanxi 030801

ABSTRACT

Aims: We used eDNA metabarcoding to detect fish diversity in three river systems of Beijing during summer and autumn. The aim of this study is to explore new methods applicable to monitor and protect fish diversity and study the spatio-temporal patterns of fish community in Beijing.

Methods: A total of 34 sites were surveyed simultaneously using the eDNA metabarcoding and ground cage methods. The main processes of the eDNA method are water sample collection and enrichment, DNA extraction with DNeasy Tissue and Blood DNA, PCR amplification with prism of MiFish-U, high-throughput sequencing by Illumina Miseq and bioinformatics analysis. The data of eDNA metabarcoding, environmental factors and human activity were used for statistical analysis between fish communities and influencing factors. The main processes of the ground cage with three replications were placed at each site waiting 24 h to be collected for species identification, and the species with number were recorded for subsequent analysis.

Results: The result showed that 55 fish species were detected by eDNA metabarcoding was higher than

收稿日期: 2022-04-30; 接受日期: 2022-05-26

基金项目: 巢湖生物资源调查及生态修复示范工程(2021BFFBZ01571-003-04)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: xiaonw@163.com

that captured by the ground cage (35 species). The fish community composition was dominated by Cypriniformes and Perciformes. The diversity of clearwater fish in mountain rivers is significantly higher than urban rivers. Urban rivers (the Beiyun River System) were dominated by pollution-tolerant species such as *Carassius auratus*, *Pseudorasbora parva* and *Misgurnus anguillicaudatus*, with a relatively homogeneous community structure. Mountain rivers (Chaobai River System and Daqing River System) are dominated by *Zacco platypus*, *Rhynchocypris lagowskii* and *Opsariichthys uncirostris*. The community structure of clearwater fish was affected by electrical conductivity and total dissolved solids in summer but by altitude and temperature in autumn. The correlation between the abundance of clearwater fish with environmental factors and human activities showed that the abundance of clearwater fish decreased significantly with the increase by turbidity of water and human activities, and was significant correlation with altitude and temperature.

Conclusion: The study used eDNA metabarcoding to show the diversity and spatio-temporal patterns of major rivers in Beijing, with a focus on the distribution of clearwater fish. The results demonstrate the feasibility of eDNA metabarcoding for monitoring fish diversity and spatial-temporal distribution in Beijing.

Key words: eDNA metabarcoding; fish community; clearwater fish; biodiversity; river

鱼类多样性是水生生物多样性的重要组成,是目前水生生态系统健康监测的关键指标之一(Zou et al, 2020)。传统的鱼类多样性监测方法多为网捕以及地笼等,通过形态学鉴定和计数,识别并记录其丰度(张春光等, 2011; Farriols et al, 2017)。但是传统方法存在生态破坏性大、稀有种和入侵种鉴别困难、耗时耗力、形态难以鉴定等缺点(徐念等, 2020; 王萌等, 2021; 沈梅等, 2022)。环境DNA宏条形码(environmental DNA metabarcoding)技术是从环境样本中捕获DNA并对其进行保存、提取,使用针对目标类群的通用引物进行扩增,结合高通量测序技术(high-throughput sequencing, HTS)及分类,进而确定取样环境中多个目标生物分布状况的方法(Deiner et al, 2015; Thomsen & Willerslev, 2015)。该方法因程序化程度高、生态破坏性小以及检测灵敏度高,作为传统方法的补充,被广泛应用于生物多样性的监测(Civade et al, 2016; Yamamoto et al, 2017; Ruppert et al, 2019)。

目前,已有诸多研究利用eDNA metabarcoding调查鱼类多样性(舒璐等, 2020; 徐念等, 2020; 王晨等, 2022),如徐念等(2020)对长江中下游鱼类多样性的调查,检测到20种鱼类,比传统方法有更高的检测效率。也有学者设计并比较用于鱼类多样性调查的通用引物(Miya et al, 2015; Zhang et al, 2020),优化eDNA采样方法和分析流程(Shaw et al, 2016; Schenekar et al, 2020)。但是国内运用eDNA metabarcoding调查鱼类多样性的研究相比国外较少(舒璐等, 2020; 徐念等, 2020, Zou et al, 2020),

更鲜有单独对清水鱼的讨论。清水鱼一般是指生活在清水中的鱼类,和耐污鱼类不同,清水鱼的生存对水质有一定的要求:无污染且水源丰富(刘奕秋和方杰峰, 2003)。因此相对于其他鱼种,清水鱼的分布更能够反映水质的优劣。

北京位于华北平原北部,总面积16,410.54 km²,山区面积约占总面积的62%,地势为西北高、东南低。境内有永定河水系、潮白河水系、北运河水系、大清河水系、蓟运河水系五大水系。北京作为我国的首都,人口密度大,社会和经济迅速发展,城市化率高,这导致了鱼类栖息地的变化。杜龙飞等(2019)研究了北京市主要河流鱼类群落结构,结果显示离城市越远的河流,鱼类多样性越高。北京市鱼类多样性的调查研究相对较为全面,但是调查时间比较久远,较早的有张春霖(1933)的《中国鲤鱼志》和Wang (1936)的*The Fishes of Peiping and Its Vicinity*。其后,北京自然博物馆王鸿媛(1994)的《北京鱼类和两栖、爬行动物志》以及陈卫等(2007)的《北京湿地生物多样性研究》。近些年,张春光等(2011)调查北京及其邻近地区鱼类多样性,共发现鱼类93种。

北京市虽然有较多的鱼类多样性调查结果,但多是基于传统法。本研究则使用eDNA metabarcoding在2个季节对北京市北运河水系、潮白河水系以及大清河水系的鱼类多样性进行调查,筛选出清水鱼,并分析其多样性及时空分布。旨在探讨环境DNA metabarcoding在监测北京市鱼类多样性及空间分布的可行性,为北京市清水鱼生物多样性监测及保护提供新的技术手段。

1 材料与方法

1.1 环境DNA样本采集

本次采样于2020年9–10月(秋季)和2021年6–7月(夏季)进行, 城区河流(北运河水系) 15个采样点和山区河流(潮白河和大清河水系) 19个采样点, 各采样点编号及分布见图1。使用容量为1 L的干净棕色塑料瓶采集河流岸边的表层水, 每个采样点3个重复, 以提高目标物种的检测概率(舒璐等, 2020; Zou et al, 2020)。34个采样点共采集102个样品, 两个季节为204个。所有的水样均在24 h内使用0.45 μm 的尼龙滤膜进行真空抽滤。每次过滤的同时设置1个无菌水的阴性对照, 操作方法相同, 以评估是否存在外源DNA污染。抽滤后的滤膜放置在干净无菌的离心管中, 避光保存在 -20°C 。采样过程中记录每个采样点的海拔(H)、水温(T)、溶解氧(DO)、电导率(EC)、总溶解固体(TDS)以及酸碱度(pH) 6个环境因子。

1.2 eDNA提取

使用DNeasy Tissue and Blood DNA提取试剂盒

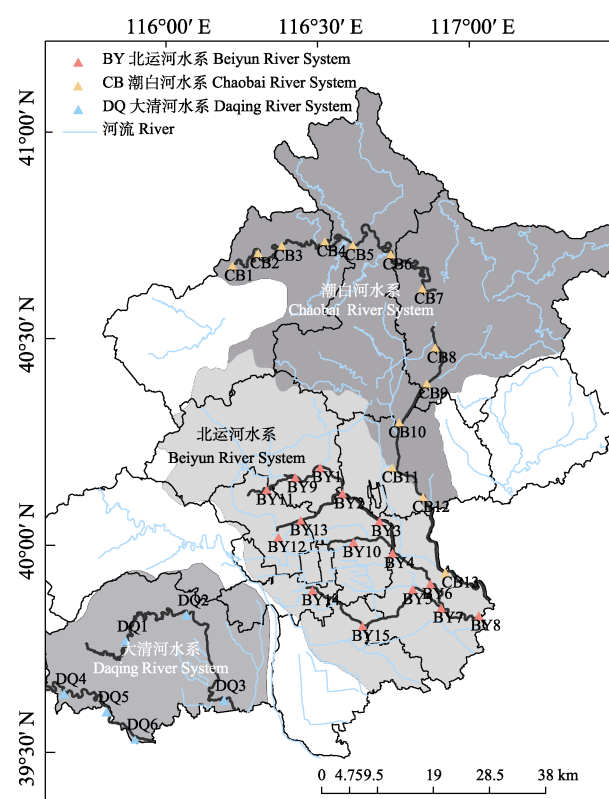


图1 北京市主要河流采样点分布图

Fig. 1 Distribution map of sampling sites of major rivers in Beijing

(Qiagen, Venlo, the Netherlands), 按照以下步骤, 完成水样的提取过程。首先将滤膜剪碎放置于2 mL的离心管中, 加入720 μL 的ATL组织裂解缓冲液和80 μL 的蛋白酶K; 再将样品放置 56°C 水浴锅中震荡3 h, 离心30 s ($6,000 \times g$); 分别转移400 μL 的解析液至2支2 mL离心管; 再加入400 μL 无水酒精和400 μL AL裂解缓冲液的混合液, 漩涡5 s, 离心30 s ($6,000 \times g$); 每个样品每次取600 μL 于洗脱柱上, 离心1 min ($6,000 \times g$)后弃滤液, 洗脱柱和收集管重新组装, 重复四次后更换收集管; 向每个样品加入500 μL AW1洗涤缓冲液离心1 min ($6,000 \times g$), 再加入500 μL AW2 洗涤缓冲液并离心2 min ($13,000 \times g$), 弃废液, 用1.5 μL 离心管代替收集管; 最后向每个洗脱柱加入500 μL 的AE洗脱缓冲液, 并放置于 37°C 水浴锅10 min后离心1 min ($13,000 \times g$), 过滤到1.5 μL 的离心管, 即为最终的DNA富集液。设置空白对照组, 所加入的试剂为样品组剂量的1/2, 其余操作与样品组一致。所得eDNA溶液快速置于 -20°C 冷冻保存, 直至下一步PCR扩增。

1.3 目的基因片段扩增和高通量测序

每个样品进行3次重复扩增, 则每个点位有9次扩增, 阴性对照同样如此。使用鱼类通用引物MiFish-U (Miya et al, 2015)对eDNA模板进行PCR扩增, 扩增长度约163–185 bp。第1轮PCR的测定体系为30 μL , 包括15 μL 的2 \times Hieff® Robust PCR预混液, 1 μL 的正向和反向引物, 10–20 ng DNA模板, 再加入ddH₂O至30 μL 。PCR反应程序为: 94°C 预变性2 min, 30个循环包括: 98°C 变性5 s, 50°C 退火10 s, 72°C 延伸10 s, 72°C 最后延伸5 min。第2轮扩增引入Illumina桥式PCR兼容引物, 将其置于无菌PCR管中(200 μL)配制同第一步相同的反应体系, 遵循以下反应条件: 95°C 预变性3min, 5个循环包括: 94°C 变性20 s, 55°C 退火20 s, 72°C 延伸30 s, 72°C 最后延伸5 min。

对PCR产物进行文库构建, 使用Illumina Miseq平台进行高通量测序(生工生物工程(上海)股份有限公司)。下机得到的双端序列数据(PE reads)首先根据overlap关系使用PEAR (Zhang et al, 2014) (v 0.9.8)将成对的reads拼接成一条序列, 然后按照条形码标签序列识别并区分样品得到各样本数据。

1.4 地笼捕获

本研究使用的传统方法为地笼法, 34个采样

点各放置3个长度为2 m的地笼, 地笼内放置一定的鱼饵, 地笼之间的距离为5 m, 放置时间为24 h, 以提高捕获到鱼类的概率。取水样与收地笼的位置及时间相同, 这样确保了2种方法之间所鉴定的鱼类组合的差异不是由于鱼类的洄游引起的。捕获后的鱼类经鱼类专家通过形态特征识别鉴定, 记录鱼的种类以及捕获条数。

1.5 数据分析

用FASTP (Chen et al, 2018)去除引物接头序列, 并对序列质量进行控制和过滤, 得到各样本的有效数据。再利用Usearch (v 11.0.667) (Edgar, 2010)优化各样本序列获得OTU代表序列, 选出与代表序列相似性在97%以上的序列, 生成OTU表格。通过使用BLASTN tool (Altschul et al, 1997)将OTU序列与MitoFish网站 (<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/download.html>)的鱼类基因数据库进行比对, 该数据库包含了已记录的北京市历史鱼类。如果OTU序列与MitoFish数据库中序列相似性达到99%, 并且是唯一的, 则认为该序列属于一个物种; 如果不唯一, 则归为某一属, 再结合北京市历史鱼类物种进行筛选(王鸿媛, 1994; 陈卫等, 2007; 张春光和赵亚辉, 2013)。

统计不同分类水平的物种数量、OTU数量和序列数量, 计算物种序列相对丰度。为了探讨不同采样点鱼类群落组成的差异, 本研究基于物种序列丰度统计的 χ^2 相似性系数进行对应分析(correspondence analysis, CA), 使用R的vegan包完成。并使用以下公式计算不同水系鱼类群落的优势度指数Y (计算软件使用Excel):

$$Y = \frac{T_i}{T} \times \frac{n_i}{N} \quad (Y > 0.02 \text{ 时, 定为优势种}) \quad (1)$$

其中, T_i 为出现第*i*种鱼的样点数, T 为总样点数, n_i 为第*i*种鱼类序列丰度, N 为总序列丰度;

本研究基于各采样点的物种序列丰度计算 α 多样性, 并使用方差检验判断3条水系清水鱼多样性显著性差异, 以进一步比较清水鱼多样性在两个季节的分布是否存在差异, 使用软件Graphpad Prism (v 9.1.0)完成图形绘制。使用冗余分析(redundancy analysis, RDA)探究影响清水鱼群落分布的主要环境因子, 使用R的pacman包完成。Spearman相关性系数分析清水鱼丰富度与环境因子和灯光指数的

相关性, 灯光指数的数据来源于2019年NPP- VIIRS合成年度数据 (https://www.ngdc.noaa.gov/eog/viirs/download_dnb_composites.html), 使用R中的ggpubr包完成计算及可视化过程。根据张春光和赵亚辉(2013)的调查结果结合中国动物主题数据库 (<http://www.zoology.csdb.cn>)及询问鱼类专家, 将鱼类生活习性为“水质澄清”或“清水”的鱼类定义为清水鱼。

2 结果与分析

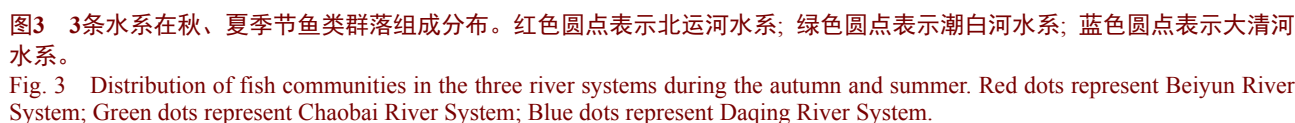
2.1 物种组成

在本次调查中, eDNA metabarcoding共识别出鱼类8目21科47属55种。夏季46种, 隶属于6目16科38属, 秋季49种, 隶属于8目20科40属, 详见附录1。其中检测到的达氏鲟(*Acipenser dabryanus*)、团头鲂(*Megalobrama amblycephala*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)、池沼公鱼(*Hypomesus olidus*)都是引入种或者人工养殖, 云鲷(*Pholis nebulosa*)和大口黑鲈(*Micropterus salmoides*)在咸淡水中生存。在目等级按照物种丰度占比从高到低排序为: 鲤形目(31, 56.36%)、鲈形目(11, 20.00%)、鲇形目(6, 10.91%)、合鳃目(2, 3.64%)、鲑形目(2, 3.64%)以及仅包含1种物种的颌针鱼目、鲟形目和胡瓜鱼目。其中又以鲤科(23, 41.82%)、鳅科(5, 9.09%)为主导, 物种分类情况可见图2。

2.2 物种时空分布

使用对应分析(CA)分别探究两个季节城区河流和郊区河流的物种组成(图3)。结果显示, 无论是夏季还是秋季, 北运河水系的样点之间较为集中, 说明群落内物种差异不大。潮白河和大清河水系的样点分布较为分散, 群落内鱼类物种差异较大, 且和北运河水系之间的距离相对较远, 说明群落间物种组成存在差异。图3中标示的物种为序列丰度排名前十的物种, 由其分布结果可以看出, 鲫(*Carassius auratus*)、麦穗鱼(*Pseudorasbora parva*)等距离北运河水系较近, 而清水鱼宽鳍鱲(*Zacco platypus*)、拉氏鲃(*Rhynchocypris lagowskii*)等距离潮白河和大清河较近。

对3条水系的总体鱼类群落做优势种分析, 使用优势种指数Y进行表示。计算得到的优势种($Y > 0.02$)结果见表1, 每条水系的物种按照优势度指数



由上到下顺次排列。结果显示, 北运河水系优势种主要是一些耐污种类, 如鲫、麦穗鱼、泥鳅 (*Misgurnus anguillicaudatus*)。而山区河流的优势种包含了华鲮 (*Sarcocheilichthys sinensis*)、北鳅 (*Lefua costata*)、宽鳍鱮、拉氏鲮等对于水质环境的要求较高清水鱼。

2.3 清水鱼的组成及分布

从总体鱼类结果中筛选出10种清水鱼, 其在每条水系的检测情况见表2。清水鱼中拉氏鲮(24)、马口鱼(24)、黄尾鲮(22)和宽鳍鱮(21)被检测到的点位最多。马口鱼主要分布在北运河水系和潮白河水系, 而黄尾鲮主要分布在潮白河水系。

虽然检测到清水鱼, 但是每个点位检测到的鱼类序列数不同。由图4可知, 宽鳍鱮和拉氏鲮的序列丰度最明显, 潮白河水系和大清河水系清水鱼序列丰度较多, 其中以CB2、CB6、CB8和DQ3检测到的清水鱼序列丰度最突出。3条水系的清水鱼 α 多样性显著性检验可以看出(图5), 北运河水系的清水鱼丰富度要显著低于潮白河和大清河水系, 其他多样性指数没有显著性, Shannon指数和Simpson指数都存在这种趋势, 但是不显著。

2.4 清水鱼多样性影响因素

清水鱼群落组成受环境因子的影响, 并且在不同的季节的主要影响因素不同。附录2记录了本研

表1 3条水系鱼类群落优势种的优势度指数
Table 1 Dominance index of dominant species in three river systems

北运河水系 Beiyun River System		潮白河水系 Chaobai River System		大清河水系 Daqing River System	
物种 Species	优势度指数 Dominance index (Y)	物种 Species	优势度指数 Dominance index (Y)	物种 Species	优势度指数 Dominance index (Y)
鲫 <i>Carassius auratus</i>	0.5175	鲫 <i>Carassius auratus</i>	0.2556	宽鳍鱮 <i>Zacco platypus</i>	0.1517
麦穗鱼 <i>Pseudorasbora parva</i>	0.0888	拉氏鲮 <i>Rhynchocypris lagowskii</i>	0.1031	鲫 <i>Carassius auratus</i>	0.1475
小黄鲮 <i>Micropercops swinhonis</i>	0.0453	宽鳍鱮 <i>Zacco platypus</i>	0.0807	拉氏鲮 <i>Rhynchocypris lagowskii</i>	0.0968
泥鳅 <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	0.0448	鲇 <i>Silurus asotus</i>	0.0474	小黄鲮 <i>Micropercops swinhonis</i>	0.0540
高体鲮 <i>Rhodeus ocellatus</i>	0.0345	子陵吻鰕虎鱼 <i>Rhinogobius giurinus</i>	0.0350	马口鱼 <i>Opsariichthys uncirostris</i>	0.0408
鲮 <i>Hemiculter leucisculus</i>	0.0205	麦穗鱼 <i>Pseudorasbora parva</i>	0.0242	华鲮 <i>Sarcocheilichthys sinensis</i>	0.0406
—	—	—	—	褐吻鰕虎鱼 <i>Rhinogobius brunneus</i>	0.0400
—	—	—	—	子陵吻鰕虎鱼 <i>Rhinogobius giurinus</i>	0.0376
—	—	—	—	鲇 <i>Silurus asotus</i>	0.0340
—	—	—	—	北鳅 <i>Lefua costata</i>	0.0241
—	—	—	—	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	0.0233

表2 清水鱼在3条水系的检测的样点数情况
Table 2 Number of detected site of clearwater fish in each river system

物种 Species	样点数 Number of detected site			
	北运河水系 Beiyun River System	潮白河水系 Chaobai River System	大清河水系 Daqing River System	总计 Total
北方须鲈 <i>Barbatula nuda</i>	1	1	0	2
华鲮 <i>Sarcocheilichthys sinensis</i>	4	5	4	13
黄尾鲮 <i>Xenocypris davidi</i>	6	11	4	21
宽鳍鱮 <i>Zacco platypus</i>	7	9	6	22
拉氏鲮 <i>Rhynchocypris lagowskii</i>	9	9	6	24
马口鱼 <i>Opsariichthys uncirostris</i>	10	9	5	24
北鳅 <i>Lefua costata</i>	0	0	2	2
达里湖高原鳅 <i>Triplophysa dalaica</i>	0	3	2	5
鳅 <i>Siniperca chuatsi</i>	6	5	4	15
细鳞鲴 <i>Brachymystax lenok</i>	1	3	0	4

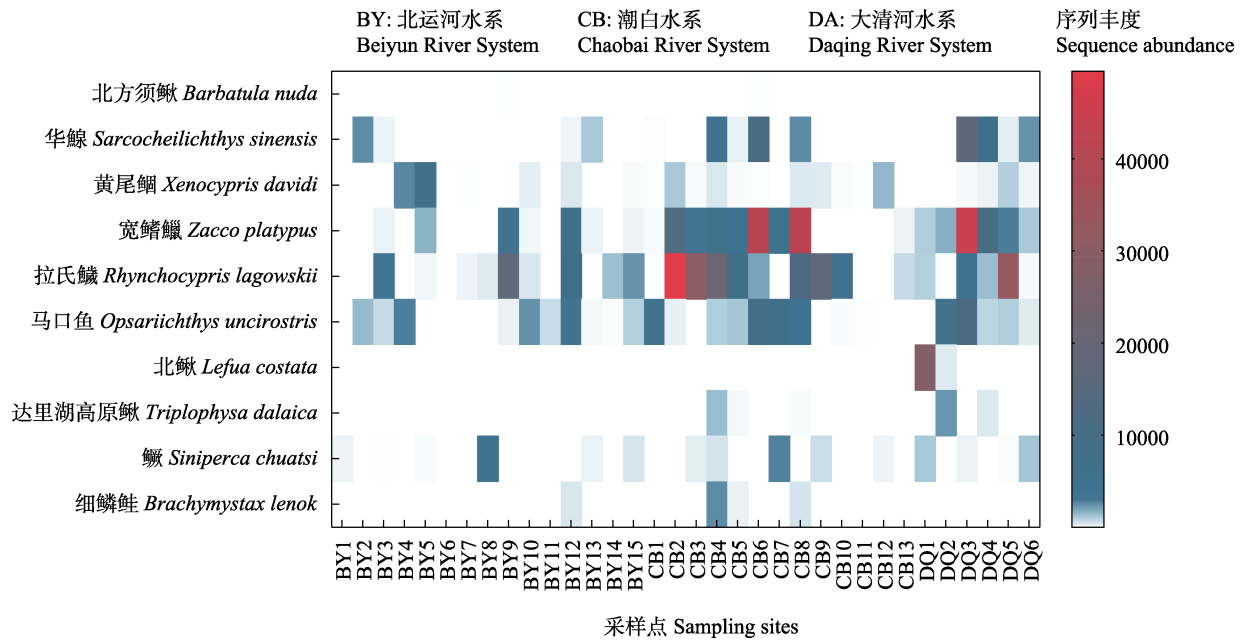


图4 34个点位清水鱼的序列丰度
Fig. 4 Sequence abundance of clearwater fish across 34 sampling sites

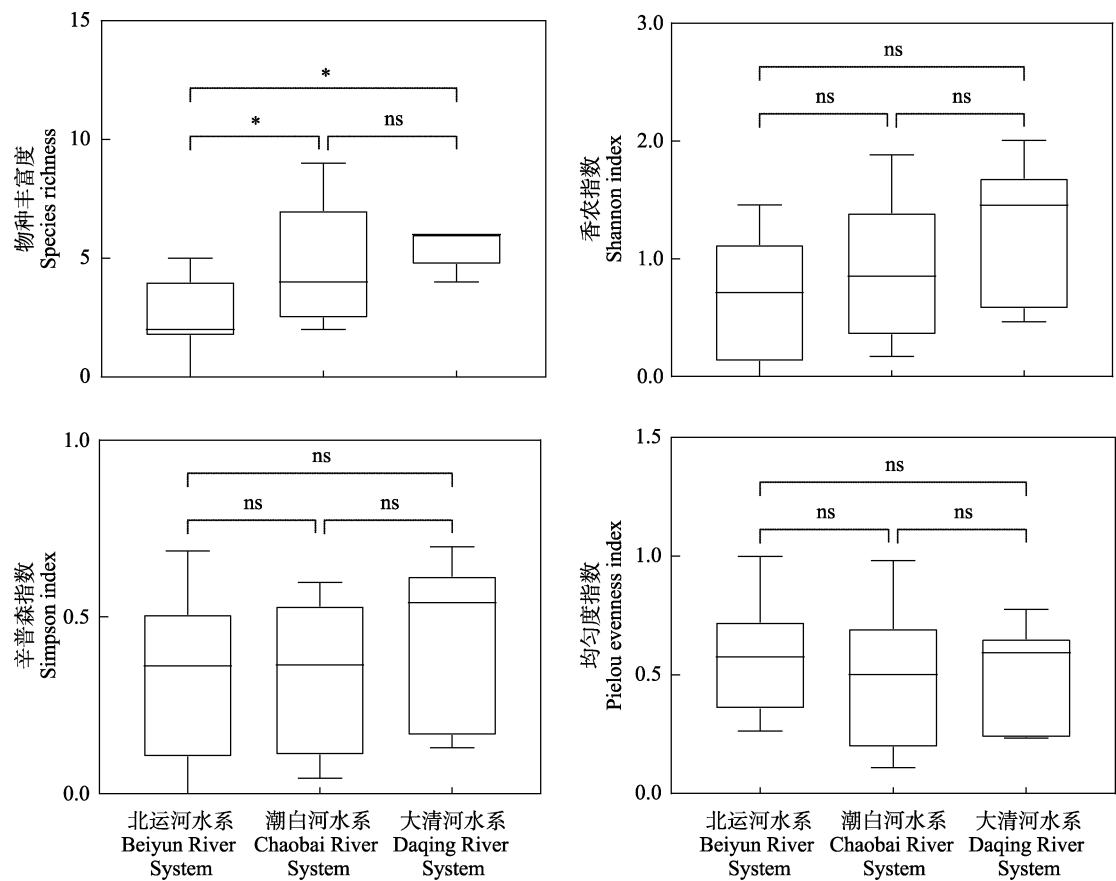


图5 北京市3条水系清水鱼 α 多样性检验
Fig. 5 α diversity of clearwater fish in three river systems of Beijing. * indicates $P < 0.05$, ns indicates $P > 0.05$.

究的所记录的环境因子数据。RDA分析(图6)表明前2个RDA轴分别解释了夏季和秋季鱼类群落结构差异的78.89%和68.78%。envfit检验显示总溶解固体($P = 0.0477$)和电导率($P = 0.0127$)对夏季清水鱼分布有显著影响, 城区水系和郊区水系之间有明显的区分; 但是秋季对清水鱼分布有显著影响的环境因子是温度($P = 0.0004$) and 海拔($P = 0.0428$)。夏季清水鱼分布在高溶解氧的地方, 与电导率和总溶解固体呈负相关。秋季清水鱼分布与溶解氧和海拔呈正相关, 和温度呈负相关。

图7a是秋季清水鱼丰富度与环境因子和2019年人类灯光指数的相关性分析结果, 其丰富度与电导率、总溶解固体以及夜间灯光指数呈显著负相关($P < 0.05$), 但是与海拔呈显著正相关($P < 0.05$)。由图7b可知, 夏季清水鱼丰富度和温度、电导率、总溶解固体以及夜间灯光指数呈负相关, 仅有温度和总溶解固体有显著差异, 与海拔呈正相关, 但不具显著差异。

3 讨论

3.1 北京市主要河流鱼类多样性及分布

本研究使用eDNA metabarcoding检测出北京3大水系鱼类55种。其中以鲤形目鲤科居多, 总计23种, 占鱼类物种总数的41.82% (图2), 以鲫、麦穗鱼、小黄鲈鱼、宽鳍鱲、拉氏鲮为优势种。附录1

包含了地笼法所捕获到的鱼类种数, 共有35种, eDNA metabarcoding捕获的种数明显高于地笼法。但是2种方法获得的鱼类在大的分类单元组成结果相似, 同历史调查结果也一致(陈卫等, 2007; 张春光等, 2011; 杜龙飞等, 2019), 均表明北京市鱼类多样性以鲤形目和鲈形目为主。eDNA metabarcoding也检测到一些传统法及历史记录中没有的物种, 如达氏鲮、花鲮(*Hemibarbus labeo*)只在一些报道中出现过, 可能是属于人工养殖, 其DNA流入水体而被检测。同时也存在传统法捕获到, 但是eDNA metabarcoding没有识别到的物种, 如中华鲮(*Rhodeus lighti*)、裸鲤(*Gymnocypris przewalskii*)、黑鳍鲈(*Sarcocheilichthys nigripinnis*)等, 推测是由于本研究没有分层采样, 而有些鱼类栖息在水体的底层, 如中华鲮和黑鳍鲈, 因此在之后的研究中应做好分层采样, 增加检出概率。

北运河水系鱼类物种较潮白河水系和大清河水系更为均质, 点位间的物种组成相似性更高, 以鲫和泥鳅等耐污鱼类为优势种。作为北京市主要的纳污河, 北运河水系受人类干扰严重, 生境类型较为单一(张春光和赵亚辉, 2013), 其鱼类群落具有典型的受干扰河流鱼类特征。而潮白河水系和大清河水系点位间物种组成差异性较大, 以宽鳍鱲、拉氏鲮、北鲈等为优势种。潮白河水系和大清河水系, 多为山区河流, 生境类型相对自然, 水温较低,

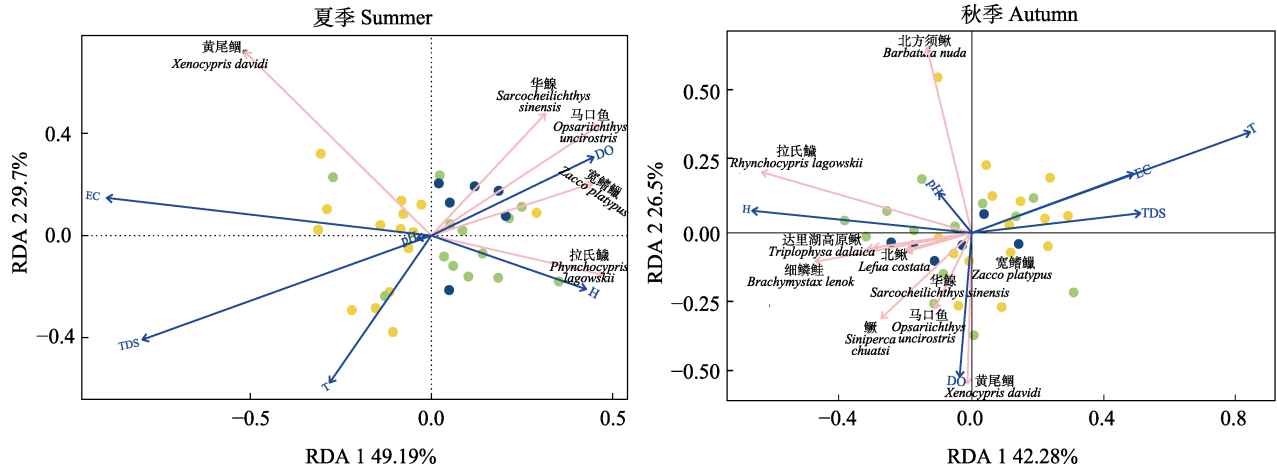


图6 冗余分析(RDA)探究清水鱼群落结构与测量环境变量之间的关系。DO: 溶解氧; TDS: 总溶解固体; T: 温度; H: 海拔; EC: 电导率。黄色圆点表示北运河水系; 绿色圆点表示潮白河水系; 蓝色圆点表示大清河水系。

Fig. 6 RDA exploring the relationship between community structure and measured environmental variables. DO, Dissolved oxygen; TDS, Total dissolved solids; T, Temperature; H, Height; EC, Electrical conductivity. Yellow dots represent Beiyun River System; Green dots represent Chaobai River System; Blue dots represent Daqing River System.

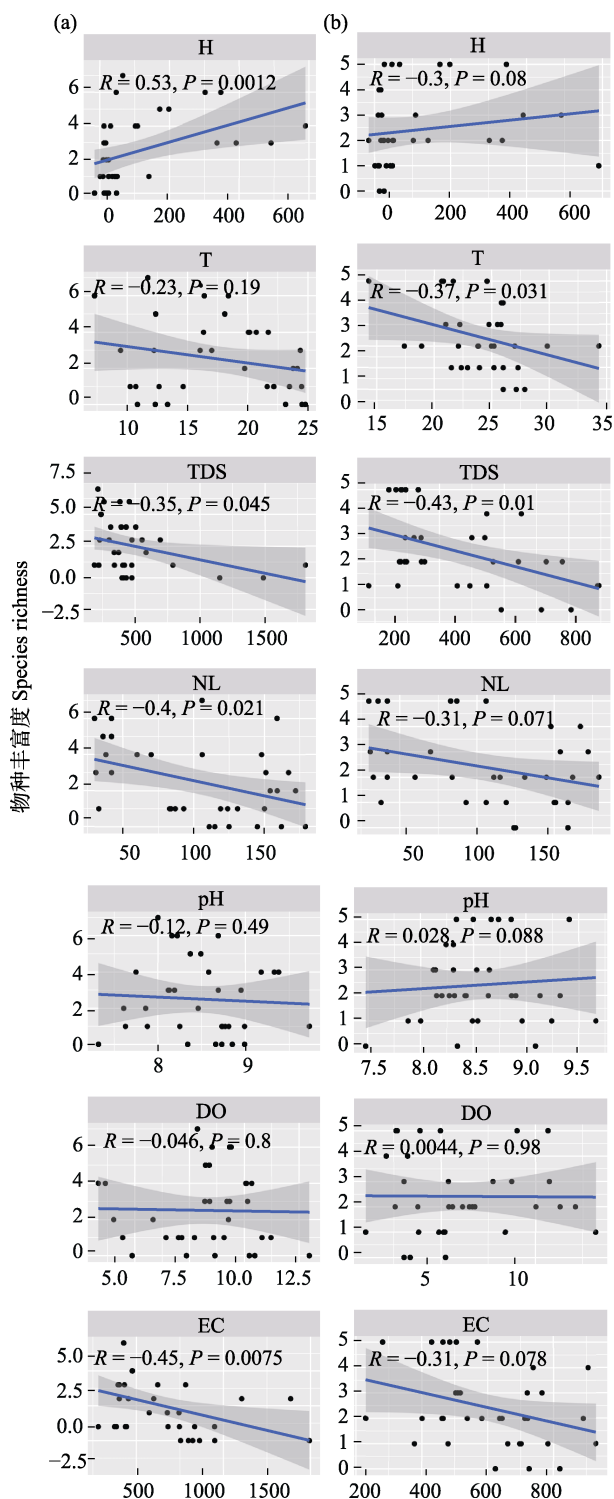


图7 清水鱼丰富度与环境因子及灯光指数的相关性。H: 海拔; pH: 酸碱度; T: 温度; DO: 溶解氧; TDS: 总溶解固体; EC: 电导率; NL: 夜间灯光; a: 秋季; b: 夏季。

Fig. 7 Correlation of clearwater fish abundance with environmental factors and lighting indices. H, Height; pH, Potential of hydrogen; T, Temperature; DO, Dissolved oxygen; TDS, Total dissolved solids; EC, Electrical conductivity; NL, Night light; a, Autumn; b, Summer.

具有轻度干扰的山溪型鱼类特征(杜龙飞等, 2019)。这2种不同生境河流鱼类物种组成的差异和杜龙飞等(2019)使用传统法所得结果一致, 都表明了人类活动对北京市河流鱼类群落的影响。这说明eDNA metabarcoding能够用于调查北京市鱼类多样性, 且能展现鱼类群落空间格局。

3.2 北京市主要河流清水鱼的分布

清水鱼主要生活在水质较好的水体中, 其分布受生境的影响较大。北运河水系清水鱼多样性相较于潮白河水系和大清河水系显著较低(图5), 虽然北运河水系有些点位检测到了清水鱼, 但是序列丰度较低(图4)。根据上述分析可知, 北运河水系受城市化影响较大, 河流流速缓慢, 多为静水, 水体多有浑浊, 清水鱼难以生存。而山区河流人为干扰较少, 水流清澈湍急, 适合清水鱼的生存。城区河流清水鱼多样性显著低于山区河流, 说明了城市化对于北京市清水鱼有着消极的影响。

3.3 清水鱼多样性及分布与环境因子的关系分析

生物的空间分布格局是环境异质性和人类干扰的长期影响的结果(Brown, 2000)。北京市清水鱼的分布在不同的季节中受不同环境因子的影响, 秋季主要受海拔和温度的影响, 夏季主要是电导率以及总溶解固体的影响。因为本研究条件有限, 测定的环境因子较少, 在以往的研究中, 发现有不同的环境因子影响着鱼类群落结构。Ji等(2022)和Kadye等(2008)认为水温是影响鱼类群落组成的重要因子, 王晨等(2022)发现鱼类群落影响因子有溶解氧等; 李捷等(2012)和Brown (2000)认为电导率和坡度是影响鱼类群落组成的主要环境因子; Xie等(2021)认为鱼类分布主要和营养元素有关; Smith等(2005)认为鱼类群落组成主要受海拔的影响, 但海拔是一个综合因素, 通常会直接影响温度与生境质量。Wu等(2020)研究渭河流域鱼类分布在夏季和秋季的影响因子发现河道宽度、pH值和流速对夏季鱼类分布有显著影响; 然而, 在秋季对鱼类分布影响显著的是pH值、总氮、总磷和流速。以上研究结果之所以有差异, 可能和研究生境以及时间有关。

本研究结果表明, 秋季清水鱼丰富度与电导率、总溶解固体以及夜间灯光指数呈显著负相关($P < 0.05$), 但是与海拔呈显著正相关($P < 0.05$)。夏季清水鱼丰富度和温度、总溶解固体呈显著负相关($P < 0.05$)。

0.05)。总溶解固体显示了水体的污染程度,无论是秋季还是夏季清水鱼多样性都随着水体污染程度增强而显著减少。夜间灯光指数显示了人类活动程度,结果显示,清水鱼多样性随着人类活动的增强而减少,说明人类活动对清水鱼多样性消极的影响。

4 结论


本研究共得出以下结论:

(1) eDNA metabarcoding在北京市2个季节3条水系共识别出鱼类55种,隶属于8目21科47属。鲤形目和鲈形目是调查区域的主要鱼类类群,其中又以鲤形目鲤科为主,占鱼类物种总数的41.82%。eDNA metabarcoding捕获率要高于传统法,虽然无法代替传统法,但是可作为快速调查北京市鱼类多样性的有效手段,减少传统方法监测对北京水生生态系统的干扰。

(2)从空间分布上看,城区河流鱼类组成更为均质化,优势种以鲫、麦穗鱼、泥鳅等耐污鱼为主;山区河流鱼类组成更为多样化,以宽鳍鱲、拉氏鲮等鱼类为优势种,物种组成的不同与2种生境环境因素及人为干扰有关。

(3)清水鱼在山区河流的多样性要显著高于城区河流。不同的季节影响清水鱼分布的环境因子不同,夏季主要是总溶解固体以及电导率,秋季主要是海拔和温度的影响。鱼类群落空间格局对人为活动的干扰具有显著的指示作用,清水鱼多样性随着总溶解固体的升高以及人类活动的增强而显著降低。

ORCID

沈梅  <https://orcid.org/0000-0003-2560-6669>

肖能文  <https://orcid.org/0000-0002-7482-135X>

参考文献

- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389–3402.
- Brown LR (2000) Fish communities and their associations with environmental variables, Lower San Joaquin River Drainage, California. *Environmental Biology of Fishes*, 57, 251–269.
- Chen SF, Zhou YQ, Chen YR, Gu J (2018) Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34, 884–890.
- Chen W, Hu D, Fu BQ (2007) Research on Biodiversity of Beijing Wetland. Science Press, Beijing (in Chinese) [陈卫, 胡东, 付必谦 (2007) 北京湿地生物多样性研究. 科学出版社, 北京.]
- Civade R, Dejean T, Valentini A, Roset N, Raymond JC, Bonin A, Taberlet P, Pont D (2016) Spatial representativeness of environmental DNA metabarcoding signal for fish biodiversity assessment in a natural freshwater system. *PLoS ONE*, 11, e0157366.
- Deiner K, Walser JC, Mächler E, Altermatt F (2015) Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA. *Biological Conservation*, 183, 53–63.
- Du LF, Xu JX, Li YB, Qu XD, Liu M, Zhang M, Yu Y (2019) Fish community characteristics and spatial pattern in major rivers of Beijing city. *Research of Environmental Sciences*, 32, 447–457. (in Chinese with English abstract) [杜龙飞, 徐建新, 李彦彬, 渠晓东, 刘猛, 张敏, 余杨 (2019) 北京市主要河流鱼类群落的空间格局特征. 环境科学研究, 32, 447–457.]
- Edgar RC (2010) Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics*, 26, 2460–2461.
- Farriols MT, Ordines F, Somerfield PJ, Pasqual C, Hidalgo M, Guijarro B, Massuti E (2017) Bottom trawl impacts on Mediterranean demersal fish diversity: Not so obvious or are we too late? *Continental Shelf Research*, 137, 84–102.
- Ji FF, Han DY, Yan L, Yan SH, Zha JM, Shen JZ (2022) Assessment of benthic invertebrate diversity and river ecological status along an urbanized gradient using environmental DNA metabarcoding and a traditional survey method. *Science of the Total Environment*, 806, 150587.
- Kadye WT, Magadza CHD, Moyo NAG, Kativu S (2008) Stream fish assemblages in relation to environmental factors on a montane plateau (Nyika Plateau, Malawi). *Environmental Biology of Fishes*, 83, 417–428.
- Li J, Li XH, Jia XP, Tan XC, Wang C, Li YF, Shao XF (2012) Relationship between fish community diversity and environmental factors in the Lianjiang River, Guangdong, China. *Acta Ecologica Sinica*, 32, 5795–5805. (in Chinese with English abstract) [李捷, 李新辉, 贾晓平, 谭细畅, 王超, 李跃飞, 邵晓风 (2012) 连江鱼类群落多样性及其与环境因子的关系. 生态学报, 32, 5795–5805.]
- Liu YQ, Fang JF (2003) The methods of clearwater fish aquaculture in the mountains. *Fishery Modernization*, 3, 15–16. (in Chinese) [刘奕秋, 方杰锋 (2003) 山区清水鱼养殖方法. 渔业现代化, 3, 15–16.]
- Miya M, Sato Y, Fukunaga T, Sado T, Poulsen JY, Sato K, Minamoto T, Yamamoto S, Yamanaka H, Araki H, Kondoh

- M, Iwasaki W (2015) MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science*, 2, 150088.
- Ruppert KM, Kline RJ, Rahman MS (2019) Past, present, and future perspectives of environmental DNA (eDNA) metabarcoding: A systematic review in methods, monitoring, and applications of global eDNA. *Global Ecology and Conservation*, 17, e00547.
- Schenekar T, Schletterer M, Lecaudey LA, Weiss SJ (2020) Reference databases, primer choice, and assay sensitivity for environmental metabarcoding: Lessons learnt from a re-evaluation of an eDNA fish assessment in the Volga headwaters. *River Research and Applications*, 36, 1004–1013.
- Shaw JLA, Clarke LJ, Wedderburn SD, Barnes TC, Weyrich LS, Cooper A (2016) Comparison of environmental DNA metabarcoding and conventional fish survey methods in a River System. *Biological Conservation*, 197, 131–138.
- Shen M, Xiao NW, Lu L, Luo ZL, Shi NN, Sun G (2022) Methods and application of environmental dna detection of fish. *Journal of Hydroecology*, 42, 133–141. (in Chinese with English abstract) [沈梅, 肖能文, 卢林, 罗遵兰, 史娜娜, 孙光 (2022) 环境DNA检测鱼类的方法及应用. *水生生态学杂志*, 42, 133–141.]
- Shu L, Lin JY, Xu Y, Cao T, Feng JM, Peng ZG (2020) Investigating the fish diversity in Erhai Lake based on enviromental DNA metabarcoding. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 44, 1080–1086. (in Chinese with English abstract) [舒璐, 林佳艳, 徐源, 曹特, 封吉猛, 彭作刚 (2020) 基于环境DNA宏条形码的洱海鱼类多样性研究. *水生生物学报*, 44, 1080–1086.]
- Smith TA, Kraft CE (2005) Stream fish assemblages in relation to landscape position and local habitat variables. *Transactions of the American Fisheries Society*, 134, 430–440.
- Thomsen PF, Willerslev E (2015) Environmental DNA—An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 183, 4–18.
- Wang C, Tao M, Li AM, Shi P, Yang JH, Wang ZH, Zhang XW (2022) Research on the biodiversity of Qinhuai River based on environmental DNA metabarcoding. *Acta Ecologica Sinica*, 42, 611–624. (in Chinese with English abstract) [王晨, 陶孟, 李爱民, 施鹏, 杨江华, 王志浩, 张效伟 (2022) 基于环境DNA宏条形码技术的秦淮河生物多样性探究. *生态学报*, 42, 611–624.]
- Wang FZ (1936) The Fishes of Peiping and Its Vicinity. *Science Reports of the National University of Peking*, 1(2), 1–28.
- Wang HY (1994) Fauna of Beijing Fish and Amphibians and Reptiles. Beijing Publishing House, Beijing. (in Chinese) [王鸿媛 (1994) 北京鱼类和两栖、爬行动物志. 北京出版社, 北京.]
- Wang M, Jin XW, Lin XL, Du LN, Cui YD, Wu XP, Sun HY, Xie ZC, Wang XH, Wang BX (2021) Advances in the macrozoobenthos biodiversity monitoring and ecosystem assessment using environmental DNA metabarcoding. *Acta Ecologica Sinica*, 41, 7440–7453. (in Chinese with English abstract) [王萌, 金小伟, 林晓龙, 杜丽娜, 崔永德, 吴小平, 孙红英, 谢志才, 王新华, 王备新 (2021) 基于环境DNA宏条形码技术的底栖动物监测及水质评价研究进展. *生态学报*, 41, 7440–7453.]
- Wu JT, Mao RC, Li MY, Xia J, Song J, Cheng DD, Sun HT (2020) Assessment of aquatic ecological health based on determination of biological community variability of fish and macroinvertebrates in the Weihe River Basin, China. *Journal of Environmental Management*, 267, 110651.
- Xie RL, Zhao GF, Yang JH, Wang ZH, Xu YP, Zhang XW, Wang ZJ (2021) eDNA metabarcoding revealed differential structures of aquatic communities in a dynamic freshwater ecosystem shaped by habitat heterogeneity. *Environmental Research*, 201, 111602.
- Xu N, Xiong MH, Shao K, Que YF, Li JY (2020) Preliminary study on environmental DNA metabarcoding for detecting biodiversity in the middle and lower reaches of the Yangtze River. *Research of Environmental Sciences*, 33, 1187–1196. (in Chinese with English abstract) [徐念, 熊美华, 邵科, 阙延福, 李键庸 (2020) 长江中下游环境DNA宏条形码生物多样性检测技术初步研究. *环境科学研究*, 33, 1187–1196.]
- Yamamoto S, Masuda R, Sato Y, Sado T, Araki H, Kondoh M, Minamoto T, Miya M (2017) Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Scientific Reports*, 7, 40368.
- Zhang CG, Zhao YH (2013) Fishes in Beijing and Adjacent Areas, China. Science Press, Beijing. (in Chinese) [张春光, 赵亚辉 (2013) 北京及其邻近地区的鱼类. 科学出版社, 北京]
- Zhang CG, Zhao YH, Xing YC, Guo RL, Zhang Q, Feng Y, Fan EY (2011) Fish species diversity and conservation in Beijing and adjacent areas. *Biodiversity Science*, 19, 597–604. (in Chinese with English abstract) [张春光, 赵亚辉, 邢迎春, 郭瑞禄, 张清, 冯云, 樊恩源 (2011) 北京及其邻近地区野生鱼类物种多样性及其资源保育. *生物多样性*, 19, 597–604.]
- Zhang CL (1933) Cyprinid Fishes in China. Fan Memorial Institute of Biology, Beijing. (in Chinese) [张春霖 (1933) 中国鲤类志. 北平静生生物调查所, 北京.]

沈梅等: 基于eDNA metabarcoding探究北京市主要河流鱼类分布及影响因素

Zhang JJ, Kobert K, Flouri T, Stamatakis A (2014) PEAR: A fast and accurate Illumina Paired-End read merger. *Bioinformatics*, 30, 614–620.

Zhang S, Zhao JD, Yao M, Gilbert M (2020) A comprehensive and comparative evaluation of primers for metabarcoding eDNA from fish. *Methods in Ecology and Evolution*, 11, 1609–1625.

Zou K, Chen J, Ruan H, Li Z, Guo W, Li M, Liu L (2020) eDNA metabarcoding as a promising conservation tool for monitoring fish diversity in a coastal wetland of the Pearl River Estuary compared to bottom trawling. *Science of the Total Environment*, 702, 134704.

(责编编委: 高天翔 责任编辑: 李会丽)

附录 Supplementary Material

附录1 北京市主要河流分布鱼类名录

Appendix 1 Checklist of fish in major rivers in Beijing

<https://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2022240-1.pdf>

附录2 本研究环境因子的测定

Appendix 2 Measurement of environmental factors of this study

<https://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2022240-2.pdf>

附录 1 北京市主要河流分布鱼类名录

Appendix 1 Checklist of fish in major rivers in Beijing

物种	eDNA 宏条形码	地笼	备注
Species	eDNA metabarcoding	Ground cage	Remarks
鲟形目 Acipenseriformes			
鲟科 Acipenseridae			
达氏鲟 <i>Acipenser dabryanus</i>	3	0	引入种
颌针鱼目 Beloniformes			
青鳉科 Adrianichthyidae			
青鳉 <i>Oryzias sinensis</i>	19	0	
鲤形目 Cypriniformes			
鲤科 Cyprinidae			
棒花鱼 <i>Abbottina rivularis</i>	28	17	
须鲮 <i>Acheilognathus barbatus</i>	15	0	
大鳍鲮 <i>Acheilognathus macropterus</i>	0	1	
鲫鱼 <i>Carassius auratus</i>	34	23	
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	17	1	
翘嘴鲌 <i>Culter alburnus</i>	2	3	
红鳍鲌 <i>Cultrichthys erythropterus</i>	22	5	
鲤鱼 <i>Cyprinus carpio</i>	30	6	
东北颌须鲈 <i>Gnathopogon strigatus</i>	10	0	
裸鲤 <i>Gymnocypris przewalskii</i>	0	1	
花鲢 <i>Hemibarbus labeo</i>	2	0	
鲮鱼 <i>Hemiculter leucisculus</i>	27	16	
鲢 <i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	4	1	
鳙 <i>Hypophthalmichthys nobilis</i>	19	0	
团头鲂 <i>Megalobrama amblycephala</i>	4	0	引入种
小鰾属 <i>Microphysogobio</i> sp	4	0	
马口鱼 <i>Opsariichthys uncirostris</i>	24	6	
麦穗鱼 <i>Pseudorasbora parva</i>	31	29	
高体鲮 <i>Rhodeus ocellatus</i>	28	15	
中华鲮 <i>Rhodeus lighti</i>	0	6	
拉氏鲮 <i>Rhynchocypris lagowskii</i>	24	10	
黑鳍鲮 <i>Sarcocheilichthys nigripinnis</i>	0	6	
华鲮 <i>Sarcocheilichthys sinensis</i>	13	0	
蛇鲈 <i>Saurogobio dabryi</i>	2	1	
兴凯银鲈 <i>Squalidus chankaensis</i>	21	5	
点纹银鲈 <i>Squalidus wolterstorffi</i>	0	1	
黄尾鲈 <i>Xenocypris davidi</i>	21	1	
宽鳍鱮 <i>Zacco platypus</i>	22	5	
鳅科 Cobitidae			
北方须鳅 <i>Barbatula nuda</i>	2	1	
鳅属 <i>Cobitis</i> sp	9	0	
中华花鳅 <i>Cobitis sinensis</i>	0	1	

泥鳅 <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>	26	19	
北方泥鳅 <i>Misgurnus bipartitus</i>	26	3	
大鳞副泥鳅 <i>Paramisgurnus dabryanus</i>	19	8	引入种
条鳅科 Nemacheilidae			
北鳅 <i>Lefua costata</i>	2	0	
尖头高原鳅 <i>Triplophysa cuneicephala</i>	3	0	模式产地
达里湖高原鳅 <i>Triplophysa dalaica</i>	5	0	
鲈形目 Perciformes			
斗鱼科 Belontiidae			
圆尾斗鱼 <i>Macropodus chinensis</i>	14	9	
太阳鱼科 Centrarchidae			
大口黑鲈 <i>Micropterus salmoides</i>	6	0	咸淡水
鳢科 Channidae			
乌鳢 <i>Channa argus</i>	18	3	
鰕虎科 Gobiidae			
褐吻鰕虎鱼 <i>Rhinogobius brunneus</i>	26	0	
波氏吻鰕虎鱼 <i>Rhinogobius cliffordpopei</i>	7	3	
子陵吻鰕虎鱼 <i>Rhinogobius giurinus</i>	30	0	
刺鱼科 Gasterosteidae			
中华多刺鱼 <i>Pungitius sinensis</i>	0	1	
沙塘鳢科 Odontobutidae			
小黄魮鱼 <i>Micropercops swinhonis</i>	27	16	
河川沙塘鳢 <i>Odontobutis potamophila</i>	9	7	引入种
真鲈科 Percichthyidae			
鳊 <i>Siniperca chuatsi</i>	15	0	
锦鲷科 Pholidae			
云鲷 <i>Pholis nebulosa</i>	2	0	咸淡水
胡瓜鱼目 Osmeriformes			
胡瓜鱼科 Osmeridae			
池沼公鱼 <i>Hypomesus olidus</i>	4	0	引入种
鲑形目 Salmoniformes			
鲑科 Salmonidae			
细鳞鲑 <i>Brachymystax lenok</i>	4	0	
虹鳟 <i>Oncorhynchus mykiss</i>	7		引入种
鲇形目 Siluriformes			
鲿科 Bagridae			
黄颡鱼 <i>Tachysurus fulvidraco</i>	22	4	
乌苏里黄颡鱼 <i>Tachysurus ussuriensis</i>	11	0	
胡子鲇科 Clariidae			
革胡子鲇 <i>Clarias gariepinus</i>	2	0	
鲴科 Ictaluridae			
斑点叉尾鲴 <i>Ictalurus punctatus</i>	7	0	
鲇科 Siluridae			
鲇鱼 <i>Silurus asotus</i>	28	6	

兰州鲇 <i>Silurus lanzhouensis</i>	3	0
合鳃目 <i>Synbranchiformes</i>		
刺鳅科 <i>Mastacembelidae</i>		
中华刺鳅 <i>Sinobdella sinensis</i>	5	0
合鳃科 <i>Synbranchidae</i>		
黄鳝 <i>Monopterus albus</i>	3	0

注: 数字代表 34 个点位中出现过该物种点位数

附录 2 本研究环境因子的测定

Appendix 2 Measurement of environmental factors of this study

样点	海拔	夏季 Summer					秋季 Autumn				
Sites	Height (m)	酸碱度	温度	溶解氧	总溶解固体	电导率	酸碱度	温度	溶解氧	总溶解固体	电导率
		Potential of hydrogen	Temperature (°C)	Dissolved Oxygen (mg/L)	Dissolved Solids (mg/L)	conductivity (μs/cm)	pote ntial of hydr ogen	Temperat ure (°C)	Dissolved Oxygen (mg/L)	Dissolved Solids (mg/L)	Electrical rate Electrical
BY1	25	7.48	26	3.37	591	930	8.99	24.45	10.81	341	682
BY2	23	8.15	24.97	6.13	566	782	8.95	12.33	10.23	399	799
BY3	12	8.24	25.84	2.1	546	807	7.75	21.69	3.34	392	783
BY4	17	8.27	23.8	6.49	644	769	8.85	13.35	10.48	432	863
BY5	12	8.54	22.9	5.13	546	1093	8.95	24.35	10.15	553	1105
BY6	13	8.35	27.87	3.04	807	790	8.73	10.85	8.66	475	950
BY7	25	8.86	23.84	6.78	780	1035	7.32	24.78	4.88	1486	1493
BY8	1	8.49	27.28	3.81	893	874	8.73	10.24	11.22	418	835
BY9	31	7.88	23.93	1.01	889	745	9.18	20.04	3.66	312	623
BY10	19	8.31	25.5	5.38	500	780	7.86	23.75	5.84	373	745
BY11	42	9.24	26	13.19	455	691	7.63	22.14	4.45	790	747
BY12	47	8	22.35	5.2	181	266	8.16	18.4	9.33	383.5	438.5
BY13	10	8.65	24.76	10.72	540	847	8.46	19.73	9.28	339	678
BY14	48	8.9	25.2	5.6	730	665	8.34	24.5	7.36	1151	754
BY15	17	8.31	25.99	3.23	653	1057	8.69	16.04	9.33	693	1386
CB1	590	8.96	25.2	8.4	271	419	8.58	20.7	10.1	431	395.5
CB2	491	8.14	25.8	7.74	294	464	8.19	17	9.21	475.4	402.7
CB3	391	8.53	22.23	3.03	343	475	8.13	9.45	8.42	300	600
CB4	347	8.5	21.65	2.62	243	458	8.69	7.29	8.53	261	521
CB5	302	8.43	17.4	10.01	276	391.3	8.22	16.4	9.4	456	381.6
CB6	198	8.67	24.6	4.97	281	428	8.37	18.09	8.4	237	476
CB7	141	8.42	18.9	12.1	292	396.9	8.81	10.71	7	222	444
CB8	66	9.41	24.58	3.89	265	122	8.00	11.71	7.86	214	427
CB9	50	9.13	27	11.29	280	44.7	8.77	21.6	6.43	405	282
CB10	36	8.32	34.32	2.56	354	507	7.88	14.64	9.08	188	375
CB11	25	9.09	27.13	5.24	715	636	7.61	24.1	4.04	584	574
CB12	9	9.66	21.49	4.88	494	752	8.25	23.45	7.73	474	949
CB13	-15	8.2	22.1	5.4	344	654	8.66	23.14	12.97	412	824
DQ1	336	9.32	29.83	3.76	298	301	8.12	12.22	8.2	227	455
DQ2	108	8.12	21	8.73	321	454	9.33	16.327	10.34	505	432
DQ3	26	8.34	20.8	9.03	334	554	9.73	22.165	7.15	1810	386
DQ4	172	8.86	14.3	10.67	283	345.4	8.49	12.36	8.23	239	477
DQ5	102	8.64	18.9	6.65	344	573	9.38	20.142	10.07	395	403
DQ6	46	8.72	20.65	2.68	295	397	8.74	12.64	8.6	218	437