



•研究报告•

# 基于DNA宏条形码技术的大兴安岭北部欧亚水獭冬季食性分析

湛振杰<sup>1</sup>, 张超<sup>2</sup>, 陈敏豪<sup>1</sup>, 王嘉栋<sup>1</sup>, 富爱华<sup>1</sup>, 范雨薇<sup>1</sup>, 栾晓峰<sup>1\*</sup>

1. 北京林业大学生态与自然保护学院, 北京 100083; 2. 国家林业和草原局国家公园(自然保护地)发展中心, 北京 100714

**摘要:** 欧亚水獭(*Lutra lutra*)是淡水生态系统重要的指示种和旗舰种, 然而在人为干扰和环境变化的背景下, 中国欧亚水獭种群数量大幅下降, 部分地区已局部灭绝。目前欧亚水獭主要分布于我国东北地区 and 西南地区, 其中大兴安岭是维持东北地区水獭种群稳定的关键区域。了解欧亚水獭的食性组成有利于理解其种间关系与生态系统功能, 对评估其生存状况、开展保护工作具有重要意义。本研究在大兴安岭北部共采集疑似欧亚水獭粪便样品50份, 使用DNA条形码技术对样品进行物种来源鉴定, 结果显示其中35份为欧亚水獭粪便。利用DNA宏条形码技术分析粪便中的物种组成, 共得到15种鱼类、2种蛙类、5种昆虫共计22种不同的物种类别。所有脊椎动物食物类别中, 杂色杜父鱼(*Cottus poecilopus*)的相对出现频率和相对序列丰度均最高, 分别为19.35%和27.32%, 其次为黑龙江林蛙(*Rana amurensis*), 分别为15.48%和21.73%; 科水平上, 杜父鱼科的相对出现频率和相对序列丰度均显著高于其他鱼类, 分别为32.26%和45.72%。结果表明, 大兴安岭北部欧亚水獭冬季主要捕食鱼类, 其次为蛙类, 其中鱼类主要以杜父鱼科为主; 此外还在少量水獭粪便中发现有蜻蜓目、襀翅目、毛翅目等水生昆虫, 可能来自水獭猎物。本研究结果可为了解水獭种群生存状况、制定相关政策、开展保护工作提供重要参考依据。

**关键词:** 欧亚水獭; 食性; DNA宏条形码; 非损伤性采样; 大兴安岭

湛振杰, 张超, 陈敏豪, 王嘉栋, 富爱华, 范雨薇, 栾晓峰 (2023) 基于DNA宏条形码技术的大兴安岭北部欧亚水獭冬季食性分析. 生物多样性, 31, 22586. doi: 10.17520/biods.2022586.

Zhan ZJ, Zhang C, Chen MH, Wang JD, Fu AH, Fan YF, Luan XF (2023) DNA metabarcoding-based winter diet analysis of Eurasian otter (*Lutra lutra*) in the northern Greater Khingan Mountains. Biodiversity Science, 31, 22586. doi: 10.17520/biods.2022586.

## DNA metabarcoding-based winter diet analysis of Eurasian otter (*Lutra lutra*) in the northern Greater Khingan Mountains

Zhenjie Zhan<sup>1</sup>, Chao Zhang<sup>2</sup>, Minhao Chen<sup>1</sup>, Jiadong Wang<sup>1</sup>, Aihua Fu<sup>1</sup>, Yuwei Fan<sup>1</sup>, Xiaofeng Luan<sup>1\*</sup>

1 School of Ecology and Nature Conservation, Beijing Forestry University, Beijing 100083

2 National Park (Protected Area) Development Center, National Forestry and Grassland Administration, Beijing 100714

### ABSTRACT

**Aims:** The Eurasian otter (*Lutra lutra*) is a key indicator and flagship species of freshwater ecosystems. Unfortunately, human disturbance and environmental changes have caused a severe decrease in Eurasian otter populations in China, even resulting in extinction in some areas. At present, the species is predominantly found in northeast and southwest China, with the northern part of the Greater Khingan Mountains being one of the most important habitats for Eurasian otter populations in the northeast. Studying the diet composition of Eurasian otter is a valuable tactic in understanding its interspecific relationship and the functioning of its ecosystem, which is essential when assessing their survival status and carrying out conservation efforts. The purpose of this study is to obtain the diet of Eurasian otter in the north of Greater Khingan Mountains using DNA metabarcoding technology.

**Method:** In this study, 50 suspected Eurasian otter fecal samples were collected from the northern Greater Khingan Mountains. Based on DNA meta barcoding technology, 35 samples were confirmed to be Eurasian otter fecal samples.

收稿日期: 2022-10-18; 接受日期: 2023-02-05

基金项目: 东北地区水獭分布时空动态变化及其保护规划

\* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: luanxiaofeng@bjfu.edu.cn

Then, using DNA metabarcoding technology, species in the identified feces were analyzed to gain insight into the diet composition of the otters.

**Results:** In this study, 22 species were identified as Eurasian otter fecal samples, including 15 fishes, 2 frogs, and 5 insect species. *Cottus poecilopus* had the highest relative frequency of occurrence (19.35%) and relative read abundance (27.32%) among all the vertebrate foods, followed by *Rana amurensis* (15.48% and 21.73%, respectively). At the family level, Cottidae had a significantly higher relative frequency of occurrence (32.26%) and relative read abundance (45.72%) than other fishes.

**Conclusion:** The results of this study reveal that fish, primarily from the family Cottidae, are the main prey of Eurasian otters in the northern part of the Greater Khingan Mountains in winter, followed by frogs. In addition, some aquatic insects such as Odonata, Trichoptera and Plecoptera are found in a small amount of otter feces, which might come from otter prey. This research provides valuable insight into the survival status of otter populations, and can be used to inform the development of relevant policies and conservation efforts.

**Key words:** *Lutra lutra*; diet analysis; DNA metabarcoding; non-invasive sampling; the Greater Khingan Mountains

食性研究是了解物种生态习性的基础,也是开展觅食策略、种间关系、食物网结构、生态位等研究的重要载体,对于评估珍稀濒危动物的生存状况、开展保护工作具有重要意义(Sheppard & Harwood, 2005; Duffy et al, 2007; Severud et al, 2013; Kartzinel et al, 2015)。

然而,珍稀濒危动物较低的种群密度及难以预测的行为活动使得研究者很难通过直接观察获得食性信息。传统的食性研究方法主要以目标物种的粪便为实验材料,对粪便中未消化的食物残渣进行形态学分析以获取食物组成信息(Klare et al, 2011; Monterroso et al, 2019)。尽管这种研究方法具有低成本、易操作以及非损伤性采样等优点,但存在较多的局限性(Klare et al, 2011)。如需要分析大量的粪便样品且十分依赖于粪便中食物残渣的可辨识度(Trites & Joy, 2005),当食物形态相近、被彻底消化或无硬质残留时,就会造成结果的偏差(Carss & Parkinson, 1996)。同时,该方法对研究人员根据形态学特征进行物种鉴定的能力要求很高,受主观因素影响较大,过程繁杂且准确性和可重复性也难以保证(Spaulding et al, 2000)。

得益于分子生物学技术的发展,高通量测序(high-throughput sequencing, HTS)和DNA宏条形码技术(DNA metabarcoding)的出现为食性研究提供了一种更高效、准确的方法(Pompanon et al, 2012; Taberlet et al, 2012; Monterroso et al, 2019)。DNA宏条形码技术是利用高通量测序技术大量获得样本中多种条形码基因序列,继而通过生物信息学手段实现分类单元鉴定的方法(邵昕宁等, 2019)。它对粪便中稀少、高度降解、形态相近、无硬质部分的食

物残渣具有高度敏感性,在获取更大尺度的物种信息的同时避免了传统分类学的人工误差(Monterroso et al, 2019; Traugott et al, 2020)。目前,该技术已成功应用于欧亚水獭(*Lutra lutra*)及其他食肉目动物的食性研究中(Xiong et al, 2017; Kumari et al, 2019; Marcolin et al, 2020; Wang et al, 2022)。

作为淡水生态系统的顶级捕食者之一,欧亚水獭因其对水质的高度敏感性,被普遍作为淡水生态系统的指示种和旗舰种(Ruiz et al, 1998; Kruuk, 2006)。自20世纪中期以来,受盗猎、栖息地破坏、环境污染等人为干扰影响,我国欧亚水獭种群已遭受严重破坏,部分地区甚至已野外灭绝(徐龙辉, 1984; Gomez et al, 2016; Li & Chan, 2018)。为保护其种群,在1988年欧亚水獭就被《国家重点保护野生动物名录》列为国家二级重点保护野生动物。有研究表明,欧亚水獭现主要分布于我国东北和西南地区,其中大兴安岭是维持东北地区水獭种群稳定的关键区域(吕江等, 2018; Zhang et al, 2018; 张超等, 2022)。目前国内欧亚水獭的研究主要集中在种群密度(吕江等, 2018; Zhang et al, 2018; 张超等, 2022)、活动节律(韩雪松等, 2021; 史国强等, 2021)、生境利用(Wang et al, 2021)等领域。然而我国水獭的食性研究仍处于起步阶段,仅在四川唐家河自然保护区开展过基于粪便的水獭食性研究(Wang et al, 2022),东北地区欧亚水獭的食性研究尚且空白。

本研究以大兴安岭北部欧亚水獭指名亚种(*Lutra lutra lutra*)野生种群的粪便为实验材料,利用DNA宏条形码技术研究其食物组成以完善我国东北地区欧亚水獭野生种群食性的基础信息,为评估其生存状况以及制定保护措施提供科学依据。





欧亚水獭肌肉样品为阳性对照, 以粪便DNA提取空白为阴性对照, 筛选出目标条带清晰、长度为80 bp的样品进行食性分析。

## 1.4 食性分析的PCR扩增及高通量测序

### 1.4.1 食性分析的PCR扩增

确定粪便来源物种后, 进行基于DNA宏条形码的分子食性分析。选用针对脊椎动物设计的通用引物12S V5-F/12S V5-R (表1)对粪便中脊椎动物线粒体基因12S rRNA V5片段进行扩增, 扩增片段长度为98 bp (Riaz et al, 2011)。该对引物通用性广且具有较高的种属分辨率, 已成功应用于欧亚水獭、雪豹(*Panthera uncia*)、豹猫(*Prionailurus bengalensis*)等多种食肉动物的分子食性分析中(Xiong et al, 2017; Kumari et al, 2019; Harper et al, 2020)。使用该组引物进行PCR扩增时, 能够同时扩增出粪便中欧亚水獭及其食物的DNA, 为减少欧亚水獭DNA以及潜在人类DNA竞争性扩增对食物DNA扩增的影响, 本研究使用欧亚水獭阻隔引物(Eurasian otter blocking) OBS1以及人类阻隔引物(human blocking) HomoB来抑制欧亚水獭与人类DNA的扩增(Kumari et al, 2019)。

此外, 为了探究欧亚水獭以无脊椎动物作为食物来源的可能, 本研究选用针对淡水无脊椎动物开发的通用引物BF2/BR1 (表1)对粪便中无脊椎动物线粒体基因COI片段进行扩增, 扩增片段长度为322 bp (Elbrecht & Leese, 2017)。

PCR扩增体系为25  $\mu$ L, 包括样品DNA 30 ng、2 $\times$ Taq Plus Master Mix 12.5  $\mu$ L、正反引物各1  $\mu$ L (5  $\mu$ M) 以及2 ng/ $\mu$ L牛血清蛋白(BSA) 3  $\mu$ L, 另外在12S V5引物体系中加入阻隔引物(50  $\mu$ M) 1  $\mu$ L, 最后ddH<sub>2</sub>O补充至25  $\mu$ L。PCR反应程序为94 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 12S V5引物体系60 $^{\circ}$ C退火30 s, BF2/BR1引物体系50 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸60 s, 进行35个循环; 72 $^{\circ}$ C延伸7 min。同时在每批次扩增时加入粪便DNA提取空白和不加模板DNA的PCR空白作为对照以检验DNA污染情况。

### 1.4.2 高通量测序及数据处理

PCR产物使用1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增条带大小, 并用Agencourt AMPure XP核酸纯化试剂盒进行纯化, 然后构建DNA测序文库进行高通量测序。测序采用双端测序法(paired-end sequencing),

每端读长300 bp, 使用平台为Illumina Miseq PE300系统(Illumina Inc., San Diego, CA, USA), 由北京奥维森基因科技有限公司完成。

测序完成后, 使用Trimmomatic (v0.36)、Pear (v0.9.6)对原始数据进行质量控制并去除含N碱基的DNA序列。之后在QIIME 2软件(2021.11.0) (Bolyen et al, 2019)中使用vsearch (Rognes et al, 2016)根据双端序列的overlap关系进行拼接处理。拼接后, 使用DADA2 (Callahan et al, 2016)对合并序列进行质量控制、降噪、去嵌合体, 然后对序列进行聚类形成扩增序列变体(amplicon sequence variant, ASV, 类似以100%相似度聚类的可操作分类单元(operational taxonomic units, OTU))。

为了对扩增序列变体进行物种注释, 两组引物采用不同的注释方法。对使用针对脊椎动物的12S V5引物组扩增的序列数据, 采用BLAST局域比对与人为比对的注释方法(陆琪等, 2019; 邵昕宁等, 2019)。具体方法为, 从NCBI (National Center for Biotechnology Information, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中下载NT数据库, 使用BLAST+ (2.13.0)的blastn程序将本实验获得的ASV与数据库进行比对, 获得每个ASV的物种注释。此外, 为了提高结果的可靠性, 将结合本地物种信息对序列进一步人工比对。

基于BLAST局域比对的序列物种鉴定及分类原则包括: (1)比对结果一致度  $\geq 98\%$ 时, 最匹配序列只对应单一物种, 且该物种在当地有分布, 则认为序列来自该物种, 当该物种为非当地物种时, 则记为涵盖当地最近缘物种的上一级分类单元; 最匹配序列对应多物种时, 先排除当地无分布的物种, 如仍对应不止一种, 则注释结果记为涵盖这些物种的最小分类单元, 若物种均非当地物种时, 则记为涵盖当地最近缘物种的最小分类单元。(2)当 $95\% \leq$  比对结果一致度  $< 98\%$ 时, 最匹配序列仅有1条, 且与其次之的序列一致度差距 $2\%$ 时, 则记为一致度最高序列的上一级分类单元; 最匹配序列对应多个物种时, 则记为能涵盖当地最近缘物种的最小分类单元。(3)比对结果一致度  $< 95\%$ 时, 序列物种注释结果记为未知。

对使用针对无脊椎动物的BF2/BR1引物组扩增的序列数据, 使用基于朴素贝叶斯原理的RDP物种

分类方法进行注释, 参考数据库从blast比对结果中构建(Schmiedova et al, 2022)。具体方法为: 使用BLAST+ (2.13.0)将实验获得的ASV与nt数据库进行比对, 提取前250条以一致度由高到低排序的同源序列组成参考数据库。使用QIIME2软件中的feature-classifier classify-sklearn (Bokulich et al, 2018), 对ASV使用基于朴素贝叶斯原理的RDP物种分类器进行分类, 分类置信度为70%。分类结果将结合本地物种信息进行人工比对, 当注释物种非当地物种时, 记为涵盖当地最近缘物种的最小分类单元, 最终序列物种注释到“目”水平。

物种分布信息参考《黑龙江鱼类》(任慕莲, 1981)、《黑龙江流域(中国)鱼类识别手册》(赵文阁等, 2021)、《呼玛河底栖动物种类组成》(唐富江等, 2007)、《黑龙江上游呼玛至黑河江段底栖动物群落结构及其生物指示作用》(林繁会等, 2016)、《中国生物物种名录》(The Biodiversity Committee of Chinese Academy of Sciences, 2022)。

物种注释完成后, 删除未鉴定成功序列以及那些不太可能成为欧亚水獭猎物的物种序列, 包括人类、欧亚水獭、细菌、真菌、藻类、水生微型动物(包括轮虫、缓步动物、溞类)以及小型环节动物(包括带丝蚓目、颤蚓目)的序列。此外当一个样品中某ASV序列数少于同批次PCR空白对照或少于该样品总序列数的1%时, 认为该序列可能来源于交叉污染, 舍弃这一序列, 该ASV不参与相应样品的食物结果与计算中。最后统计经筛选后的每份样品的物种类别以及对应序列条数用于食性数据分析。

### 1.5 食性数据分析

筛选后数据分析结果以相对出现频率(relative frequency of occurrence, %RFO)和相对序列丰度(relative read abundance, %RRA)两个指标(Deagle et al, 2019)表示。

%RFO是某一物种类别在所有样品中的出现次数占所有物种类别总出现次数的百分比, 计算公式如下:

$$\%RFO = \frac{\sum_{k=1}^S I_{i,k}}{\sum_{i=1}^T \sum_{k=1}^S I_{i,k}} \times 100\% \quad (1)$$

其中,  $S$ 为有效样品总数,  $T$ 为物种类别总数,  $I_{i,k}$ 为指示函数, 当物种类别 $i$ 在样品 $k$ 中存在其值记为1, 否则记为0。由公式可知, 全部物种类别的%RFO之和

为100%。

%RRA是某一物种类别的序列数占该样品总物种类别序列的百分比, 反映了相对生物量, 计算公式如下:

$$\%RRA = \frac{1}{N} \sum_{k=1}^N \frac{n_{i,k}}{\sum_{i=1}^T n_{i,k}} \times 100\% \quad (2)$$

其中,  $N$ 为有效样品总数,  $T$ 为物种类别总数,  $n_{i,k}$ 是物种类别 $i$ 在样品 $k$ 中的序列数。由公式可知, 全部物种类别的%RRA之和为100%。

为分析结果中不同物种类别的差异水平, 使用SPSS (26.0)软件中的独立样本Kruskal-Wallis  $H$ 检验, 分别比较不同物种类别间的%RFO差异以及%RRA差异。

为评估样品数是否足够代表欧亚水獭食性结果, 使用R (4.1.2)中的vegan包(2.5-6)对经筛选后获得的物种ASV构建物种累积曲线。

## 2 结果

### 2.1 物种鉴定与高通量测序

本研究于大兴安岭北部4个研究区中共采集欧亚水獭肌肉样品1份及疑似水獭粪便样品50份。除5份DNA提取质量不合格及10份未扩增出目标条带外, 有35份粪便样品扩增出目标条带, 鉴定来源为欧亚水獭, 其中盘中20份, 呼中6份, 克一河5份, 甘河4份(附录1)。

对上述35个已鉴定样品进行食性分析, 其中12S rRNA区域全部扩增成功, COI区域仅成功扩增15份。测序结果经过滤、降噪、合并等处理后, 12S rRNA区域共获得80–120 bp双端序列片段5,855,222条, 平均每份样品167,292条序列(22,288–800,671), 其中1.22%来自欧亚水獭和人类, 另有3.83%低于1%阈值, 其余94.95%用于脊椎动物食性分析; COI区域共获得300–350 bp双端片段326,935条, 平均每份样品21,796条序列(1,294–40,396), 其中37.32%来自细菌、真菌、植物以及藻类, 19.85%未鉴定到目水平, 另有1.03%来自小型环节动物, 0.58%来自水生微型动物, 5.37%低于1%阈值, 其余35.84%用于后续无脊椎动物食性分析。

### 2.2 欧亚水獭食性分析

#### 2.2.1 12S rRNA区域

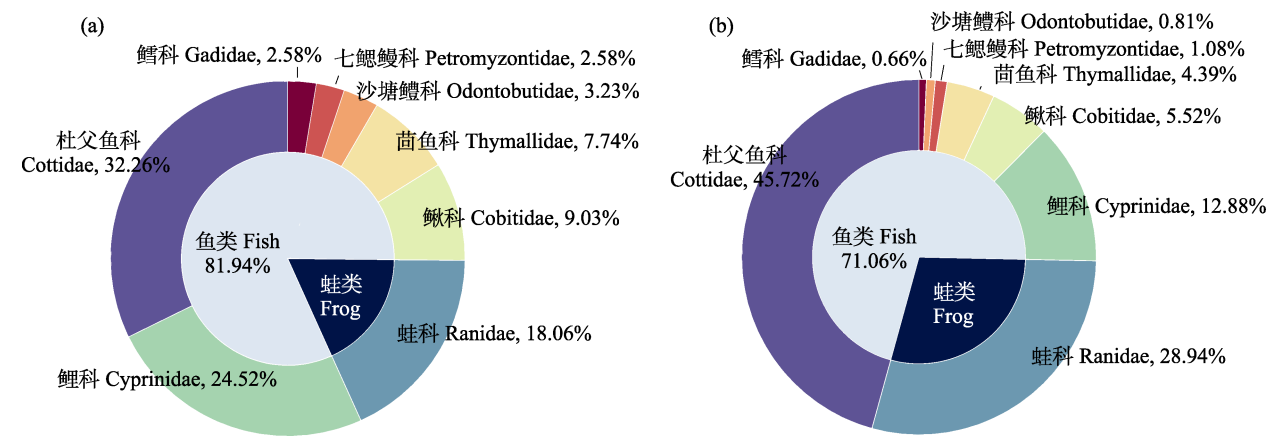
处理结果显示, 12S rRNA区域有效样品数为35

(附录2), 序列注释筛选后共获得17种不同的物种类别, 其中11种鉴定到种水平, 6种鉴定到属水平(表2)。所有物种类别中, %RFO及%RRA大于10%的类别有杂色杜父鱼(*Cottus poecilopus*)以及黑龙江林蛙(*Rana asmurensis*), 其中杂色杜父鱼相对出现频率和相对序列丰度均最高, 分别为19.35%和27.32%(表2)。科水平上, 杜父鱼科、蛙科以及鲤科物种的相对出现频率和相对序列丰度均大于10%, 其中杜父鱼科均最高, 分别为32.26%和45.72%(图2)。从生

物类群看, 相比蛙类, 17种物种类别中, 鱼类有15种, 物种最丰富(表2); 其次鱼类的%RFO和%RRA分别为81.94%和71.06%, 在脊椎动物物种类别中占主导地位(图2)。Kruskal-Wallis *H*检验结果表明, 科水平上, 不同物种类别在%RFO及%RRA统计值上存在显著差异( $H = 107.08, df = 7$ )。类别的成对比较结果显示, 杜父鱼科与其他鱼类间具有显著差异。脊椎动物物种累积曲线显示, 随着样品数量的增加, 观测到的脊椎动物ASV数量趋于稳定, 说明本研究

**表2 大兴安岭北部欧亚水獭粪便( $N = 35$ ) 12S rRNA区域食性分析结果**  
Table 2 Results of diet analysis in 12S rRNA region ( $N = 35$ ) of Eurasian otter fecal samples in the northern Greater Khingan Mountains. %RFO, Relative frequency of occurrence; %RRA, Relative read abundance.

物种类别 Species taxa	出现样品数 Occurrence	相对出现频率 %RFO	相对序列丰度 %RRA	生物类群 Biome
杂色杜父鱼 <i>Cottus poecilopus</i>	30	19.35	27.32	鱼类 Fish
黑龙江林蛙 <i>Rana amurensis</i>	24	15.48	21.73	蛙类 Frog
克氏杜父鱼 <i>Cottus czerskii</i>	15	9.68	16.47	鱼类 Fish
东北林蛙 <i>Rana dybowskii</i>	4	2.58	7.21	蛙类 Frog
须鲈属一种 <i>Barbatula</i> sp.	13	8.39	5.47	鱼类 Fish
真鲈 <i>Phoxinus phoxinus</i>	18	11.61	5.09	鱼类 Fish
湖大吻鲈 <i>Rhynchocypris percunurus</i>	10	6.45	4.65	鱼类 Fish
黑龙江茴鱼 <i>Thymallus arcticus</i>	8	5.16	2.96	鱼类 Fish
拉氏大吻鲈 <i>Rhynchocypris lagowskii</i>	8	5.16	2.81	鱼类 Fish
黑龙江中杜父鱼 <i>Mesocottus haitej</i>	2	1.29	1.54	鱼类 Fish
茴鱼属一种 <i>Thymallus</i> sp.	4	2.58	1.43	鱼类 Fish
七鳃鳗属一种 <i>Lampetra</i> sp.	4	2.58	1.08	鱼类 Fish
葛氏鲈塘鳢 <i>Perccottus glenii</i>	5	3.23	0.81	鱼类 Fish
江鳕 <i>Lota lota</i>	4	2.58	0.66	鱼类 Fish
杜父鱼属一种 <i>Cottus</i> sp.	3	1.94	0.39	鱼类 Fish
大吻鲈属一种 <i>Rhynchocypris</i> sp.	2	1.29	0.33	鱼类 Fish
花鲈属一种 <i>Cobitis</i> sp.	1	0.65	0.05	鱼类 Fish



**图2 科水平上大兴安岭北部欧亚水獭粪便( $N = 35$ )脊椎动物组成。(a)相对出现频率;(b)相对序列丰度。**  
Fig. 2 Vertebrate of Eurasian otter feces ( $N = 35$ ) in northern Greater Khingan Mountains at family level. (a) Relative frequency of occurrence; (b) Relative read abundance.



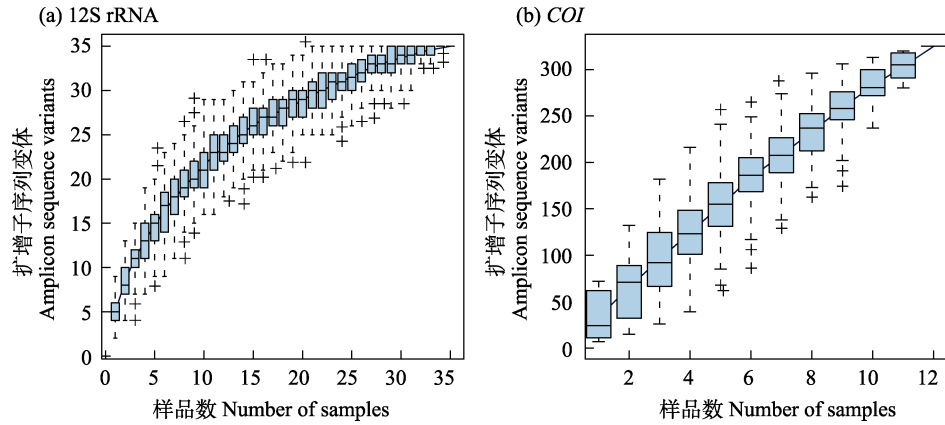


图3 12S rRNA和COI区域食性分析结果物种累积曲线  
Fig. 3 Species accumulation curve of diet analysis in 12S rRNA and COI region

表3 大兴安岭北部欧亚水獭粪便(N = 12) COI区域食性分析结果  
Table 3 Results of diet analysis in COI region (N = 12) of Eurasian otter fecal samples in the northern Greater Khingan Mountains. %RFO, Relative frequency of occurrence; %RRA, Relative read abundance.

物种类别 Species taxa	出现样品数 Occurrence	相对出现频率 %RFO	相对序列丰度 %RRA	生物类群 Biome
蜻蜓目 Odonata	8	20.51	33.86	昆虫 Insect
毛翅目 Trichoptera	9	23.08	25.92	昆虫 Insect
襀翅目 Plecoptera	7	17.95	18.74	昆虫 Insect
蜉蝣目 Ephemeroptera	8	20.51	15.87	昆虫 Insect
双翅目 Diptera	7	17.95	5.60	昆虫 Insect

样品数量足以代表大兴安岭北部冬季欧亚水獭粪便中脊椎动物情况(图3a)。

### 2.2.2 COI区域

处理结果显示, COI区域有效样品数为12 (附录3), 注释后共获得5种分类到目水平的物种类别。从生物类群看, 5种类别均为昆虫。所有类别中, %RFO及%RRA大于10%的有蜻蜓目、毛翅目、襀翅目和蜉蝣目(表3), 其中蜻蜓目(%RFO = 20.51%, %RRA = 33.86%)是粪便中无脊椎动物的主要组成部分。使用独立样本Kruskal-Wallis H检验比较不同目间的%RFO及%RRA统计值差异, 结果表明5个目水平的物种类别在%RFO及%RRA统计值上不存在显著差异。无脊椎动物物种累积曲线显示, 随着样品数量的增加, 观测到的无脊椎动物物种ASV数量仍呈上升趋势, 说明本研究仍需更多的样品数量以分析粪便中无脊椎动物的组成(图3b)。

## 3 讨论

### 3.1 物种鉴定

欧亚水獭一般独居, 多在夜间活动, 成年雄性

活动范围可达15 km, 行动迅速, 行踪隐蔽, 难以被人直接观察(Erlinge, 1967; 韩雪松等, 2021)。同时从当年9月下旬到翌年4月上旬, 采样区域日平均气温均低于10℃, 极端最低气温可达-40℃, 人为长期监测难度大, 红外相机等长期监测设备受极端低温影响常无法正常工作, 因此难以通过直接观察其捕食行为获得食性数据。得益于分子生物学的发展, 目前基于粪便DNA获取食物组成已成为食性研究的主流方法。然而该方法需要物种来源明确的粪便样品作为研究材料, 以避免得出错误的食性结果(Morin et al, 2016)。但基于粪便形态特征采集样品往往有误判来源的风险, 粪便质量也无法得到保证, 因此在食性分析前对样品的质量及物种来源进行检测就显得尤为重要(陆琪等, 2019; Harper et al, 2020)。

本研究于大兴安岭北部共采集疑似水獭粪便样品50份, 在采集时基于欧亚水獭习性, 根据雪地痕迹以及粪便形态特征预判为欧亚水獭粪便, 除5份DNA提取质量不合格及10份未扩增出目标条带外, 剩余35份均成功扩增出目标条带被鉴定源自欧

欧亚水獭, 有效样品概率为70%。本次实验中粪便物种鉴定阶段所使用的引物为针对欧亚水獭设计的特异引物LLCBL/R, 该引物已被成功应用于淡水生态系统中欧亚水獭的检测(Thomsen et al, 2012)。同时在后续食性分析阶段对脊椎动物12S rRNA区域进行测序后, 35份样品中均存在欧亚水獭的序列且无其他捕食者序列, 说明该物种鉴定方法较为可靠。

本次实验中较低的鉴定成功率可能是因为采集的样品质量不佳或保存方法不当导致了DNA的降解。目前较新的基于粪便DNA的动物食性研究一般采用两步法保存粪便, 即先用无水乙醇或95%酒精浸泡24 h后, 再加入硅胶进行-20℃保存(Shao et al, 2021; Wang et al, 2022)。有研究表明, 采用两步法要比直接加入硅胶, 能从粪便中提取到更高浓度的DNA, 在PCR实验中也有更高的成功率(Nsubuga et al, 2004)。因此, 本研究中直接加入硅胶进行低温保存可能会对DNA提取和扩增的效果造成影响, 使鉴定成功率降低。同时需要强调的是, 尽管后续实验结果表明使用硅胶冷冻法保存的样品仍可以用于食性分析, 但由于研究区域和季节的特殊性, 本研究采样时日平均气温均在-10℃以下, 而低温环境有利于粪便DNA的保存。因此本研究中使用的粪便保存方法可能不适用于其他地区或其他季节。另一个导致成功率低的因素可能是采集的粪便来源于非欧亚水獭物种, 因此无法扩增到目标条带。上述问题可通过尽量采集新鲜粪便及优化保存方法以减少降解所带来的影响。

### 3.2 食性分析

传统的基于形态学的欧亚水獭食性研究受限于食物残渣的辨识度, 往往只能将猎物鉴定到较高的分类水平, 同时由于同源物种间形态相近容易误判, 因此难以在物种水平上获得准确的食性结果(Britton et al, 2006; Smirolodo et al, 2019; Marcolin et al, 2020)。利用DNA宏条形码技术, 本研究成功从欧亚水獭粪便中鉴定出分类到种的脊椎动物共计11种及分类到目的无脊椎动物共计5种, 其中脊椎动物分类精度与同样使用DNA宏条形码的食性研究相当(Harper et al, 2020; Wang et al, 2022)。更精细的食性结果, 说明了DNA宏条形码技术可用于欧亚水獭的食性研究且具有更大的应用潜力。

本研究使用了两组引物分别探究欧亚水獭对脊椎动物及无脊椎动物的摄食情况, 尽管基于高通量测序的食性结果可以用于半定量分析, 但由于不同引物间的扩增成功率与效率存在差异, 序列丰度与生物量之间的关系往往会发生变化, 且相关性较弱, 因此本研究未对两组引物扩增获得的食性结果进行统一分析(Pompanon et al, 2012; Kumari et al, 2019)。已有研究表明, 欧亚水獭作为机会主义捕食者, 其食谱组成受到当地食物资源多样性影响, 但主要以鱼类为主, 其次是两栖动物、鸟类、爬行动物和无脊椎动物(Clavero et al, 2003; Krawczyk et al, 2016; Lanszki et al, 2016)。同时尽管欧亚水獭食性在不同季节、不同栖息地类型、不同地理区域中存在差异, 但鱼类仍是水獭食物的主要来源, 而两栖动物常在特定的季节(如冬春季)或特定的水体(如小溪沼泽)中作为鱼类的重要食物补充(Taastrom & Jacobsen, 1999; Smirolodo et al, 2009; Krawczyk et al, 2016; Lanszki et al, 2016)。此外有研究表明, 昆虫在水獭粪便中出现频率较高, 但只占其食物生物量的很小一部分, 食物重要性远小于鱼类、蛙类等脊椎动物(Krawczyk et al, 2016)。因此尽管本研究对两组引物扩增结果分别进行分析, 但仍将鱼类、蛙类等脊椎动物作为主要食物来源进行讨论。

对脊椎动物12S rRNA区域序列的分析结果表明, 大兴安岭北部欧亚水獭冬季主要捕食鱼类(%RFO = 81.94%, %RAA = 71.06%), 其次是蛙类(%RFO = 18.06%, %RAA = 28.94%), 而不捕食鸟类、爬行动物及小型哺乳动物。这一结果与欧洲的欧亚水獭食性研究结果相似, 其食物组成都是以鱼类为主, 其次为两栖动物, 不同的是在欧洲的相关研究中水獭还会捕食鸟类、小型哺乳动物等脊椎动物(Clavero et al, 2003; Krawczyk et al, 2016; Lanszki et al, 2016)。例如, Harper等(2020)在英国北部和东部基于DNA宏条形码技术开展欧亚水獭食性研究, 发现水獭的食物主要是鱼类(81.1%), 其次是两栖动物(12.7%)、鸟类(5.9%)和哺乳动物(0.5%)。国内的欧亚水獭食性研究表明, 水獭主要捕食鱼类, 其次是两栖动物、鸟类和哺乳动物, 而不食用爬行动物(Wang et al, 2022)。本研究中, 蛙类是除鱼类外唯一对饮食做出重要贡献的脊椎动物猎物。这可能是冬季时蛙类冬眠, 相较鸟类、爬行动物、哺乳动物



等物种更容易被捕捉(Weber, 1990)。此外, 由于冬季研究区河流已经封冻, 极端天气下, 营水边的鸟类数量减少也可能导致结果未能扩增出鸟类序列。还需注意的是, 有研究表明, 本研究所使用的通用脊椎动物引物12S V5并不是对所有脊椎动物都有效(Kelly et al, 2014), 因此还需要考虑引物是否充分覆盖研究区潜在食源物种做进一步研究。

本研究中欧亚水獭较多捕食杂色杜父鱼、克氏杜父鱼(*Cottus czerskii*)等杜父鱼科鱼类(%*RRA* = 45.72%), 而较少捕食其他鱼类。这可能是由于欧亚水獭偏好捕食移动缓慢和体型较小的猎物。杂色杜父鱼、克氏杜父鱼等杜父鱼科鱼类在形态上表现为小型鱼类, 主要栖息于淡水水系中较为复杂的山涧及其支流, 常被发现生存于水温较低的砂砾与石缝中, 活动能力较弱, 是典型的山涧冷水性底层鱼类<sup>①</sup>。而其他鱼类如湖大吻鲛(*Rhynchocypris percunurus*)、真鲢(*Phoxinus phoxinus*)等也属于冷水性小型鱼类(许旺, 2013), 但其活动能力较强, 捕捉它们需要更多的能量与时间。与本研究水獭鱼类捕食倾向相似, 以往有研究表明, 欧亚水獭更倾向于捕食移动缓慢和较小的底栖鱼类(Hong et al, 2019; Harper et al, 2020)。但也有研究指出, 欧亚水獭更喜欢捕食能快速活动的鲤科鱼类(Kumari et al, 2019; Wang et al, 2022)。研究结果的差异可能与栖息地猎物的捕捉难度密切相关, 而捕捉难度主要受栖息地猎物组成、水体类型、季节等因素的影响(Wang et al, 2022)。因此本研究得出的欧亚水獭鱼类偏好性的结论仍需结合当地的物种情况, 在不同栖息地类型、不同季节做进一步研究。

除了使用针对脊椎动物的12S V5引物外, 为了探讨欧亚水獭捕食无脊椎动物的可能, 本研究还使用了针对无脊椎动物的BF2/BR1引物对粪便DNA进行扩增。结果发现除了水生微型动物、小型环节动物、昆虫等无脊椎动物外, 还扩增出了细菌、真菌、藻类以及植物等非无脊椎动物序列。非无脊椎动物序列的产生可能是由于使用引物的简并性过高引起的非特异性扩增。此外植物、藻类、水生微型动物(轮虫、溞类等)以及小型环节动物(包括带丝

蛭目、颤蛭目)序列的产生可能是作为鱼类食物被一同扩增使结果产生了偏差(Alberdi et al, 2019)。因此根据以往的食性研究成果, 本研究删除了那些不太可能成为欧亚水獭猎物的物种序列进行分析。

对无脊椎动物COI区域序列的分析结果表明, 欧亚水獭粪便中存在蜻蜓目、毛翅目、襀翅目、蜉蝣目以及双翅目等昆虫, 且无其他大型无脊椎动物的存在, 这表明研究区水獭有可能捕食昆虫作为食物补充。但昆虫作为鱼类的常见食物之一, 极有可能随着水獭捕食鱼类而出现在水獭粪便中。有研究表明, 毛翅目、襀翅目、蜉蝣目等昆虫是杂色杜父鱼的主要食物来源(霍堂斌等, 2015)。且基于显著性差异分析发现, 5个昆虫类别中, 小型昆虫(难以被水獭主动捕食)如双翅目和毛翅目昆虫与大型昆虫(易被水獭发现捕食)如蜻蜓目在%*RFO*及%*RRA*统计值上不存在显著差异。这表明样品中的昆虫很有可能来源于鱼类或者蛙类等被捕食者体内。因此尽管已有研究发现, 欧亚水獭在圈养情况下会积极捕食大型昆虫(Carss & Parkinson, 1996), 且相关食性研究表明, 昆虫一直是水獭无脊椎动物食物的重要组成部分(Krawczyk et al, 2016; Lanszki et al, 2016)。但出于保守性原则, 本研究不将蜻蜓目、蜉蝣目等昆虫列入大兴安岭北部欧亚水獭冬季的食性中。此外本研究并未从水獭粪便中发现虾类、蟹类、蚌类等大型无脊椎动物的存在, 这可能与栖息地相关物种数量稀少有关(经访谈, 研究区管护人员表示很少在研究区河段中发现虾类、蟹类、蚌类等大型无脊椎动物)。

## 参考文献

- Alberdi A, Aizpurua O, Bohmann K, Gopalakrishnan S, Lynggaard C, Nielsen M, Gilbert MTP (2019) Promises and pitfalls of using high-throughput sequencing for diet analysis. *Molecular Ecology Resources*, 19, 327–348.
- Bokulich NA, Dillon MR, Bolyen E, Kaehler BD, Huttley GA, Caporaso JG (2018) q2-sample-classifier: Machine-learning tools for microbiome classification and regression. *Journal of Open Research Software*, 3, 934.
- Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, Alexander H, Alm EJ, Arumugam M, Asnicar F, Bai Y, Bisanz JE, Bittinger K, Brejnrod A, Brislawn CJ, Brown CT, Callahan BJ, Caraballo-Rodríguez AM, Chase J, Cope EK, Da Silva R, Diener C, Dorrestein PC, Douglas GM, Durall DM, Duvallet C, Edwards CF, Ernst M, Estaki M, Fouquier J, Gauglitz JM, Gibbons SM,

① 周远帆 (2021) 东北地区杂色杜父鱼线粒体全基因组序列测定及遗传多样性分析. 硕士学位论文, 上海海洋大学, 上海.

- Gibson DL, Gonzalez A, Gorlick K, Guo JR, Hillmann B, Holmes S, Holste H, Huttenhower C, Huttley GA, Janssen S, Jarmusch AK, Jiang LJ, Kaehler BD, Bin KK, Keefe CR, Keim P, Kelley ST, Knights D, Koester I, Kosciolk T, Kreps J, Langille MGI, Lee J, Ley R, Liu YX, Loftfield E, Lozupone C, Maher M, Marotz C, Martin BD, McDonald D, McIver LJ, Melnik AV, Metcalf JL, Morgan SC, Morton JT, Naimey AT, Navas-Molina JA, Nothias LF, Orchanian SB, Pearson T, Peoples SL, Petras D, Lai Preuss M, Priesse E, Rasmussen LB, Rivers A, Robeson MS, Rosenthal P, Segata N, Shaffer M, Shiffer A, Sinha R, Song SJ, Spear JR, Swafford AD, Thompson LR, Torres PJ, Trinh P, Tripathi A, Turnbaugh PJ, Ul-Hasan S, van der Hooft JJJ, Vargas F, Vázquez-Baeza Y, Vogtmann E, von Hippel M, Walters W, Wan YH, Wang MX, Warren J, Weber KC, Williamson CHD, Willis AD, Xu ZZ, Zaneveld JR, Zhang YL, Zhu QY, Knight R, Caporaso JG (2019) Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nature Biotechnology*, 37, 852–857.
- Britton R, Pegg J, Shepherd JS (2006) Revealing the prey items of the otter *Lutra lutra* in South West England using stomach contents analysis. *Folia Zoologica*, 55, 167–174.
- Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP (2016) DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods*, 13, 581–583.
- Carss DN, Parkinson SG (1996) Errors associated with otter *Lutra lutra* faecal analysis. I. Assessing general diet from spraints. *Journal of Zoology*, 238, 301–317.
- Clavero M, Prenda J, Delibes M (2003) Trophic diversity of the otter (*Lutra lutra* L.) in temperate and Mediterranean freshwater habitats. *Journal of Biogeography*, 30, 761–769.
- De Barba M, Miquel C, Boyer F, Mercier C, Rioux D, Coissac E, Taberlet P (2014) DNA metabarcoding multiplexing and validation of data accuracy for diet assessment: Application to omnivorous diet. *Molecular Ecology Resources*, 14, 306–323.
- Deagle BE, Thomas AC, McInnes JC, Clarke LJ, Vesterinen EJ, Clare EL, Kartzinel TR, Eveson JP (2019) Counting with DNA in metabarcoding studies: How should we convert sequence reads to dietary data? *Molecular Ecology*, 28, 391–406.
- Duan LL (2017) Impacts of Changes in Climate, Forest Cover and Permafrost on Streamflow in the Da Hingan Mountains watersheds. PhD dissertation, Northeast Forestry University, Harbin. (in Chinese with English abstract) [段亮亮 (2017) 大兴安岭气候、森林覆盖率和冻土变化对河川径流的影响. 博士学位论文, 东北林业大学, 哈尔滨.]
- Duffy JE, Cardinale BJ, France KE, McIntyre PB, Thébault E, Loreau M (2007) The functional role of biodiversity in ecosystems: Incorporating trophic complexity. *Ecology Letters*, 10, 522–538.
- Elbrecht V, Leese F (2017) Validation and development of *COI* metabarcoding primers for freshwater macroinvertebrate bioassessment. *Frontiers in Environmental Science*, 5, 11.
- Erlinge S (1967) Home range of the otter *Lutra lutra* L. in southern Sweden. *Oikos*, 18, 186–209.
- Gomez L, Leupen B, Theng M, Fernandez K, Savage M (2016) Illegal Otter Trade: An Analysis of Seizures in Selected Asian Countries (1980–2015). *Traffic*, Malaysia.
- Han XS, Dong ZY, Zhao G, Zhao X, Shi XY, Lü Z, Li HQ (2021) Using surveillance cameras to analyze the activity pattern of the Eurasian otters (*Lutra lutra*) and the efficiency of camera trap monitoring. *Biodiversity Science*, 29, 770–779. (in Chinese with English abstract) [韩雪松, 董正一, 赵格, 赵翔, 史湘莹, 吕植, 李宏奇 (2021) 基于视频监控系统的欧亚水獭活动节律初报及红外相机监测效果评估. *生物多样性*, 29, 770–779.]
- Harper L, Watson H, Donnelly R, Hampshire R, Sayer C, Breithaupt T, Hänfling B (2020) Using DNA metabarcoding to investigate diet and niche partitioning in the native European otter (*Lutra lutra*) and invasive American mink (*Neovison vison*). *Metabarcoding and Metagenomics*, 4, e56087.
- Hong SW, Gim JS, Kim HG, Cowan PE, Joo GJ (2019) A molecular approach to identifying the relationship between resource use and availability in Eurasian otters (*Lutra lutra*). *Canadian Journal of Zoology*, 97, 797–804.
- Huo TB, Song XS, Wang ZY, Wang Y, Li TZ (2015) Biological characteristics of alpine sculpin *Cottus poecilopus* Heckel. *Chinese Journal of Fisheries*, 28, 16–20. (in Chinese with English abstract) [霍堂斌, 宋雪松, 王振洋, 王野, 栗铁柱 (2015) 杂色杜父鱼生物学初步研究. *水产学杂志*, 28, 16–20.]
- Kartzinel TR, Chen PA, Coverdale TC, Erickson DL, Kress WJ, Kuzmina ML, Rubenstein DI, Wang W, Pringle RM (2015) DNA metabarcoding illuminates dietary niche partitioning by African large herbivores. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 112, 8019–8024.
- Kelly RP, Port JA, Yamahara KM, Crowder LB (2014) Using environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm. *PLoS ONE*, 9, e86175.
- Klare U, Kamler JF, Macdonald DW (2011) A comparison and critique of different scat-analysis methods for determining carnivore diet. *Mammal Review*, 41, 294–312.
- Krawczyk AJ, Bogdziewicz M, Majkowska K, Glazaczow A (2016) Diet composition of the Eurasian otter *Lutra lutra* in different freshwater habitats of temperate Europe: A review and meta-analysis. *Mammal Review*, 46, 106–113.
- Kruuk H (2006) *Otters: Ecology, Behaviour and Conservation*. Oxford University Press, New York.
- Kumari P, Dong K, Eo KY, Lee WS, Kimura J, Yamamoto N (2019) DNA metabarcoding-based diet survey for the Eurasian otter (*Lutra lutra*): Development of a Eurasian otter-specific blocking oligonucleotide for *12S rRNA* gene sequencing for vertebrates. *PLoS ONE*, 14, e0226253.
- Lanszki J, Lehoczy I, Kotze A, Somers MJ (2016) Diet of otters (*Lutra lutra*) in various habitat types in the Pannonian

- biogeographical region compared to other regions of Europe. *PeerJ*, 4, e2266.
- Li F, Chan BPL (2018) Past and present: The status and distribution of otters (Carnivora: Lutrinae) in China. *Oryx*, 52, 619–626.
- Lin FH, Sun CM, Chen WL, Wang JG (2016) Community structure and bioindicator of benthic fauna from Huma to Heihe in the upper reaches of Heilongjiang Province. *Journal of Mudanjiang Normal University (Natural Sciences Edition)*, 22, 57–59. (in Chinese) [林繁会, 孙春梅, 陈伟莉, 王金刚 (2016) 黑龙江上游呼玛至黑龙江段底栖动物群落结构及其生物指示作用. *牡丹江师范学院学报(自然科学版)*, 22, 57–59.]
- Lü J, Yang L, Yang L, Li JX, Huang MJ, Luan XF (2018) Potential distribution of otter in Northeast China. *Journal of Fujian Agriculture and Forestry University (Natural Science Edition)*, 47, 473–479. (in Chinese with English abstract) [吕江, 杨立, 杨蕾, 李婧昕, 黄木娇, 栾晓峰 (2018) 中国东北地区水獭种群潜在分布区的预测. *福建农林大学学报(自然科学版)*, 47, 473–479.]
- Lu Q, Hu Q, Shi XG, Jin SL, Li S, Yao M (2019) Metabarcoding diet analysis of snow leopards (*Panthera uncia*) in Wolong National Nature Reserve, Sichuan Province. *Biodiversity Science*, 27, 960–969. (in Chinese with English abstract) [陆琪, 胡强, 施小刚, 金森龙, 李晟, 姚蒙 (2019) 基于分子宏条形码分析四川卧龙国家级自然保护区雪豹的食性. *生物多样性*, 27, 960–969.]
- Marcolin F, Iordan F, Pizzul E, Pallavicini A, Torboli V, Manfrin C, Quaglietta L (2020) Otter diet and prey selection in a recently recolonized area assessed using microscope analysis and DNA barcoding. *Hystrix*, 31, 64–72.
- Monterroso P, Godinho R, Oliveira T, Ferreras P, Kelly M, Morin D, Waits L, Alves P, Mills L (2019) Feeding ecological knowledge: The underutilised power of faecal DNA approaches for carnivore diet analysis. *Mammal Review*, 49, 97–112.
- Morin DJ, Higdon SD, Holub JL, Montague DM, Fies ML, Waits LP, Kelly MJ (2016) Bias in carnivore diet analysis resulting from misclassification of predator scats based on field identification. *Wildlife Society Bulletin*, 40, 669–677.
- Nsubuga AM, Robbins MM, Roeder AD, Morin PA, Boesch C, Vigilant L (2004) Factors affecting the amount of genomic DNA extracted from ape faeces and the identification of an improved sample storage method. *Molecular Ecology*, 13, 2089–2094.
- Pompanon F, Deagle BE, Symondson WOC, Brown DS, Jarman SN, Taberlet P (2012) Who is eating what: Diet assessment using next generation sequencing. *Molecular Ecology*, 21, 1931–1950.
- Ren ML (1981) Heilongjiang River Fish. Heilongjiang People's Publishing House, Harbin. (in Chinese) [任慕莲 (1981) 黑龙江鱼类. 黑龙江人民出版社, 哈尔滨.]
- Riaz T, Shehzad W, Viari A, Pompanon F, Taberlet P, Coissac E (2011) ecoPrimers: Inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic Acids Research*, 39, e145.
- Rognes T, Flouri T, Nichols B, Quince C, Mahé F (2016) VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ*, 4, e2584.
- Ruiz-Olmo J, Calvo A, Palazón S, Arqued V (1998) Is the otter a bioindicator? *Galemys*, 10, 227–237.
- Schmiedová L, Tomášek O, Pinkasová H, Albrecht T, Kreisinger J (2022) Variation in diet composition and its relation to gut microbiota in a passerine bird. *Scientific Reports*, 12, 3787.
- Severud WJ, Windels SK, Belant JL, Bruggink JG (2013) The role of forage availability on diet choice and body condition in American beavers (*Castor canadensis*). *Mammalian Biology*, 78, 87–93.
- Shao XN, Lu Q, Liu MZ, Xiong MY, Bu HL, Wang DJ, Liu SY, Zhao JD, Li S, Yao M (2021) Generalist carnivores can be effective biodiversity samplers of terrestrial vertebrates. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 19, 557–563.
- Shao XN, Song DZ, Huang QW, Li S, Yao M (2019) Fast surveys and molecular diet analysis of carnivores based on fecal DNA and metabarcoding. *Biodiversity Science*, 27, 543–556. (in Chinese with English abstract) [邵昕宁, 宋大昭, 黄巧雯, 李晟, 姚蒙 (2019) 基于粪便DNA及宏条形码技术的食肉动物快速调查及食性分析. *生物多样性*, 27, 543–556.]
- Sheppard SK, Harwood JD (2005) Advances in molecular ecology: Tracking trophic links through predator–prey food-webs. *Functional Ecology*, 19, 751–762.
- Shi GQ, Guo YS, Luo YM, Gong ZC, Zhang GL, Piao ZJ, Wang ZC (2021) Spring ashore activity rhythm of Eurasian otters (*Lutra lutra*) in Changbai Mountain, Jilin Province. *Chinese Journal of Wildlife*, 42, 693–699. (in Chinese with English abstract) [史国强, 郭艳双, 罗玉梅, 巩振财, 张国利, 朴正吉, 王卓聪 (2021) 吉林长白山地区水獭春季岸上活动节律. *野生动物学报*, 42, 693–699.]
- Smiroldo G, Balestrieri A, Remonti L, Prigioni C (2009) Seasonal and habitat-related variation of otter *Lutra lutra* diet in a Mediterranean river catchment (Italy). *Folia Zoologica*, 58, 87–97.
- Smiroldo G, Villa A, Tremolada P, Gariano P, Balestrieri A, Delfino M (2019) Amphibians in Eurasian otter *Lutra lutra* diet: Osteological identification unveils hidden prey richness and male-biased predation on anurans. *Mammal Review*, 49, 240–255.
- Spaulding R, Krausman P, Ballard W (2000) Observer bias and analysis of gray wolf diets from scats. *Wildlife Society Bulletin*, 28, 947–950.
- Taastrøm HM, Jacobsen L (1999) The diet of otters (*Lutra lutra* L.) in Danish freshwater habitats: Comparisons of prey fish populations. *Journal of Zoology*, 248, 1–13.
- Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Brochmann C, Willerslev E (2012) Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 21,



- 2045–2050.
- Tang FJ, Jiang ZF, Dong CZ, Ma B, Zhan PR (2007) The Zoobenthos species in Huma River. Chinese Journal of Fisheries, 20, 76–78. (in Chinese with English abstract) [唐富江, 姜作发, 董崇智, 马波, 战培荣 (2007) 呼玛河底栖动物种类组成. 水产学杂志, 20, 76–78.]
- The Biodiversity Committee of Chinese Academy of Sciences (2022) Catalogue of Life China: 2022 Annual Checklist. <http://www.sp2000.org.cn>. (accessed on 2022-10-07)
- Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, Wiuf C, Rasmussen M, Gilbert MT, Orlando L, Willerslev E (2012) Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. Molecular Ecology, 21, 2565–2573.
- Traugott M, Thalinger B, Wallinger C, Sint D (2020) Fish as predators and prey: DNA-based assessment of their role in food webs. Journal of Fish Biology, 98, 367–382.
- Trites AW, Joy R (2005) Dietary analysis from fecal samples: How many scats are enough? Journal of Mammalogy, 86, 704–712.
- Wang QY, Wang ZC, Zheng KD, Zhang P, Shen LM, Chen WL, Fan PF, Zhang L (2022) Assessing the diet of a predator using a DNA metabarcoding approach. Frontiers in Ecology and Evolution, 10, 902412.
- Wang QY, Zheng KD, Han XS, He F, Zhao X, Fan PF, Zhang L (2021) Site-specific and seasonal variation in habitat use of Eurasian otters (*Lutra lutra*) in Western China: Implications for conservation. Zoological Research, 42, 824–832.
- Wasser SK, Houston CS, Koehler GM, Cadd GG, Fain SR (1997) Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. Molecular Ecology, 6, 1091–1097.
- Weber JM (1990) Seasonal exploitation of amphibians by otters (*Lutra lutra*) in north-east Scotland. Journal of Zoology, 220, 641–651.
- Xiong MY, Wang DJ, Bu HL, Shao XN, Zhang D, Li S, Wang RJ, Yao M (2017) Molecular dietary analysis of two sympatric felids in the Mountains of Southwest China biodiversity hotspot and conservation implications. Scientific Reports, 7, 41909.
- Xu HL (1984) Species of otters in China and the conservation of their natural resources. Chinese Journal of Wildlife, 1, 9–11. (in Chinese with English abstract) [徐龙辉 (1984) 中国水獭种类及资源保护. 野生动物, 1, 9–11.]
- Xu W (2013) Studies on Molecular Phylogeny of *Rhynchocypris* Fishes (Teleostei: Cyprinidae) and Phylogeography of Cold-adapting Freshwater Fishes in the Eastern China. PhD dissertation, Fudan University, Shanghai. (in Chinese with English abstract) [许旺 (2013) 鲤科大吻鲃属鱼类的分子系统发育关系与我国东部地区冷水性淡水鱼类的亲缘生物地理. 博士学位论文, 复旦大学, 上海.]
- Yang FY (1998) Fish resources in the northern Greater Khingan Mountains. Territory & Natural Resources Study, 20, 49–53. (in Chinese) [杨富亿 (1998) 大兴安岭北部鱼类资源现状. 国土与自然资源研究, 20, 49–53.]
- Zhang C, Chen MH, Yang L, Zhuang HF, Wu SH, Zhan ZJ, Wang JD, Luan XF (2022) Distribution pattern and identification of conservation priority areas of the otter in Northeast China. Biodiversity Science, 30, 21157. (in Chinese with English abstract) [张超, 陈敏豪, 杨立, 庄鸿飞, 武曙红, 湛振杰, 王嘉栋, 栾晓峰 (2022) 东北地区水獭分布格局与保护优先区识别. 生物多样性, 30, 21157.]
- Zhang L, Wang QY, Yang L, Li F, Chan BPL, Xiao ZS, Li S, Song DZ, Piao ZJ, Fan PF (2018) The neglected otters in China: Distribution change in the past 400 years and current conservation status. Biological Conservation, 228, 259–267.
- Zhao WG, Ma B, Gao ZS, Liu P, Peng YL, Yu D, Liu ZT, Li L, Chen H (2021) Manual of Fish Identification in Heilongjiang River Basin (China). Science Press, Beijing. (in Chinese) [赵文阁, 马波, 高智晟, 刘鹏, 彭一良, 于东, 刘志涛, 李雷, 陈辉 (2021) 黑龙江流域(中国)鱼类识别手册. 科学出版社, 北京.]

(责任编辑: 李晟 责任编辑: 李会丽)

## 附录 Supplementary Material

### 附录1 经物种鉴定筛选出的有效欧亚水獭粪便样品

Appendix 1 The valid fecal samples of Eurasian otter screened out through DNA identification in the northern Greater Khingan Mountains  
<https://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2022586-1.pdf>

### 附录2 科水平上大兴安岭北部欧亚水獭粪便(N = 35) 12S rRNA区域物种注释结果

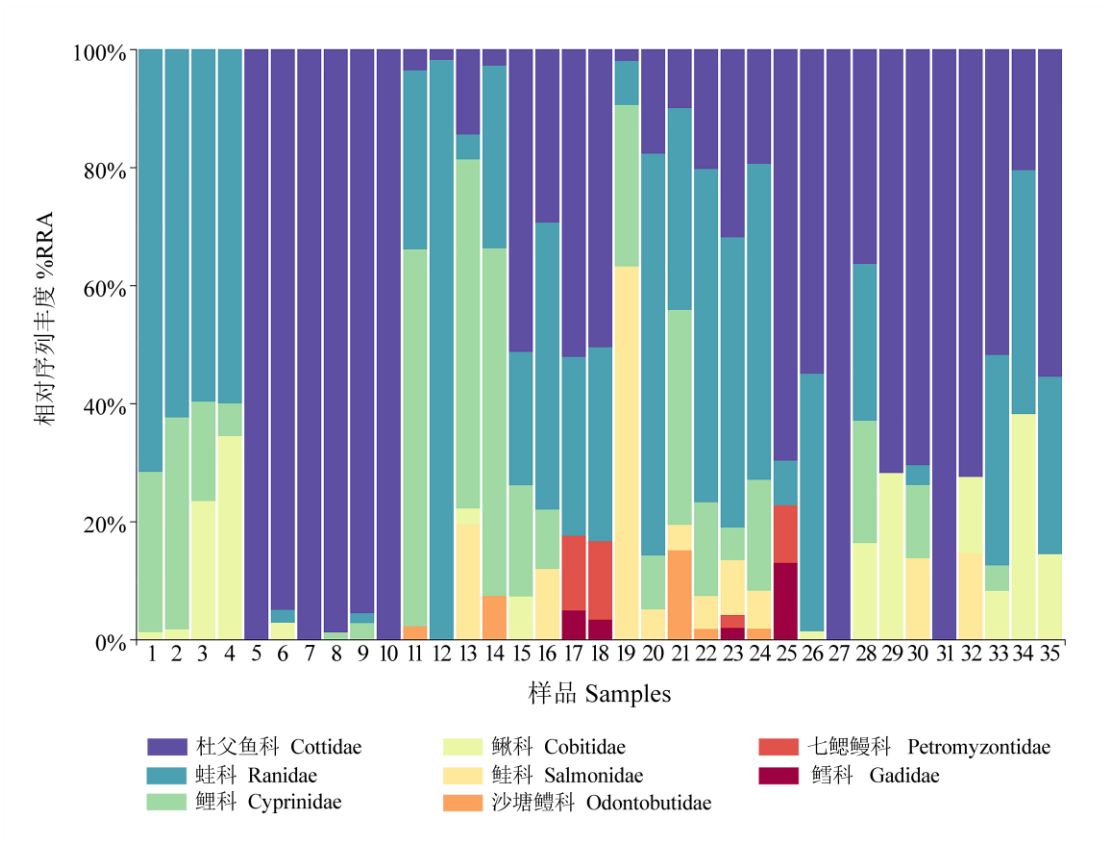
Appendix 2 Results of diet analysis at family level in 12S rRNA region (N = 35) of Eurasian otter fecal samples in the northern Greater Khingan Mountains  
<https://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2022586-2.pdf>

### 附录3 目水平上大兴安岭北部欧亚水獭粪便(N = 12) COI区域物种注释结果

Appendix 3 Results of diet analysis at order level in COI region (N = 12) of Eurasian otter fecal samples in the northern Greater Khingan Mountains  
<https://www.biodiversity-science.net/fileup/PDF/2022586-3.pdf>

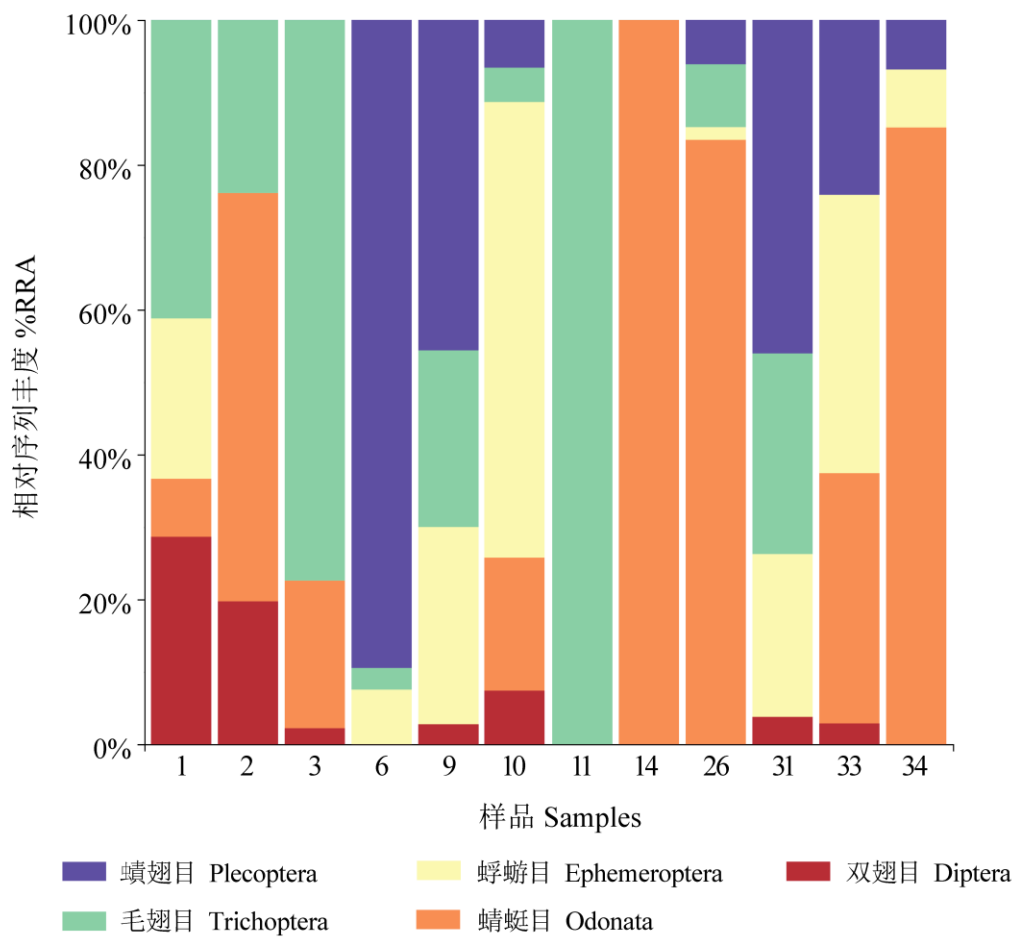
**附录1 经物种鉴定筛选出的有效欧亚水獭粪便样品**  
**Appendix 1 The valid fecal samples of Eurasian otter screened out through DNA identification in the northern Greater Khingan Mountains**

样品编号 Sample code	采样地区 Sampling site	经度 Longitude (°, E)	纬度 Latitude (°, N)	采样时间 Sampling time
1	甘河 Ganhe	122.98	50.94	2020.12
2	甘河 Ganhe	122.98	50.94	2020.12
3	甘河 Ganhe	122.98	50.94	2020.12
4	甘河 Ganhe	122.98	50.94	2020.12
5	呼中 Huzhong	123.84	52.18	2020.11
6	呼中 Huzhong	123.84	52.18	2020.11
7	呼中 Huzhong	123.44	52.09	2020.11
8	呼中 Huzhong	123.44	52.09	2020.11
9	呼中 Huzhong	123.44	52.09	2020.11
10	呼中 Huzhong	123.44	52.09	2020.11
11	克一河 Keyihe	122.61	50.23	2020.12
12	克一河 Keyihe	122.62	50.23	2020.12
13	克一河 Keyihe	122.61	50.23	2020.12
14	克一河 Keyihe	122.61	50.23	2020.12
15	克一河 Keyihe	122.61	50.23	2020.12
16	盘中 Panzhong	124.11	52.92	2021.12
17	盘中 Panzhong	124.11	52.92	2021.12
18	盘中 Panzhong	124.02	52.82	2021.12
19	盘中 Panzhong	123.98	52.81	2021.12
20	盘中 Panzhong	124.01	52.81	2021.12
21	盘中 Panzhong	124.01	52.81	2021.12
22	盘中 Panzhong	124.11	52.91	2021.12
23	盘中 Panzhong	124.11	52.91	2021.12
24	盘中 Panzhong	124.11	52.91	2021.12
25	盘中 Panzhong	124.11	52.91	2021.12
26	盘中 Panzhong	123.98	52.81	2020.11
27	盘中 Panzhong	124.00	52.8	2020.11
28	盘中 Panzhong	124.00	52.8	2020.11
29	盘中 Panzhong	124.03	52.82	2020.11
30	盘中 Panzhong	124.03	52.82	2020.11
31	盘中 Panzhong	124.10	52.89	2020.12
32	盘中 Panzhong	124.10	52.89	2020.12
33	盘中 Panzhong	124.11	52.91	2020.12
34	盘中 Panzhong	124.11	52.91	2020.12
35	盘中 Panzhong	124.11	52.91	2020.12



附录2 科大兴安岭北部欧亚水獭粪便( $N = 35$ ) 12S rRNA区域物种注释结果  
Appendix 2 Results of diet analysis at family level in 12S rRNA region ( $N = 35$ ) of Eurasian otter fecal samples in the northern Greater Khingan Mountains





附录3 目水平上大兴安岭北部欧亚水獭粪便( $N = 12$ ) *COI*区域物种注释结果  
Appendix 3 Results of diet analysis at order level in *COI* region ( $N = 12$ ) of Eurasian otter fecal samples in the northern Greater Khingan Mountains