



• 研究报告 •

# 基于环境DNA宏条形码技术研究黄河三角洲典型潮沟系统鱼类多样性及其对水文连通性的响应

董志远<sup>1,2</sup>, 陈琳琳<sup>1,2</sup>, 张乃鹏<sup>4</sup>, 陈莉<sup>1,3</sup>, 孙德斌<sup>1,2</sup>, 倪艳梅<sup>1,3</sup>, 李宝泉<sup>1,2\*</sup>

1. 中国科学院烟台海岸带研究所海岸带生物学与生物资源保护实验室, 山东烟台 264003; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 烟台大学海洋学院, 山东烟台 264003; 4. 东营市水文中心, 山东东营 257000

**摘要:** 水文连通对于维护滨海湿地生物多样性至关重要, 鱼类多样性作为生物多样性的重要组成部分, 了解其对不同水文连通强度的响应具有重要意义。本研究基于环境DNA宏条形码技术(eDNA metabarcoding)检测黄河三角洲典型潮沟系统鱼类多样性, 分析鱼类物种分布对不同水文连通强度潮沟生境差异的响应特征。利用12S rRNA经典鱼类引物对采集自三级潮沟系统的水样进行高通量测序, 共检测出鱼类55种, 其中本地鱼类27种、非本地鱼类28种, 物种组成以鲈形目为主。各样点序列丰度均较高的鱼类有矛尾刺虾虎鱼(*Acanthogobius hasta*)、鲃(*Planiliza haematocheilus*)、长体刺虾虎鱼(*Acanthogobius elongatus*)等。鱼类多样性在不同水文连通性潮沟间差异明显, 其中, 二级潮沟群落多样性水平、丰富度指数、物种种类及各种鱼类类群中的个体均匀程度等都明显高于其他两级潮沟。RDA分析显示有6种环境因子与鱼类群落结构显著相关( $P < 0.05$ ), 分别为: 硅酸盐( $\text{SiO}_3^{2-}\text{-Si}$ )、硝酸盐( $\text{NO}_3^-\text{-N}$ )、酸碱度(pH值)、盐度(SAL)、铵盐( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ )、溶解氧(DO)。其中, 优势种矛尾刺虾虎鱼的序列丰度与硅酸盐呈正相关, 鲃的序列丰度与盐度呈负相关。本研究通过与传统采样数据进行比较, 证实了环境DNA宏条形码技术用于监测黄河口典型潮沟水体中鱼类多样性的可行性, 表明潮沟系统水文连通性对鱼类群落结构及多样性均具有明显的影响, 研究结果有助于进一步了解滨海湿地水文连通对生物群落的影响机制。

**关键词:** 环境DNA宏条形码; 鱼类多样性; 水文连通; 黄河三角洲; 潮沟系统

董志远, 陈琳琳, 张乃鹏, 陈莉, 孙德斌, 倪艳梅, 李宝泉 (2023) 基于环境DNA宏条形码技术研究黄河三角洲典型潮沟系统鱼类多样性及其对水文连通性的响应. 生物多样性, 31, 23073. doi: 10.17520/biods.2023073.

Dong ZY, Chen LL, Zhang NP, Chen L, Sun DB, Ni YM, Li BQ (2023) Response of fish diversity to hydrological connectivity of typical tidal creek system in the Yellow River Delta based on environmental DNA metabarcoding. Biodiversity Science, 31, 23073. doi: 10.17520/biods.2023073.

## Response of fish diversity to hydrological connectivity of typical tidal creek system in the Yellow River Delta based on environmental DNA metabarcoding

Zhiyuan Dong<sup>1,2</sup>, Linlin Chen<sup>1,2</sup>, Naipeng Zhang<sup>4</sup>, Li Chen<sup>1,3</sup>, Debin Sun<sup>1,2</sup>, Yanmei Ni<sup>1,3</sup>, Baoquan Li<sup>1,2\*</sup>

1 Key Laboratory of Coastal Biology and Bioresource Utilization, Yantai Institute of Coastal Zone Research, Chinese Academy of Sciences, Yantai, Shandong 264003

2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049

3 School of Ocean, Yantai University, Yantai, Shandong 264003

4 Dongying Municipal Hydrology Center, Dongying, Shandong 257000

### ABSTRACT

**Aims:** Hydrological connectivity is essential for maintaining biodiversity in coastal wetlands, and it is important to understand the response of fish diversity, as a major component of biodiversity, to different hydrological connectivity intensities. This study aimed to investigate the response of fish diversity to hydrological connectivity in the typical tidal creek system and verify the applicability of eDNA metabarcoding for monitoring and conserving fish diversity in the Yellow River Delta.

**Methods:** Water samples were collected from six sites in a typical tidal creek system in the Yellow River Delta in

收稿日期: 2023-03-09; 接受日期: 2023-04-18

基金项目: 国家自然科学基金(42176160; 42276142)、山东省自然科学基金(ZR2021MD084)和中国科学院A类战略性先导科技专项(XDA23050202)

\* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: bqli@yic.ac.cn

September 2022. Fish diversity was analyzed by using eDNA metabarcoding, in which, eDNA extracted from the water samples source were amplified by PCR using the 12S rRNA classical fish primers MiFish-E and high-throughput sequencing was performed by Illumina Miseq. The OTU representative sequences were aligned to the NCBI nucleotide sequence database to obtain species taxonomic annotation information. Thirteen environmental physicochemical indicators were measured in the water column. The relationship between fish communities and environmental factors was explored based on redundancy analysis.

**Results:** A total of 55 fish species were detected, including 27 native and 28 non-native fish species, and Perciformes dominated the fish composition. The fishes with high sequence abundance at each sample site included *Acanthogobius hasta*, *Planiliza haematocheilu*, *Acanthogobius elongatus*, etc. Fish diversity of the tidal creeks with different hydrological connectivity was different. Significantly higher community diversity and richness index, the highest number of species and a more even distribution of the number of individual species were found in the secondary tidal creek than in the other two tidal creeks.  $\text{SiO}_3^{2-}$ -Si,  $\text{NO}_3^-$ -N, pH, salinity,  $\text{NH}_4^+$ -N, and dissolved oxygen were significantly correlated ( $P < 0.05$ ) with fish community structure shown by RDA analysis. *Acanthogobius hasta* with higher sequence abundance was positively correlated with silicate, and the sequence abundance of *Planiliza haematocheilus* was negatively correlated with salinity.

**Conclusion:** This study confirmed the feasibility of using environmental DNA metabarcoding to monitor fish diversity of typical tidal water bodies in the Yellow River estuary by comparing it with previous traditional sampling data and indicated that hydrological connectivity of tidal creek systems has a significant impact on fish community structure and diversity. The results of this study are helpful to further understand the influence mechanism of coastal wetland hydrological connectivity on biological communities.

**Key words:** environmental DNA metabarcoding; fish diversity; hydrological connectivity; the Yellow River Delta; tidal creek system

滨海湿地位于淡水与海水交汇的过渡地带, 具有维持生物多样性等多种生态服务功能(李伟等, 2014)。水文连通作为湿地生态过程的主要驱动因素之一, 是指在水文循环要素内部或要素之间以水为媒介的物质、能量和生物的传输(Freeman et al, 2007)。水文连通在塑造地形结构, 物质运输, 调控植被组成和有机质积累的时空格局中发挥重要作用(Yuan et al, 2015), 通过直接作用于无机环境中的物质循环和能量流动进而影响初级生产力, 然后基于生物级联效应对食物链中其他营养级造成影响, 改变鱼类及其他生物类群的食源结构(Jardine et al, 2012; 崔保山等, 2016)。水文连通还能影响鱼类迁移及其生殖细胞在水中的传输进而影响其分布特征与多样性(Schofield et al, 2018)。黄河三角洲位于暖温带海陆交接地带, 是该地区保存最为完整、面积最为广阔的新生湿地生态系统。近年来, 三角洲湿地生态系统结构与功能均衡状态被打破, 面临退化危机(孙志高等, 2011)。气候变化以及人类活动的影响使滨海湿地水文连通格局发生了改变, 一定程度上影响了潮沟发育和湿地地下水系的流动, 导致水文连通性受阻且变差(赵心怡等, 2019)。目前, 许多学者围绕黄河三角洲水文连通的生态效应展开相关研究, 但大多都基于传统的多样性调查方法。

传统的鱼类多样性调查采样强度大、易受物理条件限制, 还要求调查人员拥有专业的分类鉴定知识, 所以往往会低估甚至误判研究区域内的生物多样性。因此, 亟需一种精准可靠、灵敏高效、快速且成本低的多性调查手段结合传统形态学鉴定, 以实现鱼类群落波动变化的准确监测, 从而为湿地生态系统的保护与管理提供更全面的支持。环境DNA宏条形码技术(eDNA metabarcoding)就是在这样的背景下发展起来的新型检测手段。环境DNA宏条形码技术是指对环境样本中组成复杂、来源广泛的游离DNA进行高通量测序, 然后比对参考数据库对测序序列进行注释分类, 是进行多物种检测、评估物种丰富度的有效方法(Creer et al, 2016)。近年来, 该技术已被广泛应用于河流(Sales et al, 2021; 沈梅等, 2022)、湖泊(Sard et al, 2019)、河口(Kume et al, 2021)及海洋(Murakami et al, 2019)等各类水生生态系统鱼类多样性监测中。鱼类常用的遗传标记有12S rRNA基因(Miya et al, 2015; Valentini et al, 2016)、16S rRNA基因(Evans et al, 2016; Shaw et al, 2016)、COI基因(Balasingham et al, 2018)、Cytb基因(Miya & Nishida, 2000; Thomsen et al, 2012b)等。目前, 基于环境DNA技术对黄河三角洲地区开展鱼类多样性监测以及探讨环境因子对其影响机制尚未

见报道。

本研究选择黄河三角洲具有明显水文连通梯度的典型潮沟系统,采用环境DNA宏条形码技术进行河口湿地鱼类多样性研究,旨在明确河口典型潮沟系统鱼类多样性,同时分析不同水文连通梯度潮沟生态环境特征及其与环境DNA表征的鱼类多样性之间的关系,明确鱼类eDNA多样性对潮沟水文连通特征的响应,为黄河口湿地鱼类生物多样性监测以及水生生态保护提供新的技术方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究区域概况与采样站位设置

研究区域位于山东黄河三角洲国家级自然保护区,该区域地处黄河入海口,面朝渤海,南邻莱州湾,是中国暖温带保存最完整、最广阔、最年轻的湿地生态系统,属季风气候区,区域内滩涂湿地遍布,潮沟水系发达。在保护区北部区域选择一条完整的、具有明显水文连通梯度的潮沟设置采样站位,地理坐标为37°28′–37°29′ N, 119°03′–119°03′ E。根据潮沟的主次支流进行分级,与海直接相连且断面面积最大的为一级潮沟,其支流为二级潮沟,次支流

末端不再分支且流量最小的为三级潮沟(李冬雪等, 2020),分别在每级潮沟的上下游设置样点,共布设6个样点(图1)。使用TCM-4浅水倾斜流速仪海流计测量各级别潮沟流速,一级潮沟至三级潮沟流速分别为21.32 cm/s、14.70 cm/s、3.75 cm/s,潮沟流速与断面面积直接相关,结合现场勘察也发现一级潮沟至三级潮沟宽度、水深依次递减。

### 1.2 水样采集与环境因子测定

于2022年9月27日进行水样采集,各样点采集潮沟内表层水样1 L,沿岸每隔5 m用1 L瓶盛取1/3,最后装满。采集后暂时保存于–20℃车载冰箱中,24 h内带回实验室,用三联真空抽滤装置内装0.45 μm滤膜抽滤水样。抽滤每份样品前使用75%医用酒精清洁滤瓶并用蒸馏水润洗以防止交叉污染,以过滤等量蒸馏水作为阴性对照,所得滤膜在提取环境DNA前于–80℃保存。

采用YSI (Professional Plus (6050000)/ProComm (605604), 美国)现场同步记录水体温度(T)、盐度(SAL)、溶解氧(DO)、酸碱度(pH值)等水质参数。另取部分水样带回实验室经0.45 μm滤膜过滤后使用连续流动分析仪(SEAL, 德国)测定水体磷酸盐

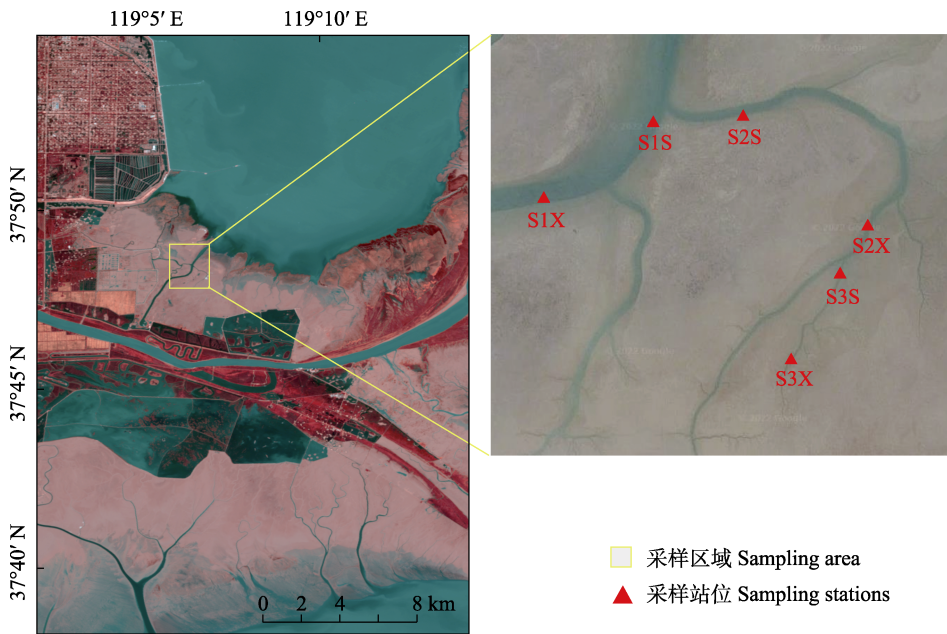


图1 黄河口自然湿地采样区域。S1S: 一级潮沟上游; S1X: 一级潮沟下游; S2S: 二级潮沟上游; S2X: 二级潮沟下游; S3S: 三级潮沟上游; S3X: 三级潮沟下游。

Fig. 1 Sampling area of natural wetland in the Yellow River Delta. S1S, Upstream of the first-class tidal creek; S1X, Downstream of the first-class tidal creek; S2S, Upstream of the second-class tidal creek; S2X, Downstream of the second-class tidal creek; S3S, Upstream of the third-class tidal creek; S3X, Downstream of the third-class tidal creek.



( $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ )、硝酸盐( $\text{NO}_3^-\text{-N}$ )、亚硝酸盐( $\text{NO}_2^-\text{-N}$ )、铵盐( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ )、硅酸盐( $\text{SiO}_3^{2-}\text{-Si}$ )含量以及总氮(TN)、总磷(TP)含量,测定按照《海洋调查规范》(GB/T12763.4-2007)进行。

### 1.3 环境DNA提取、PCR扩增与高通量测序

使用Fast DNA<sup>TM</sup> SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, 美国)提取滤膜DNA。使用Nanodrop One (Thermo Scientific, 美国)测定DNA溶液浓度及纯度(A260/A280: 1.6–2.0; 浓度  $\geq 10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ), 并进行1%浓度的琼脂糖凝胶电泳检测。

选择鱼类线粒体12S rRNA基因通用引物(Miya et al, 2015): MiFish-E-F: 5'-GTTGGTAAATCTCGT GCCAGC-3'和MiFish-E-R: 5'-CATAGTGGGGTATC TAATCCTAGTTTG-3', 对环境DNA样品进行PCR扩增。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成, 基于引物Tm值设置温度梯度PCR确定合适的退火温度。20  $\mu\text{L}$  PCR反应体系: 5  $\times$  FastPfu Buffer 4  $\mu\text{L}$ 、2.5 mM dNTPs 2  $\mu\text{L}$ 、正反引物(5  $\mu\text{M}$ )各0.8  $\mu\text{L}$ 、FastPfu Polymerase 0.4  $\mu\text{L}$ 、模板DNA 10 ng、补ddH<sub>2</sub>O至20  $\mu\text{L}$ 。PCR反应参数: 95 $^\circ\text{C}$ 预变性5 min; 95 $^\circ\text{C}$ 变性30 s, 55 $^\circ\text{C}$ 退火30 s, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸45 s, 进行27个循环; 最终于72 $^\circ\text{C}$ 下延伸10 min。所用PCR仪为ABI GeneAmp<sup>®</sup> 9700型。每个样品3个技术重复, 同一样品的PCR产物混合后用2%琼脂糖凝胶电泳检测, 使用AxyPrepDNA凝胶回收试剂盒(AXYGEN, 美国)切胶回收PCR产物, 送至上海凌恩生物科技有限公司于Illumina NovaSeq 6000测序平台(Illumina, 美国)进行高通量测序。

### 1.4 数据处理及分析

使用软件SPSS 26对各级别潮沟环境理化指标进行显著性检验, 若数据满足正态分布且符合方差齐性, 显著性水平以单因素方差分析(analysis of variance, ANOVA)检验为最终结果, 多重比较选择Bonferroni检验; 若数据满足正态分布但方差不齐, 以Welch检验为显著性水平最终结果, 多重比较选择Tamhane T2检验; 若数据不满足正态分布, 使用独立样本的非参数检验, 然后通过Bonferroni校正法调整显著性值。

根据barcode序列和PCR扩增引物序列从下机数据中拆分出各样本数据, 截去barcode和引物序列后基于序列间的overlap关系, 对成对reads进行序列

拼接, 再经质控、去除嵌合体后得到有效序列。对有效序列提取非重复序列, 去除单序列, 然后按照97%相似性对非重复序列进行OTU聚类, 同时筛选OTUs中出现频数最高的序列作为OTUs的代表序列, 将所有优化序列map至OTU代表序列, 生成OTU表格。使用R包的dplyr函数基于样本丰度矩阵, 将各样本中reads小于100的OTUs剔除; 将所得OTUs的fasta序列文件导入NCBI进行blastn比对(与nt库进行比对), 保留identity > 90%、query coverage > 85%的OTUs (Zhan et al, 2013), 再基于identity、query coverage以及e-value 3项指标筛选出每个OTU比对结果中最相似的结果对其进行注释。利用世界海洋物种登记库(WoRMS) (<https://www.marinespecies.org/index.php>)对注释结果的拉丁学名及分类信息进行校对。非目标物种剔除的标准参考Ji等(2022)。使用R中的vegan包对OTU绝对丰度矩阵抽平并计算Chao 1指数、Shannon指数、Simpson指数(Gini-Simpson指数, 非经典Simpson指数, 与群落多样性正线性相关)、ACE指数(Abundance-based Coverage Estimator, ACE)、goods-coverage测序深度指数等 $\alpha$ 多样性指数。使用Origin 2019b绘制各样点物种丰度组成图与热图。借助软件Canoco 5进行冗余分析(redundancy analysis, RDA)并绘图, 揭示物种群落结构与环境因子之间的关系。基于Excel软件对各类数据进行整理计算汇总。

## 2 结果

### 2.1 各级别潮沟生态环境特征的空间差异

测定的13种环境因子指标如表1所示。通过两两比较发现, 在不同级别的潮沟组合之间, 各环境因子均至少在一组级别间存在显著差异( $P < 0.05$ )。除总磷外, 其余各环境指标在一级潮沟与三级潮沟之间均存在显著差异( $P < 0.05$ ), 氧化还原电位、磷酸盐、电导率、盐度以及pH值存在极显著差异( $P < 0.01$ )。一级潮沟的硝酸盐、磷酸盐、pH值和溶解氧的含量显著高于三级潮沟, 但三级潮沟的总氮、亚硝酸盐、硅酸盐、电导率、盐度均显著高于一级潮沟; 另外, 二级潮沟的总磷浓度显著低于其余两级潮沟。部分环境因子由一级潮沟至三级潮沟呈现出递增或递减的趋势。例如, 从一级潮沟到三级潮沟, 总氮、亚硝酸盐、硅酸盐、电导率以及盐度含量逐级升高, 表现为 $S1 < S2 < S3$  ( $P > 0.05$ ); 磷酸盐、铵

表1 黄河口潮沟环境理化指标。同行不同小写字母表示差异显著( $P < 0.05$ )。加粗表示最大值。

Table 1 Physical and chemical indicators of in the tidal creek of the Yellow River Estuary. Different lowercase letters in the same row meant significant difference at 0.05 level. Bolded numbers indicate maximum values. TN, Total nitrogen; TP: Total phosphorus; T: Temperature; DO: Dissolved oxygen; SPC: Conductivity; SAL: Salinity; Eh: Oxidation-reduction potential.

变量 Variable	潮沟级别 Tidal creek level		
	一级潮沟 The first-class tidal creek (S1)	二级潮沟 The second-class tidal creek (S2)	三级潮沟 The third-class tidal creek (S3)
总氮 TN ( $\mu\text{g/L}$ )	351.893 $\pm$ 4.857 <sup>b</sup>	361.896 $\pm$ 11.934 <sup>ab</sup>	<b>389.191 <math>\pm</math> 19.168<sup>a</sup></b>
总磷 TP ( $\mu\text{g/L}$ )	<b>15.116 <math>\pm</math> 1.175<sup>a</sup></b>	12.586 $\pm$ 0.580 <sup>b</sup>	14.975 $\pm$ 0.715 <sup>a</sup>
磷酸盐 $\text{PO}_4^{3-}\text{-P}$ ( $\text{mg/L}$ )	<b>0.033 <math>\pm</math> 0.029<sup>a</sup></b>	0.008 $\pm$ 0.002 <sup>ab</sup>	0.004 $\pm$ 0.001 <sup>b</sup>
铵盐 $\text{NH}_4^+\text{-N}$ ( $\text{mg/L}$ )	0.039 $\pm$ 0.012 <sup>a</sup>	0.036 $\pm$ 0.004 <sup>a</sup>	<b>0.170 <math>\pm</math> 0.121<sup>b</sup></b>
亚硝酸盐 $\text{NO}_2^-\text{-N}$ ( $\text{mg/L}$ )	0.019 $\pm$ 0.003 <sup>b</sup>	0.024 $\pm$ 0.004 <sup>ab</sup>	<b>0.027 <math>\pm</math> 0.004<sup>a</sup></b>
硅酸盐 $\text{SiO}_3^{2-}\text{-Si}$ ( $\text{mg/L}$ )	0.675 $\pm$ 0.052 <sup>b</sup>	0.690 $\pm$ 0.107 <sup>ab</sup>	<b>0.964 <math>\pm</math> 0.222<sup>a</sup></b>
硝酸盐 $\text{NO}_3^-\text{-N}$ ( $\text{mg/L}$ )	<b>0.265 <math>\pm</math> 0.041<sup>a</sup></b>	0.238 $\pm$ 0.018 <sup>a</sup>	0.193 $\pm$ 0.017 <sup>b</sup>
温度 T ( $^{\circ}\text{C}$ )	21.800 $\pm$ 1.595 <sup>b</sup>	21.450 $\pm$ 0.321 <sup>b</sup>	<b>26.233 <math>\pm</math> 2.850<sup>a</sup></b>
溶解氧 DO ( $\text{mg/L}$ )	<b>7.998 <math>\pm</math> 0.804<sup>a</sup></b>	6.692 $\pm$ 0.315 <sup>b</sup>	6.067 $\pm$ 1.143 <sup>b</sup>
电导率 SPC ( $\text{ms/cm}$ )	26.412 $\pm$ 0.245 <sup>b</sup>	32.538 $\pm$ 1.752 <sup>ab</sup>	<b>36.300 <math>\pm</math> 1.715<sup>a</sup></b>
盐度 SAL	16.185 $\pm$ 0.170 <sup>b</sup>	20.362 $\pm$ 1.202 <sup>ab</sup>	<b>22.903 <math>\pm</math> 1.121<sup>a</sup></b>
酸碱度 pH	<b>8.408 <math>\pm</math> 0.012<sup>a</sup></b>	8.385 $\pm$ 0.021 <sup>ab</sup>	8.248 $\pm$ 0.026 <sup>b</sup>
氧化还原电位 Eh	<b>-71.950 <math>\pm</math> 1.104<sup>a</sup></b>	-70.583 $\pm$ 1.087 <sup>a</sup>	-64.033 $\pm$ 1.219 <sup>b</sup>

表2 各样品优化序列统计

Table 2 Statistics of trimmed sequences in each sample

样品名称 Sample name	序列条数 Sequences	碱基数 Bases (bp)	平均读长 Average length (bp)
S1S	500,311	85,254,665	170.40
S1X	500,256	84,418,677	168.75
S2S	471,672	80,731,476	171.16
S2X	479,424	81,634,922	170.28
S3S	556,415	93,868,748	168.70
S3X	614,037	103,314,806	168.26

盐、硝酸盐、溶解氧、pH值以及氧化还原电位逐级降低, 表现为 $S1 > S2 > S3$  ( $P > 0.05$ )。

## 2.2 高通量测序基础信息

2022年9月黄河口潮沟水样环境DNA高通量测序结果见表2。共送测18个样品, 2%琼脂糖凝胶电泳检测纯化后PCR产物, 样品目的条带弱, 为更好满足后续建库上机要求, 将同站位3个平行样合为1个, 实际测序6个样品。测序原始下机产生的双端序列, 经质控过滤、拼接并去除嵌合体后, 最终得到可用于后续分析的有效序列, 共3,122,115条, 碱基数为529,223,294, 序列均长169.51 bp, 读长位于151–200 bp之间的序列占比为99.54%。6个样品聚类得到3,314个OTUs。

## 2.3 物种组成与空间分布

根据样品序列丰度, 将不符合要求的OTUs除

去, 再筛除掉与NCBI核酸数据库比对结果中未满足条件的OTUs, 最终保留了489个OTUs, 能注释到3个门、6个纲、25个目、37个科、61个属、68个种。其中鱼类有55种, 隶属于2纲12目27科48属, 检测到的鱼类中有27种属于黄河口、莱州湾水域本地物种, 隶属于2纲9目16科25属(表3)。本地鱼类在目水平上物种数排名前三的分别为鲈形目13种、鲱形目5种、鲻形目与鲉形目各2种; 在科水平上物种数排名前三的分别为虾虎鱼科8种、鳀科3种、鲱科与鲻科各2种; 序列丰度排名前三的物种分别为矛尾刺虾虎鱼(*Acanthogobius hasta*)、鲃(*Planiliza haematocheilus*)以及长体刺虾虎鱼(*Acanthogobius elongatus*) (图2)。不同级别潮沟在物种组成与序列丰度上呈现出一定程度的空间分布差异(图3), 其中矛尾刺虾虎鱼在各样点均被检测到, 且在一级潮沟下游有着最高的序列丰度; 长体刺虾虎鱼序列丰度在三级潮沟最高; 非本地鱼类物种序列仅在主潮沟及其邻近样点有分布。

## 2.4 各级别潮沟鱼类生物多样性空间差异

基于55种鱼类序列相对丰度矩阵计算得到各样点鱼类群落 $\alpha$ 多样性指数(表4)。各样品文库覆盖率(Good's coverage)较高, 均位于99%以上, 表明样品序列检出率高, 测序结果真实可靠。Chao 1指数和ACE指数总体上表现为 $S2 > S1 > S3$  ( $P > 0.05$ )。

**表3** 基于环境DNA宏条形码在黄河口潮沟中检测到的鱼类物种。“本地鱼类”一词指代的是那些在黄河口、莱州湾海域历史渔业资源调查中实际捕获到或者曾经捕获到的海洋鱼类。

Table 3 List of fish species detected by eDNA metabarcoding in the tidal creek of the Yellow River Estuary. The term “Native fish species” refers to those marine fish that are actually caught or recorded as having been caught during the historical fishery resources survey in the Yellow River Estuary and Laizhou Bay.

	目 Order	科 Family	种 Species	
本地鱼类物种	鲈形目 Pleuronectiformes	舌鳎科 Cynoglossidae	短吻红舌鳎 <i>Cynoglossus joyneri</i>	
Native fish species	鲱形目 Clupeiformes	鲱科 Dorosomatidae	青鳞小沙丁鱼 <i>Sardinella zunasi</i>	
			斑鲚 <i>Konosirus punctatus</i>	
		鳀科 Engraulidae	赤鼻棱鳀 <i>Thryssa kammalensis</i>	
			鳀 <i>Engraulis japonicus</i>	
			凤鲚 <i>Coilia mystus</i>	
		颌针鱼目 Beloniforme	鲻科 Hemiramphidae	间下鲻 <i>Hyporhamphus intermedius</i>
		胡瓜鱼目 Osmeriformes	胡瓜鱼科 Osmeridae	西太公鱼 <i>Hypomesus nipponensis</i>
		鲈形目 Perciformes	花鲈科 Lateolabracidae	花鲈 <i>Lateolabrax japonicus</i>
			蓝子鱼科 Siganidae	褐蓝子鱼 <i>Siganus fuscescens</i>
			鲹科 Carangidae	吉打副叶鲹 <i>Alepes djedaba</i>
	石首鱼科 Sciaenidae		小黄鱼 <i>Larimichthys polyactis</i>	
	鳊科 Sillaginidae		少鳞鳊 <i>Sillago japonica</i>	
	虾虎鱼科 Gobiidae		矛尾刺虾虎鱼 <i>Acanthogobius hasta</i>	
			长体刺虾虎鱼 <i>Acanthogobius elongatus</i>	
			矛尾虾虎鱼 <i>Chaeturichthys stigmatias</i>	
			七棘裸身虾虎鱼 <i>Gymnogobius heptacanthus</i>	
			普氏细棘虾虎鱼 <i>Acentrogobius pflaumii</i>	
		六丝钝尾虾虎鱼 <i>Amblychaeturichthys hexanema</i>		
	棕刺虾虎鱼 <i>Acanthogobius luridus</i>			
	拉氏狼牙虾虎鱼 <i>Odontamblyopus lacepedii</i>			
	鳗鲡目 Anguilliformes	康吉鳗科 Congridae	星康吉鳗 <i>Conger myriaster</i>	
	鳐形目 Rajiformes	鳐科 Rajidae	斑鳐 <i>Okamejei kenojei</i>	
	鲉形目 Scorpaeniformes	六线鱼科 Hexagrammidae	大泷六线鱼 <i>Hexagrammos otakii</i>	
		鲷科 Platycephalidae	鲷 <i>Platycephalus indicus</i>	
	鲷形目 Mugiliformes	鲷科 Mugilidae	鲢 <i>Planiliza haematocheilus</i>	
			鳊 <i>Mugil cephalus</i>	
非本地鱼类物种	鲱形目 Clupeiformes	鲱科 Clupeidae	隆背小沙丁鱼 <i>Sardinella gibbosa</i>	
Non-native fish species			花点鲷 <i>Hilsa kelee</i>	
	鲱形目 Cyprinodontiformes	青鳉科 Oryziatidae	青鳉 <i>Oryzias latipes</i>	
	鲤形目 Cypriniformes	鲤科 Cyprinidae	鲫 <i>Carassius auratus</i>	
			似鳊 <i>Pseudobrama simoni</i>	
			尖棘鳊 <i>Zacco acutipinnis</i>	
			鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	
			温州光唇鱼 <i>Acrossocheilus wenchowensis</i>	
			三角鲂 <i>Megalobrama terminalis</i>	
			长鳍马口鱼 <i>Opsariichthys evolans</i>	
			刺鲃 <i>Spinibarbus caldwelli</i>	
			贝氏鲮 <i>Hemiculter bleekeri</i>	
			爬鳅科 Balitoridae	梅花山拟腹吸鳅 <i>Pseudogastromyzon meihuashanensis</i>
				原缨口鳅 <i>Vanmanenia stenosoma</i>

表3 (续) Table 3 (continued)

目 Order	科 Family	种 Species
鲈形目 Perciformes	金线鱼科 Nemipteridae	日本金线鱼 <i>Nemipterus thosaporni</i>
	丽鱼科 Cichlidae	齐氏非鲫 <i>Coptodon zillii</i>
		非鲫 <i>Oreochromis mossambicus</i>
		加利略帚齿非鲫 <i>Sarotherodon galilaeus</i>
		尼罗非鲫 <i>Oreochromis niloticus</i>
	雀鲷科 Pomacentridae	白带金翅雀鲷 <i>Chrysiptera brownriggii</i>
	塘鳢科 Eleotridae	刺盖塘鳢 <i>Eleotris acanthopomus</i>
	虾虎鱼科 Gobiidae	波氏吻虾虎鱼 <i>Rhinogobius cliffordpopei</i>
		雀斑吻虾虎鱼 <i>Rhinogobius lentiginis</i>
		名古屋吻虾虎鱼 <i>Rhinogobius nagoyae</i>
		武义吻虾虎鱼 <i>Rhinogobius wuyiensis</i>
		黄颡鱼 <i>Tachysurus fulvidraco</i>
鲇形目 Siluriformes	鲿科 Bagridae	怀头鲇 <i>Silurus soldatovi</i>
	鲇科 Siluridae	豹纹脂身鲇 <i>Pterygoplichthys pardalis</i>
	甲鲇科 Loricariidae	

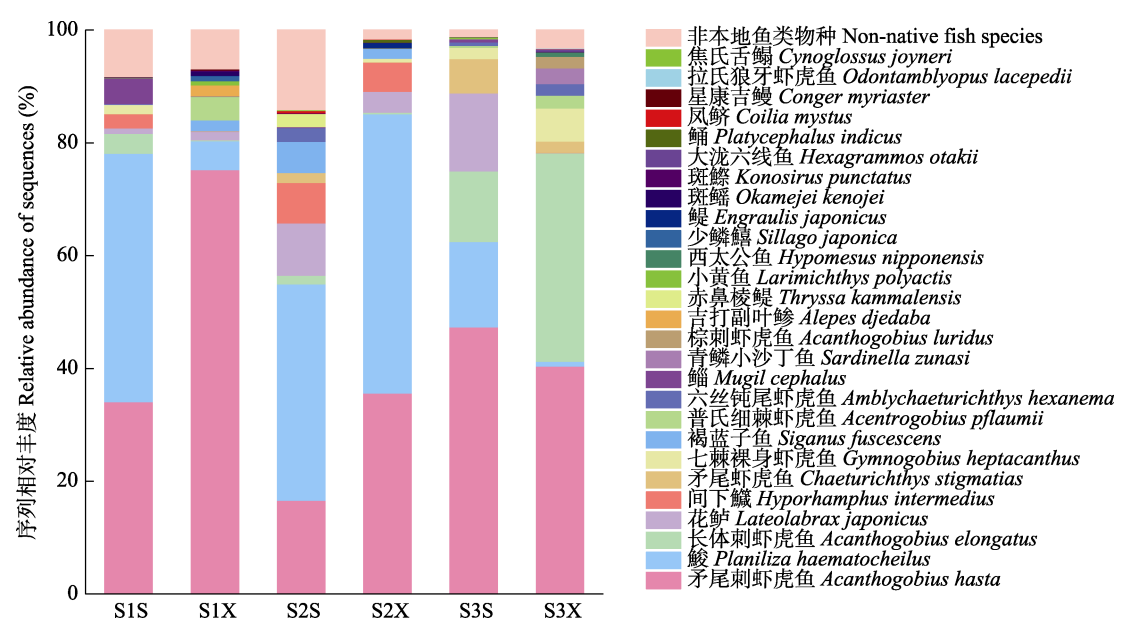


图2 各采样站位鱼类的序列相对丰度。采样站位缩写全称见图1。  
Fig. 2 The relative abundance of fish sequences at each sampling station. The full names of the sampling stations' abbreviations are shown in Fig. 1.

Shannon指数呈现出“两头低，中间高”的分布趋势，即二级潮沟的Shannon指数较一级和三级潮沟高；Simpson指数与Shannon指数变化趋势一致，即二级潮沟的多样性指数最高。

2.5 鱼类群落组成与水环境因子的关系

基于序列丰度排名前15位的本地鱼类物种丰度矩阵进行去趋势对应分析(detrended correspondence

analysis, DCA)，根据排序轴梯度长度 (gradient length < 3)，选择RDA分析。对环境数据(pH除外)进行lg(x + 1)转换。通过蒙特卡洛检验分析环境数据显著性，根据Forward Selection结果筛选出显著相关的环境因子进行后续排序分析。蒙特卡洛检验结果表明，第一轴和所有轴均具有显著性(P < 0.05)，即RDA排序结果可信。



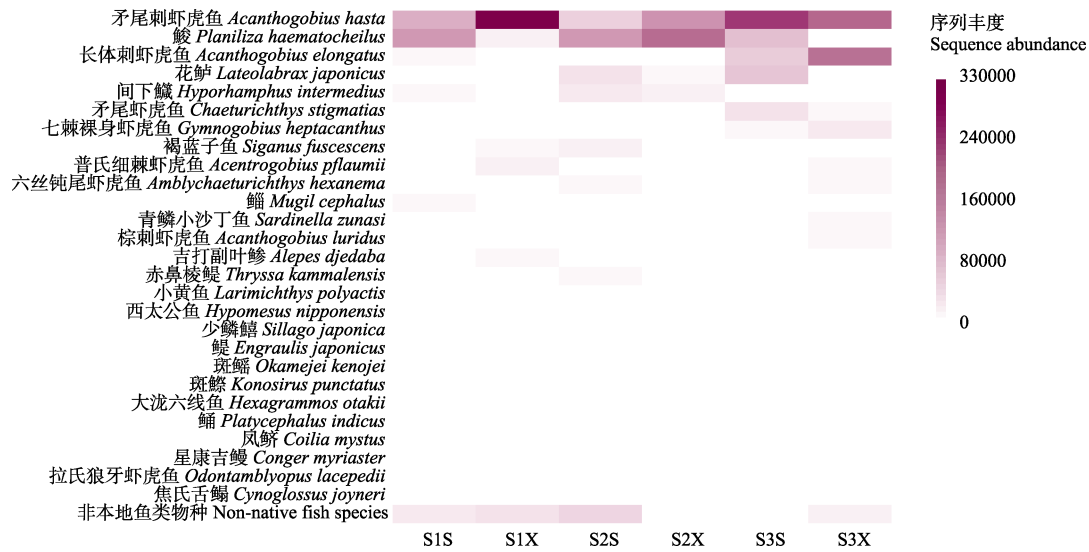


图3 各采样站位基于序列丰度的鱼类空间分布热图。采样站位缩写全称见图1。  
Fig. 3 Heatmap of the spatial distribution of fish species at each sampling station based on the abundance of sequences. The full names of the sampling stations' abbreviations are shown in Fig. 1.

表4 基于序列相对丰度计算得到的鱼类群落α多样性指数  
Table 4 Alpha diversity index of fish community based on the relative abundance of sequences

采样站点 Sampling station	观察物种数 Observed species	ACE指数 ACE index	Chao 1 指数 Chao 1 index	Shannon 指数 Shannon index	Simpson 指数 Simpson index	测序深度指数 Good's coverage
S1S	325	328.28	328.11	3.95	0.84	0.999977
S1X	327	329.57	328.62	3.14	0.62	0.999980
S2S	324	335.00	350.25	4.44	0.87	0.999958
S2X	316	325.00	323.50	3.25	0.73	0.999958
S3S	325	337.51	335.69	3.60	0.78	0.999946
S3X	288	302.85	302.88	3.64	0.81	0.999935

鱼类物种丰度矩阵与水环境因子的RDA分析结果如表5所示。第一轴和第二轴包含的物种与环境相关系数分别为0.969、0.992，共解释了物种-环境关系总方差的91.7%。与鱼类群落结构显著相关( $P < 0.05$ )的6种环境因子的解释率(conditional effects)分别为: 硅酸盐( $\text{SiO}_3^{2-}$ -Si) 34.7%、硝酸盐( $\text{NO}_3^-$ -N) 21.3%、pH值15.0%、盐度(SAL) 13.8%、铵盐( $\text{NH}_4^+$ -N) 6.2%、溶解氧(DO) 4.1%。RDA排序可以有效反映鱼类群落分布与环境因子之间的关系。

鱼类群落结构与环境因子之间关系的冗余分析(图4)显示, 虾虎鱼科7种虾虎鱼的序列丰度分布均与硅酸盐呈正相关, 与pH、DO呈负相关, 除矛尾刺虾虎鱼以外, 其余虾虎鱼的序列丰度分布与盐度

表5 黄河口潮沟鱼类物种序列丰度冗余分析(RDA)  
Table 5 Redundancy analysis (RDA) of dominant fish species in the tidal creek waters of Yellow River Estuary

	排序轴 Axes			
	1	2	3	4
特征值 Eigenvalues	0.62	0.251	0.046	0.028
相关系数 Species-environment correlations	0.969	0.992	0.986	0.947
物种数据累积百分比方差 Cumulative percentage variance of species data (%)	62	87.2	91.8	94.7
物种-环境关系累积百分比方差 Cumulative percentage variance of species-environment relation (%)	65.3	91.7	96.6	99.6
总特征值 Sum of all eigenvalues	1			
总典范特征值 Sum of all canonical eigenvalues	0.951			





样点容易在其表层水样中检测到淡水鱼类序列。本研究中, 吻虾虎鱼属以及鲤科各属淡水鱼类物种在一级潮沟尤其是其下游接近内陆河道的样点丰度明显高于其他样点。其次, 养殖池塘以及水产市场排污入河有可能将养殖鱼类的DNA引入采样区域, 从而造成假阳性。有报道称研究区域附近存在罗非鱼(非鲫)、黄颡鱼(*Tachysurus fulvidraco*)等人工养殖(孙金凤和刘清志, 2010; 蒋万钊和隋凯港, 2015), 推测本研究中检测到的黄颡鱼以及多种非鲫属鱼类序列与此有关。最后, 捕食者粪便中含有的鱼类DNA在进入水体后也有可能被检测到。研究区域所在的保护区内拥有数量众多的鸟类, 是环西太平洋鸟类迁徙重要的“中转站”、越冬栖息地和繁殖地(陈为峰等, 2003), 鸟类作为鱼类的主要捕食者, 可能在鱼类种群及其DNA扩散过程中扮演着重要角色。因此, 环境DNA技术发现的这28种非黄河口、莱州湾海域鱼类物种, 可能包括一些随机出现在该区域或者种群数量极少的物种, 利用传统的调查方法可能难于发现其踪迹, 而环境DNA技术可以更加灵敏地检测到丰度低、生物量少的稀有物种(Deiner et al, 2017)。

### 3.2 环境DNA宏条形码技术检测黄河口湿地潮间带鱼类多样性的可行性与影响因素

河口湿地是海陆交替的过渡区域, 具有复杂多样的生境条件, 为河口及近海渔业生物提供了丰富的食物和良好的栖息地(Garwood et al, 2019), 支撑着近海渔业资源的可持续产出。所以, 及时了解河口湿地特别是潮沟系统的鱼类多样性对河口湿地生物多样性保护及邻近水域渔业资源的可持续发展至关重要(马巧珍等, 2023)。本研究通过环境DNA技术在黄河口滨海湿地潮沟中共检测到鱼类55种, 其中黄河口本地鱼类27种, 占比为49.1%, 基本包括了黄河口湿地常见的鱼类物种。国内其他河口湿地也开展了相似的研究并取得了较好的效果。王汝贤等(2023)通过环境DNA技术在长江口检测到鱼类55种, 其中长江口鱼类占比为81.8%; 蒋佩文等(2022)在珠江河口检测到鱼类175种, 其中珠江口鱼类占比65.7%; 李红婷等(2022)在珠江河口伶仃洋海域共检测到鱼类35种; Zou等(2020)在珠江口南沙滨海湿地共检测到鱼类57种。虽然鱼类物种数量和组成在各个研究区域间存在差异, 但环境DNA技术

在各个河口湿地鱼类多样性研究中的初步应用表明, 相较传统调查方法的采样难度大、成本高、对研究人员专业素养要求高等, 该技术已展现出一定的优势。

目前, 环境DNA宏条形码技术在河口及近海区域的应用尚处于起步阶段, 而且相比成熟的传统调查手段, 其物种检测效率受到多种因素的影响, 如研究区域的环境特征、采样方法、参考数据库的完善程度、所选引物的物种区分能力等。首先, 较高的温度、太阳辐射和海洋环境会加快eDNA的衰变速率, 这使得对应条件下检测到的eDNA与源生物之间的空间相关性更高(Strickler et al, 2015; Lamb et al, 2022)。因此, 相较淡水环境, 河口湿地咸淡水交汇, 水体沟通频繁, 受潮汐活动影响大, 且滩涂缺少高大植被遮挡, 太阳辐射强烈, 水体深度较浅, 有利于光穿透, 这样的环境特征使eDNA在环境中的存留时间变短, 检测到的eDNA能够更好地反映当下鱼类群落结构的实际面貌, 序列丰度与物种丰度之间相关性更强(Thomsen et al, 2012a; Yamamoto et al, 2017; Jo, 2023)。其次, 过滤水样的体积对于检测到的鱼类物种数有直接影响。环境DNA领域内过滤水样富集eDNA, 单个水样体积通常设置在0.5–2.0 L (Tsuji et al, 2019), 但将不同深度水层的水样混合以及过滤更大体积的水样有利于检测到更多的物种(蒋佩文等, 2022)。另外, 数据库中物种序列信息的完善程度会影响序列比对与分类注释的结果。当库中缺乏相关物种序列信息时, 会比对到序列相似的其他物种, 从而导致结果不准确或只能得到高分阶元的分类信息; 而当库中比对到的物种信息过多时也会对分类注释造成干扰。因此, 与数据库进行序列比对时, 需要设定相应的筛选标准; 在分析“假阳性”结果时, 需要综合历史调查物种名录与研究区域环境特征谨慎做出判断; 还需要尽早构建本地的条形码数据库, 不仅能够满足土著鱼类多样性的调查需求, 也排除了公共数据库中冗余信息的影响, 提高了环境DNA技术检测的效率(郜星辰和姜伟, 2021)。此外, 引物的物种区分能力以及扩增偏好性也会导致扩增测序过程产生偏差, 可能使测序结果不准确(Knight et al, 2018)。本研究所使用的鱼类经典12S rRNA引物MiFish-E的高变区拥有足够的信息可将鱼类鉴定至不同分

类阶元, 其有效性在诸多研究中得到证实(Nakagawa et al, 2018; 蒋佩文等, 2022)。但该引物也存在局限性, 如: 在近似种之间缺乏足够的种间变异, 可能会低估物种丰富度; 很难成功扩增所提取eDNA中包含的全部鱼类信息而造成假阴性; 偶尔会检测到其他非鱼类物种, 如海鸟、海豚等(Miya et al, 2015, 2020)。研究人员在选择引物时可基于本地物种探索适合的最优遗传标记, 或使用多对引物进行扩增。

### 3.3 潮沟系统鱼类多样性对水文连通的响应

水文连通可通过影响湿地重要环境因子来影响生物定居、迁移扩散和繁殖等行为, 进而影响湿地的生物连通性以及生物多样性(王新艳等, 2019)。研究区域一级潮沟至三级潮沟流速与断面面积依次递减, 表明水文连通性也依次递减(骆梦等, 2018)。径流量最大的一级潮沟水动力变化复杂, 受潮汐影响作用强烈, 水体交换频繁, 高流速的水体冲刷使其受扰动程度较大, 水文连通强度最高; 三级潮沟水体流速缓慢, 水量小, 受蒸发严重, 易停滞, 有机质富集水平高, 同样受干扰程度较强, 水文连通强度最小; 二级潮沟作为该典型潮沟系统的中间组成部分, 水文连通强度中等(董芮等, 2020)。本研究中, Chao 1指数和ACE指数(两者在生态学中被用于评估群落中的物种总数, 两者的计算公式均赋予了稀有物种一定的计算权重, 但后者对稀有物种定义范围更广, 且校正了变异系数和样本覆盖度)在不同级别潮沟之间呈现出一致的变化趋势。Shannon指数和Simpson指数亦呈现出相同的规律。二级潮沟无论是群落多样性还是丰富度都明显高于其他两级潮沟, 说明其物种种类最多, 并且物种个体数目分配更均匀。这符合中度干扰假说(the intermediate disturbance hypothesis), 即最高的多样性维持在干扰的中间尺度(Connell, 1978)。Sousa (1979)通过研究潮间带受海浪影响的不同大小卵石上定植的物种群落结构也发现中等大小的卵石包含最多样的物种群落。Evangelisti等(2013)对湿地3个不同盐度梯度的沿海水塘进行水样16S rRNA测序, 同样发现微生物群落在中等盐度水平有着最大的多样性。多样性是综合考虑丰富度和均匀度的结果, 三级潮沟群落丰富度小于一级潮沟, 但多样性却大于一级潮沟, 即三级潮沟的均匀度较高。

O'Donnell等(2017)发现eDNA测序得到的多样性指数在环境梯度上呈现出线性变化, 随着离岸距离增加, 丰富度下降, 而均匀度上升, 原因是当生物组织颗粒稀少时, 从固定体积的样本中所收集到的量就会更少, 从而降低了检测到更多物种(丰富度)的概率, 并增加了任意两个组织颗粒属于同一物种(均匀度)的可能性。本研究中一级潮沟作为该典型潮沟系统的主潮沟, 上游与海直接相连, 下游与内陆河道相接, 推测多条输入途径使其相较三级潮沟有机会容纳更多物种的eDNA。

研究结果显示优势种矛尾刺虾虎鱼、鲃的序列丰度在水文连通强度大的潮沟中较高, 推测与潮沟生态环境特征不同所导致的环境因子差异有关。秋季是丰水期, 此时水文连通强度大的潮沟径流量大、流速高, 水流会将一定的硅酸盐随泥沙迁走使硅酸盐含量降低(张晓晓等, 2010); 还会冲刷底层大颗粒泥沙, 导致土壤硬度降低, 孔隙大, 渗透性增高, 易被搅动从而吸引甲壳类来此觅食底栖微藻(Yin et al, 2020), 而甲壳类是黄河三角洲矛尾刺虾虎鱼最主要的饵料来源(范海洋等, 2005), 因此, 水文连通强度最大的一级潮沟硅酸盐浓度显著低于三级潮沟, 并且矛尾刺虾虎鱼序列丰度最高。鲃作为广盐性鱼类在低盐环境下可节省用于渗透调节的能量, 并且其幼鱼对低盐度的水流具有强烈的趋流性(李明德等, 1997); 张鼎元等(2020)发现鲃幼鱼在盐度15的条件下有最优的增重率以及最低的饵料系数。与上述研究结论一致, 研究区域一级潮沟的盐度显著低于三级潮沟, 并且随潮沟级别增加呈现出递增的趋势, 而鲃的序列丰度在三级潮沟下游最低, 并已不是优势类群; RDA排序图也表明鲃的序列丰度与盐度呈负相关。

## 4 结论

本研究使用环境DNA宏条形码技术评估了黄河口典型潮沟系统水体中的鱼类多样性, 共检测出鱼类55种, 其中本地鱼类27种、非本地鱼类28种, 物种组成以鲈形目为主。通过与历史数据对比证实了该技术检测黄河口滨海湿地潮沟鱼类物种组成的可行性与有效性。此外, 研究发现不同水文连通性的潮沟间鱼类物种组成与多样性不同, 二级潮沟群落多样性水平、丰富度、物种种类以及各种鱼类



类群中的个体均匀程度等都明显高于其他两级潮沟。6种环境因子硅酸盐( $\text{SiO}_3^{2-}\text{-Si}$ )、硝酸盐( $\text{NO}_3^-\text{-N}$ )、pH值、盐度(SAL)、铵盐( $\text{NH}_4^+\text{-N}$ )、溶解氧(DO)与鱼类群落结构显著相关。上述结果证实了水文连通性通过改变水文条件会影响鱼类物种组成与分布,不同级别潮沟之间由于水文连通强度不同会在多种环境理化指标上呈现出显著差异。

虽然环境DNA宏条形码技术仍存在诸多问题,如对本数据库的过度依赖、无法获取生物个体生物学指标信息、容易出现假阳性等,而且,由于环境DNA衰变机制不具有普遍性,在不同环境及不同物种中均不相同,这使得能否用环境DNA浓度及序列丰度表征物种在自然环境中的实际生物量与丰度备受争议。但相比传统的鱼类调查方法,该技术具有省时省力、灵敏度高、对生物和生态环境无害等诸多优势。随着本地数据库的不断完善及实验流程的标准化,该技术作为辅助检测手段,与传统调查方法相结合能更有效地反映鱼类多样性的实际面貌,为湿地生物多样性监测及资源调查评估提供有力的数据支持。

## ORCID

李宝泉  <https://orcid.org/0000-0002-7275-1984>

## 参考文献

- Balasingham KD, Walter RP, Mandrak NE, Heath DD (2018) Environmental DNA detection of rare and invasive fish species in two Great Lakes tributaries. *Molecular Ecology*, 27, 112–127.
- Chen WF, Zhou WZ, Shi YX (2003) Crisis of wetlands in the Yellow River Delta and its protection. *Journal of Agro-Environmental Science*, 22, 499–502. (in Chinese with English abstract) [陈为峰, 周维芝, 史衍玺 (2003) 黄河三角洲湿地面临的问题及其保护. *农业环境科学学报*, 22, 499–502.]
- Connell JH (1978) High diversity of trees and corals is maintained only in a nonequilibrium state. *Science*, 199, 1302–1310.
- Creer S, Deiner K, Frey S, Porazinska D, Taberlet P, Thomas WK, Potter C, Bik HM (2016) The ecologist's field guide to sequence-based identification of biodiversity. *Methods in Ecology and Evolution*, 7, 1008–1018.
- Cui BS, Cai YZ, Xie T, Ning ZH, Hua YY (2016) Ecological effects of wetland hydrological connectivity: Problems and prospects. *Journal of Beijing Normal University (Natural Science)*, 52, 738–746. (in Chinese with English abstract) [崔保山, 蔡燕子, 谢湑, 宁中华, 华妍妍 (2016) 湿地水文连通的生态效应研究进展及发展趋势. *北京师范大学学报(自然科学版)*, 52, 738–746.]
- Deiner K, Bik HM, Mächler E, Seymour M, Lacoursière-Roussel A, Altermatt F, Creer S, Bista I, Lodge DM, de Vere N, Pfrender ME, Bernatchez L (2017) Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology*, 26, 5872–5895.
- Dong R, Wang YY, Lü C, Lei GC, Xue BL, Chen QK (2020) Effects of hydrological connectivity on the community structure of macrobenthos in West Dongting Lake. *Acta Ecologica Sinica*, 40, 8336–8346. (in Chinese with English abstract) [董芮, 王玉玉, 吕偲, 雷光春, 薛彬林, 陈乾阔 (2020) 水文连通性对西洞庭湖大型底栖动物群落结构的影响. *生态学报*, 40, 8336–8346.]
- Evangelisti M, D'Amelia D, Di Lallo GD, Thaller MC, Migliore L (2013) The relationship between salinity and bacterioplankton in three relic coastal ponds (Macchiatonda Wetland, Italy). *Journal of Water Resource and Protection*, 5, 859–866.
- Evans NT, Olds BP, Renshaw MA, Turner CR, Li YY, Jerde CL, Mahon AR, Pfrender ME, Lamberti GA, Lodge DM (2016) Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 16, 29–41.
- Fan HY, Ji YP, Zhang SH, Yuan CT, Gao TX (2005) Research of fishery biology of the neritic fish *Synechogobius ommaturus* in the area of the Huanghe Delta. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science)*, 35, 733–736. (in Chinese with English abstract) [范海洋, 纪毓鹏, 张士华, 苑春亭, 高天翔 (2005) 黄河三角洲斑尾复虾虎鱼渔业生物学的研究. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 35, 733–736.]
- Freeman MC, Pringle CM, Jackson CR (2007) Hydrologic connectivity and the contribution of stream headwaters to ecological integrity at regional scales. *Journal of the American Water Resources Association*, 43, 5–14.
- Gao XC, Jiang W (2021) The construction and application of BLAST database of DNA barcode for common fish in the Three Gorges Reservoir. *Genomics and Applied Biology*, 40, 1952–1960. (in Chinese with English abstract) [郜星辰, 姜伟 (2021) 三峡库区常见鱼类DNA条形码本地BLAST数据库的构建和应用. *基因组学与应用生物学*, 40, 1952–1960.]
- Garwood JA, Allen DM, Kimball ME, Boswell KM (2019) Site fidelity and habitat use by young-of-the-year transient fishes in salt marsh intertidal creeks. *Estuaries and Coasts*, 42, 1387–1396.
- Jardine TD, Pettit NE, Warfe DM, Pusey BJ, Ward DP, Douglas MM, Davies PM, Bunn SE (2012) Consumer-resource coupling in wet-dry tropical rivers. *Journal of Animal Ecology*, 81, 310–322.
- 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.
- Jiang PW, Li M, Zhang S, Chen ZZ, Xu SN (2022) Investigating the fish diversity in Pearl River Estuary based on environmental DNA metabarcoding and bottom trawling. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 46, 1701–1711. (in Chinese with English abstract) [蒋佩文, 李敏, 张帅, 陈作志, 徐姗楠 (2022) 基于环境DNA宏条码和底拖网的珠江河口鱼类多样性. *水生生物学报*, 46, 1701–1711.]
- Jiang WZ, Sui KG (2015) Study on ecological pond aquaculture technology of *Tachysurus fulvidraco* in saline-alkali land. *Hebei Fisheries*, (11), 32–33. (in Chinese) [蒋万钊, 隋凯港 (2015) 盐碱地黄颡鱼池塘生态养殖技术研究. *河北渔业*, (11), 32–33.]
- Jo TS (2023) Correlation between the number of eDNA particles and species abundance is strengthened by warm temperature: Simulation and meta-analysis. *Hydrobiologia*, 850, 39–50.
- Knight R, Vrbanc A, Taylor BC, Aksenov A, Callewaert C, Debelius J, Gonzalez A, Kosciolk T, McCall LI, McDonald D, Melnik AV, Morton JT, Navas J, Quinn RA, Sanders JG, Swafford AD, Thompson LR, Tripathi A, Xu ZZJ, Zaneveld JR, Zhu QY, Caporaso JG, Dorrestein PC (2018) Best practices for analysing microbiomes. *Nature Reviews Microbiology*, 16, 410–422.
- Kume M, Lavergne E, Ahn H, Terashima Y, Kadowaki K, Ye F, Kameyama S, Kai Y, Henmi YM, Yamashita Y, Kasai A (2021) Factors structuring estuarine and coastal fish communities across Japan using environmental DNA metabarcoding. *Ecological Indicators*, 121, 107216.
- Lamb PD, Fonseca VG, Maxwell DL, Nnanatu CC (2022) Systematic review and meta-analysis: Water type and temperature affect environmental DNA decay. *Molecular Ecology Resources*, 22, 2494–2505.
- Li DX, Li YQ, Zhang KH, Ma X, Zhang SY, Liu WH, Che CG, Cui BS (2020) Characteristics of carbon and nitrogen distribution in typical tidal creeks of the Yellow River Delta. *Journal of Natural Resources*, 35, 460–471. (in Chinese with English abstract) [李冬雪, 李雨琴, 张珂豪, 马旭, 张树岩, 刘伟华, 车纯广, 崔保山 (2020) 黄河口典型潮沟土壤碳氮分布特征规律. *自然资源学报*, 35, 460–471.]
- Li F, Lü ZB, Wei ZH, Wang TT, Xu BQ, Wang ZQ (2013) Seasonal changes in the community structure of the demersal fishery in Laizhou Bay. *Journal of Fishery Sciences of China*, 20, 137–147. (in Chinese with English abstract) [李凡, 吕振波, 魏振华, 王田田, 徐炳庆, 王忠全 (2013) 2010年莱州湾底层渔业生物群落结构及季节变化. *中国水产科学*, 20, 137–147.]
- Li F, Xu BQ, Lü ZB, Wang TT (2018) Ecological niche of dominant species of fish assemblages in Laizhou Bay, China. *Acta Ecologica Sinica*, 38, 5195–5205. (in Chinese with English abstract) [李凡, 徐炳庆, 吕振波, 王田田 (2018) 莱州湾鱼类群落优势种生态位. *生态学报*, 38, 5195–5205.]
- Li HT, Zou KS, Zhang S, Cao YT, Lu ZC, Chen ZZ, Li M (2022) Species composition of fishes in the Pearl River Estuary based on environmental DNA metabarcoding. *Journal of Shanghai Ocean University*, 31, 1423–1433. (in Chinese with English abstract) [李红婷, 邹柯姝, 张帅, 曹漪婷, 卢芷程, 陈作志, 李敏 (2022) 基于环境DNA宏条形码的珠江河口鱼类种类组成. *上海海洋大学学报*, 31, 1423–1433.]
- Li MD, Wang XL, Lü X (1997) Mullet. China Ocean Press, Beijing. (in Chinese) [李明德, 王秀玲, 吕宪 (1997) 梭鱼. 海洋出版社, 北京.]
- Li W, Cui LJ, Zhao XS, Zhang MY, Ma MY, Kang XM, Wang YF (2014) An overview of Chinese coastal wetland and their ecosystem services. *Forest Inventory and Planning*, 39(4), 24–30. (in Chinese with English abstract) [李伟, 崔丽娟, 赵欣胜, 张曼胤, 马牧源, 康晓明, 王义飞 (2014) 中国滨海湿地及其生态系统服务功能研究概述. *林业调查规划*, 39(4), 24–30.]
- Liu J, Chen YX, Ma L (2015) Fishes of the Bohai Sea and Yellow Sea. Science Press, Beijing. (in Chinese) [刘静, 陈咏霞, 马琳 (2015) 黄渤海鱼类图志. 科学出版社, 北京.]
- Luo M, Wang Q, Qiu DD, Shi W, Ning ZH, Cai YZ, Song ZF, Cui BS (2018) Hydrological connectivity characteristics and ecological effects of a typical tidal channel system in the Yellow River Delta. *Journal of Beijing Normal University (Natural Science)*, 54, 17–24. (in Chinese with English abstract) [骆梦, 王青, 邱冬冬, 施伟, 宁中华, 蔡燕子, 宋振峰, 崔保山 (2018) 黄河三角洲典型潮沟系统水文连通特征及其生态效应. *北京师范大学学报(自然科学版)*, 54, 17–24.]
- Ma QZ, Zhang TT, Zhao F, Zhang T, Yang G, Wang SK (2023) Effects of tidal creek connectivity on fish communities in the Yangtze estuary wetlands. *Chinese Journal of Ecology*, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1148.Q.20230311.1446.006.html>. (in Chinese with English abstract) [马巧珍, 张婷婷, 赵峰, 张涛, 杨刚, 王思凯 (2023) 长江口湿地潮沟连通程度对鱼类群落的影响. *生态学杂志*, <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1148.Q.20230311.1446.006.html>.]
- Miya M, Gotoh RO, Sado T (2020) MiFish metabarcoding: A high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples. *Fisheries Science*, 86, 939–970.
- Miya M, Nishida M (2000) Use of mitogenomic information in teleostean molecular phylogenetics: A tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 17, 437–455.
- 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.
- Murakami H, Yoon S, Kasai A, Minamoto T, Yamamoto S, Sakata MK, Horiuchi T, Sawada H, Kondoh M, Yamashita Y, Masuda R (2019) Dispersion and degradation of environmental DNA from caged fish in a marine environment. *Fisheries Science*, 85, 327–337.
- Nakagawa H, Yamamoto S, Sato Y, Sado T, Minamoto T, Miya M (2018) Comparing local- and regional-scale estimations of the diversity of stream fish using eDNA metabarcoding and conventional observation methods. *Freshwater Biology*, 63, 569–580.
- O'Donnell JL, Kelly RP, Shelton AO, Samhoury JF, Lowell NC, Williams GD (2017) Spatial distribution of environmental DNA in a nearshore marine habitat. *PeerJ*, 5, e3044.
- Qu JY, Yang GMM, Fang Z, Chen XJ (2021) A review of research advancement on fisheries biology of Japanese Spanish Mackerel *Scomberomorus niphonius*. *Fisheries Science*, 40, 643–650. (in Chinese with English abstract) [瞿俊跃, 杨光明媚, 方舟, 陈新军 (2021) 蓝点马鲛渔业生物学研究进展. *水产科学*, 40, 643–650.]
- Sales NG, Wangenstein OS, Carvalho DC, Deiner K, Præbel K, Coscia I, McDevitt AD, Mariani S (2021) Space-time dynamics in monitoring neotropical fish communities using eDNA metabarcoding. *Science of the Total Environment*, 754, 142096.
- Sard NM, Herbst SJ, Nathan L, Uhrig G, Kanefsky J, Robinson JD, Scribner KT (2019) Comparison of fish detections, community diversity, and relative abundance using environmental DNA metabarcoding and traditional gears. *Environmental DNA*, 1, 368–384.
- Schofield KA, Alexander LC, Ridley CE, Vanderhoof MK, Fritz KM, Autrey BC, DeMeester JE, Kepner WG, Lane CR, Leibowitz SG, Pollard AI (2018) Biota connect aquatic habitats throughout freshwater ecosystem mosaics. *Journal of the American Water Resources Association*, 54, 372–399.
- 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, 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. (in Chinese with English abstract) [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.]
- Sousa WP (1979) Disturbance in marine intertidal boulder fields: The nonequilibrium maintenance of species diversity. *Ecology*, 60, 1225–1239.
- Strickler KM, Fremier AK, Goldberg CS (2015) Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms. *Biological Conservation*, 183, 85–92.
- Sun JF, Liu QZ (2010) Research on comprehensive development and utilization of geothermal resources in Dongying. *Journal of Hebei Agricultural Sciences*, 14(2), 91–93, 96. (in Chinese with English abstract) [孙金凤, 刘清志 (2010) 东营市地热资源综合开发与利用研究. *河北农业科学*, 14(2), 91–93, 96.]
- Sun PF, Shan XJ, Wu Q, Chen YL, Jin XS (2014) Seasonal variations in fish community structure in the Laizhou Bay and the Yellow River Estuary. *Acta Ecologica Sinica*, 34, 367–376. (in Chinese with English abstract) [孙鹏飞, 单秀娟, 吴强, 陈云龙, 金显仕 (2014) 莱州湾及黄河口水域鱼类群落结构的季节变化. *生态学报*, 34, 367–376.]
- Sun ZG, Mou XJ, Chen XB, Wang LL, Song HL, Jiang HH (2011) Actualities, problems and suggestions of wetland protection and restoration in the Yellow River Delta. *Wetland Science*, 9, 107–115. (in Chinese with English abstract) [孙志高, 牟晓杰, 陈小兵, 王玲玲, 宋红丽, 姜欢欢 (2011) 黄河三角洲湿地保护与恢复的现状、问题与建议. *湿地科学*, 9, 107–115.]
- Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, Møller PR, Rasmussen M, Willerslev E (2012a) Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS ONE*, 7, e41732.
- Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL, Wiuf C, Rasmussen M, Gilbert MTP, Orlando L, Willerslev E (2012b) Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 21, 2565–2573.
- Tsuji S, Takahara T, Doi H, Shibata N, Yamanaka H (2019) The detection of aquatic macroorganisms using environmental DNA analysis—A review of methods for collection, extraction, and detection. *Environmental DNA*, 1, 99–108.
- Valentini A, Taberlet P, Miaud C, Civade R, Herder J, Thomsen PF, Bellemain E, Besnard A, Coissac E, Boyer F, Gaboriaud C, Jean P, Poulet N, Roset N, Copp GH, Geniez P, Pont D, Argillier C, Baudoin JM, Peroux T, Crivelli AJ, Olivier A, Acqueberge M, Le Brun M, Møller PR, Willerslev E, Dejean T (2016) Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 25, 929–942.
- Wang P, Jiao Y, Ren YP, Zhong CJ, Yu H (1999) Investigation of biodiversity from spring catch in coastal waters of Laizhou Bay and Huanghe Estuary. *Transaction of Oceanology and Limnology*, (1), 40–44. (in Chinese with English abstract) [王平, 焦燕, 任一平, 仲崇俊, 于浩 (1999) 莱州湾、黄河口水域春季近岸渔获生物多样性特征的调查研究. *海洋湖沼通报*, (1), 40–44.]
- Wang RX, Yang G, Geng Z, Zhao F, Feng XS, Zhang T (2023) Application of environmental DNA technology in fish

- diversity analysis in the Yangtze River estuary. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 47, 365–375. (in Chinese with English abstract) [王汝贤, 杨刚, 耿智, 赵峰, 冯雪松, 张涛 (2023) 环境DNA技术在长江口鱼类多样性分析中的应用. *水生生物学报*, 47, 365–375.]
- Wang XY, Yan JG, Bai JH, Cui BS (2019) Influence of hydrological connectivity of coastal wetland on the biological connectivity of macrobenthos in the Yellow River Estuary. *Journal of Natural Resources*, 34, 2544–2553. (in Chinese with English abstract) [王新艳, 闫家国, 白军红, 崔保山 (2019) 黄河口滨海湿地水文连通对大型底栖动物生物连通的影响. *自然资源学报*, 34, 2544–2553.]
- 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.
- Yamamoto S, Minami K, Fukaya K, Takahashi K, Sawada H, Murakami H, Tsuji S, Hashizume H, Kubonaga S, Horiuchi T, Hongo M, Nishida J, Okugawa Y, Fujiwara A, Fukuda M, Hidaka S, Suzuki KW, Miya M, Araki H, Yamanaka H, Maruyama A, Miyashita K, Masuda R, Minamoto T, Kondoh M (2016) Environmental DNA as a ‘snapshot’ of fish distribution: A case study of Japanese Jack Mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan. *PLoS ONE*, 11, e0149786.
- Yin S, Bai JH, Wang X, Wang XY, Zhang GL, Jia J, Li XW, Liu XH (2020) Hydrological connectivity and herbivores control the autochthonous producers of coastal salt marshes. *Marine Pollution Bulletin*, 160, 111638.
- Yuan J, Cohen MJ, Kaplan DA, Acharya S, Larsen LG, Nungesser MK (2015) Linking metrics of landscape pattern to hydrological process in a lotic wetland. *Landscape Ecology*, 30, 1893–1912.
- Zhan AB, Hulák M, Sylvester F, Huang XT, Adebayo AA, Abbott CL, Adamowicz SJ, Heath DD, Cristescu ME, MacIsaac HJ (2013) High sensitivity of 454 pyrosequencing for detection of rare species in aquatic communities. *Methods in Ecology and Evolution*, 4, 558–565.
- Zhang DY, Chai XJ, Ruan ZC, Zhang Y, Wang YB (2020) Effects of long time low salinity on the growth and physiology in the juvenile of *Liza haematocheila*. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 39, 296–302. (in Chinese with English abstract) [张鼎元, 柴学军, 阮泽超, 张燕, 王跃斌 (2020) 长期低盐胁迫对梭鱼生长及生理的影响. *浙江海洋大学学报(自然科学版)*, 39, 296–302.]
- Zhang XX, Yao QZ, Chen HT, Mi TZ, Tan JQ, Yu ZG (2010) Seasonal variation and fluxes of nutrients in the lower reaches of the Yellow River. *Periodical of Ocean University of China*, 40(7), 82–88. (in Chinese with English abstract) [张晓晓, 姚庆祯, 陈洪涛, 米铁柱, 谭加强, 于志刚 (2010) 黄河下游营养盐浓度季节变化及其入海通量研究. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 40(7), 82–88.]
- Zhao XY, Li X, Yu M, Yu JB, Wang XH (2019) Actualities of wetland hydrological connectivity blocked in the Yellow River Delta. *Regional Governance*, (49), 78–81. (in Chinese) [赵心怡, 李晓, 于淼, 于君宝, 王雪宏 (2019) 黄河三角洲湿地水文连通受阻现状. *区域治理*, (49), 78–81.]
- Zou KS, Chen JW, Ruan HT, Li ZH, Guo WJ, 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.

(责任编辑: 李新正 责任编辑: 李会丽)