

长江上游珍稀特有鱼类国家级自然保护区重庆段水域 浮游生物多样性及群落结构特征^{*}

沈彦君, 张玉凤, 王 梦, 李英文

(重庆师范大学 水生态健康与环境安全实验室, 重庆 401331)

摘要:为了解长江上游珍稀特有鱼类国家级自然保护区重庆段水域浮游生物群落的多样性及群落特征,于 2021 年 3 月在该江段设置 6 个采样断面进行样品采集,结合环境 DNA 宏条形码技术(后简称 eDNA 技术)和传统形态学鉴定方法(后简称传统方法)对该江段的浮游生物多样性及群落结构特征进行研究。研究结果显示:1) 在所有样品中共检测出真核浮游生物 116 属,其中真核浮游植物 7 门 56 属,以绿藻门(Chlorophyta)和硅藻门(Bacillariophyta)为主;浮游动物 4 类 60 属,以原生动物门(Protozoa)为主。2) 真核浮游植物平均密度为 $8.794\ 2$ 万个 $\cdot L^{-1}$,平均生物量为 $0.114\ 98\ mg \cdot L^{-1}$;浮游动物平均密度为 $0.014\ 33$ 万个 $\cdot L^{-1}$,平均生物量为 $0.896\ 43\ mg \cdot L^{-1}$ 。3) 基于传统方法计数结果计算得到各采样断面真核浮游植物的 Shannon-Wiener 多样性指数和 Pielou 均匀度指数平均值分别为 2.869 0 和 0.876 2,浮游动物的这 2 个指数平均值分别为 2.230 8 和 0.926 0;基于 eDNA 技术测序所得序列数计算得到各采样断面真核浮游植物的上述 2 个指数平均值分别为 5.229 7 和 0.552 7,浮游动物的上述 2 个指数平均值分别为 4.280 5 和 0.704 1;生物多样性指数评价结果初步揭示出该江段水质污染类型当前处于 β 中污染至轻污或无污染状态。研究结果提示在现阶段的淡水浮游生物资源监测和评价中,可尝试将 eDNA 技术与传统方法相结合来探讨浮游生物多样性和群落结构特征。

关键词:浮游生物;多样性;18S rRNA;环境 DNA;长江上游

中图分类号:Q9

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2024)04-0094-16

浮游生物个体微小、种类繁多,主要包括浮游植物和浮游动物两大类^[1]。浮游植物作为水生态系统的初级生产者,对于物质循环、能量流动及维持水生态系统的平衡具有重要作用^[2-3]。浮游动物在食物链中作为初级消费者,不仅以浮游植物为食,同时还能鱼类等其他水生生物提供食物来源,是联系初级生产者和次级消费者的重要一环,在水生态系统中起着传递物质和能量的重要作用^[4-5]。浮游植物和浮游动物作为鱼类赖以生存的饵料,它们的生物量在一定程度上决定了鱼类的生物量。此外,浮游生物具有生活周期短且对水环境中各种因素变化十分敏感的特点^[6]。因此,浮游生物的种类组成和群落结构在水质评价中常被视为重要指标^[1],对河流水环境质量评价有着重要的参考价值,也能为水体污染和富营养化程度的加深提供早期预警信号^[7]。

长江上游珍稀特有鱼类国家级自然保护区(后简称保护区)重庆段是保护区最下游的江段,是关系到保护区上游珍稀特有鱼类生存和三峡库区渔业资源增殖的重要通道,对维持长江淡水鱼类种质资源、水生生物多样性和三峡库区水域生态系统稳定性具有重要意义^[8]。目前有关保护区重庆段浮游生物群落特征的研究较少,且已有研究多是基于传统形态学鉴定方法(后简称传统方法)^[9-12]。传统方法主要依靠研究人员在光学显微镜下对浮游生物进行鉴定,不仅耗时费力,且对人员的经验和能力要求极高,因此很难精确且详尽地监测到水体中水生生物群落的全貌^[13-14]。近些年来的研究表明,环境 DNA 宏条形码技术(后简称 eDNA 技术)在水生生物多样性研究中具有极大的应用潜能,不仅弥补了传统方法存在的如调查成本大、耗时长、精准性差等不足,而且有着比传统方法更高的监测效率^[15-16]。Francesco 等人^[17]于 2008 年首次将 eDNA 技术应用于对水生生物美国牛蛙(*Rana catesbeiana*)的监测;Yamamoto 等人^[18]使用 eDNA 技术在日本近海检测出 128 种鱼类;王晨等人^[19]于 2019 年采用 eDNA 技术在秦淮河监测出 82 种浮游生物;胡愈忻等人^[14]于 2020 年运用 eDNA 技术调查了丹江

* 收稿日期:2023-03-22 修回日期:2024-05-31 网络出版时间:2024-10-11T14:21

资助项目:国家自然科学基金青年科学基金项目(No. 32202939);重庆市自然科学基金面上项目(No. CSTB2022NSCQ-MSX0793)

第一作者简介:沈彦君,男,副教授,博士,研究方向为水生生物学,E-mail: shenyanjun@cqu.edu.cn;通信作者:李英文,男,教授,博士,E-mail:377683289@qq.com

网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/50.1165.n.20241010.1940.009

口水库浮游生物多样性及群落特征;Valentini 等人^[20]以鱼类为研究对象,发现 eDNA 技术的鱼类物种多样性检测比传统调查方法效率更高。这些研究不断推动着 eDNA 技术在水生生物监测中的应用^[21-22],为水生生物多样性研究提供了新思路。

在长江大保护的背景下,本研究以保护区重庆段为研究区,分别利用传统方法和 eDNA 技术来调查该江段浮游生物的多样性及群落结构特征,以期在丰富该江段水生生物数据资料的同时也为当地水质监测和评价提供一定参考,并为探寻长江浮游生物监测的新方法进行初步探索。

1 材料与方法

1.1 采样时间及采样点的布设

保护区重庆段地理范围(北纬 28.92°~29.33°、东经 105.88°~106.40°)起于重庆市江津区石蟆镇羊石社区,止于珞璜镇地维大桥。2021 年 3 月在该江段共布设了 6 个采样断面,各采样断面名称(代号)分别为三抛河(SPH)、松溉(SJ)、高占滩(GZT)、丁家沱(DJT)、綦江口(QJK)和马夫沱(MFT),它们在研究区内的具体位置如图 1 所示。

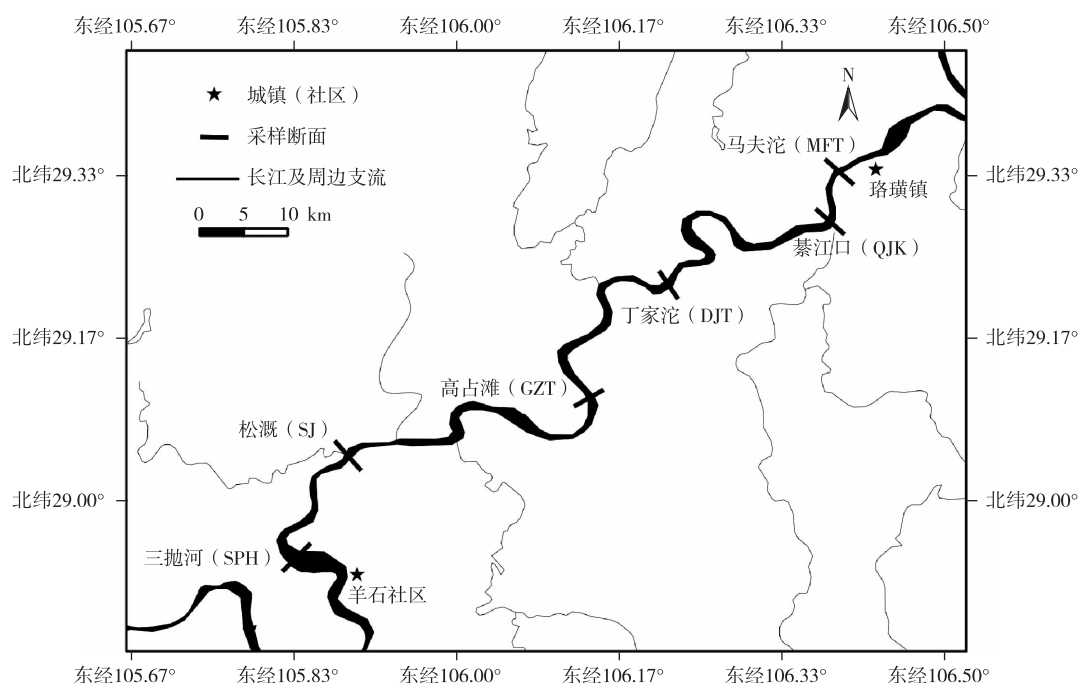


图 1 样品采样位置信息

Fig. 1 Information of sampling sites

1.2 样品的采集与处理

1.2.1 基于 eDNA 技术的样品采集与处理

利用采水器从每个采样断面各采集 6 L 水样后混匀,并分装于 3 个 2 L(即每个采样断面有 3 个平行水样)的聚乙烯瓶中^[23]。将收集到的水样立即冷藏,于采样当日运回实验室,在 24 h 内使用真空泵抽滤到英国 Whatman 公司生产的孔径为 0.45 μm 的混合纤维素滤膜上。在对每份样品进行抽滤前,均需对有关器材进行消毒以避免样品间的交叉污染。在抽滤时,同步设置 1 个阴性对照来评估是否存在外源 DNA 污染^[24]。最后将滤膜于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下保存。

1.2.2 基于传统方法的样品采集与处理

定性样品采集:用 25 $\#$ 浮游生物网采集原生动物门(Protozoa)、轮虫类(Rotifera)和真核浮游植物的定性样品,用 13 $\#$ 浮游生物网采集枝角类(Cladocera)和桡足类(Copepoda)的定性样品。以“ ∞ ”形在采样断面水体中深度为 0~0.5 m 范围内来回缓慢拖动 3~5 min 取得样品。加入体积为 1%~1.5% 水样体积的鲁哥氏液固定原生动物、轮虫和真核浮游植物样品,加入体积为 5% 水样体积的甲醛溶液($\varphi_{\text{甲醛}}$ 为 30%~40%)固定枝角类和桡足类样品,贴上标签并作好记录,带回实验室沉淀 24 h 以上,然后浓缩并镜检^[25-26]。定量样品采集:真核浮游植物

的定量样品于定性样品采样前用采水器采集,取水样 1 L 置于采样瓶中,然后立即加入体积为 1%~1.5% 水样体积的鲁哥氏液固定;动物定量样品采集方法则为用采水器采集 10~50 L 水样,再用 13# 浮游生物网过滤后,立即加入体积为 5% 水样体积的甲醛溶液($\varphi_{\text{甲醛}}$ 为 30%~40%)进行固定。最后将样品带回实验室,经过 48 h 以上的静置沉淀浓缩后用于浮游生物计数^[25-26]。

1.3 种类鉴定

1.3.1 eDNA 技术鉴定

采用德国 Qiagen 公司生产的 PowerWater DNA Isolation Kits 试剂盒提取滤膜中捕获的水样总 DNA。利用浮游动物通用引物 TAREuk454FWD1(5'-CCAGCASCYGC GGTAATTCC-3')和 TAREukREV3(5'-ACTTT-CGTTCTTGATYRAT-3')^[27]对样品核糖体小亚基即 18S rRNA 的 V4 区进行 PCR 扩增,扩增片段长度约为 385 bp。PCR 采用 TransStart Fastpfu DNA Polymerase 扩增,反应体系中含 4 μL 5 $\times$ FastPfu Buffer、2 μL dNTPs、0.4 μL FastPfu Polymerase、2~5 μL 模板 DNA(质量为 10 ng)和上下游引物各 0.8 μL (浓度为 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),最后用 ddH₂O 将体系总体积补至 20 μL 。PCR 反应程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,35 个循环的 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s、55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 终延伸 10 min。PCR 产物于 10 $^{\circ}\text{C}$ 保存。为评估 PCR 扩增中是否出现污染,实验过程中同步使用 ddH₂O 为模板作为 PCR 阴性对照。进行 PCR 扩增时,每个样本进行 3 次重复,并将获得产物混合,用琼脂凝胶电泳($\omega_{\text{琼脂}}$ = 2%)进行条带检测。最后将 PCR 产物胶回收,送至上海凌恩生物公司通过 Illumina NovaSeq 6000 测序平台进行高通量测序。

利用 Usearch 软件对高通量测序后的原始序列进行初步筛选,过滤去除低质量的序列并得到有效数据。然后将拼接序列聚类为操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU),获得 OTU 代表序列。将 OTU 代表序列与 Silva(Release138.1)数据库(<http://www.arb-silva.de>)进行比对、分类注释,去除比对到非浮游生物的数据信息,筛选出 identity 值不低于 97%, E -value 不高于 10^{-5} 的 OTU,再将比对至同一物种的 OTU 进行合并。各采样点的平行样品中未匹配到的物种序列均被剔除,匹配到物种的序列数按均值处理,最终得到相应的 OTU 丰度表。

1.3.2 传统方法鉴定

浮游生物定性分析在 10 $\times$ 20、10 $\times$ 40 倍光学显微镜下进行观察、拍照,种类鉴定主要参考《中国淡水藻类:系统、分类及生态》^[28]、《中国淡水生物图谱》^[29]和《中国常见淡水浮游藻类图谱》^[30]。浮游生物定量分析主要参照《淡水浮游生物研究方法》^[31]以及利用万深 AlgaeC 浮游生物智能鉴定计数仪进行。

1.4 统计分析

在本研究中,基于 eDNA 技术的浮游生物多样性及群落结构特征分析以 OTU 聚类分析结果为基础,在 Excel 2016 软件中统计各样本中浮游生物的有效序列数占比并参考《中国淡水藻类:系统、分类及生态》^[28]注释、完善其中的分类学信息。最后通过 R 语言绘制各个采样断面浮游生物组成柱状图等。基于每个样本中 OTU 相对丰度信息计算样本间 Bray-Curtis 距离,进行 UPGMA 的计算和作图,探索不同分组样本间的群落组成差异性 or 相似性。

为便于比较由 eDNA 技术与传统方法得到的结果,本研究利用 PRIMER 6.0 软件分别计算基于 2 种方法得到的 Shannon-Wiener 物种多样性指数(H')及 Pielou 均匀度指数(J),并根据这 2 个指数对保护区重庆段水质状况进行初步评价^[32]。2 个多样性指数计算公式分别为:

$$H' = - \sum (P_i \ln P_i),$$

其中: P_i 为第 i 种物种的个体数与全部物种总个体数的比值;

$$J = H' / H_{\max},$$

其中: $H_{\max}$ 为 $\log_{10} S$ (S 为物种数)。多样性指数与水质污染类型的关系见表 1。

2 结果与分析

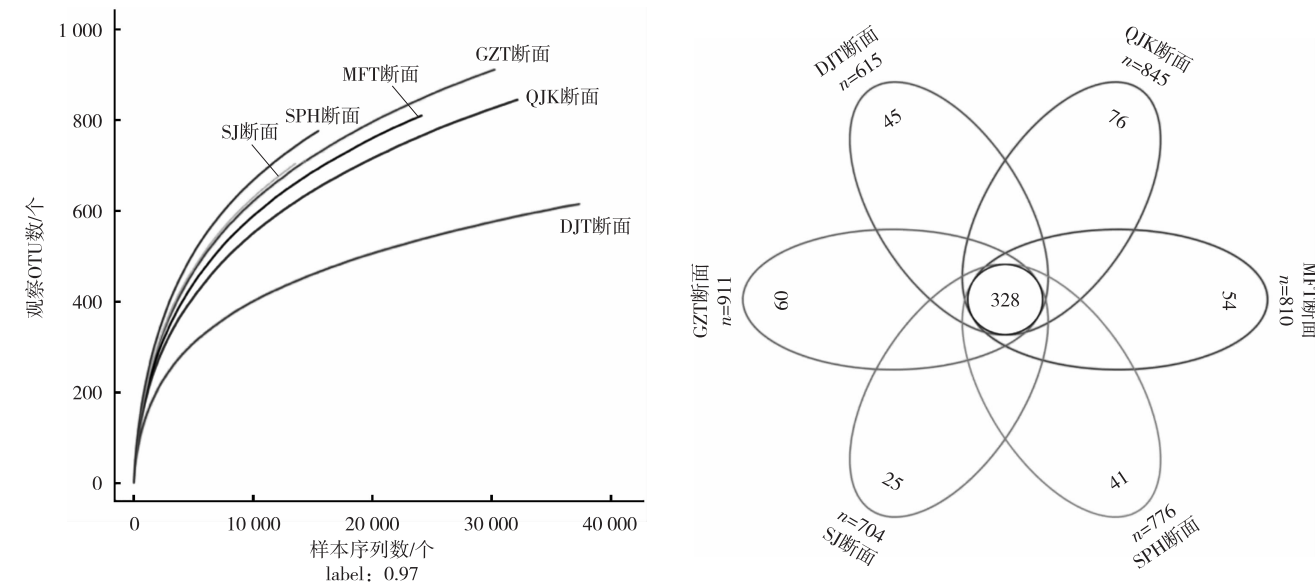
2.1 注释结果

通过高通量测序在 6 个采样断面样品中共测出 3 173 453 条序列,其中在 MFT 断面样品测得序列数最少,为 442 495 条;在 QJK 断面样品测得序列数最多,为 624 985 条;平均每个断面样品中测得 528 908 条序列。经

去除重复序列及按序列相似性不低于 97% 聚类等处理后,在 6 个采样断面样品中共获得 1 322 个代表性 OTU 序列,它们的 OTU 稀释曲线(rarefaction curve)如图 2 所示。当测序深度约为 35 250 时,各样本的稀释曲线逐渐趋于平缓,表明目前该测序深度已足够。图 3 为基于 OTU 丰度绘制的各样点 Venn 图,6 个采样断面样品有 328 个共有的 OTU 序列,其中 QJK 断面样品具有较高比例的特有 OTU 序列。将获得的代表性 OTU 序列与 Silva 数据库进行比对,其中有 1 322 条 OTU 序列通过分类学注释到 140 种真核浮游生物;有 47 226 条 OTU 序列无法识别,可能与公共数据库中浮游生物分子数据完整性有关,需要进一步开展相关方面的研究,以完善数据库中物种的分子数据信息。

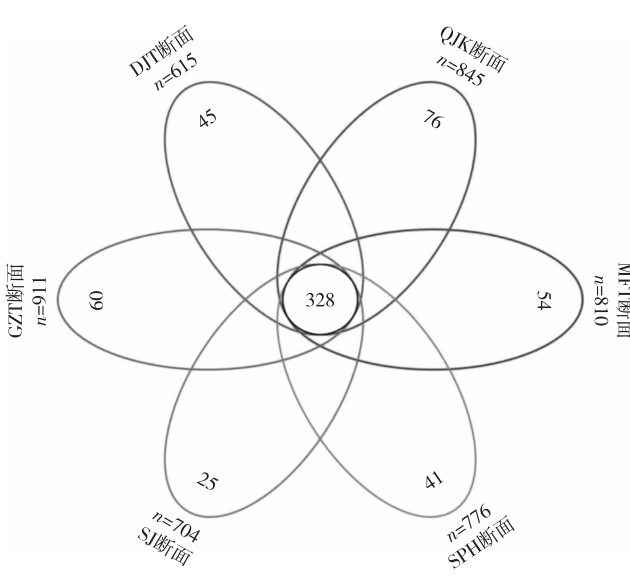
表 1 多样性指数与水质污染类型的关系^[33-35]
Tab. 1 The relationship between diversity index and types of water pollution^[33-35]

多样性指数	水质污染类型			
	重污染	α 中污染	β 中污染	轻污或无污染
H'	0~1	>1~2	>2~3	>3
J	0~0.3	>0.3~0.4	>0.4~0.5	>0.5



注:各采样断面代号对应的中文名称见图 1,下同。

图 2 基于 eDNA 技术检测的 6 个采样断面样品的稀释曲线
Fig. 2 Rarefaction curve of 6 samples based on eDNA detection



注: n 表示各采样断面样品单独所含有的 OTU 序列个数。

图 3 各采样断面的韦恩图展示
Fig. 3 Venn diagram display of each sampling section

2.2 浮游生物群落结构特征

2.2.1 浮游生物种类组成及分布

由表 2 可知,通过传统方法在 6 个采样断面样品中共鉴定出真核浮游植物 4 门 24 属,其中:硅藻门(Bacillariophyta)17 属,占比为 70.8%;甲藻门(Pyrrophyta)3 属,占比为 12.5%;绿藻门(Chlorophyta)和裸藻门(Euglenophyta)均为 2 属,占比为 8.3%。在 DJT 断面样品中鉴定到的真核浮游植物属数最少,仅 8 属;而在 SJ 断面样品中鉴定到的真核浮游植物属数最多,共 17 属;其余各采样断面样品中真核浮游植物属数数量差异较小,介于 12~14 属之间。此外表 3 显示:采用传统方法共鉴定出浮游动物 4 类 36 属,其中桡足类属数最多,为 13 属,占比为 36.11%;其次是轮虫类,为 10 属,占比为 27.8%;然后是枝角类 7 属,占比为 19.44%;原生动物门属数最少,仅 6 属,占比为 16.67%。总体上看,各采样断面样品中浮游动物属数差异不大,介于 14~19 属之间。

表 2 显示:采用 eDNA 技术共鉴定出真核浮游植物 5 门 43 属,其中绿藻门属数最多,为 19 属,占比为 44.2%;其次为硅藻门 14 属,占比为 32.5%;再次为金藻门(Chrysophyta)7 属,占比为 16.3%;隐藻门(Cryptophyta)和黄藻门(Xanthophyta)属数很少,分别为 2 属和 1 属,占比分别为 4.7%和 2.3%。此外, SJ 断

面样品中真核浮游植物序列数最少而 DJT 断面样品中获得的真核浮游植物序列数最多。而由表 3 可知:采用 eDNA 技术共鉴定出浮游动物 4 类 27 属,其中原生动物门属数最多,为 23 属,占比为 85.2%;其次为桡足类 2 属,占比为 7.4%;枝角类和轮虫类属数最少,均仅 1 属,占比均为 3.7%。在 SJ 断面样品中获得的浮游动物序列数最少而在 DJT 采样断面样品中获得的浮游动物序列数最多,其余各采样断面样品中获得的浮游动物序列数差异不大,介于 1 054~1 990 条之间。

综上所述,本研究通过传统方法和 eDNA 技术在 6 个采样断面样品中分别检出真核浮游生物 60 和 70 属。与通过 eDNA 技术得到的结果相比,通过传统方法检出的真核浮游植物属数更少但浮游动物属数更多。综合传统方法和 eDNA 技术的检出结果,本研究在保护区重庆段共检出真核浮游生物 11 个门(类),其中:真核浮游植物 7 门 56 属,且以绿藻门和硅藻门的属数最多,分别占真核浮游植物总属数的 37.5%和 35.7%;浮游动物 4 类 60 属,以原生动物门的属数最多,占浮游动物总属数的 45%。

2.2.2 浮游生物密度和生物量

基于传统方法的保护区重庆段真核浮游植物定量分析结果显示:1) 真核浮游植物平均密度为 $8.794\ 2\ \text{万个} \cdot \text{L}^{-1}$,其中硅藻门平均密度最高,为 $8.338\ 0\ \text{万个} \cdot \text{L}^{-1}$;其次是甲藻门和裸藻门,平均密度分别为 $0.178\ 6\ \text{万个} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.178\ 5\ \text{万个} \cdot \text{L}^{-1}$;绿藻门的平均密度较低,为 $0.099\ 0\ \text{万个} \cdot \text{L}^{-1}$ 。2) 真核浮游植物平均生物量为 $0.114\ 98\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,其中硅藻门平均生物量最高,为 $0.109\ 1\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;其次是甲藻门,平均生物量为 $0.005\ 0\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;绿藻门平均生物量最低,为 $0.000\ 3\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。3) 各采样断面真核浮游植物的密度和生物量差异较为明显。SJ 断面真核浮游植物密度最高而 MFT 断面真核浮游植物生物量最高;QJK 断面真核浮游植物的密度和生物量均为最低(表 4)。

表 2 各采样断面真核浮游植物种类组成及序列数
Tab. 2 Composition and sequence number of eukaryotic phytoplankton in each sampling section

门	属	物种检测信息					
		MFT 断面	QJK 断面	DJT 断面	GZT 断面	SJ 断面	SPH 断面
硅藻门(Bacillariophyta)	卵形藻属(<i>Cocconeis</i>)	+ /105	+ /99	+ /	+ /372	+ /17	+ /86
	小环藻属(<i>Cyclotella</i>)	+ /111	+ /201	+ /487	+ /105	+ /97	+ /173
	波缘藻属(<i>Cymatopleura</i>)	/451	+ /262		/655	+ /224	/36
	桥弯藻属(<i>Cymbella</i>)	+ /	+ /4		/3	+ /	/11
	脆杆藻属(<i>Fragilaria</i>)	/1	/4	/1	+ /	+ /1	+ /4
	异极藻属(<i>Gomphonema</i>)	+ /45	+ /101	/3	+ /74	+ /27	+ /156
	直链藻属(<i>Melosira</i>)	+ /263	+ /	+ /	+ /28	+ /66	+ /27
	舟形藻属(<i>Navicula</i>)	+ /1	+ /1	/	/6	+ /5	+ /1
	菱形藻属(<i>Nitzschia</i>)	+ /20	+ /26	+ /49	+ /58	+ /123	+ /111
	羽纹藻属(<i>Pinnularia</i>)	/1	/4	+ /	/3	/1	/33
	双菱藻属(<i>Surirella</i>)	+ /177	+ /261	/47	+ /187	/117	234
	短缝藻属(<i>Eunotia</i>)						/2
	长萼藻属(<i>Neidium</i>)					/1	
	管盘藻属(<i>Stephanodiscus</i>)	/333	/2 304	/835	/439	/332	/632
	星杆藻属(<i>Asterionella</i>)					+ /	
	沟链藻属(<i>Aulacoseira</i>)	+ /			+ /	+ /	+ /
	等片藻属(<i>Diatoma</i>)	+ /	+ /		+ /	+ /	+ /
	布纹藻属(<i>Gyrosigma</i>)					+ /	
	明针杆藻属(<i>Hyalosynedra</i>)					+ /	
	针杆藻属(<i>Synedra</i>)	+ /	+ /	+ /	+ /	+ /	+ /

续表 2

门	属	物种检测信息					
		MFT 断面	QJK 断面	DJT 断面	GZT 断面	SJ 断面	SPH 断面
绿藻门(Chlorophyta)	四鞭藻属(<i>Carteria</i>)	/54	/22	/119	/42	/21	/17
	衣藻属(<i>Chlamydomonas</i>)	/957	/1025	/950	/855	/381	/441
	小球藻属(<i>Chlorella</i>)		/3	/2	/1	/2	/3
	绿球藻属(<i>Chlorococcum</i>)	/21	/143		/63	/10	/292
	刚毛藻属(<i>Cladophora</i>)	/46	/1		/29	/1	/5
	羽枝藻属(<i>Cloniophora</i>)		/2				
	新月藻属(<i>Closterium</i>)	/4			/10	/1	/4
	柱胞鼓藻属(<i>Cylindrocystis</i>)				/1		
	多芒藻属(<i>Golenkinia</i>)	/6	/13				
	盘藻属(<i>Gonium</i>)	/11		/1	/7	/32	/11
	微芒藻属(<i>Micractinium</i>)	/4	/2		/3	/1	/4
	转板藻属(<i>Mougeotia</i>)		/3				
	枝鞘藻属(<i>Oedocladium</i>)					/1	
	卵囊藻属(<i>Oocystis</i>)	/42	/26	/11	/17	/12	/18
	盘星藻属(<i>Pediastrum</i>)		/22				
	平藻属(<i>Pedinomonas</i>)		/4		/1	/4	/2
	栅藻属(<i>Scenedesmus</i>)		/3	/1			
	水绵属(<i>Spirogyra</i>)	/14				/1	/5
	裂丝藻属(<i>Stichococcus</i>)	/1	/1		/1		
	鼓藻属(<i>Cosmarium</i>)				+/		
金藻门(Chrysophyta)	纤维藻属(<i>Ankistrodesmus</i>)			+/			
	单鞭金藻属(<i>Chromulina</i>)	/2	/7		/2	/1	/4
	金变形藻属(<i>Chrysamoeba</i>)		/3				/1
	锥囊藻属(<i>Dinobryon</i>)	/2 973	/869	/149	/4 780	/1 685	/4 706
	金杯藻属(<i>Kephyrion</i>)	/2	/4	/3	/7		/4
	鱼鳞藻属(<i>Mallomonas</i>)	/40	/20	/16	/52	/39	/39
	棕鞭藻属(<i>Ochromonas</i>)	/432	/11	/11	/278	/144	/673
隐藻门(Cryptophyta)	黄群藻属(<i>Synura</i>)	/1	/4		/11	/1	
	蓝隐藻属(<i>Chroomonas</i>)	/84	/89	/202	/75	/28	/18
	隐藻属(<i>Cryptomonas</i>)	/16 662	/25 564	/31 072	/20 085	/9 678	/6 098
黄藻门(Xanthophyta)	角绿藻属(<i>Goniochloris</i>)	/2	/1	/1			
甲藻门(Pyrrophyta)	裸甲藻属(<i>Gymnodinium</i>)				+/		
	拟多甲藻属(<i>Peridiniopsis</i>)	+/					
	多甲藻属(<i>Peridinium</i>)		+/	+/	+/		+/
裸藻门(Euglenophyta)	柄裸藻属(<i>Colacium</i>)					+/	+/
	裸藻属(<i>Euglena</i>)				+/	+/	+/
总计		12/22 866	12/31 109	8/33 960	14/28 250	17/13 054	13/13 851

注:“/”前方的“+”和数字分别表示在某采样断面通过传统方法检测到某属浮游生物物种存在及总计属数,“/”后方的数字表示在某采样断面通过 eDNA 技术检测到对应某属浮游生物物种的序列数,下同。

由表 5 可知:1) 浮游动物平均密度和平均生物量分别为 $0.014\ 33\ \text{万个} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.896\ 43\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。2) 浮游动物密度最高的是 DJT 断面,最低的是 SJ 断面;浮游动物生物量最高的是 MFT 断面,最低的是 QJK 断面。3) 浮游动物组成中桡足类平均密度和平均生物量均为最高,分别为 $0.009\ 13\ \text{万个} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.893\ 22\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;其次是枝角类,平均密度和平均生物量分别为 $0.005\ 07\ \text{万个} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $0.124\ 83\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2.3 多样性指数评价

分别基于传统方法计数结果和 eDNA 技术测序所得序列数计算保护区重庆段浮游生物的多样性指数 H' 和 J ,并结合表 1 来对当地水质状况进行初步评价。由表 6 可知:基于传统方法计数结果计算得到保护区重庆段真核浮游植物 H' 和 J 的平均值分别为 2.869 0 和 0.876 2,浮游动物 H' 和 J 的平均值分别为 2.230 8、0.926 0,对应水质污染类型均为 β 中污染、轻污或无污染。对采样断面按对应样品中真核浮游植物的 H' 值由大到小进行排序,依次为 SJ、SPH、MFT、GZT、QJK、DJT;按 J 值由大到小进行排序,依次为 QJK、SJ、SPH、MFT、GZT、DJT。对采样断面按对应样品中浮游动物的 H' 值由大到小进行排序,依次为 QJK、DJT、GZT、SPH、SJ、MFT;按 J 值由大到小进行排序,依次为 QJK、GZT、SPH、DJT、MFT、SJ。

表 3 各采样断面浮游动物种类组成及序列数
Tab. 3 Composition and sequence number of zooplankton in each sampling section

门(类)	属	物种检测信息					
		MFT 断面	QJK 断面	DJT 断面	GZT 断面	SJ 断面	SPH 断面
轮虫类(Rotifera)	盘网轮虫属(<i>Adineta</i>)		/5	/1	/2		
	晶囊轮虫属(<i>Asplanchna</i>)			+/	+/	+/	
	臂尾轮虫属(<i>Brachionus</i>)					+/	
	巨头轮虫属(<i>Cephalodella</i>)				+/		
	拟聚花轮虫属(<i>Conochiloides</i>)			+/			
	聚花轮虫属(<i>Conochilus</i>)			+/			
	腹尾轮虫属(<i>Gastropus</i>)				+/		
	龟甲轮虫属(<i>Keratella</i>)		+/				+/
	单趾轮虫属(<i>Monostyla</i>)	+/					
	多肢轮虫属(<i>Polyarthra</i>)		+/	+/		+/	
桡足类(Copepoda)	异尾轮虫属(<i>Trichocerca</i>)	+/	+/	+/	+/	+/	+/
	剑水蚤属(<i>Cyclops</i>)	+ /97	+ /75	+ /3	93	+ /31	+ /359
	华哲水蚤属(<i>Sinocalanus</i>)	/116		/14	/1	/23	
	刺剑水蚤属(<i>Acanthocyclops</i>)					+/	
	纺锤水蚤属(<i>Acartia</i>)	+/	+/	+/	+/		
	异足猛水蚤属(<i>Canthocamptus</i>)		+/		+/		
	基齿哲水蚤属(<i>Clausocalanus</i>)				+/	+/	
	真剑水蚤属(<i>Eucyclops</i>)	+/		+/	+/	+/	+/
	异足水蚤属(<i>Hetercope</i>)		+/	+/	+/		+/
	窄腹水蚤属(<i>Limnoithina</i>)					+/	+/
	中剑水蚤属(<i>Mesocyclops</i>)						+/
	无节幼体	+/	+/	+/	+/	+/	+/
	拟剑水蚤属(<i>Paracyclops</i>)	+/		+/	+/		+/
	许水蚤属(<i>Schmackeria</i>)	+/			+/		
	温剑水蚤属(<i>Thermocyclops</i>)	+/			+/	+/	

续表 3

门(类)	属	物种检测信息					
		MFT 断面	QJK 断面	DJT 断面	GZT 断面	SJ 断面	SPH 断面
原生动物门(Protozoa)	表壳虫属(<i>Arcella</i>)	+ /	+ /		+ /23	+ /4	+ /
	楯纤虫属(<i>Aspidisca</i>)	/46			/7		
	膜袋虫属(<i>Cyclidium</i>)	/5	/13	/2	/38	/4	/24
	曲颈虫属(<i>Cyphoderia</i>)	/17	/1		/2		
	蓝环虫属(<i>Cyrtolophosis</i>)	/1	/3			/1	/3
	栉毛虫属(<i>Didinium</i>)	/18	/33	/1	/24	/39	/19
	长颈虫属(<i>Dileptus</i>)		/102	/1		/1	
	累枝虫属(<i>Epistylis</i>)	/8	/5				
	鳞壳虫属(<i>Euglypha</i>)				/71		
	前口虫属(<i>Frontonia</i>)				/10		
	弹跳虫属(<i>Halteria</i>)	/150	/109	/555	/116	/82	/167
	异胞虫属(<i>Heterophrys</i>)	/9	/2	/367	/8	/5	/19
	全列虫属(<i>Holosticha</i>)		/5		/5	/7	
	斜叶虫属(<i>Loxophyllum</i>)	/25			/16	/1	/4
	草履虫属(<i>Paramecium</i>)	/13	/176		/396		/1
	斜毛虫属(<i>Plagiopyla</i>)					/2	
	喇叭虫属(<i>Stentor</i>)	/295	/123	/9	/1 068	/134	/685
	侠盗虫属(<i>Strobilidium</i>)			+ /			/120
	四膜虫属(<i>Tetrahymena</i>)					/63	
	筒壳虫属(<i>Tintinnidium</i>)	/355	/299	/2 318	/95	/50	/152
	拟铃虫属(<i>Tintinnopsis</i>)	/3	/15	/111	/2	/15	
	三足虫属(<i>Trinema</i>)	/8			/2	/2	
	钟虫属(<i>Vorticella</i>)	/93	/86	/4	/11	/2	/53
	匣壳虫属(<i>Centropyxis</i>)		+ /				+ /
	砂壳虫属(<i>Difflugia</i>)	+ /	+ /	+ /		+ /	
	梨壳虫属(<i>Nebela</i>)					+ /	
	曲颈虫属(<i>Cyphoderia</i>)	+ /					
枝角类(Cladocera)	溞属(<i>Daphnia</i>)	/1	/2	/1		/1	/6
	尖额溞(<i>Alona</i>)		+ /		+ /	+ /	
	象鼻溞属(<i>Bosmina</i>)	+ /	+ /	+ /	+ /	+ /	+ /
	基合溞属(<i>Bosminopsis</i>)			+ /	+ /		+ /
	弯尾溞属(<i>Camptocercus</i>)			+ /			
	盘肠溞属(<i>Chydorus</i>)		+ /				
	秀体溞属(<i>Diaphanosoma</i>)	+ /	+ /	+ /	+ /		+ /
	异尖额溞属(<i>Disparalona</i>)		+ /	+ /	+ /	+ /	+ /
总计		14/1 260	16/1 054	18/3 387	19/1 990	17/467	15/1 612

注:无节幼体在本研究中被视为桡足类的 1 个属。

表 4 各采样断面真核浮游植物密度和生物量
Tab. 4 The phytoplankton density and biomass of each sampling point

采样 断面 代号	硅藻门		绿藻门		甲藻门		裸藻门		合计	
	密度/ (万个·L ⁻¹)	生物量/ (mg·L ⁻¹)	密度/ (万个·L ⁻¹)	生物量/ (mg·L ⁻¹)	密度/ (万个·L ⁻¹)	生物量/ (mg·L ⁻¹)	密度/ (万个·L ⁻¹)	生物量/ (mg·L ⁻¹)	密度/ (万个·L ⁻¹)	生物量/ (mg·L ⁻¹)
MFT	7.618 4	0.174 4	0.000 0	0.000 0	0.119 0	0.004 1	0.000 0	0.000 0	7.737 4	0.178 5
QJK	3.927 9	0.041 7	0.000 0	0.000 0	0.476 2	0.013 8	0.000 0	0.000 0	4.404 1	0.055 5
DJT	3.912 8	0.052 6	0.474 3	0.000 5	0.118 6	0.003 4	0.000 0	0.000 0	4.505 7	0.056 5
GZT	11.713 6	0.157 6	0.119 5	0.001 3	0.239 0	0.005 2	0.000 0	0.000 0	12.072 1	0.164 1
SJ	13.689 4	0.111 8	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.000 0	0.357 0	0.001 0	14.046 4	0.112 8
SPH	9.166 1	0.116 3	0.000 0	0.000 0	0.119 0	0.003 5	0.714 2	0.002 7	9.999 3	0.122 5

表 5 各采样断面浮游动物密度和生物量
Tab. 5 The zooplankton density and biomass of each sampling point

采样 断面 代号	桡足类		枝角类		轮虫类		原生动物门		合计	
	密度/ (万个·L ⁻¹)	生物量/ (mg·L ⁻¹)	密度/ (万个·L ⁻¹)	生物量/ (mg·L ⁻¹)	密度/ (万个·L ⁻¹)	生物量/ (mg·L ⁻¹)	密度/ (万个·L ⁻¹)	生物量/ (mg·L ⁻¹)	密度/ (万个·L ⁻¹)	生物量/ (mg·L ⁻¹)
MFT	0.010 8	1.012 7	0.000 8	0.084 4	0.000 0	0.000 0	0.000 8	0.000 0	0.012 4	1.097 1
QJK	0.006 8	0.590 5	0.006 1	0.081 8	0.000 0	0.000 0	0.001 5	0.005 8	0.014 4	0.678 1
DJT	0.006 8	0.597 1	0.012 1	0.148 2	0.000 8	0.049 3	0.000 0	0.000 0	0.019 7	0.794 6
GZT	0.009 1	0.852 2	0.002 3	0.125 4	0.000 8	0.004 0	0.000 0	0.000 0	0.012 2	0.981 6
SJ	0.012 9	1.637 7	0.003 8	0.142 8	0.000 0	0.000 0	0.000 8	0.011 6	0.012 1	0.981 5
SPH	0.008 4	0.669 1	0.005 3	0.166 4	0.000 0	0.000 0	0.001 5	0.010 2	0.015 2	0.845 7

表 6 还显示:基于 eDNA 技术测序所得序列数结果计算得到保护区重庆段真核浮游植物 H' 和 J 的平均值分别为 5.229 7 和 0.552 7,浮游动物 H' 和 J 的平均值分别为 4.280 5 和 0.704 1,对应水质污染类型均为轻污或无污染。对采样断面按对应样品中真核浮游植物的 H' 值由大到小进行排序,依次为 SPH、SJ、MFT、GZT、QJK、DJT;按 J 值由大到小进行排序,依次为 SPH、SJ、GZT、MFT、DJT、QJK。对采样断面按对应样品中浮游动物的 H' 值由大到小进行排序,依次为 QJK、SJ、MFT、GZT、SPH、DJT,按 J 值由大到小进行排序,依次为 SJ、QJK、MFT、SPH、GZT、DJT。

表 6 浮游生物多样性指数
Tab. 6 Plankton biodiversity index

采样断面代号	真核浮游植物多样性指数				浮游动物多样性指数			
	传统方法		eDNA 技术		传统方法		eDNA 技术	
	H'	J	H'	JH'	J	H'	J	
MFT	2.934 9	0.880 8	5.281 3	0.556 1	1.986 7	0.904 2	4.688 6	0.727 7
QJK	2.816 5	0.925 1	4.872 4	0.508 3	2.479 1	0.966 5	4.879 6	0.778 7
DJT	2.153 6	0.816 0	4.662 1	0.509 5	2.321 8	0.934 4	2.853 0	0.513 6
GZT	2.830 3	0.824 2	5.412 6	0.557 2	2.274 0	0.948 3	4.297 7	0.696 6
SJ	3.460 9	0.914 6	5.286 3	0.566 8	2.072 8	0.864 4	4.702 8	0.789 8
SPH	3.017 8	0.896 2	5.863 2	0.618 4	2.250 3	0.938 4	4.261 1	0.718 5

此外,基于 eDNA 技术得到的 H' 值均高于基于传统方法得到的 H' 值(图 4),而基于 eDNA 技术得到的 J 值均低于基于传统方法得到的 J 值(图 5)。对于真核浮游植物而言,基于 eDNA 技术得到的多样性指数与基于传统方法得到的多样性指数在各采样断面均展现出了较大差异;对于浮游动物而言,基于 2 种方法得到的多样性指数在大部分采样断面中差异较大,仅在 DJT 和 SJ 断面中的差异较小。

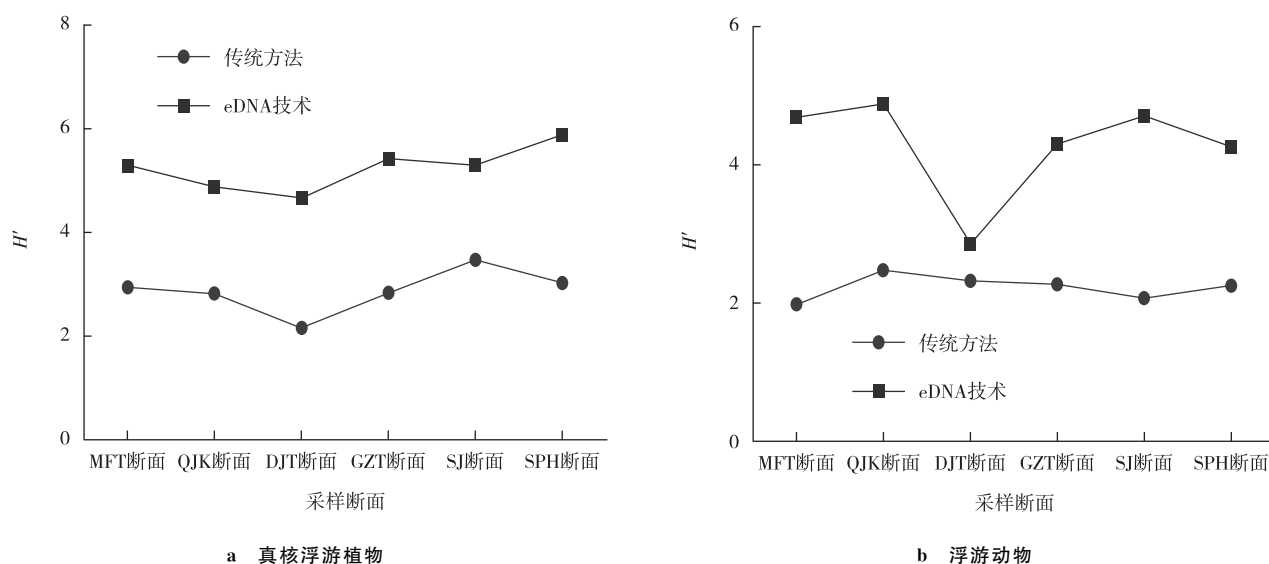


图 4 基于传统方法和 eDNA 技术所得 H' 值的比较

Fig. 4 Comparison of H' values obtained based on traditional methods and eDNA technology

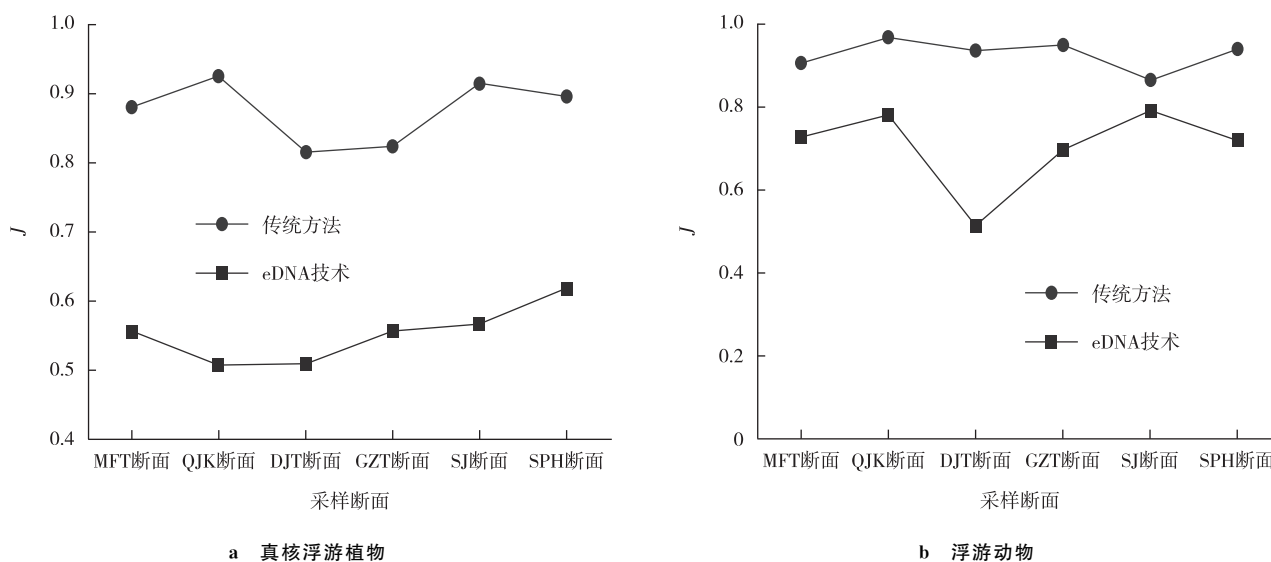


图 5 基于传统方法和 eDNA 技术所得 J 值的比较

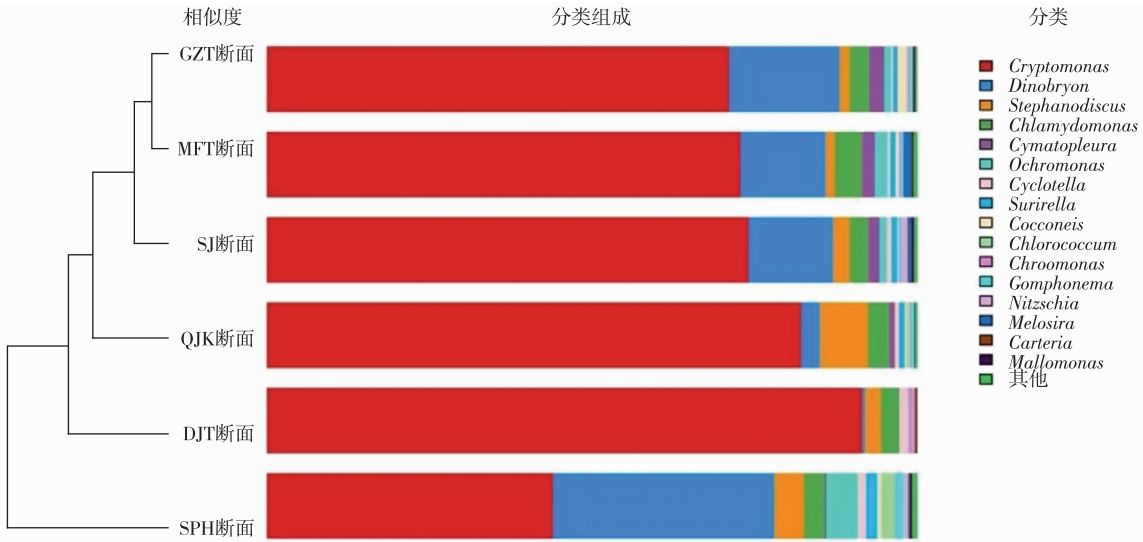
Fig. 5 Comparison of J values obtained based on traditional methods and eDNA technology

2.2.4 Beta 多样性

本研究基于各采样断面浮游生物的序列丰度分别对真核浮游植物和浮游动物进行层次聚类分析与物种组成分析。基于属水平的物种组成情况显示各采样断面的真核浮游植物组成结构具有一定相似性,其中隐藻属在各样断面均展现出较高的序列丰度;从聚类分析结果来看,GZT 和 MFT 断面之间具有相似的真核浮游植物组成,而 SPH 与其他断面之间的真核浮游植物组成差异较大(图 6)。

由图 7 可知:各采样断面的浮游动物组成结构在属水平上具有一定差异,其中 DJT 断面中筒壳虫属较其他断面而言展现出较高的序列丰度,而 GZT、SJ 和 SPH 断面中序列丰度较高的为喇叭虫属;此外从聚类分析结果

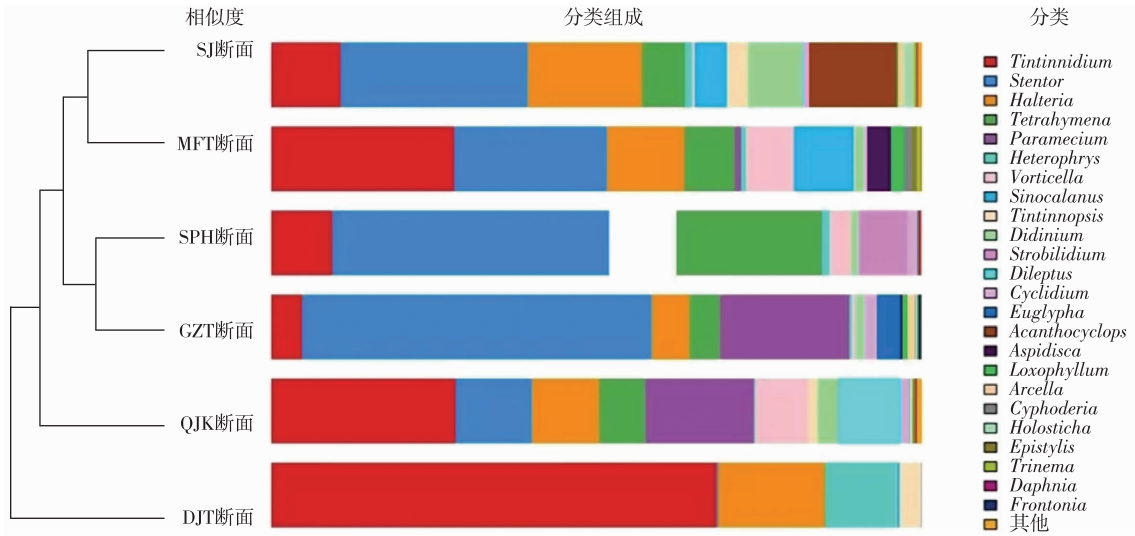
可知,DJT 与其他断面的浮游动物组成差异较大,SJ 与 MFT 断面具有相似的浮游动物组成,SPH 与 GZT 断面的浮游动物组成也较为相似。



注:各真核浮游植物属拉丁学名对应的中文学名见表 2。

图 6 基于 Bray-Curtis 距离矩阵的聚类分析与物种组成分析组合图(真核浮游植物)

Fig. 6 Combination graph of cluster analysis based on Bray-Curtis distance matrix and species composition analysis (eukaryotic phytoplankton)



注:各浮游动物属拉丁学名对应的中文学名见表 3。

图 7 基于 Bray-Curtis 距离矩阵的聚类分析与物种组成分析组合图(浮游动物)

Fig. 7 Combination graph of cluster analysis based on Bray-Curtis distance matrix and species composition analysis (zooplankton)

3 讨论

3.1 保护区重庆段浮游生物多样性及群落结构特征

此次调查在保护区重庆段共鉴定出真核浮游生物 116 属,其中真核浮游植物 56 属、浮游动物 60 属,主要以绿藻门、硅藻门和原生动物门为主,与余海英^[36]和刘晓娟等人^[37]对该区域的浮游生物调查结果相一致。研究表明:在富营养型水体中,浮游植物主要以绿藻门、蓝藻门和裸藻门为主;中营养型水体主要以硅藻门、隐藻门和绿藻门的鼓藻属为优势;在贫营养水体中,主要以金藻门藻类为主^[38]。本次调查的真核浮游植物以绿藻门和硅藻门为主,则初步判断保护区重庆段水体处于中富营养型状态。

通过传统方法得到的浮游生物密度和生物量表明保护区重庆段各采样断面水体浮游生物密度和生物量差异较为明显。在 QJK 断面水体中,浮游生物的密度和生物量均为最低。这可能与该采样断面的地理环境有一定的关系:由于 QJK 断面处于长江干流和綦江支流的交汇口,河底含砂量较大,水体营养贫乏,因此在一定程度上造成了浮游植物的密度和生物量较低^[39]。而 SJ、MFT、DJT 等断面处于干流回水区,流速缓慢,两岸地势平坦,人口密集,农业活动产生的面源污染随着雨水冲刷和地表径流流入长江水体,营养丰富,导致水体浮游生物的密度和生物量相对较高。

本研究通过 eDNA 技术测序所得序列数分别对保护区重庆段真核浮游植物和浮游动物进行了层次聚类分析与物种组成分析,结果发现各采样断面的真核浮游植物组成结构在属水平上具有一定相似性,其中隐藻属在各采样断面均展现出了较高的序列丰度。隐藻属种类较少,通常在温度适宜且有机物和含氮化合物丰富的水体中大量繁殖,可作为鱼类饵料中的优势浮游植物。本次采样时间在 3 月底,水体温度开始回升,这就可能使得各采样断面中隐藻属序列丰度较高。聚类分析表明 SPH 与其他断面具有明显不同的真核浮游植物种类组成,这可能是由于 SPH 断面位于赵家中坝内浩附近,该片水域人为活动的干扰较少;而其他断面岸边多滩涂或码头,人为活动较为频繁,在一定程度上影响了水体营养状态。对于浮游动物而言,DJT 断面中筒壳虫属较其他断面而言展现出较高的序列丰度,同时筒壳虫属在该采样断面所占序列丰度比重也最大,因此聚类分析表明 DJT 断面具有明显不同于其他断面的浮游动物组成结构。

在 Alpha 多样性方面,本研究基于传统方法计数结果和 eDNA 技术测序所得序列数分别计算了多样性指数 H' 和 J ,其中基于 eDNA 技术得到的真核浮游生物 H' 值高于基于传统方法得到的真核浮游生物 H' 值,主要原因在于通过 eDNA 技术能检出更多的浮游生物序列,且序列基数较大,样本序列数与总序列数比值高,代入计算公式中后的对数值增大。而基于 eDNA 技术得到的真核浮游生物 J 值低于基于传统方法得到的真核浮游生物 J 值则是由于 J 值的计算是基于指数化后的 H' 和检出物种数,而这有可能与检出物种数的差异有一定关系。

3.2 基于浮游生物多样性指数水质评价

多样性指数是评价水体是否健康的一个重要的指标,在一定程度上能判定湖泊和河流的营养状况、富营养化程度和演变趋势^[40-42]。董奎等人^[43]对四方湖湿地自然保护区进行浮游植物群落特征分析及水质评价时,以生物多样性指数作为评判标准,认为这一保护区水体总体处于贫营养型至中营养型状态。吴卫菊等人^[44]根据生物多样性指数判定梁子湖水质呈现中度污染状态。朱浩等人^[45]对鲃溪淀的浮游动物群落特征及水质进行研究,并根据多样性指数与水体污染程度的关系判定研究水域处于中度污染状态。本研究利用 2 种方法得到的多样性指数分别对保护区重庆段水质状况进行初步评价,其中利用 eDNA 技术得到的多样性指数均值处于较高水平,显示该江段的水质为轻污或无污染;而利用传统方法所获得的 H' 值较低,水质评价为 β 中污染,但基于该方法获得的 J 值则显示水质污染类型为轻污或无污染。总体来看,基于传统方法和 eDNA 技术的水质评价结果具有一定一致性。 H' 值的计算受多方面的影响,当物种种类多且数量分布均匀时, H' 值就高。在本研究中,基于传统方法的调查结果表明真核浮游植物和浮游动物在各采样断面的分布较不均匀,且数量差异较大,所以在一定程度上就造成了 H' 值偏低。因此,综合 2 种方法的评价结果后可以初步判定保护区重庆段水质为 β 中污染至轻污或无污染。

3.3 eDNA 技术在浮游生物资源监测中的应用前景

eDNA 技术为淡水浮游动物资源监测、物种多样性评价等提供了新的方法,具有广阔的应用前景^[46-48]。相比传统的监测方法,运用 eDNA 技术监测浮游生物具有以下主要优势:不依赖物种鉴定专家,减少了物种鉴定中的主观差异;灵敏度高,能鉴定出显微镜下难以发现的物种;可大批量检测样品,比传统的物种鉴定节约时间与人力。但目前运用 eDNA 技术进行浮游生物资源监测仍存在一些局限,例如缺乏技术标准规范、少数近缘物种因序列相似而难以区分、无法反映浮游生物的生理状态和生长发育阶段等生物学特征等。

比较 2 种方法的调查结果,利用传统方法鉴定出的真核浮游植物中 46% 的属能用 eDNA 技术鉴定出来,而利用 eDNA 技术鉴定出的大部分类别(约 74% 的属)却未被传统方法鉴定出来;对于浮游动物而言,2 种方法同时鉴定出来的属较少,仅有 3 属。2 种方法检测结果的差异可能是由于目前 eDNA 技术的引物特性导致某些浮游生物物种序列无法被扩增,或对比的公共数据库所含物种信息不完整,扩增出的序列无法对比数据库中已知序列,从而导致 eDNA 结果的“假阴性”。另一方面,利用传统方法进行物种鉴定需要依靠专业人员,因此在鉴定

过程中容易出现一定的主观偏差,进而导致鉴定结果出现“假阳性”或“假阴性”。因此,在现阶段的淡水浮游生物资源监测中,可根据监测任务需要尝试将 eDNA 技术与传统方法结合起来使用。

4 结束语

本研究在应用 eDNA 技术和传统方法对保护区重庆段浮游生物的监测中,共检出真核浮游生物 116 属,其中真核浮游植物 56 属、浮游动物 60 属,主要为绿藻门、硅藻门和原生动物门浮游生物。本研究验证了 eDNA 技术在对淡水浮游生物群落监测时具有一定适用性。基于生物多样性指数对保护区重庆段进行水质评价,结果表明该江段水质污染类型为 β 中污染至轻污或无污染。在现阶段的淡水浮游生物资源监测中,可根据监测任务的需要,尝试与传统监测方法结合使用,用于快速调查淡水浮游生物的多样性组成及分布等,同时也为水质监测和评价提供一定参考。

参考文献:

- [1] 陈红,刘清潘,潘建雄,等. 灞河城市段浮游生物群落结构时空变化及其环境因子关系[J]. 生态学报,2019,39(1):173-184.
CHEN H, LIU Q P, PAN J Q, et al. Spatial and temporal variation of the plankton community and its relationship with environmental factors in the city section of the Ba River[J]. Acta Ecologica Sinica, 2019, 39(1): 173-184.
- [2] 董雅欠,赵文,季世琛,等. 北京潮白河水系浮游动物群落结构特征及水质评价[J]. 大连海洋大学学报,2020,35(3):424-431.
DONG Y Q, ZHAO W, JI S C, et al. Community structure of zooplankton and water quality evaluation in Chaobai River system in Beijing[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2020, 35(3): 424-431.
- [3] LEPISTÖ L, HOLOPAINEN A-L, VUORISTO H. Type-specific and indicator taxa of phytoplankton as a quality criterion for assessing the ecological status of Finnish boreal lakes[J]. Limnologia, 2004, 34(3): 236-248.
- [4] 季世琛,李媛,赵文,等. 碧流河水库及其流域河流浮游动物的群落结构研究[J]. 生物学杂志,2018,35(6):72-77.
JI S C, LI Y, ZHAO W, et al. Study on the community structure of zooplankton in Biliuhe Reservoir and basin[J]. Journal of Biology, 2018, 35(6): 72-77.
- [5] 王海邻,刘玉飞,任玉芬,等. 北京市河流秋季浮游动物群落特征分析[J]. 环境科学,2019,40(8):3568-3576.
WANG H Q, LIU Y F, REN Y F, et al. Analysis of river zooplankton community characteristics in autumn in Beijing[J]. Environmental Science, 2019, 40(8): 3568-3576.
- [6] 陶敏,王永明,谢碧文,等. 沱江浮游生物群落时空分布及相关环境因子分析[J]. 水生生物学报,2016,40(2):301-312.
TAO M, WANG Y M, XIE B W, et al. Spatial-temporal distribution of plankton and driving environmental factors in the Tuojiang River [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2016, 40(2): 301-312.
- [7] 王远飞,周存通,赵增辉,等. 亚热带水库浮游植物季节动态及其与环境因子的关系[J]. 生态学报,2021,41(10):4010-4022.
WANG Y F, ZHOU C T, ZHAO Z H, et al. Seasonal dynamics of phytoplankton and its relationship with the environmental factors in subtropical reservoirs[J]. Acta Ecologica Sinica, 2021, 41(10): 4010-4022.
- [8] 何滔,魏耀东,卢群,等. 长江上游珍稀特有鱼类自然保护区重庆段渔业资源现状调查[J]. 水产研究,2018,5(2):85-97.
HE T, WEI Y D, LU Q, et al. Status study on fishery resources in rare and endemic fish national nature reserve in the Chongqing of Yangtze River[J]. Open Journal of Fisheries Research, 2018, 5(2): 85-97.
- [9] 孔令惠,蔡庆华,徐耀阳,等. 丹江口水库浮游轮虫群落季节变动特征及其与环境因子的关系[J]. 湖泊科学,2010,22(6):941-949.
KONG L H, CAI Q H, XU Y Y, et al. Seasonal change features of rotifer community and its correlation with environmental factors in Danjiangkou Reservoir[J]. Journal of Lake Sciences, 2010, 22(6): 941-949.
- [10] 王英华,陈雷,牛远,等. 丹江口水库浮游植物时空变化特征[J]. 湖泊科学,2016,28(5):1057-1065.
WANG Y H, CHEN L, NIU Y, et al. Spatio-temporal variation in phytoplankton community and its influencing factors in Danjiangkou Reservoir[J]. Journal of Lake Sciences, 2016, 28(5): 1057-1065.
- [11] 周梦,唐涛,杨明哲,等. 南水北调中线干线鱼类资源调查研究[J]. 中国水利,2019,(14):33-36.
ZHOU M, TANG T, YANG M Z, et al. Investigations and studies on fishery resources of main canal of South-to-North Water Diversion Middle Route Project[J]. China Water Resources, 2019(14): 33-36.
- [12] 池仕运,赵先富,高少波,等. 丹江口水库秋季底栖动物群落状态和空间分布及其与环境因子的关系[J]. 生态学报,2021,41(3):1229-1241.

- CHI S Y, ZHAO X F, GAO S B, et al. The spatial distribution pattern of autumn macroinvertebrates in relation to environmental factors in Danjiangkou Reservoir[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2021, 41(3): 1229-1241.
- [13] HU Y X, LIU X D, XING W Y, et al. Marker gene analysis reveals the spatial and seasonal variations in the eukaryotic phytoplankton community composition in the Yangtze River, Three Gorges Reservoir, China[J]. *Journal of Plankton Research*, 2019, 41(6): 835-848.
- [14] 胡愈忻, 彭玉, 李瑞雯, 等. 基于环境 DNA 宏条形码的丹江口水库浮游生物多样性及群落特征[J]. *湖泊科学*, 2021, 33(6): 1650-1659.
- HU Y X, PENG Y, LI R W, et al. Plankton diversity and community characteristics in Danjiangkou Reservoir based on environmental DNA metabarcoding[J]. *Journal of Lake Sciences*, 2021, 33(6): 1650-1659.
- [15] 徐念, 熊美华, 邵科, 等. 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[J]. *环境科学研究*, 2020, 33(5): 1187-1196.
- XU N, XIONG M H, SHAO K, et al. Preliminary study on environmental DNA metabarcoding for detecting biodiversity in the middle and lower reaches of the Yangtze River[J]. *Research of Environmental Sciences*, 2020, 33(5): 1187-1196.
- [16] THOMSEN P F, WILLERSLEV E. Environmental DNA—an emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity[J]. *Biological Conservation*, 2015, 183: 4-18.
- [17] FRANCESCO F G, CLAUDE M, FRANC P, et al. Species detection using environmental DNA from water samples[J]. *Biology Letters*, 2008, 4(4): 423-425.
- [18] YAMAMOTO S, MASUDA R, SATO Y, et al. Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea[J]. *Scientific reports*, 2017, 7: 40368.
- [19] 王晨, 陶孟, 李爱民, 等. 基于环境 DNA 宏条形码技术的秦淮河生物多样性研究[J]. *生态学报*, 2022, 42(2): 611-624.
- WANG C, TAO M, LI A M, et al. Research on the biodiversity of Qinhuai River based on environmental DNA metabarcoding[J]. *Journal of Ecology*, 2022, 42(2): 611-624.
- [20] VALENTINI A, TABERLET P, MIAUD C, et al. Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding[J]. *Molecular Ecology*, 2016, 25(4): 929-942.
- [21] GIBSON J F, SHOKRALLA S, CURRY C, et al. Large-scale biomonitoring of remote and threatened ecosystems via high-throughput sequencing[J]. *PloS one*, 2015, 10(10): e0138432.
- [22] ANDRUSZKIEWICZ E A, STARKS H A, CHAVEZ F P, et al. Biomonitoring of marine vertebrates in Monterey Bay using eDNA metabarcoding[J]. *Plos one*, 2017, 12(4): e0176343.
- [23] 罗加山. 利用环境 DNA 探究滇中高原湖泊的鱼类多样性[D]. 昆明: 云南大学, 2019.
- LUO J S. Assessing fish diversity in plateau lakes in the central Yunnan Province using environmental DNA[J]. Kunming: Yunnan University, 2019.
- [24] 舒璐, 林佳艳, 徐源, 等. 基于环境 DNA 宏条形码的洱海鱼类多样性研究[J]. *水生生物学报*, 2020, 44(5): 1080-1086.
- XU L, LIN J Y, XU Y, et al. Investigating the fish diversity in Erhai Lake based on environmental DNA macrobarcode[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, 44(5): 1080-1086.
- [25] 国家环境保护总局. 水和废水监测分析方法[M]. 4 版. 北京: 中国环境科学出版社, 2002.
- State Environmental Protection Administration of China. Methods for water and waste water monitoring and analysis[M]. 4th edition. Beijing: China Environmental Science Press, 2002.
- [26] 陈大庆. 长江水生生物资源监测手册[M]. 北京: 中国农业出版社, 2021.
- CHEN D Q. Handbook for monitoring aquatic biological resources in the Yangtze River[M]. Beijing: China Agricultural Press, 2021.
- [27] STOECK T, BASS D, NEBEL M, et al. Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water[J]. *Molecular Ecology*, 2010, 19(Suppl.): 21-31.
- [28] 胡鸿均, 魏印心. 中国淡水藻类: 系统分类及生态[M]. 北京: 科学出版社, 2006.
- HU H J, WEI Y X. The freshwater algae of China: systematics, taxonomy and ecology[M]. Beijing: Science Press, 2006.
- [29] 韩茂森, 束蕴芳. 中国淡水生物图谱[M]. 北京: 海洋出版社, 1995.
- HAN M S, SHU Y F. Atlas of freshwater organisms in China[M]. Beijing: Ocean Press, 1995.
- [30] 翁建中, 徐恒省. 中国常见淡水浮游藻类图谱[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2010.
- WENG J Z, XU H S. Atlas of common freshwater planktonic algae in China[M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology

Press,2010.

- [31] 章宗涉,黄祥飞.淡水浮游生物研究方法[M].北京:科学出版社,1991.
ZHANG Z S,HUANG X F. Research methods for freshwater plankton[M]. Beijing:Science Press,1991.
- [32] 马永红,曾燊,任丽萍,等.嘉陵江四川段藻类植物群落结构及水质评价[J].应用生态学报,2012,23(9):2573-2579.
MA Y H,ZENG Y,REN L P,et al. Community structure of phycophyta and evaluation of water quality in Sichuan section of Jialing River[J]. Journal of Applied Ecology,2012,23(9):2573-2579.
- [33] SHANNON C E. A mathematical theory of communications[J]. The Bell System Technical Journal,1948(27):379-423.
- [34] SLOBODKIN L B. Pathfinding in ecology (book reviews:perspectives in ecological theory)[J]. Science,1969,164(3881):817.
- [35] PIELOU E C. Species-diversity and pattern-diversity in the study of ecological succession[J]. Journal of Theoretical Biology,1966,10(2):370-383.
- [36] 余海英.长江上游珍稀、特有鱼类国家级自然保护区浮游植物和浮游动物种类分布和数量研究[D].重庆:西南大学,2008.
YU H Y. Study on species distribution and quantity of phytoplankton and zooplankton in the rare and unique fish national nature reserve of on Yangtze Upriver[D]. Chongqing:Southwest University,2008.
- [37] 刘晓娟,李云峰,茹辉军,等.长江上游珍稀、特有鱼类国家级自然保护区干流段浮游植物群落结构的年度变化[J].淡水渔业,2015,45(1):52-57.
LIU X J,LI Y F,RU H J,et al. Annual changes of phytoplankton community structure in the mainstream of the national nature reserve for rare and endemic fishes in the upper Yangtze River[J]. Freshwater Fishery,2015,45(1):52-57.
- [38] NEGO A I,de HOYOS C,VEGA J. Phytoplankton structure and dynamics in Lake Sanabria and Valparaíso Reservoir (NW Spain)[J]. Hydrobiologia,2000,424(1/2/3):25-37.
- [39] 江源,王博,杨浩春,等.东江干流浮游植物群落结构特征及与水质的关系[J].生态环境学报,2011,20(11):1700-1705.
JIANG Y,WANG B,YANG H C,et al. Community structure of phytoplankton and its relation with water quality in Dongjiang River[J]. Journal of Ecological Environment,2011,20(11):1700-1705.
- [40] 王晓清,曾亚英,吴含含,等.湘江干流浮游生物群落结构及水质状况分析[J].水生生物学报,2013,37(3):488-494.
WANG X Q,ZENG Y Y,WU H H,et al. Investigation on plankton community composition and water quality state in the mainstream of Xiangjiang River[J]. Acta Hydrobiologica Sinica,2013,37(3):488-494.
- [41] 李梦军,谢春华,张小立,等.黄石水库浮游生物资源调查及多样性分析[J].当代水产,2020,45(8):72-73.
LI M J,XIE C H,ZHANG X L,et al. Investigation and diversity analysis of plankton resources in Huangshi Reservoir[J]. Current Fisheries,2020,45(8):72-73.
- [42] 罗杨,程如丽,王梦,等.普里河浮游生物群落结构、生物多样性及鱼类资源现状[J].重庆师范大学学报(自然科学版),2023,40(2):54-64.
LUO Y,CHENG R L,WANG M,et al. Community structure and biodiversity of plankton and fish resources of the Puli River [J]. Journal of Chongqing Normal University (Natural Science),2023,40(2):54-64.
- [43] 董奎,李梦如,杨悦,等.四方湖湿地自然保护区春季浮游植物群落特征及水质评价[J].现代农业科技,2021(6):133-136.
DONG K,LI M R,YANG Y,et al. Assessment of phytoplankton community characteristics and water quality of Sifanghu wetland nature reserve in spring[J]. Modern Agricultural Science and Technology,2021(6):133-136.
- [44] 吴卫菊,王玲玲,张斌,等.梁子湖水生生物多样性及水质评价研究[J].环境科学与技术,2014,37(10):199-204.
WU W J,WANG L L,ZHANG B,et al. Investigation on biodiversity of aquatic organisms and water quality in Liangzi Lake [J]. Environmental Science & Technology,2014,37(10):199-204.
- [45] 朱浩,刘兴国,陈晓龙,等.鲢鳙浮游动物群落特征及水质评价[J].水生生物学报,2020,44(6):1313-1321.
ZHU H,LIU X G,CHEN X L,et al. The characteristics of zooplanktonand community and water quality in te Shihoudian Lake [J]. Acta Hydrobiologica Sinica,2020,44(6):1313-1321.
- [46] AMARAL-ZETTLER L A,McCLIMENT E A,DUCKLOW H W,et al. A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA genes[J]. PLoS one,2009,4(7):e6372.
- [47] FONSECA V G,CARVALHO G R,SUNG W,et al. Second-generation environmental sequencing unmasks marine metazoan biodiversity[J]. Nature Communications,2010,1(7):98.
- [48] ABAD D,ALBAINAL A,AGUIRRE M,et al. Is metabarcoding suitable for estuarine plankton monitoring? a comparative study with microscopy[J]. Marine Biology,2016,163(7):149.

Resources, Environment and Ecology in Three Gorges Area**Study on Plankton Diversity and Community Structure Characteristics of
the Rare and Endemic Fish National Nature Reserve in
the Upper Yangtze River in Chongqing Section**

SHEN Yanjun, ZHANG Yufeng, WANG Meng, LI Yingwen

(Laboratory of Water Ecological Health and Environmental Safety,
Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China)

Abstract: In order to understand the diversity and community characteristics of the plankton community in the Rare and Endemic Fish National Nature Reserve in the Upper Yangtze River in Chongqing Section, six sampling sections were set up in this river section for sample collection in March 2021. The diversity and community structure characteristics of the plankton community in this section of the river were investigated by combining the environmental DNA technology (eDNA technology) and the traditional morphological identification methods (traditional methods). The results showed that: 1) 118 genera of eukaryotic zooplankton were detected in all the samples, among which 7 phyla and 62 genera of eukaryotic phytoplankton were detected, mainly Chlorophyta and Bacillariophyta algae; and 4 groups and 56 genera of zooplankton were detected, mainly Protozoa. 2) The average density of eukaryotic phytoplankton was $8.794\ 2 \times 10^4$ individuals $\cdot L^{-1}$ with an average biomass of $0.114\ 98\ mg \cdot L^{-1}$; while the average density of zooplankton was $0.014\ 33 \times 10^4$ individuals $\cdot L^{-1}$ with an average biomass is $0.896\ 43\ mg \cdot L^{-1}$. 3) The average Shannon-Wiener diversity index of phytoplankton and zooplankton calculated by traditional method were 2.869 0 and 2.230 8, and the mean values of Pielou evenness index were 0.876 2 and 0.926 0. The mean values of the above two indices calculated based on the number of eDNA technology sequences were 5.229 7 and 4.280 5 for phytoplankton in each sampling section, and 0.552 7 and 0.704 1 for zooplankton. The biodiversity index revealed that the water quality in the Chongqing section of the reserve is currently in a state of β -moderate pollution to light pollution or no pollution. Overall, the results suggested that eDNA technology can be combined with traditional methods to explore the characteristics of plankton diversity and community structure in monitoring and evaluating freshwater plankton resources at this stage.

Keywords: plankton; diversity; 18S rRNA; environmental DNA; the upper Yangtze River

(责任编辑 方 兴)