

基于池塘模型的鱼类 eDNA 序列相对丰度研究*

周鑫鑫¹, 张玉凤¹, 李清华¹, 秦强², 李英文¹, 沈彦君¹

(1. 重庆师范大学 生命科学学院 水生态健康与环境安全实验室, 重庆 401331;

2. 西华师范大学 环境科学与工程学院, 四川 南充 637009)

摘要:为考察池塘模型下鱼类的环境 DNA(environmental DNA, eDNA)序列相对丰度与个体数量的关系,于 2022 年 9 月在长、宽、深分别为 200、100、2 m 的池塘中按比例暂养 100 尾胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)、800 尾长吻鮠(*Leiocassis longirostris*)、1 000 尾厚颌鲂(*Megalobrama pellegrini*)和 2 500 尾中华倒刺鲃(*Spinibarbus sinensis*)10 d 后,于该养殖池塘中设置 15 个采样点,以鱼类线粒体 12S rRNA 基因为标记,通过水样采集、过滤、eDNA 提取、PCR 扩增、高通量测序、生物信息学分析等一系列标准化分析流程来探究上述 4 种鱼类个体数量和 eDNA 序列相对丰度的关系。结果显示:1) 在池塘模型下检测到胭脂鱼的 eDNA 序列相对丰度最低,为 3 970 条;中华倒刺鲃的 eDNA 序列相对丰度最高,为 687 895 条。2) 4 种鱼类的 eDNA 序列相对丰度和个体数量呈正向趋势。上述研究结果可为后续将 eDNA 技术应用于自然河流系统中鱼类种群丰度的评估工作提供科学依据。

关键词:环境 DNA;个体数量;序列相对丰度

中图分类号:Q175

文献标志码:A

文章编号:1672-6693(2024)05-0043-07

生物体通过多种方式释放到土壤、水体、空气等环境中的 DNA 总称为环境 DNA(environmental DNA, eDNA)^[1-3],而从环境样本中收集、提取生物体释放的 DNA 片段并利用测序技术对这些 DNA 片段进行定性或定量分析的方法被称为 eDNA 技术^[4]。2008 年, Ficetola 等人^[5]首次基于 eDNA 技术在池塘中检测出入侵物种美国牛蛙(*Rana catesbeiana*)。目前, eDNA 技术已在水生生物学和生态学领域被广泛应用,例如:金珂等人^[6]利用该技术检测出太湖流域的 107 种底栖动物; Tillotson 等人^[7]的研究表明 eDNA 浓度与鲑鱼数量密切相关;程如丽等人^[8]利用该技术得出了鱼类的多样性和种类结构受梯级水电站的长期阻隔作用影响的研究结果。相较于传统方法, eDNA 技术的出现为相关研究提供了一条新路径;该技术具有非侵入性、敏感性、不受天气影响等特点,功能强大,经济高效^[9]。但 eDNA 技术也存在一定缺陷,如易被污染、易出现假阳性或假阴性结果等^[10]。

渔业管理需要可靠的数据进行鱼类资源调查及种群评估,而评估种群丰度是其中常见的方式之一^[11]。对池塘、湖泊以及水箱的调查结果表明, eDNA 技术可用于评估种群丰度^[12-14]。将 eDNA 技术结合到渔业管理中可帮助人们进行鱼类种群监测,并能够及早发现鱼类种群丰度的变化^[15]。但是,现有的评估方法对种群内个体数量极小的物种无法开展有效工作^[16]。同时,由于估计丰度的不确定性,特别是对于鱼类等水生生物,测试 eDNA 能否作为评估物种丰度的可靠指标仍是一项技术挑战,且缺乏支持 eDNA 序列相对丰度与物种的个体数量之间明确关系的实证研究^[11]。目前,已有研究发现浮游动物的生物量和 eDNA 序列数之间存在一定线性关系,并提出可用物种的 eDNA 序列数评估物种种群的相对丰度,但是在准确性方面并未做更加深入的探讨^[17]。因此,未来一段时间内该领域的热点和难点之一仍是如何利用 eDNA 技术精确地评估物种生物量。

鉴于目前通过 eDNA 量化每种鱼类个体数量的研究较少^[18],因此本研究首先假设鱼类个体释放到水中的 eDNA 与鱼类个体数量存在某种联系,由此可通过测量水样中 eDNA 来评估物种种群丰度。进一步地,本研究于 2022 年 9 月通过 eDNA 技术并建立池塘模型获得了相关数据,然后探究了 eDNA 序列相对丰度与鱼类个体数量之间的关系,以期通过该技术评估物种个体数量的研究与实践提供一定科学依据,进而推进该技术在水

* 收稿日期:2023-09-28 修回日期:2024-02-27 网络出版时间:2024-07-11T11:30

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);四川省自然科学基金青年科学基金项目(No. 2022NSFSC1730)

第一作者简介:周鑫鑫,女,研究方向为水生生物学, E-mail:1227052411@qq.com;通信作者:沈彦君,男,副教授,博士, E-mail:shenyanyun@cqnu.edu.cn

网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/50.1165.N.20240708.1624.002

生生物学及生态学领域的深入应用。

1 材料与方 法

1.1 实验鱼信息及池塘的选择

实验鱼均为人工池塘养殖,物种、数量等具体信息见表 1。本研究选择 1 个长×宽×深为 200 m×100 m×2 m 的长方形池塘;池塘周围生态环境良好,无外源污染,平均水深为 1.8 m,具有独立的进水及排水系统。在实验鱼放养前 5 d,用漂白粉溶液($w_{\text{漂白粉}}=10\%$)进行清塘消毒及设备消毒。每 2 500 m² 使用 1 台增氧机,即整个池塘中共使用 8 台增氧机;每日饲料投喂量占鱼体质量的 3%~5%,并依当日水质状况和实验鱼的摄食情况进行增减。

1.2 水样采集及处理

实验用鱼在池塘中喂养 10 d 后,在池塘内均匀设置 15 个采样点,采样点分布如图 1 所示,用采水器在各采样点取上、中、下水层的混合水样共 10 L,立即于 4 ℃ 条件下储存。为防止外源 DNA 污染,采水器和采样瓶在使用前均用漂白粉溶液($w_{\text{漂白粉}}=10\%$)消毒,且采样人员在采样过程中配戴一次性手套并及时更换^[19]。将水样混匀后,取 6 L 水样分装为 3 个平行水样。在 24 h 内使用真空泵抽滤 3 个水样到英国沃特曼公司出品的孔径为 0.45 μm 的混合纤维素滤膜上,每个水样抽滤前均使用漂白粉溶液($w_{\text{漂白粉}}=10\%$)对抽滤器具进行消毒,避免样品间的交叉感染。使用蒸馏水在抽滤时进行空白对照,评估是否存在外源 DNA 污染^[19]。最后将用于下一步 DNA 提取的滤膜置于-80 ℃ 条件下冷冻保存。

表 1 实验用鱼的具体信息

Tab. 1 Specific information about the experimental fish

序号	种类	放养数量/尾	长度/mm
1	胭脂鱼(<i>Myxocyprinus asiaticus</i>)	100	40~55
2	长吻鮠(<i>Leiocassis longirostris</i>)	800	50~73
3	厚颌鲂(<i>Megalobrama pellegrini</i>)	1 000	80~120
4	中华倒刺鲃(<i>Spinibarbus sinensis</i>)	2 500	91~160

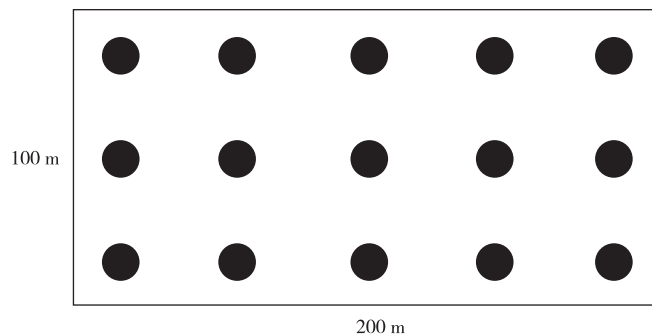


图 1 采样点设置

Fig. 1 Sampling point setting

1.3 PCR 扩增及测序

操作步骤按照 PowerWater DNA Isolation Kits 试剂盒说明书对滤膜中的总 DNA 进行提取。之后使用琼脂糖凝胶电泳($w_{\text{琼脂糖}}=1\%$)检测提取到的 eDNA 纯度。3 个样品独立提取,并设置空白滤膜作为阴性对照。提取到的 DNA 样品置于-20 ℃ 下保存,用于后续的 PCR 扩增。

本研究采用鱼类线粒体 12S rRNA 基因位点的通用引物 Tele02-F:5'-AAACTCGTGCCAGCCACC-3'和 Tele02-R:5'-GGGTATCTAATCCCAGTTTG-3'进行 PCR 扩增,并添加条形码(barcode)序列^[20]。PCR 采用 TransStart FastPfu DNA Polymerase,反应体系包括 4 μL 5×FastPfu Buffer、2 μL dNTPs、0.4 μL FastPfu Polymerase、2~5 μL 模板 DNA($\rho_{\text{DNA}}=10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)和上下游引物各 0.8 μL ($c_{\text{引物}}=10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),最后用

ddH₂O 将反应体系体积补至 20 μ L。PCR 反应条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,27 个循环的 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s、55 $^{\circ}$ C 退火 30 s 和 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,72 $^{\circ}$ C 终延伸 10 min,最终产物于 10 $^{\circ}$ C 条件下保存。同时使用 ddH₂O 为模板进行 PCR 阴性对照来评估 PCR 扩增中是否出现污染。每份样品进行 3 次重复,并将所得 PCR 产物混匀,最后使用琼脂糖凝胶电泳($w_{\text{琼脂糖}}=2\%$)检测^[21]。在本研究中,3 个样品电泳后均获得了目的条带,将 PCR 产物胶回收后送至上海凌恩生物科技有限公司,通过 Illumina NovaSeq 6000 测序平台进行高通量测序。

1.4 数据处理

Illumina PE250 测序序列首先根据条形码序列得到所有样品的有效序列;然后对测序片段(reads)的质量进行质控过滤;接着根据 PE(paired-end)测序片段之间的重叠(overlap)关系,将成对的测序片段拼接(merge)成一条序列;最后按照条形码和引物序列拆分得到每个样品的优质序列,并在过程中根据正反条形码和引物方向校正序列方向以及用 Usearch 软件和 gold 数据库,采用从头(de novo)序列和参考(reference)序列相结合的方式去除嵌合体。

按照不低于 97% 的序列相似性对序列进行 OTU 聚类分析,将 OTU 代表序列与 MitoFish(<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/>)和 NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)这 2 个数据库中的相关数据进行比对、分类注释,得到相应的 OTU 丰度表,其中物种组成 OTU 按相似度不低于 97%、E-value 不高于 10^{-5} 的标准筛选、对比至鱼类物种。

以池塘模型中 4 个物种的 eDNA 序列相对丰度为基础,使用 Excel 软件、Prism 及 R 软件包对 PCR 扩增结果、稀释曲线、物种的个体数量和 eDNA 序列相对丰度的关系进行分析。

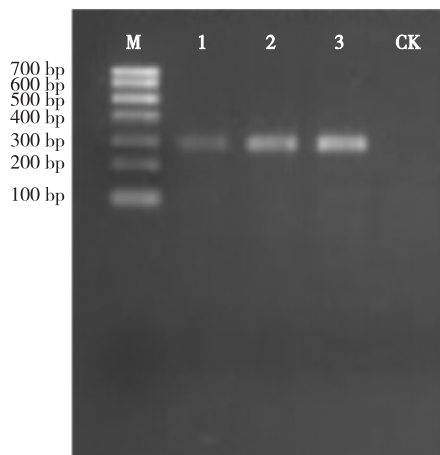
2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

PCR 扩增完成后,使用琼脂糖凝胶电泳检测发现阴性对照无条带,3 个样品电泳后 PCR 产物目的条带大小正确,约为 300 bp,浓度适宜,可进行后续实验(图 2)。

2.2 稀释曲线

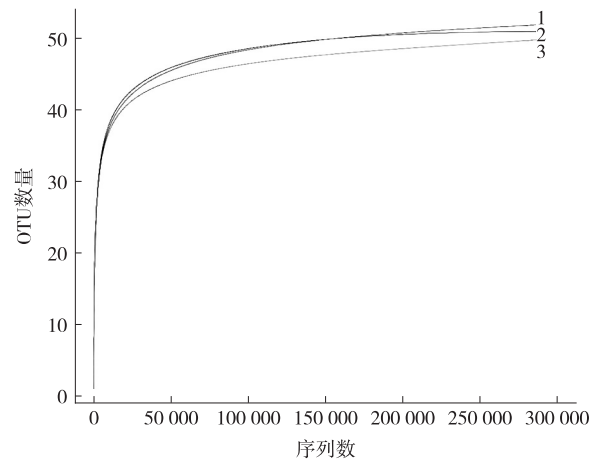
稀释曲线是指从样本中随机抽取一定数量的个体来统计这些个体所代表的物种数目,并以个体数与物种数来构建的曲线^[22]。使用相似度 97% 的 OTU 数据绘制稀释曲线,如图 3,曲线趋向平坦,表明样本的测序数据量合理,达到样本的测序深度。



注:数字 1~3 分别表示样本 1~3,CK 为阴性对照,M 为 Marker。

图 2 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig. 2 Results of agarose gel electrophoresis



注:数字 1~3 分别表示样本 1~3。

图 3 稀释曲线

Fig. 3 Rarefaction curve

2.3 鱼类 eDNA 序列相对丰度信息

由表 2 可知,4 种鱼类中 eDNA 序列相对丰度最低的是胭脂鱼而最高的是中华倒刺鲃,两者的 eDNA 序列相对丰度数值相差巨大。

表 2 各物种的 eDNA 序列相对丰度

Tab. 2 eDNA sequence abundance of each species

参数	胭脂鱼(<i>M. asiaticus</i>)	长吻鮠(<i>L. longirostris</i>)	厚颌鲂(<i>M. pellegrini</i>)	中华倒刺鲃(<i>S. sinensis</i>)
eDNA 序列相对丰度/条	3 870	47 857	570 386	687 895

2.4 4 种鱼类的个体数量和 eDNA 序列相对丰度的关系

将胭脂鱼、长吻鮠、厚颌鲂及中华倒刺鲃的个体数量和 eDNA 序列相对丰度分别作图后可以观察到 4 种鱼类的个体数量逐渐增多, eDNA 序列相对丰度也逐渐增高, 表明物种的个体数量与物种 eDNA 序列相对丰度呈正向趋势(图 4)。

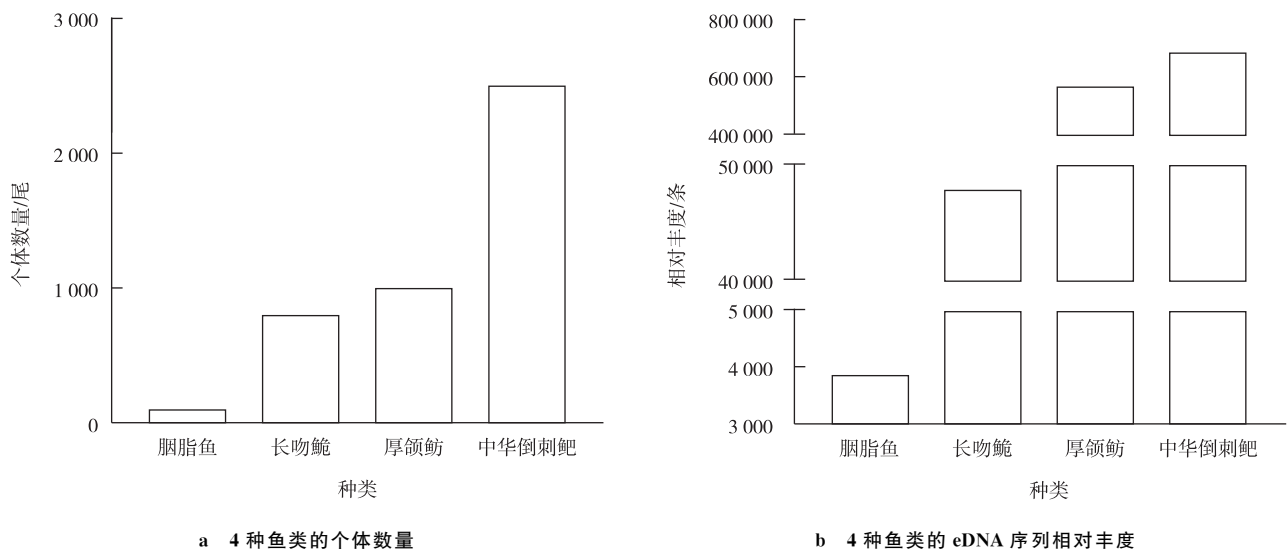


图 4 4 种鱼类的个体数量和 eDNA 序列相对丰度

Fig. 4 Number of species and relative abundance of eDNA sequence of four fish species

3 讨论

3.1 eDNA 序列相对丰度和鱼类个体数量的关系

鱼类线粒体 12S rRNA 基因的通用引物特异性高, 对所有硬骨鱼类具有通用性, 可用于全球鱼类多样性研究^[20]。本研究结果显示, 胭脂鱼、长吻鮠、厚颌鲂、中华倒刺鲃等 4 种鱼类的 eDNA 序列相对丰度和鱼类的个体数量呈正向趋势。类似地, 孙晶莹等人^[17]也发现 eDNA 宏条形码序列数与物种个体数量占比明显呈正相关, 表明 eDNA 技术能够反映浮游动物类群中物种的丰度变化; 有研究团队利用该技术对石蝇 (*Dinocras cephalotes*)、淡水无脊椎动物、鱼类和两栖动物进行实验, 均发现物种生物量和物种的 eDNA 序列丰度呈正比关系^[23-24]。此外有研究表明 eDNA 序列的数量随着鱼类的个体数量增加而增加, 即鱼类的个体数量越多, eDNA 序列相对丰度也越高^[16]; 同时其他研究也表明鱼类的个体大小也会影响 eDNA 的数量, 即鱼类个体越大, eDNA 数量越多, 它的序列相对丰度也越高^[25]。因此在本研究中, 胭脂鱼的 eDNA 序列相对丰度最低而中华倒刺鲃的 eDNA 序列相对丰度最高, 应与胭脂鱼个体数量最少且个体最小而中华倒刺鲃个体数量最多且个体最大有关。

本研究也发现 eDNA 序列相对丰度和鱼类个体数量并非呈简单的线性关系(表 2 和图 4), 其中厚颌鲂和中华倒刺鲃的 eDNA 序列相对丰度与个体数量之比更高, 可能与这 2 种鱼的运动能力更强、代谢速率更高有关; 周龙艳等人^[26]的研究结果显示, 中华倒刺鲃有着比胭脂鱼更活跃的运动能力, 且在充足的食物资源条件下生长速度更快; 付翔等人^[27]发现, 中华倒刺鲃在最大代谢率和代谢范围(最大代谢率和标准代谢率之差)方面明显高于胭脂鱼等鱼类。然而对厚颌鲂的行为学等相关研究较少, 还需进一步深入研究。

3.2 eDNA 的影响因素

一些研究表明, eDNA 序列相对丰度受物种种群丰度的影响^[28]。在特定条件下, 例如在水族箱的实验中,

eDNA 序列的数量可以代表生物的种群丰度或生物量^[29]。因此有很多研究表明,eDNA 序列的数量和物种的个体数量存在明显的线性关系^[11,30]。但在实际情况下它们的关系更加复杂,有多种因素影响 eDNA 的产生和降解等,主要包括生物因素和非生物因素 2 个方面^[26,31-34],其中生物因素体现在鱼类的个体数量和生物量^[25]、微生物和细胞外酶^[31]等,而非生物因素如降水、温度、紫外线、pH 等则均会影响 eDNA 的降解^[32-34]。本研究中的 4 种鱼类除个体数量和生物量有所差异外,其余影响因素均保持一致。因此,胭脂鱼的个体数量最少、生物量最低,eDNA 产生量也最少;中华倒刺鲃的个体数量最多、生物量最高,eDNA 产生量也最多。由此可见,为了更好地将 eDNA 与相关生物联系起来,在进行相关实验时需考虑到 eDNA 在水生生态系统中有关影响因素的变化。

综上所述,通过对池塘模型下 4 种鱼类 eDNA 的调查,本研究发现鱼类的 eDNA 序列相对丰度和物种的个体数量呈正向趋势。本研究结果有助于 eDNA 技术在野外的应用和解决鱼类资源调查保护工作中面临的各种问题,如对鱼类生物量进行有效的长期监测、在大面积区域内寻找局部的鱼类产卵场、筛选鱼类资源受到严重影响的流域等。

参考文献:

- [1] REES H C, MADDISON B C, MIDDLEDITCH D J, et al. The detection of aquatic animal species using environmental DNA: a review of eDNA as a survey tool in ecology[J]. *Journal of Applied Ecology*, 2014, 51(5): 1450-1459.
- [2] HÄNFLING B, HANDLEY L L, READ D, et al. Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods[J]. *Molecular Ecology*, 2016, 25(13): 3101-3119.
- [3] VALIERE N, TABERLET P. Urine collected in the field as a source of DNA for species and individual identification[J]. *Molecular Ecology*, 2010, 9(12): 2150-2152.
- [4] EVANS N T, LAMBERTI G A. Freshwater fisheries assessment using environmental DNA: a primer on the method, its potential, and shortcomings as a conservation tool[J]. *Fisheries Research*, 2018, 197: 60-66.
- [5] FICETOLA G F, MIAUD C, POMPANON F, et al. Species detection using environmental DNA from water samples[J]. *Biology Letters*, 2008, 4(4): 423-425.
- [6] 金珂, 张丽娟, 张伟, 等. 基于环境 DNA 宏条形码的太湖流域底栖动物监测与生态健康评价[J]. *中国环境监测*, 2022, 38(1): 175-188.
JIN K, ZHANG L J, ZHANG W, et al. Benthic macroinvertebrate biomonitoring and ecological assessment in Taihu Lake Basin based on environmental DNA metabarcoding[J]. *Environmental Monitoring in China*, 2022, 38(1): 175-188.
- [7] TILLOTSON M D, KELLY R P, DUDA J J, et al. Concentrations of environmental DNA (eDNA) reflect spawning salmon abundance at fine spatial and temporal scales[J]. *Biological Conservation*, 2018, 220: 1-11.
- [8] 程如丽, 罗杨, 张玉凤, 等. 基于环境 DNA 技术的乌江干流梯级水电库区的鱼类多样性[EB/OL]. (2023-04-13)[2024-09-28]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1283.S.20230412.1705.006.html>.
CHENG R L, LUO Y, ZHANG Y F, et al. Research on fish diversity of the cascade hydropower reservoir area of the Wujiang River based on environmental DNA technology[EB/OL]. (2023-04-13)[2024-09-28]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1283.S.20230412.1705.006.html>.
- [9] BOHMANN K, EVANS A, GILBERT M T P, et al. Environmental DNA for wildlife biology and biodiversity monitoring[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2014, 29(6): 358-367.
- [10] THOMSEN F P, WILLERSLEV E. Environmental DNA—an emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity[J]. *Biological Conservation*, 2015, 183: 4-18.
- [11] LACOURSIÈRE-ROUSSEL A, CÔTÉ G, LECLERC V, et al. Quantifying relative fish abundance with eDNA: a promising tool for fisheries management[J]. *Journal of Applied Ecology*, 2016, 53(4): 1148-1157.
- [12] THOMSEN P F, KIELGAST J, IVERSEN L L, et al. Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA [J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21(11): 2565-2573.
- [13] MIZUMOTO H, URABE H, KANBE T, et al. Establishing an environmental DNA method to detect and estimate the biomass of Sakhalin taimen, a critically endangered Asian salmonid[J]. *Limnology*, 2018, 19(2): 219-227.
- [14] KELLY R P, PORT J A, YAMAHARA K M, et al. Harnessing DNA to improve environmental management[J]. *Science*, 2014, 344(6191): 1455-1456.
- [15] 刁曹黎, 王闻, 线薇薇, 等. 环境 DNA 技术在渔业资源生物量评估中的研究进展: 现状与展望[J]. *海洋科学*, 2022, 46(2): 135-144.

- DIAO C Y, WANG W, XIAN W W. Role of the environmental DNA technology application in the biomass assessment of the fishery resource: current status and future perspectives[J]. *Marine Sciences*, 2022, 46(2): 135-144.
- [16] YATES M C, GLASER D M, POST J R, et al. The relationship between eDNA particle concentration and organism abundance in nature is strengthened by allometric scaling[J]. *Molecular Ecology*, 2021, 30(13): 3068-3082.
- [17] 孙晶莹, 杨江华, 张效伟. 环境 DNA(eDNA)宏条形码技术对枝角类浮游动物物种鉴定及其生物量监测研究[J]. *生态毒理学报*, 2018, 13(5): 76-86.
- SUN J Y, YANG J H, ZHANG X W. Identification and biomass monitoring of zooplankton Cladocera species with eDNA metabarcoding technology[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2018, 13(5): 76-86.
- [18] 郭娟, 曾燊, 郑羽晨, 等. 实验室养殖条件下麦穗鱼(*Pseudorasbora parva*)eDNA 浓度与生物量相关性曲线的拟合与比较分析[J]. *天津农业科学*, 2023, 29(6): 45-49.
- GUO J, ZENG Y, ZHENG Y C, et al. Fitting and comparative analysis of the correlation curve between the environmental DNA concentration and biomass of *Pseudorasbora parva* under laboratory rearing conditions[J]. *Tianjin Agricultural Sciences*, 2023, 29(6): 45-49.
- [19] JO T, MURAKAMI H, YAMAMOTO S, et al. Effect of water temperature and fish biomass on environmental DNA shedding, degradation, and size distribution[J]. *Ecology and Evolution*, 2019, 9(3): 1135-1146.
- [20] VALENYINI 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] Van Der LOOS L M, NIJLAND R. Biases in bulk DNA metabarcoding of marine communities and the methodology involved[J]. *Molecular Ecology*, 2020, 30(13): 3270-3288.
- [22] 刘元峰. 宏条形码分子标记 12S rRNA 和 16S rRNA 在哺乳动物混合检材种源鉴定中的应用[D]. 济南: 山东大学, 2022.
- LIU Y F. Application of the 12S rRNA and 16S rRNA metabarcoding for species identification of mammalian meat mixtures[D]. Ji'nan: Shandong University, 2022.
- [23] ELBRECHT V, LEESE F. Can DNA-based ecosystem assessments quantify species abundance? testing primer bias and biomass: sequence relationships with an innovative metabarcoding protocol[J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0130324.
- [24] EVANS N T, OLDS B P, RENSHAW M A, et al. Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2016, 16(1): 29-41.
- [25] KLYMUS K E, RICHTER C A, CHAPMAN D C, et al. Quantification of eDNA shedding rates from invasive bighead carp *Hypophthalmichthys nobilis* and silver carp *Hypophthalmichthys molitrix*[J]. *Biological Conservation*, 2015, 183: 77-84.
- [26] 周龙艳. 长江流域几种珍稀鱼类对环境因子胁迫的生理与行为响应研究[D]. 重庆: 重庆师范大学, 2020.
- ZHOU L Y. Physiological and behavioral responses to environmental stress of several endangered fish species in the Yangtze River[D]. Chongqing: Chongqing Normal University, 2020.
- [27] 付翔, 付成, 付世建. 五种淡水鱼类幼鱼游泳能力的比较[J]. *生态学杂志*, 2020, 39(5): 1629-1635.
- FU X, FU C, FU S J, et al. Comparison of swimming ability among five freshwater fish species[J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2020, 39(5): 1629-1635.
- [28] USHIO M, MURAKAMI H, MASUDA R, et al. Quantitative monitoring of multispecies fish environmental DNA using high-throughput sequencing[J]. *Metabarcoding and Metagenomics*, 2018, 2: e23297.
- [29] TAKAHARA T, MINAMOTO T, YAMANAKA H, et al. Estimation of fish biomass using environmental DNA[J]. *PLoS One*, 2012, 7(4): e35868.
- [30] 闫卉果, 董智玲, 马婷婷, 等. 基于环境 DNA 的岩原鲤检测及生物量评估[J]. *水产学报*, 2022, 46(6): 1018-1026.
- YAN H G, DONG Z L, MA T T, et al. Detection and biomass assessment of *Procypris rabaudi* based on environmental DNA[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2022, 46(6): 1018-1026.
- [31] BARNES M A, TURNER C R. The ecology of environmental DNA and implications for conservation genetics[J]. *Conservation Genetics*, 2016, 17(1): 1-17.
- [32] LACOURSIÈRE-ROUSSEL A, ROSABAL M, BERNATCHEZ L. Estimating fish abundance and biomass from eDNA concentrations: variability among capture methods and environmental conditions[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2016, 16(6): 1401-1414.
- [33] SALES N G, WANGENSTEEN O S, CARVALHO D C, et al. Space-time dynamics in monitoring neotropical fish communities using eDNA metabarcoding[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 754: 142096.
- [34] STRICKLER K M, FREMIER A K, GOLDBERG G S. Quantifying effects of UV-B, temperature, and pH on eDNA degradation in aquatic microcosms[J]. *Biological Conservation*, 2015, 183: 85-92.

Animal Sciences**Relative Abundance of Fish eDNA Sequence Based on a Pond Model**

ZHOU Xinxin¹, ZHANG Yufeng¹, LI Qinghua¹, QIN Qiang², LI Yingwen¹, SHEN Yanjun¹

(1. Laboratory of Water Ecological Health and Environmental Safety, College of Life Sciences,

Chongqing Normal University, Chongqing 401331;

2. College of Environmental Science and Engineering, China West Normal University, Nanchong Sichuan 637009, China)

Abstract: To investigate the relationship between the relative abundance of fish environmental DNA (eDNA) sequence and number of individual in a pond model. In September 2022, 100 *Myxocyprinus asiaticus*, 800 *Leiocassis longirostris*, 1 000 *Megalobrama pellegrini* and 2 500 *Spinibarbus sinensis* were temporarily cultured in a pond with dimensions of 200 m in length, 100 m in width, and 2 m in depth. After 10 days, 15 sampling sites were set up in this pond. The relationship between number of individuals of the above four fish species and the relative abundance of eDNA sequences were detected through a series of standardized analytical processes, including water sample collection, filtration, eDNA extraction, PCR amplification, high-throughput sequencing and biosignature analysis using the fish mitochondrial gene 12S gene as a marker. The results showed: 1) The relative abundance of *M. asiaticus* sequence was the lowest (3 970 sequences), and that of *S. sinensis* was the highest (687 895 sequences). 2) The relative abundance of eDNA sequence for the four fish species showed a positive trend with the number of species. The findings can provide a scientific basis for the subsequent application of eDNA technology in the assessment of fish population abundance in natural river systems.

Keywords: eDNA; number of individuals; sequence relative abundance

(责任编辑 方 兴)