

褐菖养殖密度与其eDNA的相关关系探讨

高天翔 陈治 王晓艳 张浩博 史会来

CORRELATION BETWEEN THE DENSITY OF CULTURED *SEBASTISCUS MARMORATUS* AND ITS ENVIRONMENTAL DNA

GAO Tian-Xiang, CHEN Zhi, WANG Xiao-Yan, ZHANG Hao-Bo, SHI Hui-Lai

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2022.2021.101>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

褐菖的听觉阈值研究

THRESHOLDS FOR THE HEARING OF MARBLED ROCKFISH *SEBASTISCUS MARMORATUS*

水生生物学报. 2018, 42(3): 593–598 <https://doi.org/10.7541/2018.074>

不同养殖密度下鱼粉水平对青鱼幼鱼生长及免疫的影响

EFFECTS OF FISH MEAL LEVELS ON GROWTH AND IMMUNITY OF BLACK CARP (*MYLOPHARYNGODON PICEUS*) IN DIFFERENT CULTURE DENSITIES

水生生物学报. 2020, 44(1): 75–84 <https://doi.org/10.7541/2020.010>

舟山近海水样环境DNA获取方法的建立

THE EDNA COLLECTION METHOD OF ZHOUSHAN COASTAL WATERS

水生生物学报. 2020, 44(1): 50–58 <https://doi.org/10.7541/2020.007>

太平湖浮游动物动态演替与环境因子的相关性研究

THE RESEARCH OF DYNAMIC SUCCESSION OF ZOOPLANKTON AND ITS CORRELATION WITH ENVIRONMENTAL FACTORS IN TAIPING LAKE

水生生物学报. 2017, 41(3): 700–711 <https://doi.org/10.7541/2017.88>

高密度鳙池塘分区养殖浮游动物群落结构及水环境特征

ZOOPLANKTON COMMUNITY COMPOSITION AND ENVIRONMENTAL CHARACTERISTIC IN BLOCK PARTITION POND WITH HIGH DENSITY OF BIGHEAD CARP (*ARISTICHTHYS NOBILIS*)

水生生物学报. 2018, 42(2): 400–405 <https://doi.org/10.7541/2018.051>

光周期对许氏平性腺分化过程中形态学、性激素水平及相关基因表达的影响

EFFECTS OF PHOTOPERIOD ON MORPHOLOGY, SEX HORMONE LEVELS AND GENE EXPRESSION OF GONADAL DIFFERENTIATION OF BLACK ROCKFISH (*SEBASTES SCHLEGELII*)

水生生物学报. 2020, 44(2): 319–329 <https://doi.org/10.7541/2020.039>



doi: 10.7541/2022.2021.101

褐菖鲉养殖密度与其eDNA的相关关系探讨

高天翔¹ 陈治² 王晓艳³ 张浩博³ 史会来⁴

(1. 浙江海洋大学水产学院, 舟山 316022; 2. 海南热带海洋学院水产与生命学院, 三亚 572022; 3. 浙江海洋大学国家海洋设施养殖工程技术研究中心, 舟山 316022; 4. 浙江省海洋水产研究所, 浙江省海水增殖重点实验室, 舟山 316021)

摘要: 研究以舟山岛礁水域优势鱼种褐菖鲉(*Sebastes marmoratus*)为研究对象, 通过与其他5种近缘鱼种CO I 基因片段序列的比较分析, 设计了褐菖鲉特异性引物与Taqman探针; 基于K2P模型计算得到褐菖鲉与其他5种近缘鱼种在引物探针区的种间遗传距离, 褐菖鲉与日本鬼鲉遗传距离最大(0.3202), 而与同属的三色鲉种间遗传距离最小(0.2617)。将均重为12.46 g的褐菖鲉按2、4、8、16和32尾分别放入室内5个容积为1 m³的圆形水桶, 并在40 m×15 m×0.3 m三个养殖池内分别投放20、40和80尾褐菖鲉, 其后的0、8h、16h、1d、1.5d、2d、3d、4d、5d、6d、7d、8d及10d进行水样抽取, 测定褐菖鲉eDNA浓度。分析结果表明, 褐菖鲉eDNA浓度前后变化明显, 3d后较为稳定, 且与各自群体密度相对应, 从相关系数和拟合趋势可以看出养殖密度与其eDNA浓度之间呈线性函数相关关系, 为褐菖鲉资源eDNA监测评估奠定基础。

关键词: 舟山; 养殖密度; eDNA; CO I; 遗传距离; 正相关; 褐菖鲉

中图分类号: S965.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2022)07-1007-09



褐菖鲉(*Sebastes marmoratus*)属鲉形目(Scorpaeniformes)、平鲉科(Sebastiae)、鲉属(*Sebastes*)。褐菖鲉作为暖水性底层鱼类, 生活在近海底层岩礁地带, 广泛分布于我国南北沿海近海岩礁海域, 是典型的岛礁定居性鱼类^[1]。春夏季分散在岩礁岸边和岛屿四周觅食, 冬季游向较深海区越冬。褐菖鲉是舟山岛礁水域的优势鱼种, 同时也是主要的海洋捕捞及海钓对象^[2, 3], 具有较高的经济价值。

环境DNA(Environmental DNA, eDNA)是生物体释放于冰芯、土壤、空气、水体、底泥等环境中的DNA总称。eDNA分析是一种从环境样品中提取所有的DNA片段, 然后通过相应的DNA检测技术进行目标生物的定性和定量分析的新工具^[4-10]。该方法最早出现于20世纪80年代^[11], 主要被应用于微生物生态学研究^[12-14]。近十年来, 随着样品采集、DNA提取和DNA测序分析等关键技术的突破, 环境DNA分析技术日渐成熟。其应用从微生物分

析扩展到高等水生或半水生生物种鉴定乃至生物群落的多样性分析, 目前已在生物入侵防治、濒危物种保护、生物多样性评价及重要资源监测评估等方面发挥重要作用^[15-17]。

褐菖鲉的研究主要集中在早期发育、苗种生产及生物学特征、生理生化及遗传学方面^[18-24]。国内外尚未见褐菖鲉eDNA方面的研究报道。本文通过设计褐菖鲉特异性引物及Taqman探针, 进而建立褐菖鲉养殖密度与其eDNA浓度之间的相关关系, 为基于eDNA技术的褐菖鲉生物量评估奠定基础。

1 材料与方法

1.1 褐菖鲉选取

实验时间为2020年6月8日至2020年6月25日, 在浙江省舟山市西轩岛(29°53'41.45" N, 122°18'40.12" E)养殖场开展研究。由于褐菖鲉个体暴露在空气中挣扎强烈, 影响体长、体重等生物

收稿日期: 2021-05-18; 修订日期: 2021-07-09

基金项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓科技创新”重点专项(2019YFD0901301); 国家自然科学基金(41776171和41806180); 浙江省重点研发计划(2021C02047)资助 [Supported by the Special Project on Blue Granary Science and Technology Innovation under the National Key Research and Development Program of China (2019YFD0901301); the National Natural Science Foundation of China (41776171 and 41806180); the Zhejiang Provincial Key Research and Development Program (2021C02047)]

通信作者: 高天翔(1962—), 男, 教授, 博士生导师; 主要研究方向为渔业资源生物学及其种群遗传学。E-mail: gaotianxiang0611@163.com

学测定,因此先目测挑选个体基本一致的褐菖鲉个体,用直径20 cm、孔径0.2 cm、柄长1 m的鱼捞将褐菖鲉捞入直径1 m、水深10 cm的圆形水槽中。随后用直径10 cm、孔径0.2 cm、把柄长28 cm的小型鱼捞移入圆形水槽中,对个体略大和略小的个体进行再次筛选,以保证圆形水槽中剩余的褐菖鲉个体大小相近。随机采集褐菖鲉个体,放入20 cm×20 cm×10 cm的塑料泡沫箱中(塑料泡沫箱中事先加入一定体积的水,防止褐菖鲉在泡沫箱中跳动,影响测重的准确性)。用量程为5 kg的天平称量褐菖鲉的总重,取均值作为每尾实验鱼的重量。

1.2 室内养殖实验

取5个容积为1 m³、具有完备和相同换水装置的圆形水桶,用10%次氯酸钠充分消毒后,在水桶中加入0.5 m³海水(海水已进行多级沉淀、过滤和消毒)。每个水桶内的水体更新速度恒定保持为3 L/min,多余水体从溢流管流出,使体积保持不变,直到实验结束。分别在这5个水桶中加入2、4、8、16和32尾均重为12.46 g的褐菖鲉,在充分供氧条件下,统一喂食一定数量的虾。在加入褐菖鲉0、8h、16h、1d、1.5d、2d、3d、4d、5d、6d、7d、8d及10d后,对每个水桶采集250 mL水样,共取平行样3组,同时取250 mL纯净水作为空白对照组。采样前用浓度为0.1%的次氯酸钠溶液对采样的玻璃瓶进行消毒处理。室内温度稳定保持在(26±2)℃,保证养殖环境的稳定适宜。

1.3 室外养殖试验

对3个室外养殖池[水体体积约为:40 m(长)×15 m(宽)×0.3 m(高)=180 m³]进行充分消毒,分别在3个养殖池内投放20、40和80尾褐菖鲉。分别抽取放入褐菖鲉0、8h、16h、1d、1.5d、2d、3d、4d、5d、6d、7d、8d及10d后的养殖池水样2L,共取3组平行样,空白对照及消毒方式与室内养殖实验相同。

1.4 DNA提取及PCR扩增验证

采用苯酚-氯仿方法从褐菖鲉肌肉中提取DNA^[25]。使用硬骨鱼类COI通用引物F1(5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3')、R1(5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3')^[26]进行PCR扩增,反应体系为:DNTPs 2 μL(2.5 μmol/L),10×buffer(含Mg²⁺)2.5 μL,rTaq 0.15 μL(5 U/μL),上下游引物各1 μL(10 μmol/L),DNA模板1 μL(50 ng),无菌水补齐总体积至25 μL。反应程序:95℃预变性5min;40次循环过程为:95℃变性30s,58℃退火30s,72℃延伸30s,最终在72℃延伸10min后于4℃保存。PCR产物质量采用1%琼脂糖

凝胶电泳法来检测,使用DL DNA Marker (TaKaRa),挑选电泳条带单一且最为明亮的PCR产物送至生工生物工程(上海)有限公司进行双向测序。测得的序列使用SeqMan软件进行拼接、比对及人工手动校对,得到褐菖鲉的标准CO I片段。

1.5 褐菖鲉特异性引物和Taqman探针设计

用Clustal(version 2.0.11)、DNAMAN、Primer-Express 3.0.1及NCBI在线引物设计工具(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>),通过对比褐菖鲉与其他5种舟山海域出现的近缘鱼种:许氏平鲉(*Sebastes schlegelii*)、三色鲉(*Sebastes tertius*)、裸胸鲉(*Scorpaena izensis*)、单指虎鲉(*Minous monodactylus*)和日本鬼鲉(*Inimicus japonicus*)的CO I基因片段序列,设计褐菖鲉特异性引物和TaqMan探针。基于设计好的引物与探针使用K2P模型构建NJ树计算褐菖鲉与其他5种近缘鱼种的种间遗传距离。各鱼种信息见表1。

表1 褐菖鲉及其近缘种样品信息

Tab. 1 Sampling information of *S. marmoratus* and its relative species

科Family	属Genus	种Species
平鲉科Sebastes	平鲉属Sebastes	许氏平鲉Sebastes schlegelii
平鲉科Sebastes	鲉属Sebastes	褐菖鲉Sebastes marmoratus
平鲉科Sebastes	鲉属Sebastes	三色鲉Sebastes tertius
鲉科Scorpaenidae	鲉属Scorpaena	裸胸鲉Scorpaena izensis
毒鲉科Synanceiidae	虎鲉属Minous	单指虎鲉Minous monodactylus
毒鲉科Synanceiidae	鬼鲉属Inimicus	日本鬼鲉Inimicus japonicus

1.6 特异性引物和TaqMan探针的验证

使用普通PCR验证引物的可行性,并用7300Plus Real-Time PCR仪检测引物和探针的特异性。荧光定量PCR扩增体系为: TaqMan™ Fast qPCR Master Mix(Applied Biosystems™) 10 μL、正反向引物各0.4 μL(10 μmol/L)、DNA模板2 μL(50 ng)、探针0.4 μL(10 μmol/L)、无菌水补齐至20 μL。热循环条件: 50℃孵育2 min进行UNG酶激活, 95℃预变性2min, 45次循环过程为95℃变性30s, 60℃退火/延伸30s。验证用到的鱼种见表1。

1.7 褐菖鲉eDNA提取及数字定量PCR扩增

对1.2和1.3采集的250 mL和2 L水用直径47 mm,孔径0.45 μm的醋酸纤维素滤膜(上海兴亚)抽滤,分别抽滤等体积的纯净水作为阴性对照。用DNeasy Blood and Tissue Kit试剂盒进行eDNA提取,使用QuantStudio 3D数字PCR(Digital PCR, dPCR)进行褐菖鲉eDNA浓度的测定。

在该时间段内, 室外养殖条件下eDNA浓度与褐菖鲉养殖密度之间呈显著的线性相关, 关系式为: $\text{Density (ind./m}^3\text{)} = 2.445 \times 10^{-4} \times \text{eDNA concentrations (copies/L)} - 0.123$, $R^2 = 0.99$ 。

表 3 基于荧光定量PCR的目标生物引物、探针特异性验证结果
Tab. 3 The specificity of primers and probe of target species by qPCR

种Species	Ct值 Ct value
褐菖鲉 <i>S. marmoratus</i>	20.440±0.311
三色菖鲉 <i>S. tertius</i>	U
裸胸鲉 <i>S. izensis</i>	U
单指虎鲉 <i>M. monodactylus</i>	U
日本鬼鲉 <i>I. japonicus</i>	U
许氏平鲉 <i>S. schlegelii</i>	U

注: U表示未检出
Note: U represents undetected

2.7 室内、室外养殖条件下, eDNA浓度与褐菖鲉养殖密度之间关系的联合分析

将室内水桶和室外养殖池实验结果联合, 进行eDNA浓度与褐菖鲉养殖密度相关关系分析。结果表明整体与释放早期拟合效果差、相关性低(图 6a), 室内室外在稳定期的数据表明eDNA浓度与褐菖鲉养殖密度之间呈线性相关关系(图 6b), 关系式为: $\text{Density (ind./m}^3\text{)} = 6.017 \times 10^{-5} \times \text{eDNA concentrations (copies/L)} - 0.485$, $R^2 = 0.96$ 。

2.8 褐菖鲉生物量加倍时 eDNA浓度的增长倍数

选取室内组、室外组稳定期数据探究褐菖鲉养殖密度加倍时eDNA浓度增长倍数(表 4和表 5)。室内组在养殖密度由8 ind./m³增加到16 ind./m³时, eDNA浓度增长倍数较高, 室外组养殖密度由0.22 ind./m³增加到0.44 ind./m³时, eDNA浓度增长倍数高。

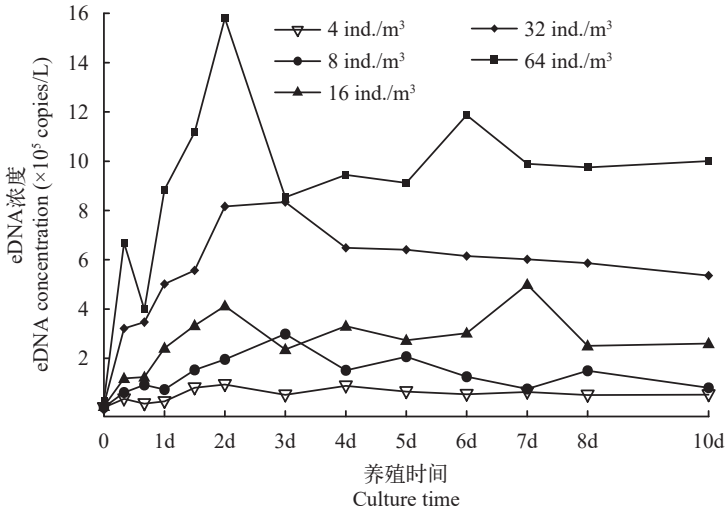


图 2 室内水体褐菖鲉eDNA浓度变化情况

Fig. 2 Variation trend of eDNA concentration of *S. marmoratus* in indoor tanks

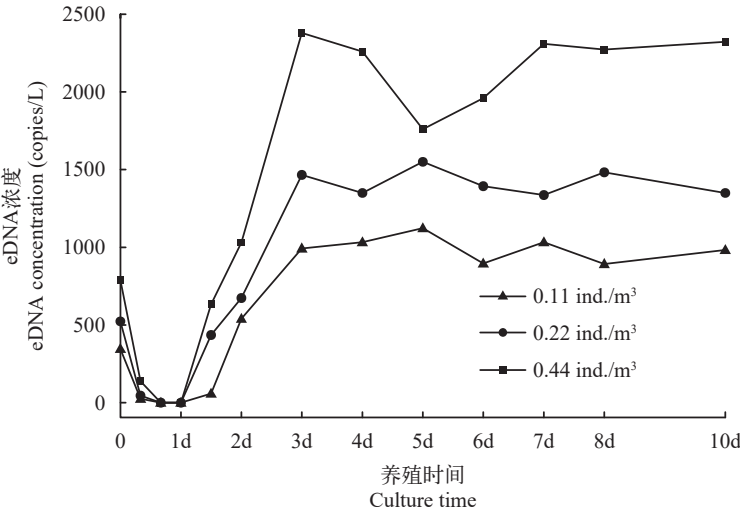


图 3 室内水体褐菖鲉eDNA浓度变化情况

Fig. 3 Variation trend of eDNA concentrations of *S. marmoratus* in outdoor ponds

整体来看, 室内各小组eDNA浓度增长倍数(图 7)均高于室外小组(图 8), 室内组和室外组中eDNA浓

度随着褐菖鲉养殖密度增加而增加, 但室内组随着养殖密度不断增加eDNA浓度增加倍数趋于平缓。

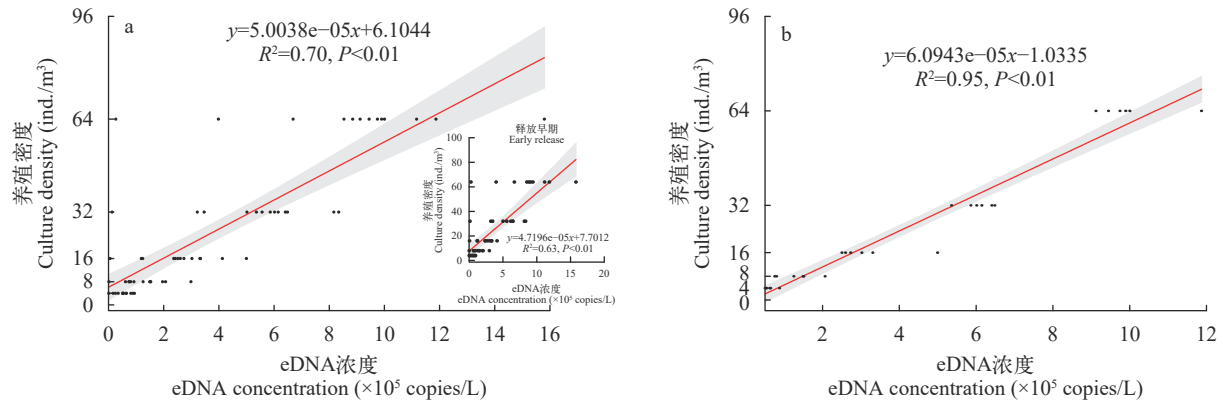


图 4 室内养殖条件下褐菖鲉eDNA与其养殖密度之间相关关系

Fig. 4 Correlation between eDNA of *S. marmoratus* and its culture density in indoor culture

a. 整体与释放早期; b. 稳定期

a. whole and early stage of release; b. stable stage

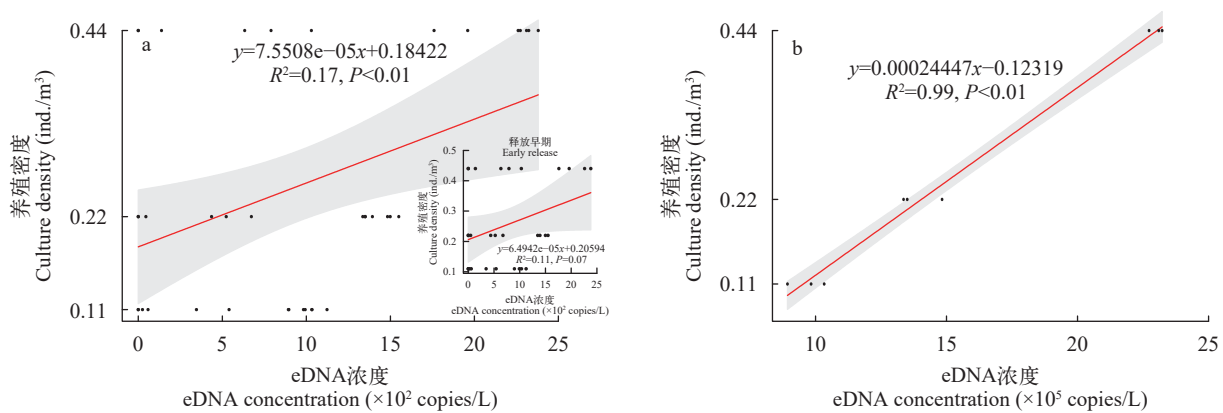


图 5 室外养殖条件下褐菖鲉eDNA浓度与其养殖密度之间相关关系

Fig. 5 Correlation between eDNA of *S. marmoratus* and its culture density in outdoor culture

a. 整体与释放早期; b. 稳定期

a. whole and early stage of release; b. stable stage

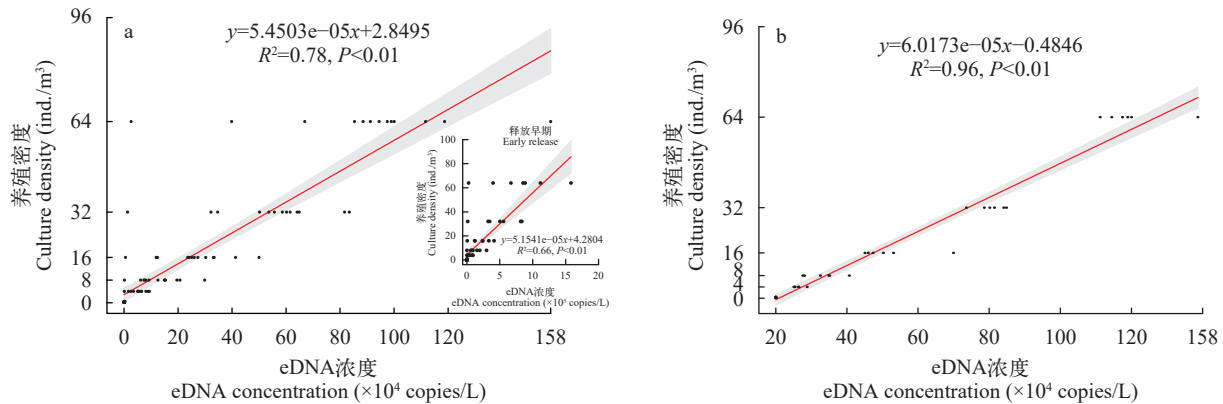


图 6 室内、室外养殖条件下褐菖鲉eDNA浓度与其养殖密度之间关系的联合分析

Fig. 6 Joint analysis of the relationship between eDNA of *S. marmoratus* and its culture density under indoor and outdoor culture conditions

a. 整体与释放早期; b. 稳定期

a. whole and early stage of release; b. stable stage

3 讨论

3.1 特异性引物和探针设计

TaqMan探针法能够保证在扩增过程中只对目标种进行特异性检测^[27, 28]。本实验通过对褐菖鲉及其近缘鱼种进行同源序列比对,在序列变异较大的位置进行特异性引物探针设计,所得的引物、探针与近缘鱼种序列皆存在一定数量的碱基差异。在引物探针的特异性验证过程中,仅以褐菖鲉组织DNA为模板的样品被检测出,而以其他5种近缘鱼种组织DNA为模板的样品均未检出,因此本研究设计的褐菖鲉特异性引物和TaqMan探针能保证扩增结果的特异性。

3.2 褐菖鲉eDNA定量检测技术的高灵敏性

室内条件下,不同养殖密度检测到的eDNA在0—2d时间段内呈上升趋势,在2—3d内褐菖鲉eDNA浓度回落,3d后趋于稳定状态。在室外条件下,0—1d、1d—3d和3d—10d这3个时间段内,褐菖鲉eDNA浓度分别呈下降,上升和稳定趋势。室内水桶及室外养殖池在“0”组的eDNA浓度极低,但并

不为0。这与水母(*Chrysaora pacifica*)、鲤(*Hypophthalmichthys molitrix*)等物种定量检测研究结果相一致^[15, 29]。塑料鱼笼放入水桶的瞬间可能引起了水流波动,导致褐菖鲉eDNA能够扩散到临近水体中,致使dPCR结果为阳性。本实验选用的褐菖鲉全部为幼鱼,个体都比较小(12.46 g/尾);室外养殖池的水体体积也较大,最低密度组(0.11 ind./m³)中

表 4 室内褐菖鲉养殖密度加倍时eDNA浓度增长倍数

Tab. 4 Ratio of indoor eDNA growth of *S. marmoratus* resulted from its culture density doubling

时间 Time(d)	养殖密度 Culture density (ind./m ³) 4 → 8	养殖密度 Culture density (ind./m ³) 8 → 16	养殖密度 Culture density (ind./m ³) 16 → 32	养殖密度 Culture density (ind./m ³) 32 → 64
4	1.72	2.19	1.96	1.46
5	3.18	1.32	2.35	1.42
6	2.30	2.41	2.03	1.93
7	1.20	6.60	1.20	1.65
8	2.95	1.68	2.34	1.66
10	1.54	3.23	2.06	1.87
AVE±SD(分组, Different groups)	2.15±0.80	2.91±1.93	1.99±0.42	1.66±0.21
AVE±SD(全部, Total)	2.18±1.10			

表 5 室外水体褐菖鲉养殖密度加倍时其eDNA浓度增长倍数

Tab. 5 Ratio of outdoor eDNA growth of *S. marmoratus* resulted from its culture density doubling

时间 Time(d)	养殖密度 Culture density (ind./m ³) 0.11 → 0.22	养殖密度 Culture density (ind./m ³) 0.22 → 0.44
7	1.29	1.73
8	1.66	1.53
10	1.37	1.72
AVE±SD(分组, Different groups)	1.44±0.19	1.66±0.11
AVE±SD(全部, Total)	1.55±0.18	

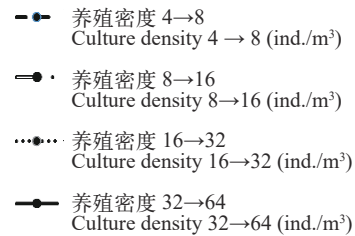


图 7 室内褐菖鲉养殖密度加倍时eDNA浓度增长倍数

Fig. 7 Ratio of indoor eDNA growth of *S. marmoratus* resulted from its culture density doubling

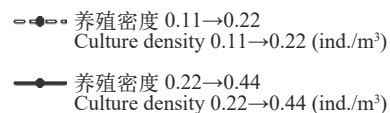


图 8 室外水体褐菖鲉养殖密度加倍时eDNA浓度增长倍数

Fig. 8 Ratio of outdoor eDNA growth of *S. marmoratus* resulted from its culture density doubling

的褐菖鲉eDNA在释放早期仍可被dPCR检出。在不同时间段室内组和室外组检测的褐菖鲉eDNA浓度均有所不同, 且差异较大, 由此可以看出褐菖鲉eDNA定量检测技术具有较高的灵敏性。

3.3 褐菖鲉eDNA浓度变化及“空白的8h”

无论是室内水桶组还是室外养殖池组, 褐菖鲉eDNA浓度的波动范围都比较大。稳定时期的褐菖鲉eDNA浓度大约比初始时期高1—2个数量级。对特定物种进行定量检测时, 应在预实验中设置不同的采样时间点, 预先研究水体中eDNA浓度的稳定情况。室内和室外在实验前期阶段(eDNA释放早期)的生物量评估结果较差, 因此用于拟合分析的数据应选自eDNA稳定释放的时期, 而结果也表明稳定期的线性拟合效果好。在室外养殖组, 褐菖鲉初始组(0)的eDNA浓度较高, 这可能是因为室内、室外水温不一致, 褐菖鲉由室内转移室外时会产生应激反应, 皮肤黏液脱落等原因造成。但在0—1d组, 水样中的褐菖鲉eDNA浓度迅速降低; 尤其是16h—1d时间段出现了eDNA浓度的“空白的8h”, dPCR也无法检测到水体中的褐菖鲉eDNA。室外养殖池水质较为清澈, 褐菖鲉初始阶段为躲避外界刺激可能游向水较深、离岸较远的水池中央。褐菖鲉具有明显的恋礁性^[18, 30], 静止在养殖池中部的褐菖鲉可能不再发生游动。取样处的褐菖鲉eDNA扩散或者降解后不再有新的褐菖鲉eDNA补充。反映在dPCR结果上, 则是16h—1d阶段内褐菖鲉eDNA检测为阴性。而1d后, 水池中央的褐菖鲉eDNA开始扩散到养殖池外缘的水样采集处。褐菖鲉eDNA才得以开始累积, 直到最后稳定下来。由此来看, 恋礁行为可能会影响褐菖鲉eDNA扩散, “远礁点”处存在eDNA检测盲点。

此外, 采样点的设置对eDNA检出和浓度估计是一个重要的因素。受室外条件限制, 室外条件下的养殖池仅设置了一个采样位点, 这可能会导致检出的eDNA浓度与实际有所偏差。水体eDNA的数量、质量和稳定性在很大程度上受到其在水中扩散的影响^[31—33], 室内养殖水桶体积小, 因此采样位点对eDNA检测影响较小。室外养殖池范围较大, 由于褐菖鲉的恋礁性会导致养殖池内的eDNA分布不均匀, 单一采样位点难以保证采集到池内均匀的eDNA, 无法准确评估实际的eDNA浓度^[36]。在自然环境中, 水流、温度、降水和紫外线等因素都会影响eDNA的降解^[34—36], 从而影响eDNA检出与浓度估计。室外的环境因素往往无法控制, 因此在难以保证养殖条件稳定的情况下设置多个采样位点对于eDNA的检出和浓度的评估是非常有必要的。

3.4 在室内和室外条件下, 褐菖鲉eDNA与其密度相关关系

由于eDNA技术是基于生物体持续释放到周围环境的代谢物来分析和研究的^[37, 38]。在本研究中, 随着养殖密度增加, 褐菖鲉eDNA浓度也呈增加趋势, 可见养殖条件下的水体eDNA能够体现褐菖鲉密度, 其相关关系为近海野外褐菖鲉资源定量监测评估奠定了基础。实际的野外采样要选择天气情况良好且温度适宜的时间段, 以便采集到褐菖鲉eDNA释放稳定期的水样, 最能反映实际环境的褐菖鲉资源密度和数量。同时要尽可能增加采样位点和重复采样, 避免产生检测盲点导致假阴性的结果。

参考文献:

- [1] Wu C W. Biological studies on *Sebastiscus marmoratus* off Zhoushan [J]. *Journal of Zhejiang Ocean University* (Natural Science), 1999, **18**(3): 185-190. [吴常文. 浙江舟山近海褐菖鲉*Sebastiscus marmoratus*生物学研究 [J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 1999, **18**(3): 185-190.]
- [2] Wang K, Zhang S Y, Wang Z H, et al. Feeding habit of *Sebastiscus marmoratus* in seaweed bed around Gouqi Island [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, **34**(2): 227-235. [王凯, 章守宇, 汪振华, 等. 枸杞岛海藻场褐菖鲉的摄食习性 [J]. 水产学报, 2010, **34**(2): 227-235.]
- [3] Wu Z L, Wang Z H, Wang K, et al. Preliminary study on biological characteristics of reef fish *Sebastiscus marmoratus* of Ma'an Archipelago [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2012, **39**(12): 133-137. [吴祖立, 汪振华, 王凯, 等. 马鞍列岛趋礁鱼类褐菖鲉生物学特性初步研究 [J]. 广东农业科学, 2012, **39**(12): 133-137.]
- [4] Hänfling B, Lawson H L, Read D S, 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.
- [5] Pilliod D S, Goldberg C S, Arkle R S, et al. Estimating occupancy and abundance of stream amphibians using environmental DNA from filtered water samples [J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2013, **70**(8): 1123-1130.
- [6] 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.
- [7] Moyer G R, Díaz-Ferguson E, Hill J E, et al. Assessing environmental DNA detection in controlled lentic systems [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(7): e103767.
- [8] Doi H, Inui R, Akamatsu Y, et al. Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish [J]. *Freshwater Biology*, 2017, **62**(1): 30-39.
- [9] Sigsgaard E E, Carl H, Møller P R, et al. Monitoring the near-extinct European weather loach in Denmark based

- on environmental DNA from water samples [J]. *Biological Conservation*, 2015, **183**: 46-52.
- [10] Mahon A R, Jerde C L, Galaska M, *et al.* Validation of eDNA surveillance sensitivity for detection of Asian carps in controlled and field experiments [J]. *PLoS One*, 2013, **8**(3): e58316.
- [11] Ogram A, Sayler G S, Barkay T. The extraction and purification of microbial DNA from sediments [J]. *Journal of Microbiological Methods*, 1987, **7**(2/3): 57-66.
- [12] Willerslev E, Hansen A J, Binladen J, *et al.* Diverse plant and animal genetic records from Holocene and Pleistocene sediments [J]. *Science*, 2003, **300**(5620): 791-795.
- [13] Thomsen P F, Kielgast J, Iversen L L, *et al.* Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples [J]. *PLoS One*, 2012, **7**(8): e41732.
- [14] 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.
- [15] Jerde C L, Chadderton W L, Mahon A R, *et al.* Detection of Asian carp DNA as part of a Great Lakes Basin-wide surveillance program [J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2013, **70**(4): 522-526.
- [16] Goldberg C S, Sepulveda A, Ray A, *et al.* Environmental DNA as a new method for early detection of New Zealand mudsnails (*Potamopyrgus antipodarum*) [J]. *Freshwater Science*, 2013, **32**(3): 792-800.
- [17] Gao T X, Chen Z, Wang X Y. Environmental DNA, A new method for fish diversity investigation in the coastal waters [J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science)*, 2018, **37**(1): 1-7. [高天翔, 陈治, 王晓艳. 近海鱼类多样性调查新方法—环境DNA分析技术 [J]. 浙江海洋大学学报(自然科学版), 2018, **37**(1): 1-7.]
- [18] Li C W, Wang K, Cheng X P, *et al.* Difference of trophic niche between *Sebastiscus marmoratus* and *Larimichthys polyactis* in marine ranching of Ma'an Archipelago, China [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2018, **29**(5): 1489-1493. [李朝文, 王凯, 程晓鹏, 等. 马鞍列岛海洋牧场褐菖鲉和小黄鱼营养生态位差异 [J]. 应用生态学报, 2018, **29**(5): 1489-1493.]
- [19] Qiu C G, Xu S L, Qi C, *et al.* Studies on early growth and development in *Sebastiscus marmoratus* with artificial breeding technology [J]. *Journal of Ningbo University (Natural Science & Engineering Edition)*, 2013, **26**(4): 17-23. [邱成功, 徐善良, 齐闯, 等. 褐菖鲉(*Sebastiscus marmoratus*)早期生长发育与人工繁育技术研究 [J]. 宁波大学学报(理工版), 2013, **26**(4): 17-23.]
- [20] Zhang X G, Guo H Y, Song J K. Thresholds for the hearing of marbled rockfish *Sebastiscus marmoratus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, **42**(3): 593-598. [张旭光, 郭弘艺, 宋佳坤. 褐菖鲉的听觉阈值研究 [J]. 水生生物学报, 2018, **42**(3): 593-598.]
- [21] Wu C W, Wang W H, Li C D. Preliminary study on the development of *Sebastiscus marmoratus* sex gland, embryo and fry [J]. *Journal of Zhejiang Ocean University*, 1999, **18**(4): 310-314. [吴常文, 王伟洪, 李昌达. 褐菖鲉 *Sebastiscus marmoratus* 性腺、胚胎和仔鱼发育的初步研究 [J]. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 1999, **18**(4): 310-314.]
- [22] Li J, Sun L, Zuo Z, *et al.* Exposure to paclobutrazol disrupts spermatogenesis in male *Sebastiscus marmoratus* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2012(122/123): 120-124.
- [23] He C, Zuo Z, Shi X, *et al.* Pyrene exposure influences the thyroid development of *Sebastiscus marmoratus* embryos [J]. *Aquatic Toxicology*, 2012(124/125): 28-33.
- [24] Hossain M A, Furuichi M. Essentiality of dietary calcium supplement in fingerling scorpion fish (*Sebastiscus marmoratus*) [J]. *Aquaculture*, 2000, **189**(1/2): 155-163.
- [25] Sambrook J, Gething M J. Protein structure. chaperones, paperones [J]. *Nature*, 1989, **342**(6247): 224-225.
- [26] Ward R D, Zemlak T S, Innes B H, *et al.* DNA barcoding Australia's fish species [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 2005, **360**(1462): 1847-1857.
- [27] Jamnikar C U, Grom J, Toplak I, *et al.* Real-time RT-PCR assay for rapid and specific detection of classical swine fever virus: comparison of SYBR Green and TaqMan MGB detection methods using novel MGB probes [J]. *Journal of Virological Methods*, 2008, **147**(2): 257-264.
- [28] Romera S A, Hilgers L A T, Puntel M, *et al.* Adjuvant effects of sulfolipo-cyclodextrin in a squalene-in-water and water-in-mineral oil emulsions for BHV-1 vaccines in cattle [J]. *Vaccine*, 2000, **19**(1): 132-141.
- [29] Minamoto T, Fukuda M, Katsuhara K R, *et al.* Environmental DNA reflects spatial and temporal jellyfish distribution [J]. *PLoS One*, 2017, **12**(2): e0173073.
- [30] Xu S Y, Zhang H, Yanagimoto T, *et al.* Morphological study of *Sebastiscus marmoratus* among populations in China and Japan [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, **37**(5): 960-966. [徐胜勇, 张辉, 柳本卓, 等. 中日褐菖鲉群体形态学比较研究 [J]. 水生生物学报, 2013, **37**(5): 960-966.]
- [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] Murakami H, Yoon S, Kasai A, *et al.* Dispersion and degradation of environmental DNA from caged fish in a marine environment [J]. *Fisheries Science*, 2019, **85**(2): 327-337.
- [33] Collins R A, Wangenstein O S, O'Gorman E J, *et al.* Persistence of environmental DNA in marine systems [J]. *Communications Biology*, 2018(1): 185.
- [34] Sales N G, Wangenstein 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.
- [35] Fraija- Fernández N, Bouquieaux M C, Rey A, *et al.* Marine water environmental DNA metabarcoding provides a comprehensive fish diversity assessment and reveals spatial patterns in a large oceanic area [J]. *Ecology and Evolution*, 2020, **10**(14): 7560-7584.
- [36] Ahn H, Kume M, Terashima Y, *et al.* Evaluation of fish biodiversity in estuaries using environmental DNA metabarcoding [J]. *PLoS One*, 2020, **15**(10): e0231127.
- [37] Pedersen M W, Overballe-Petersen S, Ermini L, *et al.* Ancient and modern environmental DNA [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 2015, **370**(1660): 20130383.
- [38] Rees H C, Maddison B C, Middleditch D J, *et al.* REVIEW: 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.

CORRELATION BETWEEN THE DENSITY OF CULTURED *SEBASTISCUS MARMORATUS* AND ITS ENVIRONMENTAL DNA

GAO Tian-Xiang¹, CHEN Zhi², WANG Xiao-Yan³, ZHANG Hao-Bo³ and SHI Hui-Lai⁴

(1. School of Fishery, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China; 2. College of Fisheries and Life Science, Hainan Tropical Ocean University, Sanya 572022, China; 3. National Engineering Research Center for Marine Aquaculture, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China; 4. Zhejiang Province Key Laboratory of Mariculture and Enhancement, Marine Fisheries Research Institute of Zhejiang, Zhoushan 316021, China)

Abstract: Environmental DNA (eDNA) analysis has become an important tool for biological resources research. *Sebastes marmoratus*, an important coral reef fish in Zhoushan coastal waters, has high economic value. To explore the relationship between the density of cultured *Sebastes marmoratus* and its eDNA, this study analyzed the *CO I* gene sequence of *Sebastes marmoratus* and other five relative species based on a set of specific primer and probe. Based on K2P model, the interspecific genetic distances between *Sebastes marmoratus* and other species were calculated with the maximum value of 0.3202 between *Sebastes marmoratus* and *Inimicus japonicus* and the minimum value of 0.2617 between *Sebastes marmoratus* and *Sebastes tertius*. 2, 4, 8, 16 and 32 individuals with average weight of 12.46 g were respectively cultured in five indoor buckets with a volume of 1 m³, and 20, 40 and 80 individuals were respectively in three outdoor ponds with a size of 40 m×15 m×0.3 m. The samples were taken at 0, 8h, 16h, 1d, 1.5d, 2d, 3d, 4d, 5d, 6d, 7d, 8d and 10d for extracting eDNA. It was concluded that eDNA reached a stable stage after 3d and 7d indoors and outdoors respectively. By fitting the linear correlation function between culture density and eDNA concentration at the stable stage, a highly significant positive correlation was found between culture density and eDNA concentration under the two culture conditions ($P < 0.001$, $R^2 \geq 0.9546$). The increase in eDNA concentration was higher in all indoor groups than that in the outdoor groups. This study provides a basis for eDNA monitoring and evaluation of *Sebastes marmoratus* resources.

Key words: Zhoushan; Stocking density; eDNA; *CO I*; Genetic distance; Positive correlation; *Sebastes marmoratus*