

不同环境样本类型对蚌类环境DNA监测的差异研究

雷姚 周春花 欧阳珊 吴小平

DIFFERENCES IN ENVIRONMENTAL DNA MONITORING OF FRESHWATER MUSSELS FROM DIFFERENT ENVIRONMENTAL SAMPLE TYPES

LEI Yao, ZHOU Chun-Hua, OUYANG Shan, WU Xiao-Ping

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.7541/2023.2022.0266>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于环境DNA宏条形码的洱海鱼类多样性研究

INVESTIGATING THE FISH DIVERSITY IN ERHAI LAKE BASED ON ENVIRONMENTAL DNA METABARCODING
水生生物学报. 2020, 44(5): 1080–1086 <https://doi.org/10.7541/2020.125>

环境因子对杭州西湖沉积物各形态磷释放的影响

EFFECTS OF VARYING ENVIRONMENTAL CONDITIONS ON RELEASE OF SEDIMENT PHOSPHORUS IN WEST LAKE, HANG ZHOU, CHINA
水生生物学报. 2017, 41(6): 1354–1361 <https://doi.org/10.7541/2017.167>

0#柴油对斑马鱼基因组DNA和环境DNA遗传毒性的RAPD比较

COMPARISON OF DIESEL GENOTOXICITY ON ZEBRAFISH GENOMIC DNA AND ENVIRONMENTAL DNA FROM WATER ENVIRONMENT OF ZEBRAFISH BY RAPD
水生生物学报. 2020, 44(4): 764–773 <https://doi.org/10.7541/2020.092>

池塘内循环流水养殖模式对养殖塘上覆水-沉积物-间隙水磷时空分布特征及释放通量的影响

EFFECTS OF INNER-CIRCULATION POND AQUACULTURE ON DISTRIBUTION AND RELEASE FLUX OF PHOSPHORUS IN THE OVERLAYING-SEDIMENT-INTERSTITIAL WATER
水生生物学报. 2021, 45(5): 1045–1056 <https://doi.org/10.7541/2021.2020.158>

落叶生境蛭态轮虫物种多样性及四种中国新记录种

SPECIES DIVERSITY OF BDELLOID ROTIFERS IN LEAF LITTER AND FOUR NEW RECORDS IN CHINA
水生生物学报. 2021, 45(2): 436–445 <https://doi.org/10.7541/2021.2019.275>

武汉东湖夏冬两季浮游动物物种多样性及群落结构研究

SPECIES DIVERSITY AND COMMUNITY STRUCTURE OF ZOOPLANKTON IN SUMMER AND WINTER IN THE EAST LAKE, WUHAN
水生生物学报. 2020, 44(4): 877–894 <https://doi.org/10.7541/2020.105>



关注微信公众号，获得更多资讯信息

doi: 10.7541/2023.2022.0266

不同环境样本类型对蚌类环境DNA监测的差异研究

雷 姚¹ 周春花^{1,2,3*} 欧阳珊^{1,2,3} 吴小平^{1,2,3*}

(1. 南昌大学生命科学学院, 南昌 330031; 2. 鄱阳湖环境与资源利用教育部重点实验室, 南昌 330031; 3. 江西省流域生态演变与生物多样性重点实验室, 南昌 330031)

摘要: 为了阐明在使用环境DNA宏条形码技术时不同环境样本类型如何影响蚌类物种的可检测性, 于2021年冬季和春季在鄱阳湖分别采集表层水、底层水和沉积物进行环境DNA宏条形码分析, 并结合传统方法采集验证。基于环境DNA宏条形码技术共检测到鄱阳湖蚌类33种, 传统方法共采集蚌类18种, 环境DNA宏条形码技术能检测出传统方法采集到的所有蚌类物种。表层水和底层水注释到的蚌类物种数均分别高于沉积物的, 且表层水和底层水注释到的蚌类物种分别完全覆盖沉积物的。基于环境DNA宏条形码技术的蚌类 α 多样性水平季节差异不显著, 但蚌类 β 多样性水平季节差异显著。表层水和底层水的蚌类多样性均显著高于沉积物样本的, Beta多样性分析也显示水体样本(表层水和底层水分别)和沉积物样本存在显著性差异。但表层水和底层水的蚌类多样性和群落结构均无显著差异。鄱阳湖蚌类群落结构与环境因子的关联分析表明水深(WD)、透明度(SD)、水温(WT)和总氮(TN)显著影响蚌类群落结构。环境DNA宏条形码技术在蚌类的多样性监测中可行, 且采水样比采沉积物效果好, 表层水和底层水无显著差异。

关键词: 环境DNA宏条形码; 沉积物; 水体样本; 物种多样性; 蚌类

中图分类号: S932.5

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2023)03-0412-12



淡水生态系统为人类的文明发展提供了宝贵资源, 然而却存在生物多样性丧失和调查研究不足的现状^[1]。物种是生物多样性的重要组成部分, 进行种质资源调查和监测是保护生物多样性的重要基石^[2], 在全球生物多样性丧失日益严重的背景下, 对生物多样性现状全面了解的需求尤为紧迫^[3]。长江是我国淡水资源的宝库, 但多年来受人类活动影响, 长江生物多样性持续下降, 水生态保护形势严峻^[4]。农业农村部于2020年1月1日颁布的《长江流域重点水域禁捕和建立补偿制度实施方案》提出长江要开始为期10年的全面禁渔, 且越来越多的大江大河开始加大禁渔力度、扩大禁渔区的范围。在禁渔条件下, 许多传统的监测水生生物的方法难以适应新的监测要求, 因此创新水生生物资源监测方法是重要的科学问题。

蚌类是大型底栖动物, 是生态系统中最重要

的生物类群之一。一方面, 它们被如底层鱼类的小型动物和一些鸟类所食用; 另一方面, 它们通过滤食水体中的营养物质、有机物和浮游生物从而达到净化水体的效果。蚌类在食物网中扮演着重要的角色, 栖息于湖泊或河流的淡水双壳类消失将会导致一系列的生态问题^[1]。最近几十年来, 全世界范围内蚌类种群密度和种类丰富程度等呈现明显的下降趋势, 部分种群自我恢复的能力远低于其物种数量减少的速度, 导致一些物种濒临灭绝或已灭绝^[2]。蚌类作为最易受威胁的淡水生物类群之一, 自20世纪90年代以来, 其种群呈明显的衰退趋势^[3]。蚌类的分布具有明显的地域特征, 北美蚌类特有种多集中于美国, 而亚洲蚌类最丰富的国家则是中国, 且集中分布在长江中下游地区^[4]。鄱阳湖是我国最大的淡水湖泊, 有着丰富的蚌类资源, 由于人类活动如挖沙、水体污染和过度捕捞等对蚌类的生存造

收稿日期: 2022-06-29; 修订日期: 2022-08-24

基金项目: 国家重点研发计划“蓝色粮仓”重点专项(2018YFD0900801); 2021年度江西省研究生创新专项(YC2021-S038)资助 [Supported by the National Key Research and Development Program of China (2018YFD0900801); the Special Fund for Postgraduate Innovation of Jiangxi Province in 2021 (YC2021-S038)]

作者简介: 雷姚(1996—), 女, 硕士研究生; 主要研究方向为环境DNA宏条形码生物多样性。E-mail: 1623829307@qq.com

通信作者: 周春花, 女, 博士, 副教授; 主要研究方向为生物多样性。E-mail: zhouchunhua@jxu.edu.cn 吴小平, 男, 博士, 教授; 主要研究方向为贝类学。E-mail: xpwu@ncu.edu.cn *共同通信作者

成了威胁,也影响了湖泊的正常生态功能^[5]。鄱阳湖的蚌类资源最早由Heude^[6]进行过采集和形态鉴定,之后林振涛^[7]、张玺等^[8]和刘月英等^[9]陆续对鄱阳湖蚌类进行了区系调查,吴小平等^[10]和欧阳珊等^[11]也分析了鄱阳湖蚌类的分布及资源现状。2009年的调查数据显示鄱阳湖有蚌类42种,其中包括中国特有种32种^[12]。2016—2017系统调查鄱阳湖大型底栖动物数据表明鄱阳湖有蚌类24种^[13]。通过与历史数据比较,发现鄱阳湖的蚌类物种丰富度和优势物种均显著减少。

虽然传统的调查方法在调查蚌类多样性方面发挥着不可替代的作用,但也存在如所需时间长、依赖专家经验、环境破坏性大、稀有物种调查不易、与禁渔政策相违背等诸多问题^[14]。环境DNA宏条形码(Environmental DNA metabarcoding, eDNA metabarcoding)技术直接从环境样本(如水、沉积物和土壤等)中提取DNA并使用针对目标物种的通用引物进行扩增,利用PCR和高通量测序(High-throughput sequencing, HTS)等技术,可在较短时间内实现对多个目标物种的鉴定^[15]。Prié等^[16]利用环境DNA宏条形码评估了西北北界淡水双壳类两个科的生物多样性。Klymus等^[17]利用环境DNA宏条形码方法检测了美国东南部的蚌科和珍珠蚌科。陈金萍等^[18]筛选出的宏条形码引物被证明在蚌类多样性研究中的有效性。

环境DNA调查信息丰富,可以补充其他生物多样性监测方法的不足,不同环境样本类型会影响物种可检测性和群落结构^[19]。Jennifer等^[20]将水体样本与沉积物样本检出的鱼类物种数与传统鱼类调查方法进行了比较,结果表明与沉积物相比,水体样本中提取的环境DNA所反映的物种数量较多,且更能反映鱼类群落的特征。Sakata等^[21]通过对不同环境样本类型进行比较发现,水体样本和沉积物样本检出的鱼类物种数量相当,但其物种组成之间差异显著。Kusanke等^[22]通过检测水体样本和沉积物样本中的濒危物种*Misgurnus fossilis*,发现目标生物在沉积物中的环境DNA浓度高于水体,这表明对于*M. fossilis*这种一生大部分时间都隐藏在沉积物中的物种而言,采集沉积物样本更适合。钱璐毅等^[23]通过采集表层水、中层水和底层水来分析在越冬洄游时中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)的分布情况,结果表明,在自然水体中,中国对虾的环境DNA呈现出底层浓度高于表层浓度的垂直分布规律。Moyer等^[24]为了确定环境DNA检测时的有效水层,以*Hemichromis letourneuxi*为目标生物,结果表明在进行环境DNA检测的最佳水层为表层水,底

层水次之。目前,环境DNA宏条形码在蚌类的研究中多采集表层水^[16,17],不同的环境样本类型对蚌类多样性及群落结构的差异研究还很少见。蚌类营底栖生活,因此我们提出假设:环境DNA宏条形码在蚌类多样性的研究中,沉积物样本检测的效果会优于水体样本,底层水的效果会优于表层水。

本研究结合传统蚌类调查方法,探索使用环境DNA宏条形码技术时,不同环境样本类型如何影响蚌类物种的可检测性,并对不同环境样本类型得到的蚌类多样性及群落结构差异进行探究。旨在探讨环境DNA宏条形码技术应用于蚌类多样性及群落结构的研究是否可行,并为后续蚌类环境DNA监测时的取样策略的选择提供依据。

1 材料与方法

1.1 样本采集

本研究分别于2021年1月19—21日(冬季)和4月28—30日(春季)在鄱阳湖采集环境水样和沉积物样本并进行蚌类传统方法的采集,共设置采样点17个,其中环境DNA采样点6个,17个采样点均进行传统方法的采集(图1)。在每个环境DNA采样点分别采集表层水(水面下约0.5 m)和底层水(湖底上方约1 m)各1 L于灭菌广口瓶中,冰上保存并尽快运回实验室过滤,且表层水和底层水在每个采样点均做3次重复。使用彼得森采泥器(面积为1/16 m²)采集沉积物,取0.5 g沉积物于50 mL样品瓶中,低温保存直至样本处理。使用边长为0.6 m的自制蚌耙在17个传统方法采样点,将蚌耙拉绳的一端固定于船尾,匀速拖拉50 m,打捞约30 m²内的蚌类。使用稀释的商业漂白剂溶液(>0.1%次氯酸钠溶液)对采样步骤中使用的所有设备进行灭菌以防污染。使用多参数水质仪(YSI650-MDS)记录各采样点的溶解氧(DO)、水温(WT)、酸碱度(pH)和叶绿素*a*(Chl. *a*)等环境参数。使用透明度盘进行透明度(SD)的测定。使用采泥器进行水深(WD)的估算。每个样点采集水样1 L,交于江西省九江市星子县环境监测站测定总氮(TN)和总磷(TP)。

1.2 样品处理

水样采集后于当天6h之内用0.45 μm的混合纤维素滤膜(天津津腾/JINTENG, 中国)对水样进行真空泵抽滤,以达富集环境DNA的目的,将各个样品的滤膜置于1.5 mL离心管中于-20℃冰箱冷冻保存。抽滤过程中所需设备及器材进行无菌处理,并使用超纯水作为阴性对照。将沉积物样本从-80℃冰箱拿出置于4℃消解,将消解好的沉积物称量0.25 g于1.5 mL离心管中,简短离心使其达到水泥分离的

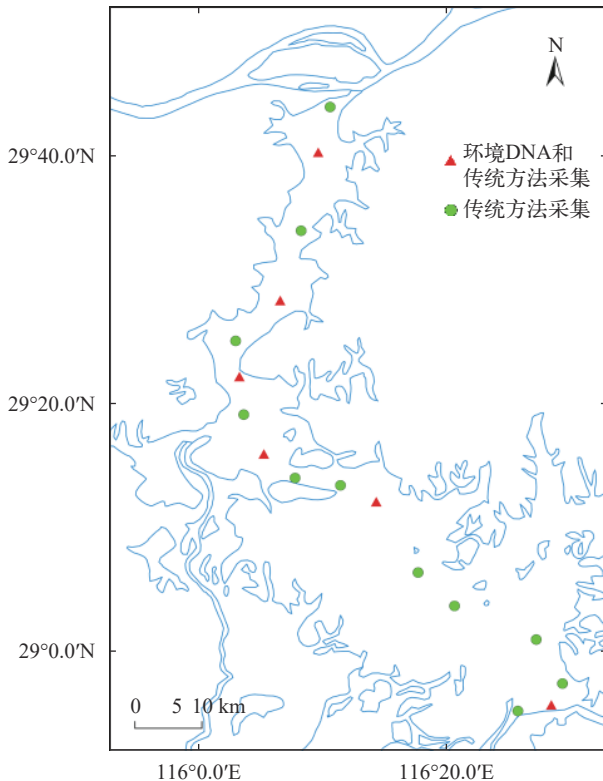


图1 鄱阳湖采样图

Fig. 1 Sampling map of Poyang Lake

状态。标本鉴定主要依据《中国经济动物志:淡水软体动物》^[9]。在实验室对每个样点的蚌类物种进行计数和称重。测量完的活体标本用95%的乙醇固定保存用于后续分子实验。

1.3 环境DNA提取与扩增

使用试剂盒DNeasy® Blood & Tissue Kit(Qiagen, Venlo, the Netherlands)并按照说明书进行滤膜DNA提取。使用试剂盒DNeasy® PowerSoil® Pro Kit Handbook(Qiagen, Venlo, the Netherlands)并按照说明书进行沉积物DNA提取。最后使用Qubit (Thermo Fisher Scientific, 中国)测定DNA浓度和质量。

使用蚌类的通用引物16SPp-F: 5'-TGAGCGTGCTAAGGTAGC-3'和16SPp-R: 5'-GCGGGGTC TTTTYGTCT-3'^[18], 对环境样本(水体样本和沉积物样本)的16S rRNA区域进行PCR扩增, 每个样本做3个重复扩增, 扩增片段长度约为147 bp。PCR反应采用20 μL体系, 其中包含: 5×FastPfu Buffer 4 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 2 μL, Forward Primer(5 μmol/L) 0.8 μL, Reverse Primer(5 μmol/L) 0.8 μL, FastPfu Polymerase 0.4 μL, Template DNA 10 ng, 补ddH₂O至20 μL。PCR反应程序: 95℃预变性5min, 29个循环包括: 95℃变性30s, 55℃退火30s, 72℃延伸45s; 最后72℃延伸10min, 4℃保存。使用ddH₂O为模板

设置PCR阴性对照, PCR阴性对照扩增结果未见异常。PCR扩增后所得产物经2%琼脂糖凝胶电泳检测后, 送至上海凌恩生物科技有限公司进行高通量测序。

1.4 高通量测序与质控

选择Illumina Miseq平台进行高通量测序。对下机数据进行筛选和过滤后得到有效序列。使用QIIME软件将有效序列聚类为可操作分类单元(Operational taxonomic unit, OTU), 获得OTU代表序列。OTU代表序列使用本地和公共数据库相结合的方式物种注释分析。本地数据库由鄱阳湖历史记录蚌类37种(物种信息见附录1)的线粒体全基因组序列或16S rRNA序列构成, 选择Nt数据库(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)作为公共数据。物种注释标准依据Valdivia-Carrillo等^[25], 以97%—100%确定为种; 94%—97%确定为属; 91%—94%确定为科; 88%—91%确定为目; <88%确定为纲。

1.5 数据分析

数据分析主要有: 物种组成分析、多样性分析和相关性Heatmap分析。

物种组成分析 物种组成分析选用相似水平为97%的OTU样本表。其中, 相对序列丰度计算了不同的蚌类物种在各采样点的reads之和。蚌类生物量计算了每个采样点约30 m²断面内活体蚌类的重量之和。

Alpha多样性分析 Alpha多样性选取Chao1指数、物种丰富度指数、香农指数和辛普森指数进行分析。其中, Chao1指数和Richness指数用于群落丰富度的估算。Shannon指数和Simpson指数则用于估算群落多样性。Chao1指数由Chao(1984)最早提出, Chao1值越大, 代表群落物种越丰富。

$$S_{\text{Chao1}} = S_{\text{obs}} + \frac{n_1(n_1 - 1)}{2(n_2 + 1)}$$

式中, S_{Chao1} 为估计的OTU数; S_{obs} 为实际观测到的OTU数; n_1 为只含有一条序列的OTU数目; n_2 为只含有两条序列的OTU数目。

物种丰富度指数(Species richness)是指群落中丰度大于0的物种数之和。Species richness指数值越大, 说明群落物种种类越丰富。

$$S = n$$

式中, S 为物种丰富度指数; n 为个体数(丰度)大于0的物种类型总数。

香农指数(Shannon index)是用来估算样本中生物多样性的指数之一。Shannon值越大, 说明群落多样性越高。

$$H_{\text{shannon}} = - \sum_{i=1}^{S_{\text{obs}}} \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$$

式中, S_{obs} =实际观测到的OTU数; n_i =第*i*个OTU所含的序列数; N =所有的序列数。

辛普森指数(Simpson index)是用于估算样本中生物多样性的指数之一。Simpson指数值越大, 说明群落多样性越低。

$$D_{\text{simpson}} = \frac{\sum_{i=1}^{S_{\text{obs}}} n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)}$$

式中, S_{obs} =实际观测到的OTU数; n_i =第*i*个OTU所含的序列数; N =所有的序列数。

Beta多样性分析 Beta多样性主要通过非度量多维尺度分析(Non-metric multidimensional scaling, NMDS)对群落结构进行研究。以胁迫系数(stress)来衡量NMDS结果的优劣, stress值越小越好, 当stress<0.05时为拟合极好, stress<0.1时为拟合较好, stress<0.2时为拟合一般, stress>0.3为拟合较差。选用相似性分析(Analysis of Similarities, ANOSIM)来验证组内差异是否显著小于组间(两组或多组)差异, 从而判断分组是否有意义。

相关性Heatmap分析 相关性Heatmap分析是以热图的形式呈现出物种与环境因子之间的相关性, 可观察物种与环境因子之间相关性的正负程度。*为 $P<0.05$, **为 $P<0.01$, ***为 $P<0.001$, 不同的颜色代表不同的R值, 热图最右侧的色卡是不同R值的颜色分区。

2 结果

2.1 鄱阳湖蚌类物种组成分析

本研究基于Illumina PE250测序对36个样本进行高通量测序, 经质控和过滤, 共得到有效序列22320294条, 平均序列长度115 bp, 在97%的相似水平下进行OTU聚类, 共得到33686个OTU。本研究共注释到蚌类33种, 其中30种是鄱阳湖记录种(表1)。从季节来看, 冬季注释到蚌类28种, 春季注释到蚌类32种。从环境样本来看, 表层水注释到蚌类32种, 底层水注释到蚌类32种, 沉积物注释到蚌类28种。传统方法在17个采样点共采集蚌类18种, 其中冬季采集到17种, 春季采集到11种。基于环境DNA宏条形码技术能检测出传统方法采集到的所有蚌类物种, 其中, 表层水除剑状矛蚌未检测到外, 其余传统方法采集到的蚌类物种均可检测到; 底层水能检测到传统方法采集到的所有物种; 沉积物中除剑状矛蚌、卵形尖嵴蚌、舟行无齿蚌和猪耳弓背蚌未检测到外, 其余传统方法采集到的蚌类物种均可检测

到。本次测序结果相对序列丰度最高的为橄榄蛭蚌(1754829), 其次为圆顶珠蚌(579313)。传统方法采集到的蚌类生物量最高的为洞穴丽蚌(84.29 g/m²), 其次为扭状矛蚌(65.26 g/m²; 表2)。从环境DNA宏条形码中获得的相对序列丰度与蚌类生物量之间不存在正相关关系。

蚌类动物线粒体的遗传方法是双单亲遗传, 存在母系和父系来源的序列。本研究使用的引物能分辨母系和父系来源的序列。有的物种只可分辨父系来源的序列如洞穴丽蚌, 有的物种只可分辨母系来源的序列有: 高顶鳞皮蚌、蚌形无齿蚌、中国尖嵴蚌、龙骨蛭蚌、角月丽蚌、褶纹冠蚌、尖锄蚌、天津尖丽蚌、矛形楔蚌、环带尖丽蚌、短褶矛蚌、光滑无齿蚌、卵形尖嵴蚌、舟形无齿蚌和三角小蛭蚌。有的物种可分辨母系和父系来源的序列。在能分辨母系和父系来源的序列物种中, 有的父系reads多, 有的母系reads多(表3)。

2.2 鄱阳湖蚌类物种Alpha多样性分析

基于环境DNA宏条形码的鄱阳湖蚌类Alpha多样性从季节上看, 虽然春季的Chao1指数和Richness指数均高于冬季, 但春季和冬季Alpha多样性水平无显著性差异($P=0.282$; 图2)。从环境样本类型来看, 表层水的Chao1指数和Richness指数显著高于沉积物的, 底层水的Chao1指数和Richness丰富度指数极显著高于沉积物的。底层水的Shannon多样性指数和Simpson指数和沉积物的均有显著性差异。表层水和底层水多样性水平没有差异(图3)。

2.3 鄱阳湖蚌类物种Beta多样性分析

基于环境DNA宏条形码的鄱阳湖蚌类结果进行Bray-Curtis NMDS分析表明冬季与春季的蚌类群落相似性的Stress值为0.1509, 进一步地ANOSIM分析显示: R 值>0, 即组间差异大于组内差异, 分组有意义, $P<0.01$, 即春季和冬季的环境DNA宏条形码注释到的鄱阳湖蚌类群落结构差异达到极显著性水平($R=0.252$, $P=0.001$; 图4)。从环境样本类型来看, Stress值为0.1509, ANOSIM分析中, R 值大于0, 整体 P 值小于0.01, 表明不同环境样本类型的整体群落结构组成具有极显著差异, 进一步的ANOSIM分析表明表层水和底层水的环境DNA注释到的鄱阳湖蚌类群落结构差异尚未达到显著性水平($R=0.002$, $P=0.398$); 表层水和沉积物的蚌类的群落结构有显著性差异($R=0.148$, $P=0.032$); 底层水和沉积物的蚌类的群落结构差异达到极显著性水平($R=0.272$, $P=0.007$; 图5)。

2.4 基于环境DNA宏条形码技术的鄱阳湖蚌类群落结构与环境因子的关联分析

基于环境DNA宏条形码技术检测到的蚌类物

种数据进行冗余分析(Redundancy analysis, RDA)显示环境因子中水深(WD)、透明度(SD)、水温(WT)和总氮(TN)均显著影响排序结果(表 4)。

各蚌类物种与环境因子之间的相关性Heat-map分析表明: 河蚌蚌、扭状矛蚌、矛形楔蚌、圆

头楔蚌、短褶矛蚌、橄榄蛭蚌、鱼尾楔蚌和背角无齿蚌均与溶解氧和总氮呈显著或极显著负相关, 与水深呈显著或极显著正相关。大多数的蚌类物种与叶绿素 a 、透明度和水温之间呈显著或极显著正相关。蚌类与酸碱度和总磷的相关性不大(图 6)。

表 1 环境DNA方法检出的蚌类与传统方法采集的蚌类

Tab. 1 Mussels detected by environmental DNA methods and collected by traditional methods

蚌类物种Mussels species	环境DNA方法Environmental DNA method						传统方法Traditional method	
蚌目Unionida	冬季Winter			春季 Spring			冬季 Winter	春季 Spring
蚌科 Unionidae	表层水 Surface Water	底层水 Bottom Water	沉积物 Sediment	表层水 Surface Water	底层水 Bottom Water	沉积物 Sediment		
1 三角小蛭蚌 <i>Parvasolenia triangularis</i>				+				
2 河小蛭蚌 <i>Parvasolenia rivularis</i>				+	+	+		
3 橄榄蛭蚌 <i>Sinosolenia oleivora</i>	+	+	+	+	+	+		
4 龙骨蛭蚌 <i>Sinosolenia carinata</i>	+	+	+	+	+			
5 三角帆蚌 <i>Sinohyriopsis cumingii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
6 背角无齿蚌 <i>Sinanodonta woodiana</i>	+	+	+	+	+	+	+	
7 光滑无齿蚌 <i>Sinanodonta lucida</i>	+	+	+					
8 <i>Sinanodonta fukudai</i>	+	+	+	+	+	+		
9 棘裂脊蚌 <i>Schistodesmus spinosus</i>	+	+	+	+	+	+		
10 射线裂脊蚌 <i>Schistodesmus lampreyanus</i>	+	+	+	+	+	+	+	
11 尖锄蚌 <i>Ptychorhynchus pfisteri</i>	+	+	+	+		+		
12 圆顶珠蚌 <i>Nodularia douglasiae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
13 高顶鳞皮蚌 <i>Lepidodesma languilati</i>	+	+	+	+	+	+		
14 扭状矛蚌 <i>Lanceolaria lanceolata</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
15 短褶矛蚌 <i>Lanceolaria grayii</i>				+	+	+	+	
16 剑状矛蚌 <i>Lanceolaria gladiola</i>					+		+	+
17 背瘤丽蚌 <i>Lamprotula leaii</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
18 角月丽蚌 <i>Lamprotula cornuumlunae</i>	+	+	+	+	+	+		
19 洞穴丽蚌 <i>Lamprotula caveata</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
20 鱼尾扭楔蚌 <i>Arcuneopsis pisciculus</i>	+	+	+	+	+	+	+	
21 圆头楔蚌 <i>Cuneopsis heudei</i>		+	+	+	+	+	+	+
22 矛形楔蚌 <i>Cuneopsis celtiformis</i>	+	+		+	+	+		
23 巨首伪楔蚌 <i>Pseudocuneopsis capitata</i>	+	+	+	+	+	+		
24 扁棱蚌 <i>Pletholophus tenuis</i>	+	+	+	+	+	+		
25 褶纹冠蚌 <i>Cristaria plicata</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
26 鸭无齿蚌 <i>Anodonta anatina</i>	+	+	+	+	+	+		
27 舟形无齿蚌 <i>Anemina euscaphys</i>	+	+		+	+			+
28 蛞形无齿蚌 <i>Anemina arcaeformis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
29 卵形尖嵴蚌 <i>Acuticosta ovata</i>		+		+	+		+	
30 中国尖嵴蚌 <i>Acuticosta chinensis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
31 环带尖丽蚌 <i>Aculamprotula zonata</i>	+	+		+	+	+	+	
32 天津尖丽蚌 <i>Aculamprotula tientsinensis</i>	+	+	+	+	+	+		
珍珠蚌科Margaritiferidae								
33 猪耳弓背蚌 <i>Gibbosula rochechouartii</i>				+	+		+	
总计 Total	26	28	24	31	30	26	17	11

注: Total表示环境DNA宏条形码方法在同一季节选择不同环境样本类型检出的物种总数和传统方法在不同季节检出的物种总数

Note: Total represents the total number of species detected by the environmental DNA metabarcoding method in different environmental sample types in the same season and the Total number of species detected by the traditional method in different seasons

表 2 环境DNA相对序列丰度与传统方法蚌类生物量对比

Tab. 2 Relative sequence abundance of environmental DNA species compared with biomass of mussels by traditional methods

环境DNA相对序列丰度 Relative sequence abundance of environmental DNA		传统方法蚌类生物量 Biomass of mussels by traditional methods	
物种 Species	相对序列丰度 Relative sequence abundance	物种 Species	蚌类生物量 Biomass of mussels (g/m ²)
橄榄蛭蚌 <i>Sinosolenia oleivora</i>	1754829	洞穴丽蚌 <i>Lamprotula caveata</i>	84.29
圆顶珠蚌 <i>Nodularia douglasiae</i>	579313	扭状矛蚌 <i>Lanceolaria lanceolata</i>	65.26
背角无齿蚌 <i>Sinanodonta woodiana</i>	556164	三角帆蚌 <i>Sinohyriopsis cumingii</i>	41.75
三角帆蚌 <i>Sinohyriopsis cumingii</i>	116263	圆顶珠蚌 <i>Nodularia douglasiae</i>	31.59
高顶鳞皮蚌 <i>Lepidodesma languilati</i>	94677	中国尖嵴蚌 <i>Acuticosta chinensis</i>	28.90
扭状矛蚌 <i>Lanceolaria lanceolata</i>	69282	背瘤丽蚌 <i>Lamprotula leaii</i>	26.71
鱼尾扭楔蚌 <i>Cuneopsis pisciculus</i>	64192	褶纹冠蚌 <i>Cristaria plicata</i>	12.92
洞穴丽蚌 <i>Lamprotula caveata</i>	49042	蚌形无齿蚌 <i>Anemina arcaeformis</i>	8.61
蚌形无齿蚌 <i>Anemina arcaeformis</i>	41042	背角无齿蚌 <i>Sinanodonta woodiana</i>	8.27
中国尖嵴蚌 <i>Acuticosta chinensis</i>	14991	短褶矛蚌 <i>Lanceolaria grayii</i>	5.89

表 3 环境DNA方法鉴定的蚌类F型和M型reads数

Tab. 3 Number of F-type and M-type reads identified by environmental DNA method

物种 Species	F型 F-type (reads)	M型 M-type (reads)
橄榄蛭蚌 <i>Sinosolenia oleivora</i>	1754135	694
圆顶珠蚌 <i>Nodularia douglasiae</i>	39081	540232
扭状矛蚌 <i>Lanceolaria lanceolata</i>	13086	56196
背角无齿蚌 <i>Sinanodonta woodiana</i>	4326	546462
棘裂脊蚌 <i>Schistodesmus spinosus</i>	4158	239
背瘤丽蚌 <i>Lamprotula leaii</i>	2839	9328
射线裂脊蚌 <i>Schistodesmus lampreyanus</i>	1358	716
三角帆蚌 <i>Sinohyriopsis cumingii</i>	970	115293
巨首伪楔蚌 <i>Pseudocuneopsis capitata</i>	582	15
河小蛭蚌 <i>Parvasolenia rivularis</i>	58	1244
鱼尾扭楔蚌 <i>Arcuneopsis pisciculus</i>	37	64155
圆头楔蚌 <i>Cuneopsis heudei</i>	27	7248

3 讨论

3.1 基于环境DNA高通量测序的鄱阳湖蚌类物种组成

本研究利用环境DNA宏条形码技术在鄱阳湖共注释到蚌类33种, 而传统方法共采集蚌类18种, 且环境DNA注释到的蚌类物种覆盖了传统方法采集到的所有物种。这说明环境DNA宏条形码技术在蚌类的监测中分辨率高于传统方法的。这与陈金萍的调查结果一致^[18]。Prié等^[16]在其他双壳类的研究中也得出类似的结果。本研究注释到的33种蚌类中有30种是鄱阳湖历史记录种, 还有3种鄱阳湖非记录种: 扁棱蚌*P. tenuis*和鸭无齿蚌*A. anatina*和*S. fukudai*(该物种主要分布在韩国, 故没有找

到相应的中文名字), 原因可能是本地数据库不完整造成的假阳性。如扁棱蚌、鸭无齿蚌和*S. fukudai*代表的OTU在本地数据库中注释到的分别是蚌形无齿蚌、扭状矛蚌和背角无齿蚌, 序列相似度分别为96.43%、95.53%和96.43%; 而在公共数据库中注释到的分别是扁棱蚌、鸭无齿蚌和*S. fukudai*, 序列相似度分别为97.32%、97.30%和97.32%。利用环境DNA宏条形码技术进行物种鉴定时, 所获结果的可靠性依赖于参考数据库的完整性和质量^[26, 27]。

本研究统计相对序列丰度高的物种分别为橄榄蛭蚌和圆顶珠蚌等, 而在传统调查中生物量高的物种分别为洞穴丽蚌和扭状矛蚌等(表 2)。虽然相对序列丰度受物种丰度的影响, 在一定程度上相对序列丰度体现了物种在环境中可能具有的丰度相互关系^[28], 但二者的相关性不太确定^[29, 30], 而且环境中物种DNA的释放、运输和降解, 到环境样本的采集与提取、目的片段的扩增和高通量测序, 这些因素都会影响相对序列丰度与物种丰度的关系^[31]。橄榄蛭蚌有历史生物量的记录, 且橄榄蛭蚌的生物量不高^[32]。本研究传统采样方法中没有采集到橄榄蛭蚌活体(只采到空壳), 但是环境DNA相对序列丰度却最高, 可能跟以下两个因素有关。一是跟传统方法采样所用的工具有关, 传统方法采样通常用彼得森采泥器或自制蚌耙, 而橄榄蛭蚌的生活习性不同于其他蚌类, 使用彼得森采泥器或自制蚌耙比较难采到; 二是引物偏好性导致的环境DNA相对序列丰度高。

本研究中很多的蚌类物种只可分辨母系来源的序列, 是因为数据库中父系数据的缺失。蚌类在繁殖期雄性个体将精子排到水中, 而雌性个体的成熟卵细胞则聚集于鳃水管内, 接着精子通过水流而

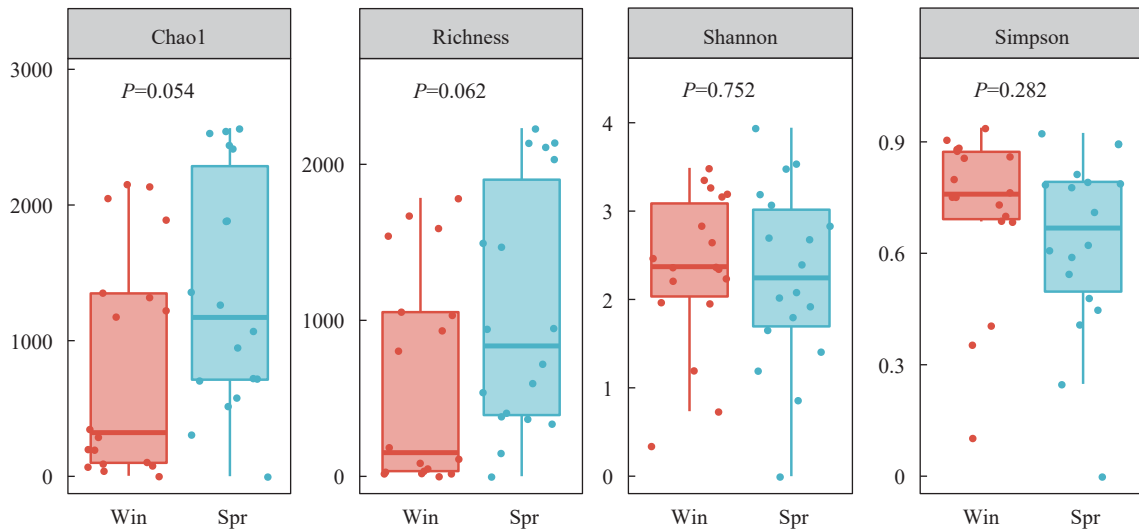


图2 不同季节Alpha多样性水平差异检验箱线图

Fig. 2 Box plot of Alpha diversity level difference test in different seasons

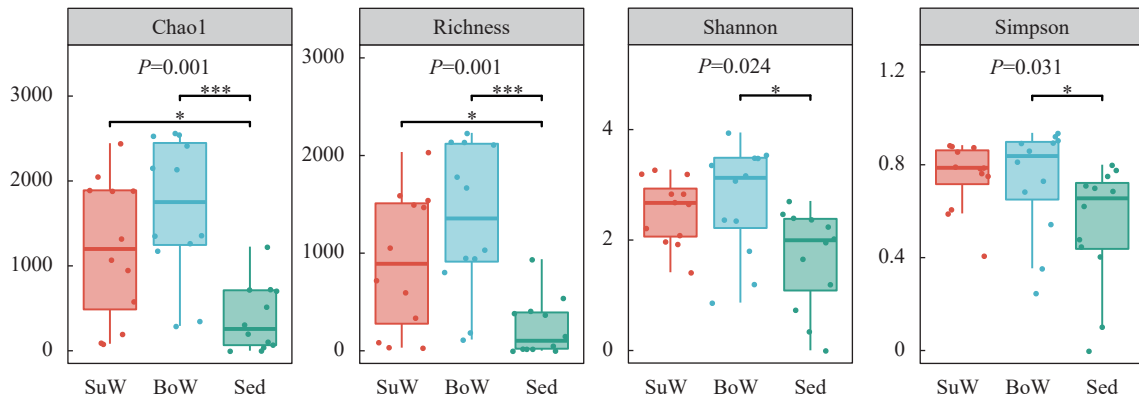


图3 不同环境样本类型Alpha多样性水平差异检验箱线图

Fig. 3 Box plot of Alpha diversity level difference test for different environmental sample types

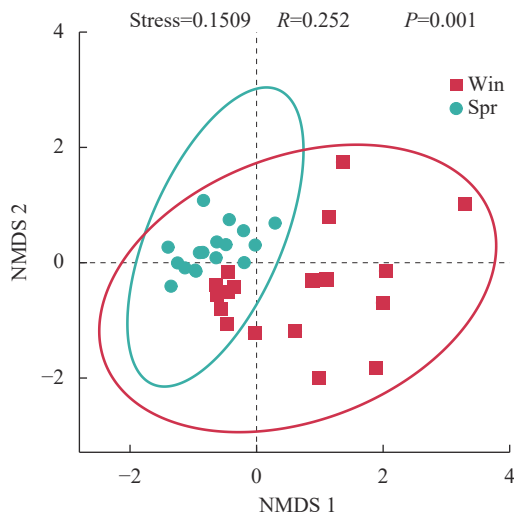


图4 冬季和春季注释到的蚌类群落NMDS排序

Fig. 4 NMDS ordination of mussel communities annotated in winter and spring

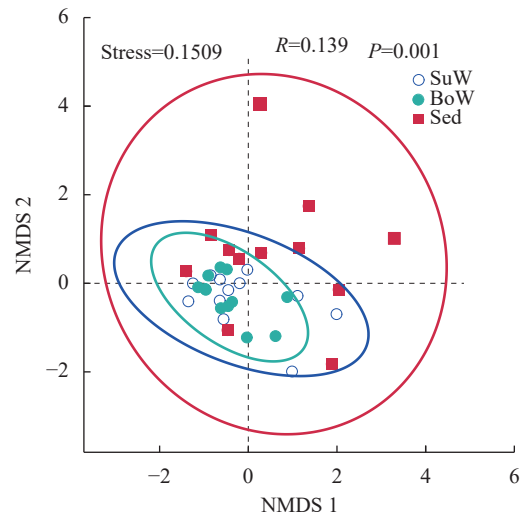


图5 表层水、底层水和沉积物注释到的蚌类群落NMDS排序

Fig. 5 NMDS ordination of mussel communities annotated by surface water, bottom water and sediment

进入雌蚌鳃水管, 完成卵细胞的受精过程^[33]。在能分辨父系和母系来源的序列物种中, 繁殖期正逢采样期的物种通常父系reads多于母系的, 如背角无齿蚌和圆顶珠蚌^[34]; 繁殖期不处在采样期的物种通常母系reads更多, 如橄榄蛭蚌^[35]。

3.2 基于环境DNA高通量测序的鄱阳湖蚌类多样性分析

基于环境DNA宏条形码的鄱阳湖蚌类Alpha多样性显示冬季和春季的蚌类多样性水平差异不显著, 传统方法的研究也表明蚌类多样性水平季节差异不显著^[36]。春季注释到的蚌类物种数多于冬季, 这和多数蚌类所处的繁殖期恰好是本研究的采样

期有关; 传统方法的采集显示冬季采集到的物种数多于春季, 这与冬季较低的水位有关。基于Bray-Curtis距离矩阵的Beta多样性分析显示鄱阳湖冬季和春季的蚌类群落结构差异显著, 这可能与这两个季节分别注释到的物种数不同有关。

水体样本注释到的蚌类物种数多于沉积物样本注释到的物种数, 水体样本蚌类Alpha多样性水平显著高于沉积物样本的, Beta多样性分析也显示水体样本和沉积物样本存在显著性差异。水体中环境DNA来源广泛, 释放进入水体的DNA因沉降作用而在沉积物中积累, 而沉积物又在外力(如垂直流、底栖生物扰动和人为干扰等)作用下再悬浮^[37], 向周围释放环境DNA, 使得水体中环境DNA浓度升高, 从而使得水体样本检出的物种种类和多样性值均高于沉积物样本。表层水和底层水注释到的蚌类物种数一样多, 表层水和底层水Alpha和Beta多样性均无差异, 这说明蚌类的环境DNA在水体中无垂直分布差异。表层水和底层水注释到的蚌类物种数均分别高于沉积物的, 且表层水和底层水注释到的蚌类物种分别完全覆盖沉积物的(表 1)。这些结果表明在进行蚌类的环境DNA研究时采水样比采沉积物效果好, 且表层水和底层水无显著差异。

3.3 基于环境DNA高通量测序的鄱阳湖蚌类物种与环境因子的冗余分析

本研究通过关联鄱阳湖蚌类物种信息和环境因子表明水深(WD)显著影响排序结果, 这和陈金萍的结果一致^[18]。这与蚌类喜栖息在浅水区有关。过深的水位通过影响光照强度, 降低水体透光性, 从而影响生物的光合作用, 使得浮游生物的生产量降低^[38], 使得蚌类食物来源减少。且随着水深

表 4 环境因子对蚌类群落结构的差异性检验

Tab. 4 Difference test of environmental factors on community structure of mussels

指标Index	RDA1	RDA2	r ²	P
WD	0.995466226	0.09511568	0.72477152	0.005
SD	0.849474828	0.527629147	0.770609356	0.006
WT	0.892100843	0.451836348	0.890834561	0.003
DO	-0.956115923	0.292988639	0.380127151	0.134
Chl a	0.014973502	-0.999887891	0.34094901	0.147
pH	-0.68553222	0.72804229	0.083753168	0.690
TN	-0.907708975	-0.419600306	0.616024561	0.021
TP	0.982101366	-0.188353143	0.218769306	0.342

注: 水深(WD)、透明度(SD)、水温(WT)、溶解氧(DO)、叶绿素a(Chl. a)、酸碱度(pH)、总氮(TN)和总磷(TP); 0.01<P<0.05, 显著性; 0.001<P<0.01, 极显著性; P≤0.001, 极显著性

Note: water depth (WD), depth of Secchi disk (SD), water temperature (WT), dissolved oxygen (DO), chlorophyll a (Chl. a), pH (pH), total nitrogen (TN), total phosphorus (TP). 0.01<P<0.05, significant; 0.001<P<0.01, extremely significant; P≤0.001, extremely significant

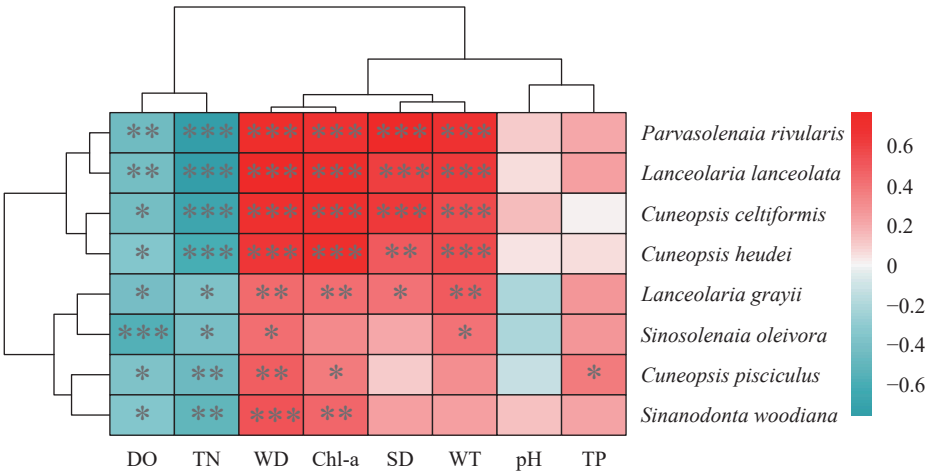


图 6 蚌类物种与环境因子的相关性Heatmap分析

Fig. 6 Heatmap analysis of correlation between mussel species and environmental factors

0.01<*P<0.05, 显著性; 0.001<***P<0.01, 极显著性; ***P≤0.001, 极显著性

0.01<*P<0.05, significant; 0.001<***P<0.01, extremely significant; ***P≤0.001, extremely significant

增加,溶解氧(DO)含量降低^[39],过低的溶解氧会对水生生物产生不利影响^[40];而在水位过浅时,蚌类暴露和被捕食的风险也将增加^[41]。透明度(SD)、水温(WT)和总氮(TN)也是造成冬季和春季蚌类物种群落结构变化的重要环境因子。透明度是判断水体藻类多寡的最直观的指标^[42],蚌类的食物组成与水体藻类组成有紧密关系^[43],故透明度也是影响蚌类群落结构变化的因子之一,传统方法对蚌类研究也得出相同的结果^[12]。适宜的水温,不仅可以提高蚌类摄食强度和新陈代谢强度^[36],还有利于浮游植物的生长与繁殖^[44]。蚌类对氨的敏感性很高,尤其是在其幼虫和幼体阶段^[45,46]。Galbraith等^[47]的结果表明:蚌类物种丰富度的长期下降与氮浓度的增加有关,故总氮(TN)也是显著影响蚌类物种群落结构的重要因子之一。也有研究报道鱼尾楔蚌与水温成正相关,与溶解氧呈负相关,这是因为鱼尾楔蚌的呼吸和排泄与水温息息相关,在一定水温范围内,随着水温的升高,鱼尾楔蚌的耗氧率和排氨率均增加^[48]。水温作为控制溶解氧分布和变化最重要的环境因子^[49],水温的增加会使溶解氧浓度降低^[50,51]。

4 结论

环境DNA宏条形码技术能够有效地检测蚌类物种,提供关于其物种组成和群落结构的数据,能发现传统方法中经常被低估的稀有物种或很难找到的物种。使用环境DNA宏条形码技术监测蚌类资源时采水样比采沉积物效果好,且表层水和底层水无显著差异。完善的参考数据库可增加检测的可靠性,同时不过度依赖分类学专家。但参考数据库的构建需要分类学专家的协助以确保正确的物种鉴定。在环境DNA研究的发展领域中读数和生物量之间的关系,以及这些关系如何受到环境变量、特定环境DNA来源等的影响还是不清楚。随着环境DNA宏条形码技术的不断发展,我们预计它将会越来越多地被用于描述水生生物的多样性,为水生生态系统的保护和管理提供依据。

致谢:

感谢郭婷、吴陈慧孜、贾晨等在水样采集工作中提供的帮助;感谢黄晓晨老师和代雨婷在数据分析方面提供的帮助。

参考文献:

[1] Graf D L, Cummings K S. Review of the systematics and global diversity of freshwater mussel species (Bivalvia: Unionoida) [J]. *Journal of Molluscan Studies*, 2007,

73(4): 291-314.

- [2] Lydeard C, Cowie R H, Ponder W F, *et al.* The global decline of nonmarine mollusks [J]. *BioScience*, 2004, 54(4): 321-330.
- [3] Liu X J, Wu R W, Lopes-Lima M, *et al.* Changes and drivers of freshwater mussel diversity patterns in the middle and lower Yangtze River Basin, China [J]. *Global Ecology and Conservation*, 2020(22): e00998.
- [4] Wu X P. Studies on freshwater mollusca in mid-lower reaches of Changjiang River [D]. Wuhan: Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, 1998: 1-5. [吴小平. 长江中下游淡水贝类的研究 [D]. 武汉: 中国科学院水生生物研究所, 1998: 1-5.]
- [5] Shu F Y, Wang H J, Pan B Z, *et al.* Assessment of species status of mollusca in the mid-lower Yangtze Lakes [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, 33(6): 1051-1058. [舒凤月, 王海军, 潘保柱, 等. 长江中下游湖泊贝类物种濒危状况评估 [J]. 水生生物学报, 2009, 33(6): 1051-1058.]
- [6] Heude P M. Conchyliologie Fluviale de la Province de Nanking [M]. Paris: F. Savy, 1874.
- [7] Lin Z T. Unionidae (Mollusca) of Poyang Lake, Kiangsi Province, China [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1962, 14(2): 249-260. [林振涛. 鄱阳湖的蚌类 [J]. 动物学报, 1962, 14(2): 249-260.]
- [8] Tchang S, Li S C. Bivalves (Mollusca) of the Poyang Lake and surrounding waters, Kiangsi Province, China, with description of a new species [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1965, 17(3): 309-319. [张玺, 李世成. 鄱阳湖及其周围水域的双壳类包括一新种 [J]. 动物学报, 1965, 17(3): 309-319.]
- [9] Liu Y Y, Zhang W Z, Wang Y X, *et al.* Economic Fauna of China-Freshwater Mollusks [M]. Beijing: Science Press, 1979: 66-125. [刘月英, 张文珍, 王跃先, 等. 中国经济动物志-淡水软体动物 [M]. 北京: 科学出版社, 1979: 66-125.]
- [10] Wu X P, Ouyang S, Hu Q Y. Bivalves (Mollusca) of the Poyang Lake [J]. *Journal of Nanchang University (Natural Science)*, 1994, 18(3): 249-252. [吴小平, 欧阳珊, 胡起宇. 鄱阳湖的双壳类 [J]. 南昌大学学报(理科版), 1994, 18(3): 249-252.]
- [11] Ouyang S, Zhan C, Chen T H, *et al.* Species diversity and resource assessment of macrozoobenthos in Poyang Lake [J]. *Journal of Nanchang University (Engineering & Technology)*, 2009, 31(1): 9-13. [欧阳珊, 詹诚, 陈堂华, 等. 鄱阳湖大型底栖动物物种多样性及资源现状评价 [J]. 南昌大学学报(工科版), 2009, 31(1): 9-13.]
- [12] Xiong L F, Ouyang S, Chen T H, *et al.* Diversity patterns of freshwater mussels in Poyang Lake area [J]. *Journal of Nanchang University (Natural Science)*, 2011, 35(3): 288-295. [熊六凤, 欧阳珊, 陈堂华, 等. 鄱阳湖区淡水蚌类多样性格局 [J]. 南昌大学学报(理科版), 2011, 35(3): 288-295.]

- [13] Li K. Temporal and spatial patterns of macrozoobenthos community in Poyang Lake and its connected waters [D]. Nanchang: Nanchang University, 2019: 18-19. [李科. 鄱阳湖及其连通水域大型底栖动物群落时空格局 [D]. 南昌: 南昌大学, 2019: 18-19.]
- [14] Ge Y S, Cheng Q Q. Environmental DNA and its application in aquatic biodiversity [J]. *Fishery Information & Strategy*, 2020, **35**(1): 55-62. [葛玉双, 程起群. 环境DNA及其在水生生物多样性调查中的应用 [J]. 渔业信息与战略, 2020, **35**(1): 55-62.]
- [15] Shu L, Lin J Y, Xu Y, *et al.* Investigating the fish diversity in Erhai Lake based on environmental DNA metabarcoding [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2020, **44**(5): 1080-1086. [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.]
- [16] Prié V, Valentini A, Lopes-Lima M, *et al.* Environmental DNA metabarcoding for freshwater bivalves biodiversity assessment: methods and results for the Western Palearctic (European sub-region) [J]. *Hydrobiologia*, 2021, **848**(12): 2931-2950.
- [17] Klymus K E, Richter C A, Thompson N, *et al.* Metabarcoding assays for the detection of freshwater mussels (Unionida) with environmental DNA [J]. *Environmental DNA*, 2021, **3**(1): 231-247.
- [18] Chen J P. Analysis of the mussel and fish diversity in Poyang Lake using environmental DNA metabarcoding [D]. Nanchang: Nanchang University, 2021: 10-45. [陈金萍. 基于环境DNA宏条形码的鄱阳湖蚌类和鱼类多样性研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2021: 10-45.]
- [19] Deiner K, Bik H M, Mächler E, *et al.* Environmental DNA metabarcoding: transforming how we survey animal and plant communities [J]. *Molecular Ecology*, 2017, **26**(21): 5872-5895.
- [20] Shaw J L A, Clarke L J, Wedderburn S D, *et al.* Comparison of environmental DNA metabarcoding and conventional fish survey methods in a river system [J]. *Biological Conservation*, 2016(197): 131-138.
- [21] Sakata M K, Watanabe T, Maki N, *et al.* Determining an effective sampling method for eDNA metabarcoding: a case study for fish biodiversity monitoring in a small, natural river [J]. *Limnology*, 2021, **22**(2): 221-235.
- [22] Kusanke L M, Panteleit J, Stoll S, *et al.* Detection of the endangered European weather loach (*Misgurnus fossilis*) via water and sediment samples: testing multiple eDNA workflows [J]. *Ecology and Evolution*, 2020, **10**(15): 8331-8344.
- [23] Qian T Y, Wang W J, Li M, *et al.* A preliminary study on the vertical distribution of *fenneropenaeus chinensis* environmental DNA in the Yellow Sea and its influencing factors [J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, **42**(2): 1-9. [钱塘毅, 王伟继, 李苗, 等. 黄海中国对虾环境DNA(eDNA)的垂直分布规律及其影响因素初探 [J]. 渔业科学进展, 2021, **42**(2): 1-9.]
- [24] 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.
- [25] Valdivia-Carrillo T, Rocha-Olivares A, Reyes-Bonilla H, *et al.* Integrating eDNA metabarcoding and simultaneous underwater visual surveys to describe complex fish communities in a marine biodiversity hotspot [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2021, **21**(5): 1558-1574.
- [26] Rey A, Basurko O C, Rodriguez-Ezpeleta N. Considerations for metabarcoding-based port biological baseline surveys aimed at marine nonindigenous species monitoring and risk assessments [J]. *Ecology and Evolution*, 2020, **10**(5): 2452-2465.
- [27] Yang J H. Biodiversity of zooplankton and community effects of environmental pollution in Tai Lake Basin [D]. Nanjing: Nanjing University, 2017: 19-20. [杨江华. 太湖流域浮游动物物种多样性与环境污染群落生态效应研究 [D]. 南京: 南京大学, 2017: 19-20.]
- [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] Cowart D A, Murphy K R, Cheng C H C. Metagenomic sequencing of environmental DNA reveals marine faunal assemblages from the West Antarctic Peninsula [J]. *Marine Genomics*, 2018(37): 148-160.
- [30] 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.
- [31] Li H X, Huang X N, Li S G, *et al.* Environmental DNA (eDNA)-metabarcoding-based early monitoring and warning for invasive species in aquatic ecosystems [J]. *Biodiversity Science*, 2019, **27**(5): 491-504. [李晗溪, 黄雪娜, 李世国, 等. 基于环境DNA-宏条形码技术的水生生态系统入侵生物的早期监测与预警 [J]. 生物多样性, 2019, **27**(5): 491-504.]
- [32] Hu C L. Study on the community structure of macrozoobenthos in Poyang Lake [D]. Nanchang: East China Institute of Technology, 2014: 21. [胡成龙. 鄱阳湖大型底栖动物群落结构研究 [D]. 南昌: 东华理工大学, 2014: 21.]
- [33] Xue T T. The community structure and historical change of species diversity of unionids in four lakes in the middle and lower reaches of the Yangtze River [D]. Nanchang: Nanchang University, 2018: 1. [薛涛涛. 长江中下游四个湖泊蚌类群落结构及物种多样性历史变化 [D]. 南昌: 南昌大学, 2018: 1.]
- [34] Liu Y J. Resource status and reproductive traits of freshwater bivalves in the Poyang Lake [D]. Nanchang: Nanchang University, 2008: 30-32. [刘勇江. 鄱阳湖淡水双壳类的资源状况及优势种繁殖特性 [D]. 南昌: 南昌大学, 2008: 30-32.]

- [35] Yang X L, Li H C, Song L. Gonadal development and growth of freshwater mussel *Solenia oleivora* [J]. *Fisheries Science*, 2011, **30**(9): 580-582. [杨小林, 李昊成, 宋浪. 橄榄蛭蚌性腺发育与生长 [J]. *水产科学*, 2011, **30**(9): 580-582.]
- [36] Xiong L F. Resource status, diversity patterns of freshwater mussels in Poyang Lake area and its response to the different environmental factors [D]. Nanchang: Nanchang University, 2011: 83-96. [熊六凤. 鄱阳湖区淡水蚌类资源现状、多样性格局及其对不同环境因子的响应 [D]. 南昌: 南昌大学, 2011: 83-96.]
- [37] Turner C R, Uy K L, Everhart R C. Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water [J]. *Biological Conservation*, 2015(183): 93-102.
- [38] Zhang Z L, Huang L Z. Influence of quarrying in Poyang Lake on the ecological environment [J]. *Jiangxi Hydraulic Science & Technology*, 2008, **34**(1): 7-10. [张子林, 黄立章. 浅析鄱阳湖采砂对生态环境的影响 [J]. *江西水利科技*, 2008, **34**(1): 7-10.]
- [39] Ma J W, Liu J L, Li Y, *et al.* Effect of physical factors on dissolved oxygen in Baiyang Lake [J]. *China Rural Water and Hydropower*, 2013(8): 21-24. [马建薇, 刘俊良, 李燕, 等. 物理因素对白洋淀溶解氧的影响 [J]. *中国农村水利水电*, 2013(8): 21-24.]
- [40] Deng S S. Dissolved oxygen in lowland Jiaying Rivers [D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2013: 5-6. [邓思思. 嘉兴平原河网溶解氧平衡研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2013: 5-6.]
- [41] Stone N M, Earll R, Hodgson A, *et al.* The distributions of three sympatric mussel species (Bivalvia: Unionidae) in budworth mere, Cheshire [J]. *Journal of Molluscan Studies*, 1982, **48**(3): 266-274.
- [42] Luo D T, Yang P H, Luo Z Y, *et al.* Study on the optimum demand of freshwater pearl mussel for planktonic algae [J]. *Animals Breeding and Feed*, 2017(1): 19-23. [罗丹婷, 杨品红, 骆贞耀, 等. 淡水育珠蚌对浮游藻类最佳需求量的研究 [J]. *养殖与饲料*, 2017(1): 19-23.]
- [43] Su Y P, Chen X B, Liu H B, *et al.* The dietary algae at different juvenile stages of *Anodonta woodiana* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, **21**(4): 736-746. [苏彦平, 陈修报, 刘洪波, 等. 背角无齿蚌幼蚌食物中的藻类组成 [J]. *中国水产科学*, 2014, **21**(4): 736-746.]
- [44] Li Y H, Zhong J Y, Guo C J. Study on physicochemical environment parameters in typical mussel aquaculture regions in the Poyang Lake—take Duchang waters for example [J]. *Journal of Hydroecology*, 2014, **35**(2): 9-13. [李艳红, 钟家有, 郭春晶. 鄱阳湖典型蚌类养殖区理化环境参数研究——以都昌水域为例 [J]. *水生态学杂志*, 2014, **35**(2): 9-13.]
- [45] Augspurger T, Keller A E, Black M C, *et al.* Water quality guidance for protection of freshwater mussels (Unionidae) from ammonia exposure [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2003, **22**(11): 2569-2575.
- [46] Keller A, Lydy M, Ruessler D S. Unionid mussel sensitivity to environmental contaminants [J]. *Freshwater bivalve ecotoxicology*, 2007: 151-167.
- [47] Galbraith H S, Spooner D E, Vaughn C C. Synergistic effects of regional climate patterns and local water management on freshwater mussel communities [J]. *Biological Conservation*, 2010, **143**(5): 1175-1183.
- [48] Li L M, He L H. Effects of water temperature and salinity on oxygen consumption rate of different specifications of *Cuneopsis pisciculus* [J]. *Hebei Fisheries*, 2016(2): 13-15. [李林明, 何亮华. 水温、盐度对不同规格鱼尾楔蚌耗氧率的影响 [J]. *河北渔业*, 2016(2): 13-15.]
- [49] Chen H S, Yan L J. Study on changing characteristics of dissolved oxygen and its relationship to water temperature in changtan reservoir in Zhejiang Province [J]. *Bulletin of Science and Technology*, 2015, **31**(3): 249-253. [陈海生, 严力蛟. 浙江省长潭水库溶解氧变化特性及其与水温相关性 [J]. *科技通报*, 2015, **31**(3): 249-253.]
- [50] Pan X Z, Gao Y R, Li J, *et al.* Dissolved oxygen in water and influencing factors of Qiantang River in Hangzhou section [J]. *Environmental Protection Science*, 2011, **37**(4): 13-16. [潘向忠, 高玉蓉, 李佳, 等. 钱塘江杭州段水体中溶解氧现状及其影响因素 [J]. *环境保护科学*, 2011, **37**(4): 13-16.]
- [51] Rao H M, Huang W Y. Discussion on influencing factor of content of dissolved oxygen in water [J]. *Journal of Salt Science and Chemical Industry*, 2017, **46**(3): 40-43. [饶胡敏, 黄旺银. 影响水体中溶解氧含量因素的探讨 [J]. *盐科学与化工*, 2017, **46**(3): 40-43.]

DIFFERENCES IN ENVIRONMENTAL DNA MONITORING OF FRESHWATER MUSSELS FROM DIFFERENT ENVIRONMENTAL SAMPLE TYPES

LEI Yao¹, ZHOU Chun-Hua^{1,2,3}, OUYANG Shan^{1,2,3} and WU Xiao-Ping^{1,2,3}

(1. College of Life Science, Nanchang University, Nanchang 330031, China; 2. Ministry of Education, Key Laboratory of Environment and Resource Utilization of Poyang Lake, Nanchang University, Nanchang 330031, China; 3. Jiangxi Province Key Laboratory of Watershed Ecosystem Change and Biodiversity, Nanchang 330031, China)

Abstract: In order to clarify how different environmental sample types affect the detectability of mussel species when using environmental DNA metabarcoding technology, surface water, bottom water and sediment were collected in Poyang Lake in winter and spring of 2021 for environmental DNA metabarcoding analysis, and then combined with traditional methods for collection and verification. A total of 33 species of mussels from Poyang Lake were detected by environmental DNA metabarcoding technology, while 18 species were collected by traditional methods. All the species collected by traditional methods could be detected by environmental DNA metabarcoding technology. The number of mussel species annotated in surface water and bottom water was respectively higher than that in sediment, and the mussel species annotated in surface water and bottom water completely covered sediment, respectively. There was no significant seasonal difference in α diversity level of mussels based on environmental DNA metabarcoding, but significant seasonal difference in β diversity level of mussels. The mussel diversity in both surface and bottom water was significantly respectively higher than that in sediment samples. The Beta diversity analysis also showed significant differences between water samples (surface and bottom water respectively) and sediment samples. But there were no significant differences in the diversity and community structure between surface and bottom water. Water depth (WD), depth of Secchi disk (SD), water temperature (WT) and total nitrogen (TN) significantly affected the community structure of mussels in Poyang Lake. Environmental DNA metabarcoding is feasible in monitoring mussel freshwater diversity, and water sampling is better than sediment sampling. There is no significant difference between surface water and bottom water.

Key words: Environmental DNA metabarcoding; Sediment; Water samples; Species diversity; Freshwater mussels