

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20221107001

http://www.yykxjz.cn/

陈治, 蔡杏伟, 申志新, 张清风, 李芳远, 谷圆, 李高俊, 赵光军, 王镇江. 海南岛淡水鱼类 eDNA 宏条形码 CO I 通用引物的筛选. 渔业科学进展, 2023, 44(6): 40–57

CHEN Z, CAI X W, SHEN Z X, ZHANG Q F, LI F Y, GU Y, LI G J, ZHAO G J, WANG Z J. Screening universal CO I primers for eDNA metabarcoding of freshwater fishes on Hainan Island. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(6): 40–57

# 海南岛淡水鱼类 eDNA 宏条形码 CO I 通用引物的筛选\*

陈治<sup>1,2</sup> 蔡杏伟<sup>1①</sup> 申志新<sup>1</sup> 张清风<sup>1</sup> 李芳远<sup>1</sup>  
谷圆<sup>1</sup> 李高俊<sup>1</sup> 赵光军<sup>1</sup> 王镇江<sup>1</sup>

(1. 海南省海洋与渔业科学院 海南 海口 571126;

2. 海南热带海洋学院 热带海洋生物资源利用与保护教育部重点实验室 海南 三亚 572022)

**摘要** 已知的鱼类环境 DNA (environmental DNA, eDNA) 宏条形码通用引物主要位于线粒体核糖体基因区, 这些 12S 和 16S 引物存在部分近缘鱼类无法识别及参考序列不足等问题。本研究以海南岛淡水鱼类为调查对象, 基于 8 目 26 科 101 属 150 种鱼类 CO I 序列, 筛选出 6 个侧翼保守区; 综合碱基变异、物种鉴定、eDNA 降解及高通量测序读长需求, 在 4 个侧翼保守区设计了 26 条引物, 其中 6 条引物未达到 Premier 评分要求; 72 种海南淡水鱼类的首轮 PCR 结果显示, 有 11 条引物的通用性较高, 其中, PCR 成功种数  $\geq 70$  且条带亮度均大于 marker 的引物有 5 条; 次轮 PCR 结果显示, 5 条引物相互搭配产生的 3 (正向)  $\times$  2 (反向) 套引物组合的扩增成功率均为 100% (72 种/72 种), 经 PCR 条带长度、亮度筛选后表现最优的引物组合为“HN-A-F4、HN-D-R3” (以下简称 HN-CO I)。30 个水样高通量测序结果显示, HN-CO I 产生的待分析序列总数、鱼类序列总数、OTUs 总数和鱼类 OTUs 总数分别为 MiFish-U 的 0.77 倍 (8 919 976/11 532 126)、1.22 倍 (2 264 965/1 863 905)、0.85 倍 (406/477) 和 1.32 倍 (86/65); HN-CO I 产生的鱼类 OTUs 注释到种、属、科及科以上水平的占比分别为 81.40%、11.63% 和 6.98%, MiFish-U 则分别为 81.54%、4.62% 和 13.85%。“引物+水样”的 NMDS 聚类图形成边界明显的 2 组 (胁强系数=0.15); HN-CO I 的属内物种扩增子两两遗传距离最小值及平均值均分别是 MiFish-U 的 1.23 倍 (0.006 9/0.005 6) 和 1.57 倍 (0.155 9/0.099 4)。室内 6 个密度组鲤鱼 (*Cyprinus carpio carpio*) “生物量–拷贝数”线性回归方程的相关系数较低, HN-CO I 及 MiFish-U 均无法准确反映鲤鱼的生物量。本研究筛选并比较了 HN-CO I 与 MiFish-U 的优劣, 表明 HN-CO I 对海南岛淡水鱼类具有更高的靶向性, 不仅在防止微生物、哺乳类等非目标生物 eDNA 污染方面有优势, 而且更有利于海南岛淡水鱼类的检出和准确鉴定。

**关键词** 海南岛; 淡水鱼类; eDNA; CO I; 通用引物

中图分类号 S931.2 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2023)06-0040-18

\* 国家自然科学基金(32002389)、海南省自然科学基金(422RC717)、海南省重点研发计划(ZDYF2021XDNY299)和海南热带海洋学院引进人才科研启动资助项目(RHDC201907)共同资助。陈治, E-mail: change@139.com

① 通信作者: 蔡杏伟, 副研究员, E-mail: caixw618@163.com

收稿日期: 2022-11-07, 收修改稿日期: 2022-12-28

淡水鱼类是水域生态系统的重要组成部分,对保持生态平衡、维系人与自然和谐发展起着至关重要的作用(程馨雨等, 2019)。海南省是中国唯一的热带岛屿省份,气候条件独特,岛内存在丰富的淡水鱼类特有种(李高俊等, 2020)。然而,由于过度捕捞、环境污染等原因,海南岛淡水鱼类生境遭到严重破坏,淡水鱼类资源量急剧衰退。根据 2015—2017 年对海南省淡水鱼类的全面调查数据(申志新等, 2018),与 1986 年相比,海南省已有 14.15%的淡水鱼类处于野外缺失状态,大鳞鲢(*Hypophthalmichthys harmandi*)、大鳞光唇鱼(*Acrossocheilus ikedai*)、海南鳅鲇(*Gobiobotia kollerii*)等 15 种特有种可能已经灭绝或濒临灭绝。对海南岛淡水鱼类特有种进行有效保护迫在眉睫。准确掌握鱼类的群落构成和资源分布是后续制定各类保护区的基础和前提(申志新等, 2018)。在鱼类资源严重衰退的背景下,仅依靠刺网、笼壶、绳钩等传统物种多样性调查手段进行资源调查会给调查对象带来不同程度的机体损伤。环境 DNA (environmental DNA, eDNA)是生物体释放于空气、水体、土壤等环境样本中的游离 DNA 总称(Ficetola *et al.*, 2008; Thomsen *et al.*, 2012; Valentini *et al.*, 2016)。近年来, eDNA 技术开始广泛应用于鱼类、甲壳类、两栖类、头足类、海洋哺乳类等类群的多样性调查(Thomsen *et al.*, 2015; 单秀娟等, 2018; 钱璐毅等, 2021)。该技术具有调查灵敏度高、对调查对象和所在生境干扰小等优点(张辉等, 2020; 陶洁等, 2021),可以作为鱼类多样性调查的重要补充手段之一(Yoccoz, 2012)。

通用引物对 eDNA 宏条形码技术的应用具有直接影响。已知的鱼类 eDNA 宏条形码通用引物主要位于线粒体(mtDNA) 12S rRNA (以下简称 12S)、16S rRNA (以下简称 16S)基因区(Zhang *et al.*, 2020),这些核糖体基因区引物普遍存在部分近缘鱼类难以识别的问题。如蒋佩文等(2022)基于 CO I 和 12S 基因构建珠江河口鱼类 eDNA 宏条形码数据库发现, 172 种鱼类的 CO I 条形码可形成明显的条形码间隙,全部鱼类均可有效鉴定;而 12S 条形码则有 11 种鱼类(占总种类的 6.4%)存在区分困难的情况。Schenekar 等(2020)、陈锦孝(2022)在各自的鱼类 eDNA 研究中也发现了此问题。此外,相比于 CO I 条形码,目前公共数据库内的 12S 和 16S 条形码序列数量不足。陈治等(2022)统计了 123 种(基于 CO I)、117 种(基于 12S)、115 种(基于 16S)海南岛淡水鱼类在 NCBI 数据库内的参考序列情况,发现平均每种鱼类有 21.98 条(CO I)、5.54 条(12S)、6.40 条(16S)参考序列。这表明 12S 和 16S 条形码覆盖的地理群体更少,不能有效反映不同地理群体的条形码变异情况。针对该问题, Sato 等(2018)基于标本馆样品和 Mitofish 数据库构建专门的

鱼类 12S eDNA 宏条形码数据库,但该数据库的建设时间较短,目前仅完成了数千种鱼类的参考序列构建,且以海洋鱼类为主。因此,短期内该数据库无法为淡水鱼类 eDNA 研究提供广泛支持。从近缘鱼类鉴定准确性及可用参考序列两方面考虑,有必要针对海南岛淡水鱼类开发 eDNA 宏条形码 CO I 通用引物。本研究将在此方面进行尝试,以期为海南岛淡水鱼类多样性研究提供一定的技术支持。

## 1 材料与方法

本研究将基于数据库(自建+公共)内已有序列设计多组 CO I 条形码引物;基于课题组积累的海南岛淡水鱼类样品使用 PCR 技术初步筛选所设计引物。野外采集水样,通过高通量测序技术比较所设计引物与已有引物的鱼类多样性调查差异。实验室饲养不同密度组的鲤鱼(*Cyprinus carpio carpio*),考察所设计引物的定量准确性。

### 1.1 目标序列筛选或扩增

根据《海南淡水及河口鱼类图鉴》(申志新等, 2021)、《海南岛淡水及河口鱼类原色图鉴》(李新辉等, 2020)、《海南岛淡水及河口鱼类志》(珠江水产研究所等, 1986)等资料统计海南岛淡水鱼类名录(含对应拉丁学名)。登录 NCBI 数据库(<https://ncbi.nlm.nih.gov/>),下载对应物种的线粒体 CO I 条形码 seq 文件(优先下载线粒体全序列、含有标本凭证信息和来自海南岛及临近水域的序列)。同时,采用 Ward 等(2005)设计的引物组合扩增实验室积累的部分海南岛淡水鱼类 CO I 条形码片段。PCR 引物(Fish-F1/F2 和 Fish-R1/R2)见 Ward 等(2005),反应条件和步骤参考蒋佩文等(2022)。使用 DNASTAR 软件包中的 SeqMan 程序核对序列长度、方向及所在链,删除 overlap 区短、含有简并碱基或插入/缺失位点的序列。

### 1.2 侧翼保守区筛选及引物设计

使用 MegAlign 程序中的“ClustalW method”多重比对功能生成“.pau”文件,基于 DnaSP 5.01 程序将该文件转化为“.meg”文件;使用 MEGA7 软件将保守位点用绿色背景标注并生成“.xlsx”文件。采用目测法筛选侧翼保守区:保守区长度 $\geq 18$  bp,密码子第 1、2 位点不发生任何变异,密码子第 3 位点如有变异则必须仅为转换。将引物序列输入 Primer Premier 6.0 软件,查看退火温度(annealing temperature,  $T_m$ )、GC 含量等基本信息,并基于默认参数记录引物 Premier 评分等级:理论扩增效率 $\geq 80\%$ 的评分等级为 Best,  $80\% >$ 扩增效率 $\geq 50\%$ 的评分等级为 Good, 扩增效率 $< 50\%$ 的评分等级为 Poor。

### 1.3 PCR 筛选

共有 72 种海南岛淡水鱼类(见表 1 中用\*标注的物种)用于 PCR 筛选。为了减少工作量,首轮 PCR 统一使用“Fish-R1+Fish-R2”(1:1 混合,作为反向引物)或“Fish-F1+Fish-F2”(1:1 混合,作为正向引物)作为本研究所设计引物的配套引物进行单引物筛选;次轮 PCR 则对首轮 PCR 筛选出的单引物进行排列组合,从中筛选出最优引物组合。PCR 体系总体积为 25  $\mu\text{L}$ ,包括 PCR 混合液(天根生化科技有限公司)12.5  $\mu\text{L}$ 、灭菌蒸馏水 10  $\mu\text{L}$ 、上下游引物(10  $\mu\text{mol/L}$ )各 1  $\mu\text{L}$ 、DNA 样品 0.5  $\mu\text{L}$ 。PCR 条件为 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 20 s,  $T_m$  温度下退火 20 s ( $T_m$  = “正向引物  $T_m$  + 反向引物  $T_m$ ”的平均值), 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 20 s, 共 39 个循环;最后 72  $^{\circ}\text{C}$  再延伸 5 min。扩增后对 PCR 产物进行凝胶电泳检测,各取 2.5  $\mu\text{L}$  的 PCR 产物于 1% 的琼脂糖凝胶中,电压 220 V,电泳 5 min,最后在凝胶成像系统上拍照。将 jpg 格式胶图导入 Photoshop 2022 软件,调节图片亮度,分别统计原图状态及胶图上 100、200、500、1 000 和 2 000 bp marker 恰好肉眼不可见(以下简称 marker 不可见)时扩增条带情况。

### 1.4 水样采集及高通量测序

为了方便运输、降低 eDNA 降解风险,在 G98 海南环岛高速与南渡江(编号 ND: 110 $^{\circ}$ 25'33"E, 19 $^{\circ}$ 56'54"N)、昌化江(编号 CH: 108 $^{\circ}$ 54'31"E, 19 $^{\circ}$ 13'56"N)、万泉河(编号 WQ: 110 $^{\circ}$ 26'30"E, 19 $^{\circ}$ 15'12"N)交汇处共设置 3 个水样采集点,每个取样点取 10 个平行样。每个平行样用直径 47 mm、孔径 0.45  $\mu\text{m}$  的 WCN 硝酸纤维滤膜抽滤 5 L。抽滤后的滤膜用液氮冷冻保存后送至华大基因青岛研究院进行高通量测序。所用引物为本研究 PCR 筛选出的 CO I 引物与 MiFish-U (12S)引物(Miya *et al.*, 2015)。建库类型为全基因组测序(whole genome sequencing, WGS),测序平台为 BGISEQ-500RS。对测序后的序列进行质控等生物信息学操作后得到可操作分类管理单元(operational taxonomic units, OTUs),将 OTUs 与 DNA 条形码参考数据库(自建数据库及 GenBank 库、MitoFish 库等)进行 BLAST 注释分析。对于相似性  $\geq 99\%$  的鱼类,记录其所在的种;相似性在 97%~99% 的鱼类,记录其所在的属;相似性在 95%~97% 的鱼类,记录其所在的科(Miya *et al.*, 2015)。同时,基于 Kimura 双参数模型(Kimura-2-parameter, K2P),采用最大似然法(maximum likelihood, ML)计算 OTUs 间的两两遗传距离(pairwise distance),评估不同引物的

物种鉴别差异。

使用非度量多维尺度(non-metric multidimensional scaling, NMDS)方法对鱼类出现结果[0,1]矩阵进行排序,该分析在 Canoco 5.0 软件中完成(魏亚男等, 2017)。选用 Bray-Curtis 距离,因其在范围和范围的坐标轴上都具有稳健性(Kruskal *et al.*, 1964)。分析结果以胁迫系数(stress)作为评判标准:当 stress < 0.2 时,认为可以用 NMDS 的二维点图表示,该图形有一定的解释意义;当 stress < 0.1 时,认为该排序是一个好的排序;当 stress < 0.05 时,则认为该排序结果具有很好的代表性(Newmaster *et al.*, 2008; 魏亚男等, 2017)。NMDS 运算的步骤如下:(1)将鱼类出现情况(仅分析确定种,未定种、属及属以上阶元不分析)处理为[0,1]矩阵,鱼类出现为 1,不出现为 0;以“水系+引物名”为首行储存 xlsx 格式的[0,1]矩阵;(2)打开 Canoco 5.0 软件,加载 xlsx 文档,给定 table name,选择“import all species as factors”,其余选择默认参数,完成矩阵导入;(3)“analyses”对话框内点击“new”选项,选择“Canoco Adviser”,调出 NMDS 分析程序;(4)“stress formula”选择“type 1”,“treatment of ties in distance”选择“secondary”,其余选择默认参数。

### 1.5 “生物量-拷贝数”定量拟合

于热带海洋生物资源利用与保护教育部重点实验室内设置 6 个容积为 1  $\text{m}^3$ 、具有相同换水装置的圆形水桶,用于比较所用引物的 eDNA 定量差异。每个水桶用 10%次氯酸钠充分消毒后,在水桶中加入 0.5  $\text{m}^3$  淡水(淡水已进行多级沉淀、过滤和消毒)。水桶内的水体源头独立、无相互交汇。水体更新速度恒定保持为 0.5 L/min,多余水体从溢流管流出,使体积保持不变。分别在这 6 个水桶中加入 1、2、4、8、16、32 尾均重为 23.68 g 的鲤鱼,在充分供氧条件下,统一喂食一定数量的鱼饵。在加入鲤鱼 15 d 后,对每个水桶采集 500 mL 水样,共取 3 个平行样,同时取等体积纯净水作为空白对照组。取样方式及滤膜处理方式与野外式样相同。使用 R 软件(version 4.0.3)中的“basicTrendline”包对剔除阴性对照后的高通量测序分子拷贝数及不同尾数组进行散点图拟合,计算“生物量-拷贝数”定量拟合线性回归方程和相关系数。

## 2 结果与分析

### 2.1 序列筛选结果

经物种名核对、碱基比对等过程筛选,本研究用于引物设计的鱼类共计 8 目、26 科、101 属、150 种(表 1)。

表 1 本研究用于引物设计的鱼类名录及序列号

Tab.1 Species and accession number of fishes used for primer design in this study

| 目<br>Order                     | 科<br>Family             | 属<br>Genus               | 种<br>Species                          | 序列号<br>Accession No.          |                          |          |
|--------------------------------|-------------------------|--------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|--------------------------|----------|
| 鳗鲡目<br>Anguilliformes          | 鳗鲡科 Anguillidae         | 鳗鲡属 <i>Anguilla</i>      | 花鳗鲡 <i>A. marmorata</i>               | AP007242                      |                          |          |
|                                |                         |                          | 日本鳗鲡 <i>A. japonica</i>               | AB038556                      |                          |          |
| 鲮形目<br>Cyprinodontiformes      | 花鲮科 Poeciliidae         | 花鲮属 <i>Poecilia</i>      | 孔雀花鲮 <i>P. reticulata</i>             | AB898687                      |                          |          |
|                                |                         |                          | 茉莉花鲮 <i>P. latipinna</i>              | KT175511                      |                          |          |
| 颌针鱼目<br>Beloniformes           | 怪颌鲮科 Adrianichthyidae   | 食蚊鱼属 <i>Gambusia</i>     | 食蚊鱼 <i>G. affinis</i>                 | AP004422*                     |                          |          |
|                                |                         |                          | 青鲮属 <i>Oryzias</i>                    | 青鲮 <i>O. latipes</i>          | AP008938                 |          |
|                                |                         |                          |                                       | 弓背青鲮 <i>O. curvinotus</i>     | KY364884                 |          |
| 合鳃鱼目<br>Synbranchiformes       | 合鳃鱼科 Synbranchidae      | 黄鳝属 <i>Monopterus</i>    | 黄鳝 <i>M. albus</i>                    | KP779625                      |                          |          |
|                                | 刺鲃科 Mastacembelidae     | 刺鲃属 <i>Mastacembelus</i> | 大刺鲃 <i>M. armatus</i>                 | KY609156*                     |                          |          |
| 脂鲤目<br>Characiformes           | 脂鲤科 Characidae          | 巨脂鲤属 <i>Piaractus</i>    | 短盖巨脂鲤 <i>P. brachypomus</i>           | KJ993871                      |                          |          |
|                                | 鲮脂鲤科 Prochilodontidae   | 鲮脂鲤属 <i>Prochilodus</i>  | 条纹鲮脂鲤 <i>P. lineatus</i>              | KY825189                      |                          |          |
| 鲇形目<br>Siluriformes            | 鲇科 Siluridae            | 隐鳍鲇属 <i>Pterocryptis</i> | 越南隐鳍鲇 <i>P. cochinchinensis</i>       | KR028479*                     |                          |          |
|                                |                         |                          | 糙隐鳍鲇 <i>P. anomala</i>                | MT433099                      |                          |          |
|                                |                         |                          | 鲇属 <i>Silurus</i>                     | 鲇 <i>S. asotus</i>            | MK895951                 |          |
|                                |                         |                          |                                       | 大口鲇 <i>S. meridionalis</i>    | JX087350                 |          |
|                                | 胡子鲇科 Clariidae          |                          | 胡子鲇属 <i>Clarias</i>                   | 棕胡子鲇 <i>C. fuscus</i>         | KJ819540                 |          |
|                                |                         |                          |                                       | 革胡子鲇 <i>C. gariepinus</i>     | KT001082                 |          |
|                                |                         |                          |                                       | 蟾胡子鲇 <i>C. batrachus</i>      | KC572134                 |          |
|                                | 芒鲇科 Pangasiidae         |                          | 芒鲇属 <i>Pangasius</i>                  | 苏氏芒鲇 <i>P. sutchi</i>         | KC846907                 |          |
|                                | 甲鲇科 Loricariidae        |                          | 下口鲇属 <i>Hypostomus</i>                | 下口鲇 <i>H. plecostomus</i>     | KM576100                 |          |
|                                | 鲿科 Bagridae             |                          | 黄颡鱼属 <i>Pelteobagrus</i>              | 黄颡鱼 <i>P. fulvidraco</i>      | MK104136                 |          |
|                                |                         |                          |                                       | 中间黄颡鱼 <i>P. intermedius</i>   | MK335935*                |          |
|                                |                         |                          |                                       | 拟鲿属 <i>Pseudobagrus</i>       | 瓦氏拟鲿 <i>P. vachellii</i> | HM746660 |
|                                |                         |                          |                                       | 粗唇拟鲿 <i>P. crassilabris</i>   | JX867257                 |          |
|                                |                         |                          |                                       | 海南拟鲿 <i>P. hainanensis</i>    | MW980438*                |          |
| 疯鲿属 <i>Tachysurus</i>          |                         |                          |                                       | 纵纹疯鲿 <i>T. virgatus</i>       | MT647840*                |          |
| 纵带疯鲿 <i>T. argentivittatus</i> |                         |                          |                                       | KX164404                      |                          |          |
| 半鲿属 <i>Hemibagrus</i>          | 斑点半鲿 <i>H. guttatus</i> | KJ584373                 |                                       |                               |                          |          |
| 鮡科 Sisoridae                   |                         | 纹胸鮡属 <i>Glyptothorax</i> | 海南纹胸鮡 <i>G. fokiensis hainanensis</i> | HQ593584*#                    |                          |          |
| 鲴科 Ictaluridae                 |                         | 真鲴属 <i>Ictalurus</i>     | 斑点叉尾鲴 <i>I. punctatus</i>             | MF621720                      |                          |          |
| 鲈形目<br>Perciformes             | 真鲈科 Percichthyidae      | 少鳞鳊属 <i>Coreoperca</i>   | 中国少鳞鳊 <i>C. whiteheadi</i>            | KJ149811                      |                          |          |
|                                | 丽鱼科 Cichlidae           | 灿丽鱼属 <i>Petenia</i>      | 灿丽鱼 <i>P. splendida</i>               | KJ914664*                     |                          |          |
|                                |                         |                          | 口孵罗非鱼属                                | 莫桑比克罗非鱼 <i>O. mossambicus</i> | AY597335                 |          |
|                                |                         |                          | <i>Oreochromis</i>                    | 尼罗罗非鱼 <i>O. niloticus</i>     | MT437356*                |          |
|                                |                         |                          | 奥利亚罗非鱼 <i>O. aureus</i>               | OW770257                      |                          |          |
| 鲈形目<br>Perciformes             | 丽鱼科 Cichlidae           | 罗非鱼属 <i>Tilapia</i>      | 齐氏罗非鱼 <i>T. zillii</i>                | MW194077*                     |                          |          |
|                                |                         |                          | 伦氏罗非鱼 <i>T. rendalli</i>              | MG438461                      |                          |          |

续表

| 目<br>Order            | 科<br>Family               | 属<br>Genus                         | 种<br>Species                   | 序列号<br>Accession No.         |                             |
|-----------------------|---------------------------|------------------------------------|--------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 鲈形目<br>Perciformes    | 丽鱼科<br>Cichlidae          | 罗非鱼属 <i>Tilapia</i>                | 布氏奇罗非鱼 <i>T. buttikoferi</i>   | KF866133                     |                             |
|                       |                           | 帚齿罗非鱼属 <i>Sarotherodon</i>         | 伽利略帚齿罗非鱼 <i>S. galilaeus</i>   | MW194078                     |                             |
|                       |                           | 副丽鱼属 <i>Parachromis</i>            | 花身副丽鱼 <i>P. managuensis</i>    | KP728467*                    |                             |
|                       |                           | 丽鱼属 <i>Cichla</i>                  | 眼点丽鱼 <i>C. ocellaris</i>       | KU878410                     |                             |
|                       |                           | 副尼丽鱼属 <i>Paraneetroplus</i>        | 粉红副尼丽鱼 <i>P. synspilus</i>     | KF879808                     |                             |
|                       |                           | 图丽鱼属 <i>Astronotus</i>             | 图丽鱼 <i>A. ocellatus</i>        | AP009127                     |                             |
|                       |                           | 半丽鱼属 <i>Hemichromis</i>            | 双斑半丽鱼 <i>H. bimaculatus</i>    | HM882928 <sup>#</sup>        |                             |
|                       |                           | 棘臀鱼科<br>Centrarchidae              | 黑鲈属 <i>Micropterus</i>         | 大口黑鲈 <i>M. salmoides</i>     | HQ391896                    |
|                       |                           |                                    |                                | 太阳鱼属 <i>Lepomis</i>          | 蓝腮太阳鱼 <i>L. macrochirus</i> |
|                       |                           | 塘鳢科<br>Eleotridae                  | 尖塘鳢属 <i>Oxyeleotris</i>        | 云斑尖塘鳢 <i>O. marmorata</i>    | KJ595342*                   |
| 塘鳢属 <i>Eleotris</i>   | 尖头塘鳢 <i>E. oxycephala</i> |                                    |                                | KP713717*                    |                             |
| 沙塘鳢科<br>Odontobutidae | 沙塘鳢属 <i>Odontobutis</i>   | 黑体塘鳢 <i>E. melanosoma</i>          | 本研究 This study <sup>*#</sup>   |                              |                             |
|                       |                           | 中华沙塘鳢 <i>O. sinensis</i>           | KF154120                       |                              |                             |
|                       |                           | 新沙塘鳢属 <i>Neodontobutis</i>         | 海南新沙塘鳢 <i>N. hainanensis</i>   | MT198690                     |                             |
|                       |                           | 细齿塘鳢属 <i>Sineleotris</i>           | 海南细齿塘鳢 <i>S. chalmersi</i>     | MH644035*                    |                             |
| 虾虎鱼科<br>Gobiidae      | 阿胡虾虎鱼属 <i>Awaous</i>      | 黑首阿胡虾虎鱼 <i>A. melanocephalus</i>   | HQ654674 <sup>*#</sup>         |                              |                             |
|                       |                           | 睛斑阿胡虾虎鱼 <i>A. ocellaris</i>        | JQ431473 <sup>#</sup>          |                              |                             |
|                       |                           | 吻虾虎鱼属 <i>Rhinogobius</i>           | 子陵吻虾虎鱼 <i>R. giurinus</i>      | KF371534*                    |                             |
|                       |                           | 溪吻虾虎鱼 <i>R. duospilus</i>          | MH127918*                      |                              |                             |
|                       |                           | 李氏吻虾虎鱼 <i>R. leavelli</i>          | MH729000*                      |                              |                             |
|                       |                           | 南渡江吻虾虎鱼 <i>R. nanduijiangensis</i> | 本研究 This study <sup>*#</sup>   |                              |                             |
|                       |                           | 陵水吻虾虎鱼 <i>R. linshuiensis</i>      | 本研究 This study <sup>*#</sup>   |                              |                             |
|                       |                           | 三更罗吻虾虎鱼 <i>R. sangenloensis</i>    | 本研究 This study <sup>*#</sup>   |                              |                             |
|                       |                           | 戴氏虾虎鱼 <i>R. davidi</i>             | OM617724                       |                              |                             |
|                       |                           | 未定种 1 sp. 1                        | 本研究 This study <sup>*#</sup>   |                              |                             |
|                       |                           | 未定种 2 sp. 2                        | 本研究 This study <sup>*#</sup>   |                              |                             |
|                       |                           | 未定种 3 sp. 3                        | 本研究 This study <sup>*#</sup>   |                              |                             |
|                       |                           | 沟虾虎鱼属 <i>Oxyurichthys</i>          | 台湾沟虾虎鱼 <i>O. formosanus</i>    | KC237282                     |                             |
|                       |                           | 舌虾虎鱼属 <i>Glossogobius</i>          | 舌虾虎鱼 <i>G. giuris</i>          | MG680939                     |                             |
|                       |                           | 枝牙虾虎鱼属 <i>Stiphodon</i>            | 多鳞枝牙虾虎鱼 <i>S. multisquamus</i> | 本研究 This study <sup>*#</sup> |                             |
|                       |                           | 攀鲈科<br>Anabantidae                 | 攀鲈属 <i>Anabas</i>              | 攀鲈 <i>A. testudineus</i>     | KJ808811*                   |
|                       |                           | 丝足鲈科<br>Osphronemidae              | 斗鱼属 <i>Macropodus</i>          | 叉尾斗鱼 <i>M. opercularis</i>   | KM588227*                   |
| 鳢科<br>Channidae       | 鳢属 <i>Channa</i>          | 乌鳢 <i>C. argus</i>                 | AP006041                       |                              |                             |
|                       |                           | 斑鳢 <i>C. maculata</i>              | KC823606                       |                              |                             |
|                       |                           | 南鳢 <i>C. gachua</i>                | MF924390*                      |                              |                             |
|                       |                           | 月鳢 <i>C. asiatica</i>              | KJ930190*                      |                              |                             |
|                       |                           | 鲤科<br>Cyprinidae                   | 波鱼属 <i>Rasbora</i>             | 南方波鱼 <i>R. steineri</i>      | JX843769*                   |
|                       | 鳊属 <i>Zacco</i>           | 宽鳍鳊 <i>Z. platypus</i>             | KF683339                       |                              |                             |

续表

| 目<br>Order           | 科<br>Family                | 属<br>Genus                   | 种<br>Species                | 序列号<br>Accession No.                |                              |
|----------------------|----------------------------|------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|------------------------------|
| 鲤形目<br>Cypriniformes | 鲤科<br>Cyprinidae           | 异鱲属 <i>Parazacco</i>         | 海南异鱲 <i>P. fasciatus</i>    | 本研究 This study <sup>*#</sup>        |                              |
|                      |                            | 马口鱼属 <i>Opsariichthys</i>    | 南方马口鱼 <i>O. bidens</i>      | DQ367044 <sup>*</sup>               |                              |
|                      |                            |                              | 海南马口鱼 <i>O. hainanensis</i> | 本研究 This study <sup>*#</sup>        |                              |
|                      |                            |                              | 唐鱼属 <i>Tanichthys</i>       | 唐鱼 <i>T. albonubes</i>              | AP011397                     |
|                      |                            |                              | 拟细鲫属 <i>Nicholsicypris</i>  | 拟细鲫 <i>N. normalis</i>              | AP011396 <sup>*</sup>        |
|                      |                            |                              | 细鲫属 <i>Aphyocypris</i>      | 林氏细鲫 <i>A. lini</i>                 | MW338757                     |
|                      |                            |                              | 鲮属 <i>Ochetobius</i>        | 鲮 <i>O. elongatus</i>               | KM400625                     |
|                      |                            |                              | 青鱼属 <i>Mylopharyngodon</i>  | 青鱼 <i>M. piceus</i>                 | MT084757                     |
|                      |                            |                              | 草鱼属 <i>Ctenopharyngodon</i> | 草鱼 <i>C. idella</i>                 | MG827396                     |
|                      |                            |                              | 赤眼鲮属 <i>Squaliobarbus</i>   | 赤眼鲮 <i>S. curriculus</i>            | AP011218                     |
|                      |                            |                              | 鲃属 <i>Culter</i>            | 蒙古鲃 <i>C. mongolicus mongolicus</i> | AP009060                     |
|                      |                            |                              |                             | 海南鲃 <i>C. recurviceps</i>           | KJ609181                     |
|                      |                            |                              | 红鳍鲃属 <i>Chanodichthys</i>   | 红鳍鲃 <i>C. erythropterus</i>         | MN105126 <sup>*</sup>        |
|                      |                            |                              | 拟鲮属 <i>Pseudohemiculter</i> | 海南拟鲮 <i>P. hainanensis</i>          | ON227526 <sup>*</sup>        |
|                      |                            |                              | 鳊属 <i>Parabramis</i>        | 鳊 <i>P. pekinensis</i>              | KF857485                     |
|                      |                            |                              | 鲮属 <i>Hemiculter</i>        | 鲮 <i>H. leucisculus</i>             | MZ521000 <sup>*</sup>        |
|                      |                            |                              | 鲂属 <i>Megalobrama</i>       | 三角鲂 <i>M. terminalis</i>            | MN725725 <sup>*</sup>        |
|                      |                            |                              |                             | 斯氏鲂 <i>M. skolkovii</i>             | KJ630486                     |
|                      |                            |                              | 华鳊属 <i>Sinibrama</i>        | 海南华鳊 <i>S. melrosei</i>             | MW175533 <sup>*</sup>        |
|                      |                            |                              | 海南鲮属 <i>Hainania</i>        | 海南鲮 <i>H. serrata</i>               | KF029674 <sup>*#</sup>       |
|                      |                            |                              | 梅氏鳊属 <i>Metzia</i>          | 线纹梅氏鳊 <i>M. lineata</i>             | AP011220                     |
|                      |                            |                              |                             | 台湾梅氏鳊 <i>M. formosae</i>            | AP011395                     |
|                      |                            |                              | 似鲮属 <i>Toxabramis</i>       | 海南似鲮 <i>T. houdemeri</i>            | AP011333                     |
|                      |                            |                              | 鲮属 <i>Xenocypris</i>        | 黄尾鲮 <i>X. davidi</i>                | KF039718                     |
|                      |                            |                              |                             | 银鲮 <i>X. macrolepis</i>             | AP009059                     |
|                      |                            |                              | 鲮属 <i>Rhodeus</i>           | 高体鲮 <i>R. ocellatus</i>             | KT004415 <sup>*</sup>        |
|                      |                            |                              |                             | 刺鳍鲮 <i>R. spinalis</i>              | 本研究 This study <sup>*#</sup> |
|                      |                            |                              | 鲮属 <i>Acheilognathus</i>    | 大鳍鲮 <i>A. macropterus</i>           | KJ499466 <sup>*</sup>        |
|                      |                            |                              |                             | 越南鲮 <i>A. tonkinensis</i>           | MH261370 <sup>*</sup>        |
|                      |                            |                              |                             | 彩副鲮 <i>A. imberbis</i>              | KP015738                     |
|                      |                            |                              | 小鲃属 <i>Puntius</i>          | 疏斑小鲃 <i>P. paucimaculatus</i>       | KJ994664 <sup>*#</sup>       |
|                      |                            |                              |                             | 条纹小鲃 <i>P. semifasciolatus</i>      | AP011246 <sup>*</sup>        |
|                      |                            |                              | 倒刺鲃属 <i>Spinibarbus</i>     | 光倒刺鲃 <i>S. caldwelli</i>            | KF134718 <sup>*</sup>        |
|                      |                            | 锯齿倒刺鲃 <i>S. denticulatus</i> | KC852197 <sup>*</sup>       |                                     |                              |
|                      | 光唇鱼属 <i>Acrossocheilus</i> | 虹彩光唇鱼 <i>A. iridescens</i>   | AP011242 <sup>*</sup>       |                                     |                              |
|                      |                            | 厚唇光唇鱼 <i>A. paradoxus</i>    | AP009303 <sup>*</sup>       |                                     |                              |
|                      | 白甲鱼属 <i>Onychostoma</i>    | 细尾白甲鱼 <i>O. lepturum</i>     | MT258556 <sup>*</sup>       |                                     |                              |
|                      |                            | 南方白甲鱼 <i>O. gerlachi</i>     | KP244449                    |                                     |                              |

续表

| 目 Order              | 科 Family         | 属 Genus                      | 种 Species                         | 序列号 Accession No.                       |            |
|----------------------|------------------|------------------------------|-----------------------------------|---|------------|
| 鲤形目<br>Cypriniformes | 鲤科<br>Cyprinidae | 结鱼属 <i>Folifer</i>           | 瓣结鱼 <i>F. brevifilis</i>          | AP011354                                |            |
|                      |                  | 纹唇鱼属 <i>Osteochilus</i>      | 暗花纹唇鱼 <i>O. salsburyi</i>         | KT359600*                               |            |
|                      |                  | 鲮属 <i>Cirrhinus</i>          | 鲮 <i>C. molitorella</i>           | KF160921*                               |            |
|                      |                  |                              | 麦瑞加拉鲮 <i>C. cirrhosus</i>         | AP012150                                |            |
|                      |                  | 野鲮属 <i>Labeo</i>             | 露斯塔野鲮 <i>L. rohita</i>            | AP011201                                |            |
|                      |                  | 墨头鱼属 <i>Garra</i>            | 海南墨头鱼 <i>G. hainanensis</i>       | JQ864621#                               |            |
|                      |                  |                              | 东方墨头鱼 <i>G. orientalis</i>        | JX290078*                               |            |
|                      |                  | 鲮属 <i>Hemibarbus</i>         | 间鲮 <i>H. medius</i>               | KJ868177*                               |            |
|                      |                  | 麦穗鱼属 <i>Pseudorasbora</i>    | 麦穗鱼 <i>P. parva</i>               | JF802126                                |            |
|                      |                  | 鲮属 <i>Sarcocheilichthys</i>  | 海南鲮 <i>S. hainanensis</i>         | JN003354#                               |            |
|                      |                  | 银鲮属 <i>Squalidus</i>         | 点纹银鲮 <i>S. wolterstorffi</i>      | AP011392*                               |            |
|                      |                  |                              | 银鲮 <i>S. argentatus</i>           | KF819452                                |            |
|                      |                  | 小鰾属 <i>Microphysogobio</i>   | 嘉积小鰾 <i>M. kachekensis</i>        | MK139891#                               |            |
|                      |                  | 似鲮属 <i>Pseudogobio</i>       | 似鲮 <i>P. vaillanti</i>            | MN883563*                               |            |
|                      |                  | 蛇鲮属 <i>Saurogobio</i>        | 无斑蛇鲮 <i>S. immaculatus</i>        | AP012074*                               |            |
|                      |                  | 鲤属 <i>Cyprinus</i>           | 尖鳍鲤 <i>C. acutidorsalis</i>       | KR869144*                               |            |
|                      |                  |                              | 鲤 <i>C. carpio carpio</i>         | JN105352                                |            |
|                      |                  |                              | 锦鲤 <i>C. carpio haematopterus</i> | JX188254                                |            |
|                      |                  | 须鲫属 <i>Carassioides</i>      | 须鲫 <i>C. acuminatus</i>           | AP011178                                |            |
|                      |                  | 鲫属 <i>Carassius</i>          | 鲫 <i>C. auratus</i>               | KJ874428*                               |            |
|                      |                  | 道森鲃属 <i>Dawkinsia</i>        | 黑点道森鲃 <i>D. filamentosa</i>       | MK348133*                               |            |
|                      |                  | 鲢属 <i>Hypophthalmichthys</i> | 鲢 <i>H. nobilis</i>               | KJ729090                                |            |
|                      |                  |                              | 鲢 <i>H. molitrix</i>              | EU315941                                |            |
|                      |                  | 花鲈属 <i>Cobitis</i>           | 中华花鲈 <i>C. sinensis</i>           | AY526868*                               |            |
|                      |                  | 泥鳅属 <i>Misgurnus</i>         | 泥鳅 <i>M. anguillicaudatus</i>     | MT896815                                |            |
|                      |                  | 副泥鳅属 <i>Paramisgurnus</i>    | 大鳞副泥鳅 <i>P. dabryanus</i>         | MG725379                                |            |
|                      |                  | 华鲈属 <i>Sinibotia</i>         | 美丽华沙鲈 <i>S. pulchra</i>           | AP012125                                |            |
|                      |                  | 鳅科<br>Cobitidae              | 小条鳅属 <i>Micronemacheilus</i>      | 美丽小条鳅 <i>M. pulcher</i>                 | AP011301*  |
|                      |                  |                              |                                   | 齐氏小条鳅 <i>M. zispi</i>                   | KJ434599*  |
|                      |                  |                              | 南鳅属 <i>Schistura</i>              | 横纹南鳅 <i>S. fasciolata</i>               | MW192448*  |
|                      |                  |                              |                                   | 无斑南鳅 <i>S. incerta</i>                  | MK361215*  |
|                      |                  | 爬鳅科<br>Balitoridae           | 爬鳅属 <i>Balitora</i>               | 广西爬鳅 <i>B. kwangsiensis</i>             | JN177072*# |
|                      |                  |                              | 近腹吸鳅属 <i>Plesiomyzon</i>          | 保亭近腹吸鳅 <i>P. baotingensis</i>           | KF732713*  |
|                      |                  |                              | 拟平鳅属 <i>Liniparhomaloptera</i>    | 琼中拟平鳅 <i>L. disparis qiongzongensis</i> | MZ047229*  |
|                      |                  |                              | 原缨口鳅属 <i>Vanmanenia</i>           | 海南原缨口鳅 <i>V. hainanensis</i>            | MW289207*  |
|                      |                  |                              | 爬岩鳅属 <i>Beaufortia</i>            | 爬岩鳅 <i>B. leveretti</i>                 | KX060617*  |
|                      |                  |                              | 中华爬岩鳅属 <i>Sinogastromyzon</i>     | 伍氏爬岩鳅 <i>S. wui</i>                     | JN177076#  |

注: \*, 该物种用于 PCR 筛选; #, 序列为 CO I 基因部分片段(共 22 种)。

Note: \*: This species is used for PCR screening; #: The sequence was only a part of CO I gene (22 species in total).

## 2.2 侧翼保守区简介

基于 150 种鱼类 CO I 序列, 共筛选出 6 个侧翼保守区(图 1, 侧翼保守区 A~F)。其中, 侧翼保守区 F 与 E 距离较远(>300 bp), 其扩增子长度超出常见 eDNA 分子长度及高通量测序读长范围(2×150 bp) (Turner *et al.*, 2014)。侧翼保守区 A 与 B、C 与 D 距离不足 100 bp, 扩增子长度较短不利于近缘鱼类区

分。因此, 本研究在 2×150 bp 测序读长范围内选取扩增子最长的前 3 个侧翼保守区组合——A+D、A+E、B+E 进行正、反向引物设计。为了比较, 本研究同时标注了标准的鱼类 DNA 条形码(650 bp 或 652 bp) 及其他研究者设计的 2 对通用性较高的 eDNA 宏条形码 CO I 通用引物所在位置(图 1, Fish-F1/F2、Fish-R1/R2、PS1、Uni-Minibar) (Zhang *et al.*, 2020)。

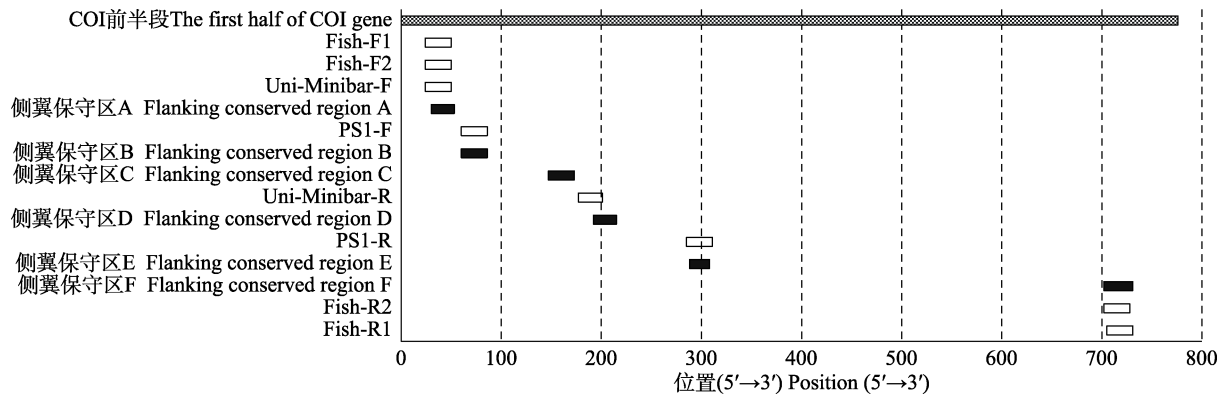


图 1 侧翼保守区在 CO I 基因前半段(776 bp/1 551 bp)内的相对位置

Fig.1 Relative positions of flanking conserved regions within the first half of CO I gene (776 bp/1 551 bp)

以鲤鱼(NCBI 序列号: JN105352)为标注模板。

*Cyprinus carpio carpio* (accession number: JN105352) was used as the labeling template.

## 2.3 引物设计结果

除侧翼保守区 A 存在 2 个完全保守密码子外, 其余密码子第 3 位点均发生转换变异(表 2), 需要使用适量简并碱基提高“引物序列-DNA 模板”匹配度。根据简并碱基数的不同, 本研究对每个侧翼保守区分别设计了 5~8 种引物, 其碱基组成、GC 含量和  $T_m$  值见表 3。引物 Premier 评分结果显示, 26 条引物中, 3 条引物评分处于“Best”等级, 表明引物在退火温度、GC 含量、二级结构等方面更符合理想引物的标准; 17 条引物评分处于“Good”等级, 理论上仍能够进行 DNA 模板有效扩增; 6 条引物评分处于“Poor”等级, 不满足常用引物有关标准。

## 2.4 PCR 筛选结果

首轮 PCR 筛选结果显示, 20 条引物中, 侧翼保守区 E 内的 5 条引物扩增成功率较低, 引物的通用性差。HN-A-F1/F2/F3/F4、HN-B-F1/F2/F3/F4、HN-D-R2/R3/R4 扩增出的单一条带物种数较多(表 3); 逐步调低图片亮度, 当胶图上的 marker 不可见时, HN-A-F4、

HN-B-F3/F4、HN-D-R3/R4 存在条带痕迹的物种数较多(亮度大于 marker 的单一条带物种数  $\geq 70$  种, 表 3)。因此, 这 5 条引物的通用性更高。

对上述 5 条引物形成的 3 (正向) × 2 (反向)套引物组合进行次轮 PCR 筛选, 结果显示, 全部 72 种鱼类扩增成功率均为 100% (PCR 胶图未展示)。HN-A-F4、HN-B-F3/F4 作为 HN-D-R3/R4 的正向引物产生的扩增子长度分别为 139 bp、106 bp/106 bp。扩增子长度越长, 物种鉴定准确性越高, 因此, HN-A-F4 比 HN-B-F3/F4 更有优势。虽然 HN-D-R3/R4 作为 HN-A-F4 的反向引物产生的扩增子长度相同, 且二者的扩增成功率均为 100% (图 2A: HN-D-R3; 图 2B: HN-D-R4), 但逐步调低图片亮度, 当胶图上的 marker 不可见时 HN-D-R3 产生的扩增子均存在痕迹(图 2C), 而 HN-D-R3 扩增的 23、24、43 号样品条带彻底消失(图 2D)。HN-D-R3 产生的条带更亮、扩增效率高于 HN-D-R4 (见图 2C、图 2D), 因此更适合作为反向引物。综上所述, 次轮 PCR 筛选中表现最优的引物组合为“HN-A-F4、HN-D-R3” (以下简称 HN-CO I)。





表 3 本研究中简并引物基本信息  
Tab.3 Basic information of degenerate primers in this study

| 引物名称<br>Primer name | 序列(5'→3')<br>Sequence from 5' to 3' | 退火<br>温度<br>( $T_m$ )/°C | GC 含量<br>GC<br>content<br>/% | 引物长度<br>Primer<br>length /bp | 引物评分<br>等级<br>Primer<br>score grade | 用于 PCR<br>筛选的配套引物<br>Matching primers<br>for PCR screening | 无条带物种数<br>Number of<br>species<br>without bands | 多条带物种数<br>Number of<br>species with<br>multiple bands | 单一条带<br>物种数<br>Number of<br>species with a<br>single band | 条带亮度大于<br>marker 的物种<br>Number of<br>species with<br>brighter bands<br>than marker |
|---------------------|-------------------------------------|--------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|--|---|---|---|--|
| HN-A-F1             | AACCACAAAAGACATGGYACCCCT            | 61.9                     | 46                           | 23                           | Best                                |  | 0   | 2   | 70  | 60   |
| HN-A-F2             | AACCACAAAAGACATYGGYACCCCT           | 61.4                     | 48                           | 23                           | Best                                |  | 0   | 0   | 72  | 65   |
| HN-A-F3             | AACCAYAAAGACATYGGYACCCCT            | 62.8                     | 46                           | 23                           | Best                                | Fish-R1+Fish-R2  | 0   | 0   | 72  | 69   |
| HN-A-F4             | AAYCAYAAAGACATYGGYACCCCT            | 65.2                     | 43                           | 23                           | Good                                |  | 0   | 0   | 72  | 71   |
| HN-A-F5             | AAYCAYAAAGAYATYGGYACCCCT            | 66.4                     | 41                           | 23                           | Good                                |  | 2   | 4   | 66  | 59   |
| HN-B-F1             | GTAITTTGGTGCTGAGCCGGAATRGT          | 67.1                     | 52                           | 26                           | Good                                |  | 2   | 0   | 70  | 57   |
| HN-B-F2             | GTAITTTGGTGCTGAGCCGGRATRGT          | 69.1                     | 54                           | 26                           | Good                                |  | 0   | 1   | 71  | 66   |
| HN-B-F3             | GTAITTTGGTGCTGAGCYGGRATRGT          | 66.4                     | 52                           | 26                           | Good                                |  | 0   | 0   | 72  | 71   |
| HN-B-F4             | GTAITTTGGTGCTGRGCYGGRATRGT          | 67.6                     | 54                           | 26                           | Good                                |  | 0   | 0   | 72  | 71   |
| HN-B-F5             | GTAITTTGGTGCTGRGCYGGRAIRGT          | 65.2                     | 52                           | 26                           | Good                                | Fish-R1+Fish-R2  | 3   | 6   | 63  | 58   |
| HN-B-F6             | GTAITTTGGYGCYTRGCYGGRAIRGT          | 65.8                     | 54                           | 26                           | Poor                                |  | —   | —   | —   | —  |
| HN-B-F7             | GTAITTYGGYGCYTRGCYGGRAIRGT          | 65.4                     | 56                           | 26                           | Poor                                |  | —   | —   | —   | —  |
| HN-B-F8             | GTRITTYGGYGCYTRGCYGGRAIRGT          | 65.5                     | 58                           | 26                           | Poor                                |  | —   | —   | —   | —  |
| HN-D-R1             | GGTAITTACTATAAAGAAAATYAT            | 43.9                     | 20                           | 23                           | Good                                |  | 7   | 2   | 63  | 52   |
| HN-D-R2             | GGTAITTACTATAAAGAARATYAT            | 45.8                     | 22                           | 23                           | Good                                |  | 1   | 1   | 70  | 66   |
| HN-D-R3             | GGYATTACTATAAAGAARATYAT             | 50.1                     | 24                           | 23                           | Good                                |  | 0   | 0   | 72  | 70   |
| HN-D-R4             | GGYATTACTATAAARAARATYAT             | 52.2                     | 22                           | 23                           | Good                                |  | 0   | 1   | 71  | 70   |
| HN-D-R5             | GGYATTACTATRAARAARATYAT             | 55.2                     | 24                           | 23                           | Good                                | Fish-F1+Fish-F2  | 5   | 9   | 58  | 53   |
| HN-D-R6             | GGYATTAACYATRAARAARATYAT            | 59.5                     | 26                           | 23                           | Good                                |  | 14  | 20  | 38  | 19   |
| HN-D-R7             | GGYATYACYATRAARAARATYAT             | 62.6                     | 28                           | 23                           | Poor                                |  | —   | —   | —   | —  |
| HN-E-R1             | CAGAAGCTTATGTTATYAT                 | 44                       | 28                           | 20                           | Good                                |  | 13  | 13  | 46  | 25   |
| HN-E-R2             | CAGAAGCTTATGTRITTYAT                | 44                       | 30                           | 20                           | Good                                |  | 10  | 4   | 58  | 44   |
| HN-E-R3             | CAGAAGCTTATRTITTYAT                 | 41.1                     | 28                           | 20                           | Good                                |  | 4   | 6   | 62  | 50   |
| HN-E-R4             | CAGAAGCTYATRTITTYAT                 | 44.4                     | 30                           | 20                           | Good                                | Fish-F1+Fish-F2  | 7   | 11  | 54  | 49   |
| HN-E-R5             | CAGAARCTYATRTITTYAT                 | 46.9                     | 28                           | 20                           | Poor                                |  | —   | —   | —   | —  |
| HN-E-R6             | CARAARCTYATRTITTYAT                 | 49.5                     | 25                           | 20                           | Poor                                |  | —   | —   | —   | —  |
| Fish-F1             | TCAACCAACCACAAAGACATGGCAC           | 66.6                     | 46                           | 26                           | Good                                | Fish-R1+Fish-R2  | 1   | 1   | 70  | 68   |
| Fish-F2             | TCGACTAATCATAAAGACATGGCAC           | 61.4                     | 42                           | 26                           | Best                                |  | 0   | 0   | 72  | 66   |
| Uni-Mimibar-F       | TCCACTAATCACAAARGAIPATTTGGIAC       | 56                       | 37                           | 26                           | Good                                | Uni-Mimibar-R  | 19  | 28  | 25  | 9  |
| PS1-F               | GTAITTTGGYGCYTRGCCGGRATAGT          | 66.4                     | 54                           | 26                           | Good                                | PS1-R  | 7   | 19  | 46  | 22   |
| Fish-R1             | TAGACTTCTGGTGGCCAAAGAATCA           | 64.7                     | 46                           | 26                           | Good                                |  | 0   | 1   | 71  | 64   |
| Fish-R2             | ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA          | 64.1                     | 46                           | 26                           | Good                                | Fish-F1+Fish-F2  | 0   | 2   | 70  | 62   |
| Uni-Mimibar-R       | GAAAATCATAATGAAGCATGAGC             | 57.9                     | 38                           | 24                           | Good                                |  | —   | —   | —   | —  |
| PS1-R               | AGCCARAARCTYATRTITTYATTCG           | 64.3                     | 35                           | 26                           | Good                                |  | —   | —   | —   | —  |

注：“—”表示结果重复或未进行有关实验。

Note: “—” indicates that the results were repeated or the experiment was not carried out.

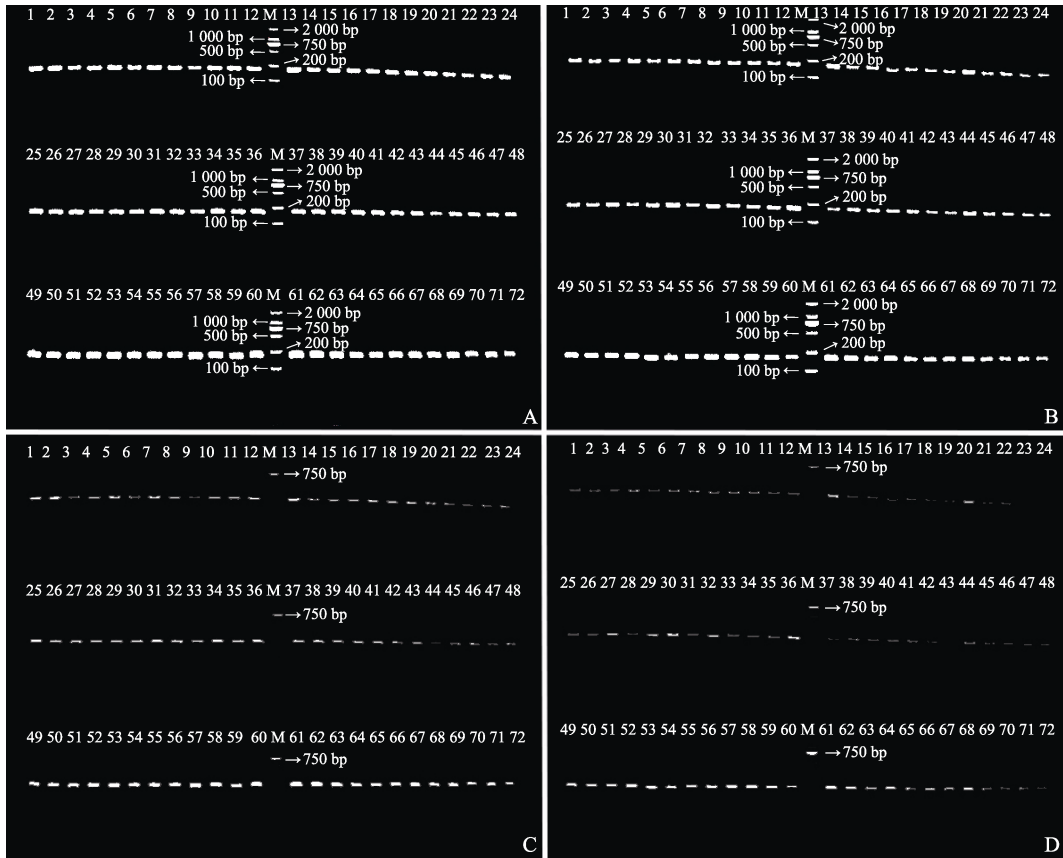


图2 HN-D-R3 与 HN-D-R4 的扩增效果比较

Fig.2 Comparison of amplification effect of HN-D-R3 and HN-D-R4

A: HN-D-R3 扩增原图; B: HN-D-R4 扩增原图; C、D: 原图亮度同步调低至只剩 750 bp marker 可见时的扩增子痕迹(C: HN-D-R3; D: HN-D-R4); 1~72: 物种编号; M: Marker。

A: Original image of HN-D-R3 amplification; B: Original image of HN-D-R4 amplification; C, D: Amplicon trace when the brightness of the original image was synchronously reduced to only 750 bp marker visible (C: HN-D-R3; D: HN-D-R4); 1~72: Numbers of species; M: Marker.

## 2.5 水样高通量测序结果

全部 30 个水样稀释曲线(rarefaction curves)末端趋于平滑, 样品测序数据量充足, 可用于后续分析。虽然生物信息学过程已剔除阴性对照中出现的序列, 但水样中仍检测出了一定比例的河口及海洋鱼类 OTUs。由于这部分序列仍是引物灵敏性和通用性的反映, 因此, 本研究未进一步对其进行剔除。MiFish-U 的扩增效率高于 HN-CO I, 前者产生的待分析序列(clean reads)总量是后者的 1.29 倍(表 4); 然而, HN-CO I 对鱼类 eDNA 靶向性更强, 待分析序列内鱼类序列总数和序列平均占比分别是 MiFish-U 的 1.22 倍和 1.99 倍(表 4)。OTUs 也表现出同样的现象: MiFish-U 共扩增出 477 种 OTUs, 其中鱼类 OTUs 共 65 种(占比为 13.63%); HN-CO I 共扩增出 406 种 OTUs, 其中鱼类 OTUs 共 86 种(占比为 21.18%)(表 4)。

OTUs 注释结果显示, HN-CO I 产生的 86 种鱼类 OTUs 注释到种、属、科及科以上水平的数目分别为 70 (81.40%)、10 (11.63%)、6 (6.98%); MiFish-U 产生的 65 种鱼类 OTUs 中注释到种、属、科及科以上水平的数目分别为 53(81.54%)、3(4.62%)、9 (13.85%)。种水平的 OTUs 共注释 81 种鱼类, 其中共享鱼类 42 种, 独享鱼类 28 种(HN-CO I)和 11 种(MiFish-U)。基于 81 种鱼类的出现情况进行“引物+水样”的 NMDS 排序结果显示, 样品聚类成边界明显的 2 组。表明 HN-CO I、MiFish-U 的鱼类多样性调查结果存在较大不同。此外, HN-CO I 的 NMDS 结果离散性高于 MiFish-U, 暗示基于该引物组合的海南岛鱼类多样性调查差异大。NMDS 分析结果的肋强系数为 0.15, 说明将 2 个引物调查结果划归不同组具有一定的解释意义。

表 4 水样高通量测序结果简介  
Tab.4 Brief introduction to water sample results after high-throughput sequencing

| 引物组合<br>Primers pairs | 水样<br>Samples | 待分析序列<br>Clean reads | 鱼类序列<br>Fish<br>sequence | 鱼类序列占比<br>Fish sequence<br>ratio /% | OTUs 总数<br>Total number<br>of OTUs | 鱼类 OTUs 总数<br>Total number<br>of fish OTUs | 鱼类 OTUs 占比<br>Fish OTUs<br>ratio /% |
|-----------------------|---------------|----------------------|--------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|--|-------------------------------------|
| MiFish-U              | ND-1          | 1 587 885            | 695 760                  | 43.82                               | 117                                | 11   | 9.40                                |
|                       | ND-2          | 1 104 676            | 144 785                  | 13.11                               | 78                                 | 8  | 10.26                               |
|                       | ND-3          | 991 762              | 133 630                  | 13.47                               | 119                                | 18   | 15.13                               |
|                       | ND-4          | 938 059              | 132 825                  | 14.16                               | 115                                | 17   | 14.78                               |
|                       | ND-5          | 905 181              | 111 780                  | 12.35                               | 115                                | 13   | 11.30                               |
|                       | CH-1          | 816 815              | 71 645                   | 8.77                                | 62                                 | 3  | 4.84                                |
|                       | CH-2          | 785 725              | 69 115                   | 8.79                                | 115                                | 6  | 5.22                                |
|                       | CH-3          | 755 231              | 59 800                   | 7.92                                | 69                                 | 7  | 10.14                               |
|                       | CH-4          | 685 819              | 64 445                   | 9.40                                | 55                                 | 6  | 10.91                               |
|                       | CH-5          | 672 648              | 103 730                  | 15.42                               | 85                                 | 12   | 14.12                               |
|                       | WQ-1          | 662 054              | 56 005                   | 8.46                                | 105                                | 10   | 9.52                                |
|                       | WQ-2          | 488 033              | 43 930                   | 9.00                                | 69                                 | 7  | 10.14                               |
|                       | WQ-3          | 484 507              | 80 615                   | 16.65                               | 62                                 | 14   | 22.58                               |
|                       | WQ-4          | 382 510              | 55 820                   | 14.59                               | 117                                | 19   | 16.24                               |
|                       | WQ-5          | 271 221              | 40 020                   | 14.76                               | 56                                 | 7  | 12.50                               |
| HN-CO I               | ND-1          | 1 388 328            | 281 980                  | 20.31                               | 64                                 | 8  | 12.50                               |
|                       | ND-2          | 1 063 166            | 220 225                  | 20.71                               | 124                                | 19   | 15.32                               |
|                       | ND-3          | 1 006 708            | 322 920                  | 32.08                               | 71                                 | 12   | 16.90                               |
|                       | ND-4          | 833 107              | 135 355                  | 16.25                               | 121                                | 19   | 15.70                               |
|                       | ND-5          | 657 805              | 99 920                   | 15.19                               | 80                                 | 14   | 13.25                               |
|                       | CH-1          | 548 473              | 135 110                  | 24.63                               | 75                                 | 9  | 12.00                               |
|                       | CH-2          | 497 554              | 256 795                  | 51.61                               | 70                                 | 17   | 22.86                               |
|                       | CH-3          | 440 352              | 84 155                   | 19.11                               | 86                                 | 19   | 22.09                               |
|                       | CH-4          | 407 752              | 124 430                  | 30.52                               | 117                                | 21   | 17.95                               |
|                       | CH-5          | 405 178              | 86 020                   | 21.23                               | 82                                 | 19   | 23.17                               |
|                       | WQ-1          | 403 004              | 58 650                   | 14.55                               | 67                                 | 8  | 11.94                               |
|                       | WQ-2          | 359 890              | 94 830                   | 26.35                               | 64                                 | 18   | 28.13                               |
|                       | WQ-3          | 352 378              | 78 085                   | 22.16                               | 71                                 | 10   | 14.08                               |
|                       | WQ-4          | 315 718              | 157 690                  | 49.95                               | 103                                | 31   | 30.09                               |
|                       | WQ-5          | 240 563              | 128 800                  | 53.54                               | 78                                 | 22   | 28.21                               |

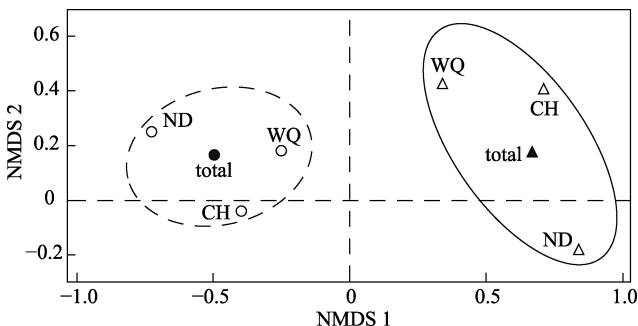


图 3 不同引物的 NMDS 分析

Fig.3 NMDS analysis of different primers

圆形: MiFish-U 扩增结果; 三角形: HN-CO I 扩增结果  
Round: Amplification results of MiFish-U;  
Triangle: Amplification results of HN-CO I

42 种共享鱼类的两两遗传距离分别为 0.007~0.377 (0.234±0.087) (HN-COI)和 0.006~0.462 (0.298±0.135) (MiFish-U); 对 42 种鱼类所在阶元进行分组, 属内物种间两两遗传距离分别为 0.007~0.251 (0.156±0.050) (CO I)和 0.006~0.202 (0.099 4±0.035) (MiFish-U); HN-CO I 引物组合的属内物种遗传距离最小值及平均值均高于 MiFish-U, 分别为后者的 1.23 倍和 1.57 倍, 暗示 HN-CO I 的近缘鱼类的区分能力高于 MiFish-U。此外, 全部 42 种共享鱼类的两两遗传距离的变异系数分别为 37.28% (HN-CO I)和 45.42% (MiFish-U); 属内物种间两两遗传距离的变异系数分别为 31.88% (HN-CO I)和 35.51% (MiFish-U)。与 MiFish-U 相比, HN-CO I 的变异系数更小, 表明其物

种鉴定稳定性高于 MiFish-U。

## 2.6 “生物量-拷贝数”定量拟合结果

将不同密度的鲤鱼与高通量测序后的分子拷贝数进行拟合: HN-CO I、MiFish-U 的线性回归方程分别为  $y=18\ 586x$  ( $R^2=0.65$ )和  $y=17\ 267x$  ( $R^2=0.52$ ) (图 4)。2 种引物拟合方程的相关系数均较低,表明尚

不能通过 eDNA 序列反映水槽中鲤鱼的生物量。拟合结果还表明, 饲养 15 d 后低密度组的 eDNA 浓度极高, 6 个密度组内的鲤鱼 eDNA 可能均处于饱和状态; 同一密度组内却又存在平行样间分子拷贝数差异较大的现象(图, 4), 表明水体 eDNA 分布并不均匀。此外, 本研究尝试了二项式、指数、对数、幂函数的拟合效果, 其相关性均较低( $R^2 \leq 0.565$ ) (图表略)。

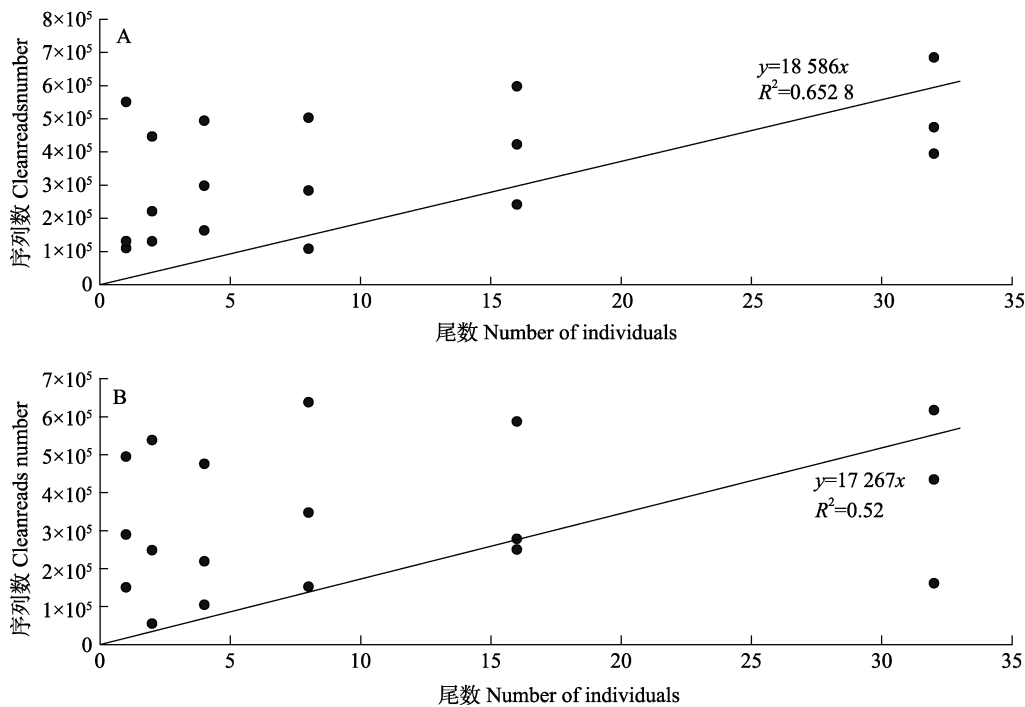


图 4 室内条件下鲤鱼 eDNA 分子拷贝数与其生物量之间的相关关系

Fig.4 Correlation between eDNA reads and biomass of *Cyprinus carpio carpio* under indoor conditions

A: HN-CO I ; B: MiFish-U

## 3 讨论

### 3.1 CO I 通用引物的地域性

本研究中, 有 5 条引物的通用性较高(表 3), 其中以 HN-CO I 效果最佳, 该引物组合的扩增子长度达到 139 bp, PCR 成功率为 100%且扩增条带亮度均大于 marker。表明以海南岛淡水鱼类为调查对象时, 能够筛选出理想的鱼类 eDNA 宏条形码 CO I 通用引物。然而, PS1 及 Uni-Minibar 在本研究中表现较差——72 种鱼类 PCR 成功数分别为 46 种和 25 种, 扩增条带亮度大于 marker 的物种数更是仅有 22 种和 9 种(表 3)。Zhang 等(2020)基于北京市水样进行 eDNA 宏条形码引物比较亦表明: PS1 及 Uni-Minibar 在全部 22 对测评引物中处于中等偏下水平。然而, 在 Balasingham 等(2018)和 Meusnier 等(2008)的原始研

究中, PS1、Uni-Minibar 却展现了极高的通用性。PS1、Uni-Minibar 及 HN-CO I 在不同研究中的表现说明, eDNA 宏条形码 CO I 通用引物具有明显的地域性, 可能无法适用于原始调查水域/类群之外的鱼类多样性研究。造成引物地域性的主要原因, 是 CO I 基因变异速率远高于 12S、16S, 因而找不到严格的侧翼保守区(Riaz *et al.*, 2011; Freeland, 2017; Evans *et al.*, 2018)。综合已有研究结果, 本研究认为, 鱼类 eDNA 宏条形码 CO I 通用引物的具体应用需要密切考虑其设计背景和原始调查水域/类群, 直接使用他人筛选出的 CO I 通用引物存在一定的物种调查假阴性风险。

### 3.2 CO I 通用引物筛选参考及建议

虽然鱼类 eDNA 宏条形码 CO I 通用引物具有一定的地域性, 但本研究为其他类似研究提供了一个引

物筛选参考。本研究筛选出的 6 个侧翼保守区与 Fish-F、Fish-R、PS1、Uni-Minibar 等已知的鱼类 CO I 条形码引物位置重叠(图 1), 并且侧翼保守区涉及的鱼类总数在数百种以上(本研究: 150 种; Fish-F、Fish-R: 207 种; PS1: 114 种; Uni-Minibar: 187 种)(Ward *et al*, 2005; Meusnier *et al*, 2008; Balasingham *et al*, 2018)。因此, 图 1 标注的侧翼保守区位置具有充分借鉴意义。尽管不同类群在具体碱基构成上可能存在一定差异, 如 150 种海南岛淡水鱼类在 HN-A-F4 引物 3' 端存在 5 个连续保守碱基, Fish-F1/F2、Uni-Minibar-F 在相同位置却只存在 2 个连续保守碱基(表 2), 但其他水域的鱼类多样性调查仍然可以以此为导引, 通过调整引物起始位置和修改碱基组成, 筛选所需的 CO I 通用引物。

侧翼保守区长度会影响引物通用性。本研究中 HN-E 系列的 6 条引物 PCR 成功率明显偏低(表 3)。虽然侧翼保守区 E 的长度达到 20 bp。有研究认为, 当引物长度在 18 bp 以上即可保证引物自身有极高的扩增效率(Kitano *et al*, 2007; Riaz *et al*, 2011; Sultana *et al*, 2018)。但由于密码子第 3 位点变异碱基的存在, 侧翼保守区 E 与 eDNA 模板的有效结合长度最小值只有 14 bp, 导致引物筛选过程中有 10~26 种鱼类扩增失败。随机扩增片段多态性(random amplification polymorphic DNA, RAPD)技术的广泛使用(所用引物在 10 bp 左右), 也从侧面印证了引物长度的降低会导致 PCR 出现多条带或者无条带的结果(何舜平等, 2000; 尹绍武等, 2006; 鹿志创等, 2007)。相比之下, Fish-F1/F2 及 Fish-R1/R2 长度均为 26 bp, 即使密码子第 3 位点完全不匹配, 其有效结合长度也至少为 18 bp。这 4 条引物在未使用任何简并碱基的情况下, PCR 条带亮度大于 marker 的物种数仍高达 62~68 种; HN-B-F3/F4 的 PCR 成功率更是高达 100%。Menning 等(2020)和 Sultana 等(2018)针对阿拉斯加、马来西亚本土鱼类进行的 CO I 通用引物筛选, 结果也呈现出类似规律: 长度短的引物更容易被率先淘汰。本研究不推荐在短侧翼保守区内进行引物设计, 如有必要则应该对引物 5' 端进行碱基加长修饰。

CO I 通用引物设计过程中, 应使用适量简并碱基。Miya 等(2015)在引物筛选过程中发现, 即使只添加 1~2 个简并碱基也会导致 PCR 扩增中出现不同程度的弥散带, 因此, 采取将 MiFish-U (硬骨鱼类)与 MiFish-E (软骨鱼类)引物分开设计的原则。Ward 等(2005)在设计标准的鱼类 DNA 条形码 CO I 引物(Fish-F1/F2 及 Fish-R1/R2)过程中, 也采取了“分别设计多对正、反向引物, 不同引物组合应用”的策略。

然而, 由于没有简并碱基, MiFish-U、Fish-F1/F2 及 Fish-R1/R2 始终存在部分鱼类无法扩增的问题(Ward *et al*, 2005; Miya *et al*, 2015); 并且多对引物搭配使用会显著提高鱼类 eDNA 研究的工作量和 PCR 测序成本。针对此问题, Ivanova 等(2007)和 Minamoto 等(2012)均通过添加简并碱基来提高“引物序列-DNA 模板”的匹配度。本研究支持使用适量简并碱基的做法: 用于首轮 PCR 筛选的 20 条引物中, 使用 1~2、3~4、5 个及以上简并碱基的引物, 其 PCR 条带亮度大于 marker 的物种数分别为 25~66 ( $54.38 \pm 14.13$ )、49~71 ( $65.13 \pm 9.67$ )和 19~59 ( $47.25 \pm 19.02$ )种。次轮 PCR 筛选结果也显示, HN-CO I 等存在 3~4 个简并碱基的引物 PCR 成功率均为 100%。然而, 当简并碱基在 5 个及以上时, 72 种海南岛淡水鱼类的 PCR 成功数开始明显下降; 特别是 HN-B-F6/F7/F8、HN-D-R7、HN-E-R5/R6 引物, 由于自身含有过多的简并碱基, 已经无法满足 Premier 软件的基本要求。PS1 对海南岛淡水鱼类的扩增效果较差, 可能也受到了反向引物简并碱基过多的影响(Minamoto *et al*, 2012; Miya *et al*, 2015)。

### 3.3 HN-CO I 与 MiFish-U 的比较

通用性和物种识别能力是鱼类 eDNA 宏条形码引物的 2 个核心指标。Collins 等(2019)和 Milan 等(2020)认为: 12S 和 16S 引物的通用性一般高于 CO I 和 Cytb。本研究支持此结论。30 个水样高通量测序结果显示, MiFish-U 产生的待分析序列总数和 OTUs 总数分别是 HN-CO I 的 1.29 倍和 1.18 倍(表 4)。然而, MiFish-U 可能存在通用性过高的风险——虽然该引物是 Miya 等(2015)基于 880 种鱼类线粒体全序列筛选所得, 但引物序列对微生物、鸟类、哺乳类等众多类群却普遍适用。过高的通用性会引起 PCR 竞争性扩增, 导致量少的鱼类 eDNA 模板在扩增过程中因受到其他量多的 eDNA 模板(如微生物)的竞争而逐步丢失(Kobayashi *et al*, 2000; 华育平, 2002; 李朋祥, 2012)。本研究中, HN-CO I 产生的鱼类序列总数及其占比、鱼类 OTUs 总数及其占比分别为 MiFish-U 的 1.22 倍 ( $2\ 264\ 965/1\ 863\ 905$ )和 1.57 倍( $25.39\%/16.16\%$ )、1.32 倍( $86/65$ )和 1.57 倍( $25.39\%/16.16\%$ ) (表 4)。HN-CO I 引物对海南岛淡水鱼类具有更高的靶向性, 能够在降低微生物等非目标物种有效扩增的同时产生更多的鱼类序列或 OTUs, 进而满足海南岛淡水鱼类多样性调查需求。

HN-CO I 的物种识别能力高于 MiFish-U。42 种共享鱼类遗传距离分析结果显示, HN-CO I 属内物种

遗传距离最小值及平均值是 MiFish-U 的 1.23 倍和 1.57 倍;HN-CO I 在物种注释过程中停滞在科及科以上水平的 OTUs 占比则仅为 MiFish-U 的 0.50 倍 (6.98%/13.85%)。陈治等(2022)通过比较数十种海南岛淡水鱼类的 eDNA 宏条形码参考数据库发现, HN-CO I 和 MiFish-U 分别有 5.56% (4 种)和 16.67% (12 种)鱼类存在条形码序列完全相同的现象。因此, MiFish-U 扩增出的部分 OTUs 可能是多个种的复合 OTUs (Schenekar *et al.*, 2020; 蒋佩文等, 2022; 王梦等, 2022)。这可能也是该引物的鱼类 OTUs 比 HN-CO I 少的原因之一。

“引物+水样”的 NMDS 聚类形成边界明显的两组(胁强系数=0.15), 表明 HN-CO I、MiFish-U 的鱼类多样性调查结果存在较大不同。该结果符合 Taberlet 等(2012)和 Pawlowski 等(2020)提出的鱼类 eDNA 调查应多基因片段并用的观点。NMDS 图中南渡江、昌化江、万泉河的位点距离较远, 该结果也与部分已有研究一致(李高俊等, 2020), 表明 eDNA 能够在中尺度上有效反映鱼类的组成差异(Kelly *et al.*, 2014; Deiner *et al.*, 2017; Yamamoto *et al.*, 2017)。并且, 基于 HN-CO I 的南渡江、昌化江、万泉河三大水系 NMDS 结果离散性高于 MiFish-U。海南岛高山地形复杂、环境异质化明显, 众多河流互不干扰且呈放射状向海岛四周奔流, 因此, 物种的隔离效应极其明显(陈辈乐等, 2008)。HN-CO I 结果可能更符合海南岛淡水鱼类的这一时空分布特点。然而, 由于没有同步采用传统调查方法采集鱼类样品, 上述推测还需要进一步验证。

虽然有观点认为, eDNA 能够反映鱼类的生物量(Doi *et al.*, 2017; Takahara *et al.*, 2019), 但本研究 2 种引物的“生物量-拷贝数”定量拟合方程相关系数较低。这可能是由于本研究为室内实验, 水体中的 eDNA 浓度较高, 导致全部水样经过少数几个 PCR 循环后均达到峰值。Pilliod 等(2013)和 Anais 等(2016)的研究也未能通过 eDNA 浓度准确反映物种的生物量和养殖密度。本研究同一密度组内却存在平行样间分子拷贝数差异较大的现象(图 4), 表明无论鲤鱼密度高低都会出现检出生物量不稳定的风险。eDNA 在水体的分布可能并不均匀, 而是呈斑片状分布, 这与 Eichmiller 等(2014)和吴昞晨等(2019)的研究报道相同。鱼类 eDNA 的产生、降解动力学过程极为复杂, 目前没有研究能够准确阐明 eDNA 的微观存在和变化规律。后续还需要进行大量实验厘清 HN-CO I、MiFish-U 等引物的 eDNA 定量结果准确性。

## 4 结论

本研究基于 8 目、26 科、101 属、150 种鱼类 CO I 序列筛选出 6 个侧翼保守区, 从中设计了 26 条引物, 经 72 种鱼类、30 个水样验证后表现最优的引物组合为 HN-CO I (HN-A-F4、HN-D-R3)——该引物组合扩增成功率为 100%且扩增条带单一明亮, 扩增子长度为 139 bp; 高通量测序获得的鱼类 OTUs 总数是 MiFish-U 的 1.32 倍; 属内物种扩增子两两遗传距离最小值及平均值分别是 MiFish-U 的 1.23 倍和 1.57 倍。HN-CO I 的 OTUs 注释结果及 NMDS 聚类图形同样与 MiFish-U 存在较大不同。HN-CO I 虽然无法准确反映鲤鱼的生物量, 但对海南岛淡水鱼类具有更高的靶向性, 该引物组合更有利于海南岛淡水鱼类的检出和准确鉴定。

## 参 考 文 献

- ANAIS L R, ROSABAL M, BERNATCHEZ L. Estimating fish abundance and biomass from eDNA concentrations: Variability among capture methods and environmental conditions. *Molecular Ecology Resources*, 2016, 16(6): 1401–1414
- BALASINGHAM K D, WALTER R P, MANDRAK N E, *et al.* Environmental DNA detection of rare and invasive fish species in two Great Lakes tributaries. *Molecular Ecology*, 2018, 27(1): 112–127
- CHEN B L, CHEN X L. Species diversity and distribution of freshwater fishes at Mt. Yinggeling, Hainan Island, China. *Biodiversity Science*, 2008, 16(1): 44–52 [陈辈乐, 陈湘舜. 海南鹦哥岭地区的鱼类物种多样性与分布特点. *生物多样性*, 2008, 16(1): 44–52]
- CHEN J X. Fish species composition and diversity in the northern and southern foothills of the Qinling Mountains based on environmental DNA high-throughput barcoding technology. Master's Thesis of Northwest A&F University, 2022 [陈锦孝. 基于环境 DNA 高通量条形码技术的秦岭南北两麓鱼类物种组成及多样性研究. 西北农林科技大学硕士研究生学位论文, 2022]
- CHEN Z, CAI X W, ZHANG Q F, *et al.* Preliminary construction and comparative analysis of environmental DNA metabarcoding reference database of freshwater fishes in Hainan Island. *South China Fisheries Science*, 2022, 18(3): 1–12 [陈治, 蔡杏伟, 张清凤, 等. 海南岛淡水鱼类环境 DNA 宏条形码参考数据库的初步构建及比较分析. *南方水产科学*, 2022, 18(3): 1–12]
- CHENG X Y, TAO J, WU R D, *et al.* Functional ecology of freshwater fish: Research progress and prospects. *Acta Ecologica Sinica*, 2019, 39(3): 810–822 [程馨雨, 陶捐, 武瑞东, 等. 淡水鱼类功能生态学研究进展. *生态学报*, 2019, 39(3): 810–822]

- COLLINS R A, BAKKER J, WANGENSTEEN O S, *et al.* Non-specific amplification compromises environmental DNA metabarcoding with CO I. *Methods in Ecology and Evolution*, 2019, 10(11): 1985–2001
- DEINER K, BIK H M, ELVIRA MACHLER, *et al.* Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology*, 2017, 26(21): 5872–5880
- DOI H, INUI R, AKAMATSU Y, *et al.* Environmental DNA analysis for estimating the abundance and biomass of stream fish. *Freshwater Biology*, 2017, 62(1): 30–39
- EICHMILLER J J, BAJER P G, SORENSEN P W. The relationship between the distribution of common carp and their environmental DNA in a small lake. *PLoS One*, 2014, 9(11): e112611
- 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. *Fisheries Research*, 2018, 197(4): 60–66
- FICETOLA G, MIAUD C, POMPANON F, *et al.* Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters*, 2008, 4(4): 423–425
- FREELAND J R. The importance of molecular markers and primer design when characterizing biodiversity from environmental DNA. *Genome*, 2017, 60(4): 358–374
- HE S P, WANG W, CHEN Y Y. The RAPD analysis and the phylogenetic concerning for primitive Cyprinidae. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, 24(2): 101–106 [何舜平, 王伟, 陈宜瑜. 低等鲤科鱼类 RAPD 分析及系统发育研究. *水生生物学报*, 2000, 24(2): 101–106]
- HUA Y P. Development of a competitive PCR assay for quantifying sheep-associated malignant catarrhal fever viral DNA. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2002, 38(9): 10–13 [华育平. 定量测定羊关联性恶性卡他热病毒 DNA 的竞争性 PCR 方法的建立. *中国兽医杂志*, 2002, 38(9): 10–13]
- IVANOVA N V, ZEMLAK T S, HANNER R H, *et al.* Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. *Molecular Ecology Notes*, 2007, 7(4): 544–548
- JIANG P W, LI M, ZHANG S, *et al.* Construction of DNA meta-barcode database of fish in Pearl River estuary based on mitochondrial cytochrome CO I and 12S rDNA gene. *South China Fisheries Science*, 2022, 18(3): 13–21 [蒋佩文, 李敏, 张帅, 等. 基于线粒体 CO I 和 12S rDNA 基因构建珠江河口鱼类 DNA 宏条形码数据库. *南方水产科学*, 2022, 18(3): 13–21]
- KELLY R P, PORT J A, YAMAHARA K M, *et al.* Using Environmental DNA to census marine fishes in a large mesocosm. *PLoS One*, 2014, 9(1): e86175
- KITANO T, UMETSU K, TIAN W, *et al.* Two universal primer sets for species identification among vertebrates. *International Journal of Legal Medicine*, 2007, 121(5): 423–427
- KOBAYASHI Y, FORSTER R J, TEATHER R M. Development of a competitive polymerase chain reaction assay for the ruminal bacterium *Butyrivibrio fibrisolvens* OB156 and its use for tracking an OB156-derived recombinant. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, 188(2): 185–190
- KRUSKAL J B. Nonmetric multidimensional scaling: A numerical method. *Psychometrika*, 1964, 29(2): 115–129
- LI G J, GU D E, CAI X W, *et al.* The species composition and distribution of indigenous freshwater fishes of three main rivers in Hainan Island. *Freshwater Fisheries*, 2020, 50(6): 15–22 [李高俊, 顾党恩, 蔡杏伟, 等. 海南岛“两江一河”淡水土著鱼类的种类组成与分布现状. *淡水渔业*, 2020, 50(6): 15–22]
- LI P X. Analytical methods of gene copy number variations based on multiplex competitive PCR using universal fluorescent primers. Master's Thesis of Donghua University, 2012 [李朋祥. 基于荧光通用引物竞争性 PCR 的基因拷贝数分析方法. 东华大学硕士研究生学位论文, 2012]
- LI X H, LI J, LI Y F. Primary color Atlas of freshwater and estuarine fishes in Hainan Island. Beijing: Science Press, 2020 [李新辉, 李捷, 李跃飞. 海南岛淡水及河口鱼类原色图鉴. 北京: 科学出版社, 2020]
- LU Z C, GAO T X, LI Y H, *et al.* Optimization for the RAPD reaction system in *Gadus macrocephalus* Tilesius and *Cynoglossus semilaevis* Gunther. *Transactions of Oceanology and Limnology*, 2007, 113(3): 96–103 [鹿志创, 高天翔, 李玉晖, 等. 大头鳕和半滑舌鳎 RAPD 分析条件的优化. *海洋湖沼通报*, 2007, 113(3): 96–103]
- MENNING D, SIMMONS T, TALBOT S. Using redundant primer sets to detect multiple native Alaskan fish species from environmental DNA. *Conservation Genetics Resources*, 2020, 12(1): 109–123
- MEUSNIER I, SINGER G A C, LANDRY J F, *et al.* A universal DNA mini-barcode for biodiversity analysis. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 214
- MILAN D T, MENDES I S, DAMASCENO J S, *et al.* New 12S metabarcoding primers for enhanced Neotropical freshwater fish biodiversity assessment. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 17966
- MINAMOTO T, YAMANAKA H, TAKAHARA T, *et al.* Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology*, 2012, 13(1): 193–197
- MIYA M, SATO Y, FUKUNAGA T, *et al.* MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: Detection of more than 230 subtropical marine species. *Royal Society Open Science*, 2015, 2(7): 150088
- NEWMASER S G, FAZEKAS A J, STEEVES R A D, *et al.* Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae. *Molecular Ecology Resources*, 2008, 8(3): 480–490
- PAWLOWSKI J, APOTHELOZ P G L, ALTERMATT F. Environmental DNA: What's behind the term? Clarifying the terminology and recommendations for its future use in biomonitoring. *Molecular Ecology*, 2020, 29(22): 4258
- Pearl River Fisheries Research Institute, Shanghai Fisheries University, East China Sea Fishery Research Institute, *et al.*



- The freshwater and estuaries fishes of Hainan Island. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press, 1986 [珠江水产研究所, 上海水产大学, 东海水产研究所, 等. 海南岛淡水及河口鱼类志. 广东: 广东科技出版社, 1986]
- 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. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2013, 70(8): 1123–1130
- 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. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(2): 1–9 [钱璐毅, 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. *渔业科学进展*, 2021, 42(2): 1–9]
- RIAZ T, SHEHZAD W, VIARI A, *et al.* ecoPrimers: Inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(21): e145
- SATO Y, MIYA M, FUKUNAGA T, *et al.* MitoFish and MiFish pipeline: A mitochondrial genome database of fish with an analysis pipeline for environmental DNA metabarcoding. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 35(6): 1553–1555
- SCHENEKAR T, SCHLETTERER M, LECAUDEY L A, *et al.* Reference databases, primer choice, and assay sensitivity for environmental metabarcoding: Lessons learnt from a re-evaluation of an eDNA fish assessment in the Volga headwaters. *River Research and Applications*, 2020, 36(7): 1004–1013
- SHAN X J, LI M, WANG W J. Application of environmental DNA technology in aquatic ecosystem. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 23–29 [单秀娟, 李苗, 王伟继. 环境 DNA (eDNA)技术在水生生态系统中的应用研究进展. *渔业科学进展*, 2018, 39(3): 23–29]
- SHEN Z X, LI G J, CAI X W, *et al.* The evolution and protection of freshwater fish species in Hainan Province. *China Fisheries*, 2018, 516(11): 56–60 [申志新, 李高俊, 蔡杏伟, 等. 海南省淡水野生鱼类多样性演变及保护建议. *中国水产*, 2018, 516(11): 56–60]
- SHEN Z X, WANG D Q, LI G J, *et al.* Atlas guide to Hainan freshwater and estuarine fish. Beijing: Chinese Agricultural Press, 2021 [申志新, 王德强, 李高俊, 等. 海南淡水及河口鱼类图鉴. 北京: 中国农业出版社, 2021]
- SULTANA S, ALI M E, HOSSAIN M A M, *et al.* Universal mini CO I barcode for the identification of fish species in processed products. *Food Research International*, 2018, 105(5): 19–28
- TABERLET P, COISSAC E, HAJIBABAEI M, *et al.* Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 2012, 21(8): 1789–1793
- TAKAHARA T, IKEBUCHI T, DOI H, *et al.* Using environmental DNA to estimate the seasonal distribution and habitat preferences of a Japanese basket clam in Lake Shinji, Japan. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2019, 221(5): 15–20
- TAO J, CAO Y, ZUO Q T. Research progress on the application of environmental DNA technology on river ecosystem. *Water Resources Protection*, 2021, 37(6): 150–156 [陶洁, 曹阳, 左其亨. 环境 DNA 技术在河流生态系统中的应用研究进展. *水资源保护*, 2021, 37(6): 150–156]
- THOMSEN P F, KIELGAST J, IVERSEN L L, *et al.* Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 2012, 21(11): 2565–2573
- THOMSEN P F, WILLERSLEV E. Environmental DNA: An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 2015, 183(1): 4–18
- TURNER C R, BARNES M A, XU C C Y, *et al.* Particle size distribution and optimal capture of aqueous microbial eDNA. *Methods in Ecology and Evolution*, 2014, 5(7): 676–684
- VALENTINI A, TABERLET P, MIAUD C, *et al.* Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology*, 2016, 25(4): 929–942
- WANG M, YANG X, WANG W, *et al.* Fish diversity in Chongqing section of the national nature reserve for rare and endemic fish in the upper Yangtze River based on eDNA technology. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2022, 46(1): 2–16 [王梦, 杨鑫, 王维, 等. 基于 eDNA 技术的长江上游珍稀特有鱼类国家级自然保护区重庆段鱼类多样性研究. *水生生物学报*, 2022, 46(1): 2–16]
- WARD R D, ZEMLAK T S, INNES B H, *et al.* DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2005, 360(1462): 1847–1857
- WEI Y N, WANG X M, YAO P C, *et al.* Comparison of species resolution rates of DNA barcoding for Chinese coastal halotolerant plants. *Biodiversity Science*, 2017, 25(10): 1095–1104 [魏亚男, 王晓梅, 姚鹏程, 等. 比较不同 DNA 条形码对中国海岸带耐盐植物的识别率. *生物多样性*, 2017, 25(10): 1095–1104]
- WU Y S, TANG Y K, LI J L, *et al.* The application of environmental DNA in the monitoring of the Yangtze finless porpoise, *Neophocaena phocaenoides asaeorientalis*. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2019, 26(1): 124–132 [吴昀晟, 唐永凯, 李建林, 等. 环境 DNA 在长江江豚监测中的应用. *中国水产科学*, 2019, 26(1): 124–132]
- YAMAMOTO S, MASUDA R, SATO Y, *et al.* Environmental DNA metabarcoding reveals local fish communities in a species-rich coastal sea. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 40368
- YIN S W, HUANG H, LIAO J Q, *et al.* RAPD analysis of molecular genetic diversity and genetic relationship of four grouper species. *Acta Oceanologica Sinica*, 2006, 28(6): 119–126 [尹绍武, 黄海, 廖经球, 等. 4 种石斑鱼的分子遗传多样性和亲缘关系的 RAPD 分析. *海洋学报(中文版)*, 2006, 28(6): 119–126]
- YOCCOZ N G. The future of environmental DNA in ecology. *Molecular Ecology*, 2012, 21(8): 2031–2038

ZHANG H, XIAN W W. Application of environmental DNA technology in ecological conservation and monitoring. *Marine Sciences*, 2020, 44(7): 96–102 [张辉, 线薇薇. 环境 DNA 技术在生态保护和监测中的应用. *海洋科学*, 2020, 44(7):

96–102]

ZHANG S, ZHAO J, YAO M. A comprehensive and comparative evaluation of primers for metabarcoding eDNA from fish. *Methods in Ecology and Evolution*, 2020, 11(12): 1609–1625

(编辑 冯小花)

## Screening Universal CO I Primers for eDNA Metabarcoding of Freshwater Fishes on Hainan Island

CHEN Zhi<sup>1,2</sup>, CAI Xingwei<sup>①</sup>, SHEN Zhixin<sup>1</sup>, ZHANG Qingfeng<sup>1</sup>, LI Fangyuan<sup>1</sup>, GU Yuan<sup>1</sup>, LI Gaojun<sup>1</sup>, ZHAO Guangjun<sup>1</sup>, WANG Zhenjiang<sup>1</sup>

(1. *Hainan Academy of Ocean and Fisheries Sciences, Haikou 571126, China;*

2. *Key Laboratory of Utilization and Conservation for Tropical Marine Bioresources, Ministry of Education, Hainan Tropical Ocean University, Sanya 572022, China)*

**Abstract** The known universal primers for environmental DNA (eDNA) metabarcoding of fish are mainly located in the mitochondrial ribosome gene regions. Not only are the reference sequences insufficient but also some relative fish species could not be identified using these 12S and 16S primers. In this study, the freshwater fishes of Hainan Island were selected to meet six investigation targets. (1) Six conserved regions were selected through the cytochrome c oxidase subunit I (CO I) sequences of 8 orders, 26 families, 101 genera, and 150 species; (2) Based on the base variation, species identification, eDNA degradation, and read length requirements of high-throughput sequencing, 26 primers were designed from four flanking conserved regions; however, six primers did not meet the Premier score requirements. (3) The first-round PCR results of 72 freshwater fish species on Hainan Island showed that 11 primers had high universality. Among them, there were 5 primers with more than 70 species successfully amplified and brighter PCR bands than marker. The second-round of PCR results showed that the amplification success rate of 3×2 (forward and reverse, respectively) primer combinations generated by the five primers was 100%, and the optimal primer combinations after PCR band length and brightness screening were "HN-A-F4, HN-D-R3" (hereinafter referred to as HN-CO I). (4) High-throughput sequencing results of 30 water samples showed that the total number of clean reads, fish sequences, operational taxonomic units (OTUs), and fish OTUs generated by HN-CO I were 0.77, 1.22, 0.85, and 1.32 times those of MiFish-U, respectively. (5) The proportion of fish OTUs annotated to species, genus, and family was 81.40%, 11.63%, and 6.98% for HN-CO I and 81.54%, 4.62%, and 13.85% for MiFish-U, respectively. The non-metric multidimensional scaling (NMDS) clustering pattern of "primer + water sample" formed two distinct groups with an obvious boundary (stress=0.15). The minimum and average values of pairwise genetic distances of species amplicons within genera of HN-CO I were 1.23 and 1.57 times those of MiFish-U, respectively. (6) The correlation coefficient of the linear regression equation of common carp biomass and sequence copies of the six indoor density groups was low. HN-CO I and MiFish-U could not accurately reflect the biomass of common carp. In this study, the advantages and disadvantages of HN-CO I were screened and compared with those of MiFish-U. The results showed that HN-CO I primers have a high targeting ability for freshwater fishes on Hainan Island. HN-CO I are advantageous in preventing eDNA contamination from non-target organisms, such as microorganisms and mammals, and is also conducive to the detection and accurate identification of freshwater fishes.

**Key words** Hainan Island; Freshwater fish; Environmental DNA; CO I; Universal primers

① Corresponding author: CAI Xingwei, E-mail: caixw618@163.com