

## 淡水鱼类环境 DNA 宏条形码引物的筛选及其在千岛湖的应用\*

周 严<sup>1,2</sup>, 童 璐<sup>1,2</sup>, 胡文静<sup>1,2</sup>, 李志力<sup>1,2</sup>, 郝 雷<sup>1,2</sup>, 刘其根<sup>1,2</sup>, 胡忠军<sup>1,2\*\*</sup>

(1: 上海海洋大学, 农业农村部鱼类营养与环境生态研究中心, 上海 201306)

(2: 上海海洋大学, 农业农村部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306)

**摘 要:** 基于环境 DNA (eDNA) 技术的鱼类多样性监测方法因具有灵敏度高、对目标生物无伤害以及成本低等特点, 近年来在国内外得到了广泛应用。eDNA 方法的有效性往往取决于宏条形码引物的选择, 尽管目前已经有一些鱼类环境 DNA 宏条形码引物, 但较少有研究综合评估这些引物的检出效果。本研究评估了来自 *COI*、*Cytb*、12S rRNA 和 16S rRNA 基因的 29 对鱼类 eDNA 宏条形码引物 (包括本研究设计的 2 对和从国内外文献中引用的 27 对引物), 首先基于计算机模拟 PCR (in silico PCR) 进行了初步分析, 随后通过高通量测序对其中效果较好的 17 对引物开展了更进一步的验证, 结果显示: 计算机模拟 PCR 结果良好的引物在进行高通量测序时并非全部表现良好, 表明引物的筛选不能仅仅依靠计算机模拟 PCR; 具有更长扩增片段长度的宏条形码引物并没有获得理想中更好的扩增效果, 表现效果好的引物大多是扩增片段长度处于 200~300 bp 之间的引物; 相对于 *COI* 和 *Cytb* 而言, 12S rRNA 引物与 16S rRNA 引物均具有良好的扩增效果, 适宜作为鱼类环境 DNA 宏条形码而用于鱼类多样性研究; 同时, 鉴于当前的鱼类 DNA 条形码数据库尚不完备以及不同引物的特性不同, 使用多对引物将大大增加物种的检出概率和 eDNA 研究的可信性。本研究展示了 eDNA 在评估生物多样性方面的潜力, 有助于将来的鱼类 eDNA 研究, 从而为鱼类多样性的保护提供参考。

**关键词:** eDNA; DNA 宏条形码; 生物多样性; 计算机模拟 PCR; 引物; 千岛湖

## Screening of primers for environmental DNA metabarcoding of freshwater fish and its application in Lake Qiandaohu\*

Zhou Yan<sup>1,2</sup>, Tong Lu<sup>1,2</sup>, Hu Wenjing<sup>1,2</sup>, Li Zhili<sup>1,2</sup>, Hao Lei<sup>1,2</sup>, Liu Qigen<sup>1,2</sup> & Hu Zhongjun<sup>1,2\*\*</sup>

(1: Centre for Research on Environmental Ecology and Fish Nutrition of the Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, P.R.China)

(2: Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, P.R.China)

**Abstract:** In recent years, environmental DNA (eDNA) technology for monitoring fish diversity have been used worldwide due to its high sensitivity, harmlessness to target organisms and low cost. However, the effectiveness of eDNA methods depends on the selection of metabarcoding primers. Although some environmental DNA metabarcoding primers for fish are available, few studies have comprehensively evaluated the detection effectiveness of these primers. In this study, 29 pairs of fish eDNA metabarcoding primers from *COI*, *Cytb*, 12S rRNA and 16S rRNA genes (including 2 pairs designed in this study and 27 pairs cited from previous literatures) were evaluated. A preliminary analysis was performed in silico PCR, followed by further validation of the 17 primer pairs that worked well by high-throughput sequencing. The results showed that the primers with good results in silico PCR did not necessarily perform well in high-throughput sequencing, indicating that the selection of primers cannot rely on silico PCR alone. The metabarcoding primers with longer amplification fragment length did not obtain better amplification results. Most of the primers with good performance were in the 200–300 bp fragment length range. In contrast to *COI* and *Cytb*, 12S rRNA primers and 16S rRNA primers had good amplification effects and were suitable for use as environmental DNA metabarcoding for fish diversity studies. Meanwhile, given the incompleteness of the current fish DNA barcode database and the different characteristics of different prim-

\* 2023-04-03 收稿; 2023-07-03 收修改稿。

国家重点研发计划重点专项 (2019YFD0900605) 资助。

\*\* 通信作者; E-mail: zjhu@shou.edu.cn。

ers, amplification using multiple primer pairs would greatly increase the detection probability of species and the credibility of eDNA studies. This study demonstrates the potential of eDNA in assessing biodiversity, which will help future eDNA studies of fish and thus provides a reference for the conservation of fish diversity.

**Keywords:** eDNA; DNA metabarcoding; biodiversity; in silico PCR; primers; Lake Qiandaohu

维持生物多样性的稳定是生态系统可持续发展的基础,由于人类的过度开发、气候变化、环境污染、外来物种入侵等因素,全球野生动物资源量正在大幅缩减,据 2022 年世界自然基金会发布的地球生命力报告显示,自 1970—2018 年之间,全球野生动物种群数量消亡了 69%,地球生命力指数下降幅度超过一半以上<sup>[1]</sup>。截至目前,全球共有 3 万多种鱼类,占有脊椎动物的一半以上,具有重要的生态效益和经济价值<sup>[2-3]</sup>。随着对鱼类受威胁状况了解的深入,鱼类所受威胁的认知度也不断加深,以中国为例,在最新的《中国生物多样性红色名录》(脊椎动物卷)评估中受威胁的鱼类比例高达 22.5%,鱼类保护工作的实施已迫在眉睫<sup>[4]</sup>。鱼类多样性的有效保护依赖于对现有鱼类群落生态和动态的深入了解,这需要对鱼类的群落结构进行全面和准确的评估。传统的鱼类多样性评估多依靠捕捞如电捕、网捕等方式进行样品的采集,不仅需要大量的人力和时间,而且成本也较高;同时,基于形态学的物种鉴定非常容易出错,处在生活史早期阶段的鱼类鉴定尤为如此,因此鱼类样品的准确分类需要依赖专业的鉴定人员<sup>[5]</sup>。此外,基于捕获的调查方式往往会对鱼类本身造成伤害,反而使得鱼类的资源量变得更少,这也违背了生物多样性保护工作的初衷<sup>[6]</sup>。

eDNA (environmental DNA) 是指从环境样品(如土壤、水或空气)中提取的片段 DNA,不需要预先捕获任何目标生物<sup>[7]</sup>。eDNA 方法是基于直接从环境样本提取到的生物体 DNA 进行序列分析,可以在不捕获实际生物体的情况下对目标物种进行识别<sup>[8]</sup>。自 2008 年 Ficetola 首次成功将 eDNA 技术应用于水生生物调查以来,越来越多的人开始使用这种方法,基于 eDNA 的生物多样性监测已被证明是一种高效、经济和微创的生物监测方法<sup>[8-10]</sup>。将宏条形码引物与高通量测序相结合,eDNA 方法在鱼类多样性监测方面取得了巨大的进步,与传统的调查方式相比较,其能够更好地揭示物种的丰富度,已彻底改变了动植物资源的调查方式<sup>[11-13]</sup>。

目前,基于 eDNA 的生物多样性监测技术仍不够完善,需进一步开展系统的研究和验证<sup>[14]</sup>。在技术应用方面,宏条形码引物合适与否常被认为是影响 eDNA 监测结果准确性的主要因素之一<sup>[15]</sup>。不同引物对于鱼类物种的覆盖率和分辨能力有所不同,尤其是当引物对于鱼类环境 DNA 的扩增效率比较低、存在许多非目标物种的扩增,或对不同物种的序列区分能力不足时,往往会出现假阳性或者假阴性的鉴定结果,而理想的引物应具有较高的物种覆盖率、较强的物种分辨率、适当的条形码长度以及更少的非特异性扩增等优势<sup>[15-16]</sup>。因此,引物的开发或筛选是提高 eDNA 监测效率和可靠性的关键步骤<sup>[13,17]</sup>。

过去有研究者针对鱼类群落开发了部分宏条形码引物,并且成功地描述了当地的鱼类多样性<sup>[18-19]</sup>。由于很难对这些来自不同研究中的宏条形码引物的监测效果进行比较与评估,许多研究人员仅依据个人的主观判断从众多引物中挑选一对引物对鱼类物种多样性展开研究,并未深入分析该引物的特征以及其对所研究群落的适用性<sup>[20-21]</sup>。近年来,相关研究开展了 eDNA 宏条形码引物的分析和测试,但仅评估了少量的引物<sup>[22]</sup>,也有部分研究选取较多的引物开展了相对全面的评估<sup>[16,23]</sup>,伴随新的引物不断被开发出来<sup>[24-25]</sup>,与之前常用的宏条形码引物相比,新开发出来的引物是否有更好的表现,仍需进一步验证。因此,有必要对现有的宏条形码引物进行全面评估,并探讨它们在基于 eDNA 技术的鱼类物种监测中的适用性和可靠性。

本研究结合计算机模拟 PCR 和野外样品实验验证,比较评估已发表的基于 12S、16S、*COI* 和 *Cytb* 线粒体基因设计的 27 对引物,以及自行设计的 2 对引物,共 29 对引物。首先,计算机模拟 PCR 分析来自 Mitofish 数据库鱼类基因数据的物种覆盖率和扩增长度等,接着对来自千岛湖五大湖区及其支流的 eDNA 样品进行宏条形码分析以综合评价不同宏条形码引物优劣势,为今后基于 eDNA 技术的鱼类物种多样性评估提供参考。

## 1 材料和方法

### 1.1 引物的检索与设计

为尽可能全面地搜集有关鱼类的宏条形码引物,在科学网(www.webofscience.com)以 eDNA 或 environ-

mental DNA 或 eDNA metabarcoding 为关键词进行文献检索,共检索到 27 对已应用于 eDNA 研究且效果较好的宏条形码引物,包括了 12S rRNA、16S rRNA、*COI* 和 *Cytb* 基因。同时,基于千岛湖历史记录中的鱼类物种,从 NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 和 Mitofish 数据库 (<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/>) 中下载了 105 种鱼类的 127 条线粒体 DNA 序列,使用 Primer Premier 5.0 软件<sup>[26]</sup> 基于 12S rRNA 区域设计了 2 对宏条形码引物,以上所得到的 eDNA 宏条形码引物汇总如表 1 所示。

表 1 本研究分析的 22 对鱼类宏条形码引物  
Tab.1 Summary of the 22 fish metabarcoding primer sets analyzed in this study

引物名称	原始名称	目的基因	退火温度/°C	引物序列(5'~3')	参考文献
Teleo	Teleo F/R	12S	55	For-ACACCGCCCGTCACTCT Rev-CTTCCGGTACTTACCATG	[ 11 ]
GFCC	GFCC-COI-F/R	<i>COI</i>	50	For-AGCCCACGCAGGAGCATCAG Rev-ACGGCCGTTACAAGCACGGA	[ 27 ]
FishCBLR	FishCBL/R	<i>Cytb</i>	60	For-TCCTTTTGAGGCGCTACAGT Rev-GGAATGCGAAGAATCGTGTT	[ 28 ]
LHCYB	L14912CYB-H15149CYB	<i>Cytb</i>	55	For-TTCCTAGCCATACAYTAYAC Rev-GTGCGKCCCTCAGAAGGACATTTGKCCYCA	[ 29 ]
L2513	L2513/H2714	16S	60	For-GCCTGTTTACAAAAACATCAC Rev-CTCCATAGGGTCTTCTCGTCTT	[ 30 ]
16SAR/BR	16SAR/BR	16S	55	For-CGCCTGTTTATCAAAAACAT Rev-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT	[ 31 ]
MiFish-U	MiFish-U	12S	60	For-GTCGGTAAAACTCGTGCCAGC Rev-CATAGTGGGTATCTAATCCCAGTTTG	[ 18 ]
12S-V51	12S-V5	12S	52	For- TAGAACAGGCTCCTCTAG Rev-TTAGATACCCCACTATGC	[ 19 ]
12S-V52	12S-V5	12S	52	For-ACTGGGATTAGATACCCC Rev-TAGAACAGGCTCCTCTAG	[ 19 ]
mlCOIint	Leray ( mlCOIintF/jgHCO2198 )	<i>COI</i>	62	For-GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC Rev-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	[ 32 ]
Fish16S	Fish 16S	16S	60	For-GACCCTATGGAGCTTTAGAC Rev-CGCTGTTATCCCTADRGTAACT	[ 33 ]
FishF1/R1	FishF1/R1	<i>COI</i>	54	For-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC Rev-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA	[ 34 ]
FishF2/R2	FishF2/R2	<i>COI</i>	54	For-TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC Rev-ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA	[ 34 ]
AcMDB07	AcMDB07	12S	60	For-GCCTATATACCGCCGTCG Rev-GTACTTACCATGTTACGACTT	[ 23 ]
16S_Fish	16S_Fish_F/R	16S	58	For-AGCGYAATCACTTGTCTYTAA Rev-CRBGGTCCGCCAAACCRAA	[ 35 ]
fish	12SA-L/B-H	12S	60	For-AAACTGGGATTAGATACCCCACTAT Rev-GAGGGTGACGGCCGGTGTGT	[ 31, 36 ]
ChordA	Chord_16S_TagA	16S	52	For-CGAGAAGACCCTRTGGAGCT Rev-GGATTGCGCTGTTATCCCT	[ 37 ]
ChordB	Chord_16S_TagB	16S	52	For-CGAGAAGACCCTRTGGAGCT Rev-CCTNGGTGCCCCCAAC	[ 37 ]
qdfish1	qdfish1	12S	55.5	For-CGGTAAAACTCGTGCCAGCC Rev-AGCGTAGTGGGGTATCTAATCCC	本研究

续表 1

引物名称	原始名称	目的基因	退火温度/°C	引物序列(5'~3')	参考文献
qdfish2	qdfish2	12S	63	For-CGGTAAAACCTCGTCCAGCC Rev-TATCGGTGCTTGAACAGGCTCCTC	本研究
metaUni126	metaUni126F/R	16S	57	For-RYAAGACGAGAAGACCCTRTG Rev-RRGATTGCGCTGTTATCCCT	[25]
qUni126	metaUni126F/qUni126	16S	58	For-RYAAGACGAGAAGACCCTRTG Rev-YAGATAGAAACYGACCTGGATT	[25]
16SFishS	16S_FishSyn_Short	16S	55	For-GACGAGAAGACCCTGTGGAGC Rev-CCGYGGTCGCCCAAC	[24]
16SFishL	16S_FishSyn_Long	16S	60	For-GACGAGAAGACCCTDTGGAG Rev-GRATTGCGNTGTTATCCCT	[24]
L14912	L14912/H15149c	<i>Cytb</i>	54	For-AAAAACCACCGTTGTTATTCAACTA Rev-GCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA	[38, 39]
Ac12s	Ac12s	12S	65	For-ACTGGGATTAGATACCCCACTATG Rev-GAGACTGACGGCGGTGT	[38]
Am12s	Am12s	12S	61	For-AGCCACCGCGGTATACG Rev-CAAGTCCTTTGGGTTTTAAGC	[38]
Ac16s	Ac16s	16S	60	For-CCTTTTGCATCATGATTTAGC Rev-CAGGTGGCTGCTTTTAGGC	[38]
Ve16s	Ve16s	16S	63	For-CGAGAAGACCCTATGGAGCTTA Rev-AATCGTTGAACAAACGAACC	[38]

## 1.2 计算机模拟 PCR

于 2021 年 11 月,从 Mitofish 数据库中下载 3118 种鱼类的线粒体 DNA 序列,构建了标准鱼类线粒体 DNA 条形码数据库。首先,使用 PrimerMiner 对 Mitofish 数据库中 3118 种鱼类进行评估,以此来计算宏条形码引物对于 Mitofish 数据库中不同鱼类物种的覆盖率和分辨率<sup>[40]</sup>,允许的最大错配数为 3 bp。随后使用 Tbttools 对成功扩增的序列长度进行分析<sup>[41]</sup>。最后通过 megaX 计算扩增序列之间的平均遗传距离<sup>[42]</sup>,以评估不同宏条形码引物所扩增鱼类序列之间的差异程度。当引物扩增的物种数目大于所有引物扩增鱼类物种数的平均值且平均扩增长度处于 100~500 bp 之间时,该引物被用于下一步实验,以进一步评估其对于实际环境 DNA 样本中鱼类的监测能力。

## 1.3 eDNA 样品的采集与保存

千岛湖位于浙江省杭州市淳安县境内,有着良好的生态环境和丰富的鱼类资源,自 20 世纪以来的历史标本和网捕调查结果记录了上百种鱼类<sup>[43]</sup>。为了评估引物对于实际采集的环境 DNA 中鱼类的监测效果,本研究对来自千岛湖湖区及其支流的水环境 DNA 进行了验证。在 2020 年 12 月—2021 年 10 月,从千岛湖五大湖区和 14 条支流共计 39 个站点进行了水样的采集。通过玻璃采水器,在每个采样点水下约 0.5、5 和 10 m 的位置收集 3 个 2 L 的水样,将水样混合均匀后放置在冰上运回上海海洋大学千岛湖基地实验室,在 12 h 内全部过滤。抽滤过程中所涉及的镊子、过滤器均提前置于 10% 的次氯酸钠溶液中浸泡 10 min,并使用纯水冲洗干净。每次过滤前均设置 2 L 无菌水作为阴性对照,使用孔径 0.22 μm 的混合纤维素滤膜(生工生物)对采集的水样进行过滤,过滤完后将滤膜对折,放置于 2 mL 离心管中,采用干冰冷冻保存。

## 1.4 传统鱼类资源调查

于 2020 年 9 月—2021 年 11 月对千岛湖五大湖区及其主要支流开展了野外调查,在千岛湖湖区及河湖交汇处的滴水区表层、5 m 水层、10 m 水层分别放置多网目单层刺网 1 套,在沿岸带放置多网目单层刺网 1 套、定置串联倒须笼网 2 个。支流主要依靠定置串联倒须笼网的方式进行鱼类多样性调查,在每个采样点放置定置串联倒须笼网 2 个。傍晚日落前 1 h 左右放网,其在水中浸泡约 12 h 后,次日清晨收网。收集所有鱼类,用低温保温箱将鱼类运回上海海洋大学千岛湖基地实验室,进行物种鉴定和形态学数据的测量。

### 1.5 eDNA 的提取、PCR 扩增和测序

样品运输至实验室后,采用 Fast DNA Spin Kit(MPBio)试剂盒并参照说明书进行总 DNA 的提取。提取后的 DNA 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,并用 NanoDrop 2000 质检合格后于 $-20^{\circ}\text{C}$  保存备用。对于计算机模拟 PCR 中扩增长度在 100~500 bp 且扩增出的物种数在所有引物扩增鱼类物种数的平均值之上的引物进行下一步实验,以原始设计论文中使用的  $T_m$  值为中心,在 10~20 $^{\circ}\text{C}$  范围内的不同温度梯度下,使用通用程序执行 8~12 个重复 PCR,确定每个引物组的最佳退火温度。针对每一对引物,均进行至少两次梯度 PCR 实验,以确保扩增效果的一致性。对于每个引物组,在明确最适退火温度后,使用已提取好的 21 个 eDNA 样本和 3 个阴性对照进行 PCR 扩增,每一次 PCR 均为 3 个重复,以确保 PCR 产物的量足以进行测序。每次 PCR 反应的总体积为 25  $\mu\text{L}$ ,其中模版 DNA 1  $\mu\text{L}$ 、正反引物各 1  $\mu\text{L}$ (10  $\mu\text{mol}$ )、Ultra HiFidelity PCR Kit II(天根生物)12.5  $\mu\text{L}$ 、 $\text{ddH}_2\text{O}$  9.5  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为:98 $^{\circ}\text{C}$  30 s;98 $^{\circ}\text{C}$  10 s,退火温度( $T_m$ )20 s,72 $^{\circ}\text{C}$  20 s,35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$  5 min。随后通过 1% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测,确保检测结果均为一条单一明亮的条带,将每一条带进行切胶,纯化回收,并用 NanoDrop 2000 分光光度计(Thermo Scientific)测定 DNA 浓度,将每组引物扩增纯化后的 21 个 PCR 产物进行等量混合,利用 Illumina 公司的 Miseq PE300 平台进行测序,进一步的文库构建和上机测序由上海美吉生物技术有限公司进行。

### 1.6 测序数据的生物信息学处理

基于 fastp<sup>[44]</sup>(<https://github.com/OpenGene/fastp>, version 0.20.0)软件去除引物接头序列,并对原始测序序列进行质控,过滤掉低质量的 Reads。采用 FLASH<sup>[45]</sup>(<http://www.cbcb.umd.edu/software/flash>, version 1.2.7)软件根据 Reads 间的重叠关系,对严格过滤后的 Reads 进行拼接。使用软件 USEARCH(v7.0.1090)根据 97% 的相似度将序列聚类为可操作分类单元(OTU)<sup>[46]</sup>。为了解每个 OTU 所对应的物种,采用 BLAST 算法对 OTU 代表序列进行分类学比对,参考数据库为 Nt 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),将序列一致性 $\geq 97\%$ 作为阈值,对 OTU 代表序列进行注释。使用 Qiime 软件基于 bray\_curtis 距离算法计算 beta 多样性距离矩阵<sup>[47]</sup>,使用 R 语言(version 3.3.1)vegan 软件包进行 NMDS 分析和作图<sup>[48]</sup>。

## 2 结果

### 2.1 计算机模拟 PCR 分析

本研究通过计算机模拟 PCR 对来自 Mitofish 数据库中的 3118 种鱼类序列进行扩增,不同宏条形码引物对于不同鱼类物种的覆盖度和分辨率分析结果如图 1 所示。使用 29 对引物所扩增出的平均鱼类物种数为 2523 种,引物 12S-V52 扩增出的鱼类物种数最多,一共扩增出了 3113 种鱼类,引物 GFCC 扩增的鱼类物种数最少,仅扩增出了 429 种鱼类。对扩增出的鱼类物种作进一步分析,平均每对引物能够准确鉴定的物种数为 2144 种,引物 16SAR/BR 能够准确鉴定的鱼类物种数最多,为 2782 种,引物 GFCC 能够准确鉴定的物种数最少,为 336 种。

通过对不同宏条形码引物扩增出的鱼类序列长度作进一步分析,大多数宏条形码引物的扩增长度处于 100~500 bp 之间。不同 eDNA 宏条形码引物扩增的平均条形码长度为 305 bp,其中 FishF1/R1 扩增出了最长的长度,为 655 bp,引物 Teleo 扩增出了最短的长度,为 63 bp(图 2)。

### 2.2 遗传距离分析

基于不同引物扩增出的鱼类物种,计算了不同物种之间的平均遗传距离。29 对引物扩增的鱼类物种间遗传距离的平均值为 19.02% $\pm$ 3.52%(图 3),引物 ChordB 扩增出的鱼类序列之间平均遗传距离最大,其次是 Fish16S 和 16SFishS,而引物 L2513 扩增出的鱼类序列之间平均遗传距离最小。

### 2.3 高通量测序结果

基于计算机模拟 PCR 的结果,有 17 对引物成功扩增的物种数以及扩增片段长度处于符合的范围内而被用于下一步分析。通过对已提取的 eDNA 样本进行 PCR 扩增和上机测序,经过质控、拼接、聚类以及数据库比对,17 对引物中有 15 对被成功扩增并得到了与之相关的测序结果,另外 2 对引物由于扩增的序列没有匹配到具有 $\geq 97\%$ 相似性的鱼类序列而被删去。15 对引物所构建的测序文库共获得有效拼接序列 961740 条,有效拼接序列最多的为 Ac16s,共获得 127385 条序列,最少的为 Ac12s,共获得 31255 条序列。从物种种

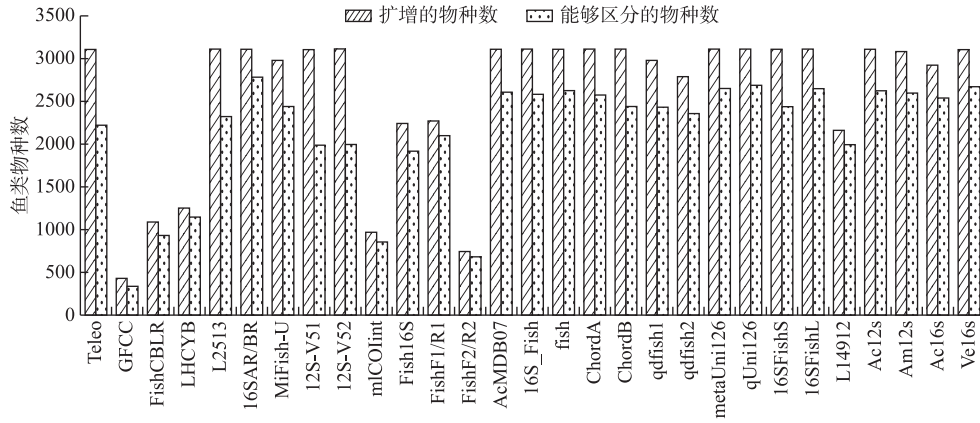


图 1 不同引物能够扩增出的物种数和能够明确鉴定出的鱼类物种数量

Fig.1 Number of species that can be amplified and number of fish species that can be unambiguously identified by different primers

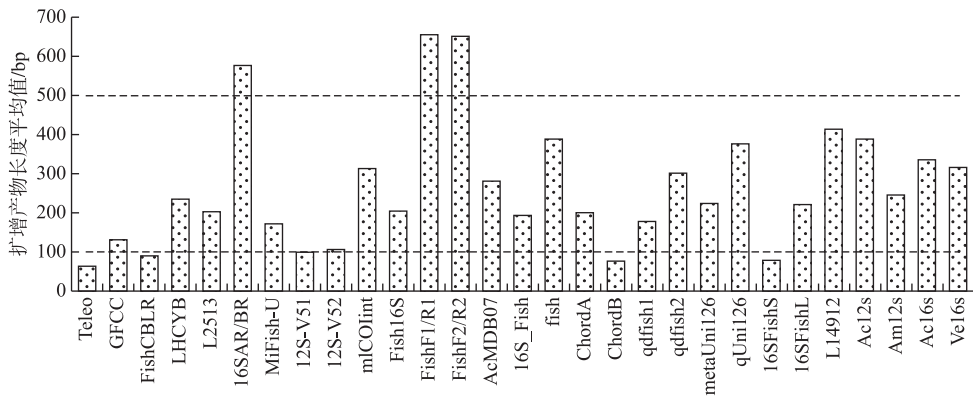


图 2 基于计算机模拟 PCR 结果计算出的每对引物平均扩增长度 (虚线表示用于下一步实验验证时扩增片段长度的阈值)

Fig.2 Average amplification length per primer pair calculated based in silico PCR results (虚线表示用于下一步实验验证时扩增片段长度的阈值)

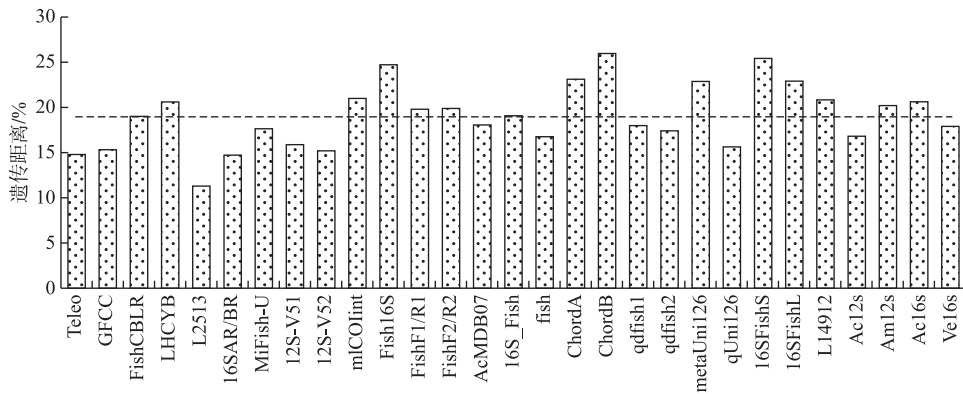


图 3 不同引物扩增出的鱼类序列之间的遗传距离(虚线表示平均值)

Fig.3 Genetic distance between fish sequences amplified by different primers

释曲线图(图 4)可知,随着测序量的增加,曲线逐渐趋向于平缓,由此可以看出测序深度足以覆盖样品中所有的物种,可以用于后续分析。

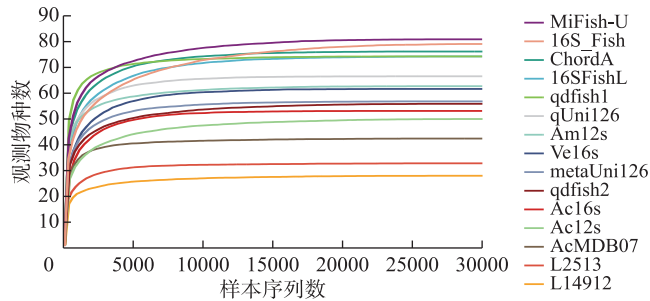


图 4 使用不同引物所得到的物种稀释曲线

Fig.4 Rarefaction curves of the observed species in different primers

## 2.4 鱼类物种组成

不同宏条形码引物所监测到的鱼类物种数量如图 5 所示,平均每对引物监测出的鱼类物种数为 60 种,引物 MiFish-U、16S\_Fish、ChordA、16SFishL、qdfish1 监测到的鱼类物种数相对较多,而其他引物监测到的物种数相对较少(如 L14912 只扩增出了 28 种鱼类)。将不同宏条形码引物监测到的鱼类物种与传统鱼类资源调查结果进行对比,尽管监测到的物种数排名前四的引物仍为 MiFish-U、16S\_Fish、ChordA、16SFishL,但监测到物种数最多的宏条形码引物是 ChordA (58 种),其次是 16SFishL (57 种),然后是引物 16S\_Fish 和 MiFish-U。

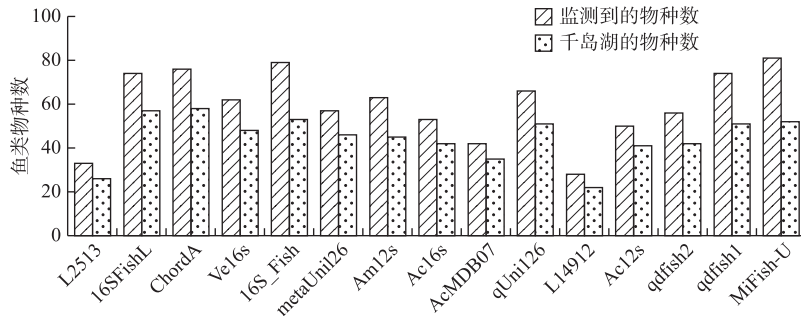


图 5 不同引物在环境 DNA 宏条形码分析中所得到的鱼类物种数量

Fig.5 Number of fish species obtained by different primers in environmental DNA metabarcoding analysis

基于不同的宏条形码引物所获得测序结果,选取丰度排名前 50 的鱼类物种,绘制了鱼类物种组成差异图。如图 6 所示,丰度排名前 50 的鱼类中,16SFishL、ChordA、Mifish-U、qdfish1 监测的物种数最多,均监测到了 40 种以上的鱼类;而引物 L14912 和 L2513 监测到的物种数最少,仅为 19 种。不同的引物既显示出了各自所具备的特性也显示出了不足之处,一方面,本研究中所用到的引物对于大部分鱼类物种均能够监测到,另一方面,也有一些物种仅仅只被一对引物或个别引物所监测到。

## 2.5 群落结构组成

基于不同引物所获得的高通量测序结果,绘制了不同物种的序列分布柱状图(图 7)。引物 L2513、Ve16s 和 qUni126 扩增出的鱼类序列数只占总体序列数的 50% 左右,引物 Ac12s 扩增出的鱼类序列数占所有鱼类序列数的 70%~80% 之间,引物 metaUni126、Am12s、qdfish2 和 qdfish1 扩增出的鱼类序列数在 80%~90% 之间,如 Am12s (84.42%);其余 6 对引物扩增的鱼类序列数占比都大于 90%。在大部分引物所扩增出序列中,鱼类的序列都是最多的,但也有一部分引物的特异性不是很好,除了扩增出鱼类的 DNA 序列之外,

	L2513	16SFishL	ChordA	Ve16s	16S_Fish	metaUni26	Am12s	Ac16s	AcMDB07	qUni26	L14912	Ac12s	qdfish2	qdfish1	MiFish-U
<i>Hypophthalmichthys nobilis</i>															
<i>Pseudolaubuca sinensis</i>															
<i>Ancherythroculter wangi</i>															
<i>Rhinogobius similis</i>															
<i>Yanmanenia stenosoma</i>															
<i>Acrossocheilus kreyenbergii</i>															
<i>Coilia brachygnathus</i>															
<i>Toxabramis swinhonis</i>															
<i>Cyprinus carpio</i>															
<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>															
<i>Rhinogobius wuyiensis</i>															
<i>Rhinogobius formosanus</i>															
<i>Hemiculter ichangii</i>															
<i>Megalobrama terminalis</i>															
<i>Parabramis pekinensis</i>															
<i>Squalidus argentatus</i>															
<i>Sinibrama macrops</i>															
<i>Xenocypris fangi</i>															
<i>Lepomis macrochirus</i>															
<i>Opsariichthys evalans</i>															
<i>Opsariichthys acutipinnis</i>															
<i>Opsariichthys uncirostris</i>															
<i>Hemiculter leucisculus</i>															
<i>Yanmanenia hainanensis</i>															
<i>Xenocypris yunnanensis</i>															
<i>Acrossocheilus</i>															
<i>Channa argus</i>															
<i>Distoechodon tunirostris</i>															
<i>Hyporhamphus intermedius</i>															
<i>Culter alburnus</i>															
<i>Rhinogobius cliffordpopei</i>															
<i>Rhinogobius brunneus</i>															
<i>Ctenopharyngodon idella</i>															
<i>Sarcocheilichthys parvus</i>															
<i>Rhinogobius shemongensis</i>															
<i>Megalobrama amblycephala</i>															
<i>Ictalurus punctatus</i>															
<i>Nivaeella nigrolinea</i>															
<i>Tachysurus fulvidraco</i>															
<i>Mylopharyngodon piceus</i>															
<i>Siniperca scherzeri</i>															
<i>Rhinogobius nagayae</i>															
<i>Pseudohagerus medianalis</i>															
<i>Siniperca kneri</i>															
<i>Rhinogobius lentiginis</i>															
<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>															
<i>Coreoperca liui</i>															
<i>Silurus asotus</i>															
<i>Xenocypris argentea</i>															
<i>Leptobotia rubrilabris</i>															

图 6 不同引物监测到的鱼类物种差异图(丰度排名前 50)

Fig.6 Map of differences in fish species monitored by different primers (top 50 in abundance)

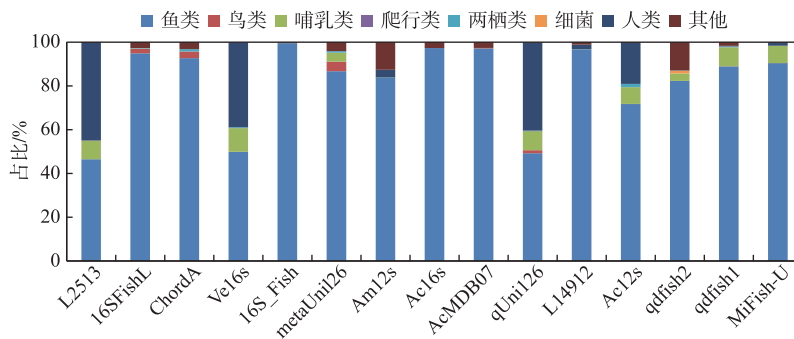


图 7 不同引物基于体外 eDNA 宏条形码分析所得的序列分布

Fig.7 Sequence distribution of different primers based on in vitro eDNA metabarcoding analysis

也扩增出了一些其他类群物种的序列,如鸟类、爬行类、两栖类等。

将针对不同目的基因的宏条形码引物分为 3 类进行 NMDS 分析,结果如图 8 所示。NMDS 分析计算出 stress 值为 0.1, 小于 0.2, 表明分析结果具有一定的可靠性,可以反映出不同引物监测到的鱼类物种间的差异程度。基于相同的 eDNA 样本,尽管不同的引物产生了不同的鱼类多样性特征,但不同组之间没有显著的差异。



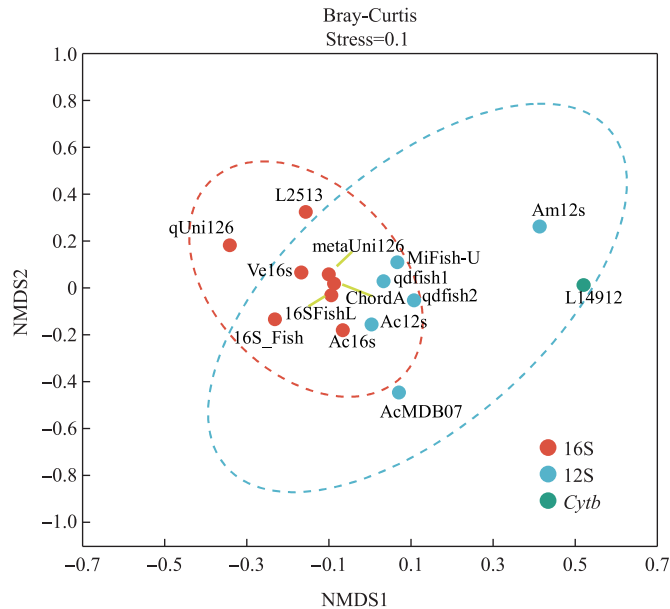


图 8 鱼类群落结构的 NMDS 分析  
Fig.8 NMDS analysis of fish community structure

### 3 讨论

#### 3.1 不同引物对于鱼类的覆盖度和分辨能力分析

对不同鱼类物种有着更广泛的覆盖范围并且能够有更大的区分程度是使用 eDNA 宏条形码对鱼类物种多样性进行监测的先决条件。通过计算机模拟 PCR 发现,不同的宏条形码引物对鱼类的扩增效率和分辨能力也有所不同。总的来说,COI 和 Cytb 基因对于鱼类物种的分辨能力并不差,除了引物 GFCC,其他引物扩增出的鱼类序列之间的遗传距离均处于平均值以上。此外,COI 基因参考数据库所覆盖的物种也更加广泛<sup>[49]</sup>。然而,基于 12S 和 16S 基因设计的宏条形码引物比基于 COI 和 Cytb 的宏条形码引物所扩增出的鱼类物种数更多,因而能够区分出的鱼类物种数也更多。对此,以往的研究者也有着相似的发现,陈治等<sup>[50]</sup>通过对海南岛淡水鱼类的 DNA 条形码研究发现,对于鱼类物种判别能力最高的目标基因为 COI,其次为 16S 和 12S。但在实际的鱼类环境 DNA 研究中却很少用 COI 作为目标基因,其最大原因在于 COI 很难设计出 DNA 宏条形码通用引物<sup>[18]</sup>,且也有研究表明,对水生动物 DNA 浓度低的水环境而言,靶向于鱼类 COI 基因的引物比 12S 表现较差<sup>[51]</sup>,限制了 COI 引物在基于 eDNA 技术的鱼类多样性监测中的应用。

在模拟 PCR 后对其中的 17 对宏条形码引物作了进一步验证,分析结果显示,尽管 17 对引物在模拟 PCR 中的分析结果均显示良好,但在实际的扩增过程中,结果却各有不同。17 对引物中有 2 对因未能成功扩增出鱼类的序列而被删除,其余 15 对宏条形码引物最多的监测到了 81 种鱼类,最少的仅监测到了 28 种鱼类。由此可以看出,模拟 PCR 可以帮助我们增加对于引物本身的了解,但模拟 PCR 仍需要与实际的宏条形码分析结合起来。监测到鱼类物种数最多的 5 对引物中,有 3 对是基于 16S rRNA 设计的,有 2 对是基于 12S rRNA 设计的,这也表明了基于 12S 和 16S 基因都能够设计出较好的引物以用于 eDNA 研究。具体来看,不同引物对于鱼类的覆盖度和分辨能力也有所不同,如 MiFish-U、16S\_Fish、ChordA、16SFishL 和 qdfish1 对鱼类的覆盖度更高一些,但从不同引物对扩增的鱼类物种的分辨能力来看,16SAR/BR、qUni126 和 Ve16s 又是最好的。基于不同的宏条形码引物所获得测序结果,一方面不同的引物都监测到了一些相同的鱼类物种,使得它们之间可以相互印证,增加了研究的可靠性;另一方面,由于不同引物具有不同的特性和优缺点,互相补充能够最大程度地提高鱼类的检测概率,因此在今后的基于 eDNA 的物种多样性研究中,推荐采用多

对宏条形码引物进行监测。

### 3.2 不同引物的特异性比较

对鱼类序列进行特异性扩增是鱼类环境 DNA 宏条形码引物选择的重点,如果对鱼类物种序列的特异性不够高,则在 PCR 扩增的过程中就可能过度扩增其他物种的序列,从而占用大量的测序通量并导致鱼类的测序量不足,无法获得足够的鱼类分类学信息<sup>[52]</sup>。本研究结果显示,几乎每一对引物都扩增出了非鱼类物种的序列,甚至有个别引物扩增出来的非鱼类物种的序列占比达到了所有物种的一半以上。Zhang 等<sup>[16]</sup>的研究结果也发现,几乎所有鱼类宏条形码引物都扩增出了非鱼类物种的序列,这表明对于 eDNA 研究而言,寄希望于引物能够完全不扩增非目标物种似乎是不太现实的。通常而言,扩增出来的非目标物种大多是人类、鸟类、哺乳类、爬行动物、两栖动物和细菌等。由于人类活动、动物行为及水体流动等原因,eDNA 中常常会涵盖非鱼类物种序列,因此在监测到鱼类物种的同时,监测到以上物种似乎不足为奇。近年来,一些研究者开始尝试使用阻断引物以解决这一问题<sup>[53]</sup>。然而,已有研究表明,使用阻断引物会降低 eDNA 宏条形码研究所能监测到的目标物种的数量;据此,一些学者提出,若非目标物种的序列较低时,不建议使用阻断引物<sup>[16,54]</sup>。因此,为了避免非特异性扩增的出现并增加目标物种的监测概率:一方面需要充分了解目标分类群的 DNA 序列特征,选择适当的引物和扩增条件以最大程度地减少非目标序列的扩增;另一方面,对 eDNA 研究中难免会出现扩增出非目标物种这种情形,增加测序深度或许会是一种比较可行的解决办法。

### 3.3 不同引物扩增长度分析

由于 eDNA 数量少和易降解的特性,扩增片段长度较短的引物通常被认为可以提供更大的扩增成功率<sup>[55]</sup>。有研究者曾对水中的 eDNA 大小分布进行了研究,结果表明较短的线粒体 DNA 片段比长的 DNA 片段更为丰富,使用扩增子较短的引物可以获得更大的检测率<sup>[24,56]</sup>。但也有研究表明,较长的 DNA 片段能够提供更多有关序列的信息<sup>[57]</sup>。由于较少有研究通过使用实际环境样本系统地进行分析,往往也很难确定不同扩增子长度对于 eDNA 研究中物种多样性监测结果的影响。

过去有研究者曾对 22 对 eDNA 引物进行了综合的比较评价,结果显示 Ac12S(约 388 bp)和 AcMDB07(约 280 bp)效果最好,监测到的物种数最多,其次是 MiFish-U(约 171 bp)<sup>[16]</sup>。本研究中,用于实际验证的引物的扩增长度范围为 100~500 bp,与以往研究者的研究结果有所不同,本研究中扩增片段长度更大的引物并没有获得理想中最好的效果,监测到物种数最多的反而是扩增片段长度在 150~250 bp 之间的引物,可能的原因是,在本研究中较短的 DNA 片段比长的片段数量更为丰富,从而获得了更大的扩增成功率,并监测到了更多的鱼类物种。

### 3.4 野外样品实验验证结果分析

本研究基于计算机模拟 PCR 筛选了 17 对宏条形码引物,并对千岛湖及其主要支流的 eDNA 样品进行分析后发现,引物 MiFish-U、16S\_Fish、ChordA、16SFishL、qdfish1 监测到的鱼类物种数相对较多。与传统的鱼类资源调查结果相比,除了两种方法监测到的共有种之外,每一种引物都或多或少地监测到了传统方法未能捕获到的鱼类。这可能与以下两方面因素有关,一方面,栖息地间的连通及水文传输使采集到的 eDNA 样本中混入了来自其他水域的鱼类 DNA<sup>[58-59]</sup>;另一方面,参考数据库的不完善以及引物本身对于部分鱼类的分辨率较低,导致一些物种尽管被成功扩增,但未能够被鉴定出来<sup>[15]</sup>。

过去有研究评估了鱼类分布与 eDNA 之间的关系,结果表明 eDNA 通常提供了鱼类大尺度空间分布和生物量的“快照”<sup>[9]</sup>。其他一些研究也表明,基于 eDNA 推断的物种时空尺度分布格局会因河流和湖泊不同而异<sup>[13]</sup>。因此,eDNA 在野外条件下的释放动态、降解和扩散模式有待进一步研究。

与传统方法相比,eDNA 方法可以在不捕获目标物种的前提下进行生物多样性监测,极大地改变了动植物调查的方式<sup>[13]</sup>。而无论选择哪一种宏条形码引物,为实现生物的准确分类鉴定,可靠且完备的参考数据库是重中之重。公共数据库因为结合了数千项研究的成果,产生了大量的数据,而这些数据无法临时获得,因此当前的 eDNA 研究多依赖于与公共数据库(如 GenBank 或 Mitofish)进行比对,从而实现物种的进一步确认。有研究表明,对于动物而言,GenBank 中错误标记序列的比例非常低(在目水平上为 0.05%,在属水平上<1%)<sup>[60]</sup>,这说明它具备较高的可靠性,可以作为了解生物多样性的一大数据来源。然而,公共数据库中的序列多来自分散且目的不同的研究,也没有系统地补充和完善不同物种分类下 DNA 条形码的想法和动

力。由此可知,尽管公共数据库中的序列信息仍然在不断增长,但分类学完整的条形码参考数据库的建设,尤其是有关本土鱼类物种序列的收集和整理仍然任重道远。

## 4 结论

本研究对 29 对宏条形码引物进行了筛选并在千岛湖进行了初步应用,从物种覆盖率和分辨率等角度评估了不同引物在基于 eDNA 的鱼类多样性研究中的适用性。本研究结果表明,eDNA 技术灵敏度的确很高,可以极大地提高对于鱼类的监测效率。引物的好与不好一方面取决于其本身的设计(如上下游引物的长度、退火温度),另外一个方面也取决于数据库的完备性。因此,对引物进行先验性评估,然后再用于全面的生物多样性监测十分重要。由于不同引物对鱼类物种的覆盖范围和分辨能力也会有所不同,在这种情况下,通过使用多个引物来增加对于目标物种的覆盖度和检测概率,不失为一种比较好的解决方案。

## 5 参考文献

- [ 1 ] Almond R, Grooten M, Juffe Bignoli D *et al.* Living planet report 2022—Building a nature-positive society. World Wildlife Fund, 2022.
- [ 2 ] Kaur KD, Jha A, Sabikhi L *et al.* Significance of coarse cereals in health and nutrition: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 2014, **51**(8): 1429-1441. DOI: 10.1007/s13197-011-0612-9.
- [ 3 ] Froese R, Winker H, Gascuel D *et al.* Minimizing the impact of fishing. *Fish and Fisheries*, 2016, **17**(3): 785-802. DOI: 10.1111/faf.12146.
- [ 4 ] 张鸲,曹文宣.中国生物多样性红色名录·脊椎动物(第五卷):淡水鱼类.北京:科学出版社,2021.
- [ 5 ] Bortolus A. Error cascades in the biological sciences: The unwanted consequences of using bad taxonomy in ecology. *Ambio*, 2008, **37**(2): 114-118. DOI: 10.1579/0044-7447(2008)37[114:ecitbs]2.0.co;2.
- [ 6 ] Baird DJ, Hajibabaei M. Biomonitoring 2.0: A new paradigm in ecosystem assessment made possible by next-generation DNA sequencing. *Molecular Ecology*, 2012, **21**(8): 2039-2044. DOI: 10.1111/j.1365-294x.2012.05519.x.
- [ 7 ] Taberlet P, Coissac E, Hajibabaei M *et al.* Environmental DNA. *Molecular Ecology*, 2012, **21**(8): 1789-1793. DOI: 10.1111/j.1365-294x.2012.05542.x.
- [ 8 ] Thomsen PF, Willerslev E. Environmental DNA—An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity. *Biological Conservation*, 2015, **183**: 4-18. DOI: 10.1016/j.biocon.2014.11.019.
- [ 9 ] Yamamoto S, Minami K, Fukaya K *et al.* Environmental DNA as a 'snapshot' of fish distribution: A case study of Japanese Jack Mackerel in Maizuru Bay, Sea of Japan. *PLoS One*, 2016, **11**(3): e0149786. DOI: 10.1371/journal.pone.0149786.
- [ 10 ] Boussarie G, Bakker J, Wangensteen OS *et al.* Environmental DNA illuminates the dark diversity of sharks. *Science Advances*, 2018, **4**(5): eaap9661. DOI: 10.1126/sciadv.aap9661.
- [ 11 ] 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. DOI: 10.1111/mec.13428.
- [ 12 ] Jerde CL, Mahon AR, Chadderton WL *et al.* "Sight-unseen" detection of rare aquatic species using environmental DNA. *Conservation Letters*, 2011, **4**(2): 150-157. DOI: 10.1111/j.1755-263x.2010.00158.x.
- [ 13 ] Deiner K, Bik HM, Mächler E *et al.* Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Molecular Ecology*, 2017, **26**(21): 5872-5895. DOI: 10.1111/mec.14350.
- [ 14 ] Wang SP, Yan ZG, Hänfling B *et al.* Methodology of fish eDNA and its applications in ecology and environment. *Science of the Total Environment*, 2021, **755**: 142622. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2020.142622.
- [ 15 ] Xiong F, Shu L, Zeng HH *et al.* Methodology for fish biodiversity monitoring with environmental DNA metabarcoding: The primers, databases and bioinformatic pipelines. *Water Biology and Security*, 2022, **1**(1): 100007. DOI: 10.1016/j.watbs.2022.100007.
- [ 16 ] Zhang S, Zhao JD, Yao M *et al.* A comprehensive and comparative evaluation of primers for metabarcoding eDNA from fish. *Methods in Ecology and Evolution*, 2020, **11**(12): 1609-1625. DOI: 10.1111/2041-210X.13485.
- [ 17 ] Ma HJ, Stewart K, Loughheed S *et al.* Characterization, optimization, and validation of environmental DNA (eDNA) markers to detect an endangered aquatic mammal. *Conservation Genetics Resources*, 2016, **8**(4): 561-568. DOI: 10.1007/s12686-016-0597-9.
- [ 18 ] 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. DOI: 10.1098/rsos.150088.
- [ 19 ] 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. DOI: 10.1093/nar/gkr732.
- [ 20 ] Gold Z, Sprague J, Kushner DJ *et al.* eDNA metabarcoding as a biomonitoring tool for marine protected areas. *PLoS One*, 2021, **16**(2): e0238557. DOI: 10.1371/journal.pone.0238557.

- [21] Harper LR, Lawson Handley L, Carpenter AI *et al.* Environmental DNA (eDNA) metabarcoding of pond water as a tool to survey conservation and management priority mammals. *Biological Conservation*, 2019, **238**: 108225. DOI: 10.1016/j.biocon.2019.108225.
- [22] Zhang AJ, Hao YB, Guo AH *et al.* Universal primer screening and verification for fish environmental DNA research based on high-throughout sequencing technology. *Acta Agriculturae Zhejiangensis*, 2019, **31**(10): 1615-1623. [张爱菊, 郝雅宾, 郭爱环等. 基于高通量测序技术的鱼类环境 DNA 研究中通用引物的筛选验证. *浙江农业学报*, 2019, **31**(10): 1615-1623.]
- [23] Bylemans J, Gleeson DM, Hardy CM *et al.* Toward an ecoregion scale evaluation of eDNA metabarcoding primers: A case study for the freshwater fish biodiversity of the Murray-Darling Basin (Australia). *Ecology and Evolution*, 2018, **8**(17): 8697-8712. DOI: 10.1002/ece3.4387.
- [24] Nester GM, De Brauwier M, Koziol A *et al.* Development and evaluation of fish eDNA metabarcoding assays facilitate the detection of cryptic seahorse taxa (Family: Syngnathidae). *Environmental DNA*, 2020, **2**(4): 614-626. DOI: 10.1002/edn3.93.
- [25] Ragot R, Villemur R. eDNA profiling of mammals, birds, and fish of surface waters by mitochondrial metagenomics: Application for source tracking of fecal contamination in surface waters. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2022, **194**(2): 1-13. DOI: 10.1007/s10661-021-09668-w.
- [26] Lalitha S. Primer premier 5. *Biotech Software & Internet Report*, 2000, **1**(6): 270-272. DOI: 10.1089/152791600459894.
- [27] Mahon AR, Jerde CL, Galaska M *et al.* Validation of eDNA surveillance sensitivity for detection of Asian carps in controlled and field experiments. *PLoS One*, 2013, **8**(3): e58316. DOI: 10.1371/journal.pone.0058316.
- [28] Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL *et al.* Monitoring endangered freshwater biodiversity using environmental DNA. *Molecular Ecology*, 2012, **21**(11): 2565-2573. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2011.05418.x.
- [29] Minamoto T, Yamanaka H, Takahara T *et al.* Surveillance of fish species composition using environmental DNA. *Limnology*, 2012, **13**(2): 193-197. DOI: 10.1007/s10201-011-0362-4.
- [30] 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. DOI: 10.1007/s00414-006-0113-y.
- [31] Palumbi S, Martin A, Roman S *et al.* The simple Fools' guide to PCR. Department of Zoology and Kewalo Laboratory, 1989.
- [32] Leray M, Yang JY, Meyer CP *et al.* A new versatile primer set targeting a short fragment of the mitochondrial *COI* region for metabarcoding metazoan diversity: Application for characterizing coral reef fish gut contents. *Frontiers in Zoology*, 2013, **10**: 34. DOI: 10.1186/1742-9994-10-34.
- [33] Berry TE, Osterrieder SK, Murray DC *et al.* DNA metabarcoding for diet analysis and biodiversity: A case study using the endangered Australian Sea lion (*Neophoca cinerea*). *Ecology and Evolution*, 2017, **7**(14): 5435-5453. DOI: 10.1002/ece3.3123.
- [34] Ward RD, Zemlak TS, Innes BH *et al.* DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 2005, **360**(1462): 1847-1857. DOI: 10.1098/rstb.2005.1716.
- [35] McInnes JC, Jarman SN, Lea MA *et al.* DNA metabarcoding as a marine conservation and management tool: A circumpolar examination of fishery discards in the diet of threatened albatrosses. *Frontiers in Marine Science*, 2017, **4**: 277. DOI: 10.3389/fmars.2017.00277.
- [36] Kocher TD, Thomas WK, Meyer A *et al.* Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1989, **86**(16): 6196-6200. DOI: 10.1073/pnas.86.16.6196.
- [37] Deagle BE, Kirkwood R, Jarman SN. Analysis of Australian fur seal diet by pyrosequencing prey DNA in faeces. *Molecular Ecology*, 2009, **18**(9): 2022-2038. DOI: 10.1111/j.1365-294x.2009.04158.x.
- [38] Evans NT, Olds BP, Renshaw MA *et al.* Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding. *Molecular Ecology Resources*, 2016, **16**(1): 29-41. DOI: 10.1111/1755-0998.12433.
- [39] Burgener M, Hübner P. Mitochondrial DNA enrichment for species identification and evolutionary analysis. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung Und -Forschung A*, 1998, **207**(4): 261-263. DOI: 10.1007/s002170050329.
- [40] Elbrecht V, Leese F. PrimerMiner: An R package for development and in silico validation of DNA metabarcoding primers. *Methods in Ecology and Evolution*, 2017, **8**(5): 622-626. DOI: 10.1111/2041-210X.12687.
- [41] Chen CJ, Chen H, Zhang Y *et al.* TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of big biological data. *Molecular Plant*, 2020, **13**(8): 1194-1202. DOI: 10.1016/j.molp.2020.06.009.
- [42] Kumar S, Stecher G, Li M *et al.* MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, **35**(6): 1547-1549. DOI: 10.1093/molbev/msy096.
- [43] 陈马康, 何光喜, 陈来生等. 千岛湖主要支流生态与渔业功能. 上海: 上海科学技术出版社, 2014.
- [44] Chen SF, Zhou YQ, Chen YR *et al.* Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 2018, **34**(17): i884-i890. DOI: 10.1093/bioinformatics/bty560.
- [45] Magoč T, Salzberg SL. FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, 2011, **27**(21): 2957-2963. DOI: 10.1093/bioinformatics/btr507.

- [46] Edgar RC. UPARSE: Highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads. *Nature Methods*, 2013, **10**(10): 996-998. DOI: 10.1038/nmeth.2604.
- [47] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature Methods*, 2010, **7**(5): 335-336. DOI: 10.1038/nmeth.f.303.
- [48] Dixon P. VEGAN, a package of R functions for community ecology. *Journal of Vegetation Science*, 2003, **14**(6): 927-930. DOI: 10.1111/j.1654-1103.2003.tb02228.x.
- [49] Andújar C, Arribas P, Yu DW *et al.* Why the *COI* barcode should be the community DNA metabarcode for the Metazoa. *Molecular Ecology*, 2018, **27**(20): 3968-3975. DOI: 10.1111/mec.14844.
- [50] Chen Z, Cai XW, Zhang QF *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.]
- [51] Deagle BE, Jarman SN, Coissac E *et al.* DNA metabarcoding and the cytochrome c oxidase subunit I marker: Not a perfect match. *Biology Letters*, 2014, **10**(9): 20140562. DOI: 10.1098/rsbl.2014.0562.
- [52] Collins RA, Bakker J, Wangenstein OS *et al.* Non-specific amplification compromises environmental DNA metabarcoding with *COI*. *Methods in Ecology and Evolution*, 2019, **10**(11): 1985-2001. DOI: 10.1111/2041-210X.13276.
- [53] Milan DT, Mendes IS, Damasceno JS *et al.* New 12S metabarcoding primers for enhanced Neotropical freshwater fish biodiversity assessment. *Scientific Reports*, 2020, **10**: 17966. DOI: 10.1038/s41598-020-74902-3.
- [54] Kumar G, Reaume AM, Farrell E *et al.* Comparing eDNA metabarcoding primers for assessing fish communities in a biodiverse estuary. *PLoS One*, 2022, **17**(6): e0266720. DOI: 10.1371/journal.pone.0266720.
- [55] Thomsen PF, Kielgast J, Iversen LL *et al.* Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS One*, 2012, **7**(8): e41732. DOI: 10.1371/journal.pone.0041732.
- [56] Bylemans J, Furlan EM, Gleeson DM *et al.* Does size matter? An experimental evaluation of the relative abundance and decay rates of aquatic environmental DNA. *Environmental Science & Technology*, 2018, **52**(11): 6408-6416. DOI: 10.1021/acs.est.8b01071.
- [57] Deiner K, Renshaw MA, Li Y *et al.* Long-range PCR allows sequencing of mitochondrial genomes from environmental DNA. *Methods in Ecology and Evolution*, 2017, **8**(12): 1888-1898. DOI: 10.1111/2041-210X.12836.
- [58] Yamanaka H, Minamoto T. The use of environmental DNA of fishes as an efficient method of determining habitat connectivity. *Ecological Indicators*, 2016, **62**: 147-153. DOI: 10.1016/j.ecolind.2015.11.022.
- [59] Shogren AJ, Tank JL, Andruszkiewicz E *et al.* Controls on eDNA movement in streams: Transport, retention, and resuspension. *Scientific Reports*, 2017, **7**(1): 5065. DOI: 10.1038/s41598-017-05223-1.
- [60] Leray M, Knowlton N, Ho SL *et al.* GenBank is a reliable resource for 21st century biodiversity research. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, **116**(45): 22651-22656. DOI: 10.1073/pnas.1911714116.