



长江上游鱼类环境 DNA 通用引物的选择与验证

吕宏森¹, 王安香¹, 董智玲¹, 闫卉果¹, 龚志韬¹,
刘嘉豪¹, 姚维志^{1,2}, 何文平^{1,2*}

(1. 西南大学水产学院, 重庆 400715;

2. 西南大学, 淡水鱼类资源与生殖发育教育部重点实验室, 重庆 400715)

摘要: 为了选择出适合使用 eDNA 技术对长江上游鱼类多样性进行研究的通用引物, 本研究选择 10 对扩增序列位于 12S rRNA、16S rRNA、Cytb 和 CO I 基因片段的常用引物, 分别为 Mifish-U、AcMDB07、Teleo、12SPv、Fish16S1、Ve16S1、PSI、G、VeCB1、FishCB, 对长江上游常见的 32 种鱼类和 3 种其他水域鱼类肌肉组织提取的 DNA 扩增。结果显示, 有 6 对引物均能扩增出全部 35 种鱼类, 但引物 Mifish-U 的扩增效果最好。进一步使用引物 Mifish-U 对长江上游屏山县、涪陵区和巫山县 3 个采样点的水样 eDNA 进行高通量测序, 共检测到 80 种鱼类, 包括本研究使用的 32 种长江上游鱼类, 其辨别度较高。使用引物 Mifish-U 对室内养殖 3 种鱼类的水样 eDNA 进行高通量测序后定性定量分析, 结果显示黄颡鱼和鲤的生物量与序列数相关性显著, 引物 Mifish-U 进行 eDNA 定量分析的潜力较大。研究表明, 引物 Mifish-U 更适合作为 eDNA 研究长江上游鱼类多样性的通用引物。本研究可为利用 eDNA 技术监测长江上游鱼类多样性的引物选择提供参考。

关键词: 鱼类; eDNA; 通用引物; Mifish-U; 长江上游

中图分类号: S 932.4

文献标志码: A

长江上游是我国淡水鱼类多样性最为丰富的地区之一, 在世界淡水鱼类生物多样性中占有重要地位。据统计, 长江历史记录分布鱼类 443 种, 其中上游区域分布有鱼类 205 种^[1], 包括达氏鲟 (*Acipenser dabryanus*)、胭脂鱼 (*Myxocyprinus asiaticus*) 等珍稀鱼类 20 种^[2]。当前, 在长江大保护的背景下, 为了修复长江上游生态环境, 保护鱼类资源, 迫切需要了解长江上游的鱼类资源现状和存在的问题。但传统的调查方法可能具有一定的破坏性, 也费时费力, 还需依赖鱼类分类专家进行鉴定^[3], 并且当前处于长江“十年禁渔”时期, 传统的调查方法受到了诸多限制。因此, 亟需一

种不违背当前政策、低破坏、高效率的检测方法来研究长江上游的鱼类多样性。

环境 DNA (eDNA) 是指生物体释放到环境中的游离 DNA 分子^[4]。基于 eDNA 技术的调查方法具有精密度高、破坏性小、监测较为容易等优点, 因而广泛用于物种调查、生物量的估测等领域^[5]。当前, eDNA 技术也存在一些问题, 例如, 引物的设计无法标准化, 当 eDNA 技术运用于物种种类检测时, 不同的引物可能会带来不同的结果, 这就是引物设计偏差^[5]。当运用 eDNA 技术进行某水域鱼类多样性的相关分析时, 需要找到适合该水域鱼类组成的通用引物, 才能获得较为真实

收稿日期: 2022-08-16 修回日期: 2023-05-17

资助项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFD1201600); 国家自然科学基金 (32071651); 农业农村部长江流域渔政监督管理办公室软科学项目 (CJBRKT2022-10); 现代农业产业技术体系专项 (CARS-49)

第一作者: 吕宏森 (照片), 从事鱼类生物学研究, E-mail: lhongsen@foxmail.com

通信作者: 何文平, 从事鱼类生物学研究, E-mail: hewenping2008@163.com



的结果。当前研究通常选择线粒体基因作为鱼类 eDNA 检测的遗传标记^[6], 鱼类线粒体基因组 (mtDNA) 通常为结构高度紧凑的双链闭合环状分子, 长度为 15~20 kb^[7]。相较于核 DNA 来说, 鱼类 mtDNA 分子更小、结构也更为简单, 是一个相对独立的复制单位^[8], 有利于后续扩增, 提高检测概率^[9]。位于鱼类线粒体基因组上的 12S rRNA、16S rRNA、Cytb 和 CO I 基因片段是目前研究较为常用的分子标记^[6], 针对这些基因开发了较多的通用引物^[10], 但当前对这些通用引物的筛选研究多集中于海洋^[11]、湖泊^[12]或其他江段^[13], 而对于长江上游鱼类通用引物的选择尚未有研究。

为了筛选出适合长江上游鱼类多样性研究的通用引物, 本研究选择了 10 对常用的通用引物进行验证性实验, 这 10 对引物所扩增的序列片段位于鱼类线粒体 12S rRNA、16S rRNA、Cytb 和 CO I 基因片段上。使用这些引物对 32 种长江上游常见鱼类及 3 种其他水域鱼类进行分析验证,

最终选择出效果最好的引物, 之后分别在野外和室内环境对所选引物的特异性和灵敏性进行验证, 以期利用 eDNA 技术监测长江上游鱼类多样性的引物选择提供参考, 并促进基于 eDNA 技术的物种丰度或生物量评估研究的开展。

1 材料与amp;方法

1.1 选择引物

通过查阅相关文献, 筛选出位于 4 个不同线粒体基因组序列的 10 对通用引物 (表 1)。其中 Mifish-U、AcMDB07、Teleo、12SPv 这 4 对引物扩增的序列片段位于 12S rRNA 片段上, Fish16S1、Ve16S1 引物扩增的序列片段位于 16S rRNA 片段上, PSI、G 引物扩增的序列片段位于 CO I 片段上, VeCB1、FishCB 引物扩增的序列片段位于 Cytb 片段上。10 对引物均由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

表 1 本研究所使用的 10 对通用引物

Tab. 1 Ten pairs of universal primers for this study

目的基因 target gene	引物名称 primer name	引物序列(5'-3') primer sequence (5'-3')	PCR 产物长度/bp PCR product length	参考文献 citations
12S rRNA	Mifish-U	F: GTCGGTAAAACCTCGTGCCAGC R: CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTG	163~185	[14]
	AcMDB07	F: GCCTATATAACCGCCGTCG R: GTACACTTACCATGTTACGACTT	321	[15]
	Teleo	F: ACACCGCCCGTCACTCT R: CTTCCGGTACACTTACCATG	100	[16]
	12Spv	F: ATAGCACTGAAGATGCTAAG R: GCATGGATGTCTTCTCGGTG	739~747	[17]
16S rRNA	Fish16S1	F: GGTCGCCCAACCCRAAG R: CGAGAAGACCCTWTGGAGCTTIAG	100	[18]
	Ve16S1	F: GCCTGTTTACCAAAAACATCAC R: CTCCATAGGGTCTTCTCGTCTT	202	[19]
CO I	PS1	F: ACCTGCCTGCCGTATTTGGYGYCYTGRGCCGRATAGT R: ACGCCACCGAGCCARAARCTYATRTRTTYATTTCG	247	[20]
	G	F: GACATTGGCACCCTTTATCTC R: CTTTACACCTGTTGGAATGG	650	[21]
Cytb	VeCB1	F: AAAAAGCTTCCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA R: AAAGTGCAGCCCTCAGAATGATTTTGTCTCA	460	[22]
	FishCB	F: TCCTTTTGAGGCGCTACAGT R: GGAATGCGAAGAATCGTGT	130	[23]

1.2 样品的采集及 DNA 提取

本研究选取了 35 种鱼类, 隶属于 6 目 11 科 30 属 (表 2), 刀鲚 (*Coilia nasus*) 来源于长江中下游江阴江段, 三角鲂 (*Megalobrama terminalis*) 和短颌鲚 (*C. brachygnathus*) 来源于南四湖, 其他 32 种鱼类样品来自重庆市长江流域水生生物资源及重要生境监测调查项目获得的渔获物, 鱼类肌肉

样品使用无水乙醇进行保存。之后采用 DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen 公司) 的 HiPure Tissue DNA Mini Kit 试剂盒从鱼类肌肉组织中提取目的基因组 DNA。与此同时, 使用塑料桶在长江上游 3 处位置 (屏山县、涪陵区、巫山县, 图 1) 采集表层水样, 每个位置采集 3 份水样, 共 9 份水样, 每份水样 2 L。采样完成之后当天在室内进行抽滤,

表 2 本研究所使用的 35 种鱼类

目 order	科 family	属 genus	种 species	
鲟形目 Acipenseriformes	鲟科 Acipenseridae	鲟属 <i>Acipenser</i>	长江鲟 <i>A. dabryanus</i>	
鲱形目 Clupeiformes	鲱科 Engraulidae	鲱属 <i>Coilia</i>	刀鲱 <i>C. nasus</i> 短颌鲱 <i>C. brachygnathus</i>	
鲤形目 Cypriniformes	沙鲈科 Botiidae	副沙鲈属 <i>Parabotia</i>	双斑副沙鲈 <i>P. bimaculata</i>	
		胭脂鱼科 Catostomidae	胭脂鱼属 <i>Myxocyprinus</i>	泥鳅 <i>M. anguillicaudatus</i>
	鳅科 Cobitidae	泥鳅属 <i>Misgurnus</i>	大鳞副泥鳅 <i>P. dabryanus</i>	
		副泥鳅属 <i>Paramisgurnus</i>	大鳍鲮 <i>A. macropterus</i>	
	鲤科 Cyprinidae	鲮属 <i>Acheilognathus</i>	鲫属 <i>Carassius</i>	鲫鱼 <i>C. auratus</i>
		铜鱼属 <i>Coreius</i>	铜鱼 <i>C. heterodon</i>	
		鲃属 <i>Culter</i>	翘嘴鲃 <i>C. alburnus</i>	
			达氏鲃 <i>C. dabryi</i>	
			红鳍原鲃 <i>C. erythropterus</i>	
		原鲃属 <i>Cultrichthys</i>	鲤属 <i>Cyprinus</i>	鲤 <i>C. carpio</i>
			鲮属 <i>Hemiculter</i>	鲮 <i>H. leucisculus</i>
			鲢属 <i>Hypophthalmichthys</i>	鲢 <i>H. molitrix</i>
				鳊 <i>H. nobilis</i>
			鳊属 <i>Megalobrama</i>	三角鲂 <i>M. terminalis</i>
		鳊属 <i>Parabramis</i>	鳊 <i>P. pekinensis</i>	
		原鲤属 <i>Procypris</i>	岩原鲤 <i>P. rabaudi</i>	
		似鳊属 <i>Pseudobrama</i>	似鳊 <i>P. simoni</i>	
		麦穗鱼属 <i>Pseudorasbora</i>	麦穗鱼 <i>P. parva</i>	
		吻鲃属 <i>Rhinogobio</i>	长鳍吻鲃 <i>R. ventralis</i>	
		翘嘴属 <i>Rhodeus</i>	中华翘嘴 <i>R. sinensis</i>	
	蛇鲃属 <i>Saurogobio</i>	蛇鲃 <i>S. dabryi</i>		
	倒刺鲃属 <i>Spinibarbus</i>	中华倒刺鲃 <i>S. sinensis</i>		
	鲮属 <i>Xenocypris</i>	黄尾鲮 <i>X. davidi</i>		
虾虎鱼目 Gobiiformes	虾虎鱼科 Gobiidae	吻虾虎鱼属 <i>Rhinogobius</i>	子陵吻虾虎鱼 <i>R. giurinus</i>	
鲈形目 Perciformes	鳢科 Channidae	鳢属 <i>Channa</i>	乌鳢 <i>C. argus</i>	
		鲈科 Siniperca	鳊 <i>S. chuatsi</i>	
			斑鳊 <i>S. scherzeri</i>	
鲇形目 Siluriformes	鲇科 Bagridae	鲇属 <i>Hemibagrus</i>	大鳍鲮 <i>H. macropterus</i>	
		黄颡鱼属 <i>Pelteobagrus</i>	光泽黄颡鱼 <i>P. nitidus</i>	
			瓦氏黄颡鱼 <i>P. vachelli</i>	
	鲇科 Siluridae	鲇属 <i>Silurus</i>	南方大口鲇 <i>S. meridionalis</i>	

使用孔径为 0.45 μm 的 PTFE 亲水滤膜, 之后使用 DNeasy[®] Blood & Tissue Kit 的 HiPure Water DNA Kit 试剂盒提取 eDNA, 提取完成的 DNA 放置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱保存。实验过程中操作人员严格遵守西南大学动物实验伦理规范, 并按照西南大学动物实验伦理委员会制定的规章制度执行。

1.3 PCR 反应

使用表 1 中所列的 10 对引物分别对 35 种鱼类肌肉组织提取的 DNA 进行扩增, 反应完成之后对 PCR 产物进行凝胶电泳检测, 各取 5 μL 的反应产物, 置于 1% 的琼脂糖凝胶中, 使用 120 V 电压, 电泳 35 min, 完成之后使用凝胶成像仪进行拍照, 观察统计反应效果。10 对引物反应体系相同, 25 μL 反应体系: Mix 12.5 μL , 正反引物各 1 μL (10 $\mu\text{mol/L}$), DNA 模板 1 μL , ddH₂O 9.5 μL 。10 对引物的反应条件均为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2.5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

1.4 水族缸实验和高通量测序

使用鲤、鲫和黄颡鱼 (*Pelteobagrus fulvidraco*) 作为水族缸实验的实验鱼。实验中的所有设备使用高锰酸钾溶液进行消毒处理。为了排除外来 DNA 干扰, 3 种鱼类分别在单独的水族缸中饲养 7 d, 然后按照不同的数量配比转移到 3 个 55 L 水族缸 (Tank 1~3) 中 (表 3), 此外, 水族缸 Tank 4 为空白对照, 不投放实验鱼。实验过程保持自然光照, 使用加热泵将水温控制在 (23 \pm 1) $^{\circ}\text{C}$, 同时不进行换水和投喂。期间如发现鱼类死亡, 则立即取出死亡个体, 更换为生物量近似的同类个体。实验周期为 7 d, 每天上午 9:00 分别从 4 个缸中采集 500 mL 表层水样, 每次取 3 个平行样本。后续抽滤及 DNA 提取步骤同“样品的采集及 DNA 提取”。将得到的 DNA 样品以及“样品的采集及 DNA 提取”中提取的 DNA 送至上海凌恩生物科技有限公司, 使用电泳实验中扩增效果最好的引物进行高通量测序。每个样品的 PCR 产物单独建库, 然后分别使用 Illumina HiSeq 2500 和 NovaSeq 6000 测序平台对大于 300 bp 和小于 300 bp 的产物进行第二代高通量测序。测序后进行修剪、组装、筛选, 去除引物-模板错配 >2 bp、Phred quality 值 <20、overlapping <10、含有模糊碱基和片段长度 <100 bp 的序列, 聚类为 OTU 后, 基于凌恩公司数据库和本地数据库, 根据相似度 \geq

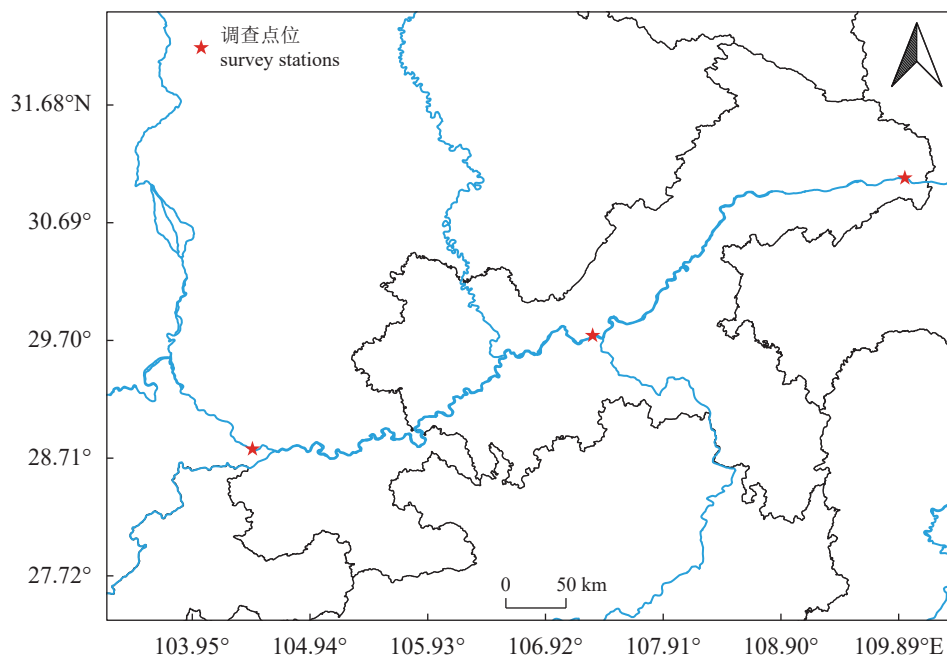


图 1 水样采集点分布

Fig. 1 Distribution of water sampling sites

表 3 三个水族缸中鱼类数量和生物量信息

Tab. 3 Abundance and biomass of fishes used in this study in Tanks 1-3

鱼类 fish	Tank 1		Tank 2		Tank 3	
	数量/尾 abundance	生物量/g biomass	数量/尾 abundance	生物量/g biomass	数量/尾 abundance	生物量/g biomass
鲫 <i>C. auratus</i>	4	13.5	8	31.3	1	1.5
鲤 <i>C. carpio</i>	1	29.3	4	113.2	8	141
黄颡鱼 <i>P. fulvidraco</i>	8	485.9	1	91.5	4	287.3

注: 数量指每种鱼的个体数量, 生物量指每种鱼的总重量。

Notes: Number refers to the number of individuals of each fish and biomass refers to the total weight of each fish.

97% 和 E 值 (expectation value, 期望值) $\leq 10^{-5}$ 将 OTU 识别到具体的物种, 本地数据库由水族缸实验中 3 种鱼类的线粒体基因组序列构成。

2 结果

2.1 通用引物比较结果

使用表 1 中的 10 对引物, 依次对 35 种鱼类肌肉组织提取的 DNA 进行扩增, 反应完成之后对 PCR 产物进行凝胶电泳检测, 结果见图 2~图 11。

12S rRNA (Mifish-U、AcMDB07 和 12Spv)、16S rRNA (Ve16S1) 和 Cytb (VeCB1 和 FishCB) 对 35 种鱼类的扩增效率为 100%; 12S rRNA (Teleo)、16S rRNA (Fish16S1) 和 CO I (PS1) 的扩增效率为 97%; CO I (G) 的扩增效率最低, 只有 69%。CO I 线粒体基因片段的两对引物对 35 种鱼类的

扩增效率都低于 97%, 是 4 种线粒体遗传标记中扩增效率最差的。AcMDB07、12Spv、Ve16S1 和 VeCB1 的扩增结果显示, 各泳道整体目的条带亮度均低于 Mifish-U, 其中 AcMDB07 的 21、22、23 泳道较暗, 分别对应中华倒刺鲃、红鳍原鲈和刀鲚; 12Spv 目的条带亮度不均一, 特别是 6、8、16、20 泳道较暗, 分别对应鳊、达氏鲈、三角鲂和乌鳢; Ve16S1 各泳道虽然有目的条带, 但与其他引物相比条带亮度最弱, 特别是泳道 6、8、31, 分别对应鳊、达氏鲈、泥鳅; VeCB1 中 6 和 8 的泳道较暗, 说明鳊和达氏鲈对 12Spv、Ve16S1、VeCB1 的扩增灵敏性比其他种类低; FishCB 的扩增结果显示, 其条带的弥散程度明显高于其他 9 对引物的条带。因此从条带的弥散程度和泳道的清晰度分析, Mifish-U 的扩增效果优于其他引物。

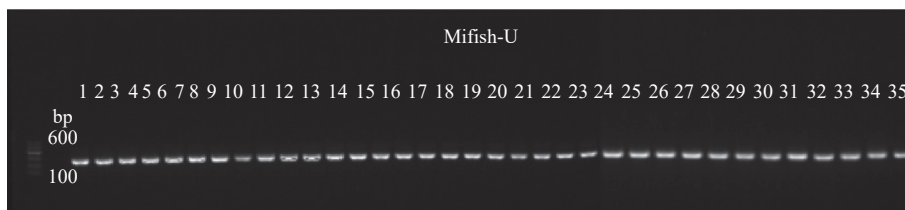


图 2 Mifish-U 引物扩增鱼类肌肉组织提取 DNA 的结果

1.岩原鲤; 2.鲫; 3.鲤; 4.鲢; 5.鳙; 6.鳊; 7.鲮; 8.达氏鲃; 9.大鳞副泥鳅; 10.大鳍鱮; 11.短颌鲚; 12.光泽黄颡鱼; 13.鳊鱼; 14.麦穗鱼; 15.翘嘴鲌; 16.三角鲂; 17.蛇鲷; 18.似鳊; 19.瓦氏黄颡鱼; 20.乌鳢; 21.中华倒刺鲃; 22.红鳍原鲌; 23.刀鲚; 24.中华鲮; 25.斑鳊; 26.双斑副沙鳅; 27.黄尾鲮; 28.子陵吻虾虎鱼; 29.南方大口鲈; 30.大鳍鱮; 31.泥鳅; 32.长江鲟; 33.铜鱼; 34.胭脂鱼; 35.长鳍吻鲷。图 3~11 同。

Fig. 2 Results of DNA extracted from fish tissue amplified by the primer Mifish-U

1. *P. rabaudi*; 2. *C. auratus*; 3. *C. carpio*; 4. *H. molitrix*; 5. *H. nobilis*; 6. *P. pekinensis*; 7. *H. leucisculus*; 8. *C. dabryi*; 9. *P. dabryanus*; 10. *A. macrop-terus*; 11. *C. brachygnathus*; 12. *P. nitidus*; 13. *S. chuatsi*; 14. *P. parva*; 15. *C. alburnus*; 16. *M. terminalis*; 17. *S. dabryi*; 18. *P. simoni*; 19. *P. vachelli*; 20. *C. argus*; 21. *S. sinensis*; 22. *C. erythropterus*; 23. *C. nasus*; 24. *R. sinensis*; 25. *S. scherzeri*; 26. *P. bimaculata*; 27. *X. davidi*; 28. *R. giurinus*; 29. *S. meridionalis*; 30. *H. macropterus*; 31. *M. anguillicaudatus*; 32. *A. dabryanus*; 33. *C. heterodon*; 34. *M. asiaticus*; 35. *R. ventralis*. Fig.3-11 are the same.



图 3 Teleo 引物扩增鱼类肌肉组织提取 DNA 的结果

Fig. 3 Amplification results of DNA extracted from fish tissue using the primer Teleo

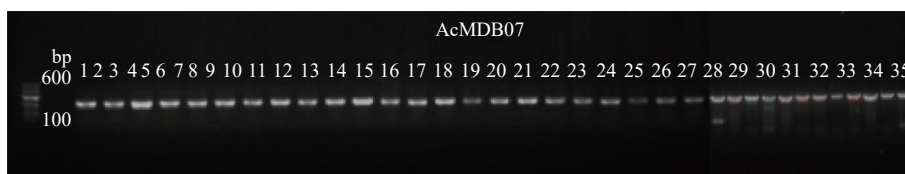


图 4 AcMDB07 引物扩增鱼类肌肉组织提取 DNA 的结果

Fig. 4 Amplification results of DNA extracted from fish tissue using the primer AcMDB07

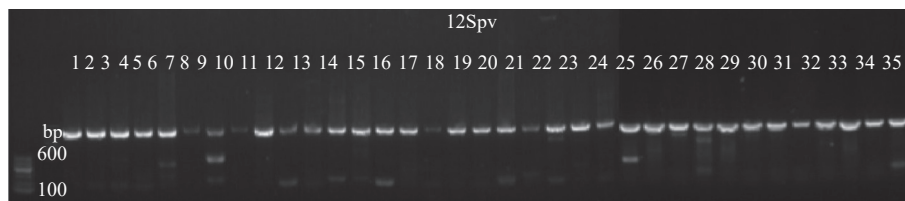


图 5 12Spv 引物扩增鱼类肌肉组织提取 DNA 的结果

Fig. 5 Amplification results of DNA extracted from fish tissue using the primer 12Spv

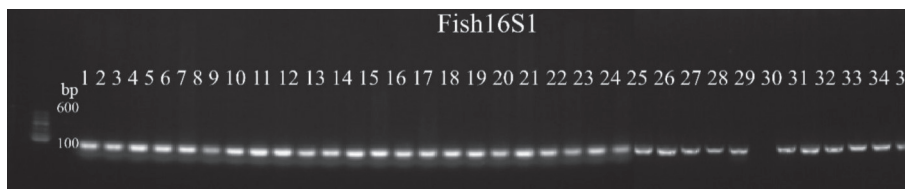


图 6 Fish16S1 引物扩增鱼类肌肉组织提取 DNA 的结果

Fig. 6 Amplification results of DNA extracted from fish tissue using the primer Fish16S1



图 7 Ve16S1 引物扩增鱼类肌肉组织提取 DNA 的结果

Fig. 7 Amplification results of DNA extracted from fish tissue using the primer Ve16S1

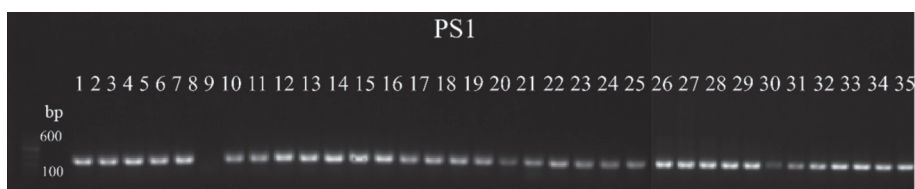


图 8 PS1 引物扩增鱼类肌肉组织提取 DNA 的结果

Fig. 8 Amplification results of DNA extracted from fish tissue using the primer PS1

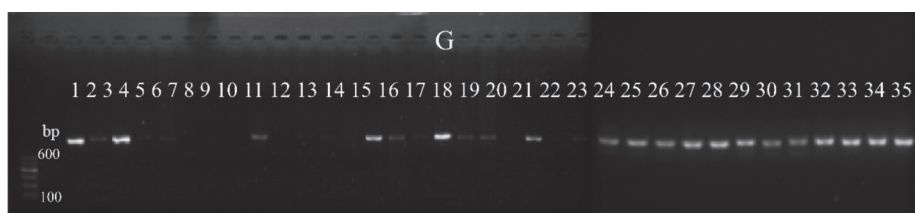


图 9 G 引物扩增鱼类肌肉组织提取 DNA 的结果

Fig. 9 Amplification results of DNA extracted from fish tissue using the primer G

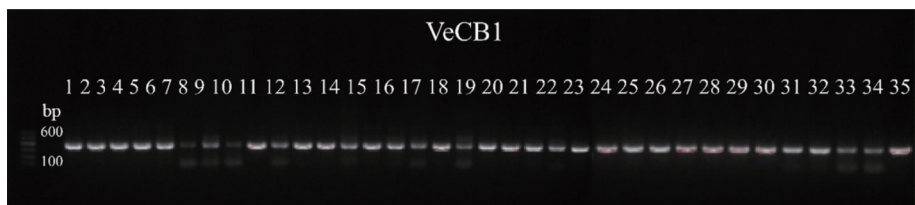


图 10 VeCB1 引物扩增鱼类肌肉组织提取 DNA 的结果

Fig. 10 Amplification results of DNA extracted from fish tissue using the primer VeCB1

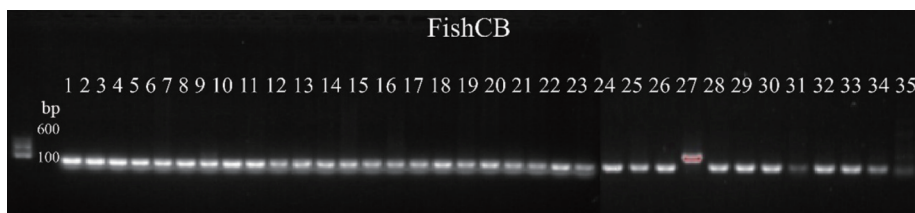


图 11 FishCB 引物扩增鱼类肌肉组织提取 DNA 的结果

Fig. 11 Results of DNA extracted from fish tissue amplified by the primer FishCB

2.2 长江水样 eDNA 高通量测序

高通量测序结果显示, 长江上游屏山县、涪陵区、巫山县 3 处采样点共检测到 80 种鱼类(包括未鉴定到种水平的罗非鱼属, 隶属于 7 目 17 科 64 属, 其中屏山县检测到 78 种, 涪陵区检测到 70 种, 巫山县检测到 74 种(表 4)。本研究使用

<https://www.china-fishery.cn>

的 35 种鱼类中的 32 种长江上游鱼类均被检出, 刀鲚、短颌鲚、三角鲂 3 种鱼类未检出。

2.3 室内水样 eDNA 定性定量分析

Tank 1~3 的样本中均检测到了 3 种实验鱼类, Tank 4 未检测到实验鱼类。综合分析后, 以第 7

中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

表 4 各采样点使用 eDNA 技术检测到的鱼类

Tab. 4 Fish species detected by eDNA technology at each sampling point

目 order	科 family	属 genus	种 species	屏山 Pingshan	涪陵 Fuling	巫山 Wushan
鲟形目 Acipenseriformes	鲟科 Acipenseridae	鲟属 <i>Acipenser</i>	长江鲟* <i>A. dabryanus</i>	+	+	+
鲤形目 Cypriniformes	沙鳅科 Botiidae	薄鳅属 <i>Leptobotia</i>	长薄鳅 <i>L. elongata</i>	+	-	-
			小眼薄鳅 <i>L. microphthalmia</i>	+	+	+
		副沙鳅属 <i>Parabotia</i>	花斑副沙鳅 <i>P. fasciatus</i>	+	+	+
			双斑副沙鳅* <i>P. bimaculata</i>	+	+	+
	胭脂鱼科 Catostomidae	胭脂鱼属 <i>Myxocyprinus</i>	胭脂鱼* <i>M. asiaticus</i>	+	+	+
	鳅科 Cobitidae	泥鳅属 <i>Misgurnus</i>	泥鳅* <i>M. anguillicaudatus</i>	+	+	+
		副泥鳅属 <i>Paramisgurnus</i>	大鳞副泥鳅* <i>P. dabryanus</i>	+	+	+
		高原鳅属 <i>Triplophysa</i>	玫瑰高原鳅 <i>T. rosa</i>	+	+	+
	鲤科 Cyprinidae	刺鲃属 <i>Acanthorhodeus</i>	兴凯刺鲃 <i>A. chankaensis</i>	+	+	+
		鲮属 <i>Acheilognathus</i>	短须鲮 <i>A. barbatulus</i>	+	+	+
			大鳍鲮* <i>A. macropterus</i>	+	+	-
		近红鲃属 <i>Ancherythroculter</i>	汪氏近红鲃 <i>A. wangi</i>	+	+	+
		似鲮属 <i>Belligobio</i>	似鲮 <i>B. nummifer</i>	+	+	-
		鲫属 <i>Carassius</i>	鲫* <i>C. auratus</i>	+	+	+
		铜鱼属 <i>Coreius</i>	铜鱼* <i>C. heterodon</i>	+	+	+
		红鲃属 <i>Chanodichthys</i>	青梢红鲃 <i>C. dabryi</i>	+	+	+
			红鳍鲃 <i>C. erythropterus</i>	+	+	+
		鲮属 <i>Cirrhinus</i>	卷须鲮 <i>C. cirrhosus</i>	+	+	+
		草鱼属 <i>Ctenopharyngodon</i>	草鱼 <i>C. idella</i>	+	+	+
		鲃属 <i>Culter</i>	翘嘴鲃* <i>C. alburnus</i>	+	+	+
			达氏鲃* <i>C. dabryi</i>	+	+	+
		原鲃属 <i>Cultrichthys</i>	红鳍原鲃* <i>C. erythropterus</i>	+	+	+
		鲤属 <i>Cyprinus</i>	鲤* <i>C. carpio</i>	+	+	+
		鲃属 <i>Danio</i>	斑马鱼 <i>D. rerio</i>	+	+	+
		圆吻鲃属 <i>Distoechodon</i>	圆吻鲃 <i>D. tumirostris</i>	+	-	-
		鲃属 <i>Elopichthys</i>	鲃 <i>E. bambusa</i>	+	-	+
		结鱼属 <i>Folifer</i>	瓣结鱼 <i>F. brevifilis</i>	+	+	+
		鮡属 <i>Gobiocypris</i>	稀有鮡 <i>G. rarus</i>	+	+	+
		鲮属 <i>Hemibarbus</i>	唇鲮 <i>H. labeo</i>	+	+	+
			花鲮 <i>H. maculatus</i>	+	+	+
		鲮属 <i>Hemiculter</i>	贝氏鲮 <i>H. bleekeri</i>	-	-	+
			鲮* <i>H. leucisculus</i>	+	+	+
			张氏鲮 <i>H. tchangi</i>	+	+	+
		半鲮属 <i>Hemiculterella</i>	半鲮 <i>H. sauvagei</i>	+	+	+
		鲃属 <i>Hypophthalmichthys</i>	鲃* <i>H. molitrix</i>	+	+	+
			鲃* <i>H. nobilis</i>	+	+	+
		鲃属 <i>Megalobrama</i>	团头鲃 <i>M. amblycephala</i>	+	+	+
		青鱼属 <i>Mylopharyngodon</i>	青鱼 <i>M. piceus</i>	+	-	-
		鲃属 <i>Ochetobius</i>	鲃 <i>O. elongatus</i>	-	-	+

· 续表 4 ·

目 order	科 family	属 genus	种 species	屏山 Pingshan	涪陵 Fuling	巫山 Wushan
		白甲鱼属 <i>Onychostoma</i>	白甲鱼 <i>O. simus</i>	+	+	+
		马口鱼属 <i>Opsariichthys</i>	马口鱼 <i>O. bidens</i>	+	-	+
		鳊属 <i>Parabramis</i>	鳊* <i>P. pekinensis</i>	+	+	+
		原鲤属 <i>Procypris</i>	岩原鲤* <i>P. rabaudi</i>	+	+	+
		似鳊属 <i>Pseudobrama</i>	似鳊* <i>P. simoni</i>	+	+	+
		拟鲮属 <i>Pseudohemiculter</i>	南方拟鲮 <i>P. dispar</i>	+	+	+
		飘鱼属 <i>Pseudolaubuca</i>	银飘鱼 <i>P. sinensis</i>	+	+	+
		麦穗鱼属 <i>Pseudorasbora</i>	麦穗鱼* <i>P. parva</i>	+	+	+
		吻鲃属 <i>Rhinogobio</i>	长鳍吻鲃* <i>R. ventralis</i>	+	+	+
			吻鲃 <i>R. typus</i>	+	+	+
		鲮属 <i>Rhodeus</i>	中华鲮* <i>R. sinensis</i>	+	+	+
		蛇鲃属 <i>Saurogobio</i>	蛇鲃* <i>S. dabryi</i>	+	+	+
			长蛇鲃 <i>S. dumerili</i>	+	+	+
		裂腹鱼属 <i>Schizothorax</i>	重口裂腹鱼 <i>S. davidi</i>	+	+	+
		倒刺鲃属 <i>Spinibarbus</i>	中华倒刺鲃* <i>S. sinensis</i>	+	+	+
		银鲃属 <i>Squalidus</i>	银鲃 <i>S. argentatus</i>	+	-	+
		赤眼鲮属 <i>Squaliobarbus</i>	赤眼鲮 <i>S. curriculus</i>	+	+	+
		丁鲃属 <i>Tinca</i>	丁鲃 <i>T. tinca</i>	+	+	+
		鲮属 <i>Xenocypris</i>	黄尾鲮* <i>X. davidi</i>	+	-	-
		鳊属 <i>Zacco</i>	宽鳍鳊 <i>Z. platypus</i>	+	+	+
鲮形目 Cyprinodontiformes	青鳉科 Adrianichthyidae	青鳉属 <i>Oryzias</i>	中华青鳉 <i>O. sinensis</i>	+	+	+
	胎鳉科 Poeciliidae	食蚊鱼属 <i>Gambusia</i>	食蚊鱼 <i>G. affinis</i>	+	+	+
虾虎鱼目 Gobiiformes	虾虎鱼科 Gobiidae	吻虾虎鱼属 <i>Rhinogobius</i>	波氏吻虾虎鱼 <i>R. cliffordpopei</i>	+	+	+
			子陵吻虾虎鱼* <i>R. giurinus</i>	+	+	+
鲈形目 Perciformes	太阳鱼科 Centrarchidae	黑鲈属 <i>Micropterus</i>	小口黑鲈 <i>M. dolomieu</i>	+	+	+
			大口黑鲈 <i>M. salmoides</i>	+	+	+
	鳊科 Channidae	鳊属 <i>Channa</i>	乌鳊* <i>C. argus</i>	+	+	+
	丽鱼科 Cichlidae	罗非鱼属 <i>Oreochromis</i>	<i>Oreochromis</i> sp.	+	+	+
	鲈科 Sinipercaidae	鳊属 <i>Siniperca</i>	鳊* <i>S. chuatsi</i>	+	+	+
			长体鳊 <i>S. roulei</i>	+	+	+
			斑鳊* <i>S. scherzeri</i>	-	-	+
鲑形目 Salmoniformes	银鱼科 Salangidae	间银鱼属 <i>Hemisanx</i>	短吻间银鱼 <i>H. brachyrostralis</i>	+	+	+
		新银鱼属 <i>Neosalanx</i>	太湖新银鱼 <i>N. taihuensis</i>	+	+	+
		大银鱼属 <i>Protosalanx</i>	大银鱼 <i>P. hyalocranius</i>	+	+	+
鲢形目 Siluriformes	钝头鮠科 Amblycipitidae	鮠属 <i>Liobagrus</i>	白缘鮠 <i>L. marginatus</i>	+	+	+
	鮠科 Bagridae	鮠属 <i>Hemibagrus</i>	大鳍鮠* <i>H. macropterus</i>	+	+	+
		黄颡鱼属 <i>Pelteobagrus</i>	瓦氏黄颡鱼* <i>P. vachelli</i>	+	+	+
			光泽黄颡鱼* <i>P. nitidus</i>	+	+	+
	鲃科 Ictaluridae	鲃属 <i>Ictalurus</i>	斑点叉尾鲃 <i>I. punctatus</i>	+	-	+
	鲃科 Siluridae	鲃属 <i>Silurus</i>	南方大口鲃* <i>S. meridionalis</i>	+	+	+
合计 total				78	70	74

天的数据作为最终结果, Tank 1 中黄颡鱼、鲤、鲫生物量占比分别为 92.0%、5.5%、2.5%, 有效序列占比分别为 93.1%、4.7%、2.2%; Tank 2 中黄颡鱼、鲤、鲫生物量占比分别为 66.2%、32.5%、1.3%, 有效序列占比分别为 65.1%、34.1%、0.8%; Tank 3 中黄颡鱼、鲤、鲫生物量占比分别为 38.8%、48.0%、13.2%, 有效序列占比分别为 42.0%、51.7%、6.3% (图 12)。使用 SPSS 软件 (版本 26.0) 对鱼类实际生物量与测序有效序列进行 Pearson 相关性分析, 结果发现, Tank 2 和 Tank 3 中鱼类的生物量与有效序列均呈显著的正相关 ($P < 0.05$), Tank 1 中鱼类的生物量与有效序列均呈现极显著的正相关 ($P < 0.01$)。三个水族缸横向对比分析发现, 黄颡鱼的生物量与有效序列呈现极显著的正相关 ($P < 0.01$), 鲤的生物量与有效序列呈现显著的正相关 ($P < 0.05$), 鲫的生物量与有效序列相关性不显著。

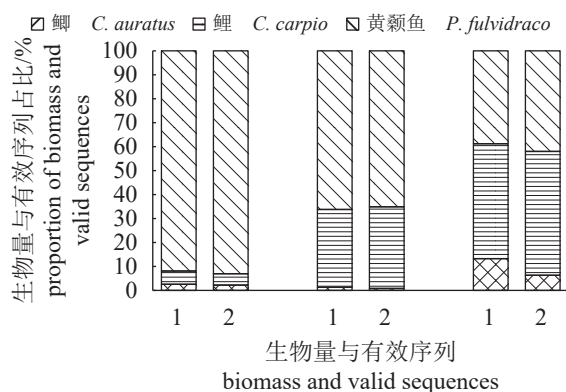


图 12 各水族箱鱼类物种实际生物量和有效序列构成情况

1. 生物量 (g), 2. 有效序列。

Fig. 12 Species composition by biomass and valid sequences in each tank

1. biomass (g), 2. valid sequences.

3 讨论

3.1 基于常规 PCR 的引物选择

电泳结果显示, 扩增序列位于 *CO I* 线粒体基因片段上的 2 对引物相较于其他线粒体遗传标记的扩增效率最差, 这与 Collins 等^[24] 利用 12 对引物检测英国的 4 条河流和英吉利海峡得出的结果一致; Byleman 等^[15] 利用构建的计算机程序检验 16 对引物也得出同样的结果。尽管参考数据库更广的 *CO I* 基因有望提供比其他线粒体基因片段更高的分类覆盖率^[25], 但线粒体基因 12S rRNA

和 16S rRNA 不仅拥有用于引物设计的保守区域以及允许属或物种水平分辨率的可变区域, 能够降低引物模板错配率, 具有与 *CO I* 基因相似的物种分辨率^[26], 而且可以最大限度地减少 PCR 扩增引起的偏差^[27]。

合适的通用引物需具有保守度高、辨别度高、没有物种偏好性等特征^[28-29]。本研究中有 6 对引物都具有高保守度, 即均能扩增出全部的 35 种鱼类 DNA, 只有引物 Mifish-U 和 FishCB 的扩增长度小于 200 bp, 但 FishCB 扩增条带的弥散程度明显高于其他 9 对引物的条带, AcMDB07、12Spv、Ve16S1、VeCB1 引物的扩增长度均大于 200 bp, 且引物 12Spv 的扩增长度最长, 为 739 bp。电泳结果显示, 引物 Mifish-U 的扩增效果最好, 条带清晰、明亮; 引物 12Spv 扩增效果最差, 拖带严重。其原因可能是由于环境样品中不同 DNA 片段相对丰度随着养殖时间的推移, eDNA 长片段的降解速率比 eDNA 短片段的降解速率快, 导致短片段在环境样本中更丰富, PCR 扩增效率更高^[30], 同时由于水样中 DNA 含量极低, 较短的扩增片段 (通常小于 200 bp) 可以最大限度地回收 DNA^[9], 因此较短扩增片段的引物更适合应用于鱼类多样性检测。

3.2 基于高通量测序的引物验证

电泳结果显示, 引物 Mifish-U 的扩增效果要优于其他引物, 因此选取引物 Mifish-U 进一步验证。本研究使用引物 Mifish-U 共检测到 80 种鱼类, 这些物种均在中国水产科学研究院组织的长江专项调查^[1] 中被捕获, 也包括本研究使用的 32 种长江上游常见鱼类, 而 3 种其他水域鱼类均未被检测到, 刀鲚是一种洄游性鱼类, 主要分布在西太平洋及河口地区, 包括长江中下游区域^[31]。短颌鲚主要分布在长江中下游及其附属水体^[32]。三角鲂主要在钱塘江、金沙河水库和黑龙江等少量分布^[33]。以上说明引物 Mifish-U 可以应用于长江上游鱼类多样性的检测。

水族缸实验旨在进一步评估引物物种多样性的检测能力以及多物种 eDNA 定量的检测能力。研究表明, 无论物种的生物量高或者低, 引物 Mifish-U 均能检测出 3 个水族缸中存在的所有鱼类, 且 3 个缸单独研究时, 扩增的有效序列值与鱼类生物量均呈现极显著或显著的正相关性, 这与之前的一些研究^[34-37] 结果一致, 表明引物 Mifish-U 对鱼类相对序列差异有较低的偏倚性,

能够对多物种相对丰度进行评估。值得注意的是, 进行横向分析时, 鲫的生物量与有效序列值无显著的正相关性, 其原因可能是 eDNA 容易受到生物因素 (生物种类、生长阶段、生活习性等)、非生物因素 (水温、pH、紫外线、溶解氧等) 和方法学 (采样、引物、扩增、测序及数据库等) 的影响^[6], 即使在水族缸等环境条件相对单一的试验中, 上述正相关关系也可能不存在, 更何况面对更为复杂的野外环境, 牟铭等^[38]运用 eDNA 技术对对虾进行定量分析时也得出类似的结论。

3.3 引物综合评价

引物 Mifish-U 的开发者 Miya 等^[14]检测了 180 种海洋鱼类, 最终检测到 59 科 123 属 168 种鱼类, 扩增效率高达 93.3%, 这些物种不仅在分类上具有多样性, 从鲨鱼到高等硬骨鱼, 而且在生态上也有很大差异, 包括生活在浅海到深水的中上层和底栖物种。Polanco 等^[39]通过统计学方法比较了 MiFish-U 和 teleo 两种引物, 认为引物 MiFish-U 对鱼类种、属和科的鉴别能力高于引物 teleo。Nakagawa 等^[40]在日本最大的淡水湖琵琶湖周围的 51 条河流的 102 个地点进行采样, 使用引物 MiFish-U 进行扩增, 扩增出 86.4% 的报告物种 (38/44)。舒璐^[6]通过计算机模拟的引物筛选, 筛选了包括 Mifish-U 在内的 16 对引物, 最终发现引物 Mifish-U 的物种分辨率和扩增成功率较高, 扩增长度在阈值范围 (150~350 bp) 内, 且通过水箱实验发现, 只有引物 Mifish-U 测得的物种 reads 数量与物种生物量之间存在显著的正相关关系。结合本研究的结论, 引物 Mifish-U 保守度和辨别度较高, 可以用于长江上游鱼类多样性检测, 但是对于物种的定量检测, 有待进一步研究。

4 结论

本研究筛选了位于鱼类线粒体基因组序列的 10 对通用引物, 对长江上游常见的 32 种鱼类和 3 种其他水域鱼类肌肉组织提取的 DNA 进行扩增, 结果显示有 6 对引物均能扩增出全部的鱼类, 但引物 Mifish-U 的扩增效果最好。使用引物 Mifish-U 对长江上游水样 eDNA 进行高通量测序显示, 引物 Mifish-U 有较高的辨别度。同时使用引物 Mifish-U 对室内水样 eDNA 进行高通量测序, 检验该引物的定量检测能力, 发现除鲫外, 扩增的有效序列值与鱼类生物量均呈现极显著或显著的

正相关性, 因此认为引物 Mifish-U 进行 eDNA 定量分析的潜力较大。eDNA 宏条形码技术在鱼类多样性评估方面具有巨大的潜力, 引物 Mifish-U 更适合用于长江上游鱼类多样性检测。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 杨海乐, 沈丽, 何勇凤, 等. 长江水生生物资源与环境本底状况调查 (2017—2021)[J]. 水产学报, 2023, 47(2): 029301.
Yang H L, Shen L, He Y F, *et al.* Status of aquatic organisms resources and their environments in the Yangtze river system (2017-2021)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2023, 47(2): 029301 (in Chinese).
- [2] 林鹏程, 高欣, 刘飞, 等. 基于鱼类物种状况的长江生态环境质量评估 [J]. 水生生物学报, 2021, 45(6): 1385-1389.
Lin P C, Gao X, Liu F, *et al.* Ecological assessment of the Yangtze River environment based on fish species richness[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2021, 45(6): 1385-1389 (in Chinese).
- [3] 徐念, 常剑波. 长江中下游干流环境 DNA 样本鱼类物种检测的初步研究 [J]. 水生态学杂志, 2016, 37(5): 49-55.
Xu L, Chang J B. Preliminary study on fish species detection in the middle and lower Yangtze River using environmental DNA[J]. *Journal of Hydroecology*, 2016, 37(5): 49-55 (in Chinese).
- [4] 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 [J]. 渔业科学进展, 2018, 39(3): 23-29.
Shan X J, Li M, Wan J W. Application of environmental DNA technology in aquatic ecosystem[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2018, 39(3): 23-29 (in Chinese).
- [5] 张娜, 谢艳辉, 李家侨, 等. 环境 DNA 应用研究进展 [J]. 中国动物检疫, 2020, 37(11): 68-75.
Zhang N, Xie Y H, Li J Q, *et al.* Research progress on the application of environmental DNA[J]. *China Animal Health Inspection*, 2020, 37(11): 68-75 (in Chinese).
- [6] 舒璐. 基于环境 DNA 技术的鱼类多样性评估: 胚胎发育动力学、引物评价及洱海鱼类多样性监测 [D]. 重庆: 西南大学, 2022.
Shu L. Fish diversity assessment based on environmental DNA technology: embryonic development
中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- dynamics, primer evaluation and fish diversity monitoring in Erhai Lake[D]. Chongqing: Southwest University, 2022 (in Chinese).
- [7] 龚理, 时伟, 司李真, 等. 鱼类线粒体 DNA 重排研究进展 [J]. 动物学研究, 2013, 34(6): 666-673.
- Gong L, Shi W, Si L Z, *et al.* Rearrangement of mitochondrial genome in fishes[J]. Zoological Research, 2013, 34(6): 666-673 (in Chinese).
- [8] 郭新红, 刘少军, 刘巧, 等. 鱼类线粒体 DNA 研究新进展 [J]. 遗传学报, 2004, 31(9): 983-1000.
- Guo X H, Liu S J, Liu Q, *et al.* New progresses on mitochondrial DNA in fish[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2004, 31(9): 983-1000 (in Chinese).
- [9] Freeland J R. The importance of molecular markers and primer design when characterizing biodiversity from environmental DNA[J]. *Genome*, 2017, 60(4): 358-374.
- [10] Shu L, Ludwig A, Peng Z G. Standards for methods utilizing environmental DNA for detection of fish species[J]. *Genes*, 2020, 11(3): 296.
- [11] 李晓玲. 基于环境 DNA 技术的东海秋季鱼类物种多样性研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2022.
- Li X L. Study on fish species diversity in the East China Sea in autumn based on environmental DNA technology[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2022 (in Chinese).
- [12] 陈金萍. 基于环境 DNA 宏条形码的鄱阳湖蚌类和鱼类多样性研究 [D]. 南昌: 南昌大学, 2021.
- Chen J P. Analysis of the mussel and fish diversity in Poyang Lake using environmental DNA metabarcoding[D]. Nanchang: Nanchang University, 2021 (in Chinese).
- [13] 周春花, 王蓉蓉, 王生, 等. 基于环境 DNA 宏条形码技术的赣江下游 (南昌段) 鱼类多样性 [J]. *湖泊科学*, 2023, 35(4): 1423-1432.
- Zhou C H, Wang R R, Wang S, *et al.* Fish diversity in Nanchang section of the lower Ganjiang River based on environmental DNA metabarcoding[J]. *Journal of Lake Sciences*, 2023, 35(4): 1423-1432 (in Chinese).
- [14] 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[J]. *Royal Society Open Science*, 2015, 2(7): 150088.
- [15] Bylemans J, Gleeson D M, Hardy C M, *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)[J]. *Ecology and Evolution*, 2018, 8(17): 8697-8712.
- [16] Civade R, Dejean T, Valentini A, *et al.* Spatial representativeness of environmental DNA metabarcoding signal for fish biodiversity assessment in a natural freshwater system[J]. *PLoS One*, 2016, 11(6): e0157366.
- [17] Evans N T, Olds B P, Renshaw M A, *et al.* Quantification of mesocosm fish and amphibian species diversity via environmental DNA metabarcoding[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2016, 16(1): 29-41.
- [18] Shaw J L A, Clarke L J, Wedderburn S D, *et al.* Comparison of environmental DNA metabarcoding and conventional fish survey methods in a river system[J]. *Biological Conservation*, 2016, 197: 131-138.
- [19] Kitano T, Umetsu K, Tian W, *et al.* Two universal primer sets for species identification among vertebrates[J]. *International Journal of Legal Medicine*, 2007, 121(5): 423-427.
- [20] 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[J]. *Molecular Ecology*, 2018, 27(1): 112-127.
- [21] Ward R D, Zemlak T S, Innes B H, *et al.* DNA barcoding Australia's fish species[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2005, 360(1462): 1847-1857.
- [22] Kocher T D, Thomas W K, Meyer A, *et al.* Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers.[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1989, 86(16): 6196-6200.
- [23] Cannon M V, Hester J, Shalkhauser A, *et al.* *In silico* assessment of primers for eDNA studies using primer-tree and application to characterize the biodiversity surrounding the Cuyahoga River[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6(1): 22908.
- [24] Collins R A, Bakker J, Wangensteen O S, *et al.* Non-specific amplification compromises environmental DNA metabarcoding with COI[J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2019, 10(11): 1985-2001.
- [25] Deagle B E, Jarman S N, Coissac E, *et al.* DNA metabarcoding and the cytochrome *c* oxidase subunit I marker: not a perfect match[J]. *Biology Letters*, 2014, 10(9): 20140562.

- [26] Riaz T, Shehzad W, Viari A, *et al.* EcoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis[J]. *Nucleic Acids Research*, 2011, 39(21): e145.
- [27] Valentini A, Taberlet P, Miaud C, *et al.* Next-generation monitoring of aquatic biodiversity using environmental DNA metabarcoding[J]. *Molecular Ecology*, 2016, 25(4): 929-942.
- [28] Shu L, Ludwig A, Peng Z G. Environmental DNA metabarcoding primers for freshwater fish detection and quantification: in silico and in tanks[J]. *Ecology and Evolution*, 2021, 11(12): 8281-8294.
- [29] Clarke L J, Beard J M, Swadling K M, *et al.* Effect of marker choice and thermal cycling protocol on zooplankton DNA metabarcoding studies[J]. *Ecology and Evolution*, 2017, 7(3): 873-883.
- [30] Jo T, Murakami H, Masuda R, *et al.* Rapid degradation of longer DNA fragments enables the improved estimation of distribution and biomass using environmental DNA[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2017, 17(6): e25-e33.
- [31] Yang Q L, Gao T X, Miao Z Q. Differentiation between populations of Japanese grenadier anchovy (*Coilia nasus*) in northwestern pacific based on ISSR markers: Implications for biogeography[J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2011, 39(4-6): 286-296.
- [32] 吴斌, 方春林, 傅培峰, 等. 鄱阳湖通江水道短颌鲚生长特性初探 [J]. *水生态学杂志*, 2015, 36(3): 51-55.
- Wu B, Fang C L, Fu P F, *et al.* Growth characteristics of *Coilia brachygnathus* in the Poyang Lake-Yangtze River waterway[J]. *Journal of Hydroecology*, 2015, 36(3): 51-55 (in Chinese).
- [33] 胡雪松, 石连玉. 我国三角鲂种质资源的研究进展 [J]. *水产学杂志*, 2020, 33(3): 84-89.
- Hu X S, Shi L Y. A review: research progress on germplasm resource of black bream (*Megalobrama terminalis*) in China[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2020, 33(3): 84-89 (in Chinese).
- [34] Vences M, Lyra M L, Perl R G B, *et al.* Freshwater vertebrate metabarcoding on illumina platforms using double-indexed primers of the mitochondrial 16S rRNA gene[J]. *Conservation Genetics Resources*, 2016, 8(3): 323-327.
- [35] Cilleros K, Valentini A, Allard L, *et al.* Unlocking biodiversity and conservation studies in high - diversity environments using environmental DNA (eDNA): a test with Guianese freshwater fishes[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2019, 19(1): 27-46.
- [36] Simmons M, Tucker A, Chadderton W L, *et al.* Active and passive environmental DNA surveillance of aquatic invasive species[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2016, 73(1): 76-83.
- [37] Souma R, Katano I, Doi H, *et al.* Comparing environmental DNA with whole pond survey to estimate the total biomass of fish species in ponds[J]. *Freshwater Biology*, 2023, 68(5): 727-736.
- [38] 牟铭, 李昂, 赵新宁, 等. 人工模拟条件下环境 DNA 宏条形码技术的定量分析初探 [J]. *渔业科学进展*, 2021, 42(5): 24-30.
- Mou M, Li A, Zhao X Y, *et al.* Preliminary study on the quantitative analysis of environmental DNA metabarcoding under ideal conditions[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(5): 24-30 (in Chinese).
- [39] Polanco F A, Richards E, Flück B, *et al.* Comparing the performance of 12S mitochondrial primers for fish environmental DNA across ecosystems[J]. *Environmental DNA*, 2021, 3(6): 1113-1127.
- [40] Nakagawa H, Yamamoto S, Sato Y, *et al.* Comparing local - and regional - scale estimations of the diversity of stream fish using eDNA metabarcoding and conventional observation methods[J]. *Freshwater Biology*, 2018, 63(6): 569-580.

Selection and verification of eDNA universal primers for fish in the upper Yangtze River

LÜ Hongsen¹, WANG Anxiang¹, DONG Zhiling¹, YAN Huiguo¹, GONG Zhitao¹,
LIU Jiahao¹, YAO Weizhi^{1,2}, HE Wenping^{1,2*}

(1. College of Fisheries, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. Key Laboratory of Freshwater Fish Reproduction and Development, Ministry of Education,
Southwest University, Chongqing 400715, China)

Abstract: Environmental DNA (eDNA) technology has emerged as a revolutionary tool for biodiversity monitoring in aquatic ecosystems, offering a non-invasive, cost-effective, and highly sensitive method for detecting species presence and abundance, particularly in complex and dynamic environments like the upper Yangtze River. In order to identify universal primers that are suitable for investigating fish diversity in the upper Yangtze River using eDNA technology, this study selected ten frequently used primers that amplify gene fragments from the 12S rRNA, 16S rRNA, *Cytb*, and *CO I* genes. The primers investigated were Mifish-U, AcMDB07, Teleo, 12SPv, Fish16S1, Ve16S1, PSI, G, VeCB1, and FishCB. DNA samples extracted from muscle tissues of 32 commonly encountered fish species in the upper Yangtze River and three additional aquatic species not from the upper Yangtze River were subjected to amplification using these primers. The results indicated that six primer pairs could amplify all 35 fish species, with Mifish-U showing the highest amplification efficiency. In addition, the eDNA samples from three sampling sites (Pingshan County, Fuling District, and Wushan County) in the upper Yangtze River were further subjected to high-throughput sequencing using the Mifish-U primer. A total of 80 fish species were detected, including the 32 fish species used in this study, with high discriminatory power. Moreover, through high-throughput sequencing, the Mifish-U primer was utilized to qualitatively and quantitatively analyze eDNA samples from indoor farms for three fish species. The results indicated a significant correlation ($P < 0.05$) between the biomass of *Pelteobagrus fulvidraco* and *Carassius auratus* and the number of sequences, highlighting the great potential of the Mifish-U primer for eDNA quantitative analysis. In summary, our findings suggest that Mifish-U is more suitable as a universal primer for investigating fish diversity in the upper Yangtze River using eDNA technology. This study offers important insights into the selection of primers for monitoring fish diversity in the upper Yangtze River using eDNA technology.

Key words: fish; environmental DNA; universal primers; Mifish-U; the upper Yangtze River

Corresponding author: HE Wenping. E-mail: hewenping2008@163.com

Funding projects: National Key Research and Development Program of China (2022YFD1201600); National Natural Science Foundation of China (32071651); Soft Science Project of Yangtze River Basin Fisheries Administration and Supervision Office, Ministry of Agriculture and Rural Affairs (CJBRKT2022-10); Earmarked fund for Agriculture Research System of China (CARS-49)