

陈治, 马春来, 叶乐, 等. 鱼类环境 DNA metabarcoding 片段的近缘物种识别差异[J]. 海洋学报, 2022, 44(8): 51–65. doi:10.12284/hyxb2022150

Chen Zhi, Ma Chunlai, Ye Le, et al. Differences of eDNA metabarcoding fragments in relative fish species resolution[J]. Haiyang Xuebao, 2022, 44(8): 51–65. doi:10.12284/hyxb2022150

鱼类环境 DNA metabarcoding 片段的近缘物种识别差异

陈治^{1,2}, 马春来^{1,2}, 叶乐^{1,2}, 杨超杰^{1,2}, 王海山^{1,2*}

(1. 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; 2. 海南热带海洋学院 海南省热带海洋渔业资源保护与利用重点实验室, 海南 三亚 572022)

摘要: 已知的鱼类环境 DNA (eDNA) metabarcoding 片段均未被针对性考察其对近缘物种的适用性, 实际使用过程中存在“物种丢失”风险。为筛选出物种识别率最高的片段, 本研究比较了 15 个主流片段对 106 属 (共 935 种) 鱼类的识别差异。研究结果如下: (1) 蛋白质编码基因 (COI, 片段 15) 的物种识别率最高, 但其引物通用性最差; 片段 09、片段 11、片段 07、片段 03、片段 12 的引物序列总平均遗传距离也较大, 均存在 eDNA 低效扩增的风险; (2) 片段长度影响物种识别率, 核糖体基因中片段 05、片段 06、片段 01、片段 02 及片段 13 的物种识别率较高; (3) 非度量多维尺度分析 (NMDS) 显示, 不同基因、同一基因不同片段的识别结果存在较大差异, 应考虑多片段、多基因组合应用; 片段 01 与片段 02、片段 05 与片段 06 等在 NMDS 图上距离较近, 存在相互替代性; (4) 物种类群影响识别结果, eDNA 研究仍需要进一步开发高识别率片段。综合物种识别率、引物通用性、NMDS 分析等多方面因素, 本研究推荐 2×150 bp 测序平台使用片段 01 (MiFish-U)、2×250 bp 测序平台使用片段 05 (Ac12S), 辅以片段 13 (Vert-16S-eDNA) 等进行近缘鱼类多样性调查。本研究旨在为提高鱼类 eDNA 调查结果准确性提供一定技术支撑。

关键词: 环境 DNA metabarcoding; 近缘鱼类识别; 12S; 扩增长度; 多片段

中图分类号: S931; Q523

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2022)08-0051-15

1 引言

近年来, 环境 DNA (Environmental DNA, eDNA) metabarcoding 技术开始广泛应用于渔业生态学领域, 在物种多样性调查、外来鱼种监测、濒危鱼类保护方面展现了极大的应用价值和发展潜力^[1-2]。其中, metabarcoding 片段的选择对该技术的有效使用至关重要^[2-3]。经过众多研究者的不懈努力, 目前已筛选

出一些物种识别率较高、对应引物扩增能力较强的优质片段^[3]。如 Miya 等^[4]基于 880 种硬骨鱼类线粒体 12S 序列设计的 MiFish-U, 扩增片段长度控制在 163~185 bp 范围内, 对冲绳水族馆的鱼类检出数目高达 230 种; Vences 等^[5]针对线粒体 16S 设计的脊椎动物 Vert-16S, 不仅扩增片段长度更长 (约 260 bp), 而且对鱼类、两栖类均具有较好的适用性——以德国境内的两条河流为验证水域时, 物种检出率高达 82%~

收稿日期: 2022-02-17; 修订日期: 2022-03-25。

基金项目: 国家自然科学基金 (32002389); 海南省自然科学基金 (422RC717); 海南热带海洋学院引进人才科研启动资助项目 (RHDRC 201907)。

作者简介: 陈治 (1990—), 男, 山东省泰安市人, 讲师, 博士, 主要从事海洋鱼类分类学及其资源保护研究。E-mail: change@139.com

* 通信作者: 王海山 (1983—), 男, 讲师, 博士, 主要从事海洋生物多样性及其系统地理学研究。E-mail: jazz-123@163.com

93%; Balasingham 等^[6]设计的 PS1, 将扩增片段选定于线粒体 COI 基因上, 在获得较多鱼类可操作分类单元 (Operational Taxonomic Units, OTUs) 的同时, 可高效利用公共数据库内的参考序列进行物种注释。截至 2020 年, 被报道的鱼类 eDNA metabarcoding 片段已多达数十个, 其中表现优异的片段约 10 余个^[3]。各片段的筛选背景不同, 实际表现也各具特色, 这为丰富鱼类 eDNA metabarcoding 库、推动鱼类多样性研究奠定了坚实基础。

然而, 迄今为止的鱼类 eDNA 研究尚不健全, 如何根据研究水域和目标类群合理选择 metabarcoding 片段仍处于探索阶段^[3]。其中, metabarcoding 片段对近缘物种的适用性就是一个亟需解决的问题。物种识别率和引物通用性是选择鱼类 eDNA metabarcoding 片段的两大核心指标^[3-4]。为了同时兼顾上述两方面需求, 主流的 eDNA metabarcoding 片段 (AcMDB07、Ac12S、MiFish-U、Tele02 等) 主要位于线粒体核糖体 (12S、16S) 高变区^[3], 虽然能基本满足鱼类多样性调查需求, 但却存在着少数近缘鱼类因条形码片段变异速率较低而难以识别的风险。基于已有物种监测结果可知, 采用核糖体区片段进行鱼类 eDNA 调查可能会造成“物种丢失”。如 MiFish-U 对平鲈属 (*Sebastes*)、东方鲀属 (*Takifugu*)、蝴蝶鱼属 (*Chaetodon*)^[7], Tele01 对玉筋鱼属 (*Ammodytes*)、杜父鱼属 (*Cottus*)、雅罗鱼属 (*Leuciscus*)^[8] 等类群的 OTUs 注释结果均出现了此问题。表明“物种丢失”可能是一种比较常见的现象。然而, 由于本底资料缺乏、物种数量不足等原因, 已知的鱼类 eDNA 调查只是简单提及了此现象, 未能充分揭露所用片段的近缘物种识别缺陷; 不同片段间的近缘物种识别差异更缺乏相互比较。究竟哪些片段的“物种丢失”风险更低, 更适合近缘鱼类多样性调查? 目前尚不得而知。

随着水体污染、过度捕捞、栖息地丧失等威胁的加剧, 世界各地土著鱼类的物种多样性、遗传多样性正急剧下降^[9-11]; 而外来鱼种却因水产养殖、观赏活动释放等原因大幅增加^[11]。这就对当前的鱼类多样性监测提出了更高的要求。而全面、准确的物种调查则是开展各类生物多样性保护的基础和前提^[1-3]。在近缘鱼类识别是鱼类 eDNA 调查无法回避的大背景下, 本研究将系统探究主流 metabarcoding 片段的“物种丢失”风险、比较不同片段的近缘物种识别差异, 以期能够从中筛选出物种识别率最高的片段, 最终为完善鱼类 eDNA metabarcoding 技术、提高鱼类多样性调查结果的准确性提供一定技术支撑。

2 材料与方法

2.1 序列下载及筛选

自然水域难以出现近缘鱼类大规模出现的情况, 结果具有较大的偶然性。因此, 本研究采用 MitoFish 公共数据库内的线粒体全序比较各片段的近缘物种识别差异。具体操作如下: 登录 MitoFish 数据库 (<http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/download.html>), 下载“*All Mitogenomes*”选项内的 3 081 种鱼类的线粒体全序 fasta 压缩文件 (截至 2022 年 1 月 23 日); 同步下载 txt 文档, 以方便核对序列来源、GenBank 号、上传者单位等信息。使用 MegAlign 软件将下载的 fasta 文件转换为 seq 文件。基于 Fishbase 数据库 (<https://www.fishbase.de/>) 核对物种分类有效性。剔除杂交种、争议种及含有简并碱基的序列。为降低序列截齐的工作量, 本研究仅将物种较多 (5 种及以上) 的属挑出用于后续分析。物种分类阶元的确认依据 Fishbase 数据库及中国动物主题数据库 (China Animal Scientific Database, <http://www.zoology.csdb.cn/>)。

2.2 metabarcoding 片段选择

查阅 2008–2021 年期间涉及鱼类 eDNA metabarcoding 技术的有关研究, 特别是参考 Zhang 等^[3]的研究结果对其中表现较好的 metabarcoding 片段及对应引物进行汇总。以花鳗鲡 (*Anguilla marmorata*) 线粒体全序 (序列号: NC006540) 为参照, 核对正、反向引物方向标注是否正确。按所在位置对 metabarcoding 片段进行编号、排序。

2.3 序列截齐

使用 DNASTar 软件包中的 Seqman 程序, 对挑选出的序列进行截齐: (1) 扩增片段序列截齐后用于近缘鱼类条形码相似度分析; (2) 正、反向引物序列截齐后用于引物变异度分析。

2.4 遗传距离分析

采用 PAUP 4.0 软件构建最大简约法 (Maximum Parsimony, MP) 系统发育树, 系统树可信度均采用 Bootstrap 检验, 经 1 000 次重复抽样检验得到分支节点支持率。物种的聚类情况即物种识别率^[12]: 若不同物种聚为一支 (取遗传距离等于 0), 认为该物种识别失败; 若不同物种聚为不同支 (遗传距离大于 0), 认为该物种识别成功 (由于不同 metabarcoding 片段的种间差异标准不同, 难以给出准确可靠的判定阈值, 因此本研究只探究遗传距离是否为 0 的情况); 同时, 基于正、反向引物联合序列计算总平均遗传

距离^[7], 从而判断引物的通用程度。

运用 SPSS25.0 软件基于单因素方差分析 (One-way ANOVA) 对不同引物的物种识别率等进行差异显著性分析。显著差异阈值为 $p=0.05$, 试验结果以“平均值±标准差”表示。

2.5 非度量多维尺度分析

使用非度量多维尺度 (Non-Metric Multidimensional Scaling, NMDS) ^[13] 方法对物种识别结果 [0,1] 矩阵进行排序分析, 该分析在 Canoco 5.0 软件中完成。选用 Bray-Curtis 距离, 因为其在在大范围和小范围的坐标轴上都具有稳健性^[12,14]。分析结果以胁强系数 (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; 而当 $stress < 0.05$ 时, 则认为该排序结果具有很好的代表性^[15]。NMDS 运算的步骤如下: (1) 将物种识别率处理为 [0,1] 矩阵, 鉴定成功为 1, 鉴定失败为 0; 以物种名为首行、metabarcoding 片段名为首列储存 .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) “analysis”选项下, 选择

“Canoco Adviser”, 调出 NMDS 分析程序; (4) “treatment of ties in distance”选择“secondary”, “stress formula”选择“type 1”, 其余选择默认参数。

3 结果

3.1 用于分析的近缘鱼类简介

本研究用于分析的鱼类共计 2 纲、20 目、52 科、106 属、935 种。其中鲤形目 (Cypriniformes) 种类最多, 共计 3 科、37 属、337 种, 鲈形目 (Perciformes) 次之, 共计 18 科、22 属、190 种。扁鲨目 (Squatiniiformes)、脂鲤目 (Characiformes)、胡瓜鱼目 (Osmeriformes) 的数量最少, 各只有 1 科、1 属、5 种。物种名称及对应 Genbank 序列号见表 S1、表 S2。

3.2 引物简介

经文献查阅及汇总, 特别是参照 Zhang 等^[9] 对 22 个主流片段 (引物) 的全面比较结果, 本研究用于分析的鱼类 eDNA metabarcoding 片段共计 15 个。涵盖线粒体 12S、16S、COI 3 个目标基因。其中以 12S 为目标基因的片段最多 (8 个), 16S 次之 (6 个), COI 最少 (仅 1 个)。各片段、对应引物位置及信息见图 1 及表 1。

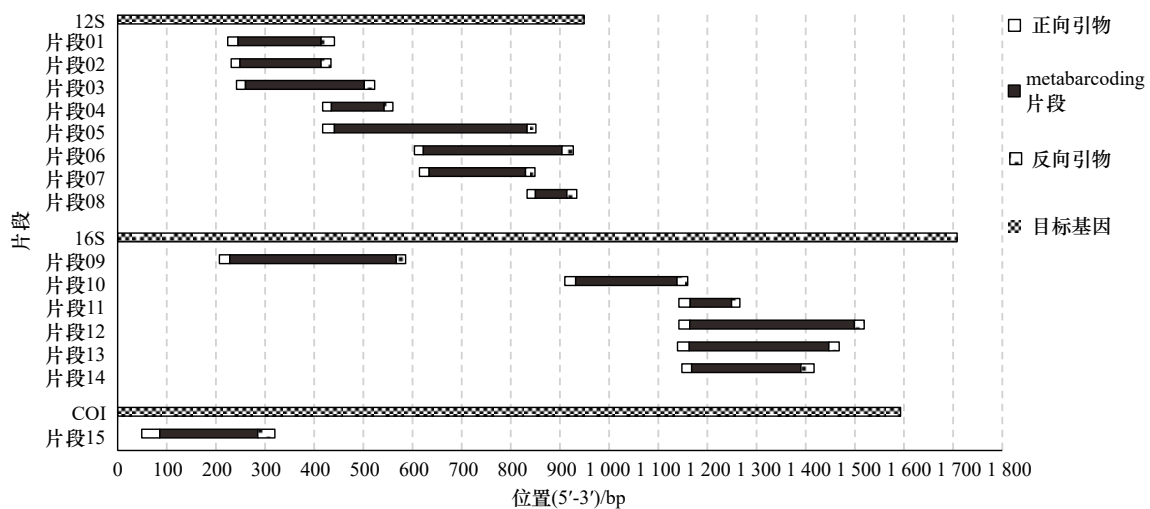


图 1 本研究中 15 个鱼类 eDNA metabarcoding 片段和对应引物在目标基因上的位置

Fig. 1 Locations of the 15 fish eDNA metabarcoding fragments and primer pairs on the target mitochondrial genes

以花鳗鲡 (*Anguilla marmorata*) 线粒体基因序列 (GenBank 登录号: NC006540) 为标注模板

Sequence of the marbled eel (*Anguilla marmorata*) (GenBank accession number: NC006540) was used as template

3.3 物种识别率及引物变异情况

不同片段的物种识别率存在极显著差异 ($F=32.39$, $p=1.5 \times 10^{-76}$), 蛋白质编码基因 (片段 15) 的物种识别率最高, 达到 $(82.76 \pm 24.66)\%$ 。核糖体基因中, 片段 03、片段 05 的表现最为优异, 识别率分别为 $(68.9 \pm 30.81)\%$ 和 $(71.62 \pm 27.3)\%$; 片段 04、片段 08 和片段

11 的识别率较低, 平均值未超过 42.92%; 其余片段的物种识别率较为中等, 平均值在 54.58%~64.6% 间 (图 2, 表 2)。

基于 15 个片段对应正、反向引物联合序列构建的 MP 系统发育树总平均遗传距离依次为 1.52%、1.84%、4.58%、0.88%、0.97%、2.46%、5.78%、3.32%、9.32%、

表 1 本研究中 15 个鱼类 eDNA metabarcoding 片段简介
Table 1 Summary of 15 fish eDNA metabarcoding fragments analyzed in this study

metabarcoding 片段	对应引物名称	目标基因	长度/bp	引物序列(5'-3')	设计者
片段01	MiFish-U	12S	169	For-GTCGGTAAAACCTCGTGCCAGC Rev-CATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTG	Miya等 ^[4]
片段02	Tele02	12S	165	For-AAACTCGTGCCAGCCACC Rev-GGGTATCTAATCCCAGTTG	Taberlet等 ^[16]
片段03	Am12S	12S	242	For-AGCCACCGCGTTATACG Rev-CAAGTCCTTTGGGTTTTAAGC	Evans等 ^[17]
片段04	12S-V5	12S	107	For-ACTGGGATTAGATACCCC Rev-TAGAACAGGCTCCTCTAG	Riaz等 ^[18]
片段05	Ac12S	12S	392	For-ACTGGGATTAGATACCCACTATG Rev-GAGAGTGACGGGCGGTGT	Evans等 ^[17]
片段06	AcMDB07	12S	282	For-GCCTATATACCGCCGTCG Rev-GTACACTTACCATGTTACGACTT	Bylemans等 ^[19]
片段07	NeoFish_3	12S	196	For-CGCCGTCGCAAGCTTACCCT Rev-AGTGACGGGCGGTGTGTGC	Milan等 ^[20]
片段08	Tele01	12S	64	For-ACACCGCCGTCACTCT Rev-CTTCCGGTACACTTACCATG	Valentini等 ^[8]
片段09	Ac16S	16S	339	For-CCTTTTGCATCATGATTTAGC Rev-CAGGTGGCTGCTTTTAGGC	Evans等 ^[17]
片段10	L2513/H2714	16S	206	For-GCCTGTTTACCAAAAACATCAC Rev-CTCCATAGGGTCTTCTCGTCTT	Kitano等 ^[21]
片段11	Fish16S	16S	84	For-CGAGAAGACCCTWTGGAGCTTIAG Rev-GGTCGCCCAACCRAAG	Shaw等 ^[22]
片段12	Ve16S	16S	335	For-CGAGAAGACCCTATGGAGCTTA Rev-AATCGTTGAACAAACGAACC	Evans等 ^[17]
片段13	Vert-16S-eDNA	16S	284	For-AGACGAGAAGACCCYDTGGAGCTT Rev-GATCCAACATCGAGGTCGTAA	Vences等 ^[5]
片段14	Fish16S F/D-2R	16S	222	For-GACCCTATGGAGCTTTAGAC Rev-CGCTGTTATCCCTADRGTAACT	DiBattista等 ^[23]
片段15	PS1	COI	199	For-ACCTGCCTGCCGATTTGGYGCYTGRGCCGGRATAGT Rev-ACGCCACCGACCCARAARCTYATRTRTTYATTCG	Balasingham等 ^[6]

注: 片段长度以花鳗鲡(*Anguilla marmorata*)(GenBank登录号: NC006540)为参考。

2.29%、6.21%、4.14%、1.71%、3.17% 和 15.70%(图 2)。表明蛋白质编码基因(片段 15)的对应引物通用性最差。片段 09、片段 11、片段 07、片段 03 和片段 12 的引物变异程度也较高(总平均遗传距离 $\geq 4.14\%$),实际使用过程中应考虑其 eDNA 扩增效率。

不同类群的识别率也存在极显著差异($F=14.40$, $p=7\times 10^{-157}$): 旗鲙属(*Aphyosemion*)、舌鳎属(*Cynoglossus*)、鏢鲈属(*Etheostoma*)等属内近缘物种较容易区分,全部 15 个片段的平均识别率均在 90% 以上;而金枪鱼属(*Thunnus*)、白鲑属(*Coregonus*)等类群的目标

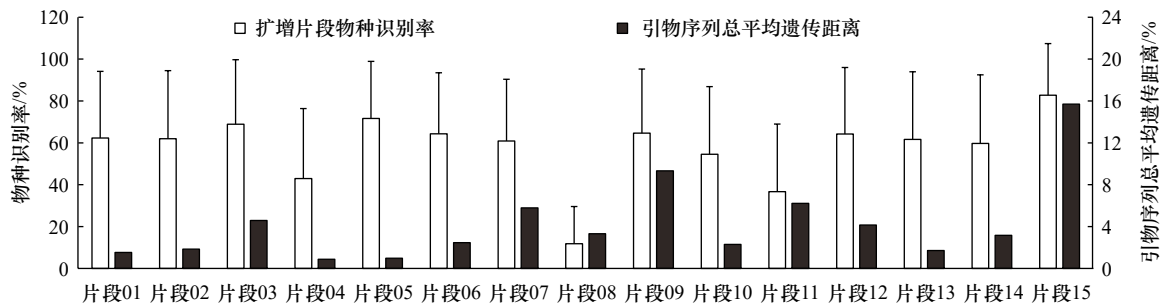


图2 本研究中 15 个鱼类 eDNA metabarcoding 片段的物种识别率及对应引物序列总平均遗传距离

Fig. 2 Fish species resolution rates of 15 eDNA metabarcoding fragments and overall mean distances of primer pairs in this study

基因同源性较高,大部分片段对其识别能力较差(图3,表2)。

3.4 NMDS 结果

根据 935 种鱼类的识别结果对 15 个 metabarcoding 片段做 NMDS 排序,片段 04、片段 08 和片段 11 明显远离其余片段,说明此 3 个片段物种识别结果较为不同(图4)。其余 11 个核糖体片段根据所在目标基因聚类成 A、B 两组,表明不同目标基因影响物种识别。NMDS 分析结果的胁强系数为 0.13,说明将 15 个 metabarcoding 片段划归不同组具有一定的解释意义。

4 讨论

本研究用于分析的鱼类数量庞大、阶元众多(见 3.1 节及表 S1、表 S2),涉及软骨鱼类及硬骨鱼类、淡水鱼类及海水鱼类、定居性鱼类及洄游性鱼类等各类群。样本量具有较好的统计学意义,结果能够比较充分地反映 15 个主流 eDNA metabarcoding 片段的优劣。本研究是目前国内第一篇针对性探究鱼类 eDNA metabarcoding 近缘物种适用性的报告。

4.1 COI 片段的引物缺陷

片段 15(PS1, COI)的物种识别率显著高于剩余 14 个 12S/16S 片段,是唯一物种识别率超过 80% 的 metabarcoding 片段。这与 Balasingham 等^[6]认为的鱼类线粒体蛋白质编码基因比核糖体基因能够更有效避免北美五大湖内部分入侵物种 eDNA 注释结果假阴性的结论一致,也与经典的 DNA 条形码普遍采用线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因的事实相符^[24]。此外,COI 基因在鱼类 eDNA metabarcoding 参考数据库的全面性方面也具有 12S、16S 基因难以比拟的优势^[3]。然而,引物序列的高变性可能会阻碍片段 15 的广泛应用。本研究中该片段正、反向引物序列的总平均遗传距离高达 15.70%。中国团扇鲮(*Platyrrhina sinen-*

sis)、细条银口天竺鲷(*Jaydia lineata*)、土佐鲮(*Uranoscopus tosaе*)、横带髯鲷(*Haploxygnathops analis*)的 COI 特异性引物、探针设计结果表明:当总平均遗传距离大于 8.21%~9.65% 时,高纯度 DNA 模板会出现明显的弥散扩增;总平均遗传距离大于 12.47%~13.77% 时,引物会对部分近缘物种产生绝对特异^[7]。因此,片段 15 存在 eDNA 低效扩增/偏倚扩增的缺陷。Collins 等^[25]、Zhang 等^[3]分别对英吉利海、北京水系的鱼类多样性调查显示,COI 片段的物种检出数目不及所用的 12S 片段,其结果支持本研究观点。

此外,其他的 COI 或 Cytb metabarcoding 片段可能也难以解决引物通用性的问题。鱼类 eDNA metabarcoding 技术需要依托 2×150 bp、2×250 bp 两种高通量测序(Next-generation Sequencing, NGS)平台实现^[3],而 Miya 等^[4]对 880 种硬骨鱼类线粒体基因组全序的筛查结果显示,COI、Cytb 等蛋白质编码基因在该读长限定范围内不存在成对的侧翼保守区,理论上难以设计出与经典的鱼类 DNA 条形码(基于 Sanger 测序,读长可达 2×600 bp)媲美的成对引物。Menning 等^[26]、Jennings 等^[27]、Sultana 等^[28]的序列比对结果也表明,整个 Cytb 基因基本为高变序列,COI 基因则只在近 5 端前 350 bp 范围内变异较小,相对适合设计短片段通用引物。结合本研究(图1)和 Zhang 等^[3]对 22 对引物的汇总结果可知,片段 15 等少数几对鱼类 COI metabarcoding 优质片段恰位于此相对保守区,其引物通用性较差,而其他区域 metabarcoding 片段的引物序列总平均遗传距离可能更大。因此,本研究认为后续研究没有必要进一步比较其他 COI、Cytb 片段的近缘物种识别差异;同时认为以片段 15 为代表的蛋白质编码片段更适合作为 eDNA 研究的辅助 metabarcoding,并且需要根据研究水域、目标类群降低引物调查范围,从而对引物序列进行针对性设计或优化。

4.2 核糖体片段的比较

片段长度影响物种识别(表1,图2,图4)。本研

表 2 metabarcoding 片段对各类群的识别率
Table 2 The species resolution rates of metabarcoding fragments for different groups

物种类群	物种数	识别率/%															全部片段
		片段 01	片段 02	片段 03	片段 04	片段 05	片段 06	片段 07	片段 08	片段 09	片段 10	片段 11	片段 12	片段 13	片段 14	片段 15	
鳓属 <i>Acheilognathus</i>	14	71.43	71.43	85.71	71.43	85.71	71.43	85.71	71.43	85.71	85.71	57.14	85.71	85.71	71.43	100	77.14±11.83
鲷属 <i>Acipenser</i>	15	13.33	20	26.67	13.33	46.67	33.33	40	6.67	33.33	0	33.33	6.67	13.33	6.67	73.33	24.44±19.46
光唇鱼属 <i>Acrossocheilus</i>	16	56.25	50	62.5	50	87.5	75	62.5	6.25	68.75	43.75	50	62.5	50	43.75	100	57.92±21.45
黑头鱼属 <i>Alepocephalus</i>	7	57.14	14.29	28.57	0	28.57	28.57	28.57	0	28.57	14.29	14.29	28.57	42.86	28.57	100	29.52±24.43
西鲱属 <i>Alosa</i>	6	50	0	0	0	33.33	33.33	33.33	0	0	66.67	16.67	16.67	16.67	100	25.56±28.78	
双锯鱼属 <i>Amphiprion</i>	10	70	50	60	20	60	50	30	10	60	60	30	80	60	50	40	48.67±19.22
雙鰭属 <i>Anguilla</i>	17	29.41	35.29	64.71	0	76.47	70.59	76.47	41.18	64.71	47.06	35.29	76.47	64.71	52.94	88.24	54.9±23.5
细鯽属 <i>Aphyocypris</i>	5	60	60	60	20	60	40	40	0	100	80	60	100	80	100	100	64±30.43
旗鳍属 <i>Aphyosemion</i>	8	100	100	100	100	100	100	100	12.5	100	100	100	100	100	100	100	94.17±22.59
深海鲷属 <i>Bathyraja</i>	8	12.5	25	50	12.5	25	12.5	12.5	0	12.5	12.5	0	25	25	37.5	50	20.83±15.43
鯽属 <i>Carassius</i>	5	0	0	0	0	60	20	20	0	60	40	0	40	0	0	60	20±25.07
真鲨属 <i>Carcharhinus</i>	14	64.29	71.43	100	78.57	100	100	100	50	85.71	35.71	14.29	50	64.29	71.43	100	72.38±26.57
刺尻鱼属 <i>Centropryge</i>	16	75	75	87.5	31.25	62.5	56.25	62.5	12.5	87.5	37.5	0	50	50	62.5	100	56.67±27.8
九棘鲷属 <i>Cephalopholis</i>	5	100	100	100	40	100	60	60	0	40	40	60	100	100	100	100	73.33±32.66
鳧属 <i>Chama</i>	8	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	62.5	25	75	75	75	75	75	75	50	64.17±13.25
红鳍鲷属 <i>Chanodichthys</i>	5	20	20	20	20	60	60	0	0	100	60	0	100	60	60	100	45.33±36.62
燕鲷属 <i>Cheilopogon</i>	8	37.5	37.5	25	0	25	50	50	0	62.5	25	12.5	12.5	25	12.5	75	30±22.06
鲮属 <i>Cirrhinus</i>	5	60	60	60	40	100	100	100	0	60	60	20	60	40	40	60	57.33±28.15
胡子鲇属 <i>Clarias</i>	6	66.67	16.67	33.33	33.33	83.33	33.33	33.33	0	66.67	33.33	0	66.67	66.67	33.33	100	44.44±29.32
花鲈属 <i>Cobitis</i>	11	81.82	81.82	81.82	81.82	72.73	81.82	81.82	9.09	63.64	81.82	63.64	81.82	81.82	81.82	100	75.15±20.17
鲢属 <i>Coilia</i>	6	16.67	50	50	16.67	66.67	100	66.67	0	50	66.67	33.33	33.33	16.67	16.67	100	45.56±30.52

续表 2

物种类群	物种数	识别率/%															
		片段 01	片段 02	片段 03	片段 04	片段 05	片段 06	片段 07	片段 08	片段 09	片段 10	片段 11	片段 12	片段 13	片段 14	片段 15	全部片段
鳊属 <i>Hemibagrus</i>	5	60	60	60	80	60	40	60	0	60	60	20	60	60	60	60	53.33±19.52
鲮属 <i>Hemibarbus</i>	7	42.86	42.86	42.86	28.57	42.86	28.57	14.29	0	42.86	28.57	14.29	42.86	42.86	42.86	100	37.14±22.13
海马属 <i>Hippocampus</i>	18	88.89	88.89	88.89	55.56	66.67	66.67	61.11	27.78	100	77.78	55.56	100	100	100	100	78.52±22.11
刺鲃属 <i>Holacanthus</i>	5	40	40	60	40	60	60	60	0	40	20	20	40	40	40	60	41.33±17.67
下鱈属 <i>Hyporhamphus</i>	5	100	100	100	100	100	100	100	40	100	100	100	100	100	100	100	96±15.49
野鲮属 <i>Labeo</i>	20	70	70	80	35	90	80	75	10	60	30	25	55	40	50	80	56.67±24.1
兔头鲈属 <i>Lagocephalus</i>	8	100	100	100	75	100	100	100	25	100	75	75	62.5	75	62.5	100	83.33±21.99
太阳鱼属 <i>Lepomis</i>	6	100	100	100	50	100	100	100	0	100	100	66.67	100	100	100	100	87.78±28.5
薄鲈属 <i>Leptobotia</i>	6	50	16.67	66.67	50	66.67	50	33.33	0	33.33	16.67	50	33.33	33.33	33.33	50	38.89±18.55
鲃属 <i>Liobagrus</i>	9	66.67	77.78	77.78	11.11	77.78	55.56	66.67	0	33.33	33.33	33.33	100	100	100	77.78	60.74±31.95
笛鲷属 <i>Lutjanus</i>	13	84.62	84.62	100	100	100	100	84.62	23.08	100	69.23	30.77	100	100	100	100	85.13±25.42
狼鲈属 <i>Lycodes</i>	5	60	60	60	40	60	60	60	0	100	40	20	60	60	60	100	56±25.3
虹银汉鱼属 <i>Melanotaenia</i>	6	100	100	50	0	66.67	33.33	33.33	0	66.67	0	50	33.33	100	66.67	100	53.33±36.84
小鱧鲷属 <i>Micropophysogobio</i>	14	64.29	64.29	85.71	64.29	71.43	50	35.71	7.14	85.71	35.71	35.71	57.14	71.43	57.14	100	59.05±23.76
泥鳅属 <i>Misgurnus</i>	5	100	100	100	20	60	60	40	0	60	60	0	60	100	60	100	61.33±35.02
假鳃鲈属 <i>Nothobranchius</i>	8	100	100	100	100	100	100	100	12.5	100	100	100	100	100	100	100	94.17±22.59
美洲鲈属 <i>Notropis</i>	10	100	80	100	60	100	100	80	10	100	60	70	100	100	100	100	84±25.58
沙塘鳢属 <i>Odontobutis</i>	6	100	100	100	100	100	100	66.67	33.33	100	100	100	100	100	100	100	93.33±18.69
太平洋鲑属 <i>Oncorhynchus</i>	8	37.5	62.5	100	37.5	100	75	75	0	37.5	0	0	50	50	50	100	51.67±34.68
白甲鱼属 <i>Onychostoma</i>	11	81.82	63.64	45.45	18.18	63.64	63.64	54.55	27.27	54.55	72.73	0	81.82	54.55	45.45	63.64	52.73±22.85
马口鱼属 <i>Opsariichthys</i>	5	100	120	100	40	60	60	20	0	60	60	40	100	100	100	100	70.67±35.35
罗非鱼属 <i>Oreochromis</i>	9	66.67	66.67	66.67	33.33	44.44	11.11	44.44	0	55.56	22.22	22.22	44.44	33.33	22.22	77.78	40.74±22.88

续表 2

物种类群	物种数	识别率/%															全部片段
		片段01	片段02	片段03	片段04	片段05	片段06	片段07	片段08	片段09	片段10	片段11	片段12	片段13	片段14	片段15	
青鳉属 <i>Oryzias</i>	10	80	80	80	80	80	80	80	100	100	100	100	100	100	100	100	89.33±10.33
纹唇鱼属 <i>Osteochilus</i>	5	80	100	100	80	100	100	100	0	100	80	100	100	100	100	100	89.33±26.04
鲷属 <i>Pampus</i>	7	28.57	57.14	28.57	14.29	28.57	28.57	28.57	0	28.57	14.29	14.29	14.29	14.29	14.29	42.86	24.76±13.73
鲷属 <i>Pareuchiloglanis</i>	5	60	60	60	20	60	100	60	0	60	60	60	60	60	60	100	61.33±26.69
鲷属 <i>Phoxinus</i>	7	100	100	100	57.14	100	71.43	71.43	0	71.43	14.29	100	100	100	100	77.14±32.31	
花鲈属 <i>Poecilia</i>	5	20	20	20	20	60	20	40	20	20	20	20	20	20	20	60	26.67±14.47
多鳞鱼属 <i>Polypterus</i>	10	100	100	100	100	100	100	100	40	100	60	100	100	100	100	92±18.21	
原唇齿脂鲤属 <i>Prochilodus</i>	5	20	20	20	0	20	0	40	0	0	0	40	40	40	20	17.33±16.68	
拟鲮属 <i>Pseudobagrus</i>	12	41.67	58.33	75	33.33	58.33	58.33	58.33	16.67	66.67	8.33	33.33	25	25	83.33	43.33±24.03	
拟腹吸鲈属 <i>Pseudogastromyzon</i>	9	33.33	55.56	55.56	0	55.56	55.56	55.56	0	77.78	44.44	100	77.78	55.56	77.78	53.34±26.96	
多刺鱼属 <i>Pungitius</i>	7	71.43	100	100	28.57	100	57.14	57.14	0	28.57	0	71.43	71.43	42.86	100	57.14±34.99	
鲷属 <i>Raja</i>	6	16.67	16.67	33.33	16.67	66.67	16.67	16.67	0	50	16.67	66.67	66.67	66.67	66.67	38.89±25.72	
波鱼属 <i>Rasbora</i>	7	100	100	100	71.43	100	71.43	100	14.29	71.43	57.14	71.43	71.43	71.43	100	80±24.03	
吻鲈虎鱼属 <i>Rhinogobius</i>	5	100	100	100	100	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100	93.33±25.82	
鲷属 <i>Rhodeus</i>	10	80	80	80	30	80	80	60	20	100	50	100	100	80	100	74.67±24.75	
红点鲑属 <i>Salvelinus</i>	12	8.33	8.33	25	8.33	25	25	25	0	16.67	8.33	0	8.33	0	8.33	15±15.17	
鲷属 <i>Sarcocheilichthys</i>	9	55.56	44.44	55.56	11.11	55.56	55.56	33.33	0	55.56	33.33	0	44.44	33.33	44.44	38.52±20.08	
沙丁鱼属 <i>Sardinella</i>	6	100	100	100	66.67	100	50	66.67	33.33	50	66.67	100	100	66.67	100	77.78±23.29	
蛇鲷属 <i>Saurogobio</i>	7	100	100	100	71.43	100	71.43	71.43	0	71.43	14.29	100	100	100	100	78.1±31.88	
南鲷属 <i>Schistura</i>	11	100	100	100	100	100	100	54.55	100	100	63.64	100	100	100	100	94.55±14.5	
裸腹尻鱼属 <i>Schizopygopsis</i>	7	14.29	14.29	14.29	0	14.29	28.57	14.29	0	28.57	0	42.86	42.86	42.86	71.43	21.91±20.82	
裂腹鱼属 <i>Schizothorax</i>	26	11.54	11.54	15.38	7.69	23.08	23.08	11.54	3.85	15.38	7.69	11.54	3.85	11.54	30.77	12.56±8.15	

续表 2

物种类群	物种数	识别率/%															
		片段01	片段02	片段03	片段04	片段05	片段06	片段07	片段08	片段09	片段10	片段11	片段12	片段13	片段14	片段15	全部片段
马鲛鱼属 <i>Scomberomorus</i>	6	66.67	66.67	66.67	33.33	66.67	66.67	66.67	33.33	100	66.67	100	66.67	66.67	66.67	100	68.89±19.79
平鲉属 <i>Sebastes</i>	19	31.58	31.58	31.58	10.53	36.84	47.37	26.32	0	10.53	15.79	0	26.32	15.79	15.79	68.42	24.56±18.09
瓢鳍虾虎鱼属 <i>Sicyopterus</i>	18	33.33	33.33	44.44	22.22	50	66.67	50	33.33	83.33	33.33	33.33	66.67	55.56	66.67	88.89	50.74±20.13
篮子鱼属 <i>Siganus</i>	6	33.33	33.33	33.33	16.67	100	66.67	66.67	0	66.67	16.67	0	16.67	0	0	33.33	32.22±30.52
鳊属 <i>Sillago</i>	6	100	100	100	100	100	100	100	50	100	66.67	100	100	100	100	100	94.44±15
鲶属 <i>Silurus</i>	6	66.67	66.67	66.67	50	100	100	66.67	16.67	66.67	50	50	66.67	66.67	100	100	68.89±23.46
鲷属 <i>Simiperca</i>	7	57.14	42.86	100	28.57	42.86	28.57	28.57	0	42.86	28.57	14.29	14.29	14.29	14.29	28.57	32.38±23.82
金线鲷属 <i>Sinyclocheilichthys</i>	14	85.71	85.71	85.71	35.71	78.57	78.57	64.29	28.57	50	57.14	21.43	64.29	57.14	78.57	85.71	63.81±21.84
银鲷属 <i>Squalidus</i>	7	42.86	28.57	57.14	42.86	100	57.14	57.14	14.29	57.14	14.29	14.29	42.86	28.57	28.57	100	46.67±26.16
扁鲨属 <i>Squatina</i>	5	60	60	60	20	60	60	60	0	20	40	40	60	60	60	100	50.67±23.74
疯鲛属 <i>Tachysurus</i>	8	75	75	75	25	100	100	100	0	75	37.5	0	75	50	50	75	60.83±33.03
东方鲀属 <i>Takifugu</i>	16	0	6.25	6.25	6.25	37.5	25	12.5	12.5	12.5	18.75	6.25	31.25	25	31.25	62.5	19.58±16.34
田中鲂鲷属 <i>Tanakia</i>	6	100	100	100	100	100	100	100	16.67	100	33.33	100	100	100	100	100	90±26.58
鲷属 <i>Tetraodon</i>	5	100	100	100	60	60	60	60	0	100	0	0	100	60	60	100	70.67±34.53
梭鲷属 <i>Thryssa</i>	6	100	100	100	66.67	100	100	100	0	100	100	100	100	100	100	100	91.11±26.63
金枪鱼属 <i>Thunnus</i>	9	0	11.11	11.11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1.48±3.91
尚鱼属 <i>Thymallus</i>	10	20	20	40	0	30	50	20	0	30	20	10	20	30	10	60	24±16.82
结鱼属 <i>Tor</i>	7	71.43	71.43	100	0	71.43	42.86	57.14	0	28.57	57.14	28.57	71.43	57.14	28.57	100	52.38±30.86
高原鲷属 <i>Triplophysa</i>	21	47.62	47.62	80.95	42.86	71.43	71.43	61.9	4.76	66.67	52.38	19.05	47.62	47.62	47.62	80.95	52.7±21.1
全部物种	935	62.3±31.84	61.95±32.54	68.9±30.81	42.92±33.46	71.62±27.3	64.34±29.13	60.89±29.48	11.79±17.79	64.6±30.65	54.58±32.28	36.71±32.27	64.2±31.8	61.6±32.35	59.71±32.78	82.7±24.66	

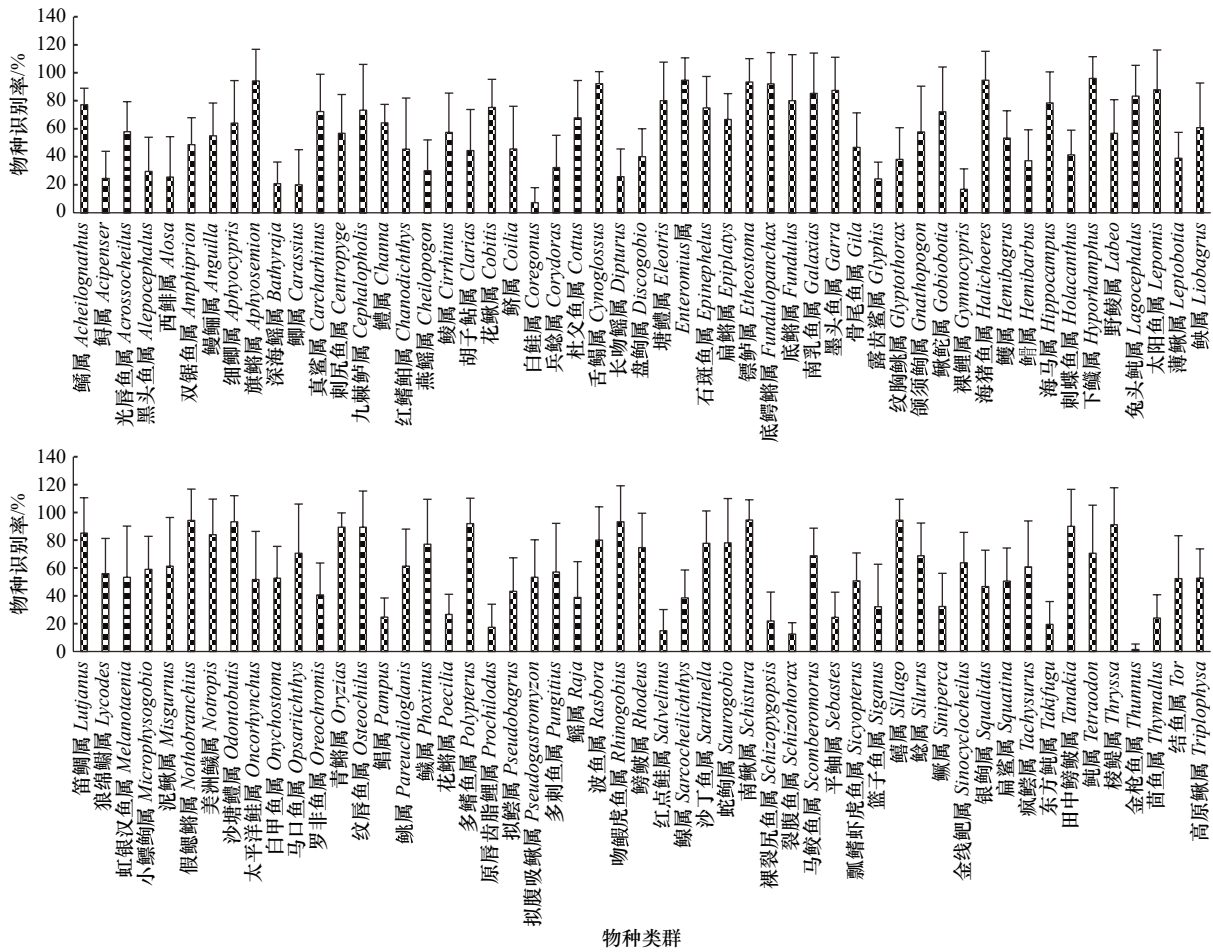


图3 本研究中 106 属鱼类的物种识别率
Fig. 3 Fish species resolution rates of 106 genera in this study

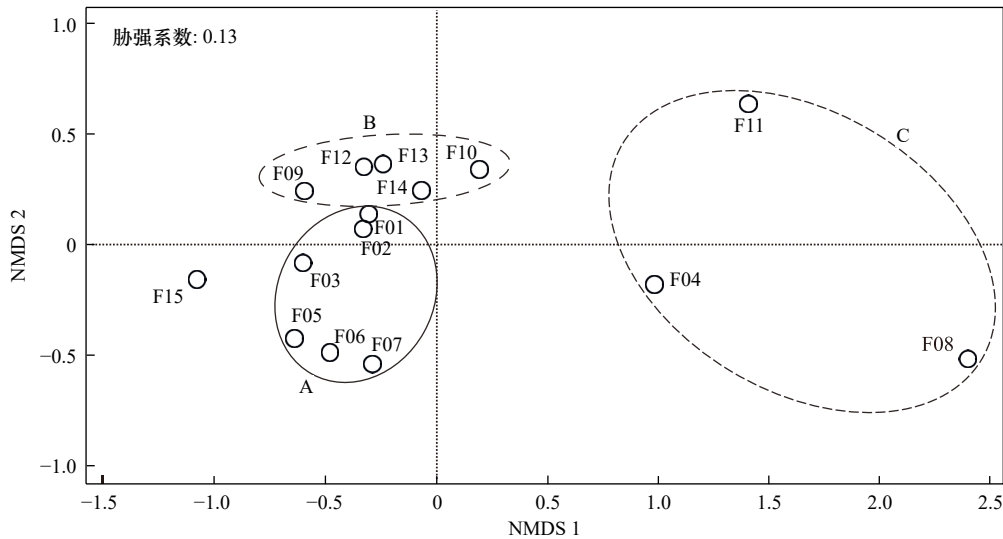


图4 不同 metabarcoding 片段的非度量多维尺度(NMDS)分析
Fig. 4 Analysis of non-metric multidimensional scaling (NMDS) for different metabarcoding fragments

F01 表示片段 01, 其余依次类推

F01 represents fragment 01, and the rest are followed by analogy

究中识别率最低的 3 个 metabarcoding 片段(片段 08、片段 11 和片段 04)长度均不超过 110 bp, 而片段 05、

片段 03 等高识别率片段则在 200 bp 以上。Balasingham 等^[6]、Gantner 等^[29]的研究也认为 12S 和 16S 扩增

片段越短,物种鉴定的准确性越低。虽然由于水体中的痕量 eDNA 通常存在严重降解,主流的观点认为 200 bp 以内的微条形码可能具有更高的 PCR 成功率^[4,30],但 Bylemans 等^[19]、Zhang 等^[3] 多个研究却发现:片段 05、片段 03 等的高通量测序数据量和物种检出数目并不低于片段 08、片段 04 或片段 11,只是在定量分析等方面相互存在较大差异。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、分布和变化规律,Deiner 等^[31]、Bylemans 等^[19] 推测长片段 eDNA 可能反而可以更长久地存在于水体中。本研究不推荐使用 metabarcoding 短片段(片段 08、片段 11 和片段 04)进行近缘鱼类多样性调查。

除去 COI 和 3 个短片段,片段 05 的物种识别率最高,其引物通用性(总遗传距离=0.97%)也仅次于片段 04。片段 05 是近缘鱼类多样性调查的第一选择,该结果与 Zhang 等^[3] 的研究结论一致。片段 09、片段 07、片段 03、片段 12 的物种识别率虽然也较高,但在本研究中,其引物序列总平均遗传距离较大($\geq 4.14\%$),存在类似于片段 15 的“物种丢失”风险;其他 metabarcoding 引物比较研究也表明其物种检出数目不及片段 06、片段 13^[3]。片段 14、片段 10 虽然长度大于 200 bp,但物种识别率和引物通用性却并不出众;并且可能因为引物序列 3' 位置存在变异^[7],这两个片段在个别研究中的实际表现甚至不如片段 15^[3]。而片段 01 和片段 02 则在引物序列、条形码性能方面基本一致,二者存在明显的相互替代性,本研究更倾向二者中选用片段 01。综上所述,片段 05、片段 06、片段 01、片段 13 是本研究筛选出的 4 个最优 metabarcoding 片段。然而,受高通量测序成本和参考数据库的影响,在单一研究中使用的 metabarcoding 片段通常不超过 3 个^[3-4]。虽然本研究及 Zhang 等^[3]、Bylemans 等^[19] 的研究均表明片段 06 的物种识别率和引物通用性优异,但 NMDS 分析(图 4)显示片段 06 在散点图上与片段 05 位置较近,因此同时使用这两个片段进行鱼类多样性研究可能并不能显著提高物种检出数目。NMDS 分析也显示,不同基因、同一基因不同片段间均存在较大差异(图 4)。因此不仅需要多片段联合应用,而且所用片段要有足够的多基因代表性。本研究倾向于以片段 05、片段 01 为主,片段 13 等为辅,进行近缘鱼类多样性调查。

4.3 本研究所用片段的不足及新片段开发的可能性

本研究对 106 属鱼类的识别结果差异极显著(见 3.3 节),表明物种类群直接影响 eDNA metabarcoding 调查效果。从 15 个片段的总识别率角度比较(表 2),

仅 15 属鱼类物种识别率超过 90%,多达 38 属鱼类识别率不足 50%。由于 935 种鱼类的线粒体全序列皆来自公共数据库,其中一些序列可能存在同物异名错误——如鲟属鱼类的银鲟(*Pampus argenteus*)与镰鲟(*Pampus echinogaster*)^[32],因此该属鱼类识别率偏低;但更可能的解释是低识别类群物种间遗传差异较小,导致 metabarcoding 片段从源头上就难以完全区分——如白鲑属(*Coregonus*)^[33]、红点鲑属(*Salvelinus*)^[34] 的众多物种集中分布于 50°N 以北环北极圈水域,物种间可能存在较为频繁的基因交流;平鲈属(*Sebastes*)则广泛分布于北太平洋且仔鱼营漂浮生活,不同群体间也不存在明显的地理隔离^[35]。Miya 等^[4] 在筛选 Mi-Fish-U(片段 01)引物时已发现,金枪鱼属等大洋性鱼类的大部分线粒体基因高度保守,只有借助变异速率极高的线粒体 NADH 脱氢酶亚基 5(NADH Dehydrogenase Subunit 5, ND5)条形码才能进行有效区分。因此,受制于物种自身的遗传背景,本研究所用片段尚无法对全部鱼类进行 100% 区分。后续仍需不断尝试筛选新片段从而尽量提高 eDNA metabarcoding 技术的鱼类多样性调查能力。

metabarcoding 片段的开发与目标基因内茎环结构的数量和分布情况密切相关。斑鳅(*Konosirus punctatus*)^[36]、大口鳊(*Psettodes erumei*)^[37]、北极茴鱼(*Thymallus arcticus*)^[38] 等线粒体基因二级结构示意图显示,16S 基因仅在中后段存在 1~2 个大型茎环结构,相比之下,12S 基因存在 2~4 个。由于 12S 基因的总长度仅为 16S 的 60%(约 900 bp : 1 600 bp),因此该基因内的茎环结构分布更为密集和均匀。茎环结构有利于寻找稳定的“保守-高变-保守”序列,Evans 和 Lamberti^[39]、Hänfling 等^[40]、Bylemans 等^[19] 据此认为,线粒体 12S 基因比 16S 基因更适合开发鱼类 eDNA metabarcoding 标记,本研究支持此结论。然而,基于 14 个核糖体片段的位置示意图(图 1)和简约信息(表 1)可知,鱼类 16S 基因的后半段大型茎环及 12S 基因的主要茎环皆已经被筛选出 metabarcoding 片段。围绕单一茎环结构开发新片段不仅可能性极小,而且片段识别率可能也不理想(如片段 07、片段 10)。相比片段 01、片段 04 和片段 08 等,片段 05 和片段 06 等则是由多个中小型茎环结构组合形成,其物种识别率反而更高。以此类推,联合多个相邻茎环区域可能是形成新的高识别率片段的手段之一。本研究中,12S 片段对应引物存在明显的位置重合及序列共用(图 1,表 1),说明这些区域的引物保守性得到了较大认可。因此,可以尝试通过这些引物的组合应用开发更长、更高识别率的 metabarcoding 片段。如片段 01、片段 02 的

正向引物与片段 06、片段 07 正向引物的反向互补序列共用, PCR 产物约 420 bp(图 1)。该片段由 1 个大型茎环加 2 个小型茎环结构组成, 其物种识别率可能高于片段 05。

综合物种识别率、引物通用性等多方面因素, 本研究推荐 2×150 bp 测序平台使用片段 01(MiFish-U)、2×250 bp 测序平台使用片段 05(Ac12S), 辅

以片段 13(Vert-16S-eDNA) 进行近缘鱼类多样性调查; 新片段的开发也是不断完善 eDNA metabarcoding 技术的重要工作。然而, 鱼类 eDNA 研究受多方面因素的影响, 基于 935 种近缘鱼类线粒体全序的比较结果可能会与实际表现有差异。后期还需寻找近缘鱼类广泛分布的水域, 在建立庞大的本底资料数据库的基础上验证本研究的结论和推测。

参考文献:

- [1] 姜维, 赵虎, 邓捷, 等. 环境DNA分析技术——一种水生生物调查新方法[J]. 水生态学杂志, 2016, 37(5): 1-7.
Jiang Wei, Zhao Hu, Deng Jie, et al. Detection of aquatic species using environmental DNA[J]. Journal of Hydroecology, 2016, 37(5): 1-7.
- [2] 陈炼, 吴琳, 刘燕, 等. 环境DNA metabarcoding及其在生态学中的应用[J]. 生态学报, 2016, 36(15): 4573-4582.
Chen Lian, Wu Lin, Liu Yan, et al. Application of environmental DNA metabarcoding in ecology[J]. Acta Ecologica Sinica, 2016, 36(15): 4573-4582.
- [3] Zhang Shan, Zhao Jindong, Yao Meng. A comprehensive and comparative evaluation of primers for metabarcoding eDNA from fish[J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2020, 11(12): 1609-1625.
- [4] 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.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 陈治. 浙江近海鱼类多样性eDNA调查方法的建立与应用[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2019.
Chen Zhi. Establishment and application of eDNA method for fish diversity survey around Zhejiang coastal area[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2019.
- [8] 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.
- [9] 程馨雨, 陶捐, 武瑞东, 等. 淡水鱼类功能生态学研究进展[J]. 生态学报, 2019, 39(3): 810-822.
Cheng Xinyu, Tao Juan, Wu Ruidong, et al. Functional ecology of freshwater fish: research progress and prospects[J]. Acta Ecologica Sinica, 2019, 39(3): 810-822.
- [10] 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[J]. 淡水渔业, 2020, 50(6): 15-22.
Li Gaojun, Gu Dang'en, Cai Xingwei, et al. The species composition and distribution of indigenous freshwater fishes of three main rivers in Hainan Island[J]. *Freshwater Fisheries*, 2020, 50(6): 15-22.
- [11] 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[J]. 中国水产, 2018, 11(6): 56-60.
Shen Zhixin, Li Gaojun, Cai Xingwei, et al. The evolution and protection of freshwater fish species in Hainan Province[J]. *China Fisheries*, 2018, 11(6): 56-60.
- [12] 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[J]. 生物多样性, 2017, 25(10): 1095-1104.
Wei Ya'nan, Wang Xiaomei, Yao Pengcheng, et al. Comparison of species resolution rates of DNA barcoding for Chinese coastal halotolerant plants[J]. *Biodiversity Science*, 2017, 25(10): 1095-1104.
- [13] Kruskal J B. Nonmetric multidimensional scaling: a numerical method[J]. *Psychometrika*, 1964, 29(2): 115-129.
- [14] Newmaster S G, Fazekas A J, Steeves R A D, et al. Testing candidate plant barcode regions in the Myristicaceae[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2008, 8(3): 480-490.
- [15] 魏观渊, 黄桂芳. 厦门湾春、秋季鱼类群落结构及其多样性[J]. 中国水产科学, 2021, 28(8): 1060-1068.
Wei Guanyuan, Huang Guifang. Fish community structure and species diversity during spring and autumn in the Xiamen Bay[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(8): 1060-1068.
- [16] Taberlet P, Bonin A, Zinger L, et al. Environmental DNA—for Biodiversity Research and Monitoring[M]. Oxford: Oxford University Press, 2018: 206.
- [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] 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.
- [19] 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.
- [20] Milan D T, Mendes I S, Damasceno J S, et al. New 12S metabarcoding primers for enhanced Neotropical freshwater fish biodiversity assessment[J]. *Scientific Reports*, 2020, 10(1): 17966.
- [21] Kitano T, Umetsu K, Tian Wei, et al. Two universal primer sets for species identification among vertebrates[J]. *International Journal of Legal Medicine*, 2007, 121(5): 423–427.
- [22] 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.
- [23] DiBattista J D, Coker D J, Sinclair-Taylor T H, et al. Assessing the utility of eDNA as a tool to survey reef-fish communities in the Red Sea[J]. *Coral Reefs*, 2017, 36(4): 1245–1252.
- [24] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, 2003, 270(1512): 313–321.
- [25] Collins R A, Bakker J, Wangenstein O S, et al. Non-specific amplification compromises environmental DNA metabarcoding with COI[J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2019, 10(11): 1985–2001.
- [26] Menning D, Simmons T, Talbot S. Using redundant primer sets to detect multiple native Alaskan fish species from environmental DNA[J]. *Conservation Genetics Resources*, 2020, 12(1): 109–123.
- [27] Jennings W B, Ruschi P A, Ferraro G, et al. Barcoding the Neotropical freshwater fish fauna using a new pair of universal COI primers with a discussion of primer dimers and M13 primer tails[J]. *Genome*, 2019, 62(2): 77–83.
- [28] Sultana S, Ali M E, Hossain M A M, et al. Universal mini COI barcode for the identification of fish species in processed products[J]. *Food Research International*, 2018, 105: 19–28.
- [29] Gantner S, Andersson A F, Alonso-Sáez L, et al. Novel primers for 16S rRNA-based archaeal community analyses in environmental samples[J]. *Journal of Microbiological Methods*, 2011, 84(1): 12–18.
- [30] Freeland J R. The importance of molecular markers and primer design when characterizing biodiversity from environmental DNA[J]. *Genome*, 2017, 60(4): 358–374.
- [31] Deiner K, Renshaw M A, Li Yiyuan, et al. Long-range PCR allows sequencing of mitochondrial genomes from environmental DNA[J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2017, 8(12): 1888–1898.
- [32] 李渊. 鲟属鱼类形态学和遗传学研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2015.
Li Yuan. Studies on morphology and genetics of *Pampus* species[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2015.
- [33] Lockwood S F, Bickham J W. Genetic stock assessment of spawning Arctic cisco (*Coregonus autumnalis*) populations by flow cytometric determination of DNA content[J]. *Cytometry*, 1991, 12(3): 260–267.
- [34] Shubina E A, Ponomareva E V, Gritsenko O F. Genetic structure of the *Salvelinus* genus chars from reservoirs of the Kuril Islands[J]. *Biochemistry (Moscow)*, 2007, 72(12): 1331–1348.
- [35] 张辉. 西北太平洋两种卵胎生鱼类(许氏平鲈和褐菖鲈)的分子系统地理学研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
Zhang Hui. Molecular phylogeography of two marine ovoviparous fishes in Northwestern Pacific[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013.
- [36] 潘晓哲. 中、日斑鲷耳石形态及线粒体基因组研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.
Pan Xiaozhe. Otolith morphological study and analysis of the mitochondrial genome of Chinese and Japanese dotted gizzard shad (*Konosirus punctatus*)[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2012.
- [37] 张艳春. 大口鲮 *Psettoodes erumei* 线粒体全序列的研究和鲷形目鱼类系统进化分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
Zhang Yanchun. Analysis of the mitochondrial genome of *Psettoodes erumei* and phylogenetic analyses of flatfishes[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009.
- [38] 林小婉. 新疆额尔齐斯河北极茴鱼线粒体全基因组测定及遗传多样性分析[D]. 哈尔滨: 哈尔滨师范大学, 2021.
Lin Xiaowan. Analysis of complete genome mitochondrial sequence and genetic diversity of *Thymallus arcticus arcticus* (pallas) in Xinjiang[D]. Harbin: Harbin Normal University, 2021.
- [39] 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[J]. *Fisheries Research*, 2018, 197: 60–66.
- [40] Hänfling B, Handley L L, Read D S, et al. Environmental DNA metabarcoding of lake fish communities reflects long-term data from established survey methods[J]. *Molecular Ecology*, 2016, 25(13): 3101–3119.

补充材料

表 S1 本研究中 106 属鱼类简介

表 S2 本研究中 935 种鱼类学名及对应序列号

补充材料可通过 <https://www.hyxbocan.cn/> 获取。补充材料未进行排版和编辑, 内容的准确性和科学性由作者承担。

Differences of eDNA metabarcoding fragments in relative fish species resolution

Chen Zhi^{1,2}, Ma Chunlai^{1,2}, Ye Le^{1,2}, Yang Chaojie^{1,2}, Wang Haishan^{1,2}

(1. Key Laboratory of Utilization and Conservation for Tropical Marine Bioresources, Ministry of Education, Hainan Tropical Ocean University, Sanya 572022, China; 2. Hainan Key Laboratory for Conservation and Utilization of Tropical Marine Fishery Resources, Hainan Tropical Ocean University, Sanya 572022, China)

Abstract: The applicability of environmental DNA (eDNA) metabarcoding fragments to relative fish species had not been compared. There was a risk of “species loss” in diversity surveys. In order to screen out the best fragments, we compared the resolution rate differences of 15 eDNA metabarcoding fragments in 106 genera (a total of 935 species). The results were as follows: (1) the protein-coding gene (COI, fragment 15) had the highest resolution rate, but the universality of its corresponding primer pairs was the worst; the overall mean distance based on primer pair sequence of fragment 09, fragment 11, fragment 07, fragment 03 and fragment 12 were obviously large, suggesting their eDNA amplification efficiency were possibly low. (2) The resolution rates were significantly affected by the length of fragments, and the fragment 05, fragment 06, fragment 01, fragment 02 and fragment 13 of ribosomal genes had a higher resolution rate except fragment 15. (3) Non-metric multidimensional scaling analysis (NMDS) showed that there were great differences among different genes and different fragments belonging to the same gene. Therefore, the combination application of multi-fragment and multi-gene should be considered; besides, fragment 01 and fragment 02, and fragment 05 and fragment 06 were close to each other in the NMDS plot. Their function of fish resolution were overlapped. (4) Species groups affected the resolution results, and eDNA studies still need to develop fragments with higher resolution rates. Based on the resolution rate of relative species, the universality of primer pairs and NMDS analysis, this study recommended fragment 01 (Mifish-U) for 2×150 bp sequencing platform and fragment 05 (Ac12S) for 2×250 bp sequencing platform, supplemented by fragment 13 (Vert-16S-eDNA) to investigate the diversity of relative fish. This study provided some support for improving the accuracy of fish eDNA survey results.

Key words: eDNA metabarcoding; relative fish species resolution; 12S; amplicon length; multi-fragments