《水生生物DNA条形码构建规程》（征求意见稿）

编制说明

《水生生物DNA条形码构建规程》标准编制组

二零二二年五月

**目 录**

[1 项目背景 1](#_Toc101446880)

[1.1 任务来源 1](#_Toc101446881)

[1.2 工作过程 1](#_Toc101446882)

[2 标准制定的必要性 3](#_Toc101446883)

[2.1 标准制定的意义和目的 3](#_Toc101446884)

[2.2 国内外相关技术发展动态 5](#_Toc101446885)

[2.3 相关国际标准或国外先进标准情况 8](#_Toc101446886)

[2.4 与国内相关法律法规和标准的协调关系 9](#_Toc101446887)

[2.5 现有工作基础 9](#_Toc101446888)

[3 标准编制依据和原则 9](#_Toc101446889)

[3.1 编制目的 9](#_Toc101446890)

[3.2 编制原则 9](#_Toc101446891)

[4 规范主要技术内容和适用范围 10](#_Toc101446892)

[4.1 标准适用范围 10](#_Toc101446893)

[4.2 总体框架和主要内容 10](#_Toc101446894)

[4.3 规范性引用文件 10](#_Toc101446895)

[4.4 DB 21/T 2777 海洋浮游微藻分离和筛选技术规程术语和定义 11](#_Toc101446896)

[4.5 试剂器材 13](#_Toc101446897)

[4.5.1 试剂和材料 13](#_Toc101446898)

[4.5.2 仪器与设备 13](#_Toc101446899)

[4.6 DNA条形码构建方法 14](#_Toc101446900)

[4.6.1 物种鉴定 14](#_Toc101446901)

[4.6.2 条形码扩增与测序 15](#_Toc101446902)

[4.6.3 条形码评估 25](#_Toc101446903)

[4.7 物种条形码 28](#_Toc101446904)

[5 废弃物处理 29](#_Toc101446905)

[6案例 29](#_Toc101446906)

[6.1 太湖流域浮游植物DNA条形码数据库构建 29](#_Toc101446907)

[6.2 太湖流域浮游动物DNA条形码数据库构建 30](#_Toc101446908)

[6.3 太湖流域大型底栖无脊椎动物DNA条形码数据库构建 34](#_Toc101446909)

[6.4 太湖流域鱼类DNA条形码数据库构建 36](#_Toc101446910)

[6.5本土物种DNA条形码数据库重要性 37](#_Toc101446911)

[7 标准实施建议 38](#_Toc101446912)

[附 录 39](#_Toc101446913)

[附录A 采样信息记录表 39](#_Toc101446914)

[附录B 浮游植物培养基配置 40](#_Toc101446915)

[附录C 推荐DNA条形码引物及PCR扩增条件 42](#_Toc101446916)

[附录D 遗传距离分析原理和方法 44](#_Toc101446917)

[附录E DNA条形码数据表格 48](#_Toc101446918)

[参考文献 49](#_Toc101446919)

# 1 项目背景

## 任务来源

本标准由南京大学提出，并由中国环境科学学会归口，2020年申请立项，被列入中国环境科学学会2020年第二批标准编制计划正式批准立项，由南京大学等单位起草。

## 工作过程

按照标准编写要求，项目承担单位组织相关科研人员组成了标准编制组。编制组成员及时查阅国内外相关文献资料，按照GB/T 1.1—2020给出的最新规定起草和编制。在前期项目研究、文献资料分析以及实际应用的基础上，编制组讨论并确定了开展标准编制工作的原则、程序、步骤和方法，目前形成标准征求意见稿及编制说明。主要工作如下：

1. 研究基础

2013年-2019年，编制组通过阅读文献和收集国内外相关资料，确定了构建我国本土水生生物DNA条形码的工作内容，并针对相关内容和关键参数开展了大量的科学研究工作，积累了大量的数据和实践经验，初步确定了水生生物DNA条形码构建方法的基本框架和流程。

1. 编制启动

编制组接到标准制定任务后，立刻组织落实标准制定工作。确定由来自高校、科研机构、企业的相关专家组成起草组，形成标准初稿。

1. 理论研究

2019年3月-2019年7月：为了按照文件要求，准确完成制定工作，标准起草组通过各种途径，收集并学习了《海洋调查规范 第6部分：海洋生物调查》（GB/T 12763.6）、《Sanger法测序技术指南》（GB/T 34265 ）和《核酸提取纯化方法评价通则》（GB/T 37874） 等相关国家标准和书籍，并进一步整理学习了《水质采样方案设计技术规定》（HJ 495）、《生物遗传资源采集技术规范》（HJ 628）、《生物多样性观测技术导则 内陆水域鱼类》（HJ 710.7）和《生物多样性观测技术导则 淡水底栖大型无脊椎动物》（HJ 710.8）等生态环境部发布的本领域相关标准，同时也深入学习了《林木DNA条形码构建技术规程》（LY/T 3191）、《国境口岸医学媒介昆虫DNA条形码鉴定操作规程》（SY/T 4278）和《海洋浮游微藻分离和筛选技术规程》（DB21/T 2777）等行业/地方标准，收集和研究了众多国内外水生生物DNA条形码构建的方法和实际案例。经过资料分析和共性总结，初步对水生生物DNA条形码构建方案进行梳理和提炼。理顺了标准制定的方向和思路，形成标准编制大纲。

1. 调研/实验研究

为了使标准具有科学性和可操作性，在2019年-2020年，标准起草组在已有的实验研究和资料分析的基础上，进一步联合多家编制单位将已构建的方法应用在我国重点流域的本土物种DNA条形码构建实践中，与相关技术和管理人员进行深入地探讨，调整已有方法。

1. 标准草稿

2020年2月-2020年6月：标准起草组召开起草工作研讨会，就标准起草过程中存在的问题进行集中研讨。标准起草组针对不同生物类群的采样方法和遗传特征，进一步完善水生生物DNA条形码建库的流程和关键参数，经过若干次课题组内部研讨会和专家咨询会，形成了标准草稿。

1. 标准立项

2020年6月：标准起草组向中国环境科学学会提交制修订立项申请书。

2020年10月：召开标准立项论证会，专家组一致同意标准通过立项论证。

2020年11月：经中国环境科学学会审议进行立项公示。

2020年12月：经中国环境科学学会审议进行正式立项。

（7）征求意见稿

2020年12月-2021年6月：标准起草组结合文献及专家建议完成标准初稿。

2021年7月，中国环境科学学会通过视频会议召开团体标准专家咨询会。与会专家听取了编制组的汇报，审阅了相关技术文件 ，经过质询讨论，形成如下意见：编制组在集成“十二五”和“十三五”国家水体污染控制与治理科技重大专项相关课题研究成果基础上，参考国内外相关研究文献编制了标准文本和编制说明，标准可为我国水生生物监测与水生态健康评价提供技术支撑。标准文本内容完整、技术路线可行。建议：① 《水生生物DNA条形码数据库构建规范》修改为《水生生生物DNA条形码构建技术规程》；② 根据 《中国环境科学学会标准管理办法》进一步完善和细化标准文本及编制说明。专家一致同意完善后公开征求意见。

2021年8月-2022年3月：标准起草组根据专家建议进一步修改完善。主要完善以下内容：（1）术语和定义的规范化和统一性；（2）标准内容的专业性和系统性；（3）文本的格式和规范性等。

2022年4月7日，中国环境科学学会牵头组织了关于团体标准的二轮专家咨询会，与会专家听取了编制组的汇报并对标准材料进行了审阅。专家认为编制单位提供的材料齐全，内容完整；编制单位对国内外相关标准及文献进行了充分调研；标准定位准确，技术路线合理可行，内容完善；三项标准可为我国水生生物监测与水生态健康评价提供技术支撑。专家组一致同意修改完善后公开征求意见。并建议：（1）进一步完善标准文本中的术语定义；（2）根据《中国环境科学学会标准管理办法》进一步完善用语规范，细化遗传距离计算等内容。

2022年4月，编制组根据专家建议，进一步对标准内容和格式进行完善。

# 2 标准制定的必要性

## 标准制定的意义和目的

水生态系统为人类社会的发展提供了多方面的生态服务功能，包括生物栖息地、水质净化、水文水量保持等。以淡水生态系统为例，尽管其仅占地球水量的0.01%，但为超过10%人类所认知的生物提供了栖息环境[1, 2]。特别是，地球上约40%的鱼类和超过30%的脊椎动物生活在淡水生态系统中[3, 4]。近年来，人类活动和气候变化对水生态系统造成破坏，导致水生生物多样性下降，水生态功能受损等。相比于山林、陆地、海洋等其他生态系统，淡水生态系统中生物多样性的下降尤为严重，已成为地球上退化最严重的生态系统[3-5]。因此，加强水生生物监测和水生态系统的管理关乎生态环境的可持续发展、符合生态文明建设的发展理念。

精准、高效的生物监测是生物多样性保护和水生态健康评估的基本保障。水生生物门类繁多，分布广泛且形态特征差异巨大，存在大量隐蔽种和未知种。我国水生生物资源非常丰富，常见的浮游植物2000余种[6]，浮游动物（桡足、枝角类和轮虫）600多种，常见的底栖动物超过900属，鱼类1600余种（Fishbase, https://www.fishbase.in/search.php）。此外，据科学估计，目前尚有90%以上的物种未被形态学分类描述。受传统形态学监测方法的局限，不同类群的鉴定往往需要借助不同的专家，且严重依赖于鉴定人的专业知识和经验。以底栖动物类群为例，物种繁多，形态多样且复杂，主要包括扁形动物（Platyhelminthes）、线形动物（Nematomorpha）、线虫动物（Nemata）、环节动物（Annelida）、软体动物（Mollusca）、节肢动物（Arthropoda）等诸多门类。由于部分类群的分类检索系统尚不完善，甚至不同来源的分类资料存在分歧，导致物种鉴定的准确率低。如在德国某河流/溪流开展的形态学方法底栖动物监测调查中，414个大型无脊椎动物样品中有29%的个体在挑选过程中被忽略，30%的物种存在专家鉴定差异，最终导致水生态评估结果存在分歧[7]。更不用说个体微小、门类更多的浮游藻类和浮游动物的分类鉴定。在一项对法国河流硅藻的生物监测研究中，采用形态学方法对同一条河流中相同位点取样分析，三个专家鉴定的硅藻种类的一致率不到1/3[8]。成年鱼类个体相对较大，分类鉴定相比藻类等小型生物难度略低，但鱼卵、幼鱼、小型鱼类及非常见种的鉴定需要分析人员的长期积累和经验支撑。因此，传统的监测方法不仅监测通量低，且难以精准鉴定物种，无法有效地监测野外生物多样性，并进一步开展生态健康评估。目前急需在传统形态分类学基础上，建立便捷准确的分子鉴定手段。

DNA条形码技术是利用生物共有的、但种间差异明显的遗传信息脱氧核糖核酸（DNA）序列来实现物种鉴定的技术，具有可标准化和可量化统计分析的特点[9, 10]。其中DNA片段要求长度较短、容易扩增、变异率适中且种间遗传距离明显大于种内遗传距离，以形成物种特异性的条形码。DNA条形码数据库用于存储大量物种/样本的DNA条形码信息，用于记载物种的遗传信息，并可用于在获得其它样本DNA序列后，进行序列比对，进而用于准确地鉴定物种，识别隐蔽种甚至新物种。DNA条形码及其数据库使物种鉴定过程实现信息化和标准化，突破了传统方法对鉴定者个人能力和经验的过度依赖，并可利用生物残留的组织或者遗留的DNA进行快速有效的鉴定。但是目前的DNA条形码技术在水生生物鉴定中多针对某单一类群，如水生昆虫、硅藻等，且现有的方法流程和重要参数均不统一，有待标准化和规范化。

本标准以构建水生生物DNA条形码为目标，规范水环境生物DNA条形码构建方法，有效记录本土水生生物的遗传特征，完善我国水生生物DNA条形码信息，为研究水生生物和水生态系统提供大量稳定的、准确的和可比较的数据，助力我国生物多样性保护和水生态健康评估与恢复。

## 国内外相关技术发展动态

自2000年以来，全球DNA条形码研究的相关论文超过8800篇，其中美国发表的论文数最多，其次为我国，发表论文数占全球总数的15%（图1）。目前最为常用的DNA条形码参考数据库为BOLD（Barcode of Life data）和NCBI中的GenBank，收集了自世界各地的各个类群DNA条形码，包含信息较为全面，但是其中存在大量的冗余甚至错误信息，导致采用该公共数据库进行物种注释的准确率偏低[11]。另外，也有研究团队构建了针对特定分类群的参考DNA条形码数据库，如针对双鞭毛藻的数据库DINOREF，硅藻的数据库R-Syst::diatom，鱼类数据库FISH-BOL目前全球有30多个国家参与构建DNA条形码数据库，多个国家开始构建本土物种DNA条形码。2010年，全球20个国家发起参与了“BARCODE 5000”计划，投资1.25亿美元，截止2015年，为500,000物种提供DNA条形码。2019年，iBOL生命条形码联盟开启BIOSCAN项目（https://ibol.org/programs/bioscan/），来自30多个国家1000多名研究人员参与，投资1.8亿美元，建立分析淡水、海洋和陆地生态系统近千万个样本覆盖2000,000个物种的DNA条形码，旨在加速物种发现，探索物种间的相互作用，以及跟踪物种动态。也有许多国家开始构建整理本土物种的DNA条形码数据库。例如奥地利条形码计划（ABOL）是一项旨在为奥地利记录的所有动植物物种DNA条形码的计划。总部位于维也纳自然历史博物馆的ABOL试验阶段和持续协调由国家教育和科学研究部提供资金。ABOL还旨在通过筹集资金，促进DNA条形码的各种应用，提高公众对生物多样性的意识来促进生物多样性研究。在芬兰FinBOL是一项国家级项目，旨在为芬兰境内所有动植物物种创建DNA条形码。自2011年以来，FinBOL一直由数个国家资助机构提供持续资助。目前，芬兰馆藏的超过100,000个标本已经过条形码处理，DNA条形码可用于芬兰报道的大约20,000种（约50％）。在不久的将来，FinBOL旨在通过采用高效的高通量测序工具从古老的博物馆标本中恢复古生物的序列信息，来扩大全国DNA条形码数据库。德国联邦教育和研究部正在资助一个自然历史博物馆和研究机构的联盟GBOL，以建立“德国生物条形码”倡议。其主要目的是建立一个由专业人员和非专业人员组成的网络，首先为德国动植物和真菌建立一个DNA条形码数据库。荷兰于2008年启动了植物和动物条形码组织计划，由荷兰博物学生物多样性中心牵头，与大量荷兰非政府组织和50多名业余博物学家合作。

|  |  |
| --- | --- |
| （A） | （B） |

图1 全球及我国DNA条形码研究现状

表1 各国DNA条形码数据库

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **地区** | **数据库** | **网站/参考文献** |
| 国际 | NCBI | https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ |
| 国际 | BOLD | https://v3.boldsystems.org/ |
| 国际 | Fish-base | https://www.fishbase.in/search.php |
| 奥地利 | ABOL | https://www.abol.ac.at/ |
| 芬兰 | FinBOL | https://en.finbol.org/ |
| 德国 | GBOL | https://bolgermany.de/home/en/german-barcode-of-life-2 |
| 挪威 | NorBOL | https://www.norbol.org/en/ |
| 瑞士 | SwissBOL | http://www.swissbol.ch/ |
| 葡萄牙 | LusoMarBoL | [12] |
| 荷兰 | NBOL | [12] |

我国在高等植物、鸟类等陆生动物类群开展DNA条形码研究较多，并将其成功应用在中草药和入侵物种的分子鉴定，目前已发布了行业标准《林业DNA条形码构建技术规程》（LY/T 3191）和《国境口岸医学媒介昆虫DNA条形码鉴定操作规程》（SN/T 4278），并发表《中国药典中药材DNA条形码标准序列》和《中国药用动物DNA条形码研究》等书籍。2014年，科技部通过科技基础性工作专项部署了“我国近海海洋生物DNA条形码资源库构建”重点项目，由中国科学院海洋研究所承担。该项目提出“对有代表性的重要海洋生物类群：如原核生物、植物、浮游动物、大型底栖无脊椎动物及鱼类，在准确形态鉴定的基础上，系统并规模化获取DNA条形码序列”，预计5年内搭建起一个涵盖2000个物种的15000条标准数据的基础DNA条形码数据库。

目前针对我国淡水生态系统水生生物的本地物种条形码数据库仍非常不完善。由于同一物种的不同亚种或不同生态型在分类学上属于同一个物种，但是其基因型、条形码信息均存在或多或少的差异。经调查：我国常见蓝藻有419种，32.20%的物种在NCBI GenBank中具有DNA条形码，只有8.12%的物种具有充足的DNA条形码序列（≥5）和7.16%的物种有来自中国的DNA条形码序列。常见淡水真核浮游植物1664种，只有14.90%在NCBI公共数据库具有DNA条形码序列和7.21%的物种有来自中国的DNA条形码序列。常见淡水浮游动物626种，30.36%的物种在数据库中有≥1条序列，17.33%具有≥5条序列， 15.64%的物种有来自中国的DNA条形码序列。常见淡水昆虫有2256种，只有26.81%在NCBI公共数据库具有DNA条形码序列和12.35%的物种有来自中国的DNA条形码序列。常见淡水鱼类1201种，57.20 %在NCBI公共数据库具有COI DNA条形码序列和32.73%的物种有来自中国的DNA条形码序列，相比其他类群略高（表 2）。以上结果充分说明，我国本土物种DNA条形码数据缺乏，尤其缺乏来自中国本土样本的DNA条形码序列。这导致采用环境DNA宏条形码技术监测水生生物多样性时，将序列比对到公共数据库，将导致大量本土物种无法被正确注释。因此迫切需要在国内继续全面构建淡水水生生物的DNA条形码。

表2 我国本土水生生物DNA条形码覆盖现状

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 物种类群 | 条形码 | 物种数目 | 覆盖率%  （≥1） | 覆盖率  （≥5） | 来自中国的  物种占比 | 物种名录来源 | 条形码数据来源 |
| 蓝藻 | 16S rDNA | 419 | 32.20 | 8.12 | 7.16 | [1] | NCBI  Genbank |
| 真核藻类 | 18S rDNA | 1664 | 14.90 | 1.56 | 7.21 | [1] |
| 浮游动物 | Mt COI | 652 | 30.36 | 17.33 | 15.64 | [2-4] |
| 水生昆虫 | Mt COI | 2256 | 26.81 | 12.14 | 12.35 | [5] |
| 软体动物 | Mt COI | 505 | 51.09 | 28.71 | 43.26 | [5] |
| 鱼类 | Mt COI | 1201 | 57.20 | 34.39 | 32.73 | [6] |

## 相关国际标准或国外先进标准情况

目前国际及国内没有发表的水生生物DNA条形码数据库构建标准。但是存在少数相关标准。如国际标准《Soil quality — Identification of ecotoxicological test species by DNA barcoding》（ISO 21286:2019），该标准基于DNA条形码识别土壤生态毒理测试物种，未涉及到水生生物。另外欧盟已公布的DNA条形码相关标准有3个，正在起草的相关标准有2个，分别为：

（1）《Water quality - Technical report for the management of diatom barcodes》（CEN/TR 17244:2018），水质-硅藻DNA条形码管理技术报告，主要用于验证生态评估的硅藻条形码所需的数据，并对DNA条形码数据的存储提供建议，以确保对该信息的访问。

（2）《Algae and algae products - Identification of the biomass of microalgae, macroalgae, cyanobacteria and Labyrinthulomycetes - Detection and identification with morphological and/or molecular methods》（EN 17477:2021），结合形态学和分子方法检测和识别微型藻、大型藻、蓝藻和网粘菌纲物种。

（3）《Foodstuffs - DNA barcoding of fish and fish products using defined mitochondrial cytochrome b and cytochrome c oxidase I gene segments》（CEN/TS 17303:2019），食品-采用线粒体细胞色素b和细胞色素c氧化酶I对鱼类和鱼类相关产品进行基于DNA条形码的物种鉴定。

（4）《Food authenticity — DNA barcoding of meat and meat products derived from mammalia and poultry using defined mitochondrial cytochrome b and cytochrome c oxidase I gene segments》（起草中）。食品鉴定-使用线粒体细胞色素b和细胞色素c氧化酶I基因片段对哺乳动物和家禽的肉类和肉制品进行基于DNA条形码的物种鉴定

（5）《Food authenticity — DNA barcoding of bivalves and products derived from bivalves using a defined mitochondrial 16S rRNA gene segment》（起草中）。食品鉴定-用线粒体16S rRNA基因片段对双壳类及其产品进行基于DNA条形码的物种鉴定。

这些标准针对某个/些特定类群，采用DNA条形码进行物种鉴定。其中（3）、（4）、（5）主要用于鱼类、哺乳家禽类和双壳类等特定食物来源的真伪鉴定，（1）和（2）用于基于DNA条形码的藻类鉴定。但是目前国际上并没有针对所有水生生物类群的DNA条形码构建的标准。

## 与国内相关法律法规和标准的协调关系

目前国内关于DNA条形码数据具有两个行业标准，分别为行业标准《林业DNA条形码构建技术规程》（LY/T 3191）和《国境口岸医学媒介昆虫DNA条形码鉴定操作规程》（SN/T 4278）。但是在水生生物DNA条形码方面，目前尚无已发布的国际标准或国家标准、地方标准、行业标准或团体标准。

## 现有工作基础

目前，编制组开展了大量构建我国重点流域的本土物种DNA条形码数据库的相关工作，积累了大量的野外调查和DNA条形码快速建库的工作经验，对于标准的合理可操作性提供了很好的保障。同时，整理收集了国外水生生物DNA条形码数据库构建成功的经验案例，也为标准的编制提供了很好基础支撑。

# 3 标准编制依据和原则

## 编制目的

规范水生生物DNA条形码建库工作，促进DNA条形码技术在我国水生生物鉴定体系中的应用推广，有助于全国水生生物DNA条形码数据库的构建，精准记录我国本土物种的基因、种群和群落特征，支撑未来生物多样性保护和生态修复管理工作。

## 编制原则

本标准按照《中国环境科学学会标准管理办法（试行）》的要求和规定，确定标准的组成要素。

在标准制定过程中遵循了以下几个原则：

（1）科学性和规范性；

（2）保证标准的先进性和实用性；

（3）与相关的标准、法规接轨；

（4）充分考虑我国水生生物群落特征和分布，结合现有DNA条形码技术的发展水平，符合我国水生生物监测行业规范化发展需求。

# 4 规范主要技术内容和适用范围

## 标准适用范围

本文件规定了水生生物DNA条形码构建方法及质量控制和安全管理要求。

本文件适用于淡水生态系统中的浮游植物、浮游动物、水生维管植物、大型底栖无脊椎动物和鱼类等生物类群的DNA条形码构建；其他生态系统生物DNA条形码构建可参照执行。

## 总体框架和主要内容

本标准规定了水生生物DNA条形码数据库的相关术语、构建方法及质量控制等。

（1）范围

（2）规范性引用文件

（3）术语和定义

（4）试剂器材

（5）DNA条形码构建方法

（6）质量控制和安全管理

## 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

GB/T 30989 高通量基因测序技术规程

GB/T 34265 Sanger法测序技术指南

GB/T 35537 高通量基因测序结果评价要求

GB/T 37874 核酸提取纯化方法评价通则

HJ 710.7 生物多样性观测技术导则 内陆水域鱼类

HJ 710.8 生物多样性观测技术导则 淡水底栖大型无脊椎动物

HJ 710.12 生物多样性观测技术导则 水生维管植物

HJ 1216 水质 浮游植物的测定 0.1 ml计数框-显微镜计数法

SC/T 9402 淡水浮游生物调查技术规范

LY/T 3191 林木DNA条形码构建技术规程

SN/T 4278 国境口岸医学媒介昆虫DNA条形码鉴定操作规程

SN/T 4835 实验室生物废弃物管理要求

DB 21/T 2777 海洋浮游微藻分离和筛选技术规程

## 术语和定义

（1）水生生物 hydrobios

全部或部分生活在各种水域中的生物。主要的淡水生物类群包括浮游植物、浮游动物、水生维管植物、大型底栖无脊椎动物和鱼类等。

2007年科学出版处出版的图书《生态学名词》中对“水生生物”的定义为“全部或部分生活在各种水域中的动物和植物。包括淡水生物和海洋生物”。本文件主要适用于淡水水生生物。

（2）引物 primer

在DNA复制过程中，结合于模板链上并作为复制延伸的起始位点和/或终止位点的，具有一定长度和顺序的寡核苷酸链。

[来源：GB/T 34265—2017，3.4]

（3）聚合酶链式反应 Polymerase Chain Reaction (PCR)

一种体外酶促合成特异DNA片段的分子技术，由高温变性、低温退火及适温延伸等几步反应组成一个周期，循环进行，使目的DNA得以迅速扩增，具有特异性强、灵敏度高、操作简便省时等特点。

[来源：LY/T 3191—2020，3.3，有修改]

（4）Sanger测序 sanger sequencing

用于基因测序的双脱氧链末端终止法，在链延伸过程中利用荧光标记双脱氧碱基随机阻断，产生以A、T、C、G结束的四组不同长度的核苷酸链，通过读取荧光信号实现对核酸碱基序列信息的读取

[来源：GB/T34265—2017，3.2，有修改]

（5）高通量测序 high-throughput sequencing

这里指第二代测序技术。区别于传统Sanger测序，二代测序技术是指能够一次并行对大量核酸分子进行平行序列测定的技术。

[来源：GB/T 30989—2014，3.19，有修改]

（6）DNA 条形码 DNA barcode

生物体细胞核或者细胞器中一段公认的能够代表该物种的标准的、有足够变异的、易扩增的短DNA序列，可用于实现生物的识别和鉴定。

[来源：LY/T 3191—2020，3.6，有修改]

（7）遗传距离 genetic distance

通过遗传标记如DNA条形码对种群或分类单元间遗传相似性和进化关系的测度。

2007年科学出版处出版的图书《生态学名词》中对“遗传距离”的定义为“通过遗传标记对种群或分类单元间遗传相似性和进化关系的测度”。2006年出版的《遗传学名词》（第二版）中定义为“一种用来估算两个个体或群体之间基因差异的度量”。2020年公布的《畜牧学名词》中定义为“一种用来度量群体间遗传差异的指标”。杨倩倩等[13]定义遗传距离分析法是基于生物体亲缘关系远近，计算DNA 条形码序列的遗传距离，进而实现物种鉴定的方法。在一定的范围内，物种间亲缘关系越近，遗传距离越小；反之，亲缘关系越远，遗传距离越大。本文件中主要通过DNA条形码的序列差异来计算不同样本之间的遗传距离。

（8）16S核糖体DNA 16S ribosomal DNA(16S rDNA)

原核生物编码核糖体小亚基16SrRNA的DNA序列。

（9）18S核糖体DNA 18S ribosomal DNA (18S rDNA)

真核生物编码核糖体小亚基18SrRNA的DNA序列。

（10）线粒体12S 核糖体DNA mitochondrial 12S ribosomal DNA (Mt 12S rDNA)

后生动物线粒体基因组上12S rRNA对应的DNA序列。

（11）线粒体细胞色素c氧化酶I mitochondrial cytochrome c oxidase I(COI)

后生动物线粒体基因组上的线粒体细胞色素c氧化酶I对应的DNA序列。

（12）凭证标本 voucher specimen

获取DNA条形码等分子数据的来源标本。可以是标本的一部分组织，也可以是同一批同种标本中的一个个体，但必须与本标本的DNA条形码数据等分子凭证是一一对应的关系。凭证标本必须有唯一性的标本编号和存放信息，便于日后查证。

## 试剂器材

### 试剂和材料

（1）标准采样瓶

（2）1.5mL离心管：无DNA和生物残留

（3）组织基因组DNA提取试剂或试剂盒

（4）PCR扩增试剂

（5）PCR扩增引物

（6）凝胶回收试剂盒

（7）DNA浓度测定试剂

（8）凝胶电泳相关试剂

（9）分子量标准品（最小片段≥50 bp）

（10）测序平台相关试剂和材料

（11）无菌双蒸水

（12）通用无菌手套

（13）培养基

### 仪器与设备

（1）冰箱：温度调节范围为-20℃~4℃。

（2）竖式采水器

（3）底栖动物捕捉及清洗装置

（4）浮游生物网

（5）PCR仪

（6）凝胶成像仪

（7）电泳仪

（8）离心机

（9）组织研磨器

（10）涡旋混匀仪

（11）测序仪

（12）天平：分度值0.1 mg

（13）微量移液器：0.5 µL~10 µL，10 µL~100 µL，20 µL~200 µL，100 µL~1000 µL

## DNA条形码构建方法

水生生物DNA条形码构建流程主要包括：物种鉴定、条形码扩增与测序、条形码评估和物种条形码入库等过程（图2）。

|  |
| --- |
|  |

图2水生生物DNA条形码数据库构建基本流程

### 物种鉴定

浮游植物的定性样品采集、保存与鉴定按照HJ1216的规定执行，浮游植物的分离培养按照DB21/T 2777的规定执行。常用的培养基见附录B。

浮游动物的定性样品采集与鉴定按照SC/T 9402的规定执行，加乙醇溶液固定（乙醇浓度≥90%），常温保存。水生维管植物的定性样品采集与鉴定按照HJ 710.12的规定执行，野外干冰或-20℃保存，实验室-20℃保存。大型底栖无脊椎动物的定性样品采集与鉴定按照HJ 710.8的规定执行，加乙醇溶液固定（乙醇浓度≥90%），常温保存。

鱼类样品采集与鉴定按照HJ 710.7的规定执行，野外干冰或-20℃保存，实验室-20℃保存。

形态学鉴定建议由具有丰富鉴定经验的专业人员完成，并保留凭证标本。

参考附录A详实记录样品采集信息，形态学鉴定建议由具有丰富鉴定经验的分类学家完成，鉴定完成后保留凭证标本。

关于浮游植物的定性样本采集、保存与鉴定，生态环境部发布的《水质 浮游植物的测定 0.1 ml 计数框-显微镜计数法》（HJ1216）中规定使用25号浮游生物网采集定性样品，采集后立即加入鲁哥氏液，在室温避光保存。关于浮游动物的定性样本采集，农业部发布的《淡水浮游生物调查技术规范》(SCT9402-2010)中规定，枝角类和桡足类等大型浮游动物的定性样品应用13号浮游动物网采集。立即加入体积分数为40%的甲醛溶液，用量为水样体积的4%。原生动物和轮虫定性样品则用25号浮游生物网收集，用鲁哥氏液固定，用量为水样体积的1.0%~1.5%，若需长时间保存，则加入40%的甲醛溶液。

### 条形码扩增与测序

#### 4.6.2.1 DNA提取和浓度及纯度测定

**（1）DNA 提取**

选取完整个体或合适部位的组织提取DNA，避免外源污染。植物和动物组织DNA的提取分别参考LY/T 3191和 SN/T 4278。

根据《高通量基因测序样本预处理方法 第1部分：动物组织样本预处理》（GB/T 33681.1）中对于核酸提取的定义，核酸提取是用物理、化学或生物酶的方法，释放动物组织样本中的核酸并对它进行纯化，充分去除动物组织样本中的蛋白质、脂类等PCR抑制剂以及提取核酸时加入的试剂，保证核酸的质量和浓度的稳定，以能满足下游实验要求。

目前DNA提取方法有酚氯仿提取法、浓盐法、水抽提法、阴离子去污剂法（CTAB法）、离心柱法和磁珠法等。在行业标准《林木DNA条形码构建技术规程》（LY/T 3191）中推荐的植物DNA提取方法主要包括CTAB法和试剂盒法。行业标准《国境口岸医学媒介昆虫DNA条形码鉴定操作规程》（SN/T 4278）中采用的动物DNA提取方法为酚氯仿法或试剂盒DNA提取方法。现在试剂盒的DNA提取方法主要为离心柱法和磁珠法。

**（2）DNA浓度及纯度测定**

按GB/T 37874的规定评价提取的DNA浓度和纯度，一般要求浓度不低于1 ng/μL，在260 nm和280 nm波长处的吸光度值比值（OD260 nm/OD280 nm）应在1.7~1.9范围内。有效的DNA样品分装为两份，一份在-80 ℃长期保存，另一份保存在-20 ℃ 用于后续实验，避免反复冻融。

根据国家标准《核酸提取纯化方法评价通则》（GB/T 37874），若OD260nm/OD280nm值低于1.7，说明提取的DNA中有蛋白质、多酚等杂质污染；若OD260nm/OD280nm值高于1.9，说明提取的DNA可能有RNA污染。若OD260nm/OD230nm值小于2.0，表明有残存的盐或其他分子杂质。

**（3）DNA保存**

所有提取出的DNA，经过浓度和质量检测之后，一部分保存在-20℃冰箱中用于后续实验，一部分放置在-80℃冰箱用于长期保存备用。

#### 4.6.2.2 条形码扩增与检测

**（1）条形码扩增**

针对不同生物类群选择引物扩增目标DNA条形码序列，常用PCR扩增引物和扩增反应条件见附录C。

根据国家林业行业标准 《林木DNA条形码构建技术规程》（LY/T 3191—2020）和已有的文献汇总，核心DNA条形码片段选取需要考虑多方面因素：① 进化速率。进化速率较慢的片段可以锚定目标物种到科/属的较高分类等级，进化速率较快的片段则可将近缘类群进行识别和分辨。②分辨能力。种间有明显的遗传变异，而种内变异足够小（图3）；片段所含的变异位点多则分辨力高，进化速率较快的片段比进化速率较慢的片段有更高分辨力。③片段长度。足够短，减少测序工作，且便于DNA提取和PCR扩增，尤其是对存在DNA降解的材料(如：保存已久的腊叶标本、处理过的民间药材)；降低测序费用；不同物种间序列长度变异尽可能小。④片段通用性。存在保守区域，便于设计通用引物。也可以从已发表的基因组、转录组数据中筛选合适的DNA片段作为特定物种的条形码。⑤目标DNA片段还需要在公共数据库中具有足够的序列信息，以便在获得DNA序列后，进行序列比对和人工矫正。

|  |
| --- |
|  |

图3 DNA条形码片段示意图（引自 Bucklin et al. 2011, Annu. Rev. Mar. Sci.）[14]

蓝色代表种内差异，橙色代表种间差异。A. 种间差异明显大于种内差异，可作为候选DNA条形码片段。B. 种内和种间遗传距离存在交叉，不符合DNA条形码要求。

生物体的DNA存在与细胞核和部分细胞器/细胞质中。核基因组是生物个体中主要的DNA储存仓，而细胞器基因组包括线粒体基因组（Mt DNA）和质体基因组，后者包括叶绿体基因组（Cp DNA）。它们都位于细胞核外。细胞器DNA通常以超螺旋环状双链DNA的形式存在，它们比核基因组小的多，但数量可观（人类细胞一般包含1000~10000个线粒体）。因此在环境中细胞器基因组比核基因组更易获得。动物线粒体基因组基因排列较为保守，易于操作，突变率较高但一般不会发生重组，因此是理想的DNA条形码候选区。但植物线粒体的容易发生基因重排和重复，且核苷酸替换上进化缓慢，不是优选的植物条形码区域。植物叶绿体基因组大部分结构是稳定的，且替换率比植物线粒体基因组高的多（高等植物中高接近3倍），可以作为植物的DNA条形码区域。选择DNA条形码需要综合考虑不同条形码区域对目标类群的覆盖度和区分度。

目前浮游植物常用的DNA条形码序列包括核基因的16S rDNA（蓝藻门），18S rDNA（真核藻类）、28S rDNA（真核藻类）、ITS（转录间隔区，Internal transcribed spacer）、叶绿体rbcL（Rubisco大亚基，Ribulose-1，5-biphosphate carboxylase）和matK（成熟酶k，Maturase K）等（表3）[15, 16]。其中18S rDNA基因具有更高的物种覆盖率及较为完善的条形码数据库，已被广泛应用于监测海洋和淡水真核藻类的组成结构[17]。16SrDNA基因是蓝藻门等微生物中最为常用的DNA条形码。

表3 常用的浮游植物DNA条形码比较[15]

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **条形码** | **基因组** | **优点** | **缺点** |
| 18S rDNA | 核基因组 | 进化速率适中，易扩增，最常用，数据库全 | 种水平区分能力一般，只适用于真核藻类 |
| 16S rDNA | 核基因组 | 进化速率适中，易扩增，最常用，数据库全 | 种水平区分能力一般，只适用于蓝藻门 |
| ITS | 核基因组 | 分辨水平高，片段短，易于扩增和测序 | 长度变异大 |
| RbcL | 叶绿体基因组 | 容易扩增，鉴别到科属水平能力高 | 进化缓慢；种水平区分能力一般，全序列测序需要四对引物 |
| matK | 叶绿体基因组 | 进化速率快，长度适中，种间差异明显，转化速率低 | 现有的引物很难实现普遍扩增，不同类群鉴别时所选用的引物对也不尽相同 |

表4 常用的浮游植物DNA条形码信息

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **靶向类群** | **基因名称** | **引物名称** | **引物序列（5’ - 3’）** | **长度**  **（bp）** | **参考**  **文献** |
| 蓝藻门 | 16S rDNA | 16S-27F | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG | 1400-1600 | [18] |
| 16S-1492R | RGMAACCTTGTACGACTT |
| 16S\_V3\_V4 | 16S-338F | ACTCCTACGGGAGGCAGCAG | 400-500 | [19] |
| 16S-806 | GGACTACHVGGGTWTCTAAT |
| 16S\_V3 | 16S\_341F | ACCTACGGGRSGCWGCAG | 100-200 | [20] |
| 16S\_518R | ATTACCGCGGCTGCTGG |
| 16S\_V4 | 16S\_515F | GTGCCAGCMGCCGCGGTAA | ~300 | [21] |
| 16S\_806R | GGACTACHVGGGTWTCTAAT |
| 真核藻类 | 18S rDNA | 18S-7F | ACCTGGTTGATCCTGCCAG | 1500-2000 | [22] |
| 18S-1534R | TGATCCTTCYGC AGGTTCAC |
| 18S\_V9 | 18S\_1389F | TCCCTGCCHTTTGTACACAC | 100-200 | [23] |
| 18S\_1510R | CCTTCYGCAGGTTCACCTAC |
| 18S\_V4 | TAReuk454FWD1 | CCAGCA(G/C)C(C/T)GCGGTAATTCC | 300-400 | [24] |
| TAReukREV3 | ACTTTCGTTCTTGAT(C/T)(A/G)A |

水生维管植物DNA条形码包括18S rDNA，trnL（转运RNAL基因），ITS，COI，叶绿体rbcL和matK，其中rbcL和matK最为常用，公共数据库中rbcL的DNA条形码序列和覆盖的物种数目更多。在环境DNA宏条形码监测水生植物应用中，有研究采用18S-V7条形码在海洋中识别出48种大型藻类、海草和红树林[25]。Stephanie等（2019年）[26]设计了matK、rbcL和ITS2 三对引物扩增已知的混合水生植物，发现rbcL可以识别出所有的水生植物，并注释到属/种水平。Alejandra等（2020年）[27]针对rbcL、matK、trnL、ITS2、COI和18S设计了18对引物扩增海洋水生维管植物，结果显示基于18S设计的mini条形码具有最高的通用性，扩增出95-100%的样本。因此本标准推荐采用rbcL和18S扩增大型水生维管植物（表5）。

表5 常用的水生维管植物DNA条形码信息

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **基因名称** | **引物名称** | **引物序列（5’ - 3’）** | **长度**  **（bp）** | **参考文献** |
| RbcL | orbcLa-F | ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGCAAGTG | 100-500 | [26] |
| orbcLa-R | TCATCYTTGGTAAAATCAAGTCCACCRCG |
| ITS | oITS2-F | GCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGC | 100-500 | [26] |
| oITS2-R | CCTTGTAAGTTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGC |
| 18S \_V7 | Euka02\_V7\_F | TTTGTCTGSTTAATTSCG | 100-150 | [28] |
| Euka02\_V7\_R | ACAGACCTGTTATTGC |
| 18S\_V9 | 18S2\_V9\_F | CCAGCASCYGCGGTAATTCC | 100-150 | [27] |
|  | 18S2\_V9\_R | CCTTCYGCAGGTTCACCTA |
| RbcL | orbcL2\_F | YGATGGACTTACNAGTCTTGATCGTTACAAAGG | 100-500 | [26] |
| orbcL2\_R | GNCCATAYTTRTTCAATTTATCTCTTTCAACTTGGATNCC |

目前使用的浮游动物DNA条形码序列包括核基因的18S rDNA和28S rDNA，线粒体的12S rDNA，16S rDNA，CytB（细胞色素b，Cytochrome b）和COI等。其中18S rDNA，线粒体COI区域及16S rDNA是最常用的分析浮游动物的标记基因（表6），有研究者比较了这三对标志基因在浮游动物宏条形码研究中的差别，发现其所用的COI658及在这段序列中间设计的另外三对COI引物都无法获得高质量的PCR产物，并发现相比线粒体16S rDNA标记基因，18S rDNA（V4）扩增获得的序列可以注释到更多的物种，因此建议在需要更高的物种覆盖度时使用18S rDNA（V4）进行条形码研究[29]。近年来，有研究者设计了一个更加适合高通量测序的通用COI引物(表6 COI-2)，扩增的DNA条形码片段约313bp，用于鱼类肠道浮游动物多样性的评估[30]。编制组选择了COI313, 核基因组18Sr DNA(V9)及设计的线粒体16S rDNA（表6 Mt 16S rDNA-2）引物识别浮游动物多样性，结果发现COI和线粒体16S引物所检测到的物种数量和种类比较接近，其中有64个物种能够同时被这2对引物检出，有28个物种仅仅能被COI引物检出，有10个物种仅能被16S引物检出。而V9引物获得的序列大部分都无法注释到物种水平，导致其结果跟COI313和16S差别较大，仅有5个物种能够同时被3个引物检测到，该研究说明COI313标志基因更适合用于水体中浮游动物DNA宏条形码研究[31]。综合考虑，线粒体COI和核基因组的18S rDNA更适合作为浮游动物DNA条形码。

表6 浮游动物相关标记基因信息

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **DNA条形码** | | **序列(5′–3′)** | **长度(bp)** | **参考文献** |
| **线**  **粒**  **体** | Mt 16S rDNA-1 | TRACYGTGCDAAGGTAGC | 300-400 | [29] |
| YTRRTYCAACATCGAGGTC |
| Mt 16S rDNA-2 | GACTGTGCTAAGGTAGCATAAT | 100-200 | [31] |
| TAATCCAACATCGAGGTCRCA |
| COI-1 | GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG | ~658 | [32] |
| TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA |
| COI-2 | GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC | ~313 | [33] |
| TAAACTTCAGGGTGACCAAARAAYCA |
| **细**  **胞**  **核** | 18S rDNA（V4） | AGGGCAAKYCTGGTGCCAGC | 400-600 | [34] |
| GRCGGTATCTRATCGYCTT |
| 18S rDNA（V9） | TCCCTGCCHTTTGTACACAC | 150bp | [23] |
| CCTTCYGCAGGTTCACCTAC |

用于大型无脊椎底栖动物鉴定的DNA条形码大多为线粒体COI区域，但是不同研究选用的COI片段和引物序列略有差异（表7）。最为常用的长DNA条形码码片段为LCO1490/HCO2198，短的DNA条形码为mlCOIintF/jgHCO2198。

表7 底栖动物相关DNA条形码信息

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **引物** | | **序列(5′–3′)** | **长度(bp)** | **参考文献** |
| **线**  **粒**  **体** | mlCOIintF/jgHCO2198 | GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC | ~ 313 | [35] |
| TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA |
| mlCOIintF/dgHCO2198 | GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC | ~ 313 | [30] |
| TAAACTTCAGGGTGACCAAARAAYCA |
| BF2/BR2 | GCHCCHGAYATRGCHTTYCC | 421 | [36] |
| TCDGGRTGNCCRAARAAYCA |
| BF1/BR2 | ACWGGWTGRACWGTNTAYCC | 316 | [36] |
| TCDGGRTGNCCRAARAAYCA |
| LCO1490/HCO2198 | GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG | 658 | [32] |
| TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA |

对于鱼类，食品鉴定中，通常利用线粒体基因组上的细胞色素b（CytB）和细胞色素C氧化酶亚基I（COI）扩增鱼类DNA条形码，用于物种鉴定，辨别鱼类真假。作为动物界DNA条形码研究的标准基因，长片段的COI（>600 bp）也常在生态学研究中，用于构建鱼类DNA条形码数据库。如Yanjun Shen等成功扩增了长江1424个样本覆盖123个物种的DNA条形码[37]。但是在环境DNA宏条形码监测中，引物扩增的DNA片段必须足够短（一般<400bp），以扩增降解的样品及满足二代测序要求，同时DNA条形码要保障在物种内部相同但在物种之间有可变性，并且侧翼是高度保守的区域，以扩增各种物种而不减少目标群体的特异性。基于长片段COI设计的引物扩增环境DNA中的鱼类DNA条形码成功率偏低，因此基于COI条形码构建的DNA条形码数据库很难应用于环境DNA宏条形码技术的物种识别。目前，线粒体的其他区域如12S rDNA和16S rDNA基因已被广泛用于基于环境DNA的鱼类鉴定。有研究比较了22对引物对硬骨鱼进行宏条形码分析，结果显示线粒体12S rDNA和16S rDNA检出更高的鱼类多样性，其中12S rDNA率高于16S rDNA，CytB检出的鱼类物种数目最少 [38]。本编制组根据长江中下游种常见鱼类线粒体保守区设计了覆盖线粒体12S rDNA和16SrDNA区域的DNA条形码，并成功用于构建太湖流域35种鱼类的DNA条形码建库，结果证明基于该DNA条形码获得的种间遗传距离明显高于种内，可以有效地进行物种鉴别[39]。

表8 鱼类常用DNA条形码信息

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **基因** | **引物** | **序列(5′–3′)** | **长度（bp）** | **参考文献** |
| Mt 16S-12S rDNA | MetafishF1 | TCGTGCCAGCCACCGCGGTTA | ~ 2000 | **[39]** |
| MetafishR6 | ATAGTGGGGTATCTAATCCCAG |
| COI  2对引物结合 | FishF1 | TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC | 630-660 | **[40]** |
| FishF2 | TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC |
| FishR1 | TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA |
| FishR2 | ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA |
| Mt 12S rDNA-1 | MetafishF1 | TCGTGCCAGCCACCGCGGTTA | 150-200 | **[39]** |
| MetafishR1 | ATAGTGGGGTATCTAATCCCAG |
| Mt 12S rDNA-2 | Tele02\_F\_ | AAACTCGTGCCAGCCACC | 150-200 | **[41]** |
| Tele02\_R\_ | GGGTATCTAATCCCAGTTTG |

**（2）条形码片段检测**

PCR通过1%~2%琼脂糖凝胶电泳检测，判断PCR反应是否存在非特异性扩增，及扩增过程中产生的引物二聚体信息。电泳后，PCR产物应在相应的DNA条形码序列长度位置出现一条单一的目的条带，阴性对照无条带。若样品出现多个条带，需纯化PCR产物，具体过程按照SN/T 4278。

行业标准《国境口岸医学媒介昆虫DNA条形码鉴定操作规程》（SN/T 4278）中规定条形码片段检测主要包括制胶，点样和电泳检测等过程。若样品出现多个条带，需纯化PCR产物，也可按照SN/T 4278中7.5的规定执行，即选用胶孔大的梳子，重新制胶、点样、电泳，将所需的目的条带进行切胶回收纯化，需要时也可委托测序公司进行纯化。

#### 4.6.2.3 测序

对目标条带进行Sanger测序，应满足GB/T 34265的规定。为减少Sanger测序出现双峰或者测序失败，可先将PCR产物克隆到质粒中再进行测序。针对大批量实验样品或Sanger测序失败的样品，可按照GB/T 35537的规定进行高通量测序，为每个样本提供不少于100条高质量序列。

Sanger测序方法又称为一代测序，根据国家标准《Sanger法技术指南》（GB/T 34265），Sanger测序指用于基因测序的双脱氧末端终止法，在链延伸过程中利用荧光标记双脱氧碱基随机阻断，产生以A/T/G/C结束的四组不同长度的核苷酸链，通过读取荧光信号实现对核酸碱基序列信息的读取。该方法具有测序读长长，准确率高等特点，但是对生物样本的DNA浓度和纯度要求很高，在处理小型生物如浮游动植物时，测序成功率偏低。另外Sanger测序的通量低，平均1个样本的DNA条形码获取需要花费大量时间和成本。如《Sanger法技术指南》（GB/T 34265）中明确规定用于测序的PCR产物应≥200bp，若片段<150bp，则需进行克隆后再测序。测序引物应在17 bp~25bp，且Tm值应在55℃~65℃之间。针对PCR产物的模板用量也有明确需求，如对于200bp~500bp的PCR产物，用量应在3ng~10ng等。Sanger测序方法已被应用于物种的DNA条形码构建，并形成规范和标准，如行业标准《林木DNA条形码构建技术规程》（LY/T 3191）、《国境口岸医学媒介昆虫DNA条形码鉴定操作规程》（SN/T 4278）和《中药材DNA条形码分子鉴定指导原则》等。

高通量测序技术也被称作二代测序技术（Next Generation Sequencing, NGS），这是相对一代测序技术（Sanger 测序）而言的，根据标准《高通量基因测序技术规程》（GB/T 30989），高通量测序能一次平行对大量核酸分子进行序列测定，同时由于高通量测序的出现使得我们对一个物种的基因组和转录组进行全面、细致的分析成为可能，所以又被称为深度测序(deep sequencing)。与一代测序Sanger法相比，高通量测序技术在处理大规模样品时具有显著的优势，在测序速度及测序通量上具有无可取代的地位，但是也存在测序读长短等特征。高通量测序技术的出现在一定程度上弥补了传统基于形态学物种鉴定的一些缺陷。

本编制组以浮游动物为例，开发了基于高通量测序技术的水生生物DNA条形码数据库构建方法 [42]。该方法利用单个体裂解法提取单个样本的DNA，采用特殊的MIT引物进行PCR扩增，PCR扩增产物纯化及定量后可直接进行高通量测序和序列分析，需要的DNA量低，不需要额外的构建测序文库和构建测序载体。后期通过将不同样本的序列分别进行多重序列比对，根据多重序列比对结果，依据遗传距离以0.05为阈值进行序列分组，并去除序列少于5的分组，选取每组中最长的序列作为本组的代表序列并进行BLAST注释，参考物种的分类鉴定信息，选取样品所测序列的注释信息和分类鉴定信息最接近的序列组作为本样品的条形码序列（图4）。研究结果证明高通量测序方法能够对单个样本进行深度测序，为每个样本提供大量平行序列，识别污染序列，精确识别靶向物种序列，显著提高水生生物尤其小型生物的DNA条形码构建效率，同时降低成本。如杨江华等在太湖流域共分拣出1302个浮游动物个体，分属于92个物种分类单元。其中有1041个样本被成功测序，属于87个形态学分类单元，建库成功率达到79.95%。

|  |
| --- |
| 图片5  图4 利用高通量测序构建浮游动物条形码数据库的技术流程 |

### 条形码评估

**（1）序列质控**

将Sanger测序的双端测序文件进行拼接，按照GB/T 34265的规定去除测序结果两端的低质量序列。高通量测序应保留数量最多的序列。测序序列应去除扩增引物，并保证序列方向与PCR扩增正向引物方向一致。根据国家标准《Sanger法技术指南》（GB/T 34265）获得的序列QV值建议达到QV20，即序列准确率达到99%。根据国家标准《高通量基因测序结果评价要求》（GB/T 35537），连接酶法和聚合酶法的建库及测序准确率也均应达到99%。参考LY/T 3191采用DNAStar的SeqMan等软件对双向序列进行校准和拼接。

**（2）遗传距离分析**

基于DNA条形码的遗传距离分析包括序列准备、序列比对和修剪及遗传距离计算。具体原理和分析过程见附录D。具体过程如下：

* 1. 序列准备

将有效的样本序列合并整理成fasta文件。

* 1. 序列比对和修剪

采用ClustalW方法进行多序列比对，并修剪对齐双端序列。

* 1. 遗传距离计算

遗传距离计算基于有差异的核苷酸位点在序列中所占的比例，同时需要考虑四种核苷酸的发生频率和核苷酸替换类型。

DNA分子中的核苷酸变异即核苷酸替代，是基因进化的原动力。遗传距离分析法是基于生物体亲缘关系远近，基于DNA条形码序列差异计算的遗传距离，进而实现物种鉴定的方法。在一定的范围内，物种间亲缘关系越近，遗传距离越小；反之，亲缘关系越远，遗传距离越大。DNA 条形码技术中常用p-距离模型，Jukes—Cantor模型和Kimura两参数模型等。

a）p-距离模型：利用两个同源基因DNA序列间的核苷酸差异数所占的比例来表示序列间的分歧度。该模型比较简单，没有考虑核苷酸位点间的替换情况。有研究认为，该模型更适用于近源种及短DNA条形码的分析。

b）Jukes—Cantor模型：本模型假定4种核苷酸之间相互随机替代，即某一核苷酸替代变成其他3种核苷酸的概率是等同的。

c）Kimura两参数模型：本模型将核苷酸替代分成转换替代和颠换替代，因此更适用于转换颠换比较大的类群。根据实际监测数据，核苷酸的转换替代率约为颠换替代率的2倍。杨倩倩等[13]认为该距离模型提供的碱基替换模式与线粒体DNA极为相似，可以得出相对准确的种间及种内遗传距离，可以更加真实地反映核苷酸序列间的差异，适用于动物DNA条形码研究和物种鉴定。

**（3）条形码有效性**

在DNA条形码构建过程中需要通过添加阴性和阳性对照进行质量控制，设置的对照包括DNA提取阴性对照、PCR扩增阴性对照和PCR扩增阳性对照。

成功的物种条形码应同时满足以下条件：

a）阴性对照PCR产物无条带；

b）阳性对照的PCR产物应在预期的DNA条形码序列长度位置出现目的条带；

c） 测序获得高质量序列，Sanger测序和高通量测序分别达到QV20和Q20；

d）种内遗传距离明显小于种间距离（一般5倍~10倍）。

表9 DNA条形码构建过程中对照样品信息

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
|  | DNA提取阴性对照 | PCR扩增阴性对照 | PCR扩增阳性对照 |
| DNA提取 | √ |  |  |
| 条形码扩增 | √ | √ | √ |
| 测序 | √ | √ | √ |

注：“√”代表该步骤需要包含对照。

种内和种间遗传距离的大小是利用DNA条形码序列进行物种鉴别的重要标准。Hebert等（2003年）[43]指出，进行物种分类鉴定的关键是种间遗传距离大于种内遗传距离。随着DNA条形码的深入研究，发现不同物种及不同DNA条形码区段的阈值难以统一。如Hebert等[9]在对200个鳞翅目昆虫近源种的研究中，以3%作为阈值可以达到98%的鉴别成功率。该作者又通过COI条形码序列对鸟类进行鉴定，建议物种种内的遗传距离要小于2%，并提出种间平均遗传距离值应大于种内平均遗传距离的10倍[44]。国际上BOLD数据库采用成熟的算法按照一定的遗传距离阈值将序列聚类成类似于物种的操作分类单元（Operational taxonomic units），并采用DNA条形码索引号（Barcode Index Numbers, BIN）进行有序编号记录。BOLD数据库最初将遗传距离1%作为生物物种的划分阈值，由于其阈值过于宽泛，物种“鉴别过渡”，出现同种异名。后来，BOLD系统默认鉴定阈值为3%[45]。目前BOLD数据库中采用的是一个动态的BIN值。目前尚未找到一个通用的阈值应用于所有的类群。究其原因，不同的类群，由于进化速率不同，不可能会有一个普适性的值来衡量所有的物种。编制组在太湖流域构建的35种鱼类的线粒体12S rDNA条形码，获得的平均种内遗传距离为3.7%，获得的种间平均遗传距离为12.63%，是种内平均遗传的3.4倍。基于太湖流域87种浮游动物的COI条形码构建的种内遗传距离大多小于3%，种间遗传距离可达到20.87%，种间距离是种内距离的7倍左右。另外，构建的太湖流域大型底栖无脊椎动物COI条形码数据库，获得的摇蚊科种内遗传距离大部分小于2%，种间遗传距离高达15%。因此DNA条形码获得的种内遗传距离显著小于种间遗传距离，且种间遗传距离一般为种内遗传距离的5-10倍。

分类学上鉴定为同一个物种的不同样本，由于环境变化等因素，导致生物个体出现差异性进化，DNA序列也会存在或多或少的差异。目前BOLD采用BIN重新定义物种分类，一个物种可以存在多个BIN。因此为了更加全面的记录水生生物的遗传信息，本标准建议每个物种应该至少采集5个样本进行DNA条形码测序和入库。

## 物种条形码

成功的物种条形码信息由样本信息、DNA条形码信息和物种分类信息构成，在DNA条形码数据表中详实记录，见附录E。样本信息包括样本编号、凭证标本信息、采样信息、鉴定信息和3张高清样本图片等。DNA条形码信息包括分子实验记录、扩增引物、测序平台和序列信息。DNA条形码数据可按照SN/T 4279的规定上传至BOLD或NCBI等公共数据库。

## 质量控制和质量保证

（1）严格按标准要求进行信息采集，填写各项观测数据。记录表格一般要编页装订成册，内容齐全，填写翔实，字迹工整、清晰。所有原始数据记录表、数码图片、样品和分类凭证标本应及时保存归档，并及时填写和归档电子数据(包括数据记录表和数码图片等)。

（2）采样完成后，将所有样品运回实验室，与实验室人员交接，填写实验室样品记录表。将样品瓶上的所有信息抄写在实验室样品登记表上，按照采样区域或样点对样品登记表进行统一编号。

（3）实验场所应具备分子生物学实验室的基本条件。

（4）为防止外源污染，实验前应将实验用具进行高压灭菌，并用75%乙醇擦洗药材表面。

（5）DNA提取阴性对照（Negative isolation control, NIC），用于监控DNA提取过程中的污染：在DNA提取过程中设置一个空管，和样品同步操作。

（6）PCR扩增阴性对照（Negative amplification control, NAC），用于排除PCR反应混合物制备过程中由于污染造成的假阳性：用无菌水替代DNA样品进行同步PCR扩增。

（7）PCR扩增效率的阳性对照（Positive amplification control, PAC）：添加等体积已知浓度的靶向生物的基因组DNA，同步进行PCR扩增。

# 5 废弃物处理

废弃物的分类、收集、存放和集中处理应按照GB 19489和SN/T 4835的规定执行，其中生物废弃物在处理之前应采用高压灭菌、消毒或焚烧等方式灭活。此外，对含核酸染料的废液和废胶单独收集和处理。

# 6案例

编制组在太湖流域构建了297种水生生物的高质量DNA条形码。具体情况如下：构建了82种浮游植物的DNA条形码，覆盖蓝藻门、绿藻门、硅藻门等7个门类，其中69.51%（57/82）的种属为太湖常见属种，覆盖了太湖流域64%常见科（太湖2019-2020年两次形态学监测数据）；构建了87种（枝角类33，桡足类17和轮虫37）浮游动物的DNA条形码，涵盖了91%太湖流域常见的种类；构建了88种底栖动物的DNA条形码数据库，覆盖摇蚊科、颤蚓科、田螺科和觿螺科等常见底栖动物类群，涵盖太湖常见科的83.3%，常见属的45.5%（根据十三五监测数据）；构建了40种鱼类的DNA条形码数据库，覆盖了太湖流域鱼类常见种的85.7%。

## 6.1 太湖流域浮游植物DNA条形码数据库构建

**（1）物种数据库**

编制组结合Sanger测序和高通量测序在太湖流域构建了82种浮游植物的DNA条形码序列，覆盖蓝藻门，绿藻门，硅藻门等7个门类，其中69.51%（57/82）的种属为太湖常见属种，覆盖了太湖流域64%常见科（太湖2019-2020年两次形态学监测数据）。由于太湖浮游植物种类繁多，浮游植物的分离纯化耗时较长，纯培养要求高，太湖藻种库分离培养难度较大，所以本土DNA条形码数据库的浮游植物序列还需要继续补充。

1. **遗传距离**

利用Kimura two-parameter (K2P)模型计算物种间的遗传距离。来自同一个物种的序列都被用于物种遗传距离的计算。计算得到，该82个物种的种间平均遗传距离为36.51%，种内平均遗传距离为0.92%，种间与种内遗传距离都符合相应的要求。

1. **系统发育分析**

根据物种间的遗传距离在MEGA software中构建neighbor-joining（NJ）系统进化树，发现同“门”物种的序列，如隶属于蓝藻门的物种序列的遗传关系较近，可以较好的聚类在一起。其它如绿藻门与硅藻门等的物种也都聚类在一起（图5）。

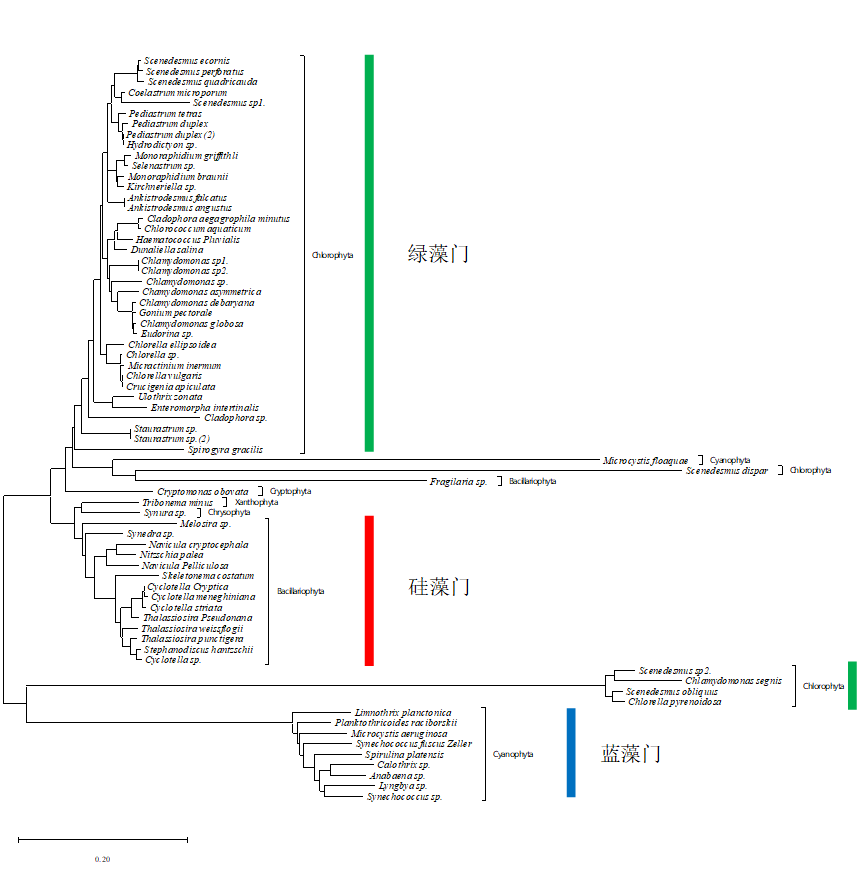
****

图5太湖流域常见浮游植物DNA条形码构建的系统发育树

## 6.2 太湖流域浮游动物DNA条形码数据库构建

**（1）物种建库名录**

通过对太湖流域20个点位的采样，共分拣出1302个浮游动物个体，分属于92个物种分类单元。采用高通量测序技术构建浮游动物DNA条形码。其中有1041个样本被成功测序，属于87个形态学分类单元，平均每个物种包含12个样本，样本数量最多的为指状许水蚤（*Schmackeria forbesi*），包含35个样本。经过严格的质量控制和污染序列的去除，最终获得了224951条条形码序列，平均每个物种有2585条序列，其中获得条形码序列最多为叉角拟聚花轮虫（*Conochiloides dossuarius*），包含13910条序列。本土条形码数据库中物种清单如下表10，共获得87种（其中枝角类33种，桡足类17种和轮虫类37种）浮游动物的DNA条形码序列，这87种浮游动物涵盖了91%太湖流域常见的浮游动物种类。

构建的本土数据中的87个物种，有28个物种在NCBI中有对应物种的条形码序列。本土物种序列在blastx模式下与NCBI数据库的比对显示出本土序列和NCBI序列有很高的相似性，但是在blastn模式下部分物种的相似性较低。blastx模式下比较的是蛋白质的序列，而blastn模式下是直接比对DNA序列，这说明COI区域在蛋白水平上相对保守，而在DNA序列上存在较大差异。例如晶莹仙达溞在NCBI中有对应的COI序列，但是我们获得的本土本晶莹仙达溞的序列和NCBI中的序列存在较大的差异，尽管两者在氨基酸水平上很类似。同样的情况还出现在*Camptocerus rectirostris、Dunhevedia crassa、Graotoleberis testudinaria*和*Microcylops varicans*中，在轮虫中这种情况就更加普遍，除萼花臂尾轮虫、月形腔轮虫、裂足臂尾轮虫和屈腿龟甲轮虫等少数几个种和NCBI中的序列相似性较高外，其他物种要么在NCBI中没有对应物种的序列，要么和对应的物种序列存在较大差异。

表10 太湖流域本土条形码数据库中物种清单

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 物种名称 | 样本数 | 序列 | 物种名称 | 样本数 | 序列 |
| *Alona diaphana* | 12 | 744 | *Ilyocryptus sordidus* | 4 | 1462 |
| *Alona eximia* | 2 | 104 | *Keratella cochlearis* | 12 | 2195 |
| *Alona guttata* | 13 | 9681 | *Keratella quadrala* | 19 | 3309 |
| *Alona rectangular* | 20 | 2371 | *Keratella valga* | 14 | 1967 |
| *Alona sp* | 3 | 393 | *Lecane bulla* | 11 | 2350 |
| *Asplachna priodonta* | 10 | 1031 | *Lecane buna* | 17 | 4043 |
| *Asplachna sp* | 26 | 5555 | *Lecane ungulata* | 18 | 1562 |
| *Asplanchna girodi* | 7 | 1489 | *Limnoithona sinensis* | 12 | 3116 |
| *Bosmina sp* | 17 | 2610 | *Macrothrix sp* | 2 | 296 |
| *Bosminopsis deitersi* | 17 | 858 | *Mesocyclops sp* | 16 | 3792 |
| *Brachionus angularis* | 21 | 3285 | *Microcyclops varicans* | 2 | 2223 |
| *Brachionus calyciflorus* | 16 | 1548 | *Moina brachiata* | 5 | 2500 |
| *Brachionus caudatus* | 18 | 1701 | *Moina micrura* | 14 | 4155 |
| *Brachionus diversicornis* | 10 | 1064 | *Moina rectirostris* | 16 | 9410 |
| *Brachionus falcatus* | 11 | 1020 | *Mytilina ventralis* | 12 | 2319 |
| *Brachionus forficula* | 4 | 320 | *Neodiaptomus schmackeri* | 26 | 4495 |
| *Brachionus quadridentatus* | 16 | 3949 | *Notommatidae sp* | 18 | 5211 |
| *Brachionus urceus* | 18 | 2123 | *Plalyias militaris* | 17 | 3598 |
| *Branchionus leydign* | 13 | 1039 | *Pleuroxus aduncus* | 4 | 1063 |
| *Camptocercus rectirostris* | 9 | 839 | *Pleuroxus laevisS* | 3 | 1416 |
| *Ceriodaphnia cornuta* | 19 | 2876 | *Pleuroxus sp* | 2 | 599 |
| *Ceriodaphnia quadrangula* | 2 | 208 | *Pleuroxus trigonellus* | 6 | 1437 |
| *Chydorus sp* | 18 | 6404 | *Ploesoma hudsoni* | 19 | 1908 |
| *Chydorus sphaericus* | 7 | 1852 | *Rolaria neplunia* | 14 | 927 |
| *Conochiloides dossuarius* | 25 | 13910 | *Rotifer sp* | 15 | 2009 |
| *Conochilus unicornis* | 7 | 1408 | *Scapholeberis mucronata* | 5 | 1522 |
| *Cyclop sp* | 7 | 11 | *Schmackeria forbesi* | 35 | 1663 |
| *Cyclops vicinus* | 15 | 2744 | *Schmackeria inopinus* | 12 | 1005 |
| *Daphnia galeatia* | 21 | 5805 | *Schmackeria sp* | 9 | 589 |
| *Daphnia pulex* | 8 | 3660 | *Sida crystallina* | 13 | 4131 |
| *Daphnia sp* | 1 | 27 | *Simocephalus vetuloides* | 16 | 4942 |
| *Diaphanosoma dubium* | 16 | 6493 | *Simocephalus vetulus* | 2 | 279 |
| *Diaphanosoma orghidani* | 25 | 3829 | *Sinocalanus dorrii* | 22 | 30 |
| *Diaphanosoma sp* | 3 | 634 | *Synchacta sp* | 7 | 1635 |
| *Diaptomidae sp* | 1 | 171 | *Synchaeta oblonga* | 18 | 2741 |
| *Disparalona rostrata* | 1 | 26 | *Testudinella patina* | 3 | 217 |
| *Dunhevedia crassa* | 5 | 1911 | *Thermocyclops brevifurcatus* | 21 | 3038 |
| *Eodiaptomus sinensis* | 5 | 711 | *Thermocyclops sp* | 3 | 577 |
| *Euchlanis dilalata* | 24 | 767 | *Thermocyclops taihokuensis* | 26 | 12911 |
| *Eucyclops serrulatus* | 7 | 1433 | *Trichocerca bicrislata* | 3 | 494 |
| *Filinia longisela* | 9 | 2730 | *Trichocerca elongata* | 7 | 1140 |
| *Gastropus stylifer* | 25 | 12267 | *Trichocerca sp* | 2 | 363 |
| *Graptoleberis testudinaria* | 8 | 565 | *Trichocerca stylata* | 3 | 1810 |
| *Harpacticoida sp* | 14 | 6336 |  |  |  |

（2）种间与种内遗传距离

利用Kimura two-parameter模型计算物种间的遗传距离。来自同一个物种的序列都被用于物种遗传距离的计算。本土数据库内浮游动物种间和种内遗传多样性如图6，大部分浮游动物的种内序列多样性（基于COI序列）都小于3%，种间的序列多样性通常大于10%。属间平均遗传距离为25.4%，科间的平均遗传距离为28.5%，目间平均遗传距离为38.0%，纲间平均遗传距离为40.2%，门间平均遗传距离为48.7%。盘肠溞、尖额溞和龟甲轮虫种内遗传距离超过5%，这可能是因为这些样本仅仅鉴定到属的水平，每一个类群包含多个物种。也有个别物种的种内多样性超过了5%，例如轮虫*Branchionus leydign*（14.3%）、*Trichocerca elongate*（11.5%）、*Lecane bulla*（15.9%）和*Synchaeta oblonga*（5.95%）和桡足类*Schmackeria forbesi*（6.5%）。

../../../../../Volumes/BIO-LINUX%20L/intraspecie

图6本土数据库内浮游动物种内和种间COI序列多样性

（3）系统遗传发育树的构建

基于COI序列差异浮游动物被明显地分化为3大枝系，轮虫、枝角类和桡足类。说明这三者之间还是存在比较大的进化差异。其中每个物种不同样本明显聚类在一起，其次为同属，同科（图7）。

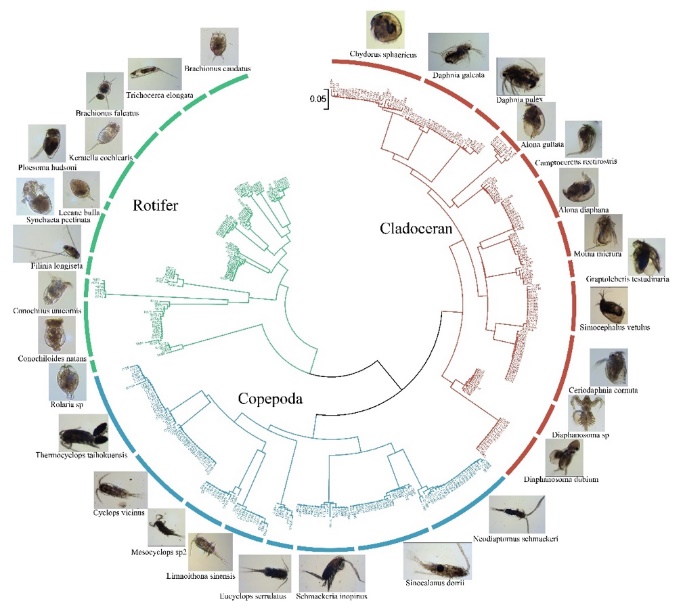


图7 常见浮游动物系统进化树

## 6.3 太湖流域大型底栖无脊椎动物DNA条形码数据库构建

（1）DNA条形码物种名录

在太湖流域的多个点位收集底栖动物样品，通过DNA提取和扩增、高通量测序，最终获得共计88个不同底栖物种的高质量DNA条形码序列，隶属3门6纲14属32科72属。建库物种包含摇蚊、软体动物、寡毛纲等常见的指示物种。其中摇蚊科有32属42种，占47.8%；软体动物17种，占19.3%；EPTO类群14种，占15.9%；寡毛纲2种，占2.3%。所有建库物种的序列长度在660-725bp之间，GC碱基含量为34.7%。

（2）种间与种内遗传距离

利用Kimura two-parameter (K2P)模型计算物种间的遗传距离。来自同一个物种的序列都被用于物种遗传距离的计算。种内和种间遗传距离的大小是利用DNA条形码序列进行物种鉴别的重要标准。结果显示，88个种属之间平均遗传距离的最大值为0.547，最小值为0.095，平均值为0.219。除了伞状倒毛摇蚊（*Microtendipes umbrosus*）和特长足摇蚊属摇蚊（*Thienemannimyia sp.*）种间的遗传距离为0.095外，其余所有不同种序列遗传距离均大于0.1，占序列对总数的99.93%。所有种间平均遗传距离中，85.93%大于0.15，37.64%的遗传距离大于0.2。即本次实验收集的底栖动物DNA条形码序列，分类单元间的遗传距离在0.1以上，这其中包括不同种之间的遗传距离，也包括不同属之间的遗传距离。在种内遗传距离方面，14个物种的种内遗传距离小于0.02，涵盖共计40条序列。其中德永雕翅摇蚊、拉粗腹摇蚊属摇蚊、大沼螺的种内遗传距离最小（0）。明确鉴定至种的分类单元中，黄色羽摇蚊的种内平均遗传距离最大（0.065），可见种间遗传距离全部大于种内遗传距离，说明利用COI基因构建本土底栖动物条形码数据库，可以对不同物种进行有效的分类鉴别。对于仅鉴定至属的物种序列，部分种内遗传距离达到10%以上，包括前突摇蚊属摇蚊（0.112）、大粗腹摇蚊属摇蚊（0.124）、棒脉摇蚊属摇蚊（0.165）、尼罗长足摇蚊属摇蚊（0.165）、长跗摇蚊属摇蚊（0.180）、特长足摇蚊属摇蚊（0.185）。此外霍甫水丝蚓、椭圆萝卜螺的种内遗传距离达到了0.2以上，需要进一步比对验证。

（3）系统发育树构建

根据物种间的遗传距离在MEGA software中构建NJ系统进化树。结果表明，同科物种的序列遗传关系较近，可以较好的聚类在一起。摇蚊科是本次建库的主要类群之一，所有摇蚊科的序列都聚类在一起，且同属不同种的序列也能聚类。水生昆虫中，蜉蝣目、蜻蜓目的各物种序列，分别聚类在一起。软体动物门的物种序列也聚类在一起（图8）。



图8 太湖流域常见底栖动物DNA条形码构建的系统发育树（NJ法）

## 6.4 太湖流域鱼类DNA条形码数据库构建

（1）建库物种名录

共获得40种太湖流域鱼类的DNA条形码序列，这40种鱼类涵盖了85.7%太湖流域常见的鱼类。

（2）种间与种内遗传距离

利用K2P模型计算物种间的遗传距离。来自同一个物种的序列都被用于物种遗传距离的计算。对所有物种两两比对得到种间平均遗传距离和种内遗传距离。结果显示，40种鱼的种内平均遗传距离为0.0037。有研究指出，进行物种分类鉴定的关键是种间遗传距离大于种内遗传距离，并且大部分物种种内的遗传距离小于1%，很少有大于2%的。本研究的结果符合该观点。其中，䱗的种内遗传距离最小(0.0012)，长蛇鮈最大(0.0381)。35个物种的种间平均遗传距离为 0.1263，是种内平均遗传距离的34倍。目前世界上普遍认为条形码数据库的构建，种内遗传距离不大于0.02，而种间距离必须大于种内距离，且差异距离约10倍，本研究符合条件。其中，子陵吻虾虎鱼与鳡鱼之间的遗传距离最大(0.3140)，而同属于鲢和鳙之间的种间遗传距离最小(0.0010)。12S rRNA基因在种间的遗传距离大于种内的遗传距离，这表明，利用12S rRNA基因可以有效的进行物种分类鉴定。

（3）系统发育树构建

基本上同一物种的个体首先聚在一起，再与同一属的其他物种序列聚在一起，大部分个体聚在一起形成一个单系，在种水平上，NJ树生物分类节点支持率约为99%，鱼类能得到有效区分（图9）。

|  |
| --- |
|  |

图9太湖流域常见鱼类DNA条形码构建的系统发育树（NJ法）

## 6.5本土物种DNA条形码数据库重要性

将eDNA监测数据分别通过本土数据库和公共数据库注释，发现40%的分类单元仅能被本土物种数据库注释（图10），进一步论证构建本土物种DNA条形码数据库的重要性。

|  |
| --- |
|  |

图10 本土DNA条形码数据库提高eDNA宏条形码的物种识别率

# 7 标准实施建议

本标准为首次制定，随着DNA条形码技术的发展，本标准中的DNA条形码建库方法和涉及到的相关参数也可能会随之发生变化。因此，建议在本标准实施过程中，继续广泛听取和收集各方面的意见与建议，并根据实际应用情况，对本标准进行不断地修订与完善，使其实用性和可操作性与时俱进，为规范开展基于DNA条形码的水生生物种群鉴定和生物多样性监测等工作提供依据和指导。

# 附 录

## 附录A 采样信息记录表

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 检测单位： 采集日期： 年 月 日 记录表号： | | | | | | |  |  |
| 点位名称： | | | | | | | 断面编号： | |
| 绘制的观测区域图或拍摄生境照片的编号: | | | | | | | | |
| 经度: 度 分 秒 | | | | 纬度: 度 分 秒 | | | 海拔（m）： | |
| 生境条件 | | | | | | | | |
| 水深： | | | | pH： | | | 溶氧量： | |
| 水温： | | | | 透明度： | | | 流速： | |
| 叶绿素a： | | | | 藻密度： | | | 电导率： | |
| 区域特征 | | □溪流源头 □浅水(可涉水)溪流或河流 □过渡性溪流 □深水河流 □大型河流 □封闭型浅水湖泊 □浅水湖泊 □封闭型深水湖泊 □深水湖泊 □大型深水水库 □中小型水库 | | | | | | |
| 周边生境类型 | | □森林 □农田 □草地 □沼泽 □灌丛 □裸地 □居民居住区 □其他: | | | | | | |
| 河道变化 | | □渠道化 □天然河道 □土坝 □混凝土加固堤岸 □石块加固堤岸 | | | | | | |
| 周边植被信息:相对丰度:0—无，1—稀少(<5%)，2—一般(<30%)，3—丰富(30%~70%)， 4—优势(>70%) | | | | | | | | |
| 水生植被类型及生长情况 | | | | | 岸生植被类型及概况(距离岸18 m 内) | | | |
| 沉水植物 | 漂浮植物 | | 浮叶植物 | 挺水植物 | 乔木 | 灌木 | | |
|  |  | |  |  |  |  | | |
| 采样工具：□13#浮游生物网□25#浮游生物网□其他 | | | | | 采样次数： | 样品编号 | | |
| 采样体积： | | | | |  |  | | |
| 采样工具：□13#浮游生物网□25#浮游生物网□其他 | | | | | 采样次数： | 样品编号 | | |
| 采样体积： | | | | |  |  | | |
| 采样工具：□13#浮游生物网□25#浮游生物网□其他 | | | | | 采样次数： | 样品编号 | | |
| 采样体积： | | | | |  |  | | |
| 采集人 | | 记录人 | | | | 采集时间： | | |

## 附录B 浮游植物培养基配置

**表B.1 BG11培养基的制备**

|  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- |
| **编号** | **组分** | **用量（每升水）** | **母液浓度** |
| 1 | NaNO3 | 10mL | 15g/100mL 无菌水 |
| 2 | K2HPO4 | 10 mL | 2g/500 mL 无菌水 |
| 3 | MgSO4·7H2O | 10 mL | 3.75g/500 mL 无菌水 |
| 4 | CaCl2·2H2O | 10 mL | 1.8g/500 mL 无菌水 |
| 5 | Citric acid | 10 mL | 0.3g/500 mL 无菌水 |
| 6 | Ferric ammonium citrate | 10 mL | 0.3 g/500 mL 无菌水 |
| 7 | EDTANa2 | 10 ml | 0.05 g/500 mL 无菌水 |
| 8 | Na2CO3 | 10 mL | 1.0g/500mL 无菌水 |
| 0 | A5 （Trace mental solution） | 1mL |  |

**表B.2 AF-6 培养基的制备**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **编号** | **组分** | **用量（每升水）** |
| 1 | NaNO3 | 0.14g |
| 2 | NH4NO3 | 0.22g |
| 3 | K2HPO4 | 0.005g |
| 4 | KH2PO4 | 0.01g |
| 5 | CaCO3 | 0.01g |
| 6 | Citric acid | 0.002g |
| 7 | Biotin（2 µg/100mL） | 1mL |
| 8 | Thiamine HCl（1 µg/100ml） | 0.5mL |
| 9 | Fe-citrate | 0.002g |
| 10 | MgSO4. 7H2O | 0.03 g |
| 11 | CaCl2. 2H2O | 0.01g |
| 12 | PIV\* | 5ml |
| 13 | Vitamin B6 | 1μg |
| 14 | Vitamin B12 | 1μg |

**表B.3 CSI 培养基的制备**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **编号** | **组分** | **用量（每升水）** |
| 1 | Ca(NO3) ·4H2O | 1 mL/L |
| 2 | KNO3 | 1 mL/L |
| 3 | MgSO4·7H2O | 1 mL/L |
| 4 | β-Na2 glycerophosphate·5H2O | 1 mL/L |
| 5 | Vitamin B12 | 0.1ug/L |
| 6 | Biotin | 0.1μg/L |
| 7 | Thiamine HCl | 10μg/L |
| 8 | PIV\* | 6ml/L |
| 9 | HEPES | 0.5g/L |
| 10 | Na2SiO3·9H2O | 0.1g/L |
| 11 | 土壤提取液\*\* | 30ml/L |

**表B.4 A5的制备**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **编号** | **组分** | **用量（每升水）** |
| 1 | H3BO3 | 2.86g |
| 2 | MnCl2·4H2O | 1.86g |
| 3 | ZnSO4·7 H2O | 0.22g |
| 4 | Na2MoO4·2 H2O | 0.39g |
| 5 | CuSO4·5 H2O | 0.08g |
| 6 | Co(NO3)2·6 H2O | 0.05g |

**表B.5 PIV的制备**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **编号** | **组分** | **用量（每升水）** |
| 1 | Na2EDTA | 0.75g |
| 2 | MnCl2·4H2O | 0.041g |
| 3 | ZnCl2·7H2O | 0.005g |
| 4 | Na2MoO4·2H2O | 0.004g |
| 5 | FeCl3·6 H2O | 0.097g |
| 6 | CoCl2.6 H2O | 0.002g |

\*\***土壤提取液**：取未施过肥的土壤200g置于烧杯或三角瓶中，加入蒸馏水1000毫升，瓶口用透气塞封口，在水浴中沸水加热3小时，冷却，沉淀24小时，该过程重复3次，过滤取上清液，于高压灭菌锅中灭菌，4℃冰箱中保存备用。

## 附录C 推荐DNA条形码引物及PCR扩增条件

**表C.1基于Sanger法测序的常见条形码引物信息**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 目标群落 | 基因名称 | 引物名称 | 引物序列（5’ - 3’） | 退火温度 |
| 蓝藻门 | 16S rDNA | 16S-27F | AGAGTTTGATCCTGGCTCAG | 55°C ~62 °C |
| 16S-1492R | RGMAACCTTGTACGACTT |
| 真核藻类 | 18S rDNA | 18S-7F | ACCTGGTTGATCCTGCCAG | 55°C ~62 °C |
| 18S-1534R | TGATCCTTCYGC AGGTTCAC |
| 水生维管植物 | RbcL | orbcLa-F | ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGCAAGTG | 60°C ~61°C |
| orbcLa-R | TCATCYTTGGTAAAATCAAGTCCACCRCG |
| ITS | oITS2-F | GCGAAATGCGATACTTGGTGTGAATTGC | 60°C ~61°C |
| oITS2-R | CCTTGTAAGTTTCTTTTCCTCCGCTTATTGATATGC |
| 浮游动物  底栖动物 | COI | LCO1490F | GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG | 45°C ~55 °C |
| HCO2198R | TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA |
| 鱼类 | Mt 12S rDNA | MetafishF1 | TCGTGCCAGCCACCGCGGTTA | 60°C ~62 °C |
| MetafishR12 | AACTNGGTNCGTTGATCGG |
| COI | FishF1 | TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC | 50°C ~60 °C |
| FishF2 | TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC |
| FishR1 | TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA |
| FishR2 | ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA |

**表C.2基于高通量测序的常见条形码引物信息**

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **目标群落** | **基因名称** | **引物名称** | **引物序列（5’ - 3’）** | **退火温度** |
| 蓝藻门 | 16S\_V3 | 16S\_341F | CCTACGGGRSGCWGCAG | 55°C ~62 °C |
| 16S\_518R | ATTACCGCGGCTGCTGG |
| 16S\_V4 | 16S\_515F | GTGCCAGCMGCCGCGGTAA | 55°C ~62 °C |
| 16S\_806R | GGACTACHVGGGTWTCTAAT |
| 16S\_V3\_V4 | 16S-338F | ACTCCTACGGGAGGCAGCAG | 55°C ~62 °C |
| 16S-806 | GGACTACHVGGGTWTCTAAT |
| 真核藻类 | 18S\_V9 | 18S\_1389F | TCCCTGCCHTTTGTACACAC | 55°C ~62 °C |
| 18S\_1510R | CCTTCYGCAGGTTCACCTAC |
| 18S\_V4 | TAReuk454FWD1 | CCAGCA(G/C)C(C/T)GCGGTAATTCC | 55°C ~62 °C |
| TAReukREV3 | ACTTTCGTTCTTGAT(C/T)(A/G)A |
| 水生维管植物 | 18S\_ V7 | Euka02\_V7F | TTTGTCTGSTTAATTSCG | 45°C ~55°C |
| Euka02\_V7R | ACAGACCTGTTATTGC |
| RbcL | orbcL2\_F | YGATGGACTTACNAGTCTTGATCGTTACAAAGG | 60°C ~62 °C |
| orbcL2\_R | GNCCATAYTTRTTCAATTTATCTCTTTCAACTTGGATNCC |
| 浮游动物  底栖动物 | COI-1 | mlCOIintF | GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC | 45°C ~55°C |
| dgHCO2198 | TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA |
| 底栖动物 | COI-2 | mlCOIintF | GGWACWGGWTGAACWGTWTAYCCYCC | 45°C ~55°C |
| jgHCO2198 | TAIACYTCIGGRTGICCRAARAAYCA |
| 鱼类 | Mt 12S rDNA-1 | MetafishF1 | TCGTGCCAGCCACCGCGGTTA | 60°C ~63 °C |
| MetafishR1 | ATAGTGGGGTATCTAATCCCAG |
| Mt 12S rDNA-2 | Tele02\_F | AAACTCGTGCCAGCCACC | 55°C ~60 °C |
| Tele02\_R | GGGTATCTAATCCCAGTTTG |

## 附录D 遗传距离分析原理和方法

D.1 序列准备

合并整理后fasta文件格式见图D.1。



图D.1 fasta序列格式

D.2遗传距离计算模型

遗传距离分析模型包括p-distance模型、Jukes-Cantor模型和K2P模型，一般采用K2P模型。

（1）p-distance模型

利用两个同源基因DNA序列间的核苷酸差异数所占的比例来表示序列间的分歧度。

()

式中:

*p*—— 序列间的分歧度

*nd*——存在差异的核苷酸数目

*n*——总的核苷酸数目

（2）Jukes-Cantor模型

本模型假定4种核苷酸之间相互随机替代，即某一核苷酸替代变成其他3种核苷酸的概率是等同的。

()

式中:

*d*—— 遗传距离

*p*——序列间的分歧度

（3）Kimura 2-parameter（K2P）模型

本模型将核苷酸替代分成转换和颠换。其中转换指A、G间替代或G、C间替代。颠换指A和T/C间的替代或G和T/C间的替代。根据实际监测数据，核苷酸的转换替代率约为颠换替代率的2倍，该方法可以更加真实地反映核苷酸序列间的差异。

()

()

()

式中：

*d*—— 遗传距离

*P*——序列间的转换分歧度

*Q*——序列间的颠换分歧度

*ns*——存在转换的核苷酸数目

*nv*——存在颠换的核苷酸数目

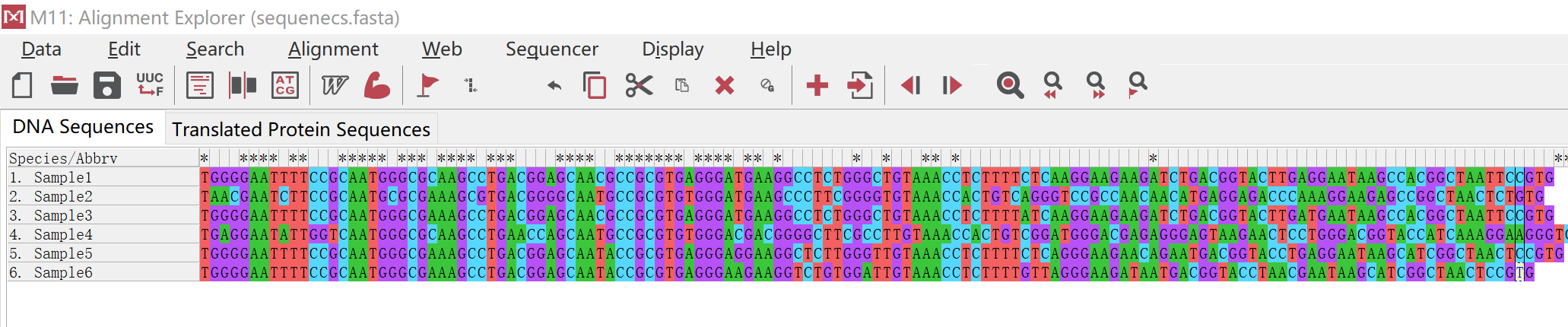
*n*——总的核苷酸数目

D.3 基于软件MEGA 11的遗传距离分析过程

遗传距离分析通过软件MEGA 11实现，软件下载地址为：[https://megasoftware.net/](https://megasoftware.net/download_form)

（1）fasta 序列导入

打开MEGA 11，点击File，选择Open A File/Session，上传fasta文件，见图D.2



图D.2 序列导入MEGA 11窗口截图

（2）序列比对和修剪

点击Alignment，选择Alignment by ClustalW（COI条形码序列选择Alignment by ClustalW（Codons）），进行多序列比对。一般手动修剪两端序列，保持序列对齐。点击Data，选择Export alignment 将比对结果保存成MEGA格式文件。



图D.3序列比对后窗口截图

（3）遗传距离计算

导入MEGA文件，点击DISTANCE，选择Compute Pairwise Distances，其中Model/Method选择“Kimura 2-parameter model”计算基于K2P模型的遗传距离。

D.4 基于R语言的的遗传距离分析过程

遗传距离分析也可通过R语言实现。

（1）fasta序列导入

通过“Biostrings”包导入序列：

seq<- readDNAStringSet("sequences.fasta")

（2）序列比对和修剪

通过“msa”包比对序列：

seq.alin<- msa(seq,method ="ClustalW")

通过“ape”包将比对结果（seq.alin）转化成DNAbin格式文件：

seq.dnabin<- as.DNAbin(seq.alin)

（3）修剪双端序列：

seq.dnabin.trim<- trimEnds(seq.dnabin)

（4）遗传距离计算

通过“ape”包计算基于K2P模型的遗传距离：

dist.seq<- dist.dna(seq.dnabin.trim, model = "K80")

（5）结果导出

遗传距离数据导出为 “genetic\_distance.csv”文件：

dist.output<- as.matrix(dist.seq)

write.csv(dist.output,"genetic\_distance.csv",quote = F,row.names = T)

## 附录E DNA条形码数据表格

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| 样本编号 |  | | | 样本照片 |  |
| 凭证标本编号 |  | | | 凭证标本保存地点及保存方式 |  |
| 采样位点 |  | 采样人/单位 |  | 采样时间 |  |
| 经纬度 |  | 海拔 |  | 温度 |  |
| 鉴定人/单位 |  | 鉴定时间 |  | 分类特征 |  |
| 中文名 |  | 拉丁名 |  | 分类信息（门纲目科属） |  |
| 分子实验室 |  | 分子实验操作人 |  | DNA保存地点 |  |
|  | 引物信息 | □16S □18S □RbcL □ITS □COI □Mt 12S □其他： | | | |
| 测序平台 |  | | | |
| 序列长度 |  | | | |
| GC含量 |  | | | |
| 序列 |  | | | |
| 序列原始峰图 |  | | | |

# 参考文献

[1] BARRETT M B A, BLADEN S, BREEZE T, BURGESS N, BUTCHART S, CLEWCLOW H, CORNELL S, COTTAM A, CROFT S. Living planet report 2018: Aiming higher [J]. 2018: 1-144.

[2] ALTERMATT F, LITTLE C J, MAECHLER E, et al. Uncovering the complete biodiversity structure in spatial networks: the example of riverine systems[J]. Oikos, 2020, 129(5): 607-618.

[3] CARDINALE B J. Biodiversity improves water quality through niche partitioning[J]. Nature, 2011, 472(7341): 86-U113.

[4] CARDINALE B J, DUFFY J E, GONZALEZ A, et al. Biodiversity loss and its impact on humanity[J]. Nature, 2012, 486(7401): 59-67.

[5] VOEROESMARTY C J, MCINTYRE P B, GESSNER M O, et al. Global threats to human water security and river biodiversity[J]. Nature, 2010, 467(7315): 555-561.

[6] 魏印心 胡. 中国淡水藻类: 系统、生态及分类[M]. 科学出版社, 2006.

[7] HAASE P, PAULS S U, SCHINDEHUETTE K, et al. First audit of macroinvertebrate samples from an EU Water Framework Directive monitoring program: human error greatly lowers precision of assessment results[J]. Journal of the North American Benthological Society, 2010, 29(4): 1279-1291.

[8] WACH M, GUEGUEN J, CHAUVIN C, et al. Probability of misclassifying river ecological status: A large-scale approach to assign uncertainty in macrophyte and diatom-based biomonitoring[J]. Ecological Indicators, 2019, 101: 285-295.

[9] HEBERT P, RATNASINGHAM S, WAARD J D. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. Proc Biol, 2003, 270(Suppl\_1): S96.

[10] 林森杰, 王路, 郑连明, 等. 海洋生物DNA条形码研究现状与展望[J]. 海洋学报, 2014, 36(12): 1-17.

[11] LOCATELLI N S, MCINTYRE P B, THERKILDSEN N O, et al. GenBank's reliability is uncertain for biodiversity researchers seeking species-level assignment for eDNA[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2020, 117(51): 32211-32212.

[12] WEIGAND H, BEERMANN A J, CIAMPOR F, et al. DNA barcode reference libraries for the monitoring of aquatic biota in Europe: Gap-analysis and recommendations for future work[J]. Science of the Total Environment, 2019, 678: 499-524.

[13] 杨倩倩, 刘苏汶, 俞晓平. DNA条形码分析方法研究进展[J]. 应用生态学报, 2018, 29(03): 1006-1014.

[14] BUCKLIN A, STEINKE D, BLANCO-BERCIAL L. DNA Barcoding of Marine Metazoa [M]//CARLSON C A and GIOVANNONI S J. Annual Review of Marine Science, Vol 3. 2011: 471-508.

[15] 张宛宛, 谢玉为, 杨江华, 等. DNA宏条形码(metabarcoding)技术在浮游植物群落监测研究中的应用[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(01): 15-24.

[16] 张宛宛. 基于DNA宏条形码技术的浮游植物群落多样性监测研究[D]. 南京大学, 2017.

[17] 张丽娟, 徐杉, 赵峥, 等. 环境DNA宏条形码监测湖泊真核浮游植物的精准性[J]. 环境科学, 2021, 42(02): 796-807.

[18] LANE D J. 16S/23S rRNA sequencing[J]. Nucleic acid techniques in bacterial systematics, 1991:

[19] LI X, HUO S, ZHANG J, et al. Metabarcoding reveals a more complex cyanobacterial community than morphological identification[J]. Ecological Indicators, 2019, 107: 105653.

[20] KLINDWORTH A, PRUESSE E, SCHWEER T, et al. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies[J]. Nucleic acids research, 2013, 41(1): e1-e1.

[21] FABRIN T M C, STABILE B H M, DA SILVA M V, et al. Cyanobacteria in an urban lake: hidden diversity revealed by metabarcoding[J]. Aquatic Ecology, 2020, 54(2): 671-675.

[22] MOON-VAN DER STAAY S Y, VAN DER STAAY G W M, GUILLOU L, et al. Abundance and diversity of prymnesiophytes in the picoplankton coμmunity from the equatorial Pacific Ocean inferred from 18S rDNA sequences[J]. Limnology and Oceanography, 2000, 45(1): 98-109.

[23] AMARAL-ZETTLER L A, MCCLIMENT E A, DUCKLOW H W, et al. A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA genes[J]. Plos One, 2009, 4(12): : e6372.

[24] STOECK T, BASS D, NEBEL M, et al. Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water[J]. Molecular Ecology, 2010, 19(s1): 21-31.

[25] ORTEGA A, GERALDI N R, DUARTE C M. Environmental DNA identifies marine macrophyte contributions to Blue Carbon sediments[J]. Limnology and Oceanography, 2020, 65(12): 3139-3149.

[26] COGHLAN S A, SHAFER A B A, FREELAND J R. Development of an environmental DNA metabarcoding assay for aquatic vascular plant communities[J]. Environmental DNA, 2021, 3(2): 372-387.

[27] ORTEGA A, GERALDI N R, DíAZ-RúA R, et al. A DNA mini-barcode for marine macrophytes[J]. Molecular Ecology Resources, 2020, 20(4): 920-935.

[28] GUARDIOLA M, URIZ M J, TABERLET P, et al. Deep-Sea, Deep-Sequencing: Metabarcoding Extracellular DNA from Sediments of Marine Canyons[J]. Plos One, 2015, 10(10): e0153836.

[29] ZHAN A, BAILEY S A, HEATH D D, et al. Performance comparison of genetic markers for high-throughput sequencing-based biodiversity assessment in complex communities[J]. Molecular Ecology Resources, 2014, 14(5): 1049-1059.

[30] LERAY M, YANG J Y, MEYER C P, 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[J]. Frontiers in Zoology, 2013, 10(1): 34.

[31] 高旭, 杨江华, 张效伟. 浮游动物DNA宏条形码标志基因比较研究[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(02): 61-70.

[32] FOLMER O, BLACK M, HOEH W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. Mol Mar Biol Biotechnol, 1994, 3(5): 294-9.

[33] YANG J, ZHANG X, ZHANG W, et al. Indigenous species barcode database improves the identification of zooplankton[J]. Plos One, 2017, 12(10):

[34] ZHAN A, HULáK M, SYLVESTER F, et al. High sensitivity of 454 pyrosequencing for detection of rare species in aquatic communities[J]. Methods in Ecology and Evolution, 2013, 4(6): 558-565.

[35] LERAY M, KNOWLTON N. DNA barcoding and metabarcoding of standardized samples reveal patterns of marine benthic diversity[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015, 112(7): 2076-81.

[36] ELBRECHT V, LEESE F. Validation and Development of COI Metabarcoding Primers for Freshwater Macroinvertebrate Bioassessment[J]. Frontiers in Environmental Science, 2017, 5(11):

[37] SHEN Y, HUBERT N, HUANG Y, et al. DNA barcoding the ichthyofauna of the Yangtze River: Insights from the molecular inventory of a mega-diverse temperate fauna[J]. Molecular Ecology Resources, 2019, 19(5): 1278-1291.

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

[39] 高旭. 太湖鱼类环境DNA宏条形码快速监测技术应用研究[D]. 南京大学, 2020.

[40] WARD R D, ZEMLAK T S, INNES B H, et al. DNA barcoding Australia's fish species[J]. Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences, 2005, 360(1462): 1847-1857.

[41] TABERLET P, BONIN A, ZINGER L, et al. Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring[M]. Oxford: Oxford University Press, 2018.

[42] 张效伟, 杨江华, "一种利用高通量测序构建浮游动物条形码数据库的方法," 2018.

[43] HEBERT P, CYWINSKA A. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings. Biological sciences, 2003, 270(1512): 313-321.

[44] HEBERT P D N, STOECKLE M Y, ZEMLAK T S, et al. Identification of Birds through DNA Barcodes[J]. PLoS Biology, 2004, 2(10): e312-.

[45] 李晶, 刘雪涛, 郭华威, 等. 动物DNA条形码之分析方法研究进展[J]. 四川动物, 2013, 32(06): 950-954.