

文章编号: 1674-5566(2025)05-0968-10

DOI: 10.12024/jsou. 20250804913

## 基于环境DNA多重PCR技术的大藻入侵监测引物开发与验证

陈雨萱<sup>1,2</sup>, 陆亮<sup>1,2</sup>, 方敏瑶<sup>1,2</sup>, 李晨虹<sup>1,3</sup>

(1. 上海海洋大学 环境DNA技术与水生态健康评估工程中心, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 海洋动物系统分类与进化上海高校重点实验室, 上海 201306; 3. 临港新片区海洋生物医药科技创新型平台, 上海 201306)

**摘要:** 大藻(*Pistia stratiotes* L.)作为我国淡水生态系统中危害严重的外来入侵植物, 其快速扩散已对水域生态安全构成重大威胁。为实现该物种的早期监测与防控, 基于环境DNA(eDNA)技术开发了一套高灵敏度、高特异性的检测体系。通过整合k-mer索引策略与叶绿体基因组比对分析, 设计出4组大藻特异性多重PCR引物(PS\_7、PS\_8、PS\_9、PS\_10), 实验验证结果表明: (1)各单引物及其组合在组织样本、养殖水样和自然水样中均能高效扩增目标DNA; (2)单个引物PS\_7和PS\_10的检测限均达 $0.69 \times 10^{-2}$  ng/μL; PS\_8和PS\_9的检测限分别为 $0.34 \times 10^{-1}$  ng/μL和0.17 ng/μL; 多重PCR体系的检测限达 $1.1 \times 10^{-5}$  ng/μL, 较最佳单引物灵敏度提升约625倍( $P < 0.01$ ); (3)特异性测试显示, 该引物组与紫萍(*Spirodela polyrhiza*)等近缘物种无交叉反应。该多重PCR体系可在3 h内完成检测分析。本研究建立的检测体系为大藻入侵的早期预警与监测提供了可靠技术支撑, 并为水生入侵植物的eDNA快速检测方法开发提供了实践范例。

**关键词:** 大藻; 入侵物种; 环境DNA; 多重PCR; 引物设计

中图分类号: Q 178.1 文献标志码: A

外来物种入侵已成为全球生态安全面临的主要威胁之一, 仅次于生境破坏, 且每年对全球造成的损失超过1万亿美元<sup>[1-3]</sup>。大藻(*Pistia stratiotes* L.)隶属于被子植物门(Angiospermae)木兰纲(Magnoliopsida)泽泻目(Alismatales), 是一种具有典型入侵特性的水生漂浮草本<sup>[4-5]</sup>。大藻在全球热带和亚热带地区广泛分布<sup>[6]</sup>, 在我国民间素有“水白菜”之称。大藻最初从巴西引进, 鉴于它生长速度快且产量高, 是一种优良青绿饲料, 因而被我国南方各省市引进放养<sup>[4]</sup>。这几年因为大力发展经济, 部分江河流域水面上升, 加上水质的恶化、水体中氮磷营养物质富集, 为大藻提供了理想的生息场所。诸多因素影响下, 大藻在中国南部的淡水河道以及库区流域内迅速生长, 抑制和排斥了本地水生生物繁殖, 对当地的生态系统安全构成了严重威胁。据报道, 大藻已经在云南、广西、贵州、福建等省泛滥成灾, 且成灾范围广, 受灾程度深<sup>[6]</sup>。大藻在入侵早期阶

段往往以零散个体或碎片形式存在, 传统形态学调查难以及时发现, 导致防控时机延误, 从而造成大规模入侵现象。因此, 建立一种高灵敏度、特异性强、适应复杂环境条件的分子检测方法, 对于大藻的早期预警和快速防控具有重要意义。

近年来, 环境DNA(Environmental DNA, eDNA)技术在入侵生物学和防控研究中展现出独特优势<sup>[7-9]</sup>。采用eDNA技术进行入侵物种监测, 不仅能降低野外调查的工作量和漏检率, 还能为防控措施的及时实施提供科学依据, 从而提高防控效率并降低治理成本<sup>[10-16]</sup>。然而, 针对水生植物的eDNA研究进展相对缓慢, 现有成果有限<sup>[17]</sup>, 主要原因在于植物DNA释放机制特殊(如根系分泌、组织碎片脱落等), 其释放量低且易受环境降解, 使得检测灵敏度和特异性均面临挑战<sup>[18]</sup>。此外, 现有研究大多依赖于叶绿体或核基因的有限片段进行引物设计<sup>[19-20]</sup>, 缺乏对近缘物种完整叶绿体基因组的系统比较, 增加了交叉扩

收稿日期: 2025-08-16 修回日期: 2025-08-21

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFC2601301); 临港新片区海洋生物医药科技创新型平台(RWS-2025-004)

作者简介: 陈雨萱(2002—), 女, 硕士研究生, 研究方向为入侵物种和环境DNA技术。E-mail: 3207273168@qq.com

通信作者: 李晨虹, E-mail: chli@shou.edu.cn

版权所有 ©《上海海洋大学学报》编辑部(CC BY-NC-ND 4.0)

Copyright © Editorial Office of Journal of Shanghai Ocean University (CC BY-NC-ND 4.0)

<http://www.shhydxxb.com>

增和漏检风险。因此,如何在基因组水平上筛选特异靶标并设计出兼具高灵敏度与高特异性的引物组合,成为水生植物eDNA检测方法学亟待解决的关键问题<sup>[8-9]</sup>。

针对上述问题,本研究进行了创新改进,旨在开发一套专用于检测入侵植物大藻的多重PCR特异性引物组合,实现对大藻在环境样本中的高效检测。具体目标包括:(1)结合k-mer基因组特征分析与叶绿体全基因组比对进行引物设计;(2)评估各引物及其组合在不同样品(组织样、养殖水样、自然水体样)中的扩增效果;(3)检测方法的灵敏度与特异性。研究结果可为大藻的分子监测提供技术支撑,并为今后水生入侵植物eDNA快速检测方法建立提供实践范例。

## 1 材料与方法

### 1.1 引物设计与筛选

基于k-mer分析策略和叶绿体全基因组比对,设计并筛选特异性检测大藻的PCR引物。首先从NCBI公共数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)系统检索并下载天南星科全部叶绿体全基因组序列,共获得19条完整序列,包括*Pistia stratiotes* (NC\_048522.1) (MN\_885890.1) , *Steudnera colocasiifolia* (NC\_051952.1) , *Colocasia esculenta* (LC\_851499.1) , *Spirodela polyrhiza* (NC\_015891.1) , *Sauromatum giganteum* (NC\_050648.1) , *Colocasia esculenta* (MT447084.1) , *Typhonium trilobatum* (MT447084.1) , *Zantedeschia aethiopica* (NC\_035499.1) , *Typhonium blumei* (NC\_051872.1) , *Pinellia pedatisecta* (NC\_058756.1) , *Arisaema heterophyllum* (NC\_063965.1) , *Wolffia australiana* (NC\_015899.1) , *Typhonium roxburghii* (MT884860.1) , *Sauromatum giganteum* (NC\_050648.1) , *Amorphophallus albus* (NC\_067990.1) , *Caladium bicolor* (NC\_060474.1) , *Philodendron hederaceum* (NC\_064988.1) , *Landoltia punctata* (KY993959.1)。采用生物信息学方法构建k-mer索引数据库<sup>[21]</sup>,具体流程:将全部序列切割为18 bp长度的k-mer片段<sup>[22]</sup>,精确记录每个k-mer在各序列中的位置信息。以目标物种大藻叶绿体基因组的首个k-mer(K1)为起始点,通过严格比对算法寻找所有可能的相邻k-

mer(K2),匹配条件要求K1的后17个碱基与K2的前17个碱基完全一致。通过这一迭代比对过程,最终获得所有连续一致的序列区间,并详细记录其基因组位置和片段长度,直至完整覆盖目标物种全基因组。为确保引物的特异性,本研究专门提取仅在大藻基因组中出现且长度大于90 bp的独特序列区间<sup>[23]</sup>,并利用BLAST工具与所有叶绿体基因组进行比对验证。采用本地化运行的Primer 3软件进行引物设计,设置严格的筛选参数:扩增产物长度为90~300 bp,引物长度为18~22 bp,退火温度为57~63 °C,GC含量45%~55%,其余参数保持软件默认设置。经过多轮优化和验证,最终筛选出4对分值高、特异性强的优质引物,分别命名为PS\_7至PS\_10,详细序列特征和参数见表1。本研究为大藻研究设计的物种特异性引物检索软件已经申请软件著作权(2024SR0998189)。

### 1.2 样品采集与eDNA提取

本研究采用多类型样本进行引物特异性验证,样本类型包括目标物种大藻组织样本、近缘物种紫萍(*Spirodela polyrhiza*)组织样本、人工养殖水体样本以及自然水体样本。其中,大藻组织样本取自实验室标准栽培植株,确保样本来源的可靠性<sup>[24]</sup>。水样采集过程严格执行标准化操作流程<sup>[25-26]</sup>,采用5 L聚碳酸酯专用采水器进行采样,每个采样点采集2 L水样,并在现场立即使用0.45 μm孔径的混合纤维素膜(PALL, USA)进行真空抽滤处理<sup>[27]</sup>,全程控制在30 min内完成。抽滤结束后,滤膜迅速转移至预先装有CTAB裂解液(体积比为1:1)的2 mL无菌离心管中,置于-20 °C低温环境保存直至DNA提取<sup>[28]</sup>。

环境DNA提取采用改良CTAB法进行<sup>[29]</sup>。首先将含有样品的滤膜置于CTAB裂解液中进行裂解处理,在60 °C恒温水浴条件下反应8 h,其间定时振荡以充分混匀。裂解完成后,加入等体积的氯仿-异戊醇混合液(体积比24:1),充分混匀后在7 000 r/min条件下离心15 min。小心吸取上层水相,加入适量异丙醇和5 mol/L NaCl进行DNA沉淀。沉淀过程在-20 °C环境中静置1 h后,采用12 000 r/min高速离心15 min收集DNA沉淀。随后使用70%乙醇洗涤沉淀2次,室温风干后将DNA溶解于50 μL TE缓冲液,最后保存于-20 °C冰箱备用。整个提取过程在洁净实验环

境中进行,并设置阴性对照以排除潜在污染。该方法在保证DNA提取质量的同时,能够有效去除环境样本中常见抑制物,为后续PCR扩增提供高质量模板。

### 1.3 特异性测试

通过严格的分子生物学实验验证引物的物种特异性,选取目前国内亲缘关系最近的物种之一紫萍作为关键对照物种。实验采用设计出的引物对大藻和紫萍的组织DNA进行PCR扩增分析。PCR反应条件经过系统优化:初始95℃热启动5 min确保DNA完全变性;后续40个循环的扩增程序设置为95℃变性30 s、56℃退火90 s、72℃延伸30 s;最后68℃终延伸10 min保证产物完整性。实验设计中每组反应均设置无模板空白对照,严格监控可能存在的污染或非特异性扩增。扩增产物采用1.5%琼脂糖凝胶电泳分离,通过专业紫外成像系统观察和分析电泳条带特征。

经过上述严格验证的合格引物组合方可进入后续灵敏度测试和实际环境样本验证阶段,确保检测体系的可靠性和准确性。特异性判定标准如下:(1)要求目标物种大藻必须出现清晰、单一且符合目标长度(100~200 bp)的扩增条带;(2)近缘物种紫萍样本中不得检测到任何扩增产物;(3)空白对照必须保持阴性。任何在非目标物种中出现扩增条带的引物均视为存在交叉反应,将直接淘汰该引物。

### 1.4 多重PCR反应体系与条件优化

建立了多重PCR检测体系,通过同时使用筛选出的几对特异性引物,提升了检测灵敏度,并增强在复杂环境样本中的适用性<sup>[30]</sup>。为克服环境样本中常见的PCR抑制效应,反应体系中特别添加了牛血清白蛋白(BSA)作为PCR增强剂<sup>[27]</sup>。经过反复优化,最终确定的多重PCR反应体系:使用5 μL 2×Multiplex PCR Master mix酶溶液,加入0.5 μL BSA溶液,3 μL DNA模板,以及每对引物(20 μmol/L)各0.1 μL,最后用无菌无酶水补足至10 μL反应体积。反应程序经过系统优化:首先95℃预变性5 min确保模板完全解链;随后进行40个循环的扩增反应,每个循环包括95℃变性30 s、56℃退火90 s、72℃延伸30 s;最后68℃终延伸10 min以确保产物完整性。扩增产物分

析采用标准化电泳流程:在1.5%琼脂糖凝胶上以110 V恒压电泳40 min,完成后通过专业凝胶成像系统观察和记录条带分布。

### 1.5 测序和数据分析

将第一阶段PCR获得的PCR产物在第二阶段PCR(PCR2)中进行扩增,以整合 Illumina 接头和8 bp 双索引条形码,便于测序。具体而言,使用标准 Illumina P5 和 P7 索引引物扩增4 μL 每个 PCR1 产物。反应混合物:10 μL 2× 多重 PCR Master Mix 酶(QIAGEN, 德国)、4 μL DNA 模板、1 μL P5/P7 引物(10 μmol/L), 以及无核酸酶水至最终体积 20 μL。反应条件:95℃初始变性 5 min, 然后 15 个循环, 95℃变性 15 s, 53℃退火 15 s, 72℃延伸 15 s, 最后 72℃延伸 5 min。使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析扩增产物, 将条带符合测序要求的样本在北京诺禾致源科技股份有限公司(北京,中国)使用 Illumina NovaSeq 6000 平台进行高通量测序。所有测序数据在 Linux 服务器上进行生物信息学分析。分析步骤包括:使用 fastp 对原始 reads 进行质量控制<sup>[31]</sup>, 去除含有接头污染、过短或低质量的序列, 确保后续分析的可靠性;采用 FLASH 程序将成对的 reads (R1, R2) 进行拼接, 得到完整的扩增子序列;对拼接后的序列, 使用自编写的 Python 脚本进行引物识别;脚本根据设定分别统计每个引物匹配的 reads 数量<sup>[32-33]</sup>;将每个样本的引物匹配 reads 数量除以该样本总 reads 数, 计算出相对扩增比例, 并用 GraphPad Prism 进一步统计分析与绘图。

### 1.6 灵敏度评估

为评估各引物对大藻环境DNA的检测灵敏度, 分别采用单引物及组合引物体系进行检测限(Limit of detection, LOD)测定<sup>[34]</sup>。首先使用 Nanodrop 2000(Thermo Fisher Scientific)精确测定大藻组织DNA的初始浓度(4.30 ng/μL), 随后进行5倍梯度连续稀释9次, 共有10个梯度(4.30、0.86、1.72×10<sup>-1</sup>、3.43×10<sup>-2</sup>、6.88×10<sup>-3</sup>、1.38×10<sup>-3</sup>、2.75×10<sup>-4</sup>、5.5×10<sup>-5</sup>、1.1×10<sup>-5</sup>、2.2×10<sup>-6</sup> ng/μL)。PCR反应体系与扩增条件同1.3节(特异性验证部分)。检测限(LOD)定义为阳性检出率达到95%的最低模板浓度。通过比较单引物与组合引物的检出限, 分析多重PCR对检测灵敏度的提升效果。

### 1.7 引物组合适用性验证

为全面评估多重引物体系的实用性,选取3类代表性样本进行检测:大藻组织DNA样本、人工养殖水体样本和自然水体环境DNA样本。特别针对我国多个大藻入侵区域(包括浙江、湖南、广东、洞庭湖、重庆和江苏等地)的自然水体样本进行检测验证。通过比较不同来源样本的扩增条带强度,客观评价该检测方法对不同类型样本的适用性<sup>[15]</sup>。所有PCR扩增实验均设置空白对照,严格排除实验过程中可能存在的污染干扰。这一系统验证过程充分证实了该多重引物组合在复杂环境样本中的稳定性和可靠性。

## 2 结果

### 2.1 引物设计结果

采用生物信息学方法对大藻及其近缘物种的叶绿体基因组进行了系统分析。通过k-mer比对技术,成功鉴定出2个高度特异的基因组区域,这些区域在大藻中具有独特的序列特征。基于这些特征性区域,精心设计了4对多重PCR引物(P7、P8、P9、P10,表1)。所有引物均表现出优异的理论特性:引物长度控制在18~22 bp,退火温度稳定在57~63 °C,扩增产物长度统一在100~150 bp,这个尺寸范围特别适合环境DNA样本中常见的片段化DNA模板。引物的GC含量保持在40%~60%的理想范围,确保扩增效率和特异性之间的最佳平衡。

### 2.2 特异性验证

通过系统性的PCR扩增实验验证,所有4对

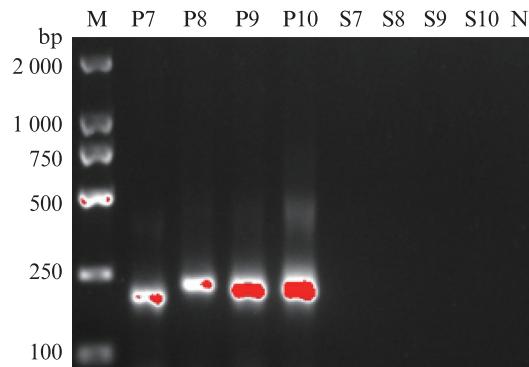
设计引物(PS\_7至PS\_10)均表现出优异的物种特异性。在目标物种大藻的组织DNA样本中,各引物均能产生预期大小的清晰扩增条带,条带位置与理论预测完全吻合,而且在紫萍组织DNA样本中,所有引物均未检测到任何扩增产物,这一结果充分证明了引物设计的特异性。实验设置的空白对照组(无DNA模板)同样保持阴性结果,排除了实验系统可能存在的污染或非特异性扩增干扰(图1)。这一系列严格的验证实验证实,本研究设计的引物组合能够实现大藻的特异性检测,为后续环境样本中的应用提供了可靠保障。

### 2.3 多重PCR体系优化

基于单引物扩增的良好性能,成功构建了包含4对引物(PS\_7至PS\_10)的多重PCR检测体系。经过系统的反应条件优化,确定56 °C为最佳退火温度,在该条件下各引物均能保持高效扩增。为验证该体系的适用性,将其应用于3类典型样本的检测:实验室培养的大藻组织样本、人工养殖水体样本以及来自浙江、湖南、广东、洞庭湖、重庆和江苏等不同地理区域的自然水体样本。实验结果显示所有样本类型均能获得清晰可辨的目标条带(图2和图3),其中组织样本由于DNA完整性较高,扩增效率最佳,条带信号最强;环境水体样本虽然条带强度有所减弱,但依然保持稳定可靠的检出能力。这一结果表明,本研究建立的多重PCR体系能够适应不同环境样本,在保证检测特异性的前提下,显著提高了对大藻环境DNA的检出能力,为野外大藻的快速检测和监测提供了高效的技术手段。

表1 大藻特异性多重PCR引物信息  
Tab. 1 Information of specific multiplex PCR primers for *Pistia stratiotes*

引物组名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	在大藻叶绿体基因组上的位置 Location on chlorophyll genome of <i>Pistia stratiotes</i>	扩增子长度 Amplicon length/bp
PS_7	CCCAGGTCAGTTGTAGTCTAA TCCAGGGCATATGATAGTTCG	36157-36275	119
PS_8	TGTCCGCCTCCAAAAAGGTT AGACCACGACTGATCCTGAA	4073-4209	137
PS_9	TGTCCGCCTCCAAAAAGGTT AAGACCACGACTGATCCTGAA	4073-4210	138
PS_10	TTGTCGCCTCCAAAAAGGT AGACCACGACTGATCCTGAA	4072-4209	138

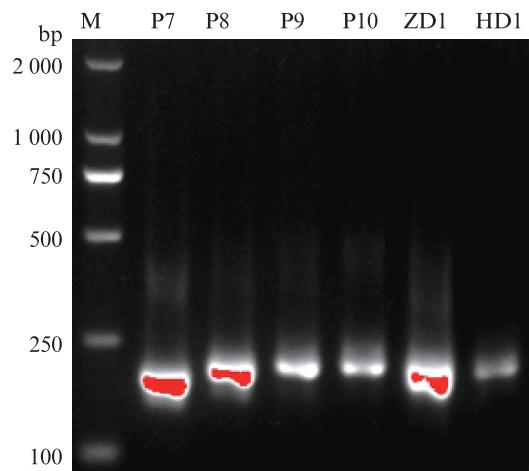


M. 标准DNA Marker 2 000; P7-P10. 引物 PS\_7-PS\_10 扩增大藻组织样DNA的产物; S7-S10. 引物 PS\_7-PS\_10 扩增紫萍组织样DNA的产物; N. 空白对照。

M. Standard DNA Marker 2 000; P7-P10. Primers PS\_7-PS\_10, PCR amplification products of DNA from large duckweed tissue samples; S7-S10. Primers PS\_7-PS\_10, PCR amplification products of DNA from duckweed tissue samples; N. Blank control.

图1 4种引物特异性测试结果

Fig. 1 Specificity test results of four primer sets

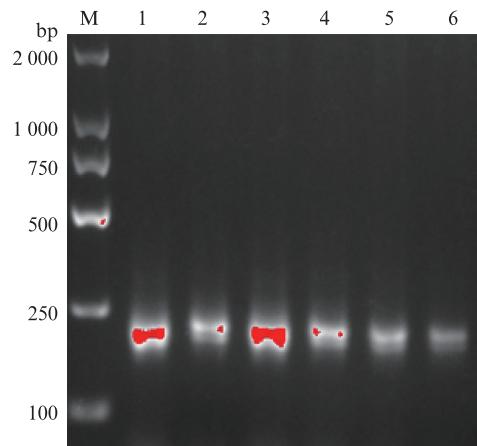


M. 标准DNA Marker 2 000; P7-P10. 引物 PS\_7-PS\_10 扩增大藻组织样DNA的产物; ZD1. 引物组合扩增大藻组织样DNA的产物; HD1, 引物组合扩增养殖水样DNA。

M. Standard DNA Marker 2 000; P7-P10. Primers PS\_7-PS\_10, PCR amplification products of DNA from large-leaved plant tissue samples; ZD1. Primer combination, PCR amplification products of DNA from large-leaved plant tissue samples; HD1. Primer combination, PCR amplification products of DNA from aquaculture water samples.

图2 单个引物与4个引物组合扩增结果

Fig. 2 Amplification results of single primer and combination of 4 primers



M. 标准DNA Marker 2 000; 1-6. 浙江、湖南、广东、洞庭湖、重庆、江苏地区水样的多重PCR扩增产物。

M. Standard DNA Marker 2 000; 1-6. Multiple PCR amplification products from water samples collected in Zhejiang, Hunan, Guangdong, Dongting Lake, Chongqing, and Jiangsu regions.

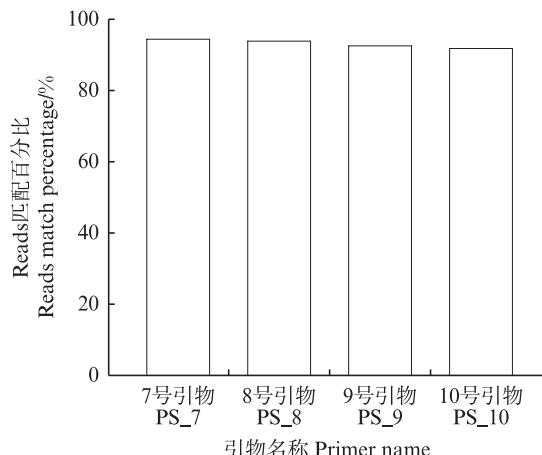
图3 多重引物组扩增自然水样结果

Fig. 3 Amplification results of multiplex primer sets for natural water samples

#### 2.4 测序结果

为评估单引物与多重引物系统在实际样本(组织样本/水样)中的扩增表现和分布特征,对以下分组的高通量测序数据进行了对比分析:单引物扩增组织样本以及多重引物样本扩增组织样本(ZD1)和水样(HD1)。各引物扩增产物的相对丰度按(引物匹配 Reads 数/测序总 Reads 数)×100%进行计算,并用于下文绘图与比较(图4和图5)。由于引物 PS\_8、PS\_9、PS\_10 扩增区域重叠,因此在组合引物样本中合并计算。

图4为单引物样本扩增大藻组织样的柱状图,柱高表示目标序列在样本中占测序 Reads 的百分比。结果显示:每个单引物样本中,目标序列均占主导(PS\_7 约占测序 Reads 的 94.50%; PS\_8 约占测序 Reads 的 93.99%; PS\_9 约占测序 Reads 的 92.88%; PS\_10 约占测序 Reads 的 91.90%),表明单引物扩增时目标产物高度富集,检测特异性良好。该图结果证明所设计的单引物在各自样本中都有比较高的扩增效率。



每个柱子表示在单引物扩增条件下目标序列在样本中占测序 reads 的百分比。

Each bar represents the percentage of sequencing reads accounted for by the target sequence in the sample under single-primer amplification conditions.

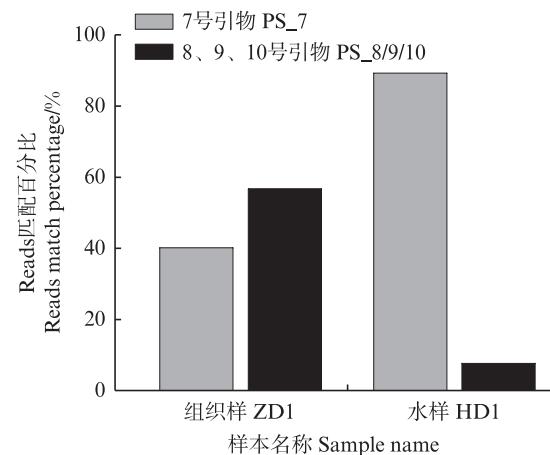
图4 单引物在单对PCR中的检测效果

Fig. 4 Performance of single-primer sets in singleplex PCR

图5展示了两种样本类型(组织样本ZD1和水样HD1)在相同多重PCR条件下各引物组(PS\_7、PS\_8/PS\_9/PS\_10)的扩增效率比较。实验结果显示,在组织样本ZD1中,PS\_8/PS\_9/PS\_10引物组表现出相对均衡的扩增(约56.84%),而在水样HD1中则观察到显著的扩增偏倚:PS\_7引物占据绝对优势(89.32%),而PS\_8/PS\_9/PS\_10引物组的扩增效率大幅降低至7.7%。这种样本依赖性扩增偏倚现象提示,水样中环境DNA的特性(如低浓度、高度片段化)可能导致引物间的竞争性扩增强度差异。特别值得注意的是,PS\_7的高扩增效率可能通过模板竞争机制抑制其他引物的检测信号。基于这些发现,建议在环境水样检测应用中,应对多重PCR体系进行以下优化:调整各引物浓度配比;优化退火温度;考虑添加PCR增强剂,以改善多位点检测的均衡性和整体灵敏度。这些优化措施将有助于提高水样中低丰度目标序列的检出率。

## 2.5 灵敏度评估

通过系统的梯度稀释实验对引物检测灵敏度进行了全面评估,结果见图6。单引物体系中,PS\_7和PS\_10的检测灵敏度较高,95% LOD都为 $0.69 \times 10^{-2}$  ng/ $\mu$ L;PS\_8和PS\_9的灵敏度相对较低,95% LOD分别为 $0.34 \times 10^{-1}$  ng/ $\mu$ L和 $0.17$  ng/ $\mu$ L。

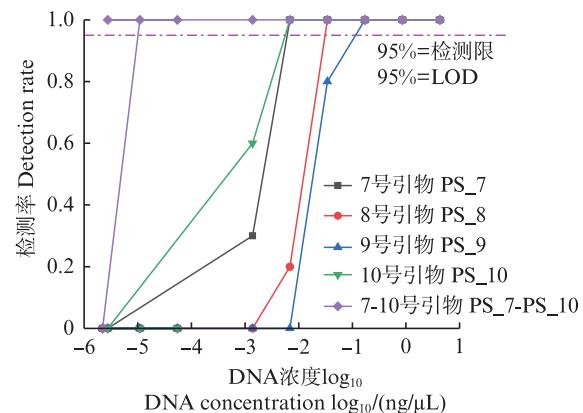


比较同一多重 PCR 条件下,组织样(ZD1)与水样(HD1)中各引物(PS\_7 - PS\_10)占总测序 reads 的百分比。柱高为百分比值。图用于展示多重体系下各引物相对扩增丰度的差异。

Compare the percentage of each primer (PS\_7 - PS\_10) in the total sequencing reads between tissue samples (ZD1) and water samples (HD1) under the same multiplex PCR conditions. The column height represents the percentage value. The figure is used to illustrate the differences in relative amplification abundance among primers in the multiplex system.

图5 多重PCR中不同引物在组织与水样中的扩增比例比较

Fig. 5 Comparison of read ratios amplified with different primer sets in multiplex PCR between tissue and water samples



不同DNA浓度(ng/ $\mu$ L)下单个引物组(PS\_7, PS\_8, PS\_9, PS\_10)和引物组合(PS\_7-PS\_10)的检测率。该图展示了95% 检测限 (LOD) 以及低模板浓度下检测的一致性。PS\_7-PS\_10是指所有4对引物的组合。

Detection rates of individual primer sets (PS\_7, PS\_8, PS\_9, PS\_10) and primer combinations (PS\_7-PS\_10) at different DNA concentrations (ng/ $\mu$ L). This figure shows the 95% limit of detection (LOD) and the consistency of detection at low template concentrations. PS\_7-PS\_10 refers to the combination of all four primer pairs.

图6 单个引物以及组合引物灵敏度测试结果

Fig. 6 Sensitivity test results for single primers and primer combination

多重 PCR 体系(PS\_7~PS\_10)的灵敏度显著高于任一单引物,其95% LOD 达到  $1.1 \times 10^{-5}$  ng/ $\mu$ L,比最优单引物(PS\_7或PS\_10)提升约625倍( $P<0.01$ )。实验数据证实,本研究建立的多重PCR体系能够显著提升对大藻环境DNA的检测灵敏度,满足野外调查中对微量DNA的检测需求。

### 3 讨论

水生植物的eDNA释放机制与动物相比具有显著差异。鱼类、两栖类等动物通过排泄物、表皮细胞或体液等方式持续主动释放DNA,因此其eDNA检测灵敏度相对较高;而水生植物主要依赖根系分泌、组织碎片或自然死亡残体的脱落来释放DNA,释放过程通常被动且受环境条件影响较大,因而检测信号不稳定<sup>[35~36]</sup>。这些特性使得植物eDNA检测面临更大的技术挑战,也对分子检测方法的灵敏度提出了更高要求。大藻作为大型漂浮植物在其大规模暴发时易于通过肉眼观测发现,但这并不意味着eDNA检测技术在其监测过程中是多余的。在入侵初期阶段,大藻种群往往呈现数量稀少、分布隐蔽的特点,单个植株可能隐匿于岸边植被中或仅以断枝形式存在,这些情况都极易被传统调查方法所遗漏。特别是在大型水体如湖泊、水库等环境中,大藻可能以零散分布的形式存在,尚未形成明显的表面聚集现象,且大藻具有多种传播途径,包括水流漂移、禽类携带、船只运输等,这些都可能使其在未被察觉的情况下实现前期扩散,而此时eDNA检测技术就能发挥关键的监测作用。此外,大藻具有与其他水生植物不同的生物学特性:其叶片极易在群落密集或营养盐富集条件下黄化、枯萎并脱落至水体中,因此大藻也并不适合作为环境修复植物<sup>[37]</sup>,但是这一特性意味着大藻在环境中释放的DNA量可能较其他水生植物更为丰富,因而更适合通过eDNA技术进行早期监测,为本研究建立的检测体系提供了生物学基础。

本研究针对以上问题,提出并验证了一条系统性的技术路线,显示出较强的科学性与实用性。首先,在引物设计方面,创新性地采用了k-mer基因组特征分析结合叶绿体全基因组比对的策略。与传统依赖局部基因片段(如ITS或特定叶绿体基因区)的设计方法相比,该策略能够从

全叶绿体基因组角度筛选出真正具有物种特异性的片段,最大程度地降低了与近缘物种发生交叉扩增的风险。实验证据表明,本研究设计的4组引物在近缘物种紫萍中均无扩增产物,验证了该策略在保证检测特异性方面的有效性。其次,在检测体系构建上,本研究通过多重PCR技术实现了多位点同时检测,提高了检测体系的灵敏度。现有研究的沉水植物的eDNA引物通常检测限为  $10^{-4} \sim 10^{-3}$  ng/ $\mu$ L<sup>[14]</sup>,而本研究的多重PCR体系最低检出限达  $1.1 \times 10^{-5}$  ng/ $\mu$ L,且具有较强的稳定性。即便某些目标片段因降解而无法扩增,其余位点仍可产生有效信号,这种“多位点同时检测”的设计理念,有效降低了漏检风险。这一设计思路尤其适用于入侵早期、环境DNA稀释严重的场景,弥补了传统方法在低丰度检测中的不足。再者,结果表明该体系在组织样本、养殖水体和自然水体等多类样品中均表现出稳定的扩增效果,验证了其在不同环境背景下的适用性和可靠性。这一发现为将eDNA方法从实验室推广到野外实际监测提供了重要支持。从经济成本的角度来看,本方法仅需常规PCR仪和电泳设备,仅在3 h内即可完成,大大降低了技术门槛和使用成本。这一特点使其特别适合在基层监测站点和资源有限的地区推广应用。考虑到野外监测的实际需求,未来的研究可以进一步开发基于该体系的现场快速检测方案,例如结合横向流动试纸条或便携式PCR设备,实现真正意义上的“现场采样、即时检测”。

尽管本研究已验证了eDNA技术在大藻早期检测中的有效性,但在入侵植物乃至更广泛的入侵生物监测中,仍存在若干亟待突破的技术瓶颈。首先,eDNA在环境中的降解机制尚未完全阐明,不同水体条件(如温度、pH、营养盐水平和微生物活性)下,DNA的保存与衰减速率差异显著,增加了检测结果的不确定性<sup>[38]</sup>。其次,复杂水样中常含有多种抑制因子(如腐殖酸、金属离子等),仍是影响PCR扩增效率和检测灵敏度的关键因素。此外,eDNA浓度与入侵种群数量或生物量之间的关系尚未建立可靠的定量模型,不同物种间DNA释放速率差异极大,限制了其在种群规模评估和动态预测中的应用<sup>[39]</sup>。未来研究需要在标准化采样与保存方法、环境因子校正模型的建立、以及野外便携式快速检测平台开发

等方面取得突破,以推动eDNA技术从实验室验证走向野外应用,并真正成为入侵生物监测和防控的常规工具<sup>[40]</sup>。

#### 4 结论

本研究基于eDNA技术,通过创新性地结合k-mer基因组特征分析方法和多重PCR技术,筛选并验证了4组高特异性引物(PS\_7、PS\_8、PS\_9、PS\_10)构建的多重PCR检测系统具有优异的灵敏度(最低检出限 $1.1 \times 10^{-5}$  ng/ $\mu$ L)和特异性(与紫萍等近缘种无交叉反应),有效识别自然水体中的大藻eDNA信号,成功开发了一套高效、稳定的大藻特异性检测体系,突破入侵早期和低密度阶段的监测难题。本研究不仅建立了一套完整的大藻分子监测技术方案,更重要的是提出了一套适用于水生入侵植物检测的通用技术路线,包括基于叶绿体全基因组特征的引物设计策略、多重PCR体系优化方法以及野外样本检测验证流程。未来研究可进一步:(1)开发基于该系统的实时定量检测方法;(2)研制便携式现场检测装置;(3)构建配套的数据库和分析平台,从而形成从实验室到野外的完整技术链条,为水生入侵植物的防控提供更加有力的技术支撑。

作者声明本文无利益冲突。

#### 参考文献:

- [1] RUNYON J B, BUTLER J L, FRIGGENS M M, et al. Invasive species and climate change (Chapter 7) [R]// Climate Change in Grasslands, Shrublands, and Deserts of the Interior American West: A Review and Needs Assessment. Fort Collins, Colorado, USA: Department of Agriculture, Forest Service, Rocky Mountain Research Station, 2012: 97-115.
- [2] 廖慧璇,周婷,陈宝明,等.外来入侵植物的生态控制[J].中山大学学报(自然科学版),2021,60(4):1-11.
- LIAO H X, ZHOU T, CHEN B M, et al. Ecological control of exotic invasive plants [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni*, 2021, 60(4): 1-11.
- [3] PIMENTEL D, ZUNIGA R, MORRISON D. Update on the environmental and economic costs associated with alien-invasive species in the United States[J]. *Ecological Economics*, 2005, 52(3): 273-288.
- [4] 华汝城.大藻—水浮莲[J].生物学通报,1957(4): 35-40.
- HUA R C. *Pistia stratiotes*-Water Lettuce [J]. *Biology Bulletin*, 1957(4): 35-40.
- [5] 颜素珠.中国水生高等植物图说[M].北京:科学出版社,1983.
- YAN S Z. *Illustrated Handbook of Aquatic Higher Plants in China* [M]. Science Press, Beijing, 1983.
- [6] 马国君,张振兴,张颖洁.外来物种入侵灾变治理的困境与对策研究——以清水江三板溪库区“水白菜”泛滥为例[J].原生态民族文化学刊,2014,6(4): 2-13.
- MA G J, ZHANG Z X, ZHANG Y J. Dilemma and countermeasures of disaster management of invasive alien species: A case study of water lettuce growth in the Sanbanxi reservoir [J]. *Journal of Original Ecological National Culture*, 2014, 6(4): 2-13.
- [7] 赵紫华,吴品珊,许益镌,等.外来入侵物种精准防控的主动性策略[J].植物保护学报,2023,50(6): 1379-1387.
- ZHAO Z H, WU P S, XU Y J, et al. Proactive prevention and management for controlling invasive alien species [J]. *Journal of Plant Protection*, 2023, 50 (6) : 1379-1387.
- [8] 林志强.环境DNA技术结合物种分布模型在外来入侵种早期监测中的应用[D].石河子:石河子大学,2023.
- LIN Z Q. Application of environmental DNA technology combined with species distribution model in early detection of alien invasive species [D]. Shihezi: Shihezi University, 2023.
- [9] 欧阳美凤,方平,何飞祥,等.环境DNA技术在水生入侵物种监测中的应用研究进展[J].湖南理工学院学报(自然科学版),2025,38(2): 57-62.
- OUYANG M F, FANG P, HE F X, et al. Research progress on the application of environmental DNA technology in aquatic invasive species monitoring [J]. *Journal of Hunan Institute of Science and Technology (Natural Sciences)*, 2025, 38(2): 57-62.
- [10] 张利茹, KINGSLY C, BENG, CORLETT, RICHARD T. 环境DNA技术及其应用[J].水利信息化,2023,(4): 97-98.
- ZHANG L R, KINGSLY C, BENG, CORLETT, RICHARD T. Applications of environmental DNA (eDNA) in ecology and conservation: opportunities, challenges and prospects [J]. *Water Resources Informatization*, 2023, (4): 97-98.
- [11] THOMSEN P F, WILLERSLEV E. Environmental DNA—An emerging tool in conservation for monitoring past and present biodiversity [J]. *Biological Conservation*, 2015, 183: 4-18.
- [12] FICETOLA G F, MIAUD C, POMPANON F, et al. Species detection using environmental DNA from water samples[J]. *Biology Letters*, 2008, 4(4): 423-425.
- [13] SCRIVER M, MARINICH A, WILSON C, et al. Development of species-specific environmental DNA

- (eDNA) markers for invasive aquatic plants [J]. *Aquatic Botany*, 2015, 122: 27-31.
- [14] ANGLÈS D'AURIAC M B, STRAND D A, MJELDE M, et al. Detection of an invasive aquatic plant in natural water bodies using environmental DNA [J]. *PLoS One*, 2019, 14(7): e0219700.
- [15] WILCOX T M, CARIM K J, MCKELVEY K S, et al. The dual challenges of generality and specificity when developing environmental DNA markers for species and subspecies of *Oncorhynchus* [J]. *PLoS One*, 2015, 10(11): e0142008.
- [16] 杨力风, 杨楠, 付海滨, 等. 环境DNA技术在生物入侵研究中的应用进展 [J]. *植物保护学报*, 2023, 50(1): 1-10.
- YANG L F, YANG N, FU H B, et al. Research advances in the application of environmental DNA (eDNA) technique in biological invasions [J]. *Journal of Plant Protection*, 2023, 50(1): 1-10.
- [17] DRUMMOND J A. The role of sampling location and depth in the performance of lake plant environmental DNA metabarcoding [D]. Houston: Rice University, 2020.
- [18] GANTZ C A, RENSHAW M A, ERICKSON D, et al. Environmental DNA detection of aquatic invasive plants in lab mesocosm and natural field conditions [J]. *Biological Invasions*, 2018, 20(9): 2535-2552.
- [19] 程云山, 任艺晨, 席贻龙, 等. 基于环境DNA技术和形态学鉴定的浮游植物多样性比较 [J]. *湖泊科学*, 2024, 36(5): 1336-1352.
- CHENG Y S, REN Y C, XI Y L, et al. Comparative study on the biodiversity of phytoplankton based on environmental DNA technology and morphological identification [J]. *Journal of Lake Sciences*, 2024, 36(5): 1336-1352.
- [20] 郭婷, 付智豪, 周春花, 等. 基于环境DNA宏条形码的鄱阳湖真核浮游植物多样性研究 [J]. *水生态学杂志*, 2023, 44(5): 67-75.
- GUO T, FU Z H, ZHOU C H, et al. Diversity of eukaryotic phytoplankton in Poyang Lake based on environmental DNA metabarcoding [J]. *Journal of Hydroecology*, 2023, 44(5): 67-75.
- [21] MARÇAIS G, KINGSFORD C. A fast, lock-free approach for efficient parallel counting of occurrences of *k*-mers [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(6): 764-770.
- [22] CHIKHI R, MEDVEDEV P. Informed and automated *k*-mer size selection for genome assembly [J]. *Bioinformatics*, 2014, 30(1): 31-37.
- [23] THALINGER B, EMPEY R, COWPERTHWAITE M, et al. BirT: a novel primer pair for avian environmental DNA metabarcoding [EB/OL]. (2023-08-09) [2024-07-20].
- [24] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochemical Bulletin*, 1987, 19(1): 11-15.
- [25] TURNER C R, UY K L, EVERHART R C. Fish environmental DNA is more concentrated in aquatic sediments than surface water [J]. *Biological Conservation*, 2015, 183: 93-102.
- [26] YAMANAKA H, MINAMOTO T, MATSUURA J, et al. A simple method for preserving environmental DNA in water samples at ambient temperature by addition of cationic surfactant [J]. *Limnology*, 2017, 18(2): 233-241.
- [27] DEINER K, WALSER J C, MÄCHLER E, et al. Choice of capture and extraction methods affect detection of freshwater biodiversity from environmental DNA [J]. *Biological Conservation*, 2015, 183: 53-63.
- [28] RENSHAW M A, OLDS B P, JERDE C L, et al. The room temperature preservation of filtered environmental DNA samples and assimilation into a phenol-chloroform-isoamyl alcohol DNA extraction [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2015, 15(1): 168-176.
- [29] DJURHUUS A, PORT J, CLOSEK C J, et al. Evaluation of filtration and DNA extraction methods for environmental DNA biodiversity assessments across multiple trophic levels [J]. *Frontiers in Marine Science*, 2017, 4: 314.
- [30] MIYA M, GOTOH R O, SADO T. MiFish metabarcoding: a high-throughput approach for simultaneous detection of multiple fish species from environmental DNA and other samples [J]. *Fisheries Science*, 2020, 86(6): 939-970.
- [31] CHEN S F, ZHOU Y Q, CHEN Y R, et al. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor [J]. *Bioinformatics*, 2018, 34(17): i884-i890.
- [32] CAMACHO C, COULOURIS G, AVAGYAN V, et al. BLAST+: architecture and applications [J]. *BMC Bioinformatics*, 2009, 10(1): 421.
- [33] ROGNES T, FLOURI T, NICHOLS B, et al. VSEARCH: a versatile open source tool for metagenomics [J]. *PeerJ*, 2016, 4: e2584.
- [34] BUSTIN S A, BENES V, GARSON J A, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments [J]. *Clinical Chemistry*, 2009, 55(4): 611-622.
- [35] UCHII K, DOI H, MINAMOTO T. A novel environmental DNA approach to quantify the cryptic invasion of non-native genotypes [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2016, 16(2): 415-422.
- [36] MATSUHASHI S, DOI H, FUJIWARA A, et al. Evaluation of the environmental DNA method for estimating distribution and biomass of submerged aquatic

- plants[J]. PLoS ONE, 2016, 11(6): e0156217.
- [37] 崔健, 彭颖, 周阳, 等. 中国外来入侵水生植物及其在污染水体生态修复中的应用进展[J]. 植物资源与环境学报, 2024, 33(1): 1-13.
- CUI J, PENG Y, ZHOU Y, et al. Alien-invasive aquatic plants in China and their application progress in ecological remediation of contaminated water [J]. Journal of Plant Resources and Environment, 2024, 33(1): 1-13.
- [38] 马鸿娟, STEWART K, 马利民, 等. 环境DNA及其在水生生态系统保护中的应用[J]. 生态学杂志, 2016, 35(2): 516-523.
- MA H J, STEWART K, MA L M, et al. Environmental DNA and its application in protecting aquatic ecosystems [J]. Chinese Journal of Ecology, 2016, 35(2): 516-523.
- [39] 谷思雨, 陈凯, 金小伟, 等. 水生生物环境DNA监测技术的发展、应用与标准化[J]. 水生生物学报, 2024, 48(8): 1443-1458.
- GU S Y, CHEN K, JIN X W, et al. Development, applications, and standardization of environmental DNA monitoring technology for aquatic organisms [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2024, 48(8): 1443-1458.
- [40] 李晨虹, 凌岚馨, 谭娟, 等. 环境DNA技术在水生生物监测中的挑战、突破和发展前景[J]. 上海海洋大学学报, 2023, 32(3): 564-574.
- LI C H, LING L X, TAN J, et al. Challenge, breakthrough and future perspectives of environmental DNA technology in monitoring aquatic organisms [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2023, 32(3): 564-574.

## Development and validation of primers for monitoring the invasion of water lettuce (*Pistia stratiotes* L.) using environmental DNA based multiplex PCR technology

CHEN Yuxuan<sup>1,2</sup>, LU Liang<sup>1,2</sup>, FANG Minyao<sup>1,2</sup>, LI Chenhong<sup>1,3</sup>

(1. Engineering Research Center of Environmental DNA and Ecological Water Health Assessment, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Shanghai Universities Key Laboratory of Marine Animal Taxonomy and Evolution, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. Marine Biomedical Science and Technology Innovation Platform of Lin-gang Special Area, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** *Pistia stratiotes* L. (water lettuce), as a highly detrimental invasive plant species in China's freshwater ecosystems, has posed significant threats to aquatic ecological security through its rapid proliferation. To enable early monitoring and control of this species, this study developed a highly sensitive and specific detection system based on environmental DNA (eDNA) technology. By integrating k-mer indexing strategies with chloroplast genome alignment analysis, we designed four sets of species-specific multiplex PCR primers (PS\_7, PS\_8, PS\_9, PS\_10). Experimental validation demonstrated that: (1) All individual primers and their combinations effectively amplified target DNA from tissue samples, aquaculture water, and natural water samples; (2) The detection limits reached  $0.69 \times 10^{-2}$  ng/μL for individual primers PS\_7 and PS\_10,  $0.34 \times 10^{-1}$  ng/μL for PS\_8, and 0.17 ng/μL for PS\_9. The multiplex PCR system achieved a detection limit of  $1.1 \times 10^{-5}$  ng/μL, representing approximately a 625-fold improvement in sensitivity compared to the best single primer ( $P < 0.01$ ); (3) Specificity tests confirmed no cross-reactivity with closely related species such as *Spirodela polyrhiza*. The entire detection process can be completed within 3 hours. This established detection system provides reliable technical support for early warning and monitoring of *Pistia stratiotes* invasions, while serving as a practical model for developing rapid eDNA-based detection methods for aquatic invasive plants.

**Key words:** *Pistia stratiotes*; invasive species; environmental DNA (eDNA); multiplex PCR; primer design