

Shen X X, Man L J, Liu Q J, *et al.* Environmental DNA dynamics during reproductive activity of the *Acipenser dabryanus* in captive breeding systems [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2026, 50(4): 042603. [申晓雪, 满李君, 刘青娟, 等. 人工繁育环境中长江鲟繁殖活动的环境DNA动态研究 [J]. 水生生物学报, 2026, 50(4): 042603.]

人工繁育环境中长江鲟繁殖活动的环境DNA动态研究

申晓雪^{1,2} 满李君^{1,2} 刘青娟^{1,2} 李莎³ 刘焕章¹ 俞丹¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 中国长江三峡集团有限公司, 武汉 430000)

摘要: 本研究基于线粒体DNA (mtDNA)和核基因DNA (nuDNA)的数字PCR技术, 揭示了国家一级重点保护鱼类长江鲟(*Acipenser dabryanus*)在人工繁殖过程中的环境DNA动态变化规律。通过设计长江鲟特异性引物与TaqMan探针, 采集不同繁殖阶段的环境DNA样品, 对mtDNA、nuDNA的数字PCR产物浓度及核质比(nuDNA/mtDNA)的变化进行了定量分析。结果表明, mtDNA和nuDNA浓度均在繁殖发生后快速达到峰值, 其中雄鱼挤精后mtDNA浓度升至繁殖前水平的27倍, nuDNA浓度升至130倍; 在雌鱼挤卵后, mtDNA和nuDNA浓度分别达到繁殖前水平的8和13倍。同样, 雄、雌鱼池的核质比在挤精和挤卵后迅速升至峰值(0.14和0.09)。整体来说, 雄、雌鱼池峰值时的mtDNA浓度分别为nuDNA的12与11倍, 且可在繁殖结束后持续检出24—36h, 稳定性与持久性更强; nuDNA则在繁殖行为发生后迅速达到峰值并于12h内快速衰减, 对瞬时繁殖行为的敏感性更强。因此, 环境DNA监测能够精准捕捉长江鲟繁殖活动的分子信号及变化过程, 为揭示长江鲟等珍稀濒危鱼类的繁殖生态特征及非侵入式监测提供了重要技术支撑。

关键词: 环境DNA; 繁殖; 数字PCR; mtDNA; nuDNA; 长江鲟

中图分类号: S932.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2026)04-042603-10

doi: 10.3724/1000-3207.2025.2025.0386 **CSTR:** 32229.14.SSSWXB.2025.0386



长江鲟(*Acipenser dabryanus*)又名达氏鲟, 是我国长江中上游特有的洄游型鱼类, 历史上广泛分布于金沙江下游、长江中上游干支流及与之相连的湖泊^[1,2]。1988年, 长江鲟被列为国家一级重点保护野生动物, 1998年被列入《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES)附录II^[3,4]。2000年以来, 长江鲟野外自然繁殖活动基本停滞^[5]。2010年, 国际自然保护联盟(IUCN)将长江鲟受胁等级评定为“极危”(Critically endangered), 2022年被评定为“野外灭绝”(Extinct in the wild)^[6]。为应对这一困境, 近年来多项研究相继突破了长江鲟的繁殖过程中的关键技术, 如2019年成功实现了长江鲟全人工繁殖技术, 2023年在模拟自然生境的人工产卵室中实现了长江鲟自发繁殖, 2025年成功引导长江鲟完成野外自

然繁殖, 标志着长江鲟保护从人工保种向野外种群重建迈出了关键一步^[7]。与此同时, 长江鲟增殖放流规模扩大, 截至2023年底, 已累计放流长江鲟亲鱼1000余尾, 幼鲟100余万尾^[2]。尽管如此, 目前尚未通过传统捕捞手段监测到长江鲟的自然繁殖行为, 凸显了创新繁殖活动监测方法的必要性。

环境DNA (environmental DNA, eDNA)技术作为一种新兴的生物监测手段, 通过采集水体、土壤、沉积物等环境样本中的生物遗传物质(包括脱落细胞、分泌物、生殖细胞等), 结合PCR扩增等技术, 能够快速实现非侵入式的物种检测^[8-11]。近年来, 研究发现鱼类环境DNA浓度的动态变化可作为评估鱼类繁殖活动的重要分子指标^[11,12]。例如, Bracken等^[13]利用半定量qPCR技术连续3年监测爱

收稿日期: 2025-11-04; **修订日期:** 2025-12-08

基金项目: 科技基础资源调查专项(2022FY100400); 三峡工程运行安全综合监测系统, 库区维护和管理基金(2136703)资助 [Supported by the National Science and Technology Basic Resources Survey Special Project (2022FY100400); the Comprehensive Safety Monitoring System of Three Gorges Project, Reservoir Operation and Management (2136703)]

作者简介: 申晓雪(2002—), 女, 硕士研究生; 研究方向为鱼类进化生物学。E-mail: shenxiaoxue@ihb.ac.cn

通信作者: 俞丹(1985—), 女, 博士; 副研究员; 主要从事鱼类进化生物学方向研究。E-mail: yudan@ihb.ac.cn

尔兰河流中海七鳃鳗(*Petromyzon marinus*)的环境DNA,发现其在繁殖期显著升高。Saito等^[14]对香鱼(*Plecoglossus altivelis*)产卵后的环境DNA监测显示,核基因DNA(nuDNA)的浓度变化可有效反应产卵事件,且在主产卵期的变化较线粒体DNA(mtDNA)更为显著。Bylemans等^[15]发现澳洲麦氏鲈(*Macquaria australasica*)在繁殖期水体中nuDNA显著高于mtDNA,表明核质比变化可指示鱼类的产卵时间与场所。微滴式数字PCR(Droplet Digital PCR, ddPCR)作为第三代PCR技术,通过将反应体系分割为大量独立微滴开展核酸扩增可对目标DNA分子实现绝对定量^[16]。例如,李莎等^[17]在长江宜昌江段利用ddPCR定量分析了四大家鱼的环境DNA浓度,发现其与传统监测到的卵苗密度呈显著相关。

准确掌握珍稀濒危物种的繁殖动态和产卵场位置是制定保护策略的重要基础。然而,长江鲟繁殖期间水体中eDNA的持续时间及其变化过程仍缺乏系统研究。因此,本研究设计了针对长江鲟的特异性mtDNA与nuDNA的引物及相应的TaqMan探针,并在全人工繁殖过程中,系统采集不同繁殖阶段的水环境DNA样品,对mtDNA、nuDNA浓度及核质比(nuDNA/mtDNA)的变化过程进行了定量分析,以揭示其在繁殖前后发生的动态过程。本研究

构建的长江鲟特异性环境DNA定量检测体系,为其增殖放流后的时空分布和野外自然繁殖活动监测提供了精确的技术支撑,不仅有助于推进该物种的繁殖生态学研究,也为其他珍稀濒危水生生物的繁殖监测提供了可推广的方法。

1 材料与方法

1.1 长江鲟全人工繁殖期间的环境DNA样品采集及实验

2023年4月10—13日,在湖北省宜昌中华鲟自然保护区救治监测中心开展长江鲟全人工繁殖实验期间,分别在繁殖活动前、中、后不同阶段采集水体环境DNA样品(表1)。人工繁殖实验期间,雄鱼(6尾)与雌鱼(20尾)分别暂养于两个条件一致的催产池中,单个池面积约50 m²、水深约0.6 m,水体体积约30 m³。在繁殖操作中,分别对雄、雌亲鱼实施人工挤精和挤卵,待精液与卵子收集完毕后立即将亲鱼放回原暂养池。整个实验期间,两池水温、曝气及换水条件均保持一致,以避免环境因素干扰eDNA浓度变化。采样前,使用超纯水将2 L采样瓶及采水器润洗2次,置于10%的漂白粉溶液中浸泡消毒10 min,并再以超纯水润洗2次,以清除外源DNA及潜在污染物。每个独立养殖池采集3个重复水样,采集完成后12 h内完成真空抽滤。使用不锈钢

表1 长江鲟雄、雌鱼全人工繁殖实验的环境DNA采集信息

Tab. 1 Environmental DNA collection information for full artificial propagation experiments of male and female *A. dabryanus*

鱼池Pond	时间Time	繁殖阶段Spawning stage	具体操作Specific operation	采集水样Water sample collection (L)
雄鱼Male	4.10 8:00	繁殖前	无	2×3=6
	4.10 11:10	繁殖中	雄鱼挤精后	2×3=6
	4.10 16:00	繁殖后	无	2×3=6
	4.10 22:30	繁殖后	无	2×3=6
	4.11 9:00	繁殖后第一天早上	无	2×3=6
	4.11 21:00	繁殖后第一天晚上	无	2×3=6
	4.12 9:00	繁殖后第二天早上	无	2×3=6
	4.12 21:00	繁殖后第二天晚上	无	2×3=6
	4.13 9:00	繁殖后第三天早上	无	2×3=6
	4.13 21:00	繁殖后第三天晚上	无	2×3=6
雌鱼Female	4.10 10:35	繁殖前	雌鱼催产针未全部打完	2×3=6
	4.10 11:00	繁殖前	雌鱼催产针全部打完	2×3=6
	4.10 16:00	繁殖前	无	2×3=6
	4.10 22:30	繁殖中	雌鱼挤卵后	2×3=6
	4.11 9:00	繁殖后第一天早上	无	2×3=6
	4.11 21:00	繁殖后第一天晚上	无	2×3=6
	4.12 9:00	繁殖后第二天早上	无	2×3=6
	4.12 21:00	繁殖后第二天晚上	无	2×3=6
	4.13 9:00	繁殖后第三天早上	无	2×3=6
	4.13 21:00	繁殖后第三天晚上	无	2×3=6

四联真空抽滤器,使用孔径0.45 μm 、直径47 mm的硝酸-醋酸混合纤维滤膜进行过滤。在过滤结束后,用镊子将滤膜样品面朝内折叠若干次,放入5 mL 无菌离心管中标记编号,并于 -20°C 保存。滤膜样本的DNA提取采用Qiagen DNeasy PowerWater Kit试剂盒,实验操作严格依照说明书进行。采用ddPCR对所有样品的mtDNA和nuDNA进行定量分析。实验过程中设置阴性对照(无菌无酶水)和阳性对照(长江鲟基因组DNA),每个样品均设置3个重复,以评估实验结果的重复性与可靠性。扩增结束后读取结果以(copies/ μL)表示。每个反应中生成微滴数不低于10000个,最终样品浓度为3次技术重复的算术平均值。

1.2 长江鲟特异性引物和TaqMan探针的设计及验证

从美国国家生物技术信息中心(NCBI)获取长江鲟及其近缘物种的线粒体控制区(D-loop)和核基因*RAG1*序列^[18],包括中华鲟(*Acipenser sinensis*)、俄罗斯鲟(*Acipenser gueldenstaedtii*)、西伯利亚鲟(*Acipenser baerii*)、密西西比铲鲟(*Scaphirhynchus platyrhynchus*)、达氏鳇(*Huso dauricus*)。根据种间特异性高、种内序列保守、扩增片段长度适宜等原则,利用Oligo7软件在长江鲟的D-loop和*RAG1*区设计了特异性引物与TaqMan探针^[19]。探针5'端标记6-羧基荧光素(6-Carboxyfluorescein, 6-FAM), 3'端修饰黑洞淬灭剂(Black hole quencher-1, BHQ-1)^[20]。D-loop上游引物序列: 5'-GCATCTGGCTTCTATCTC-3'; 下游引物序列: 5'-CAACCATATGCCAGACATA-3'; 探针序列: 5'-6-FAM-TTCCATTAACAGCTAGATTCCCCATAACT-BHQ-1-3', 扩增产物长度为72 bp。*RAG1*基因上游引物序列: 5'-GTCGCGTGATCCTGGAGATT-3'; 下游引物序列: 5'-GTTGACCCTGAGGCTTCCAA-3'; 探针序列: 5'-6-FAM-CCTTCAACGTCCCTCACCAGC-BHQ-1-3', 扩增片段长度为118 bp。所有引物与探针序列均通过NCBI GenBank比对,以排除非目标物种的特异性结合可能。引物与探针由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

选取长江鲟及其近缘物种(中华鲟、杂交鲟)及长江流域常见的多种非近缘物种(包括张氏鲟*Hemiculter tchangii*、圆吻鲟*Distoechodon tumirostris*、粗唇鲟*Leiocassis crassilabris*、厚颌鲂*Megalobrama pellegrini*、中华沙鳅*Sinibotia superciliosa*、翘嘴鲇*Culter alburnus*、高体近红鲃*Ancherythroculter kurematsui*、黑尾近红鲃*Ancherythroculter nigrocauda*、达氏鲃*Chanodichthys dabryi*、花鲢

Hemibarbus maculatus、鲢*Hypophthalmichthys molitrix*、鳊鱼*Pseudolaubuca sinensis*)的鱼类肌肉样本,采用高盐法提取基因组DNA后,在中国科学院水生生物研究所分析测试中心的Bio-Rad QX200™ Auto-DG™ Droplet Digital™ PCR系统上进行ddPCR扩增,以验证引物与TaqMan探针的特异性^[21]。

以长江鲟的基因组DNA为模板,在53—59℃内筛选长江鲟ddPCR扩增的最佳退火温度。ddPCR反应体系总体积为20.0 μL ,包含2.0 μL DNA模板、1.8 μL 的100 nmol/L上下游引物、0.5 μL 的100 nmol/L探针、10.0 μL 2×ddPCR Supermix for Probes (不含dUTP)及3.9 μL 无菌无酶水。使用微滴生成卡将20.0 μL 反应液与70.0 μL 微滴生成油(Droplet Generator Oil for Probes)在微滴生成仪中制备微滴。将密封的96孔板置于ddPCR仪中进行扩增,程序设置:96℃预变性10min;随后进行40个循环,包括94℃变性30s、对应梯度温度退火1min;最后98℃延伸10min,4℃保存。在扩增结束后,将96孔板置于Bio-Rad QX200微滴读取仪中进行荧光信号检测,并利用QuantaSoft软件对微滴进行自动识别与阳性判定,最终由程序自动计算每个反应体系中模板DNA的绝对浓度(copies/ μL)。温度梯度实验结果表明,线粒体D-loop引物的最佳退火温度为55℃,核基因*RAG1*引物的最适退火温度为57℃。

以确定的长江鲟基因组DNA为模板,采用两倍稀释法进行梯度稀释,依次获得1/2、1/4、1/8……1/512共9个梯度样本,共10组不同浓度的DNA模板。各梯度样品均按相同体系进行ddPCR扩增,并记录其检测所得的浓度。将测得的DNA浓度值进行常用对数($\log_{10}$)转换,以稀释倍数为横坐标,对数转换后的DNA浓度为纵坐标,进行线性回归分析并绘制标准曲线。通过相关性系数(R^2)和斜率评估引物在定量检测中的线性关系,并据此确定最低检测阈值(Limit of Detection, LOD),为后续样品定量分析提供参考依据^[18]。

1.3 数据分析

采用时间序列图展示长江鲟繁殖过程中mtDNA浓度、nuDNA浓度及核质比(nuDNA/mtDNA)的变化趋势^[14]。对不同繁殖阶段雄、雌鱼池中mtDNA与nuDNA浓度的相关性进行评估,通过散点图、回归线及Pearson相关系数分析比较二者在不同阶段的线性关系^[14]。对长江鲟繁殖过程雄、雌鱼池中mtDNA与nuDNA浓度及其比值进行单因素方差分析和Tukey HSD检验,显著性水平为 $P < 0.05$ ^[22]。所有数据分析和可视化均在R4.3.3环境下

完成, 主要使用ggplot2、ggpubr和patchwork包进行绘图^[23]。

2 结果

2.1 引物和探针特异性验证结果

多序列比对结果表明, 本研究设计的两对引物、探针及扩增的目的片段在长江鲟与其近缘物种间均存在明显的核苷酸差异, 具有较好的物种特异性。同时, ddPCR检测结果显示, 长江鲟线粒体D-loop和核基因*RAG1*基因的特异性引物及TaqMan探针仅在长江鲟DNA中产生特异性扩增信号, 未在其他近缘及远缘物种中观察到明显扩增(图 1a和1b)。

通过样本浓度梯度稀释构建标准曲线, mtDNA初始模板对应的ddPCR产物浓度为57.00 copies/ μ L, 标准曲线方程为 $y = -0.356x + 2.02$ ($R^2 = 0.995$), 当初始模板稀释至512倍时达到mtDNA的最低检测阈值0.07 copies/ μ L (图 1c)。核基因*RAG1* (nuDNA)初始

模板对应的ddPCR产物浓度为32.50 copies/ μ L, 标准曲线方程为 $y = -0.407x + 1.86$ ($R^2 = 0.991$), 当初始模板稀释至128倍时, 达到nuDNA的最低检测阈值0.11 copies/ μ L (图 1d)。

2.2 长江鲟繁殖过程中mtDNA浓度的变化趋势

在雄、雌鱼池中, 不同繁殖阶段的mtDNA浓度均存在显著变化($P < 0.05$)。雄鱼挤精操作后, mtDNA浓度迅速升高并出现峰值(9.76×10^3 copies/ μ L), 约为繁殖前水平(3.67×10^2 copies/ μ L)的27倍。随后的5—14h内迅速下降(5.37×10^3 — 5.49×10^3 copies/ μ L), 在大约24h后恢复至繁殖前水平(4.53×10^2 — 1.18×10^3 copies/ μ L, 图 2a)。在雌鱼挤卵操作后, mtDNA浓度迅速升高并达到最高值(1.46×10^4 copies/ μ L), 为繁殖前水平(1.84×10^3 copies/ μ L)的8倍。随后12h内降低至较低水平(6.09×10^3 copies/ μ L), 且在约36h内的早上仍能检测到相似浓度, 随后维持在稳定的低水平浓度(2.00×10^3 — 2.35×10^3 copies/ μ L; 图 2b)。

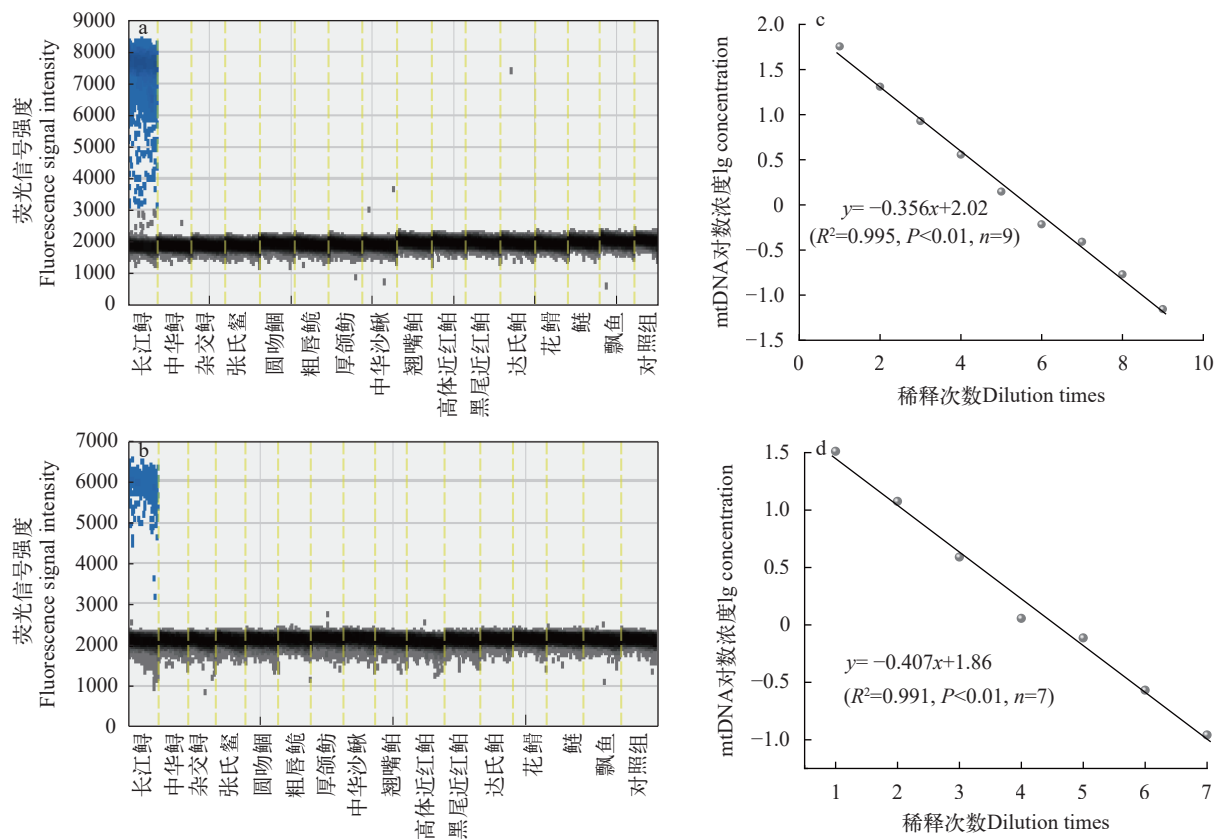


图1 基于线粒体D-loop控制区与核基因*RAG1*的长江鲟ddPCR引物和探针的特异性验证和标准曲线

Fig. 1 Specificity assessment and standard curve of the ddPCR primers and probes for *A. dabryanus* based on mitochondrial D-loop and nuclear *RAG1* genes

a. 线粒体D-loop控制区的ddPCR引物和探针特异性验证结果; b. 核*RAG1*基因的ddPCR引物和探针特异性验证结果; c. D-loop控制区ddPCR引物和探针标准曲线; d. 核*RAG1*基因ddPCR引物和探针标准曲线

a. Specificity validation of ddPCR primers and probes for the mitochondrial D-loop control region; b. specificity validation of ddPCR primers and probes for the nuclear *RAG1* gene; c. standard curve for primers and probes for the mitochondrial D-loop control region; d. standard curve for primers and probes for the nuclear *RAG1* gene

2.3 长江鲟繁殖过程中nuDNA浓度的变化趋势

在雄、雌鱼池中, 不同繁殖阶段nuDNA浓度均存在显著变化($P<0.05$)。在雄鱼挤精操作后, nuDNA浓度持续升高且在12h后达到峰值(7.69×10^2 copies/ μL), 为繁殖前水平(5.88 copies/ μL)的130倍, 随后在12h内显著下降至稳定低值($<1.00 \times 10^2$ copies/ μL , $P<0.05$; 图 3a)。在雌鱼挤卵操作后, nuDNA浓度急剧上升达到峰值(1.32×10^3 copies/ μL), 较繁殖前水平(1.05×10^2 copies/ μL)升高13倍, 随后12h内迅速下降并维持在较低水平浓度($0.10\text{—}2.83$) $\times 10^2$ copies/ μL (图 3b)。

2.4 长江鲟繁殖期水体中nuDNA/mtDNA比值的动态变化

在雄、雌鱼池中, 不同繁殖阶段的核质比(nuDNA/mtDNA)比值也存在明显的动态变化($P<0.05$)。雄鱼挤精操作后, nuDNA/mtDNA比值迅速升高达到峰值(0.14), 较繁殖前水平(0.02)上升7倍。随后, 该比值在12h内迅速下降并维持在较低的比值(<0.02 ; 图 4a)。在雌鱼挤卵后, nuDNA/mtDNA比值达到峰值(0.09), 随后24h内下降达到最低值(0.02),

此后略有回升并稳定在0.03—0.05 (图 4b)。

不同繁殖阶段, 雄、雌鱼池水体中的mtDNA与nuDNA浓度大部分存在显著相关性(图 5)。雄鱼繁殖前相关性较弱($r=-0.38$, $P=0.31$), 但在繁殖中期显著增强($r=0.99$, $P<0.01$), 并在繁殖后仍保持较强正相关($r=0.90$, $P<0.01$)。雌鱼在各阶段均表现出显著正相关(繁殖前 $r=0.96$, $P<0.01$ 、繁殖中 $r=0.91$, $P<0.01$ 及繁殖后 $r=0.84$, $P<0.01$)。整体来说, 雄、雌鱼池峰值时的mtDNA浓度分别为nuDNA的12与11倍。

3 讨论

3.1 长江鲟繁殖过程中mtDNA与nuDNA的动态变化与机理解释

在长江鲟人工繁殖过程中, 雄、雌鱼池水体中的环境DNA (mtDNA与nuDNA)浓度变化体现了对繁殖事件的响应, 可准确指示繁殖行为的发生, 但在响应时序与持续性上存在一定的差异。具体来说, 雄鱼池中的mtDNA浓度在挤精后立即显著上升并达到峰值, 最高可达繁殖前水平的27倍, 随后迅

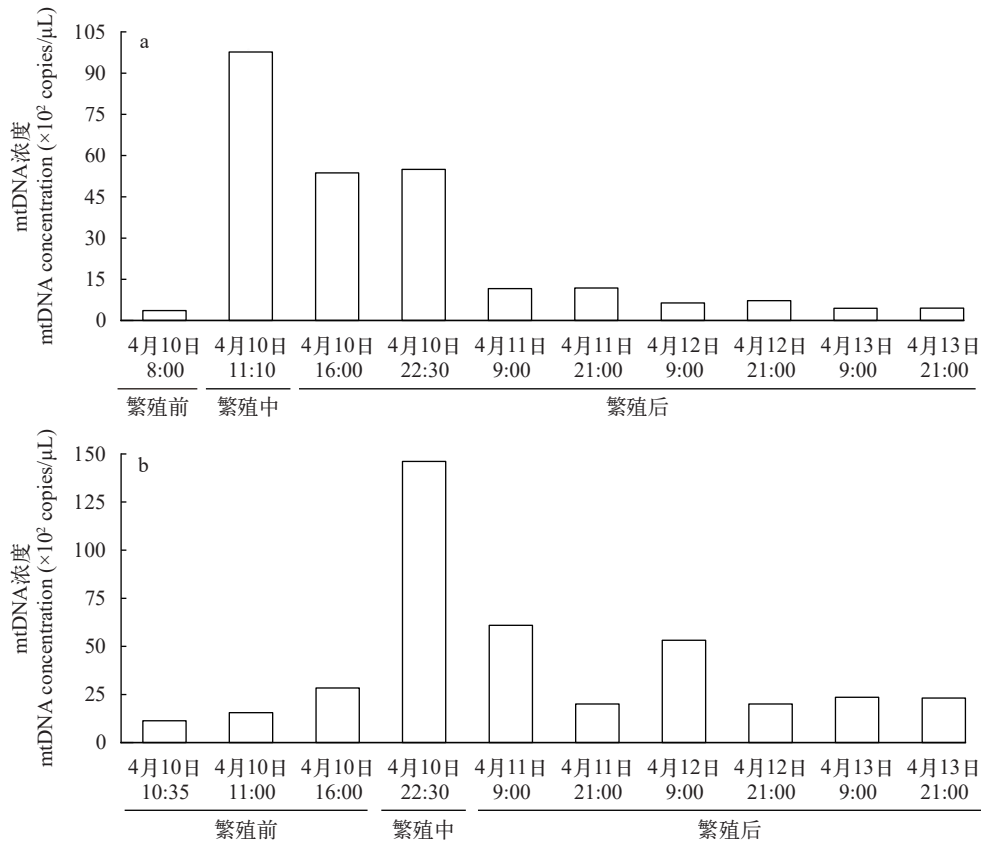


图 2 长江鲟繁殖期间雄、雌鱼池mtDNA浓度变化

Fig. 2 The variation of mtDNA concentration in male and female ponds of *A. dabryanus* during the spawning period

a. 长江鲟繁殖期间雄鱼池mtDNA浓度变化; b. 长江鲟繁殖期间雌鱼池mtDNA浓度变化

a. Variation of mtDNA concentration in the male pond of *A. dabryanus* during the spawning period; b. variation of mtDNA concentration in the female pond of *A. dabryanus* during the spawning period

速衰减并在24h内回落至较低水平;而雌鱼池中的mtDNA浓度也在挤卵后即刻升高,升幅达8倍,但在12—36h内仍然维持较高水平,即高水平浓度持续时间更长,提示雌性来源的mtDNA分子信号在水体中更稳定且衰减缓慢。nuDNA浓度的动态变化在雄、雌鱼池中呈现不同规律,雄鱼池中nuDNA浓度在挤精后并非立即达到峰值,而是出现约12h的延迟累积,但最终峰值可达繁殖前水平的130倍,随后约12h内回落至较低水平;相反,雌鱼池中nuDNA浓度在挤卵后立即升高达到峰值(13倍),并于12h内快速回落至接近较低水平,表现出典型的“短时暴发—快速衰减”模式。由此可见,nuDNA对繁殖事件更为敏感,但其在水体中的残留时间明显短于mtDNA。核质比(nuDNA/mtDNA)分析结果显示,雄鱼池在挤精后短时间内出现比值峰(0.14),并于24h内下降至较低水平;但雌鱼池的峰值下降后又于挤卵后24—36h内出现一次小幅度的回升,比值与繁殖前水平相当,表明核质比仍可指示长江鲟繁殖行为的发生。因此,雄性排精后水体中的eDNA浓度变化幅度大于雌性,nuDNA浓度变化幅度大于mtDNA,

但mtDNA的绝对浓度和持续时间大于nuDNA。

在全人工繁殖条件下,排精与挤卵操作在隔离容器中单独进行,因此本研究观测到的环境DNA变化主要来源于鱼体表残留的精子、卵子和卵膜碎片等释放的DNA。由于精子富含线粒体以提供运动能量,挤精后水体中mtDNA浓度(9.76×10^3 copies/ μL)显著高于nuDNA (2.95×10^2 copies/ μL , $P < 0.01$),与Satio等^[14]的研究结果一致^[24, 25]。值得注意的是,雄鱼池中nuDNA的峰值较mtDNA出现了约12h的滞后(图2a和3a)。这一时序差异很可能源于精子亚结构差异所导致的DNA释放和降解动力学不同。雄性精子在挤出后会迅速破裂,其中位于中段的mtDNA可能更快释放或更快降解成可检测片段;而精子头部由鱼精蛋白等高度致密化蛋白包裹,可在短时间内保持结构完整,使得nuDNA的释放与解体过程相对延迟^[26, 27]。要更精确地揭示这一机制,还需通过后续实验加以验证,比如比较精子不同结构部位的降解动力学,并实时追踪mtDNA与nuDNA在水体中的释放、沉降和降解等过程。此外,峰值后mtDNA与nuDNA衰减速率的差异反映了其分子

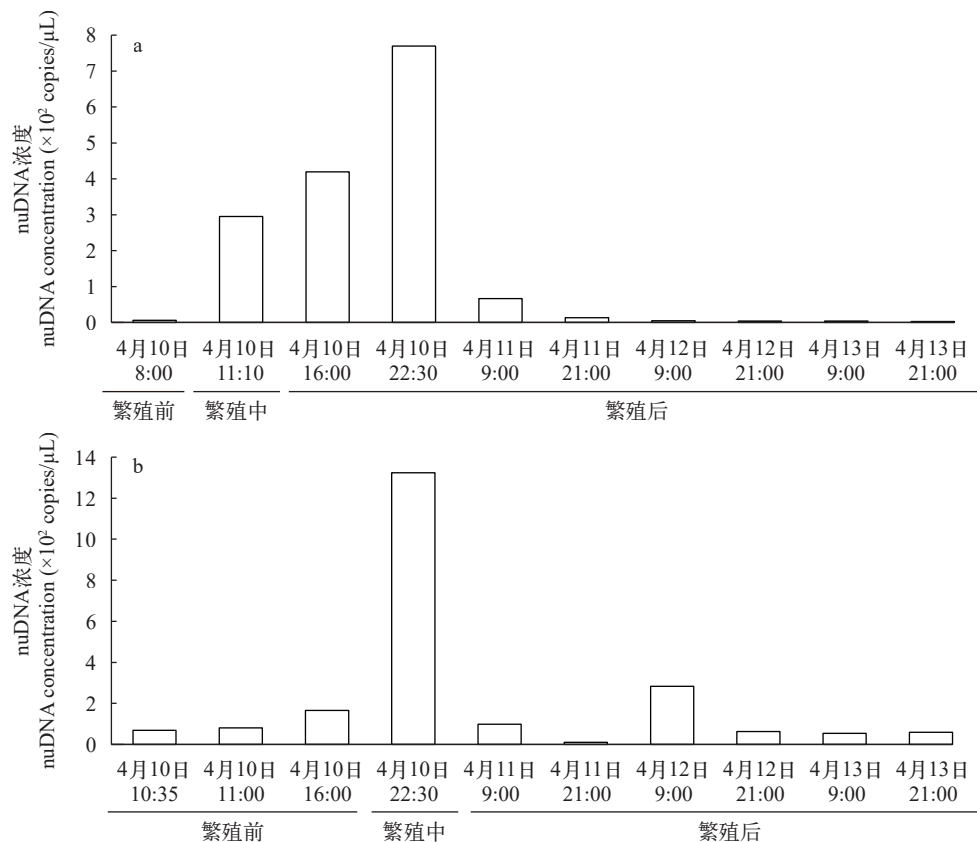


图3 长江鲟繁殖期间雄、雌鱼池nuDNA浓度变化

Fig. 3 The variation of nuDNA concentration in male and female ponds of *A. dabryanus* during the spawning period

a. 长江鲟繁殖期间雄鱼池nuDNA浓度变化; b. 长江鲟繁殖期间雌鱼池nuDNA浓度变化

a. Variation of nuDNA concentration in the male pond of *A. dabryanus* during the spawning period; b. variation of nuDNA concentration in the female pond of *A. dabryanus* during the spawning period

稳定性的不同^[28]。mtDNA以多拷贝形式存在于线粒体中, 受被膜结构或胞器包裹, 抗降解能力更强, 可在水中维持较长检出时间, 具有较高稳定性与累积性^[29], 而nuDNA信号被检出后以游离或碎片化状态存在, 更易被核酸酶降解或稀释, 因此在繁殖结束后浓度迅速下降。

3.2 mtDNA与nuDNA在繁殖活动检测中的适用性

mtDNA与nuDNA两种分子标记在繁殖活动监测中各具优势, mtDNA丰度高、检出灵敏, 适合反映繁殖活动, nuDNA波动明显、时间分辨率高, 可指示繁殖行为的发生与结束。本研究在可控人工繁殖池发现的mtDNA与nuDNA的动态差异与多种鱼类的野外观测到的eDNA变化模式高度一致。例如, Saito等^[14]通过比较香鱼(*Plecoglossus altivelis*)产卵前后eDNA浓度变化, 可有效识别鱼类产卵事件, 其中核基因*RAG1*的浓度升高幅度明显大于线粒体基因*Cyt b*基因, 证实了nuDNA较mtDNA对产卵过程更为敏感。虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)的mtDNA信号可在繁殖结束后持续检出24—36h, 而nuDNA浓度在产卵后数小时即出现显著下降^[30]。

Jo和Spear等^[28, 31]也认为mtDNA稳定性更强, 适用于长期监测, 而nuDNA更能捕捉短期繁殖事件。同样, 核质比(nuDNA/mtDNA)结果显示在雄鱼繁殖中达到峰值, 但雌鱼池的峰值下降后又于24—36h内出现一次小幅度的回升, 但比值与繁殖前水平相当, 与nuDNA的变化规律相似, 依然可以指示长江鲟繁殖行为的发生。总体而言, 在长江鲟繁殖活动监测中, mtDNA分子信号更适用于宏观层面的存在性检测, 具有更高的灵敏度和稳定性, 而nuDNA更适合用于捕捉短时的繁殖行为动态, 如产卵、排精等即时事件。理想状况下应将二者联合使用形成互补, 取得空间稳健性与时间灵敏性之间的最佳平衡。

3.3 应用展望与局限性

长江鲟作为我国特有且极度濒危的洄游性鱼类, 因栖息地生境的破坏而导致自然繁殖失败, 其野生种群已呈现功能性灭绝, 现阶段的种群维系主要依赖人工繁殖与增殖放流。然而, 放流个体能否在自然水体中存活、迁移并成功繁殖, 是当前该物种拯救与种群重建的关键科学问题。本研究设计的长江鲟mtDNA (D-loop)与nuDNA (*RAG1*)的数字

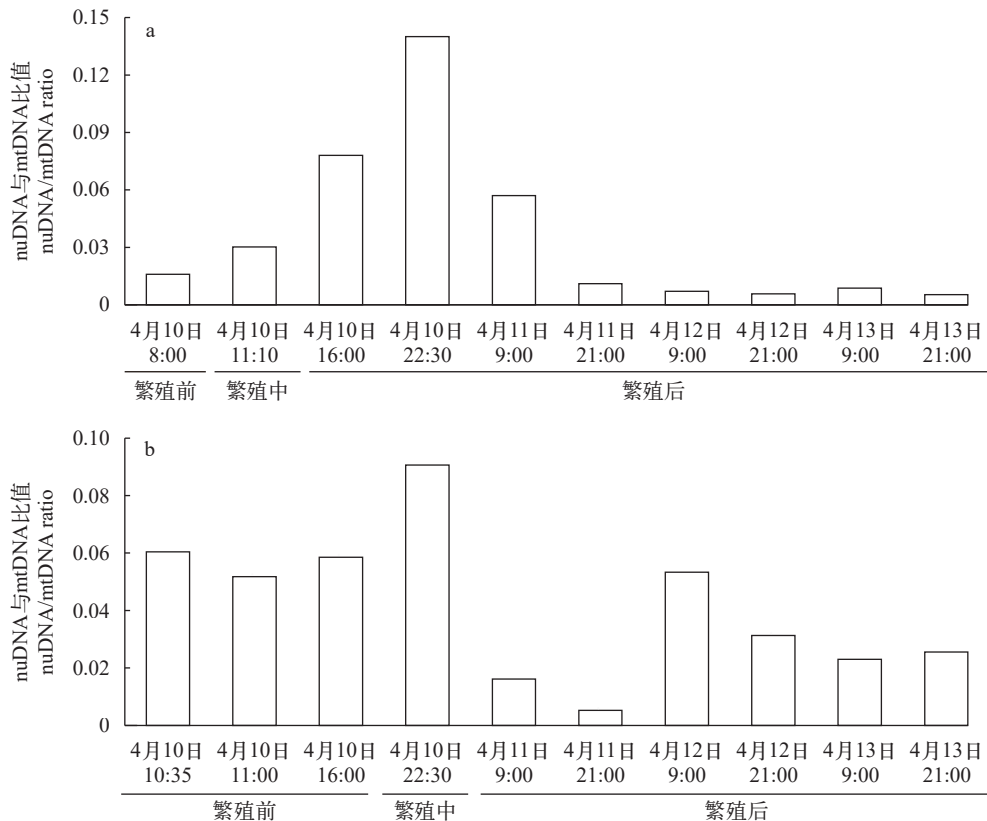


图4 长江鲟繁殖期间雄、雌鱼池nuDNA与mtDNA比值变化

Fig. 4 The variation of nuDNA/mtDNA concentration ratio in male and female ponds of *A. dabryanus* during the spawning period

a. 长江鲟繁殖期间雄鱼池nuDNA/mtDNA浓度比值变化; b. 长江鲟繁殖期间雌鱼池nuDNA/mtDNA浓度比值变化

a. Variation of nuDNA/mtDNA concentration ratio in the male pond of *A. dabryanus* during the spawning period; b. variation of nuDNA/mtDNA concentration ratio in the female pond of *A. dabryanus* during the spawning period

PCR体系具有高特异性和高灵敏度,可精准反映长江鲟在全人工繁殖过程中的eDNA动态变化,为濒危鱼类繁殖监测提供了可量化的分子工具。未来在长江鲟自然繁殖监测及增殖放流效果评估中,尤其在确定繁殖活动是否发生及产卵场位置时,建议用该eDNA定量检测体系开展高时间和空间分辨率的连续监测,从而更准确地解析繁殖活动的时空动态过程。值得强调的是,本研究发现nuDNA信号具有高度瞬时性(<12h),为精准捕捉产卵事件提供了契机。在野外监测中,为有效识别瞬时的产卵信号,建议实施高频次采样策略,尤其在推测的产卵周期内,采样间隔建议不超过6h,以降低因eDNA快速衰减导致的漏检风险。此外,将该体系应用于自然河段或放流后栖息地的监测,可实现对长江鲟配子释放与繁殖行为的非侵入式识别。进一步结合水动力学与eDNA降解模型,可量化DNA信号扩散与保持时间,从而实现了对长江鲟自然种群恢复过程的动态追踪,为该物种的长期保护与生态重建提供科学支撑。

尽管本研究构建的长江鲟eDNA定量检测体系具有良好的应用前景,但在实际野外繁殖活动监测中仍可能存在一定的局限性。例如,本研究样品均来源于同一次人工繁殖事件,受亲本数量、场地和

繁殖操作周期等限制,未设置未繁殖亲本作为同步对照池,且难以开展生物学重复,其结果在更复杂或多变环境条件下的适用性仍需通过更多独立繁殖事件加以验证。未来研究在条件允许情况下,将扩大亲本数量,增加非繁殖对照池或平行繁殖事件,以提升该方法的普适性与稳健性。另外,本研究是在可控条件下的全人工繁殖池中进行的,通过已知繁殖事件成功捕获到eDNA峰值。然而,在开放水体中,受流速、扩散与分层等水动力过程的影响,eDNA信号可能出现快速稀释或局部积聚,因此需要更加密集的时空采样布设以降低漏检风险。此外,自然野外繁殖活动可能受沉降、稀释及生物降解等因素的综合影响,因此将本研究建立的定量关系应用于野外实践时,应结合具体生境条件进行校正。最后,数字PCR技术具有一定检测下限(mtDNA LOD=0.07 copies/ μ L; nuDNA LOD=0.11 copies/ μ L),当野外水体中eDNA浓度接近或低于该限值时,检测结果的精确性和稳定性可能受到影响,从而降低低浓度阶段数据及核质比(nuDNA/mtDNA)计算的可靠性。总体而言,本研究揭示了人工繁殖条件下长江鲟eDNA的动态变化规律,但在野外应用时仍需综合考虑水文过程、繁殖行为背景及方法学不确定性等因素。

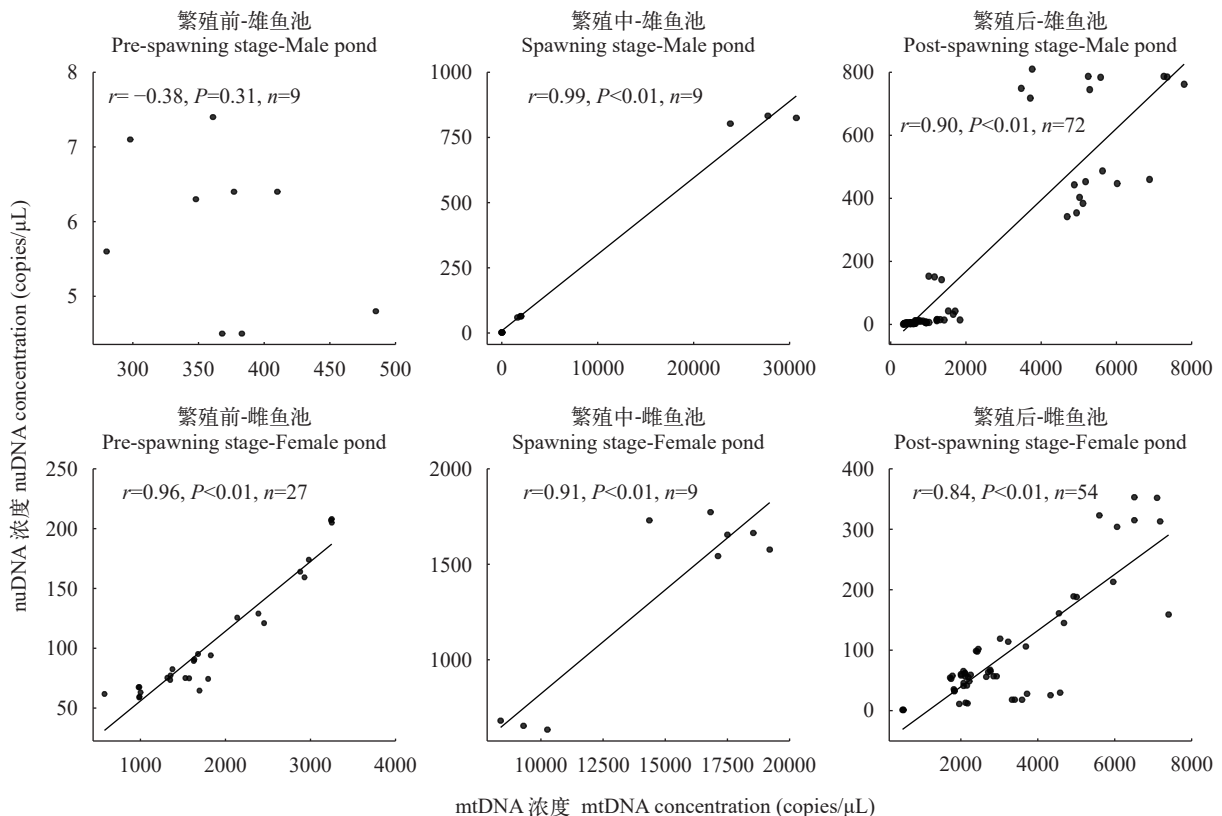


图5 不同繁殖阶段雄、雌鱼池中mtDNA与nuDNA浓度的相关性

Fig. 5 Correlation between mtDNA and nuDNA concentrations in male and female ponds at different reproductive stages

4 结论

本研究构建了基于线粒体D-loop和核基因*RAG1*的长江鲟eDNA定量检测体系,具有较高的特异性和灵敏度,可精确捕捉长江鲟繁殖期间水体eDNA浓度的时序变化。结果显示,mtDNA与nuDNA在繁殖阶段同步升高,并在繁殖结束后迅速衰减,能够有效反映长江鲟繁殖活动的分子信号及其动态过程。其中,mtDNA信号可在繁殖结束后持续检出24—36h,表现出更高的稳定性与持久性,适于指示繁殖活动的总体强度与持续时间;nuDNA则在繁殖事件发生后短时间内迅速升至峰值并快速衰减,能灵敏反映繁殖行为的即时发生与短期变化。两者的动态差异揭示了eDNA分子信号的形成机制及降解特征,表明其在繁殖监测中具有互补作用。本研究不仅推动了长江鲟繁殖活动的分子监测技术体系,也为濒危鱼类的种群恢复与生态管理提供了重要技术支撑。

(作者声明本文符合出版伦理要求)

参考文献:

- [1] Li J, Du H, Wu J, *et al.* Foundation and prospects of wild population reconstruction of *Acipenser dabryanus* [J]. *Fishes*, 2021, **6**(4): 55.
- [2] Cheng P L, Liu Q J, Li P C, *et al.* Parentage analysis of offspring induced by artificial simulated spawning environments in natural waters for natural breeding of the *Acipenser dabryanus* [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2025, **49**(12): 129309. [程佩琳, 刘青娟, 李鹏程, 等. 天然水域人工模拟产卵环境诱导长江鲟自然繁殖后代的亲权分析 [J]. *水产学报*, 2025, **49**(12): 129309.]
- [3] Zhang H, Jarić I, Roberts D L, *et al.* Extinction of one of the world's largest freshwater fishes: Lessons for conserving the endangered Yangtze fauna [J]. *Science of the Total Environment*, 2020(710): 136242.
- [4] Zhang H, Wei Q W, Du H, *et al.* Present status and risk for extinction of the Dabry's sturgeon (*Acipenser dabryanus*) in the Yangtze River watershed: a concern for intensified rehabilitation needs [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2011, **27**(2): 181-185.
- [5] Yang Y, Wu J P, Zhong J, *et al.* Exploring factors affecting the quality of *Acipenser dabryanus* eggs based on hatching rate [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2024, **48**(10): 1697-1705. [杨宇, 吴金平, 仲嘉, 等. 基于孵化率探究长江鲟卵质差异因子 [J]. *水生生物学报*, 2024, **48**(10): 1697-1705.]
- [6] Qiwei W. *Acipenser dabryanus* [EB]. The IUCN Red List of Threatened Species, 2022: e. T231A61462199.
- [7] Ban X, Li P, Wu J, *et al.* The silver lining in rewilding the vanished sturgeon in the Yangtze River [J]. *The Innovation Life*, 2024, **2**(2): 100070.
- [8] Gu S, Deng Y, Wang P, *et al.* Assessing riverine fish community diversity and stability by eDNA metabarcoding [J]. *Ecological Indicators*, 2023(157): 111222.
- [9] Curto M, Batista S, Santos C D, *et al.* Freshwater fish community assessment using eDNA metabarcoding vs. capture-based methods: Differences in efficiency and resolution coupled to habitat and ecology [J]. *Environmental Research*, 2025(274): 121238.
- [10] Zhang S, Zheng Y, Zhan A, *et al.* Environmental DNA captures native and non-native fish community variations across the lentic and lotic systems of a megacity [J]. *Science Advances*, 2022, **8**(6): eabk0097.
- [11] Zou K, Chen J, Ruan H, *et al.* eDNA metabarcoding as a promising conservation tool for monitoring fish diversity in a coastal wetland of the Pearl River Estuary compared to bottom trawling [J]. *Science of the Total Environment*, 2020(702): 134704.
- [12] Wu L, Yamamoto Y, Yamaguchi S, *et al.* Spatiotemporal changes in environmental DNA concentrations caused by fish spawning activity [J]. *Ecological Indicators*, 2022(142): 109213.
- [13] Bracken F S A, Rooney S M, Kelly-Quinn M, *et al.* Identifying spawning sites and other critical habitat in lotic systems using eDNA "snapshots": A case study using the sea lamprey *Petromyzon marinus* L [J]. *Ecology and Evolution*, 2018, **9**(1): 553-567.
- [14] Saito M, Tsuji S, Nakao R, *et al.* Comparative study on nuclear and mitochondrial DNA of Ayu *Plecoglossus altivelis* for environmental DNA-based spawning evaluation [J]. *Landscape and Ecological Engineering*, 2023, **19**(1): 55-67.
- [15] Bylemans J, Furlan E M, Hardy C M, *et al.* An environmental DNA-based method for monitoring spawning activity: a case study, using the endangered Macquarie perch (*Macquaria australasica*) [J]. *Methods in Ecology and Evolution*, 2017, **8**(5): 646-655.
- [16] Doi H, Takahara T, Minamoto T, *et al.* Droplet digital polymerase chain reaction (PCR) outperforms real-time PCR in the detection of environmental DNA from an invasive fish species [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, **49**(9): 5601-5608.
- [17] Li S, Liu X Q, Jiang W, *et al.* Application of environmental DNA technology in natural reproduction of the four major Chinese carps in Yichang section of Yangtze River, China [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2021, **32**(6): 2241-2248. [李莎, 刘雪清, 姜伟, 等. 环境DNA技术在宜昌江段四大家鱼自然繁殖中的应用 [J]. *应用生态学报*, 2021, **32**(6): 2241-2248.]
- [18] Yang T C, Li J H, Zhang Y, *et al.* Design and verification of primers and TaqMan probe specific for *Paramesotriton hongkongensis* eDNA [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2020, **55**(5): 624-636. [杨泰昌, 李嘉华, 张颖, 等. 香港瘰螈eDNA引物和TaqMan探针的设计与确认 [J]. *动物学杂志*, 2020, **55**(5): 624-636.]
- [19] Yeung A T, Holloway B P, Adams P S, *et al.* Evaluation of dual-labeled fluorescent DNA probe purity versus performance in real-time PCR [J]. *BioTechniques*, 2004, **36**(2): 266-275.

- [20] Xiang D, Li F, Wu C, *et al.* The G-BHQ synergistic effect: Improved double quenching molecular beacons based on guanine and Black Hole Quencher for sensitive simultaneous detection of two DNAs [J]. *Talanta*, 2017(174): 289-294.
- [21] Guo Y, Charoenkwan P, Traisrisilp K, *et al.* Application of Digital Polymerase Chain Reaction (dPCR) in Non-invasive Prenatal Testing (NIPT) [J]. *Biomolecules*, 2025, **15**(3): 360.
- [22] Santos S W, Cachot J, Gourves P Y, *et al.* Sub-lethal effects of waterborne copper in early developmental stages of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019(170): 778-788.
- [23] Ginestet C. ggplot2: elegant graphics for data analysis [J]. *Journal of the Royal Statistical Society Series A: Statistics in Society*, 2011, **174**(1): 245-246.
- [24] Alavi S M H, Cosson J, Bondarenko O, *et al.* Sperm motility in fishes: (III) diversity of regulatory signals from membrane to the axoneme [J]. *Theriogenology*, 2019(136): 143-165.
- [25] Huang S, Yoshitake K, Watabe S, *et al.* Environmental DNA study on aquatic ecosystem monitoring and management: Recent advances and prospects [J]. *Journal of Environmental Management*, 2022(323): 116310.
- [26] Balhorn R. The protamine family of sperm nuclear proteins [J]. *Genome Biology*, 2007, **8**(9): 227.
- [27] Jo T, Murakami H, Yamamoto S, *et al.* Effect of water temperature and fish biomass on environmental DNA shedding, degradation, and size distribution [J]. *Ecology and Evolution*, 2019, **9**(3): 1135-1146.
- [28] Jo T S, Tsuru K, Yamanaka H. Can nuclear aquatic environmental DNA be a genetic marker for the accurate estimation of species abundance [J]? *The Science of Nature*, 2022, **109**(4): 38.
- [29] Kirtane A, Wiczorek D, Noji T, *et al.* Quantification of Environmental DNA (eDNA) shedding and decay rates for three commercially harvested fish species and comparison between eDNA detection and trawl catches [J]. *Environmental DNA*, 2021, **3**(6): 1142-1155.
- [30] Homel K M, Franklin T W, Carim K J, *et al.* Detecting spawning of threatened chum salmon *Oncorhynchus keta* over a large spatial extent using eDNA sampling: Opportunities and considerations for monitoring recovery [J]. *Environmental DNA*, 2021, **3**(3): 631-642.
- [31] Spear M J, Embke H S, Krysan P J, *et al.* Application of eDNA as a tool for assessing fish population abundance [J]. *Environmental DNA*, 2021, **3**(1): 83-91.

ENVIRONMENTAL DNA DYNAMICS DURING REPRODUCTIVE ACTIVITY OF THE *ACIPENSER DABRYANUS* IN CAPTIVE BREEDING SYSTEMS

SHEN Xiao-Xue^{1,2}, MAN Li-Jun^{1,2}, LIU Qing-Juan^{1,2}, LI Sha³, LIU Huan-Zhang¹ and YU Dan¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. China Three Gorges Corporation, Wuhan 430000, China)

Abstract: We applied digital PCR targeting mitochondrial DNA (mtDNA) and nuclear DNA (nuDNA) markers to investigate environmental DNA (eDNA) dynamics during artificial propagation of the critically endangered Yangtze sturgeon (*Acipenser dabryanus*). Species-specific primers and TaqMan probes were designed to quantify mtDNA and nuDNA concentrations and their ratio (nuDNA/mtDNA) across different reproductive stages. Both mtDNA and nuDNA levels increased rapidly and reached their peaks after spawning. In the male pond, concentrations rose to 27-fold (mtDNA) and 130-fold (nuDNA) of pre-spawning levels following sperm release; in the female pond, concentrations increased to 8-fold (mtDNA) and 13-fold (nuDNA) after ovulation. The nuDNA/mtDNA ratio peaked at 0.14 and 0.09 in the male and female ponds, respectively. Overall, peak mtDNA concentrations were approximately 11–12 times higher than those of nuDNA and remained detectable for 24–36h, indicating greater persistence. In contrast, nuDNA concentrations declined sharply within 12h post-spawning, demonstrating high temporal sensitivity to spawning events. Our findings demonstrate that eDNA monitoring effectively captures molecular signatures and temporal patterns of *A. dabryanus* reproductive activity, offering a robust, non-invasive tool for studying the reproductive ecology and informing conservation strategies for endangered fish species.

Key words: Environmental DNA; Spawning; Digital PCR; mtDNA; nuDNA; *Acipenser dabryanus*