

孔啸兰, 张帅, 陈作志, 等. 基于 DNA 条形码技术的珠江口春季鱼卵和仔稚鱼种类组成和分布特征的研究[J]. 海洋学报, 2023, 45(3): 52–65, doi:10.12284/hyxb2023032

Kong Xiaolan, Zhang Shuai, Chen Zuozhi, et al. Species composition and distribution characteristic of fish eggs and larvae based on DNA barcoding technology of the Zhujiang River Estuary in spring[J]. Haiyang Xuebao, 2023, 45(3): 52–65, doi:10.12284/hyxb2023032

基于 DNA 条形码技术的珠江口春季鱼卵和仔稚鱼种类组成和分布特征的研究

孔啸兰¹, 张帅¹, 陈作志^{1,2*}, 林昭进¹, 蒋佩文¹, 江艳娥¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所 农业农村部外海渔业可持续利用重点实验室, 广东 广州 510300; 2. 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州), 广东 广州 511458)

摘要: 采用线粒体 CO I 和 12S rRNA 基因片段作为 DNA 条形码, 分析珠江口春季鱼卵和仔稚鱼种类组成和分布特征, 并探究两种条形码在鱼卵和仔稚鱼种类鉴定中的适用性。研究共扩增样本 391 个, 成功鉴定的鱼卵和仔稚鱼共 7 目 25 科 42 属 60 种 (2 种未鉴定到种)。其中, 以鲈形目 (Perciformes) 种类和数量最多, 种类数占比为 51.6%, 数量占比为 47.91%; 其次为鲱形目 (Clupeiformes), 种类数占比为 25%, 数量占比为 34.56%。优势种 10 种, 其中凤鲚 (*Coilia mystus*) 优势度最高, 为 0.071; 棘头梅童鱼 (*Collichthys lucidus*) 最低, 为 0.014。CO I 和 12S rRNA 基因片段扩增结果显示, 鱼卵和仔稚鱼 12S rRNA 基因片段扩增成功率 (95.60%) 明显高于 CO I 基因 (43.22%)。遗传距离和 ABGD 分析显示, CO I 基因种内遗传距离为 0~0.005 (平均 0.003), 种间遗传距离为 0.061~0.376 (平均 0.253), 两者间存在明显的“条形码间隙”, ABGD 划分结果与数据库比对结果一致; 12S rRNA 基因种内遗传距离为 0~0.011 (平均 0.007), 种间遗传距离为 0.007~0.487 (平均 0.283), 龟鲛 (*Chelon haematocheila*) 和前鳞龟鲛 (*Chelon affinis*) 种间遗传距离与种内遗传距离不形成“条形码间隙”, ABGD 将其划分为同一种。系统发育分析显示, 在种的分类阶元, 所有物种均能聚为独立分支, 得到有效区分。综上, 线粒体 CO I 和 12S rRNA 条形码可有效鉴定珠江口大多数鱼卵和仔稚鱼, 但是 CO I 基因扩增成功率较低, 12S rRNA 基因部分近缘物种存在区分困难的情况, 两种基因结合使用更能提高鱼卵和仔稚鱼种类鉴定的成功率和准确性。

关键词: CO I 基因; 12S rRNA 基因; 鱼卵和仔稚鱼; DNA 条形码

中图分类号: S932.4

文献标志码: A

文章编号: 0253-4193(2023)03-0052-14

1 引言

珠江口位于广东沿海中部, 是典型的河口水域, 因珠江径流带来了丰富的营养物质, 使得该海域水质肥沃、饵料生物丰富, 且该海域岛屿众多, 生境复杂,

是许多经济渔业种类产卵和索饵的重要场所, 具有重要的渔业经济和生态保护价值^[1]。珠江口水域鱼类种类丰富, 据统计共有 1 009 种, 分属 2 纲, 26 目, 157 科, 454 属, 主要是沿岸或河口性中小型鱼类, 鲈形目种类占绝对优势^[2-3]。鱼卵和仔稚鱼是鱼类早期发育的重要

收稿日期: 2022-08-10; 修订日期: 2022-09-22。

基金项目: 广东省重点领域研发计划 (2020B1111030001); 南方海洋科学与工程广东省实验室 (广州) 人才团队引进重大专项 (GML2019ZD0605); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2020TD05)。

作者简介: 孔啸兰 (1986—), 女, 河南省汤阴县人, 助理研究员, 主要从事渔业资源和分子生物学研究。E-mail: weilankong.2005@163.com

* 通信作者: 陈作志, 男, 研究员, 主要从事海洋生态和渔业资源研究。E-mail: zzchen2000@163.com

阶段,作为鱼类种群补充的重要来源,鱼卵和仔稚鱼的分布和数量变化是评估水域产卵场、成鱼资源量等非常重要的数据资料^[4]。近几十年来,随着环境污染的加剧和海洋捕捞强度的增加,珠江口鱼类群落结构已经发生了变化^[3,5]。同时,因鱼类产卵场等生态环境遭到破坏,鱼卵和仔稚鱼资源亦遭到严重破坏,鱼类产卵场、产卵亲体和幼鱼资源的保护与恢复工作迫在眉睫,而摸清该海域鱼卵和仔稚鱼的种类组成和数量变化是开展保护与恢复工作的重要前提^[6]。

鱼卵和仔稚鱼的鉴定是渔业资源调查的关键技术。然而传统的形态学鉴定在准确性方面存在很大的局限性。我国已知海洋鱼类已超过3000种,但是有资料可查的鱼卵和仔稚鱼种类不超过300种,且鱼卵和仔稚鱼的形态学鉴定需要丰富的鉴定经验^[7]。DNA条形码技术,因其快速性、准确性和可模式化操作的优势,被迅速地应用于物种分类鉴定和生物多样性的研究,尤其是形态学区分困难的样品,如鱼卵和仔稚鱼等^[7-12]。目前应用最广泛的DNA条形码是线粒体细胞色素氧化酶I(cytochrome oxidase subunit I, CO I)基因片段,Ward等^[13]使用CO I基因652 bp片段序列鉴定澳大利亚207种鱼类,结果表明CO I基因片段能够有效地区分不同物种。近年来,由于环境DNA(environmental DNA, eDNA)技术的发展急需片段更小的微型条形码。Miya等^[14]研发了一套12S rRNA基因的环境DNA通用的PCR引物,长度为163~185 bp,检测了230多种亚热带海洋鱼类物种,结果表明除少数近源物种外,该基因片段能够作为条形码有效区分鱼类物种,且对DNA量少且已降解的样品依然能够较好地扩增,尤其适用于鱼卵、仔稚鱼样品。

为了能更准确地了解珠江口鱼卵和仔稚鱼种类组成和分布特征,同时比较两种线粒体条形码对珠江口鱼卵和仔稚鱼鉴定的适用性,本研究选取2020年春季珠江口鱼卵和仔稚鱼为研究对象,采用线粒体CO I和12S rRNA基因片段作为条形码,对鱼卵和仔稚鱼样品进行分类鉴定和分析,论证两种条形码对珠江口鱼卵和仔稚鱼鉴定的可行性,为珠江口鱼类产卵场的保护和渔业资源的可持续利用提供数据支撑和理论依据。

2 材料与方法

2.1 样品采集

鱼卵和仔稚鱼样品分别采用大型浮游生物网于表层水平拖网(拖速2~3节,拖网时长10 min)和上下层垂直拖网采集,采集到的样品用50%酒精固定

后带回实验室。采样时间为2020年3月31日至4月3日,共采集9个站位(D1-D9),具体采样时间和站位如表1和图1所示。

表1 具体采样时间和站位
Table 1 Specific sampling time and stations

站位	采样时间	水深/m	表层盐度
D1	2020年4月3日	24	1.45
D2	2020年4月3日	15	7.85
D3	2020年4月2日	6	6.95
D4	2020年4月2日	10	25.6
D5	2020年4月1日	6.5	8
D6	2020年4月1日	9	23.57
D7	2020年4月1日	24	32.52
D8	2020年3月31日	13	28.82
D9	2020年3月31日	18	27.82

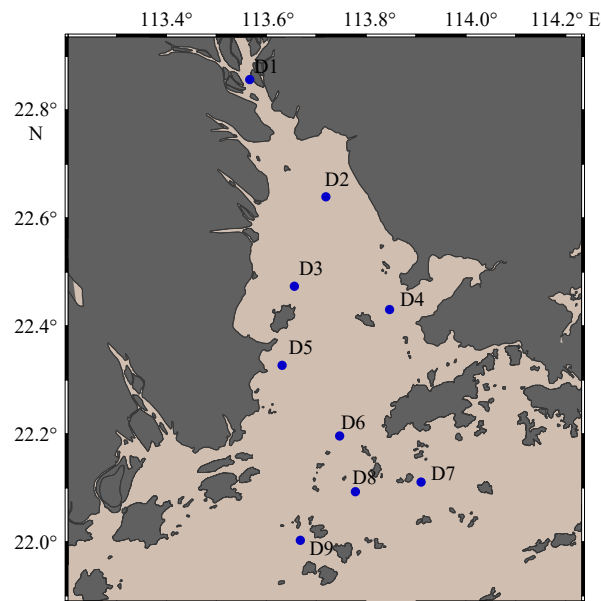


图1 珠江口采样站位

Fig. 1 Sampling stations in the Zhujiang River Estuary

2.2 基因组DNA提取与目的片段扩增

样品用双蒸水充分浸洗洗脱酒精后,置于1.5 mL离心管中,用海洋动物组织基因组DNA提取试剂盒(天根,中国)提取基因组DNA,之后置于-20°C下保存备用。线粒体CO I基因片段扩增引物为Fish-F1: 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3'和Fish-R1: 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3'^[12]。线粒体12S rRNA基因片段扩增引物为MiFish-F: 5'-GTC-GGTAAAACCTCGTGCCAGC-3'和MiFish-R: 5'-CATAG-TGGGGTATCTAATCCCAGTTTG-3'^[13]。PCR扩增反应

总体积为 15 μL , 其中包括 2 \times PCR Buffer 7.5 μL , 2 mmol/L dNTPs 1 μL , 正反向引物 (10 $\mu\text{mol/L}$) 各 0.4 μL , KOD FX(1 U/ μL)0.3 μL , DNA 模版 1 μL , 加双蒸水至 15 μL 。PCR 扩增程序为: 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 55/50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 40 s, 40 个循环; 68 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测合格后送华大基因公司(深圳)双向测序。

2.3 数据分析

测序结果首先采用 DNASTAR 软件根据峰图进行人工校对和拼接^[15]。校对后 12S rRNA 序列经鱼线粒体基因组数据库 (Mitochondrial Genome Database of Fish, MitoFish) 比对^[16], CO I 序列经生命条形码数据系统 (Barcode of Life Data, BOLD) 数据库^[17] 比对, 若无有效比对结果, 采用 GenBank 数据库比对, 进行物种鉴定, 最后与自建的珠江口鱼类数据库比对校准。遗传相似度 $\geq 99\%$ 鉴定为同一物种; 92%~99% 鉴定为同属; 85%~92% 鉴定为同一科^[18-20]。使用 MEGA7 软件根据 Kimura2-Parameter (K2P) 双参数模型对种间遗传距离 (interspecific genetic distance) 和种内遗传距离 (intraspecific genetic distance) 进行计算^[21]。采用 ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery) 软件将全部序列自动分组, 将划分在同一组的样本认定为 1 个种^[22]。使用 PhyloSuit 软件中的 MrBayes 进行贝叶斯系统发育树构建^[23] 并使用 itol 软件对系统发育树进行标记^[24]。站位图使用 Ocean Data View 软件^[25] 绘制。物种中文名和拉丁名参照《拉汉世界鱼类系统名典》^[26] 校正。

鱼卵及仔稚鱼种类优势度采用以下公式计算^[27]:

$$Y = (N_i/N) \times f_i, \quad (1)$$

式中, N_i 为第 i 种样品数量; N 为所有种类样品总数量; f_i 为第 i 种样品在所有站位中出现的频率。本研究取 $Y \geq 0.01$ 的种类为优势种^[28]。

3 结果与分析

3.1 序列扩增结果

珠江口调查 9 个站位中, 共获得鱼卵 352 粒, 仔稚鱼 39 条, 总计 391 个样品用于线粒体基因扩增(表 2)。最终, 线粒体 CO I 基因扩增获得有效序列 169 条, 单倍型 74 条, 鉴定鱼类 43 种, 扩增成功率为 43.22%; 线粒体 12S rRNA 基因扩增获得有效序列 369 条, 单倍型 79 条, 鉴定鱼类 59 种, 扩增成功率为 95.60%。综合两个基因扩增结果, 在总共 391 个样品中, 成功鉴定 382 个样品, 鉴定鱼类 60 种, 扩增成功率为 97.70%。

3.2 种类组成和数量分布

在 9 个站位, 382 个有效样品中, 共鉴定出 60 种

表 2 不同站位鱼卵及仔稚鱼种类和数量

Table 2 Species and quantity of eggs and larvae at different stations

站位	总扩增数		有效数		种类数	
	鱼卵	仔稚鱼	鱼卵	仔稚鱼	鱼卵	仔稚鱼
D1	42	4	42	4	5	3
D2	39	0	38	0	9	0
D3	31	17	28	17	14	7
D4	40	0	40	0	15	0
D5	40	8	40	8	14	4
D6	40	1	40	1	20	1
D7	42	0	42	0	18	0
D8	40	5	36	5	18	3
D9	38	4	37	4	10	4
总计	352	39	343	39	52	15

鱼类, 隶属于 7 目 25 科 42 属, 58 种鱼类鉴定到种, 1 种鉴定到科 (石首鱼科 Sciaenidae), 1 种鉴定到属 (斜棘鲷属 *Repomucenus*), 见表 3。所有样品中, 以鲈形目 (Perciformes) 种类和数量最多, 种类数占比为 51.6%, 数量占比为 47.91%, 其次为鲱形目 (Clupeiformes), 种类数占比为 25%, 数量占比为 34.56%。优势种 10 种, 为凤鲚 (*Coilia mystus*)、项斑项鲷 (*Nuchequula nuchalis*)、日本金线鱼 (*Nemipterus japonicus*)、岛屿侧带小公鱼 (*Stolephorus insularis*)、叫姑鱼 (*Johnius grypotus*)、黄泽小沙丁鱼 (*Sardinella lemuru*)、太平洋棘鲷 (*Acanthopagrus pacificus*)、卵鲷 (*Solea ovata*)、中华舌鲷 (*Cynoglossus sinicus*)、棘头梅童鱼 (*Collichthys lucidus*)。其中凤鲚优势度最高, 为 0.071; 棘头梅童鱼最低, 为 0.014。

所有样品中, 样品数最高的科是鳀科 (Engraulidae), 占样品总数的 25.9%, 鳀科主要种类为鲚属 (*Coilia*) (61.6%)、侧带小公鱼属 (*Stolephorus*) (21.2%)、棱鳀属 (*Thryssa*) (17.2%), 其中鲚属仅有凤鲚一种, 占绝对优势; 其次为石首鱼科, 占样品总数的 17%, 主要种类为叫姑鱼属 (*Johnius*) (56.2%) 和梅童鱼属 (*Collichthys*) (36.9%); 再次为鲱科 (Clupeidae), 占样品总数的 32.3%, 主要种类为小沙丁鱼属 (*Sardinella*) (71.9%) 占绝对优势。此外, 样品数较多的科还有金线鱼科 (Nemipteridae)、舌鲷科 (Cynoglossidae)、鲷科 (Leiongnathidae)、鲷科 (Sparidae)、鲷科 (Mugilidae) 等, 金线鱼科仅有一种日本金线鱼。

鱼卵及仔稚鱼种类数量和分布如表3所示,数量超过站位鱼类数量50%的种类有棘头梅童鱼、凤鲚和日本金线鱼3种,超过10%的种类有12种。不同站位间种类数差异较大,如表2所示D1站最少,仅有鱼卵5种,仔稚鱼3种,D8站最多,有鱼卵18种,仔稚鱼3种。

从生态类型上来看,珠江口春季鱼卵和仔稚鱼主要以河口和近海中小型鱼类为主,主要是暖水性种类,如凤鲚、小沙丁鱼属、叫姑鱼属、日本金线鱼、卵鲷等,部分暖温性种类,如棘头梅童鱼、龟鲛(*Chelona haematocheila*)、红狼牙虾虎鱼(*Odontamblyopus rubicundus*)、花鲮(*Clupanodon thrissa*)等,没有冷水性种类。

3.3 遗传距离计算和ABGD划分

169条CO I序列比对切齐,获得一致序列长度为650 bp。根据K2P模型计算种内和种间遗传距离。结果显示种内遗传距离为0~0.005,平均为0.003;种间距离为0.061~0.376,平均为0.253。369条12S rRNA序列比对切齐,获得一致序列长度为166~174 bp。根据K2P模型计算种内和种间遗传距离,结果显示种内遗传距离为0~0.011,平均为0.007;种间距离为0.007~0.487,平均为0.283。两个基因片段计算的种

内遗传距离均远低于Ratnasingham和Hebert^[17]提出的最大种内距离为0.02的标准。CO I序列种间平均遗传距离为种内遗传距离的84倍,12S rRNA序列种间平均遗传距离为种内遗传距离的143倍,均符合种间遗传距离要为种内距离的10倍以上的规则^[17]。CO I序列的最小种间遗传距离远远大于最大种内遗传距离,两者间存在明显的“条形码间隙”。12S rRNA序列的最小种间遗传距离小于最大种内遗传距离,两者间存在交叉重叠,不形成“条形码间隙”。12S rRNA序列的最小种间遗传距离0.007存在于龟鲛和前鳞龟鲛(*Chelona affinis*)两个种之间,除此外,12S rRNA序列的其他种间遗传距离均大于种内遗传距离且大于0.02。

通过ABGD软件以0.001~0.100先验值P区间对74条CO I序列和79条12S rRNA序列单倍型进行划分,结果如图2所示,初始划分结果较为稳定。CO I序列74条单倍型序列在先验值P为0.001~0.0616时被分为43组,结果与数据库比对鉴定种类数一致。12S rRNA序列79条单倍型序列在先验值P为0.001~0.0089时被分为58组,此结果最接近数据库比对鉴定种类数59种。其中,龟鲛和前鳞龟鲛被分为同一组。

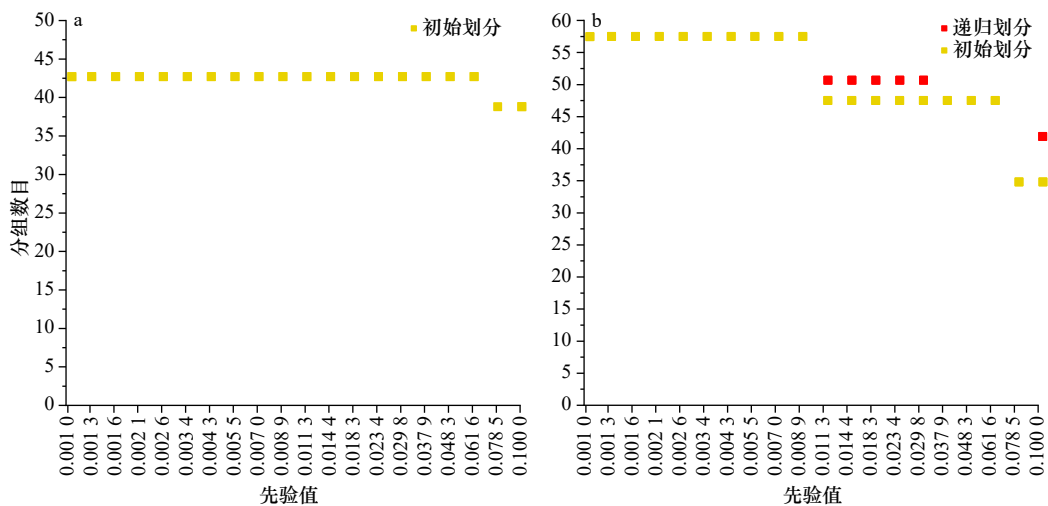


图2 ABGD方法对CO I序列(a)和12S rRNA序列(b)的划分结果

Fig. 2 Partition results of CO I sequence (a) and 12S rRNA sequence (b) by ABGD method

3.4 系统发育分析

基于CO I基因片段构建的贝叶斯系统发育树如图3所示,所有种类能够聚为独立分支,各物种均能得到有效区分。在属的分类阶元上,同属物种均能形成单系支,例如,棱鯷属、棘鲷属(*Acanthopagrus*)、海鲷属(*Nematalosa*)等。在科的分类阶元上,同科的物种亦均能形成独立分支,例如,鲷科、鯷科、石首鱼科、鲷科和鲷科(*Blenniidae*)等。

基于12S rRNA序列构建的贝叶斯系统发育树如图4所示,所有种类能够聚为独立分支,各物种均能得到有效区分。在属的分类阶元上,棱鯷属未能聚为一支外,其他属均聚为一支,例如,叫姑鱼属、舌鲷属、棘鲷属、小沙丁鱼属等。在科的分类阶元上,石首鱼科被分为多支,鲷科(*Platycephalidae*)2种未聚为一支,其他鲷科、鯷科、鲷科、鲷科、舌鲷科均能聚为一支。

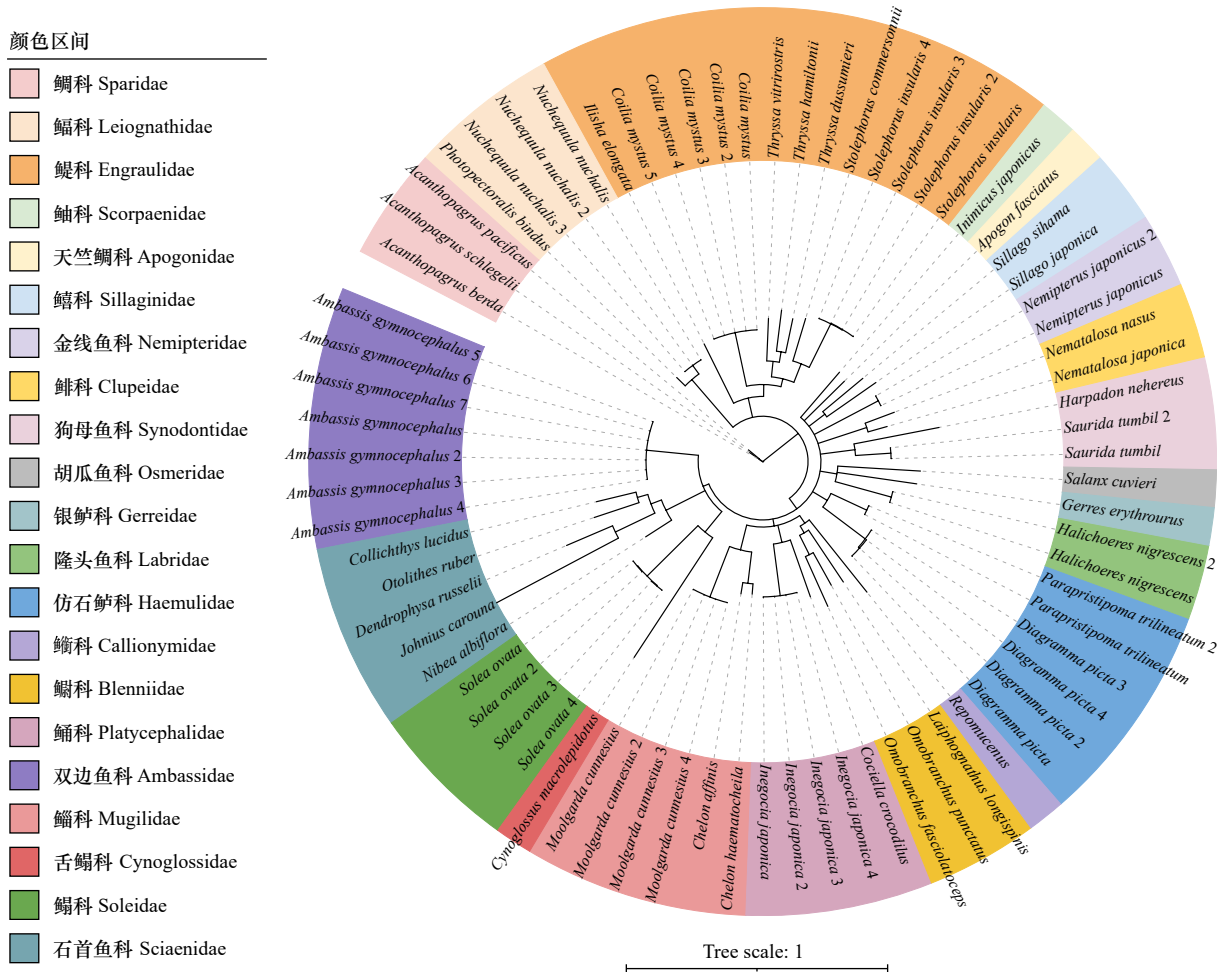


图 3 基于 CO I 序列构建的系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic tree based on CO I sequences

ABGD 的 DNA 鉴定与比对鉴定物种数目一致, 未用红点显示出

The DNA identification from ABGD is consistent with the number of identified species and are not displayed through the red dot

4 讨论

4.1 珠江口鱼卵和仔稚鱼种类组成和分布

本次调查水域主要包括虎门水道口、伶仃洋水域和部分近岸水域, 气候条件与南海北部大陆架相近, 鱼类适温类型相似, 均以暖水性为主, 少量暖温性种类, 无冷温性种类。本区域与长江口相比, 均属于不同纬度的亚热带河口区, 优势种类较为相似, 以凤鲚和棘头梅童鱼等小型咸淡水经济种类占优势^[29-30]。本次春季调查站位表层水温介于 20~21.6℃ 之间, 是鱼类繁殖最适宜的温度, 鱼卵和仔稚鱼较为丰富, 共鉴定出 60 种鱼类, 隶属于 7 目 25 科 42 属, 其中, 以鲈形目种类和数量最多, 其次为鲱形目, 此结果与以往研究结果相一致^[31-33]。凤鲚是本次调查主要的优势种之一, 仅分布于河口区盐度 10 以下站位, 盐度最低的 D1 站位最多, 说明凤鲚更偏向于低盐度水域。本文

与肖瑜璋等^[32-33]的珠江口鱼卵仔鱼调查相比, 优势种类多了凤鲚和棘头梅童鱼 2 种典型的河口鱼类, 少了虾虎鱼科 (Gobiidae) 和鲷科 (Callionymidae) 的种类, 这可能与本次调查范围更偏向河口区以及采样时间、方式等不同均存在一定关系。

研究表明, 鱼卵和仔稚鱼的组成和分布与水温、盐度等环境因子关系密切, 季节变化明显^[34-35]。本次调查发现调查水域水温相近, 均有利于鱼卵和仔稚鱼的繁殖和生长, 鱼卵和仔稚鱼的分布与盐度密切相关。如表 1 各站位盐度显示, D1 站位位于虎门水道口, D2、D3、D5 站位位于西侧珠江入海口区域, 受珠江径流影响, 盐度较低, 均在 10 以下, 为河口咸淡水区域。此低盐度区域鱼卵和仔稚鱼种类数最少, 但偏好低盐度的凤鲚和棘头梅童鱼数量丰富, 另还有花鲈、银鱼属 (*Salanx*) 等种类仅分布于此。D7 站位位于最东侧, 盐度最高, 超过 30, 为高盐区, 日本海鲷 (*Nemat-*

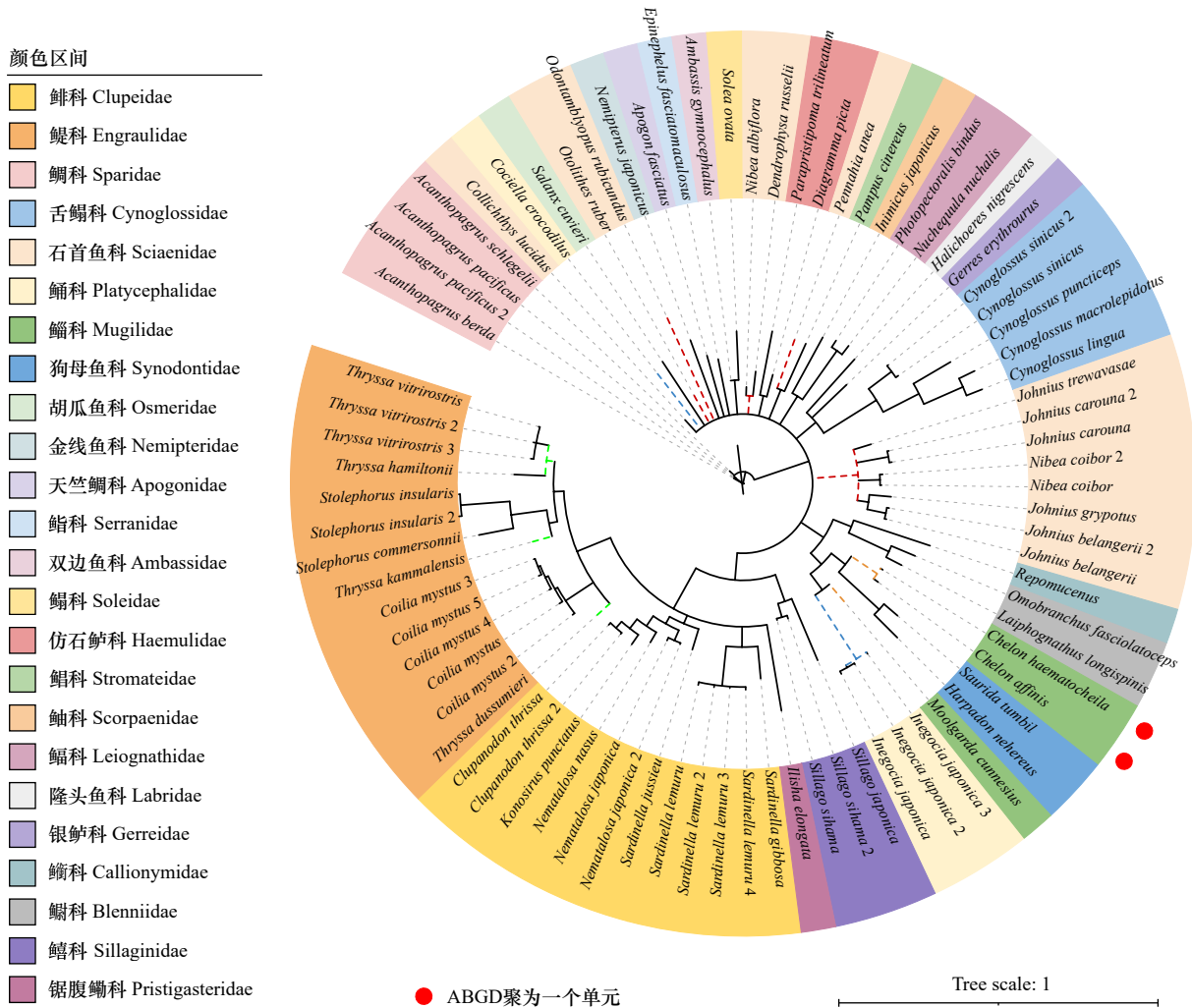


图4 基于12S rRNA序列构建的系统发育树

Fig. 4 Phylogenetic tree based on 12S rRNA sequences

ABGD的DNA鉴定通过红色圆点显示在外围

The DNA identification from ABGD is displayed on the periphery through the red dot

alosa japonica)、多齿蛇鲻 (*Saurida tumbil*)、龙头鱼 (*Harpadon nehereus*)、舌鲷属等更偏向于此区域。D4、D6、D8和D9站盐度均在20~30之间,为海湾冲淡水区,此区域咸淡水种类和近岸种类均较多分布,是鱼卵和仔稚鱼的主要繁殖和发育地,主要有小沙丁鱼属、小公鱼属、石首鱼科等。有部分种类如项斑项鲷为广盐性鱼类,几乎所有站位均有分布。种类数最多的D6青洲和D8桂山岛站位,以往的研究已认为该水域为春季鱼卵和仔稚鱼的重要分布区域^[36-37]。此区域处于径流和潮流的消能带和咸淡水交汇处,营养丰富,且盐度处于23~30之间,这与李建生等^[38]认为的长江口表层盐度24~32水域为鱼卵和仔稚鱼的主要分布区域的盐度范围极为相近。

本文仅有1个航次的调查,在分析种类组成和分布上略显不足,今后还需要结合多年份、多季节调查

数据更为准确地评估珠江口鱼卵和仔稚鱼的组成和分布状况。

4.2 线粒体CO I和12S rRNA基因在鱼卵和仔稚鱼鉴定中的适用性

DNA条形码技术始于2003年^[18],2006年首次报道用于鱼卵和仔稚鱼的鉴定^[39],随后因其具有操作简单、易于掌握、准确性高的优势在鱼类鉴定中得到了广泛应用^[40-41]。Ward等^[13]开发的CO I基因条形码通用引物目前在鱼类鉴定中应用最为广泛,包括鱼卵和仔稚鱼的鉴定。但是由于鱼卵和仔稚鱼样品DNA量较少,提取DNA过程中容易造成DNA的丢失、断裂等,Fish引物在扩增鱼卵和仔稚鱼时的成功率一直不太稳定。国内外多位学者使用Fish引物对鱼卵和仔稚鱼CO I基因片段扩增结果显示成功率在42.3%~84.6%,平均为60.7%^[7-8, 12, 42-44]。随着环境DNA技术的

发展,急需片段更小的微型条形码。Miya等^[14]开发的12S rRNA基因微型条形码Mifish引物在应用中被发现对鱼卵和仔稚鱼等DNA量少且已降解的样品依然能够较好地扩增。基于上述原因,本文选择这两个具有代表性的条形码分别对珠江口鱼卵和仔稚鱼样品进行扩增分析,探究其在鱼卵和仔稚鱼种类鉴定中的适用性。

本文CO I基因扩增获得有效序列169条,扩增成功率为43.22%;12S rRNA基因扩增获得有效序列369条,扩增成功率为95.60%。从扩增成功率来看,12S rRNA基因Mifish引物更具有优势。

CO I基因的种内遗传距离(0~0.005)均小于0.02,种间遗传距离(0.061~0.376)均大于0.02,种间平均遗传距离为种内遗传距离的84倍,符合Hebert等^[18]提出的0.02作为DNA条形码物种划分的阈值和种间遗传距离大于种内遗传距离10倍以上规则。种间遗传距离和种内遗传距离之间存在明显的“条形码间隙”,ABGD划分与数据库比对结果相一致。系统发育树显示,科、属、种各分类阶元物种均能聚为独立分支。以上结果均表明,CO I基因可以作为条形码对鱼卵和

仔稚鱼种类成功鉴定且可进一步分析其系统进化关系。

12S rRNA基因种内遗传距离(0~0.011)均小于0.02,种间遗传距离最小为0.007(龟鮠和前鳞龟鮠),小于0.02且与种内遗传距离存在交叉重叠,其余种间遗传距离(0.021~0.487)均大于0.02,种间平均遗传距离为种内遗传距离的143倍。ABGD划分将龟鮠和前鳞龟鮠划为同一种,其他种类与数据库比对结果一致。可见,12S rRNA基因对大多数鱼卵和仔稚鱼可以成功鉴定,但对个别近缘物种(龟鮠和前鳞龟鮠)难以有效区分。系统进化树显示在属和科的分类阶元上聚类关系不是很清晰,不适合分析种以上高分类阶元的系统进化关系。

综上所述,CO I和12S rRNA基因片段用于珠江口鱼卵和仔稚鱼鉴定各有优缺点,CO I基因片段在种类划分和系统发育分析方面更为准确,但扩增成功率较低。12S rRNA基因片段扩增成功率高,但部分近缘物种难以有效区分,且不适合高分类阶元的系统发育分析。作者认为,12S rRNA基因可以用于单纯的鱼卵和仔稚鱼分子鉴定,在少数近缘物种鉴定中结合CO I基因综合分析将是最佳选择。

参考文献:

- [1] 王迪,林昭进.珠江口鱼类群落结构的时空变化[J].南方水产,2006,2(4):37-45.
Wang Di, Lin Zhaojin. Spatial and temporal variations of fish community structure in the Pearl River Estuary waters[J]. South China Fisheries Science, 2006, 2(4): 37-45.
- [2] 郑亮,吕振波,李凡,等.黄河口、长江口和珠江口水域鱼类分类学多样性的对比研究[J].大连海洋大学学报,2014,29(5):530-535.
Zheng Liang, Lü Zhenbo, Li Fan, et al. Comparison of ontaxonomic diversity of fish community among the Yellow River Estuary, Yangtze River Estuary, Pearl River Estuary and their adjacent waters[J]. Journal of Dalian Ocean University, 2014, 29(5): 530-535.
- [3] 李永振,陈国宝,孙典荣.珠江口鱼类组成分析[J].水产学报,2000,24(4):312-317.
Li Yongzhen, Chen Guobao, Sun Dianrong. Analysis of the composition of fishes in the Pearl River estuarine waters[J]. Journal of Fisheries of China, 2000, 24(4): 312-317.
- [4] 刘守海,程祥圣,何彦龙,等.DNA条形码技术在鱼类浮游生物鉴定中的应用及研究展望[J].海洋开发与管理,2018,35(7):56-62.
Liu Shouhai, Cheng Xiangsheng, He Yanlong, et al. Review and outlook of DNA barcoding in identification of ichthyoplankton[J]. Ocean Development and Management, 2018, 35(7): 56-62.
- [5] Zhou Lei, Wang Gongpei, Kuang Tianxu, et al. Fish assemblage in the Pearl River Estuary: spatial-seasonal variation, environmental influence and trends over the past three decades[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2019, 35(4): 884-895.
- [6] 刘连为,隋宥珍,蒋日进,等.春季舟山渔场鱼卵、仔稚鱼种类组成与数量分布[J].浙江海洋大学学报(自然科学版),2021,40(1):1-8.
Liu Lianwei, Sui Youzhen, Jiang Rijin, et al. Species composition and abundance distribution of ichthyoplankton in Zhoushan fishing ground in spring[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2021, 40(1): 1-8.
- [7] 林君卓,吴昊,陈凯,等.DNA条形码在厦门湾鱼卵和仔稚鱼分类鉴定中的应用[J].渔业研究,2018,40(5):340-348.
Lin Junzhuo, Wu Hao, Chen Kai, et al. Identification of ichthyoplankton using DNA barcoding in Xiamen Bay[J]. Journal of Fisheries Research, 2018, 40(5): 340-348.
- [8] 唐富江,王继隆,那荣滨,等.基于DNA条形码技术的乌苏里江中下游漂流性鱼卵鉴定[J].湿地科学,2020,18(6):653-659.
Tang Fujiang, Wang Jilong, Na Rongbin, et al. Identification of drifting eggs of fish in the middle and lower reaches of the Wusuli River based on DNA barcoding technology[J]. Wetland Science, 2020, 18(6): 653-659.
- [9] 张楠,吴娜,郭华阳,等.基于DNA条形码技术对江门沿岸海域夏季鱼卵的鉴定[J].中国水产科学,2018,25(4):721-727.
Zhang Nan, Wu Na, Guo Huayang, et al. DNA barcoding technology to identify spawn from the Jiangmen marine environment in summer[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(4): 721-727.

- [10] Steinke D, Connell A D, Hebert P D N. Linking adults and immatures of South African marine fishes[J]. *Genome*, 2016, 59(11): 959–967.
- [11] Pappalardo A M, Cuttitta A, Sardella A, et al. DNA barcoding and COI sequence variation in Mediterranean lanternfishes larvae[J]. *Hydrobiologia*, 2015, 749(1): 155–167.
- [12] Leyva-Cruz E, Vásquez-Yeomans L, Carrillo L, et al. Identifying pelagic fish eggs in the southeast Yucatan Peninsula using DNA barcodes[J]. *Genome*, 2016, 59(12): 1117–1129.
- [13] Ward R D, Zemlak T S, Innes B H, et al. DNA barcoding Australia's fish species[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2005, 360(1462): 1847–1857.
- [14] Miya M, Sato Y, Fukunaga T, et al. MiFish, a set of universal PCR primers for metabarcoding environmental DNA from fishes: detection of more than 230 subtropical marine species[J]. *Royal Society Open Science*, 2015, 2(7): 150088.
- [15] Swindell S R, Plasterer T N. SEQMAN. Contig assembly[J]. *Methods in Molecular Biology*, 1997, 70: 75–89.
- [16] Iwasaki W, Fukunaga T, Isagozawa R, et al. MitoFish and MitoAnnotator: a mitochondrial genome database of fish with an accurate and automatic annotation pipeline[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2013, 30(11): 2531–2540.
- [17] Ratnasingham S, Hebert P D N. BOLD: the Barcode of Life Data System (www.barcodinglife.org)[J]. *Molecular Ecology Notes*, 2007, 7(3): 355–364.
- [18] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2003, 270(1512): 313–321.
- [19] Ko H L, Wang Y T, Chiu T S, et al. Evaluating the accuracy of morphological identification of larval fishes by applying DNA barcoding[J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e53451.
- [20] 刘守海, 杨漪祎, 何彦龙, 等. 基于DNA条形码的长江口鱼类浮游生物形态分类研究[J]. *海洋学报*, 2021, 43(8): 93–104.
Liu Shouhai, Yang Yiyi, He Yanlong, et al. Morphological classification of ichthyoplankton in the Changjiang River Estuary based on DNA barcoding[J]. *Haiyang Xuebao*, 2021, 43(8): 93–104.
- [21] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870–1874.
- [22] Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, et al. ABGD, automatic barcode gap discovery for primary species delimitation[J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21(8): 1864–1877.
- [23] Zhang Dong, Gao Fangluan, Jakovlić I, et al. PhyloSuite: an integrated and scalable desktop platform for streamlined molecular sequence data management and evolutionary phylogenetics studies[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2020, 20(1): 348–355.
- [24] Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v4: recent updates and new developments[J]. *Nucleic Acids Research*, 2019, 47(W1): W256–W259.
- [25] Schlitzer, Reiner. Ocean data view[EB/OL]. [2021–10–18]. <https://odv.awi.de>.
- [26] 伍汉霖, 邵广昭, 赖春福, 等. 拉汉世界鱼类系统名典[M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2017.
Wu Hanlin, Shao Guangzhao, Lai Chunfu, et al. Latin-Chinese Dictionary of Fish Names by Classification System[M]. Qingdao: China Ocean University Press, 2017.
- [27] 孙儒泳. 动物生态学原理[M]. 2版. 北京: 北京师范大学出版社, 1987.
Sun Ruyong. Principles of Animal Ecology[M]. 2nd ed. Beijing: Beijing Normal University Press, 1987.
- [28] 吕振波, 李凡, 曲业兵, 等. 2010年夏季黄河口及邻近海域鱼类群落多样性[J]. *渔业科学进展*, 2013, 34(2): 10–18.
Lü Zhenbo, Li Fan, Qu Yebing, et al. Fish community diversity in the Huanghe Estuary and its adjacent area in summer, 2010[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2013, 34(2): 10–18.
- [29] 蒋玫, 沈新强, 王云龙, 等. 长江口及其邻近水域鱼卵、仔鱼的种项组成与分布特征[J]. *海洋学报*, 2006, 28(2): 171–174.
Jiang Mei, Shen Xinqiang, Wang Yunlong, et al. Species of fish eggs and larvae and distribution in Changjiang Estuary and vicinity waters[J]. *Haiyang Xuebao*, 2006, 28(2): 171–174.
- [30] 陈琳. 珠江河口和浅海鱼虾类的产卵场、渔场、渔汛和渔业资源的利用水平[C]//何国民, 赵永泉. 珠江口水域水生生物生态研究文集. 北京: 科学出版社, 2004: 59–72.
Chen Lin. Spawning grounds, fishing grounds, fishing flood and utilization level of fishery resources of fish and shrimp in Pearl River Estuary and shallow sea[C]//He Guomin, Zhao Yongquan. Collection of Ecological Studies on Aquatic Organisms in the Pearl River Estuary. Beijing: Science Press, 2004: 59–72.
- [31] 詹海刚. 珠江口及邻近水域鱼类群落结构研究[J]. *海洋学报*, 1998, 20(3): 91–97.
Zhan Haigang. Study on fish community structure in the Zhujiang Estuary and adjacent waters[J]. *Haiyang Xuebao*, 1998, 20(3): 91–97.
- [32] 肖瑜璋, 王蓉, 欧强, 等. 春季珠江口水域鱼卵和仔稚鱼的分布及其与环境因子的关系[J]. *台湾海峡*, 2010, 29(4): 488–495.
Xiao Yuzhang, Wang Rong, Ou Qiang, et al. Relationship between abundance distribution of fish eggs, larvae and juveniles and environmental factors in the Pearl River Estuary waters in spring[J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*, 2010, 29(4): 488–495.
- [33] 肖瑜璋, 王蓉, 郑瑛晶, 等. 珠江口鱼类浮游生物种类组成与数量分布[J]. *热带海洋学报*, 2013, 32(6): 80–87.
Xiao Yuzhang, Wang Rong, Zheng Yanjing, et al. Species composition and abundance distribution of ichthyoplankton in the Pearl River Estuary[J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2013, 32(6): 80–87.

- [34] 陈真然, 魏淑珍. 珠江口海区浮性鱼卵和仔稚鱼分布的生态特征[C]//何国民, 赵永泉. 珠江口水域水生生物生态研究文集. 北京: 科学出版社, 2004: 133-139.
Chen Zhenran, Wei Shuzhen. Ecological characteristics of the distribution of floating fish eggs and larvae in the Pearl River Estuary[C]//He Guomin, Zhao Yongquan. Collection of Ecological Studies on Aquatic Organisms in the Pearl River Estuary. Beijing: Science Press, 2004: 133-139.
- [35] Burghart S E, Van Woudenberg L, Daniels C A, et al. Disparity between planktonic fish egg and larval communities as indicated by DNA barcoding[J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2014, 503: 195-204.
- [36] 广东省海岛资源综合调查大队, 广东省海岸带和海涂资源综合调查领导小组办公室. 珠江口海岛资源综合调查报告[M]. 广州: 广东科技出版社, 1993: 199-203.
Guangdong Island Resources Comprehensive Investigation Team, Guangdong Provincial Leading Group Office for the Comprehensive Survey of Coastal Zone and Tidal Flat Resources. Comprehensive Survey Report of Island Resources in Pearl River Estuary[M]. Guangzhou: Guangdong Science and Technology Press, 1993: 199-203.
- [37] 徐兆礼, 陈华, 陈庆辉. 瓯江口渔场夏秋季浮性鱼卵和仔鱼的时空分布[J]. 水产学报, 2008, 32(5): 733-739.
Xu Zhaoli, Chen Hua, Chen Qinghui. Distribution patterns of ichthyoplankton in the Oujiang Estuary[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(5): 733-739.
- [38] 李建生, 胡芬, 程家骅. 长江口水域春季鱼卵仔鱼分布及其与温度盐度的关系[J]. *海洋科学*, 2007, 31(4): 16-21.
Li Jiansheng, Hu Fen, Cheng Jiahua. Distributions of fish eggs and juveniles and relations between surface layer water temperature and salinity of the Yangtze Estuary water area in spring[J]. *Marine Sciences*, 2007, 31(4): 16-21.
- [39] Pegg G G, Sinclair B, Briskey L, et al. MtDNA barcode identification of fish larvae in the southern Great Barrier Reef, Australia[J]. *Scientia Marina*, 2006, 70(S2): 7-12.
- [40] 余海军, 王茜. DNA条形码在水生动物物种鉴定中的应用[J]. *安徽农业科学*, 2021, 49(16): 1-3, 6.
Yu Haijun, Wang Qian. Application of DNA barcoding for species identification in aquatic animal[J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2021, 49(16): 1-3, 6.
- [41] 赵新宁. DNA条形码和eDNA技术在鱼类分类鉴定中的应用[D]. 上海: 上海海洋大学, 2021.
Zhao Xinning. Application of DNA barcode and eDNA technology in fish classification and identification[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2021.
- [42] Kawai K, Okazaki R, Tomano S, et al. DNA identification and seasonal changes of pelagic fish eggs in Hiroshima Bay[J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 2017, 83(2): 215-217.
- [43] 吴娜, 张楠, 曹明, 等. 基于DNA条形码技术的永暑礁泻湖鱼卵鉴定研究[J]. *淡水渔业*, 2018, 48(2): 51-57.
Wu Na, Zhang Nan, Cao Ming, et al. The identification analysis of fish eggs from lagoon of Yongshu Reef based on DNA barcoding technology[J]. *Freshwater Fisheries*, 2018, 48(2): 51-57.
- [44] 卢芷程, 李敏, 张俊, 等. 基于DNA条形码的南海美济礁泻湖鱼卵种类鉴定与组成初探[J]. *南方水产科学*, 2021, 17(6): 12-21.
Lu Zhicheng, Li Min, Zhang Jun, et al. Preliminary study on species composition of fish eggs of Meiji Reef Lagoon in South China Sea based on DNA barcoding[J]. *South China Fisheries Science*, 2021, 17(6): 12-21.

Species composition and distribution characteristic of fish eggs and larvae based on DNA barcoding technology of the Zhujiang River Estuary in spring

Kong Xiaolan¹, Zhang Shuai¹, Chen Zuozhi^{1,2}, Lin Zhaojin¹, Jiang Peiwen¹, Jiang Yan'e¹

(1. Key Laboratory of Sustainable Utilization of Open-sea Fishery, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou 510300, China; 2. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Guangzhou), Guangzhou 511458, China)

Abstract: In order to improve the success rate and accuracy of species identification of fish eggs and larvae, fish eggs and larvae samples collected from the Zhujiang River Estuary in spring were identified by DNA barcoding technology based on the mitochondrial CO I and 12S rRNA genes. A total of 391 samples were amplified and 60 species in 7 orders, 25 families, 42 genera were successfully identified (2 species were not identified). Among them, Perciformes had the most species and quantity accounting for 51.6% and 47.91% respectively, followed by

Clupeiformes with 25% and 34.56% respectively. There were 10 dominant species, among which *Coilia mystus* had the highest dominance of 0.071, *Collichthys lucidus* had the lowest dominance of 0.014. The amplification results of CO I and 12S rRNA gene fragments showed that the success rate of 12S rRNA gene amplification in eggs and larvae (95.60%) was significantly higher than that of CO I gene (43.22%). Genetic distance and ABGD analysis showed that the intraspecies genetic distance of CO I gene was 0–0.005 (average was 0.003), and the interspecific genetic distance was 0.061–0.376 (average was 0.253), and there was an obvious “barcode gap” between them. The intraspecific genetic distance of 12S rRNA gene was 0–0.011 (average was 0.007), and the interspecific genetic distance was 0.007–0.487 (average was 0.283), which do not form a “barcode gap” between the interspecific and intraspecies genetic distances. The Bayesian phylogenetic tree based on CO I and 12S rRNA genes showed that all species could be clustered into independent branches and can be effectively distinguished. The above results show that both CO I gene and 12S rRNA gene can be used for the identification of most fish eggs and larvae, but the success rate of CO I gene amplification is low, and it is difficult to distinguish some closely related species of 12S rRNA gene. The combined use of the two genes can improve the success rate and accuracy of species identification of fish eggs and larvae.

Key words: CO I gene; 12S rRNA gene; fish eggs and larvae; DNA barcoding