

DOI: 10.12264/JFSC2023-0003

基于 DNA 宏条形码技术的沙氏下鱚幼鱼食性分析

李玉龙, 陈百灵, 鲍相渤, 周遵春, 刘卫东, 李云峰

辽宁省海洋水产科学研究院, 农业农村部水产种质资源保护与发掘利用重点实验室, 辽宁省分子生物学重点实验室, 辽宁 大连 116023

摘要: 为详细了解鱼类早期生活史阶段的食物组成, 以黄海北部海水池塘养殖环境下不同发育阶段的沙氏下鱚(*Hyporhamphus sajori*)幼鱼为对象, 提取其胃含物及水环境样品 DNA, 选用 18S rDNA V4 区作为分子标记进行扩增, 通过 DNA 宏条形码技术(DNA metabarcoding)鉴定其食物组成及摄食选择性。结果显示, 33 日龄沙氏下鱚幼鱼胃含物样品中共检出 17 个物种门类, 其中节肢动物门(45.29%)序列数占比最高, 其他物种序列数占比超过 1% 的门类依次为绿藻门(20.34%)、硅藻门(12.35%)、甲藻门(12.42%)、纤毛虫门(2.41%)、链形植物门(1.75%)、鞭毛虫门(1.24%)和子囊菌门(1%), 同期水环境样品中甲藻门序列数占绝对优势(76.64%), 其次分别为纤毛虫门(2.52%)、刺胞动物门(1.50%)、异鞭藻门(1.34%)、丝足虫门(1.12%); 63 日龄沙氏下鱚幼鱼胃含物样品中共检出 18 个物种门类, 其中节肢动物门序列数占绝对优势(97.31%), 其他门类物种序列数占比均小于 1%, 同期水环境样品中甲藻门(57.92%)为优势门类, 其他物种序列数占比超过 1% 的门类依次为纤毛虫门(10.97%)、硅藻门(8.05%)、金藻门(4.54%)、隐藻门(3.88%)、异鞭藻门(3.85%)、刺胞动物门(2.30%)、节肢动物门(1.61%)、绿藻门(1.07%)。不同发育阶段的沙氏下鱚幼鱼食物组成存在差异, 说明沙氏下鱚的食性随着生长发育可能存在由浮游生物为主的杂食性向浮游动物食性的转变。此外, 通过 DNA 宏条形码技术还检测出传统胃含物检测方法未鉴定到的真菌、纤毛虫类以及链形植物等食物种类。研究结果表明, DNA 宏条形码技术作为一种新兴的食性分析方法, 适用于幼鱼阶段鱼类的食性分析, 且比基于传统形态学的食性分析具有更高的鉴别潜力。

关键词: 沙氏下鱚; DNA 宏条形码; 18S rDNA; 摄食选择性; 食性分析

中图分类号: S931

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2023)04–0393–13

鱼类食性研究是鱼类生物学和生态学研究的重要内容, 是进行渔业资源开发和管理的基礎^[1]。鱼类食物谱的广度和组成是影响鱼类生态功能的重要方面^[2], 其食物组成情况一般通过胃含物传统形态鉴定法进行观察和统计, 从而判断鱼类各种食物的相对重要程度^[3]。胃含物传统形态鉴定法是应用最早、最广泛的鱼类食性鉴定方法, 这种方法能够提供食物的形态信息, 可以直接定量反映鱼类胃含物的食物组成, 在鱼类的食性研究中得到了广泛的应用^[3–4]。然而传统形态鉴定方法工作强度大, 且严重依赖于实验人员的形态分类

鉴定技能, 消化过的食物碎片有时很难进行形态鉴定^[5], 其“分辨率”和“准确率”会受到消化程度及分类技能的直接影响。尤其是对一些以浮游动物为食的小型鱼类或者处于生活史早期阶段的仔稚鱼或幼鱼来说, 由于其摄食量小且食物微小, 消化后的食物碎片很难进行形态鉴定, 阻碍了对其食性的深入研究。

沙氏下鱚(*Hyporhamphus sajori*)也称日本鱚, 俗称棒鱼, 隶属于颌针鱼目(Beloniformes)鱚科(Hyporhamidae)下鱚鱼属(*Hyporhamphus*), 是我国北方海域较具代表性的温水性中上层小型经济

收稿日期: 2023-01-09; 修订日期: 2023-03-16.

基金项目: 国家现代农业产业技术体系专项(CARS-47); 辽宁省重大农业专项(2020JH1/10200002); 辽宁省海洋渔业厅项目(201834).

作者简介: 李玉龙(1981–), 男, 副研究员, 研究方向为海洋生物遗传育种及渔业资源增殖放流. E-mail: liyudragon@126.com

通信作者: 李云峰, 研究员, 研究方向为水产养殖. E-mail: yunfengli@126.com

鱼类, 每年春季在黄渤海近岸形成明显的渔场和渔汛, 20 世纪 80 年代渔获量曾超过万 t^[6-9]。近年来, 由于传统经济鱼类资源的衰退, 沙氏下鱚已成为中国黄渤海近岸海域的重要鱼类生物资源, 但由于过度捕捞和栖息地破坏, 沙氏下鱚自然资源也呈逐年下降趋势, 亟需加强对沙氏下鱚这一海洋渔业资源的保护。鱼类尤其是幼鱼阶段的生长与存活与其摄食密切相关, 就沙氏下鱚这类小型鱼类而言, 受限于之前的食性分析技术, 有关其食物组成及其摄食选择性方面的研究还很欠缺。已有的研究显示, 自然海域中沙氏下鱚成鱼为浮游动物食性, 其食物组成主要为桡足类、枝角类、糠虾、磷虾、水生昆虫等, 也摄食少量的硅藻、绿藻等浮游植物和有机碎屑等^[8-11], 采用的研究方法多为形态学鉴定。如陈大刚^[8]报道沙氏下鱚通常摄食以小型甲壳类为主的浮游动物, 主要包括硅藻、水母类、双壳类幼体、桡足类、端足类、糠虾、昆虫等。此外, 对黄、渤海区沙氏下鱚的调查结果也显示, 沙氏下鱚以浮游生物为食, 主食枝角类; 在莱州湾和烟威近海有时也以石莼为食; 在海州湾主食舟形硅藻、水母幼体、桡足类、端足类、糠虾、水生昆虫等; 石岛近海则主食糠虾^[11]。然而, 胃含物形态学鉴定方法虽然操作简单, 但针对食物微小、消化程度较高的胃含物难以进行形态鉴定^[5], 不适于沙氏下鱚这类小型鱼类的食性分析, 从而可能低估其食物多样性。

DNA 宏条形码技术是近年发展起来的一种基于高通量测序技术获得生物特异性基因识别 DNA 条形码序列的方法, 该技术通过对大量样本进行处理和测序后, 借助数据库序列比对可以实现物种水平上的食物种类鉴定, 而且可以通过比较所得物种序列的相对丰度来定量描述目标种的食物组成, 从而实现食性研究的定性及定量分析, 适用于对各种动物类群进行大规模食性研究^[12-17]。目前, 有关鱼类生活史早期阶段食性研究较为缺乏, 对沙氏下鱚幼鱼或成鱼食性方面的分析均为基于上述传统形态学鉴定方法进行的研究^[6-11], 尚无利用分子标记技术分析沙氏下鱚幼鱼食性方面的报道。本研究选取黄海北部海水池塘这一半

封闭生态系统中养殖的沙氏下鱚幼鱼为对象, 分别选取不同生长阶段的沙氏下鱚幼鱼胃含物及水环境样品, 提取其 DNA 后选用 18S rDNA 作为分子标记, 分析不同生长阶段沙氏下鱚幼鱼的食物组成及摄食选择性, 解析 DNA 宏条形码技术在幼鱼阶段鱼类食性研究中的应用潜能, 为沙氏下鱚资源的保护和可持续利用提供科学依据, 也为今后与沙氏下鱚类似的小型鱼类及鱼类早期生活史阶段的摄食研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 样品采集

2019 年 5 月, 在黄海北部大洋河口附近海域采集到一些附着在刺网上的鱼类受精卵, 经形态和分子鉴定为沙氏下鱚受精卵后^[18-19], 在东港市黄土坎农场有限公司育苗车间进行人工培育, 培育用海水经过砂滤, 水温 17~19 °C, pH 7.8~8.4, 盐度 26~28, 溶解氧含量 5 mg/L 以上。初孵仔鱼 5 月 23 日出膜后, 鱼苗继续经车间培育至全长 2~3 cm 后于 6 月 15 日放入东港市黄土坎农场有限公司海水池塘进行养殖实验。该池塘位于丹东东港滨海路潮上带, 池塘面积 2 hm², 水深 1.5~2.0 m, 月换水 2~3 次。经池塘养殖 10 和 40 d 后, 分别于 2019 年 6 月 25 日、7 月 25 日采集沙氏下鱚幼鱼胃含物, 6 月 25 日采集 33 日龄幼鱼 20 尾, 平均体长(40.20±3.66) mm; 7 月 25 日采集 63 日龄幼鱼 30 尾, 平均体长(86.60±8.69) mm, 具体采样信息见表 1。采集的沙氏下鱚幼鱼现场用无菌的解剖剪解剖, 由于沙氏下鱚幼鱼的胃是呈管状的“T”字型胃, 胃与肠之间没有明显界限, 在确保解剖鱼类样品肠道中存在食物后, 用全消化道内含物作为胃含物放入冻存管中冷冻保存备用。

采集沙氏下鱚胃含物的同时, 采集海水养殖池塘的水环境样品。分别在池塘周边位置设 4 个采样点, 每个采样点使用容量为 1 L 的取水器采集表层、中层水样, 每个采样点在同一位置进行多次采样, 以增加物种的检出率, 混合后保存至已消毒的 5 L 塑料桶中。为了提高目标种的检出率, 所有样品均在 24 h 内分别使用 0.45 μm 和 3 μm (MCE; Whatman 公司)混合纤维素滤膜进行

真空抽滤。在每份样品过滤后, 滤膜立即冷冻保存, 并对过滤器滤膜接触面用酒精进行消毒后用超纯水冲洗, 防止样品间的交叉污染。冷冻滤膜置低温保温箱保存带回实验室备用。

表 1 沙氏下鱯幼鱼胃含物及水环境样品取样信息
Tab. 1 Sampling information of stomach content of *Hyporhamphus sajori* and environmental water samples

采集日期 date	样品 sample	生长阶段 stage	样品数量 number	平均体长/mm average length
2019-06-25	沙氏下鱯胃含物 stomach content	33 日龄 幼鱼	20	40.20±3.66
	水环境样品 water		4	
2019-07-25	沙氏下鱯胃含物 stomach content	63 日龄 幼鱼	30	86.60±8.69
	水环境样品 water		4	

1.2 DNA 提取、PCR 扩增及测序

采用 CTAB (hexadecyltrimethylammonium bromide, 十六烷基三甲基溴化铵)法分别提取沙氏下鱯幼鱼胃含物及水环境样品宏基因组 DNA, 其中, 第 1 次采集的 4 个采样点的水环境样品分别经 0.45 μm 和 3 μm 过滤后提取 DNA, 然后分别将每个采样点经 0.45 μm 和 3 μm 过滤后的 2 个 DNA 样品混合成一个样品, 混合成 4 个水环境样品用于后续分析, 第 1 次采集的 20 个胃含物样品的 DNA 分别提取后, 每 10 个个体混合成一个样品, 混合成 2 个胃含物混合样品进行后续分析; 第 2 次采集的 4 个水环境样品分别经 0.45 μm 和 3 μm 过滤后, 经 0.45 μm 过滤的 4 个水样混合成 1 个样品, 经 3 μm 滤膜过滤的 4 个水样混合成另 1 个样品, 共包括 2 个水环境样品进行后续分析, 第 2 次采集的 30 个胃含物样品的 DNA 分别提取后, 每 10 个个体混合成一个样品, 混合成 3 个胃含物混合样品进行后续分析。以混合后的胃含物及水环境样品总 DNA 分别为模板, 使用带 Barcode 特异引物的 18S V4 区 528F-706R 分别对环境水样和沙氏下鱯胃含物 DNA 进行 PCR 扩增。引物序列为: 528F, 5'-GCCTCCCTCGCGCCATCAGGCGG-TAATTCCAGCTCCAA-3', 706R, 5'-GCCTTGCC-AGCCCGATCAGAATCCRAGAATTTCACCTCT-3'。反应体系 25 μL, 包括: 0.2 mmol/L 每种 dNTPs,

0.2 μmol/L 每种引物, 1 μL DNA 模板, 1 U *Taq*, 2.0 mmol/L MgCl₂, 2.5 μL 10×缓冲液, 灭菌超纯水补足剩余体系。在 Bio-rad T100 梯度 PCR 仪上进行 PCR 扩增, 反应程序: 98 °C 预变性 1 min, 98 °C 变性 10 s, 50~55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环; 最后 72 °C 保温 5 min。PCR 产物经 2% 的琼脂糖凝胶电泳纯化后, 选择主带大小为 400~450 bp 的序列, 使用 QIAquick 胶回收试剂盒割胶回收目标条带。PCR 扩增产物使用 TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 建库试剂盒进行文库构建, 构建好的文库经过 Qubit 和 Q-PCR 定量, 经检测合格后, 将合格的文库在 Illumina 平台进行高通量测序(天津诺不致源生物信息科技有限公司)。

1.3 数据分析

各样品的原始测序 reads 用 OBITools1.01.22 程序包(<http://metabarcoding.org/obitools/doc>)经质控、过滤、拼接后得到有效数据, 建立参考数据库、序列比对及分类等步骤, 基于有效数据以 97% 的一致性进行 OTUs (Operational taxonomic units) 聚类 and 物种分类分析。选取代表性 OTUs 序列, 采用 RDP Classifier V2.2 方法^[20]与 Silva 数据库进行物种注释^[21]。为排除鱼类自身序列的干扰, 将隶属于脊索动物门(Chordata)的 OTUs 序列均删除, 不用于后续分析。当 OTUs 序列在 Silva 数据库中不能匹配相应的物种分类信息时, 将该序列在 NCBI 数据中进行 Blast 分析(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 进一步确认 OTUs 的分类信息。

通过 Excel 软件统计分析 OTUs 在门分类水平下的相对丰度; 同时, 选取 OTUs 相对丰度值最高的种类, 进行 Blast 比对, 探讨与之相近的物种信息。由于条形码分辨率及数据库的局限, 不是每条序列的识别都能达到物种水平, 因此将 OTU 代表序列作为分子可操作分类单元(MOTU)来对不同物种类群进行区分。序列的物种鉴定原则如下: 18S rDNA 序列以在相同的基因序列区域内, 当覆盖度(coverage)不低于 95%且一致度达到 99.5%及以上时, 判定样品来自匹配序列对应的物种; 最高一致度<99.5%且≥95%, 一致度最高序列仅有 1 条, 且与得分次之的序列一致度差距≥

2%时,记为一致度最高序列的上一级分类单元,最高一致度对应有多个物种时,则记为能够涵盖所有一致度最高的当地物种的最低分类单元^[22]。

根据相关研究,水环境样品中浮游生物物种序列数比例更接近于生物量比例^[23-25],鱼类的胃含物中的物种序列数比例也与其真实食物组成的结果大体一致^[26],因此,本研究将物种序列数比例作为水环境样品及胃含物样品的物种占比进行统计。样本进行物种注释后,在门分类水平上将各个样本门类作为整体进行物种组成统计及摄食选择性分析。采用 Ivlev 选择指数 E 来分析沙氏下鱚幼鱼对浮游生物的摄食选择性^[27]:

$$E=(r_i-p_i)/(r_i+p_i)$$

式中, r_i 表示 i 门类在沙氏下鱚胃含物中所占的百

分比, p_i 表示 i 门类在水体中的生物量百分比。 E 范围为 $[-1, 1]$,当 E 为 -1 时,表示鱼类避食门类 i ; 当 E 为 1 时,表示鱼类主动选择门类 i ; 当 E 接近 0 时,表示随机摄食门类 i 。

2 结果与分析

2.1 测序结果

经测序,6 个水环境样品每个样品平均获得 89817 条原始序列,5 个胃含物样品每个样品平均获得 89163 条原始序列。数据经拼接和质量过滤后,水环境及胃含物每个样品平均得到 65193、65199 条有效序列,有效序列占比均达到 73%以上,测序数据质量满足分析要求($Q20 \geq 98\%$, $Q30 \geq 94\%$),可进行后续分析。相关结果见表 2。

表 2 有效序列数及 OTUs 数统计
Tab. 2 The statistics of effective tags and OTUs numbers

样品 sample	原始 序列数 original tags	拼接 序列数 raw tags	过滤后 序列数 clean tags	有效序列数 effective tags number	有效序列平均长 度/nt effective tag length	Q20/%	Q30/%	有效序列数占比/% percentage of effective tags	OTUs 总数 total OTUs
水样 environmental water sample	89817	86304	84081	65193	307	98	94	73	427
胃含物 stomach contents	89163	86341	84268	65199	312	98	94	74	257

注: Q20 和 Q30 分别为有效序列数中碱基质量值(Phred)大于 20 (测序错误率小于 1%)和 30 (测序错误率小于 0.1%)的碱基所占的百分比。
Note: Q20 and Q30 represent the percentage of bases with Phred value more than 20 (sequencing error rate less than 1%) and 30 (sequencing error rate less than 0.1%), respectively.

2.2 基于 18S rDNA 宏条形码的 33 日龄沙氏下鱚胃含物及水环境样品物种组成

基于 18S rDNA 宏条形码鉴定结果,在门分类水平上,33 日龄沙氏下鱚胃含物样品及水环境样品物种组成分别如图 1、表 3 所示。33 日龄沙氏下鱚胃含物样品和水环境样品的物种组成有极大差别。水环境样品中,除 13.03% 的序列无法鉴定种类外,剩余序列共鉴定出 18 个门类。其中,甲藻门占绝对优势(76.64%),其次分别为纤毛虫门(2.52%)、刺胞动物门(1.50%)、异鞭藻门(1.34%)、丝足虫门(1.12%)、绿藻门(0.96%)、隐藻门(0.81%)、硅藻门(0.69%)、金藻门(0.53%)、轮虫门(0.34%)、节肢动物门(0.30%)以及子囊菌门(0.21%)。胃含物样品中,去除脊索动物门物种序列后无法鉴定种类的序列仅占 0.19%,剩余序列占比最高的为节肢动物门(45.29%),绿藻门(20.34%)、硅藻门

(12.35%)、甲藻门(12.42%)占比也较高,其他依次为纤毛虫门(2.41%)、链形植物门(1.75%)、鞭毛虫门(1.24%)、子囊菌门(1%)、隐藻门(0.92%)、异鞭藻门(0.88%)、软体动物门(0.38%)、金藻门(0.36%)、丝足虫门(0.19%)、定鞭藻门(0.14%)、轮虫门(0.07%)、担子菌门(0.05%)以及毛颚动物门(0.02%)。其中水环境样品中,未鉴定出毛颚动物门、担子菌门以及链形植物门物种,定鞭藻门、鞭毛虫门以及软体动物门种类也很少;而胃含物样品中未鉴定出刺胞动物门种类,担子菌门(0.05%)以及毛颚动物门(0.02%)种类占比均较少。

2.3 基于 18S rDNA 宏条形码的 63 日龄沙氏下鱚胃含物及水环境样品物种组成

基于 18S rDNA 宏条形码鉴定结果,在门分类水平上,63 日龄沙氏下鱚胃含物样品及水环境样品物种组成分别见图 2、表 4。63 日龄沙氏下

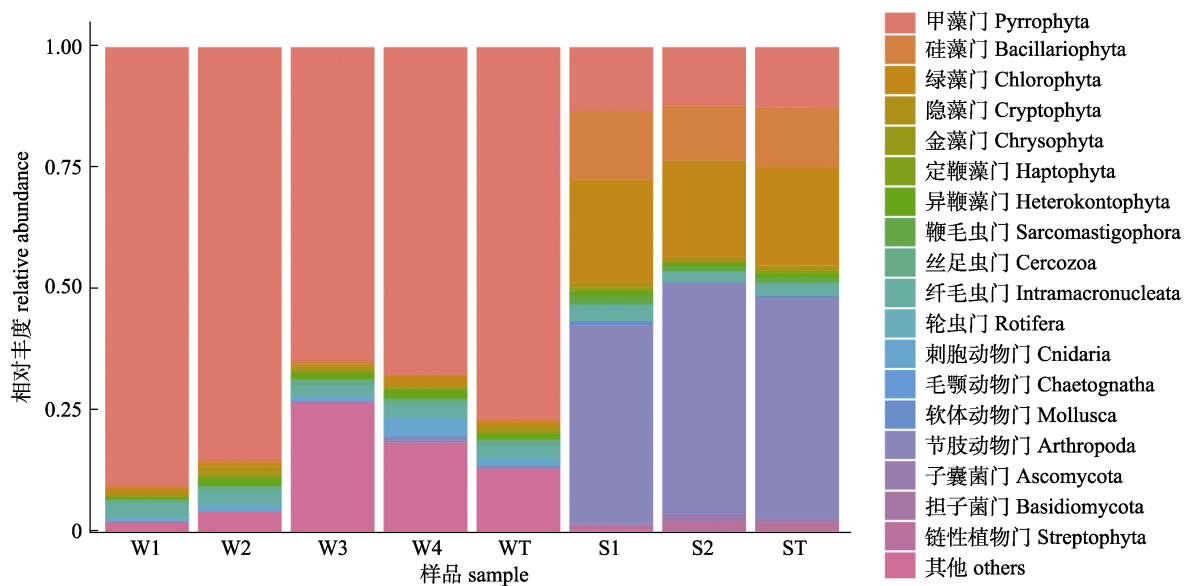


图 1 33 日龄沙氏下鱚所处养殖水体及胃含物中真核生物的物种组成

W1, W2, W3, W4 分别代表 33 日龄沙氏下鱚幼鱼所处养殖水体水环境样品, WT 代表合并后的水环境样品, S1, S2 分别代表 33 日龄沙氏下鱚幼鱼胃含物样品, ST 代表合并后的胃含物样品。

Fig. 1 Eukaryote composition in water samples and stomachs of 33 days old *Hyporhamphus sajori*

W1, W2, W3, W4 represent the environmental water samples and WT represents the combined environmental water sample of 33-day-old *H. salmonicus* juveniles. S1, S2 represent the stomach content samples and ST represents the combined stomach content sample of 33-day-old *H. salmonicus* juveniles.

表 3 基于 18S rDNA 宏条形码标记的 33 日龄沙氏下鱚胃含物及水环境样品的物种序列数

Tab. 3 The number of reads detected for stomach contents of 33 days old *Hyporhamphus sajori* and environmental water samples by DNA metabarcoding based on 18S rDNA sequences

序号 no.	门类 phylum	水样 water sample				合计 total	占比/%	胃含物 stomach content		合计 total	占比/%
		W1	W2	W3	W4			S1	S2		
1	甲藻门 Pyrrophyta	59453	53270	44745	43831	201299	76.64	1091	1835	2926	12.42
2	硅藻门 Bacillariophyta	435	568	491	317	1811	0.69	1176	1735	2911	12.35
3	绿藻门 Chlorophyta	534	530	359	1093	2516	0.96	1758	3035	4793	20.34
4	隐藻门 Cryptophyta	413	828	492	397	2130	0.81	86	130	216	0.92
5	金藻门 Chrysophyta	244	512	386	256	1398	0.53	44	40	84	0.36
6	定鞭藻门 Haptophyta	1	0	1	0	2	<0.01	12	22	34	0.14
7	异鞭藻门 Heterokontophyta	298	1033	960	1227	3518	1.34	93	115	208	0.88
8	鞭毛虫门 Sarcomastigophora	0	0	7	0	7	<0.01	138	154	292	1.24
9	丝足虫门 Cercozoa	550	698	854	830	2932	1.12	22	23	45	0.19
10	纤毛虫门 Intramacronucleata	1796	1791	1378	1662	6627	2.52	262	305	567	2.41
11	轮虫门 Rotifera	320	117	324	128	889	0.34	8	8	16	0.07
12	刺胞动物门 Cnidaria	351	704	428	2447	3930	1.50	0	0	0	0
13	毛颚动物门 Chaetognatha	0	0	0	0	0	0	4	1	5	0.02
14	软体动物门 Mollusca	1	11	9	3	24	<0.01	72	17	89	0.38
15	节肢动物门 Arthropoda	50	14	139	587	790	0.30	3396	7276	10672	45.29
16	子囊菌门 Ascomycota	16	50	242	253	561	0.21	24	212	236	1.00
17	担子菌门 Basidiomycota	0	0	0	0	0	0	9	2	11	0.05
18	链形植物门 Streptophyta	0	0	0	0	0	0	78	335	413	1.75
19	其他 others	1296	2586	18391	11955	34228	13.03	26	19	45	0.19
合计 total		65758	62712	69206	64986	262662	100	8299	15264	23563	100

注: W1,W2,W3,W4 分别代表 33 日龄沙氏下鱚幼鱼所处养殖水体水环境样品; S1, S2 分别代表 33 日龄沙氏下鱚幼鱼胃含物样品。

Note: W1,W2,W3,W4 represent the environmental water samples of 33-day-old *H. salmonicus* juveniles. S1,S2 represent the stomach content samples of 33-day-old *H. salmonicus* juveniles.

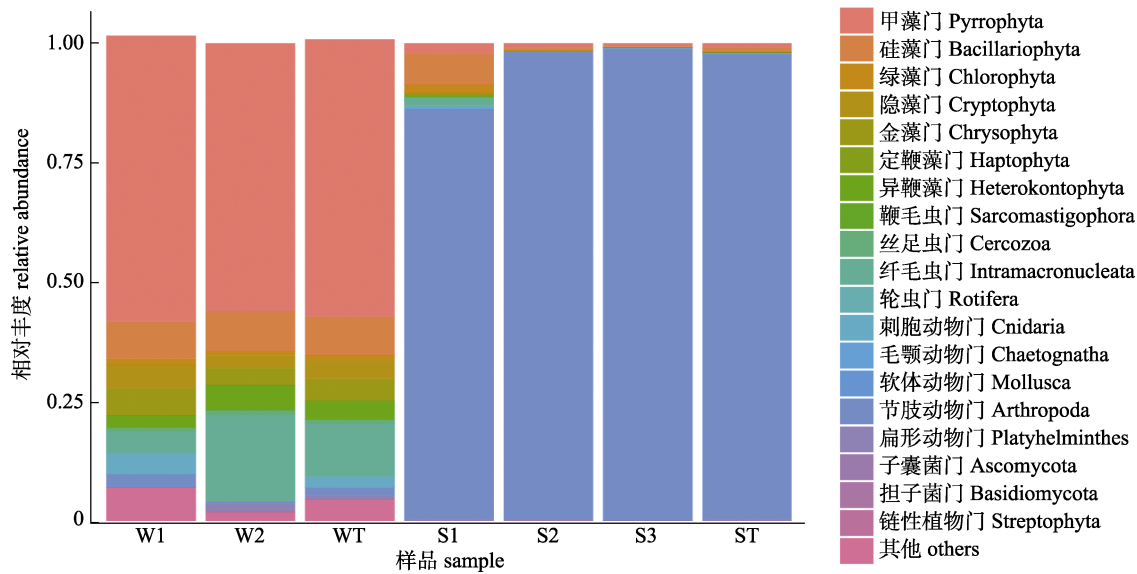


图 2 63 日龄沙氏下鱚所处养殖水体及胃含物中真核生物的物种组成
W1,W2 分别代表 33 日龄沙氏下鱚幼鱼所处养殖水体水环境样品, WT 代表合并后的水环境样品; S1, S2, S3 分别代表 33 日龄沙氏下鱚幼鱼胃含物样品, ST 代表合并后的胃含物样品。

Fig. 2 Eukaryote composition in aquaculture area and stomach of 63 days old *Hyporhamphus sajori*
W1,W2 represent the environmental water samples and WT represents the combined environmental water sample of 33-day-old *H. salmonicus* juveniles. S1,S2, S3 represent the stomach content samples and ST represents the combined stomach content sample of 33-day-old *H. salmonicus* juveniles.

表 4 基于 18S rDNA 宏条形码标记的 63 日龄沙氏下鱚胃含物及水环境样品的物种序列数
Tab. 4 The number of reads detected for stomach contents of 63 days old *Hyporhamphus sajori* and environmental water samples by DNA metabarcoding based on 18S rDNA sequences

序号 no.	门类 phylum	水样 water sample		合计 total	占比/%	胃含物 stomach content			合计 total	占比/%
		W1	W2			S1	S2	S3		
1	甲藻门 Pyrrophyta	37846	33471	71317	57.92	200	621	365	1186	0.88
2	硅藻门 Bacillariophyta	4900	5013	9913	8.05	646	225	97	968	0.72
3	绿藻门 Chlorophyta	827	493	1320	1.07	170	160	53	383	0.28
4	隐藻门 Cryptophyta	3203	1573	4776	3.88	8	0	9	17	0.01
5	金藻门 Chrysophyta	3505	2081	5586	4.54	38	1	7	46	0.03
6	定鞭藻门 Haptophyta	4	4	8	0.01	2	3	0	5	<0.01
7	异鞭藻门 Heterokontophyta	1637	3098	4735	3.85	15	11	13	39	0.03
8	鞭毛虫门 Sarcomastigophora	98	77	175	0.14	26	1	9	36	0.03
9	丝足虫门 Cercozoa	452	625	1077	0.88	0	0	0	0	0
10	纤毛虫门 Intramacronucleata	2800	10710	13510	10.97	162	9	60	231	0.17
11	轮虫门 Rotifera	1	6	7	0.01	40	0	2	42	0.03
12	刺胞动物门 Cnidaria	2831	1	2832	2.30	1	15	0	16	0.01
13	毛颚动物门 Chaetognatha	0	0	0	0	19	2	107	128	0.095
14	软体动物门 Mollusca	0	0	0	0	18	0	23	41	0.03
15	节肢动物门 Arthropoda	1693	293	1986	1.61	8371	62793	60501	131665	97.31
16	扁形动物门 Platyhelminthes	0	997	997	0.81	0	0	0	0	0
17	子囊菌门 Ascomycota	57	12	69	0.06	26	266	165	457	0.34
18	担子菌门 Basidiomycota	0	0	0	0	2	4	1	7	<0.01
19	链形植物门 Streptophyta	0	0	0	0	2	11	19	32	0.024
20	其他 Others	4554	1260	5814	4.72	8	4	0	12	<0.01
合计 total		63408	59714	123122	100	9754	64126	61431	135311	100

注: W1,W2 分别代表 33 日龄沙氏下鱚幼鱼所处养殖水体水环境样品; S1, S2, S3 分别代表 33 日龄沙氏下鱚幼鱼胃含物样品。
Note: W1,W2 represent the environmental water sample of 33-day-old *H. salmonicus* juveniles. S1,S2, S3 represent the stomach content samples of 33-day-old *H. salmonicus* juveniles.

鳃胃含物样品和水环境样品间的物种组成差别较大。水环境样品中, 除 4.72% 的序列无法鉴定种类外, 剩余序列中占比最高的门类也为甲藻门(57.92%), 其次分别为纤毛虫门(10.97%)、硅藻门(8.05%)、金藻门(4.54%)、隐藻门(3.88%)、异鞭藻门(3.85%)、刺胞动物门(2.30%)、节肢动物门(1.61%)、绿藻门(1.07%)、丝足虫门(0.88%)、扁形动物门(0.81%)、鞭毛虫门(0.14%)、子囊菌门(0.06%), 定鞭藻门以及轮虫门占比较小, 均小于 0.01%。胃含物样品中, 去除脊索动物门物种序列后无法鉴定种类的序列占比小于 0.01%, 其中节肢动物门占绝对优势(97.31%), 其次分别为甲藻门(0.88%)、硅藻门(0.72%)、子囊菌门(0.34%)、绿藻门(0.28%)、纤毛虫门(0.17%)、毛颚动物门(0.1%), 金藻门、异鞭藻门、鞭毛虫门、轮虫门、软体动物门、链形植物门以及隐藻门、刺胞动物门占比较少, 在 0.01%~0.03% 之间, 而定鞭藻门、担子菌门占比小于 0.01%。水环境样品中, 未鉴定出毛颚动物门、软体动物门、担子菌门以及链形植物门物种; 而胃含物样品中未鉴定出丝足虫门、扁形动物门种类。

2.4 不同生长阶段沙氏下鱚胃含物及水环境样品物种组成比较

由表 3、表 4 以及图 1、图 2 可以看出, 33 日龄时的水环境样品中, 甲藻门占绝对优势(76.64%), 其他物种序列占比超过 1% 的门类依次为纤毛虫门(2.52%)、刺胞动物门(1.50%)、异鞭藻门(1.34%)、丝足虫门(1.12%); 与之相比, 63 日龄时的水环境样品中, 甲藻门(57.92%)同样占比最高, 其次分别为纤毛虫门(10.97%)、硅藻门(8.05%)、金藻门(4.54%)、隐藻门(3.88%)、异鞭藻门(3.85%)、刺胞动物门(2.30%)、节肢动物门(1.61%)以及绿藻门(1.07%), 虽然两者间部分物种门类的组成存在一些差异, 但水体中的优势物种门类并未发生根本性改变。进一步对 33 及 63 日龄沙氏下鱚胃含物样品的物种组成进行分析, 33 日龄沙氏下鱚胃含物样品中除节肢动物门(45.29%)物种序列占据较高的比例外, 绿藻门(20.34%)、硅藻门(12.35%)、甲藻门(12.42%)等微藻占比也较高; 与之相比, 63 日龄沙氏下鱚胃含

物样品中节肢动物门物种序列占绝对优势(97.31%), 其他物种门类占比均小于 1%(图 3)。上述结果表明, 不同生长阶段沙氏下鱚胃含物物种组成的改变并不是由于水环境物种组成的改变导致, 更可能是由于不同生长阶段沙氏下鱚幼鱼对食物的选择具有偏好性, 对以节肢动物门为代表的浮游动物表现出更大的摄食选择性。

2.5 不同生长阶段沙氏下鱚幼鱼的摄食选择性

按照传统胃含物形态学鉴定的研究结果^[8-11], 将沙氏下鱚潜在饵料种类按浮游动物、浮游植物以及有机碎屑(包括链形植物门以及真菌等)进行分类, 采用 Ivlev 选择指数 E 表示不同生长阶段沙氏下鱚幼鱼对不同饵料种类的摄食选择性(表 5), 为避免计算出现误差, 对于在胃含物及水环境样品中物种组成占比均小于 1% 的物种门类, 不进行摄食选择性的相关统计。分析结果表明, 在浮游动物类群中, 33 日龄沙氏下鱚幼鱼对节肢动物门有最高的摄食选择性; 浮游植物类群中, 对绿藻门、硅藻门具有较高的摄食偏好, 对其他门类如甲藻门、金藻门、异鞭藻门等有害藻类则表现出避食倾向; 有机碎屑类群中, 对子囊菌门真菌及链形植物门都表现出摄食倾向。同样, 在浮游动物类群中, 63 日龄沙氏下鱚幼鱼对节肢动物门表现出最高的摄食选择性; 但 63 日龄幼鱼对浮游植物类群则均未表现出摄食倾向, 与 33 日龄幼鱼明显不同。实际上, 不同生长阶段沙氏下鱚幼鱼对水体中的浮游动物如软体动物门、毛颚动物门以及有机碎屑类群中真菌以及链形植物门都表现出摄食选择性, 但因在池塘水体中占比较少, 尚无法得出确切的结论。

为进一步了解不同生长阶段沙氏下鱚幼鱼的摄食差异, 对其食物中优势 OTU 的相对丰度进行了分析, 结果见表 6。食物中优势 OTU 在不同发育阶段沙氏下鱚幼鱼的相对丰度值差异较为明显, 在 33 日龄沙氏下鱚幼鱼中, 食物中的优势 OTU 为节肢动物门的 OTU33(相对丰度为 25.40%)和绿藻门的 OTU52(相对丰度为 12.28%), 其分别为太平洋磷虾(*Euphausia pacifica*) (100%)和海洋绿藻(*Ostreococcus tauri*) (100%); 其次为节肢动物门未鉴定到种的 OTU6(相对丰度为 8.88%)以及鉴

表 5 不同发育阶段沙氏下鱚幼鱼的摄食选择指数

Tab. 5 Selectivity index of different phylums of *Hyporhamphus sajori* juveniles at different developmental stages

序号 no.	门类 phylum	33 日龄幼鱼/% 33 days old fish			63 日龄幼鱼/% 63 days old fish		
		水样 water	胃含物 stomach	选择指数 <i>E</i>	水样 water	胃含物 stomach	选择指数 <i>E</i>
1	甲藻门 Pyrrophyta	76.64	12.42	−0.72	57.92	0.88	−0.97
2	硅藻门 Bacillariophyta	0.69	12.35	0.89	8.05	0.72	−0.84
3	绿藻门 Chlorophyta	0.96	20.34	0.91	1.07	0.28	−0.59
4	隐藻门 Cryptophyta	0.81	0.92	−	3.88	0.01	−0.99
5	金藻门 Chrysophyta	0.53	0.36	−	4.54	0.03	−0.98
6	定鞭藻门 Haptophyta	<0.01	0.14	−	<0.01	<0.01	−
7	异鞭藻门 Heterokontophyta	1.34	0.88	−0.20	3.85	0.03	−0.98
8	鞭毛虫门 Sarcomastigophora	<0.01	1.24	1	0.14	0.03	−
9	丝足虫门 Cercozoa	1.12	0.19	−0.71	0.88	0	−
10	纤毛虫门 Intramacronucleata	2.52	2.41	−0.02	10.97	0.17	−0.97
11	轮虫门 Rotifera	0.34	0.07	−	<0.01	0.03	−
12	刺胞动物门 Cnidaria	1.5	0	−1	2.3	0.01	−0.99
13	毛颚动物门 Chaetognatha	0	0.02	−	0	0.1	−
14	软体动物门 Mollusca	<0.01	0.38	−	0	0.03	−
15	节肢动物门 Arthropoda	0.3	45.29	0.99	1.61	97.31	0.97
16	扁形动物门 Platyhelminthes	0	0	−	0.81	0	−
17	子囊菌门 Ascomycota	0.21	1	0.65	0.06	0.34	−
18	担子菌门 Basidiomycota	0	0.05	−	0	<0.01	−
19	链形植物门 Streptophyta	0	1.75	1	0	0.02	1
20	其他 others	13.03	0.19	−	4.72	<0.01	−

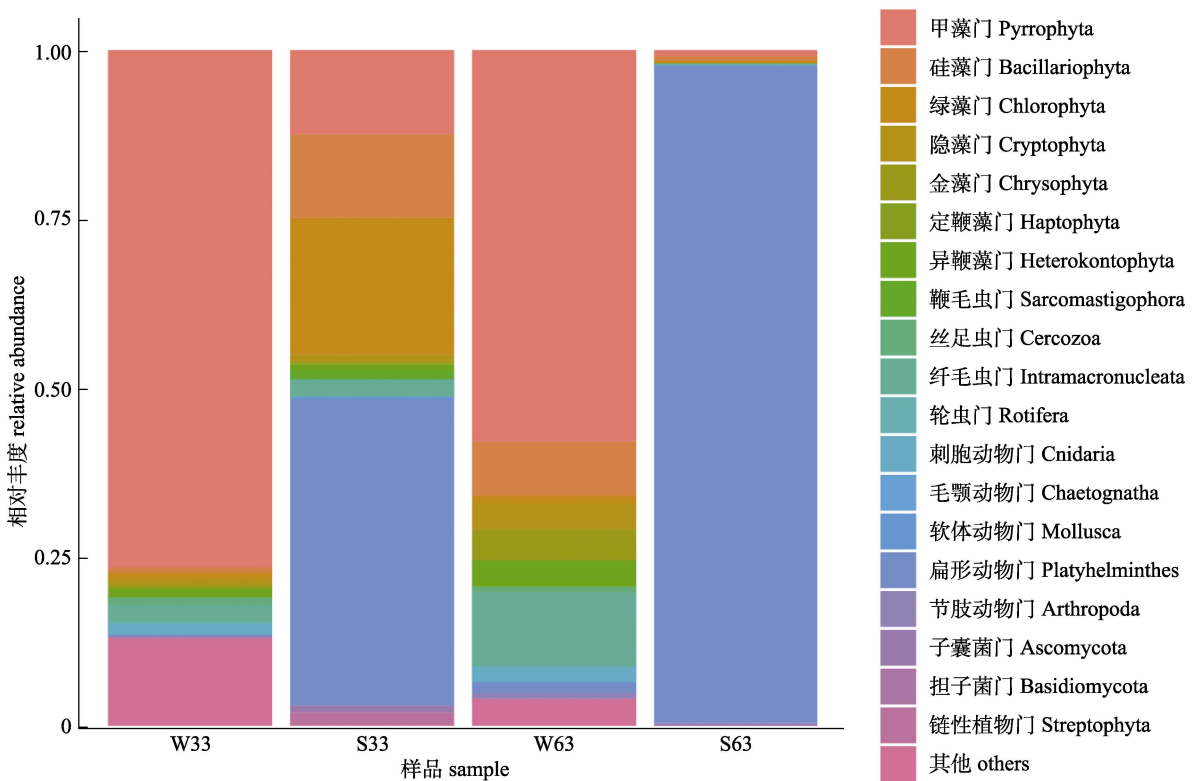


图 3 不同发育阶段沙氏下鱚幼鱼所处养殖水体及胃含物中真核生物的物种组成对比

W33, S33 分别代表 33 日龄沙氏下鱚幼鱼所处养殖水体及胃含物样品, W63, S63 分别代表 63 日龄沙氏下鱚幼鱼所处养殖水体及胃含物样品。

Fig. 3 Eukaryote composition in aquaculture area and stomach of *Hyporhamphus sajori* juveniles at different developmental stages

W33 and S33 represent the the environmental water sample and the stomach content sample of 33-day-old *H. salmonicus* juveniles, respectively. W63 and S63 represent the environmental water sample and the stomach content sample of 63-day-old *H. salmonicus* juveniles, respectively.

表 6 基于 18S rDNA 标记的不同发育阶段沙氏下鱚幼鱼食物中优势 OTUs 情况

Tab. 6 Composition of dominant OTUs of *Hyporhamphus sajori* juveniles at different developmental stages based on high-throughput sequencing of 18S rDNA sequences

序号 no.	OTUs	门类 phylum	相似种(登入号, 相似性) similar species (accession number, similarity)	相对丰度 relative abundance	
				33 日龄/% 33 days old fish	63 日龄/% 63 days old fish
1	OTU1	甲藻门 Pyrrophyta	异冒藻 <i>Heterocapsa</i> sp.(ON459692, 100%)	2.52	0.08
2	OTU6	节肢动物门 Arthropoda	新糠虾属 <i>Neomysis integer</i> (AY781420, 72.7%)	8.88	56.19
3	OTU9	节肢动物门 Arthropoda	新糠虾属 <i>Neomysis integer</i> (AY781420, 77.2%)	1.53	31.1
4	OTU18	硅藻门 Bacillariophyta	海链藻 <i>Thalassiosira</i> sp.(MG662232, 99.35%)	2.46	0.21
5	OTU20	节肢动物门 Arthropoda	新糠虾属 <i>Neomysis americana</i> (HM179998, 99.67%)	0.76	8.47
6	OTU33	节肢动物门 Arthropoda	太平洋磷虾 <i>Euphausia pacifica</i> (MZ333605, 100%)	25.4	0.01
7	OTU52	绿藻门 Chlorophyta	海洋绿藻 <i>Ostreococcus tauri</i> (AY329635, 100%)	12.28	0.11
8	OTU62	节肢动物门 Arthropoda	中华哲水蚤 <i>Calanus sinicus</i> (KR048707, 100%)	5.66	0.02
9	OTU66	链形植物门 Streptophyta	盐角草 <i>Salicornia ramosissima</i> (ON685420, 99.67%)	1.75	0.01
10	OTU87	硅藻门 Bacillariophyta	玛氏骨条藻 <i>Skeletonema marinoi</i> (KR091067, 100%)	3.32	0.06
11	OTU91	绿藻门 Chlorophyta	海洋真核微藻 <i>Ostreococcus</i> sp. (MW451616, 100%)	2.89	0.01
12	OTU94	节肢动物门 Arthropoda	节肢动物 Arthropoda sp. (ON256138, 100%)	1.02	0.21
13	OTU107	绿藻门 Chlorophyta	绿色葡萄藻 <i>Bathycoccus prasinos</i> (MT571465, 100%)	2.08	0.02
14	OTU173	绿藻门 Chlorophyta	细小微胞藻 <i>Micromonas pusilla</i> (KT860894, 100%)	1.31	0.01
15	OTU442	甲藻门 Pyrrophyta	赤潮甲藻 <i>Heterocapsa rotundata</i> (KY980397, 100%)	2.06	0.02
16	OTU938	硅藻门 Bacillariophyta	海链藻 <i>Thalassiosira concaviuscula</i> (AJ810857, 100%)	1.07	0.02

注: 括号中文字分别表示 NCBI 数据库中 与 OUT 序列相似性最高物种的序列登录号及相似性百分比。
Note: The text in parentheses indicates the sequence accession number and percentage similarity of the species with the highest sequence similarity to OTUs in the NCBI database, respectively.

定为中华哲水蚤(*Calanus sinicus*) (100%)的 OTU62 (相对丰度为 5.66%); 硅藻门的 OTU87 (相对丰度 3.32%)为玛氏骨条藻(*Skeletonema marinoi*) (100%), OTU18 (相对丰度 2.46%)与海链藻(*Thalassiosira* sp.) (99.35%)相似; 绿藻门的 OTU91 (相对丰度为 2.89%)、甲藻门的 OTU1 (相对丰度 2.52%)分别为海洋真核微藻(*Ostreococcus* sp.) (100%)、异冒藻(*Heterocapsa* sp.) (100%); 其余 OTU 的相对丰度值均低于 2.0%。在 63 日龄沙氏下鱚幼鱼中, 食物组成以节肢动物动物门 OTU6、OTU9、OTU20 占绝对优势, 其中未鉴定到种的 OTU6、OTU9 相对丰度最高, 分别为 56.19%和 31.1%; 其次为 OTU20 (相对丰度为 8.47%), 其与新糠虾属的物种 *Neomysis americana* 最为相似(99.67%)。随着幼鱼的生长, 浮游动物尤其是节肢动物门的相关种类在其食物组成中的占比越来越大, 提示不同发育阶段沙氏下鱚幼鱼食性存在差异, 随着生长发育, 其食性从以浮游动物及藻类等浮游植物为

主的杂食性向浮游动物食性转变。

3 讨论

3.1 DNA 宏条形码技术在鱼类食性研究中的适用性

DNA 宏条形码技术解析动物食性不受食物种类限制, 尤其适合研究海洋生态系统中具有不同生物学和生态学特性的广食性或滤食性动物在不同时空条件下的复杂食物网结构、时空转换和食物资源分配等, 近年来该技术已成功应用于多种海洋鱼类的摄食多样性研究中^[26, 28-34], 弥补了形态学鉴定方法在鉴别个体微小的浮游动植物以及消化程度较高的胃含物方面的不足。如 Albaina 等^[26]通过扩增 18S r DNA 的 V9 区, 对浮游植物食性的两种鱼类[沙丁鱼(*Sardina pilchardus*)和黍鲱(*Sprattus sprattus*)]的胃含物中的物种进行了定性和定量研究, 结果与镜检或 qPCR 定量的结果一致。国外在一些浮游生物食性的小型鱼类如珊

珊瑚鱼类的食性分析结果也表明, DNA 宏条形码技术比传统形态鉴定方法的灵敏度更高, 可检测到的食物种类更为丰富^[28-31]。林先智等^[32]比较了传统 Sanger 测序和基于 DNA 宏条形码的高通量测序方法对金钱鱼(*Scatophagus argus*)仔稚鱼的食物组成分析, 发现两种方法检测到的食物类群基本相同, 但高通量测序方法在反映食物多样性和覆盖范围上更具优势, 且灵敏度更高。孙鹏等^[33]和陈晓雷等^[34]分别利用 18S rDNA 和 CO I 基因宏条形码对象山港海域黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)和南海亮眶灯鱼(*Diaphus splendidus*)的食性进行了分析, 结果同样表明, 与传统食性分析方法相比, DNA 宏条形码技术克服了食物碎片的形态学鉴定问题, 且获取信息量大、成效快, 在鱼类食谱检测灵敏性和覆盖范围上更具优势。

以往通过传统消化道内含物形态学鉴定发现, 沙氏下鱚为浮游动物食性, 喜食桡足类、端足类、糠虾和水生昆虫等, 也摄食少量的硅藻、绿藻等浮游植物和有机碎屑等^[6-11]。本研究通过 DNA 宏条形码技术发现, 沙氏下鱚幼鱼食谱组成广泛, 包括节肢动物门、软体动物门、毛颚动物门、轮虫门、纤毛虫门等浮游动物, 绿藻门、硅藻门、甲藻门等浮游植物, 子囊菌门、担子菌门等真菌以及链形植物门等有机碎屑, 其中甲藻门、纤毛虫门以及真菌、链形植物门等食物类别在以往传统胃含物形态鉴定中未见报道, 研究结果表明, DNA 宏条形码技术在沙氏下鱚幼鱼食性研究中显现出较为明显的技术优势, 这与上述通过 DNA 宏条形码技术对鱼类食性进行研究得出的结论一致^[28-34], 佐证了以 DNA 宏条形码为标记的高通量检测方法灵敏度和精确度更高, 在获取食物种类信息、食谱覆盖率和食物丰度分析上具有明显优势, 进一步证明 DNA 宏条形码技术在鱼类食性研究中具有较高的应用潜能。

3.2 不同发育阶段沙氏下鱚幼鱼的食物组成及摄食选择性

在鱼类生活史的早期阶段如仔稚鱼或幼鱼期, 充足的食物供给是决定其存活及生长发育的关键影响因子^[35]。但由于鱼类食性复杂, 食物来源广泛, 仔稚鱼或幼鱼阶段个体较小, 摄食食物量较

少, 且其食物微小, 消化后的食物碎片很难进行形态鉴定, 再加上以往基于胃含物形态鉴定法的局限性^[5], 导致对鱼类仔稚鱼或幼鱼阶段的摄食研究了解甚少。本研究中, 基于 DNA 宏条形码技术对 33 及 63 日龄沙氏下鱚幼鱼的食性研究结果表明, 不同发育阶段的沙氏下鱚幼鱼食性存在差异, 虽然食物组成都以节肢动物门为代表的浮游动物为主, 但 33 日龄幼鱼食物组成中, 以绿藻门、硅藻门及甲藻门为代表的浮游植物也占有较高的比例(45.11%); 而 63 日龄幼鱼食物组成中浮游动物占比高达 97.31%。对不同生长阶段沙氏下鱚幼鱼的摄食选择性进行的分析结果也支持上述结论, 33 日龄幼鱼除对节肢动物门浮游动物有较高的摄食选择外, 对绿藻门、硅藻门等也表现出较高的摄食选择倾向; 而 63 日龄幼鱼除对浮游动物门类表现出正向选择外, 对浮游植物门类未表现出摄食选择。综上, 与其他海洋鱼类一样^[33], 沙氏下鱚幼鱼和成鱼间食性可能存在差异, 随着生长发育其食性可能存在由以浮游动物及浮游植物为主的杂食性向浮游动物食性转变的倾向。研究结果对了解鱼类生活史早期阶段的营养状况以及为水产养殖中仔稚鱼的饵料配比等提供参考。

由于鱼类生活在水体环境中, 其摄食的饵料生物种类不可避免地会受到所处水体环境中环境生物的影响, 考虑到本研究分析所用的沙氏下鱚样品为海水池塘养殖的个体, 与自然海区相比, 海水池塘属于半封闭生态系统, 实验中得到的沙氏下鱚胃含物样品中的饵料生物组成可能与自然状态下并不一致, 如本次海水池塘水环境样品中检测到的软体动物门、毛颚动物门以及轮虫门等物种较少导致其食物组成中相应种类占比较小, 可能造成沙氏下鱚幼鱼饵料生物组成与自然海区同一物种食物组成之间的差异。鉴于上述情况, 建议在后续研究中采集不同海域的沙氏下鱚样品及水环境样品, 进一步分析沙氏下鱚的食性及摄食选择性等, 以便得到更为准确的结论。

3.3 DNA 宏条形码技术在鱼类食性研究中的局限性

尽管 DNA 宏条形码技术因其明显的技术优势, 在包括鱼类在内的动物食性研究领域得到了

广泛应用^[26, 28-34], 但DNA宏条形码技术本身尚存在一些技术层面无法解决的问题, 如引物选用组合、PCR扩增偏向性、数据库缺失、测序误差等, 且易受污染、数据处理方法不完善、无法区分鱼类自身序列的具体来源等^[5, 36], 导致测序序列的多少并不能代表某个物种的真实生物量, 物种序列数占比并不一定能真实反映生物量或个体数的占比, 导致其定量分析能力有限, 仅定性结果可靠, 这可能导致饵料食物组成出现误差, 使得获取的食物组成信息不够完整。除此之外, DNA宏条形码技术仅能反映物种的短期摄食状况, 想要了解长期摄食状况, 还需结合其他食性研究方法如稳定同位素分析法进行交叉互补^[37-38], 以期加深对鱼类不同发育阶段摄食生态的了解, 为海洋鱼类种质资源的合理开发及保护利用提供理论依据。

参考文献:

- [1] Frid A, Marliave J. Predatory fishes affect trophic cascades and apparent competition in temperate reefs[J]. *Biology Letters*, 2010, 6(4): 533-536.
- [2] Clements K D, German D P, Piché J, et al. Integrating ecological roles and trophic diversification on coral reefs: multiple lines of evidence identify parrotfishes as microphages[J]. *Biological Journal of the Linnean Society*, 2017, 120(4): 729-751.
- [3] Xue Y, Jin X S. Review of the study on feeding habits of fishes and food webs[J]. *Marine Fisheries Research*, 2003, 24(2): 76-87. [薛莹, 金显仕. 鱼类食性和食物网研究评述[J]. *海洋水产研究*, 2003, 24(2): 76-87.]
- [4] Gao X D, Chen X J, Li Y K. A review on the methods used in aquatic food web research: Development and applications [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2018, 25(6): 1347-1360. [高小迪, 陈新军, 李云凯. 水生食物网研究方法的发展和应用[J]. *中国水产科学*, 2018, 25(6): 1347-1360.]
- [5] Pompanon F, Deagle B E, Symondson W O C, et al. Who is eating what: Diet assessment using next generation sequencing[J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21(8): 1931-1950.
- [6] Bian X D, Wan R J, Shan X J, et al. Preliminary analysis on recruitment variation and the exogenous driving factors to early life stages of small pelagic fishes in the Laizhou Bay[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2022, 29(3): 446-468. [卞晓东, 万瑞景, 单秀娟, 等. 莱州湾中上层小型鱼类早期资源量动态及其外在驱动因素[J]. *中国水产科学*, 2022, 29(3): 446-468.]
- [7] Zhao Y, Zhang X Q, Bian X D. Habitat suitability index of larval Japanese Halfbeak(*Hyporhamphus sajori*) in Bohai Sea based on geographically weighted regression[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2018, 29(1): 293-299. [赵杨, 张学庆, 卞晓东. 基于地理加权回归的渤海沙氏下鱚鱼仔稚鱼栖息地指数[J]. *应用生态学报*, 2018, 29(1): 293-299.]
- [8] Chen D G. A preliminary study on fishery biology of *Hyporhamphus sajori* off the Shandong coast[J]. *Marine Science Bulletin*, 1984, 3(4): 45-49. [陈大刚. 山东沿海鱚 *Hyporhamphus sajori* 渔业生物学的初步研究[J]. *海洋通报*, 1984, 3(4): 45-49.]
- [9] Wang S. Studies on the reproductive biology of *Hyporhamphus sajori* in the Yellow Sea and Bohai[J]. *Shandong Fisheries*, 1991, 8(4): 14-16. [王守民. 黄渤海日本鱚繁殖生物学研究[J]. *齐鲁渔业*, 1991, 8(4): 14-16.]
- [10] Guo X W, Tang Q. Maintenance ration and conversion efficiency of *Hyporhamphus sajori*[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2001, 12(2): 293-295. [郭学武, 唐启升. 小鳞鱼箴的维持日粮与转换效率[J]. *应用生态学报*, 2001, 12(2): 293-295.]
- [11] Fisheries Bureau and Yellow Sea Fisheries Headquarters in the Ministry of Agriculture. Investigation and Regionalization of Fishery Resources in the Yellow Sea and Bohai Sea[M]. Beijing: China Ocean Press, 1990: 141-162. [农业部水产局, 农业部黄海区渔业指挥部. 黄、渤海区渔业资源调查与区划[M]. 北京: 海洋出版社, 1990: 141-162.]
- [12] Valentini A, Pompanon F, Taberlet P. DNA barcoding for ecologists[J]. *Trends in Ecology & Evolution*, 2009, 24(2): 110-117.
- [13] Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, et al. Towards next-generation biodiversity assessment using DNA metabarcoding [J]. *Molecular Ecology*, 2012, 21(8): 2045-2050.
- [14] Deagle B E, Kirkwood R, Jarman S N. Analysis of Australian fur seal diet by pyrosequencing prey DNA in faeces[J]. *Molecular Ecology*, 2009, 18(9): 2022-2038.
- [15] Deagle B E, Chiaradia A, McInnes J, et al. Pyrosequencing faecal DNA to determine diet of little penguins: Is what goes in what comes out?[J]. *Conservation Genetics*, 2010, 11(5): 2039-2048.
- [16] Alberdi A, Aizpurua O, Bohmann K, et al. Promises and pitfalls of using high-throughput sequencing for diet analysis [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2019, 19(2): 327-348.
- [17] Zinger L, Bonin A, Alsos I G, et al. DNA metabarcoding—Need for robust experimental designs to draw sound ecological conclusions[J]. *Molecular Ecology*, 2019, 28(8): 1857-1862.
- [18] Bian X D, Zhang X M, Xiao Y S, et al. Identification of fish

- eggs of Japanese halfbeak (*Hyporhamphus sajori*) using mtDNA sequencing[J]. Periodical of Ocean University of China, 2007, 37(S1): 111-116. [卞晓东, 张秀梅, 肖永双, 等. 线粒体 DNA 序列在沙氏下鱚鱼卵鉴别上的应用[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2007, 37(S1): 111-116.]
- [19] Bian X D, Zhang X M, Gao T X, et al. Morphological and genetic identification of Japanese halfbeak (*Hyporhamphus sajori*) eggs[J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(3): 342-352. [卞晓东, 张秀梅, 高天翔, 等. 沙氏下鱚鱼卵的形态学及遗传学鉴别[J]. 水产学报, 2008, 32(3): 342-352.]
- [20] Wang Q, Garrity G M, Tiedje J M, et al. Naïve Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(16): 5261-5267.
- [21] Pruesse E, Quast C, Knittel K, et al. SILVA: A comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB[J]. Nucleic Acids Research, 2007, 35(21): 7188-7196.
- [22] Shao X N, Song D Z, Huang Q W, et al. Fast surveys and molecular diet analysis of carnivores based on fecal DNA and metabarcoding[J]. Biodiversity Science, 2019, 27(5): 543-556. [邵昕宁, 宋大昭, 黄巧雯, 等. 基于粪便 DNA 及宏条形码技术的食肉动物快速调查及食性分析[J]. 生物多样性, 2019, 27(5): 543-556.]
- [23] Zhu F, Massana R, Not F, et al. Mapping of picoeucaryotes in marine ecosystems with quantitative PCR of the 18S rRNA gene[J]. FEMS Microbiology Ecology, 2005, 52(1): 79-92.
- [24] Godhe A, Asplund M E, Härnström K, et al. Quantification of diatom and dinoflagellate biomasses in coastal marine seawater samples by real-time PCR[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2008, 74(23): 7174-7182.
- [25] Song L, Bi X D, Song G J, et al. Size-fractionated eukaryotic microalgae and its influencing factors Dachangshan Island and its adjacent waters[J]. China Environmental Science, 2020, 40(6): 2627-2634. [宋伦, 毕相东, 宋广军, 等. 海洋真核微藻粒级结构及其环境影响因素[J]. 中国环境科学, 2020, 40(6): 2627-2634.]
- [26] Albaina A, Aguirre M, Abad D, et al. 18S rRNA V9 metabarcoding for diet characterization: A critical evaluation with two sympatric zooplanktivorous fish species[J]. Ecology and Evolution, 2016, 6(6): 1809-1824.
- [27] Song L, Song G J, Wu J H, et al. Grain size structure of eukaryotic microalgae and feeding selectivity of scallop in Changshan Islands[J]. Acta Ecologica Sinica, 2022, 42(16): 6838-6852. [宋伦, 宋广军, 吴金浩, 等. 长山群岛海域真核微藻粒级结构及扇贝摄食选择性[J]. 生态学报, 2022, 42(16): 6838-6852.]
- [28] 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): 1-14.
- [29] Leray M, Meyer C P, Mills S C. Metabarcoding dietary analysis of coral dwelling predatory fish demonstrates the minor contribution of coral mutualists to their highly partitioned, generalist diet[J]. PeerJ, 2015, 3: e1047.
- [30] Nalley E M, Donahue M J, Toonen R J. Metabarcoding as a tool to examine cryptic algae in the diets of two common grazing surgeonfishes, *Acanthurus triostegus* and *A. nigrofasciatus*[J]. Environmental DNA, 2022, 4(1): 135-146.
- [31] Nalley E M, Donahue M J, Heenan A, et al. Quantifying the diet diversity of herbivorous coral reef fishes using systematic review and DNA metabarcoding[J]. Environmental DNA, 2022, 4(1): 191-205.
- [32] Lin X Z, Hu S M, Liu S, et al. Comparison between traditional sequencing and high-throughput sequencing on the dietary analysis of juvenile fish[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2018, 29(9): 3093-3101. [林先智, 胡思敏, 刘胜, 等. 传统测序与高通量测序在稚鱼食性分析中的比较[J]. 应用生态学报, 2018, 29(9): 3093-3101.]
- [33] Sun P, Ling J Z, Zhang H, et al. Diet composition and feeding habits of black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) in Xiangshan Bay based on high-throughput sequencing[J]. Acta Ecologica Sinica, 2021, 41(3): 1221-1228. [孙鹏, 凌建忠, 张辉, 等. 基于高通量测序的象山港海域黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)食性分析[J]. 生态学报, 2021, 41(3): 1221-1228.]
- [34] Chen X L, Li M, Chen Z Z, et al. Preliminary analysis of feeding habits of *Haliotis diversicolor* in South China Sea based on macro bar code technology[J]. South China Fisheries Science, 2022, 18(3): 22-29. [陈晓雷, 李敏, 陈作志, 等. 基于宏条形码技术的南海亮眶灯鱼食性初步分析[J]. 南方水产科学, 2022, 18(3): 22-29.]
- [35] Riemann L, Alfredsson H, Hansen M M, et al. Qualitative assessment of the diet of European eel larvae in the Sargasso Sea resolved by DNA barcoding[J]. Biology Letters, 2010, 6(6): 819-822.
- [36] Zhang Y Y, Dong J Y, Sun X, et al. Bibliometric analysis of food habit research based on DNA molecular biology[J]. Fisheries Science, 2022, 41(1): 160-172. [张宇洋, 董建宇, 孙昕, 等. 基于 DNA 分子生物学食性研究领域的文献计量分析[J]. 水产科学, 2022, 41(1): 160-172.]
- [37] Liu G, Ning Y, Xia X F, et al. The application of high-

throughput sequencing technologies to wildlife diet analysis [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2018, 38(9): 3347-3356. [刘刚, 宁宇, 夏晓飞, 等. 高通量测序技术在野生动物食性分析中的应用[J]. *生态学报*, 2018, 38(9): 3347-3356.]

[38] Hambäck P A, Weingartner E, Dalén L, et al. Spatial subsidies in spider diets vary with shoreline structure: Complementary evidence from molecular diet analysis and stable isotopes[J]. *Ecology and Evolution*, 2016, 6(23): 8431-8439.

Preliminary dietary analysis of *Hyporhamphus sajori* juveniles based on DNA metabarcoding

LI Yulong, CHEN Bailing, BAO Xiangbo, ZHOU Zunchun, LIU Weidong, LI Yunfeng

Liaoning Ocean and Fisheries Science Research Institute; Key Laboratory of Protection and Utilization of Aquatic Germplasm Resource, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Key Laboratory of Molecular Biology for Marine Fishery, Liaoning Province, Dalian 116023, China

Abstract: As a core research field in trophic ecology and biology, fish dietary analysis enables the understanding of the food composition and functional role of target predators in ecosystems. In this study, the 18S rDNA high-throughput sequencing method was used to investigate the diet composition of *Hyporhamphus sajori* juveniles in an aquaculture pond in the northern Yellow Sea for providing more details about the feeding behavior of juvenile fish. A standardized process of DNA metabarcoding analysis was used, including stomach and water collection, DNA extraction, genetic marker amplification, sequencing, and bioinformatic analyses. The results showed that 17 phyla were detected from the stomach contents of 33-day-old *H. sajori* in which Arthropoda (45.29%) was the dominant phylum, followed by Chlorophyta (20.34%), Pyrrophyta (12.42%), Bacillariophyta (12.35%), Intramacronucleata (2.41%), Streptophyta (1.75%), Sarcomastigophora (1.24%), and Ascomycota (1%). A total of 15 phyla were detected from the environmental water samples, including Pyrrophyta, Intramacronucleata, Cnidaria, Heterokontophyta, and Cercozoa, in which Pyrrophyta (76.64%) was the dominant phylum. Additionally, 18 phyla were detected from the stomach contents of 63-day-old *H. sajori*, in which Arthropoda (97.31%) was the dominant phylum. Additionally, 15 phyla were detected from the environmental water samples, including Pyrrophyta (57.92%), Intramacronucleata (10.97%), Bacillariophyta (8.05%), Chrysophyta (4.54%), Cryptophyta (3.88%), Heterokontophyta (3.85%), Cnidaria (2.30%), Arthropoda (1.61%), and Chlorophyta (1.07%). The results showed that the food composition differed between *H. sajori* juveniles at different developmental stages, and the diet of *H. sajori* mainly included Arthropoda, Chlorophyta, and Bacillariophyta, which is consistent with the previous study findings utilizing traditional morphological identification, except for Fungi, Intramacronucleata, and Streptophyta, which were identified only in the present study. Therefore, DNA metabarcoding is helpful for analyzing the diets of fish species and showed advantages over traditional food analysis based on morphology in identifying fish dietary components.

Key words: *Hyporhamphus sajori*; DNA metabarcoding; 18S rDNA; feeding selectivity; dietary analysis

Corresponding author: LI Yunfeng. E-mail: yunfengli@126.com