

文章编号: 1000-0615(2017)10-1533-09

DOI: 10.11964/jfc.20160310329

## DNA条形码在马鞍列岛海域皮氏叫姑鱼 胃含物鉴定中的应用

席晓晴<sup>1</sup>, 鲍宝龙<sup>2</sup>, 章守宇<sup>1\*</sup>

(1. 上海海洋大学海洋科学学院, 上海 201306;

2. 上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

**摘要:** 采用分子生物学手段与传统观测手段相结合的方法, 对2014年夏季在马鞍列岛海域捕获的201尾皮氏叫姑鱼进行了胃含物分析。解剖后发现其空胃率较高, 传统的观测方法仅获得口虾蛄、日本鼓虾、沙蚕、日本蝠幼体4种胃含物, 所获得的胃含物中存在大量不可辨认的虾类、蟹类。针对不可辨认的食物糜提取组织DNA, 选用线粒体基因细胞色素C氧化酶亚基 I (mitochondrial cytochrome oxidase subunit I, CO I) 作为分子标记, 在GenBank中进行比对分析, 并利用MEGA 6.0构建NJ系统进化树, 结果鉴定出中华管鞭虾、鲜明鼓虾、巨指长臂虾、日本鼓虾、中国毛虾、褐菖鲉、日本鳀等10种胃含物种类, 实验中所获得的基因序列在GenBank中的相似度达到97%以上。通过对不可辨认糜的鉴定, 在较大程度上解决了对食物团中不可辨认成分鉴定的困惑; 同时, 发现了新的摄食对象, 了解到更加多样的皮氏叫姑鱼的摄食种类信息。因此, DNA条形码技术在不可辨认饵料生物鉴定中的应用价值应得到重视。

**关键词:** 皮氏叫姑鱼; 胃含物鉴定; 线粒体细胞色素氧化酶亚基 I; DNA条形码; 种类鉴定; 摄食生态

**中图分类号:** Q 785; S 931.1

**文献标志码:** A

皮氏叫姑鱼(*Johnius belangerii*)属暖水性近海底层鱼类, 隶属于硬骨鱼亚纲(Osteichthyes)、鲈形目(Perciformes)、石首鱼科(Sciaenidae)、叫姑鱼属(*Jounius*), 主要分布于印度—西太平洋海区, 在中国沿海、韩国及日本诸海均有分布<sup>[1]</sup>。皮氏叫姑鱼是马鞍列岛海域渔业资源的重要组成种类, 主要摄食小型底栖鱼类、虾类等, 同时也是鳎(*Ilisha elongata*)、龙头鱼(*Harpadon nehereus*)、海鳗(*Muraenesox cinereus*)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、带鱼(*Trichiurus lepturus*)、蓝点马鲛(*Scomberomorus niphonius*)、牙鲆(*Paralichthys solivaceus*)等重要的饵料生物<sup>[2]</sup>, 属于东海北部海域重要的底栖、游泳动物食性功能种团<sup>[3]</sup>, 在食物网中具有重要地位。

国内对皮氏叫姑鱼的研究主要是在渔业生

物学方面, 唐启升<sup>[4]</sup>对我国黄渤海、东海和南海北部的叫姑鱼生物学特性和资源量等进行了分析与评估, 王凯等<sup>[2]</sup>对马鞍列岛的皮氏叫姑鱼体长组成、体长与体质量关系、性比、繁殖习性和摄食等方面进行了较详细的研究, 并将其饵料生物分为鱼类、虾类、蟹类、端足类等, 共计41种饵料生物, 但仍有大量由于消化程度较高而无法鉴定的食物组成。

在传统的食性分析中普遍采用形态学观察法<sup>[5]</sup>, 而对肉眼不可辨认组分的鉴定一直是食性分析中被忽视的环节; 随着DNA条形码技术的兴起<sup>[6-11]</sup>, 不少国外学者利用该技术进行食性分析。例如, Barnett等<sup>[12]</sup>对扁头哈那鲨(*Notorychus cepedianus*)的胃含物进行了基因分析, 通过洗胃来收集胃含物样品, 既保护了研究对象, 又对

收稿日期: 2016-03-28 修回日期: 2016-11-01

资助项目: 国家自然科学基金(41176110)

通信作者: 章守宇, E-mail: syzhang@shou.edu.cn

其食性进行了较准确的了解。Budarf等<sup>[13]</sup>利用DNA条形码和形态学观察相结合的方法,对部分海洋植食性鱼类胃含物进行了精确鉴定,并认为该方法比形态学鉴定更加有效。在国内,仅有少数研究人员应用分子生物学手段鉴定胃含物中的不可辨认组分。洪巧巧<sup>[14]</sup>在研究长江口花鲈(*Latelabrax japonicus*)食性时,对结合分子生物学(16S rDNA序列)和形态学观察的可行性以及两种方法的比较进行了探讨,并认为两种方法的结合将得出更加准确的食性分析结果。本实验选择马鞍列岛海域为研究区域,采用DNA条形码技术对皮氏叫姑鱼夏季胃含物中不可辨认的食物组分进行种类鉴定,通过分析夏季皮氏叫姑鱼的食物基础,为保护皮氏叫姑鱼资源提供合理化建议。

## 1 材料与方 法

### 1.1 研究区域与样品采集

采样区域位于浙江舟山马鞍列岛(E: 122°35'~122°51'; N: 30°41'~30°52')海域,根据马鞍列岛海域的地形和皮氏叫姑鱼的生活习性,选用多网目组合刺网捕捉皮氏叫姑鱼,网目尺寸范围为25~80 mm。具体方法参考汪振华等<sup>[15]</sup>的方法,采样时间2014年8月,每次放置时间约为24 h。将捕获对象放置保温箱冷藏保存,带回实验室分析。

### 1.2 样品预处理

对捕获的皮氏叫姑鱼进行生物学测量,各项测量指标严格按照《海洋调查规范》(GB12763.6-2007)第六部分《海洋生物调查》<sup>[16]</sup>进行,主要包括体长、体质量、纯重、摄食等级和胃含物分析等。胃含物分析时采用精度为0.001 g的电子秤,解剖观察并记录摄食等级,对形态学观察无法识别的种类进行编号留样,使用已灭菌的PE管将其保存于95%的乙醇中,置于4℃的冰箱

中保存。为防止不同样品之间的DNA交叉污染,采集过程中的所用剪刀、镊子等事先进行严格清洗。

### 1.3 实验室处理

采用美国Axygen动植物基因组DNA提取试剂盒提取胃含物样品基因组DNA,使用Nano-Drop 2000超微量分光光度计测定DNA浓度。选取线粒体基因细胞色素C氧化酶亚基I (mitochondrial cytochrome oxidase subunit I, CO I)作为分子标记,对组织DNA进行50 μL体系(2×TaqPCRMaster Mix 25 μL, 引物F/R各1 μL, DNA1 μL, ddH<sub>2</sub>O 22 μL)PCR(Polymerase Chain Reaction, 聚合酶链反应)扩增,在1%的琼脂糖凝胶(含EB)电泳之后进行胶回收(TIANGEN gel extraction kit),本次实验针对不同的胃含物种类采用不同的引物(表1),分别为鱼类、无脊椎动物的通用引物,所采用的PCR的反应条件为94℃预变性1 min, 94℃变性30s, 55℃/40℃退火30s, 72℃延伸40 s, 35个循环,最后72℃延伸10 min。

电泳后出现单一条带的PCR产物,在紫外灯下用已灭菌的医用手术刀切下目的片段,使用TIANGEN琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒回收目的片段,将其连接至PGEM-T载体后,转化到DH5α大肠杆菌感受态细胞中,经蓝白斑筛选后,挑选5~6个单克隆培养,进行PCR扩增M<sub>13</sub>检测(10 μL体系: 2×TaqPCRMaster Mix 5 μL, M<sub>13</sub>R/F 0.5 μL+0.5 μL, 菌液 0.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 3.5 μL),挑选在700 bp有条带显示的样品,送生工生物工程(上海)有限公司(Sangon biotech)测序。

### 1.4 DNA序列比对并鉴定物种

通过GenBank中的BLAST,结合序列相似性和系统进化关系,对所测得的序列进行逐个比对分析并下载数据库中相似性最高的序列片段,在CLASTAL X中进行序列比对分析,利用MEGA 6.0构建Neighbour-Joining(NJ)系统进化树并确定物种。

表 1 皮氏叫姑鱼胃含物种类鉴定的PCR引物

Tab. 1 PCR primers for species identification in *J. belangerii* gut content

目标种类 species	通用引物 universal primer	序列(5'-3') sequence	退火温度/℃ annealing temperature	产物大小/bp size	参考文献 reference
鱼类 fish	FF2d FR1d	TTCTCCACCAACCACAARGAYATYGG CACCTCAGGGTGTCGAARAAAYCARAA	55	681	[17]
无脊椎动物 invertebrate	LC01490 HC02198	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA	40	710	[18]

### 1.5 数据处理与分析

根据胃含物分析结果, 分别计算出饵料生物的出现频率(F%); 利用出现频率比较形态学观察与分子鉴定法所得到的食物种类。

## 2 结果

### 2.1 形态学观察结果分析

本次调查共捕获皮氏叫姑鱼201尾, 通过解

剖发现夏季皮氏叫姑鱼的空胃率较高, 达到84.65%, 共获得30个有效的胃含物样本, 通过形态学鉴定出的胃含物种类为口虾蛄(*Oratosquilla oratoria*)、日本鼓虾(*Alpheus japonicus*)、沙蚕(*Nereis succinea*)、日本蠅(*Charybdis japonica*)幼体。

### 2.2 DNA鉴定结果分析

比对序列测定结果, 共得到相似性>97%的序列18条, 利用系统进化关系(图1)分析出在不

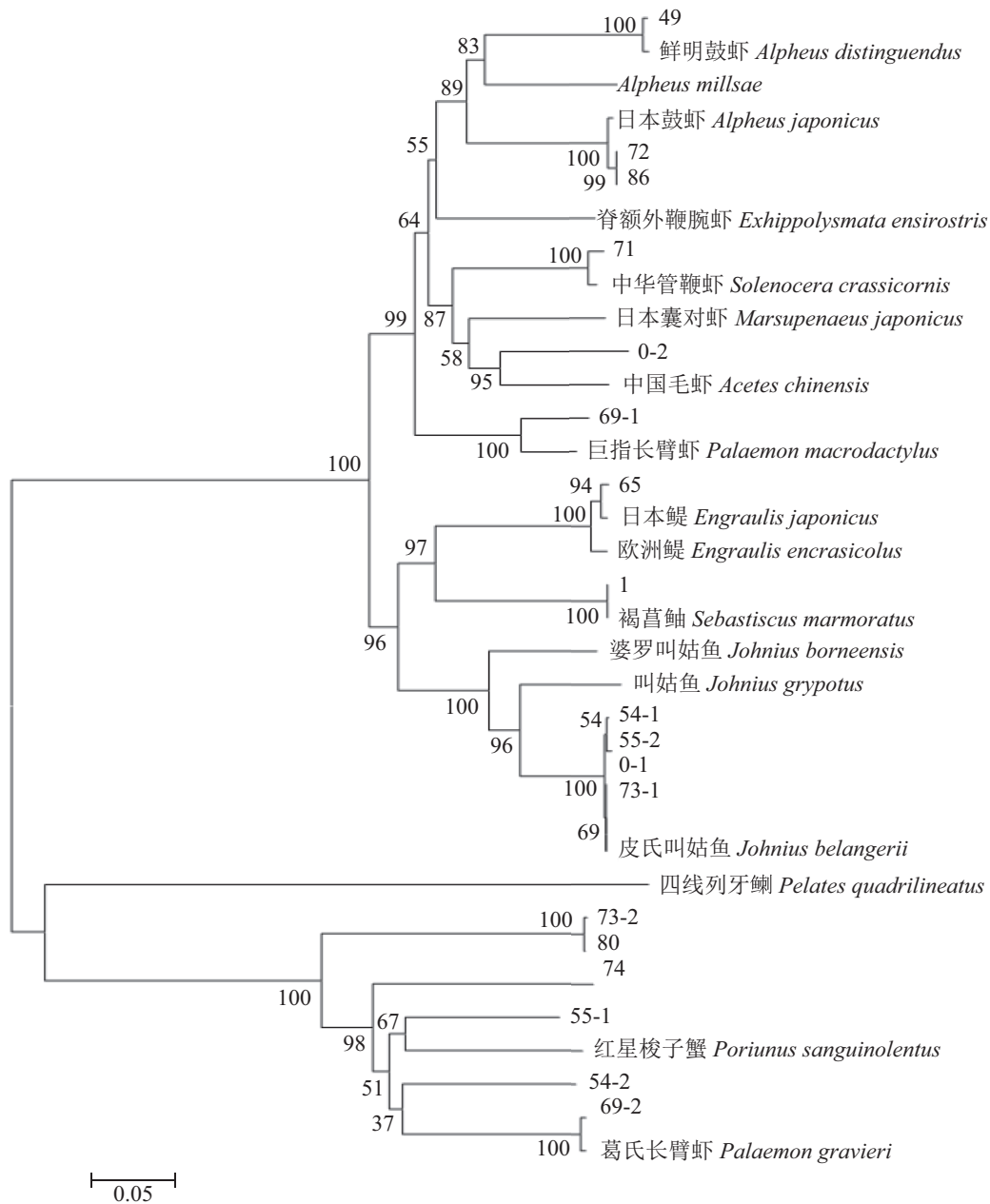


图 1 马鞍列岛海域水生生物与皮氏叫姑鱼胃含物COI系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic tree about COI of aquatic organism and stomach contents of *J. belangerii* in Ma'an Archipelago

可辨认的食物糜中, 存在6种虾类, 3种鱼类, 1种蟹类, 包括中华管鞭虾、鲜明鼓虾、巨指长臂虾、葛氏长臂虾、日本鼓虾、中国毛虾、日本蛄、皮氏叫姑鱼、褐菖鲉、红星梭子蟹。其中, 在4个样本(样品序号为0-1、54-1、55-2、73-1)中均扩增出了皮氏叫姑鱼的CO I 序列; 而在进化树中无法直接确定的样本(73-2、74、80)则根

据GenBank中相似度>97%序列, 鉴定为皮氏叫姑鱼(样品序号73-2、80)、鲜明鼓虾(样品序号74)。

### 2.3 形态学观察与DNA鉴定结果比较分析

通过比较形态学鉴定和CO I 鉴定结果(表2), 可以从每个不可辨认的食物组分中至少鉴定出一个物种。

表 2 形态学观察与DNA鉴定结果

Tab. 2 The result of morphological observation and DNA identification

编号 number	样品序号 sample no.	形态学鉴定 visual identification	不可辨认部分的CO I 鉴定 CO I identification of unidentified stomach content
1	71	糜* chyme	中华管鞭虾 <i>S. crassicornis</i>
2	72	日本鼓虾 <i>A. japonicus</i> 、 糜* chyme	日本鼓虾 <i>A. japonicus</i>
3	65	沙蚕 <i>Nereis succinea</i> 、糜* chyme	日本蛄 <i>E. japonius</i>
4	54-1、54-2	口虾蛄 <i>O. oratoria</i> 、 沙蚕 <i>N. succinea</i> 、糜* chyme	葛氏长臂虾 <i>P. gravieri</i> 、皮氏叫姑鱼 <i>J. belangerii</i>
5	49	不可辨虾 undistinguished shrimp	鲜明鼓虾 <i>A. distinguendus</i>
6	55-1、55-2	不可辨蟹 undistinguished crab	红星梭子蟹 <i>P. sanguinolentus</i> 、皮氏叫姑鱼 <i>J. belangerii</i>
7	69-1、69-2	糜*chyme	巨指长臂虾 <i>P. macrodactylus</i> 、葛氏长臂虾 <i>P. gravieri</i>
8	86	不可辨虾 undistinguished shrimp	日本鼓虾 <i>A. japonicus</i>
9	1	糜* chyme	褐菖鲉 <i>S. marmoratus</i>
10	0-1、0-2	不可辨虾 undistinguished shrimp	中国毛虾 <i>A. chinensis</i> 、皮氏叫姑鱼 <i>J. belangerii</i>
11	73-1、73-2	糜* chyme	皮氏叫姑鱼 <i>J. belangerii</i> 、皮氏叫姑鱼 <i>J. belangerii</i>
12	80	糜* chyme	皮氏叫姑鱼 <i>J. belangerii</i>
13	74	糜* chyme	鲜明鼓虾 <i>A. distinguendus</i>

注: 糜\*是指胃含物中无法通过肉眼及显微镜观察鉴定的食物残余物, 一般是饵料生物的肌肉组织、未消化完全的甲壳类的壳, 或已经消化完全呈现流体状的食物残渣

Notes: \*chyme is undigested stomach content, usually including muscle tissue and crust of undistinguished shrimp and crab, even food mass shaped like fluid

根据2009年5月至10月(未公开数据)及2014年8月的调查结果, 皮氏叫姑鱼主要以虾蟹类为食, 其中葛氏长臂虾、中华管鞭虾、口虾蛄是马鞍列岛夏季优势种类, 日本鼓虾、鲜明鼓虾属于该海域常见种, 日本蛄、双斑蛄(*C. bimaculata*)是该海域的优势蟹类, 隆线强蟹(*Eucrate crenata*)、红星梭子蟹属于常见种, 据此推测皮氏叫姑鱼在马鞍列岛海域的摄食种类主要是当地一些优势种、常见种, 也有其他小型虾蟹类、幼鱼等。与往年只通过形态学鉴定得到的数据相比(表3), 利用条形码技术可以在有限的实验样品中获得更多的种类信息; 选取2009年每航次捕获尾数超过30尾的鱼类胃含物数据(2009年5月—2009年10月), 发现其食物组成共有19种(表3), 而2014年8月结合形态学观察与

DNA条形码鉴定(其中形态学鉴定出4种), 共得到食物种类12种, 说明结合两种方法可以在有限样品的情况下补充更多反映客观事实的信息; 此外, 对于样品的充分利用, 有助于降低资源调查活动对渔业资源存在现状的干扰程度, 减轻调查活动对岛礁海域自然生态系统的破坏, 更加符合资源可持续利用的宗旨。

相比于只采用一种鉴定方法, 两种方法的结合能够提供更多的种类信息。从物种的出现频率(表4)中得出, 皮氏叫姑鱼主要摄食虾蟹类、少数鱼类以及部分底栖生物; 而对比王凯等<sup>[2]</sup>的研究结果, 本实验中发现日本蛄、中华管鞭虾、巨指长臂虾、鲜明鼓虾、中国毛虾、葛氏长臂虾、口虾蛄、沙蚕均在8月的摄食对象中

表 3 本实验与2009年数据中皮氏叫姑鱼的食物种类组成的比较

Tab. 3 Comparison about species in *J. belangerii* diet between this case's and 2009's data

名称 name	采集时间 sampling time							
	200905	200906	200907	200908	200909	200910	201408	201408*
<b>鱼类 fish</b>								
褐菖鲉 <i>S. marmoratus</i>	+		+					+
六丝矛尾虾虎鱼 <i>Chaeturichthys hexanema</i>	+	+	+		+	+		
日本鳀 <i>Engraulis japonius</i>	+	+	+					+
皮氏叫姑鱼 <i>J. belangerii</i>								+
<b>虾类 shrimps</b>								
葛氏长臂虾 <i>P. gravieri</i>		+						
日本鼓虾 <i>A. japonicus</i>				+			+	+
细巧仿对虾 <i>P. tenella</i>						+		
鲜明鼓虾 <i>A. distinguendus</i>	+	+	+		+	+		+
中国毛虾 <i>A. chinensis</i>		+			+			+
中华管鞭虾 <i>S. crassicornis</i>								+
巨指长臂虾 <i>P. macrodactylus</i>								+
口虾蛄 <i>O. oratoria</i>							+	
<b>蟹类 crabs</b>								
隆线强蟹 <i>E. crenata</i>					+	+		
强壮梭蟹 <i>Parthenope validus</i>				+				
日本蟳 <i>C. japonica</i>				+		+	+	+
日本岩瓷蟹 <i>Petrolisthes japonicus</i>			+					
锐齿蟳 <i>C. acuta</i>				+				
红星梭子蟹 <i>P. sanguinolentus</i>								+
双斑蟳 <i>C. bimaculata</i>			+					
<b>端足类 Amphipoda</b>								
麦秆虫 <i>Caprellidea</i>		+	+	+	+			
钩虾 <i>Gammarid</i>			+					
<b>其他类 others</b>								
短蛸 <i>O. ocellatus</i>						+		
滩栖阳遂足 <i>Amphiura vadicola</i>			+					
沙蚕 <i>N. succinea</i>						+	+	
总计 total	4	6	9	5	5	7	4	10

注: 201408的调查结果分为形态学结果与分子鉴定结果, 201408表示采用形态学鉴定, 201408\*表示采用CO I 鉴定, 2009年的皮氏叫姑鱼胃含物数据均采用形态学鉴定。表中的每批样本数均大于等于30

Notes: The diet results from August 2014 (201408) are divided into two parts according to the identification method, i.e. morphology and DNA barcoding. 201408 indicates morphological identification results and 201408\* shows DNA barcoding results. Diet results for *J. belangerii* in 2009 were obtained by visual identification in the same investigating area. Every sample number in this table was  $\geq 30$

出现; 而对比2009年的形态鉴定结果, 两种方法的结合可以覆盖到2009年鉴定种类的63.16%, 并

发现此前未鉴定出的中华管鞭虾、巨指长臂虾、口虾蛄、红星梭子蟹。

表4 形态学鉴定与分子鉴定的物种出现频率

种类 species	出现次数 times	出现频率 frequency	鉴定方法 methods
<b>鱼类</b> fish			
日本鳀 <i>E. japonius</i>	1	0.036	CO I
褐菖鲈 <i>S. marmoratus</i>	1	0.036	CO I
皮氏叫姑鱼 <i>J. belangerii</i>	6	0.214	CO I
<b>虾类</b> shrimps			
中华管鞭虾 <i>S. crassicornis</i>	1	0.036	CO I
鲜明鼓虾 <i>A. distinguendus</i>	2	0.071	CO I
巨指长臂虾 <i>P. macrodactylus</i>	1	0.036	CO I
葛氏长臂虾 <i>P. gravieri</i>	2	0.071	CO I
中国毛虾 <i>A. chinensis</i>	1	0.036	形态鉴定 morphological
日本鼓虾 <i>A. japonicus</i>	4	0.143	CO I 和 形态鉴定 CO I, morphological
口虾蛄 <i>O. oratoria</i>	1	0.036	形态鉴定 morphological
<b>蟹类</b> crabs			
红星梭子蟹 <i>P. sanguinolentus</i>	1	0.036	CO I
日本蟳 <i>C. japonica</i>	5	0.178	形态鉴定 morphological
<b>其他类</b> others			
沙蚕 <i>N. succinea</i>	2	0.071	形态鉴定 morphological
合计 total	28	1.000	

注：此表格中的数据来自于2014年8月调查中的所有可鉴定样品  
Notes: Data in this table is from identified samples in August 2014

### 3 讨论

本实验中利用鱼类通用引物和无脊椎动物通用引物对不可辨认食物组成进行CO I 序列扩增，虽可以不受鉴定对象的限制，扩增出食物糜中的序列信息，辅助进行更精确的食性分析，需要事先建立一个比较完整的数据库，才能满足后期比对分析的要求。除此之外，DNA条形码只能满足定性鉴定的要求，不能达到定量分析的目的。因此，还需要结合形态学观察进行定量分析，才能得到较完整的食性分析结果。

此外，皮氏叫姑鱼多次出现在CO I 鉴定结果中，但仅通过DNA分析结果无法判断是否存在自食现象，借鉴王凯等<sup>[2]</sup>对马鞍列岛海域皮氏叫姑鱼食物组成的研究结果，未发现存在自食现象；此外，在现场采样解剖胃含物的过程中没有发现皮氏叫姑鱼，据此推测实验过程中可能存在基因污染或自身DNA干扰<sup>[19-20]</sup>。

本研究结果显示出许多以往调查未发现的种类，如巨指长臂虾、中华管鞭虾、红星梭子蟹等，这些种类分布于泥地生境、泥沙石生境，在该海域并不占数量上的优势，在调查中可捕获的概率较小，因此本研究获得的摄食种类更加多样化，并以虾类为主<sup>[21]</sup>；另外，多次调查结果均出现日本鳀幼鱼。日本鳀的产卵期约为5月中旬至10月中旬<sup>[22]</sup>，而马鞍列岛海域的皮氏叫姑鱼的繁殖期大致在6月到9月<sup>[2]</sup>，2009年和2014年的数据均表明季节性洄游的日本鳀为皮氏叫姑鱼提供了季节性饵料。而在此期间皮氏叫姑鱼处于繁殖期，对食物的需求量增加，因此，日本鳀幼鱼是皮氏叫姑鱼在此期间较重要的饵料生物。

### 4 结论

CO I 序列在物种鉴定及物种进化分析中的应用十分广泛<sup>[23-25]</sup>，在胃含物鉴定中可以发挥重要作用，本实验通过序列比对及系统进化关系分析，得出皮氏叫姑鱼主要以虾蟹类、部分鱼类幼鱼以及底栖生物为食，从而维持夏季种群繁衍的需求，维持该海域的生物多样性的平衡，为进行详细的食物网构建以及研究马鞍列岛海域的食物网能流途径奠定基础。该方法相对于往年进行的形态学鉴定法更加准确，并且发现了新的饵料生物。随着DNA条形码技术日渐成熟，将其引入到宏观的生态调查中，可以提高对自然的认知水平，对鱼类食性的分析、栖息环境的保护、食物网的构建以及生态系统结构的研究都将具有十分重要的作用。

### 参考文献：

- [1] 谢子强, 刘雪媚, 郭昱嵩, 等. 北部湾皮氏叫姑鱼的遗传多样性分析[J]. 南方农业学报, 2013, 44(1): 140-144.  
Xie Z Q, Liu X M, Guo Y S, et al. Genetic diversity

- analysis of Beibu Gulf *Johnius belangerii*[J]. Journal of Southern Agriculture, 2013, 44(1): 140-144(in Chinese).
- [ 2 ] 王凯, 章守宇, 汪振华, 等. 马鞍列岛海域皮氏叫姑鱼渔业生物学初步研究[J]. 水产学报, 2012, 36(2): 228-237.
- Wang K, Zhang S Y, Wang Z H, *et al.* A preliminary study on fishery biology of *Johnius belangerii* off Ma'an Archipelago[J]. Journal of Fisheries of China, 2012, 36(2): 228-237(in Chinese).
- [ 3 ] 姜亚洲, 程家骅, 李圣法. 东海北部鱼类群落多样性及其结构特征的变化[J]. 中国水产科学, 2008, 15(3): 453-459.
- Jiang Y Z, Cheng J H, Li S F. Variation in fish community structure and biodiversity in the north of the East China Sea between two periods[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15(3): 453-459(in Chinese).
- [ 4 ] 唐启升. 中国专属经济区海洋生物资源与栖息环境[M]. 北京: 科学出版社, 2006.
- Tang Q S. Marine living resources and habitats in the exclusive economic zone of China [M]. Beijing: Science Press, 2006 (in Chinese).
- [ 5 ] 薛莹, 金显仕, 张波, 等. 黄海中部小黄鱼的食物组成和摄食习性的季节变化[J]. 中国水产科学, 2004, 11(3): 237-243.
- Xue Y, Jin X S, Zhang B, *et al.* Diet composition and seasonal variation in feeding habits of small yellow croaker *Pseudosciaena polyactis* Bleeker in the central Yellow Sea[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2004, 11(3): 237-243(in Chinese).
- [ 6 ] 裴男才, 陈步峰. 生物DNA条形码: 十年发展历程、研究尺度和功能[J]. 生物多样性, 2013, 21(5): 616-627.
- Pei N C, Chen B F. DNA barcoding of life: a classification of uses according to function and scale after ten years of development[J]. Biodiversity Science, 2013, 21(5): 616-627(in Chinese).
- [ 7 ] 薛银刚, 许霞, 蔡焕兴, 等. DNA条形码技术在水生生物分类中的研究进展[J]. 环境监测与预警, 2012, 4(6): 23-26.
- Xue Y G, Xu X, Cai H X, *et al.* The research progress of DNA barcoding in aquatic taxonomy[J]. Environmental Monitoring and Forewarning, 2012, 4(6): 23-26(in Chinese).
- [ 8 ] 郑小东, 马媛媛, 程汝滨. 线粒体DNA标记在头足纲动物分子系统学中的应用[J]. 水产学报, 2015, 39(2): 294-303.
- Zheng X D, Ma Y Y, Cheng N B. Application of mitochondrial DNA in phylogenetic analysis of Cephalopods[J]. Journal of Fisheries of China, 2015, 39(2): 294-303(in Chinese).
- [ 9 ] 焦明超, 赵大显, 欧阳珊, 等. DNA条形码技术在生物分类学中的应用前景[J]. 湖北农业科学, 2011, 50(5): 886-890.
- Jiao M C, Zhao D X, Ouyang S, *et al.* Application prospect of DNA barcode technology in taxonomy[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2011, 50(5): 886-890(in Chinese).
- [10] 李琪, 邹山梅, 郑小东, 等. DNA条形码及其在海洋生物中的应用[J]. 中国海洋大学学报, 2010, 40(8): 43-47.
- Li Q, Zou S M, Zheng X D, *et al.* DNA barcoding and its applications in marine organisms[J]. Periodical of Ocean University of China, 2010, 40(8): 43-47(in Chinese).
- [11] Valentini A, Pompanon F, Taberlet P. DNA barcoding for ecologists[J]. Trends in Ecology & Evolution, 2009, 24(2): 110-117.
- [12] Barnett A, Redd K S, Frusher S D, *et al.* Non-lethal method to obtain stomach samples from a large marine predator and the use of DNA analysis to improve dietary information[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2010, 393(1-2): 188-192.
- [13] Budarf A C, Burfeind D D, Loh W K W, *et al.* Identification of seagrasses in the gut of a marine herbivorous fish using DNA barcoding and visual inspection techniques[J]. Journal of Fish Biology, 2011, 79(1): 112-121.
- [14] 洪巧巧. 长江口中国花鲈的食性及分子生物学在食性分析上的应用[D]. 上海: 华东理工大学, 2012.
- Hong Q Q. Feeding habits of *Lateolabrax maculatus* in Yangtze River estuary[D]. Shanghai: East China University of Science and Technology, 2012 (in Chinese).
- [15] 汪振华, 王凯, 赵静, 等. 枸杞岛潮下带沙地生境鱼类群落结构和季节变化[J]. 应用生态学报, 2011, 22(5): 1332-1342.
- Wang Z H, Wang K, Zhao J, *et al.* Fish community structure and its seasonal change in subtidal sandy beach habitat off southern Gouqi Island[J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2011, 22(5): 1332-1342(in Chinese).

- [16] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 12763.6-2007 海洋调查规范第6部分: 海洋生物调查[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.
- General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. GB/T 12763.6-2007 Specifications for oceanographic survey-Part 6: Marine biological survey[S]. Beijing: China Standard Press, 2008 (in Chinese).
- [17] Ivanova N V, Zemlak T S, Hanner R H, *et al.* Universal primer cocktails for fish DNA barcoding[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2007, 7(4): 544-548.
- [18] Folmer O, Black M, Hoeh W, *et al.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates[J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3(5): 294-299.
- [19] 张雅芝. 东山湾叫姑鱼食性研究[J]. 厦门水产学院学报, 1996, 18(1): 25-32.
- Zhang Y Z. Study on feeding habits of *Johnius belangerii* in Dongshan Bay[J]. *Journal of Xiamen Fisheries College*, 1996, 18(1): 25-32(in Chinese).
- [20] Leray M, Agudelo N, Mills S C, *et al.* Effectiveness of annealing blocking primers versus restriction enzymes for characterization of generalist diets: unexpected prey revealed in the gut contents of two coral reef fish species[J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(4): e58076.
- [21] 李忠义, 戴芳群, 左涛, 等. 长江口及南黄海水域秋季小黄鱼与皮氏叫姑鱼的食物竞争[J]. *水生态学杂志*, 2009, 2(2): 67-72.
- Li Z Y, Dai F Q, Zuo T, *et al.* Studies on food competition between *Pseudosciaena polyactis* and *Johnius belangerii* from Changjiang Estuary and adjacent Southern Yellow Sea in autumn[J]. *Journal of Hydroecology*, 2009, 2(2): 67-72(in Chinese).
- [22] 胡东方. 黄海鲷鱼的摄食生态学研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
- Hu D F. Studies on feeding ecology of anchovy in Yellow Sea[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009 (in Chinese).
- [23] 彭士明, 施兆鸿, 侯俊利, 等. 银鲳3个野生群体线粒体COI基因的序列差异分析[J]. *上海海洋大学学报*, 2009, 18(4): 398-402.
- Peng S M, Shi Z H, Hou J L, *et al.* Genetic diversity of three wild silver pomfret(*Pampus argenteus*) populations based on COI gene sequences[J]. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2009, 18(4): 398-402(in Chinese).
- [24] 宫亚运, 章群, 曹艳, 等. 基于线粒体CO I 基因的中国近海棱鲷属鱼类DNA条形码[J]. *水产学报*, 2016, 40(10): 1513-1520.
- Gong Y Y, Zhang Q, Cao Y. DNA barcoding of *Thryssa* in coastal waters of China based on the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I sequence[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2016, 40(10): 1513-1520 (in Chinese).
- [25] 王中锋, 郭昱嵩, 陈荣玲, 等. 南海常见硬骨鱼类CO I 条码序列[J]. *海洋与湖沼*, 2009, 40(5): 608-614.
- Wang Z D, Guo Y S, Chen R L, *et al.* CO I barcoding sequences of teleosts in the South China Sea[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2009, 40(5): 608-614(in Chinese).



## Application of DNA barcoding in analyzing food composition of Belanger's croaker (*Johnius belangerii*) in Ma'an Archipelago

XI Xiaoqing<sup>1</sup>, BAO Baolong<sup>2</sup>, ZHANG Shouyu<sup>1\*</sup>

(1. College of Marine Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

**Abstract:** Belanger's croaker (*Johnius belangerii*) is a fundamental fish species of family *Sciaenidae* which usually has high gastric vacuous rate during 24 hours trawl surveys making the diet analysis difficult to continue. However, it plays an important role in the predator-prey relationship in the food web of Ma'an Archipelago, East China Sea. In this study, we use visual inspection with DNA barcoding technology combined previous collected data to make more comprehensive analysis towards its diet compositions and realistic prey-predator relationships. We amplified mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (*COI*) using fish and invertebrates universal primers in sampled fish stomach contents which could not be identified by morphological observation. Our results indicated that using DNA barcoding could successfully identify those partially digested food compositions species, such as *Solenocera crassicornis*, *Alpheus distinguendus*, *Palaemon macrodactylus*, *Alpheus japonicus*, *Acetes chinensis*, *Sebastes marmoratus*. We found belanger's croaker mostly feeds on shrimps (frequency of occurrence, 45%) and crabs (23%), some juvenile fishes (27%) occasionally and among them *S. crassicornis*, *P. macrodactylus*, *Portunus sanguinolentus*, *Oratosquilla oratoria* had not been observed in summer investigation ever before. In conclusion, the accurate and sufficient diet analysis is the precondition of feeding habit research which could contribute to reasonable suggestions of the management of island reef area ecosystem and fisheries forecasting.

**Key words:** *Johnius belangerii*; stomach contents; *CO*; DNA barcoding; species identification; feeding ecology

**Corresponding author:** ZHANG Shouyu. E-mail: syzhang@shou.edu.cn

**Funding projects:** National Natural Science Foundation of China (41176110)