



浙江沿岸日本鳀幼鱼渔业兼捕鱼类的 DNA 条形码鉴定

王乙婷¹, 朱文斌², 张亚洲², 王业辉³, 贾程豪⁴, 陈治⁵, 高天翔^{1*}

(1. 浙江海洋大学水产学院, 浙江 舟山 316022;

2. 浙江省海洋水产研究所, 浙江 舟山 316021;

3. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003;

4. 海南大学生态与环境学院, 海南海口 570228;

5. 海南热带海洋学院水产与生命学院, 海南 三亚 572022)

摘要: 为全面了解日本鳀幼鱼渔业兼捕种类, 探究线粒体细胞色素氧化酶亚单位 I (CO I) 基因片段在幼鱼鉴定方面的有效性, 本实验采用 DNA 条形码辅助形态分类的方法, 以 2021 年浙江沿岸日本鳀幼鱼渔业兼捕所得 192 尾鱼为研究对象进行条形码研究, 最终鉴定出 48 种鱼类, 隶属 2 纲 11 目 36 科 46 属, 其中 46 个种类鉴定到种, 2 个种类鉴定到属, 并成功鉴别 11 个形态学误判鱼种。研究共获得 152 条 CO I 序列, 平均长度为 654 bp (634~656 bp); 种间平均遗传距离 (0.252 3) 为种内平均遗传距离 (0.003 4) 的 74 倍, 表明基于 CO I 基因可以有效鉴定幼鱼; 自动条形码间隙检索 ABGD 分析产生 48 个 OTUs, 与形态学分类结果一致; 基于 CO I 基因构建系统发育树, 同一种类的个体均聚为一支, 物种可以有效区分, 但在科级和目级水平的聚类关系不清晰, DNA 条形码鉴定结果与形态学鉴定结果基本一致。研究表明, DNA 条形码可作为鉴定浙江沿岸日本鳀幼鱼渔业兼捕鱼类的有效方法, 弥补了传统形态学鉴定方法的不足。作为一种便捷、高效的物种识别工具, 该技术可以有效提高渔业资源评估中鱼种组成的准确性。研究结果为浙江沿岸鱼类多样性及产卵洄游研究奠定了基础, 同时为日本鳀幼鱼渔业的可持续利用提供科学依据。

关键词: 日本鳀; 幼鱼; DNA 条形码; 兼捕鱼类; 线粒体 CO I 基因

中图分类号: S 932.4

文献标志码: A

海洋环境作为地球上最大的栖息地之一, 具有极高的生物多样性^[1]。我国海域辽阔, 捕捞方式繁多, 然而, 随着环境变化、沿海开发等影响, 部分渔业资源呈衰退迹象^[2]。同 20 世纪 80 年代相比, 当前海洋捕捞渔获物的组成发生很大变化: 传统经济鱼种出现了小型化、低龄化、首次性成熟时间提前的问题; 低经济价值的小型鱼种逐渐替代高经济价值鱼种^[3]。为此, 国内开始实施“双

控”、禁渔期制度和伏季休渔制度, 但始终未能达到预期效果^[4-5]。

浙江海域常年受长江径流、东海沿岸流及台湾暖流的影响, 营养盐和生物饵料丰沛, 是众多经济鱼类重要的产卵场和索饵场, 也是部分远洋性鱼类洄游的必经水域^[6-7]。日本鳀 (*Engraulis japonicus*) 幼鱼, 隶属于鲱形目 (Clupeiformes) 鳀科 (Engraulidae), 为广温性中上层鱼类, 是该海域

收稿日期: 2022-11-07 修回日期: 2023-03-28

资助项目: 浙江省重点研发计划 (2021C2047); 国家自然科学基金 (41776171); 农业农村部“限额捕捞关键技术研究”与制度探索”(农财发 [2017]36 号)

第一作者: 王乙婷 (照片), 从事渔业资源研究, E-mail: wangyiting0193@163.com

通信作者: 高天翔, 从事渔业生态学研究, E-mail: gaotianxiang0611@163.com



的关键渔业类群^[8], 该物种主要以桡足类等浮游生物为食, 是许多经济鱼类如蓝点马鲛 (*Scomberomorus niphonius*) 等的饵料^[9-10], 在食物网中占据着将能量从浮游动物转换为高营养级鱼类的重要地位。日本鳀幼鱼离水后易腐, 但可以通过烘干制成美味鱼干, 深受人们喜爱, 是江浙沪闽地区重要的渔业资源捕捞对象之一^[11-14]。近年来, 随着东海渔业资源的衰退及变水层拖网技术的成熟, 日本鳀幼鱼由过去的兼捕对象逐渐转变为主捕对象^[3]。此外, 东海伏季休渔时间由6月1日提前至5月1日, 也在一定程度上对日本鳀幼鱼捕捞作业造成冲击^[15]。如何对日本鳀幼鱼捕捞作业进行时空优化成为渔业管理部门关注的焦点。因此农业农村部于2018年批准了浙江沿岸日本鳀幼鱼(丁香鱼渔业)专项特许捕捞。

鱼类的准确鉴定不仅是分类学研究的重要内容, 也是了解鱼类种群结构、开展渔业资源调查的基础与前提。鱼卵及仔稚鱼是鱼类资源补充和可持续利用的基础, 其数量直接决定了成鱼资源的补充量。全面了解鱼类早期生命史对于监测鱼类生态、推测鱼类的迁徙路线以及分析鱼类对环境的适应具有重要意义^[16-18]。目前, 浙江海域渔业资源调查研究主要建立在传统分类学方法之上^[19-20], 但其中一些研究中出现了鱼种鉴定错误的情况^[21-23]。此外, 形态学方法对日本鳀幼鱼渔业兼捕鱼类鉴定还存在一定的局限性: 其一, 日本鳀幼鱼渔业兼捕鱼类多为小型鱼类, 许多早期生活史阶段的鱼类往往具有相似特征, 且同一物种在早期发育的不同阶段会迅速发生变化, 导致不同发育阶段的同一物种常被误鉴为不同物种; 其二, 海上作业时间较长, 无法保证样本的新鲜程度和完整性; 此外, 受个人分类经验和专业知识的限制, 也会对鉴定结果造成影响^[24-27]。Ko等^[25]建议利用形态特征进行仔鱼鉴定应更加保守, 最好仅在科或属水平进行鉴定。相比之下, DNA条形码作为一段标准化的基因序列, 其序列差异可以区分98%以上的物种^[28]。该方法不受分类学基础及生物体表型可塑性的限制, 广泛应用于动植物及微生物种类鉴定。线粒体细胞色素氧化酶亚单位 I (*CO I*) 易被通用引物扩增, 进化速率适中, 很少出现基因插入或缺失的情况, 是目前鱼类鉴定中应用最广泛的标记基因^[29-31]。近几年, 不少国内学者使用DNA条形码用于鱼卵或仔稚鱼的鉴定, 如徐春燕等^[32]基于*CO I*和16S*rRNA*两种

线粒体基因对厦门海域的仔稚鱼进行种类鉴定, 认为16S*rRNA*基因的扩增效率相较于*CO I*基因更高。Ardura等^[33]使用*CO I*基因对东大西洋仔鱼进行鉴定, 成功识别44个分类单元 (operational taxonomic units, OTUs)。Liu等^[34]基于*Cytb*基因鉴定出7933枚长江流域鱼卵。这些研究表明, DNA条形码可以有效地对鱼卵和仔稚鱼进行鉴定。

为此, 本研究以浙江近岸日本鳀幼鱼渔业兼捕鱼类为对象, 在形态学分类的基础上, 基于线粒体*CO I*基因片段对所采集的鱼类样品进行分析, 以评估*CO I*基因鉴定幼鱼的可行性和准确性。研究结果能增进对浙江海域鱼类多样性的了解, 为浙江省渔业资源的保护和可持续利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用样品为2021年5月1日—6月15日浙江沿岸日本鳀幼鱼渔业捕捞所获。据捕捞日志记录, 5月日本鳀幼鱼总尾数占该月总尾数的99.75%, 对所获副渔获物全部低温保存并运回实验室, 最终得到192尾样本。样品采集的作业海域为27°20'~30°20' N, 底拖网禁渔区线以西20 n mile至底拖网禁渔区线海域(产卵保护区除外), 最大船数43艘, 捕捞限额为4000 t, 采用围网作业, 定点上岸港口为瑞安市的东山渔港。目前所有样本保存于浙江海洋大学渔业生态与生物多样性实验室。本研究获得了浙江海洋大学实验动物管理和使用伦理委员会批准(第2022069号), 实验过程中操作人员严格遵守浙江海洋大学实验动物管理和使用伦理规范, 并按照浙江海洋大学伦理委员会制定的规章制度执行。

1.2 DNA提取、扩增与测序

参照《中国海洋鱼类》《浙江海洋鱼类志》和《中国海洋及河口鱼类系统检索》形态特征描述^[8, 35-36]对采集样品进行初步的形态学归类, 测量体重和全长, 选取每种鱼类中外观特征最佳的个体进行拍照, 每尾鱼取2份约1 g肌肉, 分别用于提取DNA和入库保存, 所用鱼类样本均保存于-80 °C冰箱。肌肉样品采用酚-氯仿法提取DNA^[37]。使用通用引物F和R (F1: 5'-TCAACCAACCACA AAGACATTGGCAC-3', F2: 5'-TCGACTAATC

ATAAAGATATCGGCAC-3', R1: 5'-TAGACTTC TGGGTGGCCAAAGAATCA-3', R2: 5'-ACTTCA GGGTGACCGAAGAATCAGAA-3') 扩增 *CO I* 基因片段^[1]。

PCR 扩增反应体系为 25 μL , 包含 2.5 μL 10 \times PCR buffer, 2 μL dNTPs, 0.25 μL *Taq* 聚合酶(北京全式金生物技术有限公司), 无菌水 17.25 μL , 上下游引物各 1 μL , 1 μL DNA 模板。使用 Mastercycler Gradient 仪器进行扩增, 扩增程序: 预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 35 个循环: 94 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 54 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s; 最后延伸 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min; 10 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测出现清晰明亮条带后, 送生工生物工程(上海)股份有限公司进行双向测序。

1.3 数据分析

测序获得的序列通过 Seqman 软件(DNAStar 软件包)进行比对, 剪切上下游引物并辅以手动校正。剪切好的序列在 NCBI(National Center for Biotechnology Information) 网站进行在线比对, 两条序列相似度 $\geq 98\%$ 鉴定为同一种^[25]。

剪切好的序列使用 MEGA 11.0 软件^[38] 的 Clustal W 进行序列比对。随后, 使用 Kimura-2-parameter(K2P) 碱基替换模型计算碱基组成、变异位点、简约信息位点及序列间遗传距离。

通过自动条形码间隙检索(Automated barcode gap discovery, ABGD) 在线网站(<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/>)^[39] 将获得的全部 *CO I* 基因序列上传, 最小相对 gap 值设为 1, 其余均使用给定的默认值, 使用 Kimura(K80) TS/TV 方法分析。

比对后的序列导入 MEGA 11.0 软件并选用 Kimura-2-parameter(K2P) 碱基进化模型, 节点处置信度为 1 000 进行分支结构检验, 其余均使用给定的默认值, 构建邻接(Neighbor-joining, NJ) 树。

2 结果

2.1 种类鉴定

通过与 NCBI 数据库比对, 152 条 *CO I* 基因序列鉴定为 48 种鱼类, 隶属 2 纲 11 目 36 科 46 属(表 1)。其中 46 个种类鉴定到种, 2 个种类鉴定到属(下鱈属和小带鱼属)。

2.2 序列特征

本研究对 192 尾样品进行 *CO I* 基因片段测

序, 分析得到 152 条 *CO I* 序列。结果显示, 在 152 条平均长度为 654 bp (634~656 bp) 的 *CO I* 序列中, 保守位点(conserved sites) 占 47.21%, 简约信息位点(informative sites) 占 45.25%, 变异位点(variable sites) 占 51.89%。*CO I* 全序列及各位点的碱基组成见表 2, 其中 C+G (47.66%) 的含量显著低于 A+T (52.34%) 的含量, 整体呈现 AT 偏倚, 且第 3 位点 AT 含量最高。

2.3 遗传距离分析

基于 K2P 模型分别计算不同分类阶元的 *CO I* 基因遗传距离。结果显示, 种内遗传距离为 0.000 0~0.010 8, 六丝矛尾虾虎鱼的种内遗传距离最大, 种内平均遗传距离为 0.003 4; 种间遗传距离为 0.119 7~0.339 5, 最小出现在竹荚鱼与短吻丝鲈, 最大出现在镰鲷与有明银鱼, 种间平均遗传距离为 0.252 3, 为种内平均遗传距离的 74 倍, 符合 Hebert 等^[40] 提出的“10 倍法则”, 即种间遗传距离是种内遗传距离 10 倍以上时可以鉴别物种。属间遗传距离最大的是银鱼属与鲷属 (0.339 5), 最小的是竹荚鱼属与丝鲈属 (0.119 7); 科间遗传距离最大的是银鱼科与鲷科 (0.339 5), 最小的是银汉鱼科与鲈科 (0.192 1); 鲈形目与胡瓜鱼目遗传距离最大 (0.276 2), 最小的是鲈形目与银汉鱼目 (0.212 2)。遗传距离随分类阶元的提高而增大, 但增长幅度随分类阶元的提高而减小(表 3)。

2.4 系统发育关系

基于 *CO I* 基因序列构建的 NJ 树(图 1) 结果显示, 同种个体均以高支持率单独聚为一支, 聚类清晰, 所有物种都可以被有效区分, 同属个体聚类效果也较好。这种聚类结果与遗传距离结果相对应, 表明基于条形码的方法可以有效区分鱼种。

基于所有 *CO I* 序列的 ABGD 分析结果显示, 种内差异先验值 P (prior intraspecific divergence) 处于 0.001 0~0.006 9 时, 可以形成明显的条形码间隙, 当 $P=0.008 9$ 时(图 2, 红色箭头处), 初始划分结果与递归划分结果首次交汇, 取该点作为物种界定点, 此时产生 48 个 OTUs, 与形态学划分结果一致。

3 讨论

日本鳀幼鱼专项特许捕捞为单一鱼种作业方式, 具有相对较强的选择性^[20], 其捕捞的渔获物

表 1 基于 CO I 基因的鉴定结果

Tab. 1 Species identification based on CO I gene

目 order	科 family	属 genus	物种 species	数量/尾 no.	形态学鉴定与分子鉴定结果是否一致 coincidence degree
鳐形目 Rajiformes	鳐科 Rajidae	瓮鳐属 <i>Okamejei</i>	斑瓮鳐 <i>Okamejei kenojei</i>	1	形态学仅鉴定到瓮鳐属
鲛鳐目 Lophiiformes	鲛鳐科 Lophiidae	黄鲛鳐属 <i>Lophius</i>	黄鲛鳐 <i>Lophius litulon</i>	3	是
刺鱼目 Gasterosteiformes	海龙科 Syngnathidae	海龙属 <i>Syngnathus</i>	薛氏海龙 <i>Syngnathus schlegeli</i>	2	否[形态学误判为尖海龙(<i>Syngnathus acus</i>)]
	烟管鱼科 Fistulariidae	烟管鱼属 <i>Fistularia</i>	鳞烟管鱼 <i>Fistularia petimba</i>	1	是
鲱形目 Clupeiformes	鲱科 Engraulidae	鲱属 <i>Engraulis</i>	日本鲱(幼鱼) <i>E. japonicus</i>	18	是
		棱鲱属 <i>Thryssa</i>	赤鼻棱鲱 <i>Thryssa kammalensis</i>	5	是
			黄吻棱鲱 <i>Thryssa vitirostris</i>	2	否[形态学误判为中颌棱鲱(<i>Thryssa mystax</i>)]
		黄鲫属 <i>Setipinna</i>	太的黄鲫 <i>Setipinna taty</i>	1	是
		侧带小公鱼属 <i>Stolephorus</i>	康氏侧带小公鱼 <i>Stolephorus commersonii</i>	1	是
	鲱科 Clupeidae	小沙丁鱼属 <i>Sardinella</i>	青鳞小沙丁鱼 <i>Sardinella zunasi</i>	8	是
		斑鲙属 <i>Konosirus</i>	斑鲙 <i>Konosirus punctatus</i>	1	是
	锯腹鳐科 Pristigasteridae	鳐属 <i>Ilisha</i>	鳐 <i>Ilisha elongata</i>	1	是
颌针鱼目 Beloniformes	鲷科 Hemiramphidae	下鲷属 <i>Hyporhamphus</i>	<i>Hyporhamphus</i> sp.	4	
胡瓜鱼目 Osmeriformes	银鱼科 Salangidae	银鱼属 <i>Salanx</i>	有明银鱼 <i>Salanx ariakensis</i>	14	是
鲈形目 Perciformes	石首鱼科 Sciaenidae	黄鱼属 <i>Larimichthys</i>	大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	5	其中2个个体形态学仅鉴定到黄鱼属, 其余3个个体形态学鉴定为大黄鱼
			小黄鱼 <i>Larimichthys polyactis</i>	4	是
		鳊属 <i>Miichthys</i>	鳊 <i>Miichthys miituy</i>	4	否(形态学无法鉴定)
	无齿鲷科 Ariommatidae	无齿鲷属 <i>Ariomma</i>	印度无齿鲷 <i>Ariomma indicum</i>	1	否[形态学误判为黄斑鲷(<i>Leiognathus bindus</i>)]
	鲟科 Sphyraenidae	鲟属 <i>Sphyraena</i>	日本鲟 <i>Sphyraena japonica</i>	2	是
	赤刀鱼科 Cepolidae	棘赤刀鱼属 <i>Acanthocephala</i>	背点棘赤刀鱼 <i>Acanthocephala limbata</i>	2	是
	带鱼科 Trichiuridae	小带鱼属 <i>Eupleurogrammus</i>	<i>Eupleurogrammus</i> sp.	3	
		沙带鱼属 <i>Lepturacanthus</i>	沙带鱼 <i>Lepturacanthus savala</i>	3	是
	鲷科 Sparidae	犁齿鲷属 <i>Erynnis</i>	二长棘犁齿鲷 <i>Erynnis cardinalis</i>	5	是
	鲱科 Coryphaenidae	鲱属 <i>Coryphaena</i>	鲱 <i>Coryphaena hippurus</i>	1	是
	鲭科 Scombridae	鲭属 <i>Scomber</i>	日本鲭 <i>Scomber japonicus</i>	5	是
		马鲛属 <i>Scomberomorus</i>	蓝点马鲛 <i>Scomberomorus niphonius</i>	1	是

· 续表 1 ·

目 order	科 family	属 genus	物种 species	数量/尾 no.	形态学鉴定与分子鉴定结果是否一致 coincidence degree
		丝鲹属 <i>Alectis</i>	短吻丝鲹 <i>Alectis ciliaris</i>	1	是
	鲹科 Carangidae	竹荚鱼属 <i>Trachurus</i>	竹荚鱼 <i>Trachurus japonicus</i>	6	是
		鲷属 <i>Seriola</i>	五条鲷 <i>Seriola quinqueradiata</i>	1	是
	虾虎鱼科 Gobiidae	矛尾虾虎鱼属 <i>Amblychaeturichthys</i>	六丝矛尾虾虎鱼 <i>Amblychaeturichthys hexanema</i>	3	是
	长鲷科 Centrolophidae	刺鲷属 <i>Psenopsis</i>	刺鲷 <i>Psenopsis anomala</i>	5	是
	唇指鲷科 Cheilodactylidae	唇指鲷属 <i>Cheilodactylus</i>	四角唇指鲷 <i>Cheilodactylus quadricornis</i>	1	是
	鲷科 Leiognathidae	鲷属 <i>Deveximentum</i>	间断仰口鲷 <i>Deveximentum interruptum</i>	2	否[形态学误判为短棘鲷(<i>Leiognathus equulus</i>)]
	双鳍鲷科 Nomeidae	玉鲷属 <i>Psenes</i>	水母玉鲷 <i>Psenes arafurensis</i>	1	形态学仅鉴定到玉鲷属
	鲷科 Stromateidae	鲷属 <i>Pampus</i>	镰鲷 <i>Pampus echinogaster</i>	1	否[形态学误判为银鲷(<i>Pampus argenteus</i>)]
	石鲷科 Oplegnathidae	石鲷属 <i>Oplegnathus</i>	条石鲷 <i>Oplegnathus fasciatus</i>	1	是
	须鲷科 Mullidae	副鲷属 <i>Parupeneus</i>	短须副鲷 <i>Parupeneus ciliatus</i>	1	形态学仅鉴定到副鲷属
鲷形目 Tetraodontiformes	单角鲷科 Monacanthidae	细鳞鲷属 <i>Stephanolepis</i>	丝背细鳞鲷 <i>Stephanolepis cirrhifer</i>	2	是
	鲷科 Tetraodontidae	兔头鲷属 <i>Lagocephalus</i>	棕斑兔头鲷 <i>Lagocephalus spadiceus</i>	4	是
		东方鲷属 <i>Takifugu</i>	黄鳍东方鲷 <i>Takifugu xanthopterus</i>	2	是
鲈形目 Scorpaeniformes	豹鲂鲷科 Dactylopteridae	豹鲂鲷属 <i>Dactyloptena</i>	东方豹鲂鲷 <i>Dactyloptena orientalis</i>	1	是
	鲂鲷科 Triglidae	绿鳍鱼属 <i>Chelidonichthys</i>	小眼绿鳍鱼 <i>Chelidonichthys spinosus</i>	4	是
	绒皮鲈科 Aploactinidae	钝顶鲈属 <i>Paracentropogon</i>	红鳍赤鲈 <i>Paracentropogon rubripinnis</i>	1	否[形态学误判为长棘赤鲈(<i>Hypodytes iongispinis</i>)]
	鲈科 Scorpaenidae	蓑鲈属 <i>Pterois</i>	蓑鲈 <i>Pterois volitans</i>	1	是
鲷形目 Mugiliformes	鲷科 Mugilidae	平鲷属 <i>Planiliza</i>	鲷 <i>Planiliza haematocheilus</i>	1	是
鳗鲡目 Anguilliformes	海鳗科 Muraenesocidae	细颌鳗属 <i>Oxyconger</i>	细颌鳗 <i>Oxyconger leptognathus</i>	2	否(柳叶鳗, 形态学无法鉴定)
	蛇鳗科 Ophichthyidae	须鳗属 <i>Cirrhimuraena</i>	中华须鳗 <i>Cirrhimuraena chinensis</i>	7	否(柳叶鳗, 形态学无法鉴定)
银汉鱼目 Atheriniformes	银汉鱼科 Atherinidae	下银汉鱼属 <i>Hypoatherina</i>	凡氏下银汉鱼 <i>Hypoatherina valenciennei</i>	5	是

表 2 CO I 基因的碱基组成

Tab. 2 The sequence composition of CO I gene

%

碱基位点 base sites	A	T	C	G	A+T	C+G
第1位点 1st site	23.92	22.65	27.57	25.86	46.57	53.43
第2位点 2st site	21.87	33.31	27.97	16.85	55.18	44.82
第3位点 3st site	24.61	30.62	30.69	14.08	55.23	44.77
平均值 average	23.47	28.87	28.75	18.91	52.34	47.66

表 3 不同分类阶元下的遗传差异

Tab. 3 Genetic divergence at different taxonomic levels

项目 item	平均遗传距离 mean genetic distance	最小遗传距离 minimum genetic distance	最大遗传距离 maximum genetic distance
种内 intraspecific	0.003 4	0.000 0	0.010 8
种间 interspecific	0.252 3	0.119 7	0.339 5
属间 intergenus	0.254 3	0.119 7	0.339 5
科间 interfamily	0.254 7	0.192 1	0.339 5
目间 interorder	0.245 2	0.212 2	0.276 2

种类数明显低于同季节的底层拖网和张网^[23, 41-43]。但由于作业海域是众多经济种类的产卵场与索饵场, 在多种鱼种共栖海域作业时不可避免地兼捕到其他鱼类, 进行准确地鉴定对评估日本鳀幼鱼渔业的种群状况及制订渔业管理对策具有重要意义。本研究基于线粒体 *CO I* 基因对所获 192 尾鱼进行分子鉴定, 成功鉴定出 48 种鱼类, 包括 11 个形态学误判鱼种。

3.1 基于 DNA 条形码的物种鉴定

本研究所采集的 192 尾鱼经 DNA 提取、扩增和测序后, 共获得 152 条 *CO I* 条形码序列, 通过序列比对, 将样品鉴定为 48 个种类, 除 2 个个体仅鉴定到属, 其余个体均能鉴定到种的水平。由于 GenBank 数据库中的序列信息不足, 2 个样品的序列 (下鱈鱼属和小带鱼属) 在数据库中搜索到序列相似度最大为 93%, 无法鉴定到种水平。另外还发现数据库中存在错误鉴定的序列信息, 如部分以学名为银鲳提交的基因序列, 经比对发现这些序列明显不属于银鲳物种, 许多学者也遇到相同情况^[32, 44-46]。可见, 完整且准确的数据库是 DNA 条形码物种鉴定的前提条件^[25]。脱离形态学而开展的 DNA 条形码研究是不可取的, 必须在取样前对样品进行形态测量并拍照保存。今后研究应尽可能补充其他鱼类 DNA 条形码, 尤其是一些非经济鱼种。同时在使用数据库的序列信息时需要仔细甄别, 确保序列来源可信性, 因此, 可以通过多个数据库同时比对 (如 BOLD <http://biodiversitygenomics.net>、MitoFish <http://mitofish.aori.u-tokyo.ac.jp/>), 也可以选择同一物种的多个基因片段进行分析鉴定。

尽管形态学鉴定的作用不容小觑, 但对于外观特征相似的鱼类而言, 想要进一步正确鉴定到种的水平则需要借助 DNA 条形码。如本研究中形

态学初步鉴定为尖海龙的个体, 经 DNA 条形码鉴定后纠正为舒氏海龙。尖海龙和舒氏海龙为海龙属不同种, 由于二者形态差异较小, 又缺乏权威的分类描述, 其分类问题曾一度困扰许多分类专家, Chen 等^[47]对采自中国 4 个水域的海龙属鱼类开展了相关的形态学描述及分子鉴定工作, 成功鉴别 2 个物种并给出 2 个物种的 *CO I* 基因条形码序列, 研究结果提示分布于中国海域的海龙为舒氏海龙。本研究在进行形态学初步鉴定时, 水母玉鲷、短须副鲱鲤、斑瓮鳚 3 个样品只鉴定到属水平; 大黄鱼个体较小, 易与小黄鱼混淆, 初步鉴定为黄鱼属, 以上样品经 DNA 条形码验证后鉴定到种水平。可见, 在缺乏专业分类知识、样品破损等情况下, DNA 条形码可以快速、有效地鉴定物种。

3.2 DNA 条形码序列特征及遗传距离分析

碱基组成方面, 4 种碱基的平均组成中 G 碱基含量最低 (18.91%), 呈明显的反 G 偏倚, 且第 3 位点的反 G 偏倚现象最显著 (14.08%)。线粒体的不对称复制方式会使大部分 H 链处于易发生突变的单链状态, 进而导致较不稳定的 G 碱基被其他 3 种碱基所替代^[48]。Xing 等^[49]认为线粒体基因产生突变是由于受到自然选择压力, 而密码子位点的碱基突变压力则会导致碱基使用偏差。因此, 推测本研究中出现反 G 偏倚主要是由 H 链编码的蛋白质, 尤其是其第三密码子位点对碱基使用的偏好导致。Ward 等^[1]曾报道了 143 种硬骨鱼中 *CO I* 基因序列的密码子 GC 含量特征, 即密码子第 1 位点 GC 含量最高, 密码子第 3 位点 GC 含量最低, 本研究中 GC 含量在第 1 位点最高 (53.43%), 第 3 位点最低 (44.77%), 碱基组成呈现 AT 偏倚, 符合 Ward 等^[1]发现的碱基组成规律。这一结果说明尽管不同鱼类碱基含量不同, 但整体都表现为 GC 向 AT 进化过程中具有选择压力。

基于 DNA 条形码进行物种鉴定的有效性也依赖于足够的种内和种间差异。Hebert 等^[29]通过对 8 个门的物种分析后发现, 在基于 *CO I* 基因进行物种鉴定时, 种内遗传距离一般不大于 0.02, 当种间遗传距离为种内遗传距离的 10 倍以上时可有效鉴别物种^[40]。本研究中种内最大遗传距离为 0.010 8, 小于 0.02; 种间平均遗传距离为种内平均遗传距离的 74 倍, 远高于夏威夷海域鱼类的 36 倍、台湾海峡鱼类的 29 倍和澳大利亚海域鱼

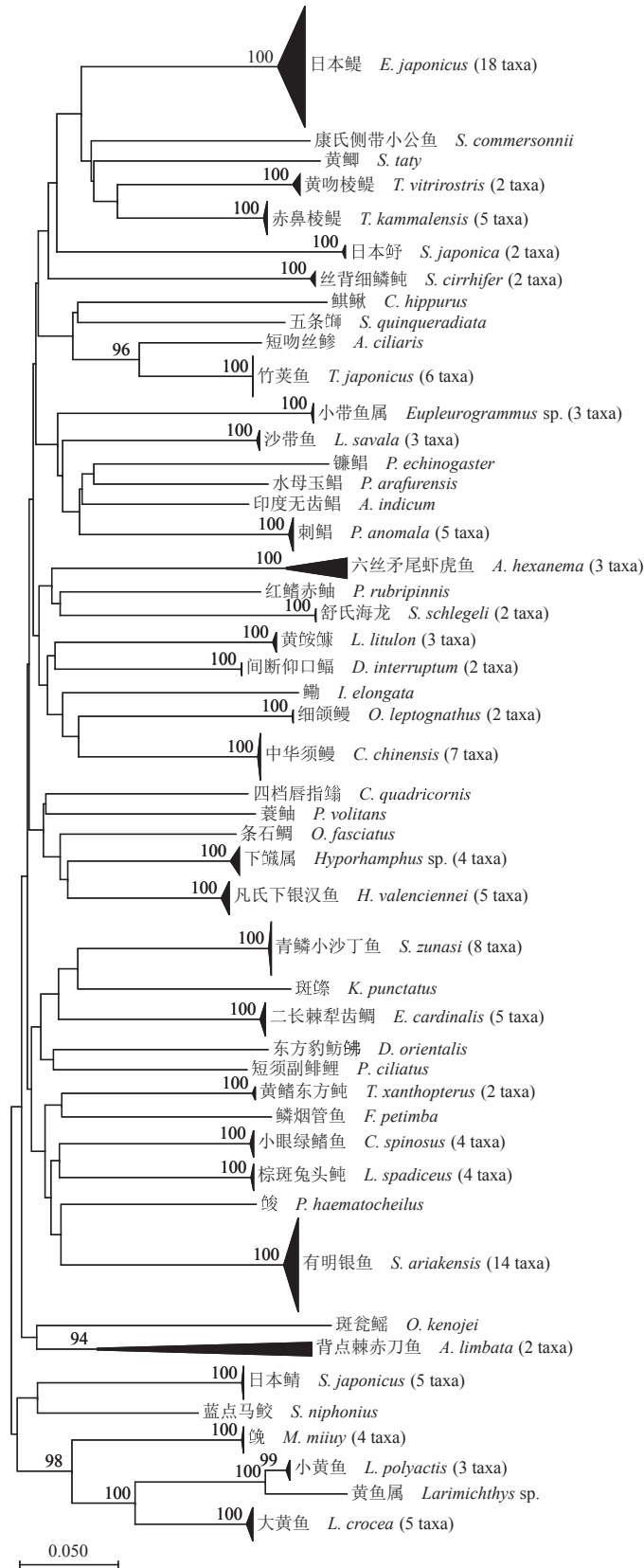


图 1 基于 CO I 基因序列构建的系统进化树

括号中的数字表示该物种所包含的个体数, 其余均只有 1 个个体。

Fig. 1 Neighbor-joining phylogenetic tree based on CO I sequences

The numbers in parentheses indicate the number of individuals contained in the species, the rest are only 1 individual.

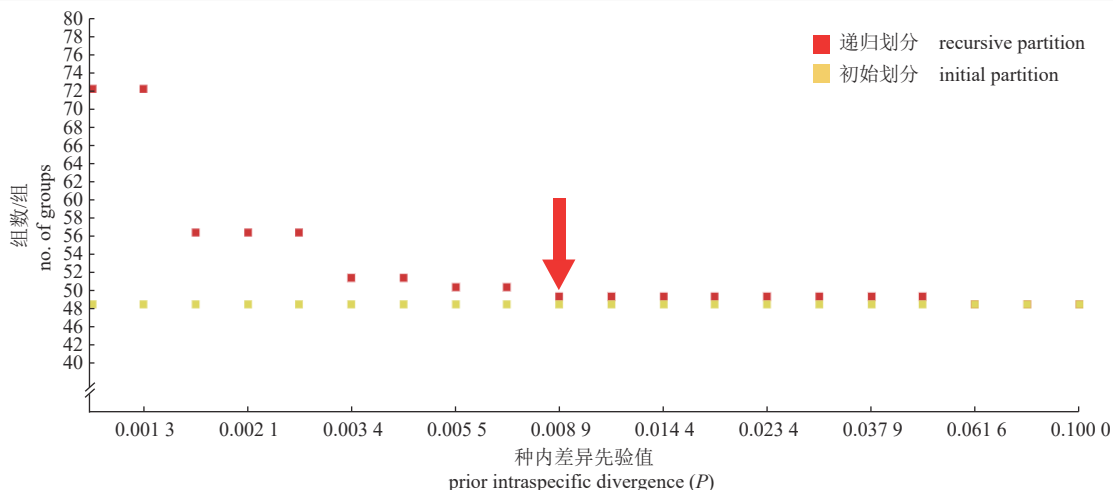


图2 基于所有 *CO I* 序列的 ABGD 分析

黄色为初始划分结果, 红色为递归划分结果。

Fig. 2 ABGD analysis based on all *CO I* sequences

Yellow box is initial partition and red box is recursive partition.

类的 25 倍^[1, 46, 49], 差异倍数符合 Hebert 等^[29] 提出的 10 倍遗传差异标准。表明 *CO I* 基因 DNA 条形码适用于日本鳀幼鱼渔业兼捕幼鱼的鉴定。

3.3 DNA 条形码分类及系统发育分析

本研究使用 ABGD 和构建 NJ 树两种方法, 为了便于比较两种方法, 均使用 K2P 模型进行分析。基于 *CO I* 基因序列构建 NJ 树, 图 1 可以明显观察到 DNA 条形码能将全部物种区分, 同种个体均聚为一支, 同属的个体表现为姐妹群关系, 但科级及以上的分类阶元不能很好地分开, 存在聚类交叉的现象, 仅部分同科或同目的个体聚类在一起, 这种情况与许多研究相同^[44, 50-52]。由于 *CO I* 基因具有母性遗传的特点, 无法体现亲本的完整遗传信息。NJ 树的聚类关系与本研究中各阶元的遗传距离随分类阶元提高而增长缓慢的现象相符合。说明 *CO I* 基因在分析科级以上的物种进化关系方面有一定的局限性。然而, Krück 等^[53] 使用线粒体 DNA 和核基因 2 种标记, 成功解决了有同样情况的鳀属 (*Sillago*) 鱼类。因此, 在今后的分类鉴定研究中, 可以选取多种基因片段并结合形态特征进行鉴定。ABGD 的检测步骤是将比对好的序列先进行两两间的遗传距离的计算, 再根据给定的临界值将序列划分为不同类群, 并基于种内和种间遗传距离的差异形成条形码间隙。递归划分结果和初始划分结果越接近, 分析结果越科学。当种内遗传距离与种间遗传距离出现重叠情况时, 该方法在可以一定程度上减少阈值定义的主观因素, 具有较高的准确性。图 2 表

明当种内差异先验值 $P=0.0089$ 时, 两点交汇共产生 48 个 OTUs, 与物种鉴定结果一致。

随着测序技术的发展和测序成本的降低, 近些年 DNA 条形码技术逐渐被应用于物种分类鉴定^[54-55]、系统进化研究^[56]、生物多样性评估^[57]、生物群落组成^[58] 和食物链^[59] 等多个方面研究中。DNA 条形码的出现为分类学研究提供了新方法, 解决了早期研究中过度依赖于分类专家及个体表型可塑性而导致鉴定结果不一致的难题。

综上所述, DNA 条形码适用于日本鳀幼鱼渔业兼捕鱼类的鉴定, 作为一种准确的、标准化的、便捷的物种鉴定工具, 该技术在鱼类多样性研究中具有很好的应用前景。本研究为浙江海域渔业资源相关研究提供了新思路。但需要注意的是, 尽管 DNA 条形码能够很好地对从形态学上难以区分的物种进行鉴定, 但该技术只能作为一种辅助手段, 特别是在描述新种、隐存种时, 必须要有形态学依据^[60-62]。在进行物种鉴定时须将传统形态学方法与分子鉴定相结合, 使结果更令人信服。本研究也强调需要补充和完善鱼类的 DNA 条形码序列信息, 为后续研究提供科学依据。

(作者声明本文无实际或潜在的利益冲突)

参考文献 (References):

- [1] 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, 中国水产学会主办 sponsored by China Society of Fisheries

- 360(1462): 1847-1857.
- [2] 黄硕琳, 唐议. 渔业管理理论与中国实践的回顾与展望 [J]. 水产学报, 2019, 43(1): 211-231.
Huang S L, Tang Y. Review and prospect of theories of fisheries management and China's practice[J]. Journal of Fisheries of China, 2019, 43(1): 211-231 (in Chinese).
- [3] 赵淑江, 吕宝强, 李汝伟, 等. 物种灭绝背景下东海渔业资源衰退原因分析 [J]. 中国科学: 地球科学, 2015, 45(11): 1628-1640.
Zhao S J, Lü B Q, Li R W, *et al.* A preliminary analysis of fishery resource exhaustion in the context of biodiversity decline[J]. Scientia Sinica Earth Sciences, 2016, 59(2): 223-235. (in Chinese)
- [4] 孙吉亭, 卢昆. 中国海洋捕捞渔船“双控”制度效果评价及其实施调整 [J]. 福建论坛: 人文社会科学版, 2016(11): 49-55.
Sun J T, Lu K. Evaluation and adjustment of the “double control” system for Chinese marine fishing vessels[J]. Fujian Tribune: The Humanities Social Sciences, 2016(11): 49-55 (in Chinese).
- [5] 长江渔业资源管理委员会. 实施长江禁渔期制度 助推长江渔业资源恢复——长江禁渔期制度实施十年工作回顾 [J]. 中国水产, 2011(11): 13-15.
Yangtze Fisheries Resources Management Committee. Implementation of the Yangtze fishing close season system to boost the recovery of fishery resources in the Yangtze River: ten years' work review of the fishing close season system in Yangtze River[J]. China Fisheries, 2011(11): 13-15 (in Chinese).
- [6] 郭朋军, 江新琴, 俞存根, 等. 舟山沿岸渔场春秋鱼类群落结构特征分析 [J]. 渔业科学进展, 2020, 41(4): 1-11.
Guo P J, Jiang X Q, Yu C G, *et al.* Analysis of the fish community structure in the spring and autumn of the Zhoushan coastal fishing grounds[J]. Progress in Fishery Sciences, 2020, 41(4): 1-11 (in Chinese).
- [7] 胡翠林, 张亚洲, 李德伟, 等. 浙江沿岸产卵场春、夏季鱼类资源密度和群落多样性研究 [J]. 水生生物学学报, 2018, 42(5): 984-995.
Hu C L, Zhang Y Z, Li D W, *et al.* Study on fish resources and community diversity during spring and summer in the coastal spawning ground of Zhejiang Province, China[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2018, 42(5): 984-995 (in Chinese).
- [8] 陈大刚, 张美昭. 中国海洋鱼类 [M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2015.
Chen D G, Zhang M Z. Marine fishes of China[M]. Qingdao: China Ocean University Press, 2015 (in Chinese).
- [9] 韦晟, 姜卫民. 黄海鱼类食物网的研究 [J]. 海洋与湖沼, 1992, 23(2): 182-192.
Wei S, Jiang W M. Study on food web of fishes in the Yellow Sea[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 1992, 23(2): 182-192 (in Chinese).
- [10] 蒋日进, 李鹏飞, 刘志坚, 等. 鳊鱼摄食习性的季节变化 [J]. 浙江海洋学院学报 (自然科学版), 2015, 34(5): 439-443.
Jiang R J, Li P F, Liu Z J, *et al.* Seasonal variation in feeding habits of *Engraulis japonicus*[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition), 2015, 34(5): 439-443 (in Chinese).
- [11] 李本亭. 诱人的鳊鱼资源 [J]. 海洋世界, 1997(1): 10-11.
Li B T. Seductive resource of *Engraulis japonicus*[J]. Ocean World, 1997(1): 10-11 (in Chinese).
- [12] 唐启升, 苏纪兰, 张经. 我国近海生态系统食物产出的关键过程及其可持续机理 [J]. 地球科学进展, 2005, 20(12): 1280-1287.
Tang Q S, Su J L, Zhang J. Key processes and sustainable mechanisms of ecosystem food production in the coastal ocean of China[J]. Advances in Earth Science, 2005, 20(12): 1280-1287 (in Chinese).
- [13] 薛利建, 刘子藩. 东海日本鳊数量分布和生物学特性的研究 [J]. 浙江海洋学院学报 (自然科学版), 2005, 24(4): 312-317.
Xue L J, Liu Z P. Study on the biomass distribution & biological characteristics of *Engraulis japonicus* in the East China Sea[J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition), 2005, 24(4): 312-317 (in Chinese).
- [14] 魏涯, 吴燕燕, 李来好, 等. 船上加工日本鳊的质量安全管理研究 [J]. 南方水产科学, 2011, 7(2): 61-67.
Wei Y, Wu Y Y, Li L H, *et al.* Quality and safety management in on-board processing of *Engraulis japonicus* [J]. South China Fisheries Science, 2011, 7(2): 61-67 (in Chinese).
- [15] 中华人民共和国农业农村部. 农业部关于调整海洋伏季休渔制度的通告 [EB/OL]. (2018-02-28)[2023-03-

- 27]. http://www.moa.gov.cn/gk/zcfg/nybgz/201802/t20180209_6136812.htm.
Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. The Ministry of Agriculture has readjusted the marine fishing moratorium[EB/OL]. (2018-02-28)[2023-03-27]. http://www.moa.gov.cn/gk/zcfg/nybgz/201802/t20180209_6136812.htm (in Chinese).
- [16] 陈定标. 浙江沿海鱼类 DNA 条形码及其在鱼卵仔鱼鉴定中的应用 [D]. 舟山: 浙江海洋大学, 2017.
Chen D B. The application of fish DNA barcoding in species identification of fish larvae and eggs in Zhejiang coast[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2017 (in Chinese).
- [17] Reynalte-Tataje D A, Nakatani K, Fernandes R, *et al*. Temporal distribution of ichthyoplankton in the Ivinhema River (Mato Grosso do Sul State/ Brazil): influence of environmental variables[J]. *Neotropical Ichthyology*, 2011, 9(2): 427-436.
- [18] Wibowo A, Panggabean A S, Zamroni A, *et al*. Using DNA barcode to improve the identification of marine fish larvae, case study coastal water near Jakarta and Banda Sea, Indonesia[J]. *Indonesian Fisheries Research Journal*, 2018, 24(1): 23-30.
- [19] 朱文斌, 朱海晨, 张亚洲, 等. 浙江沿岸日本鳀幼鱼数量分布及其与环境因子的关系 [J]. *中国水产科学*, 2021, 28(9): 1175-1183.
Zhu W B, Zhu H C, Zhang Y Z, *et al*. Quantitative distribution of juvenile *Engraulis japonicus* and the relationship with environmental factors along the Zhejiang coast[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2021, 28(9): 1175-1183 (in Chinese).
- [20] 朱海晨, 朱文斌, 张亚洲, 等. 丁香鱼围网副渔获物鱼类组成及分布特征 [J]. *水产科学*, 2022, 41(4): 573-580.
Zhu H C, Zhu W B, Zhang Y Z, *et al*. Fish composition and distribution characteristics of by-catch of double-vessel bag seine[J]. *Fisheries Science*, 2022, 41(4): 573-580 (in Chinese).
- [21] 李渊, 宋娜, Khan F S, 等. 银鲳形态特征与 DNA 条形码研究 [J]. *水产学报*, 2013, 37(11): 1601-1608.
Li Y, Song N, Khan F S, *et al*. New evidence of morphological characters and DNA barcoding of *Pampus argenteus* (Euphrasen, 1788)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(11): 1601-1608 (in Chinese).
- [22] 徐善良, 王丹丽, 徐继林, 等. 东海银鲳 (*Pampus argenteus*)、灰鲳 (*P. cinereus*) 和中国鲳 (*P. sinensis*) 肌肉主要营养成分分析与评价 [J]. *海洋与湖沼*, 2012, 43(4): 775-782.
Xu S L, Wang D L, Xu J L, *et al*. Analysis and evaluation of nutritional components in muscle of *Pampus argenteus*, *P. cinereus* and *P. sinensis* from the East China Sea[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(4): 775-782 (in Chinese).
- [23] 张洪亮, 宋之琦, 潘国良, 等. 浙江南部近海春季鱼类多样性分析 [J]. *海洋与湖沼*, 2013, 44(1): 126-134.
Zhang H L, Song Z Q, Pan G L, *et al*. Diversity analysis of fish in the coastal area of Zhejiang during spring[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2013, 44(1): 126-134 (in Chinese).
- [24] Victor B, Hanner R H, Shivji M S, *et al*. Identification of the larval and juvenile stages of the Cubera snapper, *Lutjanus cyanopterus*, using DNA barcoding[J]. *Zootaxa*, 2009, 2215: 24-36.
- [25] 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.
- [26] Kwun H J. Species identification of juvenile fishes of the genus *Pseudoblennius* using mitochondrial DNA barcoding[J]. *Mitochondrial DNA Part B*, 2018, 3(1): 405-408.
- [27] Azmir I A, Esa Y, Amin S M N, *et al*. Identification of larval fish in mangrove areas of Peninsular Malaysia using morphology and DNA barcoding methods[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2017, 33(5): 998-1006.
- [28] Hebert P D N, Ratnasingham S, De Waard J R. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2003, 270(S1): S96-S99.
- [29] 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.
- [30] Beard C B, Hamm D M, Collins F H. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects[J]. *Insect Molecular Biology*, 1993, 2(2): 103-124.

- [31] Gennis R B. Site-directed mutagenesis studies on subunit I of the *aa₃*-type cytochrome c oxidase of *Rhodobacter sphaeroides*: a brief review of progress to date[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1992, 1101(2): 184-187.
- [32] 徐春燕, 庄之栋, 马超, 等. 基于 *COI* 和 16S rRNA 基因片段鉴定厦门海域的仔稚鱼 [J]. *渔业研究*, 2021, 43(5): 451-460.
- Xu C Y, Zhuang Z D, Ma C, *et al.* Molecular identification of fish larvae and juveniles based on *COI* and 16S rRNA barcoding in Xiamen coastal areas[J]. *Journal of Fisheries Research*, 2021, 43(5): 451-460 (in Chinese).
- [33] Ardura A, Morote E, Kochzius M, *et al.* Diversity of planktonic fish larvae along a latitudinal gradient in the eastern Atlantic Ocean estimated through DNA barcodes[J]. *PeerJ*, 2016, 4: e2438.
- [34] Liu M D, Wang D Q, Gao L, *et al.* Species diversity of drifting fish eggs in the Yangtze River using molecular identification[J]. *PeerJ*, 2018, 6: e5807.
- [35] 赵盛龙, 徐汉祥, 钟俊生, 等. 浙江海洋鱼类志 [M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 2016.
- Zhao S L, Xu H X, Zhong J S, *et al.* Fauna of marine fishes in Zhejiang[M]. Hangzhou: Zhejiang Science and Technology Publishing House, 2016 (in Chinese).
- [36] 伍汉霖, 钟俊生. 中国海洋及河口鱼类系统检索 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2021.
- Wu H L, Zhong J S. Key to Marine and estuarial fishes of China[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2021 (in Chinese).
- [37] Sambrook J, Russel D W. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. 3rd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [38] Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2021, 38(7): 3022-3027.
- [39] 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.
- [40] Hebert P D N, Stoeckle M Y, Zemplak T S, *et al.* Identification of birds through DNA barcodes[J]. *PLoS Biology*, 2004, 2(10): e312.
- [41] 胡成业, 水玉跃, 杜肖, 等. 浙江苍南南部沿岸海域主要游泳动物生态位及种间联结性 [J]. *应用生态学报*, 2015, 26(10): 3195-3201.
- Hu C Y, Shui Y Y, Du X, *et al.* Niche and interspecific association of nekton in the south coastal waters of Cangnan, Zhejiang, China[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2015, 26(10): 3195-3201 (in Chinese).
- [42] 卢占晖, 苗振清, 林楠. 浙江中部近海及其邻近海域春季鱼类群落结构及其多样性 [J]. *浙江海洋学院学报(自然科学版)*, 2009, 28(1): 51-56.
- Lu Z H, Miao Z Q, Lin N. Structure and diversity fish communities in spring in the middle sea area of Zhejiang Province and adjacent region[J]. *Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science Edition)*, 2009, 28(1): 51-56 (in Chinese).
- [43] 周永东, 徐汉祥, 刘子藩. 浙江沿岸张网中主要经济幼鱼发生量与当年渔汛渔获量的关系 [J]. *海洋学研究*, 2009, 27(3): 54-60.
- Zhou Y D, Xu H X, Liu Z F. Relationship between the recruitment of major economic juvenile fishes and the catch of the same year of the Zhejiang coastal set net fishery[J]. *Journal of Marine Sciences*, 2009, 27(3): 54-60 (in Chinese).
- [44] 张静, 李渊, 宋娜, 等. 我国沿海棱鲷属鱼类的物种鉴定与系统发育 [J]. *生物多样性*, 2016, 24(8): 888-895.
- Zhang J, Li Y, Song N, *et al.* Species identification and phylogenetic relationship of *Thryssa* species in the coastal waters of China[J]. *Biodiversity Science*, 2016, 24(8): 888-895 (in Chinese).
- [45] Wang Y H, Duan J N, Shi H L, *et al.* Species identification of small fish in Xixuan Island coastal waters of Zhoushan using DNA barcoding[J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2020, 36(1): 75-84.
- [46] Xing B P, Wang C G, Wu Q, *et al.* Species identification of larval fish in Hawaiian waters using DNA barcoding[J]. *Frontiers in Marine Science*, 2022, 9: 825395.
- [47] Chen Z, Zhang Y, Han Z Q, *et al.* Morphological characters and DNA barcoding of *Syngnathus schlegelii* in the coastal waters of China[J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2018, 36(2): 537-547.
- [48] Clayton D A. Replication of animal mitochondrial DNA[J]. *Cell*, 1982, 28(4): 693-705.
- [49] Xing B P, Lin H S, Zhang Z L, *et al.* DNA barcoding for identification of fish species in the Taiwan Strait[J]. *PLoS One*, 2018, 13(6): e0198109.
- [50] 程鹏, 张爱兵, 王忠锁. 微型 DNA 条形码在鱼类识别上的应用 [J]. *首都师范大学学报(自然科学版)*, 2012,

- 33(2): 47-52.
- Cheng P, Zhang A B, Wang Z S. Mini DNA barcode utilizes in fish classification[J]. Journal of Capital Normal University (Natural Science Edition), 2012, 33(2): 47-52 (in Chinese).
- [51] 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).
- [52] 徐春燕, 沈长春, 蔡建堤, 等. 基于 CO I 基因的福建近海部分仔稚鱼 DNA 条形码分析 [J]. 中国水产科学, 2017, 24(6): 1176-1183.
- Xu C Y, Shen C C, Cai J D, *et al.* Species identification of partial fish larvae and juveniles in Fujian coastal areas based on cytochrome C oxidase subunit I barcoding[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(6): 1176-1183 (in Chinese).
- [53] Krück N C, Tibbetts I R, Ward R D, *et al.* Multi-gene barcoding to discriminate sibling species within a morphologically difficult fish genus (*Sillago*)[J]. Fisheries Research, 2013, 143: 39-46.
- [54] 王萌, 苑艺, 于海燕, 等. 中国淡水大型底栖无脊椎动物条形码数据库构建 [J]. 中国环境监测, 2022, 38(1): 36-44.
- Wang M, Yuan Y, Yu H Y, *et al.* Construction of barcode library of freshwater macroinvertebrate in China[J]. Environmental Monitoring in China, 2022, 38(1): 36-44 (in Chinese).
- [55] 俞正森, 宋娜, 本村浩之, 等. 中国银口天竺鲷属鱼类的分类厘定 [J]. 生物多样性, 2021, 29(7): 971-979.
- Yu Z S, Song N, Motomura H, *et al.* Taxonomic revision of the cardinalfish genus *Jaydia* in China[J]. Biodiversity Science, 2021, 29(7): 971-979 (in Chinese).
- [56] 梁日深, 唐丰寿, 何浩斌, 等. 西太平洋沿海石斑鱼属鱼类 DNA 条形码及分子系统进化研究 [J]. 水生生物学报, 2021, 45(4): 851-860.
- Liang R S, Tang F S, He H B, *et al.* DNA barcoding and molecular phylogenetic relationships of *Epinephelus* species from western Pacific coastal areas[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2021, 45(4): 851-860 (in Chinese).
- [57] 王梦, 杨鑫, 王维, 等. 基于 eDNA 技术的长江上游珍稀特有鱼类国家级自然保护区重庆段鱼类多样性研究 [J]. 水生生物学报, 2022, 46(1): 2-16.
- Wang M, Yang X, Wang W, *et al.* Fish diversity in Chongqing section of the national nature reserve for rare and endemic fish in the upper Yangtze River based on eDNA technology[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2022, 46(1): 2-16 (in Chinese).
- [58] Baker C C M, Bittleston L S, Sanders J G, *et al.* Dissecting host-associated communities with DNA barcodes[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2016, 371(1702): 20150328.
- [59] Littlefair J E, Clare E L. Barcoding the food chain: from sanger to high-throughput sequencing[J]. Genome, 2016, 59(11): 946-958.
- [60] Golani D, Fricke R, Tikochinski Y. *Sillago suzensis*, a new whiting from the northern Red Sea, and status of *Sillago erythraea* Cuvier (Teleostei: Sillaginidae)[J]. Journal of Natural History, 2014, 48(7-8): 413-428.
- [61] Gao T X, Ji D P, Xiao Y S, *et al.* Description and DNA barcoding of a new *Sillago* species, *Sillago sinica* (Perciformes: Sillaginidae), from coastal waters of China[J]. Zoological Studies, 2011, 50(2): 254-263.
- [62] Hebert P D N, Gregory T R. The promise of DNA barcoding for taxonomy[J]. Systematic Biology, 2005, 54(5): 852-859.

DNA barcoding identification of by-catch in juvenile anchovy (*Engraulis japonicus*) fishery along the Zhejiang coast

WANG Yiting¹, ZHU Wenbin², ZHANG Yazhou², WANG Yehui³, JIA Chenghao⁴,
CHEN Zhi⁵, GAO Tianxiang^{1*}

(1. School of Fishery, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;

2. Zhejiang Marine Fisheries Research Institute, Zhoushan 316021, China;

3. Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

4. College of Ecology and Environment, Hainan University, Haikou 570228, China;

5. College of Fisheries and Life Science, Hainan Tropical Ocean University, Sanya 572022, China)

Abstract: The coast of Zhejiang has the most extensive fishing grounds in China and is rich in fish resources. Juvenile *Engraulis japonicus* is one of the key fish species in the area. However, due to over fishing and other human factors, which resources are less than they used to be. The Ministry of Agriculture and Rural Affairs approved juvenile *E. japonicus* fishery along the coast of Zhejiang in 2018 to achieve a sustainable harvest of this species juvenile. Meanwhile, there were no studies report using DNA barcoding to identify species of the fishery presently. To comprehensively understand the bycatch species of juvenile anchovy fishery and investigate the effectiveness of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (*CO I*) gene in the identification of fish, this study adopted the method of DNA barcode-assisted morphological classification, taking 192 juvenile fishes from the by-catch of juvenile *E. japonicus* fishery. Finally, we identified 48 species, belonging to 46 genera of 2 classes 11 orders 36 families, of which 46 species were identified to the level of species, 2 to the level of genera, and 11 species of morphology misidentifies were successfully identified. The average length of 152 *CO I* sequences was 654 bp (634-656 bp), and conserved sites accounted for 47.21%, informative sites accounted for 45.25% and variable sites accounted for 51.89%. The content of C+G (47.66%) was significantly lower than that of A+T (52.34%), showing at AT bias, and the highest AT content was found at the site 3. The average interspecific genetic distance (0.252 3) was 74 times higher than the average intraspecific genetic distance (0.003 4). The largest genetic distance between genera was between *Salanx* and *Pampus* (0.339 5), and the smallest was between *Trachurus* and *Alectis* (0.119 7). The largest genetic distance between the families was between Salangidae and Stromateidae (0.339 5), and the smallest was between Atherinidae and Carangidae (0.192 1). The largest genetic distance was between Perciformes and Osmeriformes (0.276 2), and the smallest was between Scorpaeniformes and Atheriniformes (0.212 2). The ABGD analysis resulted in 48 OTUs, consistent with the morphological classification. The phylogenetic tree was constructed based on *CO I* gene, and individuals of the same species could be clustered in the same branch. The species could be effectively distinguished, but the clustering relationships at the family and order levels were not clear. The DNA barcoding identification results were basically consistent with the morphological identification results. The above results indicated that DNA barcoding could be used as an effective method of identification of juvenile *E. japonicus* fishery in Zhejiang coast, which made up for the limitations and shortcomings of traditional morphological identification methods. The findings of this study can lay the foundation for the study of fish diversity and spawning migration along the Zhejiang coast, as well as provide a scientific basis for the sustainable development and utilization of juvenile *Engraulis japonicus* fishery.

Key words: *Engraulis japonicus*; juvenile; DNA barcoding; by-catch; mitochondrial *CO I* gene

Corresponding author: GAO Tianxiang. E-mail: gaotianxiang0611@163.com

Funding projects: Key Research & Development Project of Zhejiang Province (2021C2047); National Natural Science Foundation of China (41776171); Ministry of Agriculture and Rural Affairs "Research on Key Technology and System Exploration of Limit Fishing" ([2017]36)