

文章编号: 1674-5566(2018)01-0001-07

DOI:10.12024/jsou.20170301981

基于 DNA 条形码的如东海域浒苔附着鱼卵的物种鉴定

陈月华^{1,2,3}, 何培民^{1,2,3}, 杨金权^{1,2,3}

(1. 海洋动物系统分类与进化上海高校重点实验室, 上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306; 3. 上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心, 上海 201306)

摘要: 为了探明如东海域浒苔藻团中附着的大量鱼卵的产卵鱼种, 利用 DNA 条形码技术对其进行了物种鉴定。鉴定结果表明: 鱼卵、仔鱼、成鱼与沙氏下鱚鱼 (*Hyporhamphus sajori*) COI 基因片段序列之间无变异位点出现, 遗传距离为 0, 而其他颌针鱼目鱼类序列间差异达 10.83% ~ 20.94%, 遗传距离在 21.9% ~ 26.4% 之间; NJ 分子系统发育分析显示鱼卵、仔鱼、成鱼与沙氏下鱚鱼聚为单系群。因此, 确定该海域浒苔藻团中产卵鱼类为沙氏下鱚鱼。在此基础上探讨了浒苔藻团附着大量黏性鱼卵现象的原因及其对近海鱼类资源恢复的启示。

关键词: DNA 条形码; 沙氏下鱚鱼; 浒苔; 物种鉴定

中图分类号: S 917 **文献标志码:** A

从 20 世纪 70 年代开始, 我国近海生态系统的结构与功能发生着显著的变化, 并影响到其生态服务功能^[1-2]。相关调查研究显示: 自 20 世纪 80 年代以来, 随着人类活动加剧和生态环境恶化, 尤其近年来, 大规模围填海工程、污染物入海等高强度人类活动致使近海生态环境急剧恶化, 水体富营养化程度加剧也使得赤潮、绿潮频繁暴发^[3-4]。赤潮、绿潮频繁暴发改变了海洋原有生态环境, 造成了生态系统紊乱, 已经产生了诸如鱼类栖息地减少、碎片化或消失, 湿地功能退化, 仔鱼分散输运动力学基础剧烈变动, 饵料基础失衡, 产卵场和育幼场环境污染严重与质量退化^[5-7]等问题, 影响了近海鱼类种群的繁殖发育, 造成近海鱼类资源衰退, 鱼类种类和数量呈现显著下降趋势, 鱼类多样性也大幅下降。

由浒苔导致的绿潮主要发生在河口、内湾、泻湖以及城市密集、富营养化程度相对严重的海域, 经常是多年连续暴发。根据海水污染的成分分析, 海水富营养化是我国近海浒苔绿潮暴发的主要原因^[8-10]。自 2009 年在江苏如东县沿岸堤坝和紫菜养殖筏架上发现浒苔绿藻以来, 该地区

连续 6 年暴发了不同程度和规模的绿潮^[11-12], 为了降低浒苔绿潮给该海域环境带来的危害, 当地采用了人工打捞的方式对该海域的浒苔藻类进行打捞。一般认为, 暴发绿潮的生态环境并不适合鱼类生存和大量产卵繁殖。然而, 2015 年 5 月初在该地收割浒苔的过程中, 我们发现了浒苔上附着了大量的黏性鱼卵, 这一不寻常的现象值得关注。究竟是一种还是多种鱼类在该环境下产卵繁殖? 该现象对我国近海鱼类资源恢复有何启示?

DNA 条形码是利用标准的 DNA 片段对物种进行快速鉴定的技术, 线粒体 DNA 的 COI 基因片段拥有长度适宜、进化速率慢及富含系统发育信息等特点, 且大多数鱼类的 COI 基因能被通用引物所扩增, 因此, 通常选择 COI 基因作为条形码进行鱼类物种鉴定^[13-14]。本研究中, 首先采用 DNA 条形码作为分子标记, 对如东海域浒苔中所获鱼卵及成鱼尸体进行遗传学分析, 鉴定浒苔中产卵鱼类有哪些种类; 其次, 浅要探讨该现象对近海鱼类资源的启示。

收稿日期: 2017-03-15 修回日期: 2017-10-11

基金项目: 国家自然科学基金(31172066)

作者简介: 陈月华 (1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为鱼类分子系统发育地理学。E-mail: yuehua0312@sina.com

通信作者: 杨金权, E-mail: jqyang@shou.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料

2015年5月27日于江苏如东海域(121°42'N, 32°32'E)采集鱼卵及成鱼。鱼卵是在该海域浒苔暴发范围内随机取自流刺网起网时带到船甲板的海藻团中,其数量极大,鱼卵之间通过韧性强的卵膜丝相互黏连,并缠绕在海藻上进行发育(图1),在海藻团中还发现数条已经腐烂无法辨认的鱼类尸体以及两尾可辨认形态特征的成鱼尸体。

将两尾成鱼尸体(酒精保存)和该海域随机选取的附着大量鱼卵的海藻团编号后带回实验室,取两尾成鱼背鳍下肌肉组织分别放入离心管中用95%酒精固定;同时将附着在海藻团上的卵块小心剥离,在每个编号藻团中随机取出一部分鱼卵用95%酒精固定;由于从鱼卵中提取DNA可能质量不高,再将各剩余附着鱼卵的海藻团分别放入鱼缸中孵化(模拟该时间如东近海的盐度和温度,设置孵化条件盐度为25~30,温度为20~24℃)。经过一周左右鱼卵先后孵化出来,将先期孵化出来的仔鱼分缸投喂饵料饲养,但是一周内皆相继死亡,因此在每个编号鱼缸随机选取一部分仔鱼用95%酒精固定,以便后续进行DNA提取。

1.2 DNA提取

两尾成鱼经鉴定为沙氏下鱚鱼(*Hyporhamphus sajori*),用前期已取的背鳍下肌肉组织,并与上述95%酒精固定的鱼卵、仔鱼中随机挑取的20粒鱼卵和20尾仔鱼,采用标准酚/氯仿法提取全基因组DNA,置于-20℃冰箱备用。

1.3 引物设计、PCR和序列测定

本实验选用的标记基因为COI基因片段,用于扩增COI基因片段序列的1对引物F: 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3', R: 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3'^[15]。PCR反应体系25 mL,包括PCR Master Mix 12.5 μL(含MgCl₂、dNTP Mix和Taq酶)、上下游引物各1.0 μL(55 ng/μL)、DNA样品1.0 μL,用ddH₂O补足25 μL。反应程序:94℃预变性4 min,扩增35个循环(94℃变性30 s,58℃退火45 s,72℃延伸1 min),最后72℃延伸10 min。PCR产物用1%琼脂糖电泳检测样品扩增情况,将扩增出目标片段长度PCR产物送至上海生物工程公司

纯化和测序。

1.4 数据分析

用DNA Baser对生物公司的测序结果进行拼接、比对、人工校正,然后将序列输入GenBank中进行BLAST搜索,寻找同源序列。

将本研究获得的序列以及从GenBank中下载的同源序列,用MEGA6软件分析基因片段序列的变异位点^[16];序列之间的遗传距离用Kimura双参数模型进行估算,系统进化分析采用Neighbor-joining(NJ)法,置信度估算采用Kimura双参数模型,重复数为1 000次。

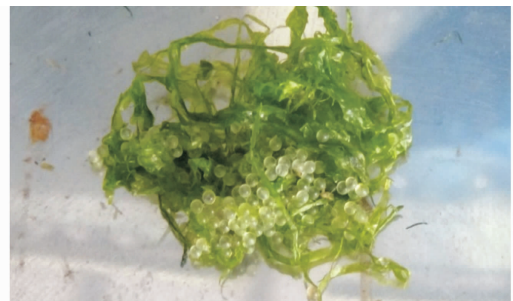


图1 藻团中的鱼卵

Fig. 1 The eggs in the algae

2 结果

用DNA Baser软件包将PCR扩增测序后获得的20条仔鱼和20个鱼卵序列进行拼接、比对后发现各序列之间碱基并无差异,故在鱼卵、仔鱼序列中分别选取1条序列和GenBank中经BLAST搜索后下载得到8条颌针鱼目的高相似度同源序列以及两尾成鱼序列用DNASTAR软件包进行拼接、比对后得到分析用12条554 bp的同源序列(表1)。

2.1 COI基因片段序列之间的遗传距离

从采用Kimura双参数模型估算的鱼卵、仔鱼、成鱼与颌针鱼目鱼类基因片段序列间的遗传距离(表2)可以看出:鱼卵、仔鱼、成鱼与沙氏下鱚鱼(*H. sajori*)基因片段序列之间没有出现核苷酸替代(Nucleotide substitution),其遗传距离为0;鱼卵、仔鱼、成鱼与间下鱚鱼(*H. intermedius*)、台湾原尾颌针鱼(*Strongylura leiura*)、大西洋颌针鱼(*S. marina*)基因片段序列之间的遗传距离分别为11.9%~12.1%、24.9%~25.2%、24.7%~25.0%。

表 1 基于 COI 基因片段序列分析的材料标号、拉丁名、中文名、样品来源
 Tab.1 List of the partial sequences of COI gene with sample ID, species,
 Chinese name and origin of samples

样本编号 Sample ID	种名 Species	中文名 Chinese name	样品来源 Origin of samples
Hys1	<i>Hyporhamphus sajori</i>	沙氏下鱚鱼	AB370892.1
Hys2	<i>Hyporhamphus sajori</i>	沙氏下鱚鱼	JF952763.1
Hyi1	<i>Hyporhamphus intermediu</i>	间下鱚鱼	NC_026467.1
Hyi2	<i>Hyporhamphus intermediu</i>	间下鱚鱼	KP260625.1
Stl1	<i>Strongylura leiura</i>	台湾原尾颌针鱼	EF607567.1
Stl2	<i>Strongylura leiura</i>	台湾原尾颌针鱼	EF607566.1
Stm1	<i>Strongylura marina</i>	大西洋颌针鱼	JQ843081.1
Stm2	<i>Strongylura marina</i>	大西洋颌针鱼	JQ841017.1
egg	*	*	本研究
lar	*	*	本研究
adu1	<i>Hyporhamphus sajori</i>	沙氏下鱚鱼	本研究
adu2	<i>Hyporhamphus sajori</i>	沙氏下鱚鱼	本研究

注: * 表示未知

Notes: * Asterisks indicate for unknown

2.2 COI 基因片段序列的聚类分析结果

用 Kimura 双参数模型构建鱼卵、仔鱼、成鱼与颌针鱼目鱼类 COI 基因片段序列 NJ 分子系统树(图 2)。节点处的数字为 1 000 次 Bootstrap 统计分析后的自引导值,表示对该支的支持百分比。NJ 分子系统树明显聚为两大支:大西洋颌针

鱼(*S. marina*)、台湾原尾颌针鱼(*S. leiura*)聚为一支,支持率为 100%,另一支为本实验的鱼卵、仔鱼与两条成鱼样本以及来自 GenBank 的沙氏下鱚鱼(*H. sajori*)组成的单系群,并与间下鱚鱼(*H. intermedius*)互为姐妹群,支持率为 100%。

表 2 鱼卵、仔鱼、成鱼与颌针鱼目鱼类 COI 基因片段序列 Kimura 双参数遗传距离
 Tab.2 The Kimura 2-parameter genetic distances of COI gene among fish eggs, larvae,
 adults and other species of Beloniformes %

材料标号 Sample ID	Hys1	Hys2	Hyi1	Hyi2	Stl1	Stl2	Stm1	Stm2	egg	lar	adu1	adu2
Hys1												
Hys2	0.000											
Hyi1	0.119	0.119										
Hyi2	0.121	0.121	0.002									
Stl1	0.252	0.252	0.239	0.236								
Stl2	0.249	0.249	0.244	0.241	0.005							
Stm1	0.247	0.247	0.238	0.238	0.188	0.188						
Stm2	0.250	0.250	0.240	0.240	0.186	0.186	0.002					
egg	0.000	0.000	0.119	0.121	0.252	0.249	0.247	0.250				
lar	0.000	0.000	0.119	0.121	0.252	0.249	0.247	0.250	0.000			
adu1	0.000	0.000	0.119	0.121	0.252	0.249	0.247	0.250	0.000	0.000		
adu2	0.000	0.000	0.119	0.121	0.252	0.249	0.247	0.250	0.000	0.000	0.000	

3 讨论

3.1 浒苔中产卵鱼种类

尽管实验前已经鉴定出浒苔藻团中的成鱼尸体为沙氏下鱚鱼,但是,并不能确定其就是产卵鱼类,也不能确定产卵鱼类究竟有多少种类。

用鱼卵甚至孵化出的仔稚鱼直接进行物种鉴定也很难鉴定到具体种。因此,在本研究中选用了 mtDNA 基因组中的 COI 基因作为物种鉴定的分子标记。COI 基因是鱼类 mtDNA 13 个蛋白质编码基因之一,中度保守,既能保证足够的变异又足够保守,且很少存在插入与缺失,可用于种间

及种以上阶元的遗传学分析。随机取样获得的 554 bp COI 基因片段的同源序列比对结果表明: 鱼卵、仔鱼、成鱼与 GenBank 中的沙氏下鱚鱼(*H. sajori*) 基因片段序列之间无变异位点出现, 用 Kimura 双参数法计算遗传距离为 0, 而与其他颌针鱼目鱼类序列间的遗传距离在 11.9% ~ 25.2% 之间(表 2)。据其他一些动物的 COI 基因序列分析的结果, 种内个体间的平均遗传距离一般在 0 ~ 4.06% 之间, 差异超过 6% 的个体已有明显的亚种或种的分化, 10% 以上时就具有种的差异^[17-18]。通过 Kimura 双参数模型构建的 NJ 分子系统发生树聚类结果也显示鱼卵、仔鱼、成鱼与沙氏下鱚鱼(*H. sajori*) 聚为单系群, 与其他颌针鱼目鱼类亲缘关系较远(图 2)。综合分析确定该海域浒苔藻团中产卵鱼类只有沙氏下鱚鱼(*H. sajori*) 一个种。

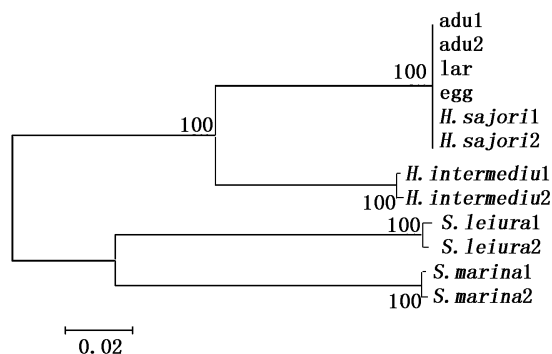


图 2 基于 Kimura 双参数法构建的鱼卵、仔鱼、成鱼与颌针鱼目鱼类 COI 基因片段序列 NJ 分子系统发育树

Fig. 2 Neighbor-joining phylogenetic tree of fish eggs, larvae, adults and other species of Beloniformes based on the COI gene sequences with Kimura 2-parameter

节点处数值为 1 000 次重复运算的支持率

Numbers at the nodes are percent recovery in bootstrap analysis with 1 000 replicates

3.2 浒苔中鱼类产卵繁殖的原因及意义

鱼类繁殖包括亲鱼性腺发育、成熟、产卵、精卵结合孵出仔鱼^[29]。鱼类繁殖所需要的生态条件和鱼类性腺发育成熟、产卵、卵的特性、受精和初孵仔鱼发育所要求的条件是一致的。产黏性卵的鱼类性腺发育成熟需要充足的溶氧, 产卵需要适当的水流速度刺激, 但流速不宜过大, 流速过大会影响黏着沉性鱼卵的受精和附着, 同时鱼类繁殖也需要优良的水质条件和充足的饵料^[19-21]。

如东近岸海域大面积养殖条斑紫菜(*Pyropia yezoensis*), 养殖筏架成为浒苔微观繁殖体附着和快速生长的温床^[22-23]。在每年 3—4 月紫菜收割阶段, 大量的浒苔藻体从紫菜养殖筏架和苗绳上脱落, 成为早期漂浮浒苔的主要来源之一。近年来近岸海域水质富营养化程度很高, 为浒苔绿潮最初形成和快速生长提供了物质基础。浒苔绿潮一般在紫菜收割结束后四、五月份开始繁殖形成规模, 一直持续到 8 月份。

一般认为由浒苔导致的绿潮会对海洋生态环境造成负面影响, 影响近海鱼类种群的繁殖发育, 导致近海鱼类资源衰退。但是, 近年的一些研究发现, 在繁殖初期(4 月下旬至 6 月中下旬), 浒苔生长区水质会得到一定的改善, 浒苔光合作用产生的氧气会增加水中溶氧, 有浒苔等水生植物的地方不乏浮游动物存在, 且水流舒缓^[24-26]。沙氏下鱚鱼亲鱼在溶氧充足水质良好的环境中性腺发育成熟, 并且由适当的流速刺激产卵(产卵时间通常是 5 月中旬至 6 月中下旬), 这也很好地解释了开篇提到的在浒苔藻团中附着大量黏性鱼卵的现象。沙氏下鱚鱼鱼卵为黏着性卵^[27], 在水清舒缓的环境中完成受精, 黏着性的受精卵黏附在浒苔上生长发育, 水质清澈, 水流缓慢为受精卵提供了一个良好的生长发育环境, 大量浮游动物的存在, 为仔鱼的生长发育提供了丰富的饵料。通过本研究推断如东地区浒苔繁殖的前中期可以为某些产黏性卵鱼类(如沙氏下鱚鱼)的繁殖发育提供有利条件。众所周知, 近海鱼类资源衰退的主要原因之一是产卵育幼场的退化。因此, 可以尝试选择一些近岸海域水体被污染的区域, 人工种植一些附着可控的藻类或者沉水植物, 附着藻类和沉水植物是重要的初级生产者, 为浮游动物提供食物来源, 这样就可以为鱼类提供充足的饵料; 沉水植物和附着藻类光合作用产生氧气可以提高水体中溶氧量, 为鱼类性腺发育成熟提供了足够的溶解氧; 沉水植物和附着藻类对水体中的营养盐和重金属元素有很强的吸附作用, 从而起到净化水质的效果; 附着藻类和沉水植物能够改变水流速度刺激鱼类产卵受精; 沉水植物和附着藻类又能为产黏着性卵的鱼类如扁颌针鱼(*Ablennes anastomella*)、燕鲷鱼(*Cypselurus ago*)等提供附着载体, 形成天然有利的产卵育幼场^[28-32]。综上所述, 人工种植附着

藻类或者沉水植物对产卵育幼场的恢复具有重要意义,或许能为我国近海鱼类资源恢复提供一个新思路。

参考文献:

- [1] 吴在兴. 我国典型海域富营养化特征、评价方法及其应用[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2013.
- WU Z X. The eutrophication characteristics of typical Chinese coastal areas and applications of an integrated methodology for eutrophication assessment in these areas [D]. Qingdao: Graduate University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology), 2013.
- [2] 厉丞烜, 张朝晖, 陈力群, 等. 我国海洋生态环境状况综合分析[J]. 海洋开发与管理, 2014, 31(3): 87-95.
- LI C H, ZHANG C H, CHEN L Q, et al. A comprehensive analysis of the marine ecological environment in China[J]. Ocean Development and Management, 2014, 31(3): 87-95.
- [3] 吴青, 张建恒, 赵升, 等. 黄海绿潮漂浮浒苔对高光强胁迫生态适应机制研究[J]. 上海海洋大学学报, 2016, 25(1): 97-105.
- WU Q, ZHANG J H, ZHAO S, et al. An adjustment mechanism to high light intensity for free-floating *Ulva* in the Yellow Sea [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2016, 25(1): 97-105.
- [4] 张林慧, 张建恒, 赵升, 等. 2014 年青岛海域消亡漂浮浒苔生理特征研究[J]. 上海海洋大学学报, 2016, 25(4): 591-598.
- ZHANG L H, ZHANG J H, ZHAO S, et al. Physiological characteristics of the floating *Ulva* macroalgae along Qingdao coast in 2014 [J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2016, 25(4): 591-598.
- [5] 程芳晋. 长江口邻近海域典型站位的沉积记录及其对富营养化演变的指示意义[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2012.
- CHENG F J. Historical sedimentary records in typical stations in Changjiang (Yangtze) River estuary and its adjacent East China Sea and their indications of eutrophication [D]. Qingdao: Graduate University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology), 2012.
- [6] 王大海. 海水养殖业发展规模经济及规模效率研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2014.
- WANG D H. A study on the problems and countermeasures of scale economy of marine aquaculture in China [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2014.
- [7] 刘青. 黄海绿潮浒苔与浮游植物间的相互作用研究[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2015.
- LIU Q. The interactions study between bloom-forming *Ulva* *prolifera* and phytoplankton in the Yellow Sea [D]. Qingdao: Graduate University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology), 2015.
- [8] 唐启升, 张晓雯, 叶乃好, 等. 绿潮研究现状与问题[J]. 中国科学基金, 2010(1): 5-9.
- TANG Q S, ZHANG X W, YE N H, et al. Review on the research progress on marine green tide [J]. Bulletin of National Natural Science Foundation of China, 2010(1): 5-9.
- [9] 刘峰, 逢少军. 黄海浒苔绿潮及其溯源研究进展[J]. 海洋科学进展, 2012, 30(3): 441-449.
- LIU F, PANG S J. Research advances on green tides in the Yellow Sea [J]. Advances in Marine Science, 2012, 30(3): 441-449.
- [10] 丁月旻. 黄海浒苔绿潮中生源要素的迁移转化及对生态环境的影响[D]. 青岛: 中国科学院研究生院(海洋研究所), 2014.
- DING Y M. Impacts of *Ulva* (*Enteromorpha*) *prolifera* in the green tide on the Yellow Sea ecological environment-implications from migration and transformation of biogenic elements [D]. Qingdao: Graduate University of Chinese Academy of Sciences (Institute of Oceanology), 2014.
- [11] 田晓玲, 霍元子, 陈丽平, 等. 江苏如东近海绿潮藻分子检测与类群演替分析[J]. 科学通报, 2011, 56(4/5): 309-317.
- TIAN X L, HUO Y Z, CHEN L P, et al. Molecular detection and analysis of green seaweeds from Rudong coasts in Jiangsu Province [J]. Chinese Science Bulletin, 2011, 56(4/5): 309-317.
- [12] 张建恒, 陈丽平, 霍元子, 等. 我国江苏如东岸基绿潮藻分布特征[J]. 海洋环境科学, 2013, 32(1): 1-5.
- ZHANG J H, CHEN L P, HUO Y Z, et al. Distributing characteristics of green tide algae growing on settled sediment in Rudong coastal area [J]. Marine Environmental Science, 2013, 32(1): 1-5.
- [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 of B: Biological Sciences, 2005, 360(1462): 1847-1857.
- [14] WITT J D S, THRELOFF D L, HEBERT P D N. DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: implications for desert spring conservation [J]. Molecular Ecology, 2006, 15(10): 3073-3082.
- [15] 柳淑芳, 陈亮亮, 戴芳群, 等. 基于线粒体 COI 基因的 DNA 条形码在石首鱼科(Sciaenidae)鱼类系统分类中的应用[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(2): 223-232.
- LIU S F, CHEN L L, DAI F Q, et al. Application of DNA barcoding gene COI for classifying family Sciaenidae [J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2010, 41(2): 223-232.
- [16] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5(2): 150-163.
- [17] 邢炳鹏, 林汝榕, 王彦国, 等. 基于 COI 基因的厦门海域

- 鱼类 DNA 条形码鉴定[J]. 应用海洋学学报, 2016, 35(1): 144-150.
- XING B P, LIN R R, WANG Y G, et al. Species identification for fishes in Xiamen sea waters based on COI barcoding[J]. Journal of Applied Oceanography, 2016, 35(1): 144-150.
- [18] 张馨月, 刘岩, 张秀梅, 等. 基于 COI 基因的西南大西洋部分经济鱼类 DNA 条形码鉴定[J]. 水生生物学报, 2014, 38(6): 1161-1167.
- ZHANG X Y, LIU Y, ZHANG X M, et al. Species identification of some commercial fishes in southwest Atlantic based on COI barcoding[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(6): 1161-1167.
- [19] MOIR H J, SOULSBY C, YOUNGSON A. Hydraulic and sedimentary characteristics of habitat utilized by Atlantic salmon for spawning in the Girnock Burn, Scotland[J]. Fisheries Management and Ecology, 1998, 5(3): 241-254.
- [20] CROWDER D W, DIPLAS P. Vorticity and circulation: spatial metrics for evaluating flow complexity in stream habitats[J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2002, 59(4): 633-645.
- [21] CROWDER D W, DIPLAS P. Evaluating spatially explicit metrics of stream energy gradients using hydrodynamic model simulations[J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2000, 57(7): 1497-1507.
- [22] 朱莹. 紫菜养殖筏架固着绿藻的清除方法研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.
- ZHU Y. Studies on the methods of removing attached *Ulva*. L green algae from *Pyropia* rafts [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014.
- [23] 韩红宾, 华梁, 霍元子, 等. 黄海绿潮暴发前江苏紫菜养殖海域绿藻显微繁殖体分布特征[J]. 上海海洋大学学报, 2015, 24(3): 365-374.
- HAN H B, HUA L, HUO Y Z, et al. The distribution features of *Ulva* microscopic propagules in Jiangsu *Porphyra* aquaculture regions before the outbreak of the green tides in Yellow Sea[J]. Journal of Shanghai Ocean University, 2015, 24(3): 365-374.
- [24] YOKONO M, TAKABAYASHI A, AKIMOTO S, et al. A megacomplex composed of both photosystem reaction centres in higher plants [J]. Nature Communications, 2015, 6: 6675.
- [25] WANG H, LIN A P, GU W H, et al. The sporulation of the green alga *Ulva prolifera* controlled by changes in photosynthetic electron transport chain [J]. Scientific Reports, 2016, 6: 24923.
- [26] YAMORI W, SHIKANAI T. Physiological functions of cyclic electron transport around photosystem I in sustaining photosynthesis and plant growth[J]. Annual Review of Plant Biology, 2016, 67: 81-106.
- [27] 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研究[J]. 水产学报, 2008, 32(3): 342-352.
- 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.
- [28] 李琳琳, 汤祥明, 高光, 等. 沉水植物生态修复对西湖细菌多样性及群落结构的影响[J]. 湖泊科学, 2013, 25(2): 188-198.
- LI L L, TANG X M, GAO G, et al. Influence of submerged vegetation restoration on bacterial diversity and community composition in West Lake [J]. Journal of Lake Science, 2013, 25(2): 188-198.
- [29] 任文君, 田在锋, 宁国辉, 等. 4 种沉水植物对白洋淀富营养化水体净化效果的研究[J]. 生态环境学报, 2011, 20(2): 345-352.
- REN W J, TIAN Z F, NING G H, et al. Purification efficiency of four species submerged macrophytes for the eutrophic water in Baiyangdian Lake [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2011, 20(2): 345-352.
- [30] 姚洁. 罗非鱼、附着藻类与沉水植物苦草关系的研究[D]. 广州: 暨南大学, 2010.
- YAO J. Study on the relationships among tilapia, periphyton and submerged macrophyte *Vallisneria spiralis* [D]. Guangzhou: Jinan University, 2010.
- [31] 马文华. 螺类对附着藻类的摄食生态研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2014.
- MA W H. The feeding ecology of snails on benthic algae [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2014.
- [32] 刘玉超. 罗非鱼-附着藻-沉水植物相互关系研究进展[J]. 生态环境学报, 2010, 19(10): 2511-2514.
- LIU Y C. Relationship among tilapia, periphyton and submerged macrophyte: a review [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2010, 19(10): 2511-2514.

Molecular identification of fish eggs in Enteromorpha of Rudong sea area based on DNA barcode

CHEN Yuehua^{1,2,3}, HE Peimin^{1,2,3}, YANG Jinqun^{1,2,3}

(1. Shanghai Universities Key Laboratory of Marine Animal Taxonomy and Evolution, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: To identify the fish eggs which were obtained from Enteromorpha algae of Rudong sea area, DNA barcoding technique was used. Our result showed there were no variable sites in mtDNA COI gene sequences among our fish eggs, larvae, adults and Japanese halfbeak (*Hyporhamphus sajori*), and the genetic distance among them was 0. However, there are high variable sites among the eggs, larvae, adults and the other Beloniformes fishes, and the genetic distance among them is 21.9% – 26.4%. The Neighbor-joining (NJ) phylogenetic tree also indicated that the eggs, larvae, adults and the Japanese halfbeak formed a monophyletic group. Therefore, it is suggested that the fish eggs which we obtained from Enteromorpha algae of Rudong sea area were *Hyporhamphus sajori*. Based on our identification result, we further discussed the reasons of Japanese halfbeak spawning in algae and how to use this phenomenon to recover the offshore fish resources.

Key words: DNA barcode; *Hyporhamphus sajori*; Enteromorpha; species identification