

基于宏条形码技术的南海亮眶灯鱼食性初步分析

陈晓雷^{1,2,3}, 李敏^{1,3}, 陈作志^{1,3}, 张俊^{1,3}, 张帅¹, 齐占会^{1,3}, 徐姗楠^{1,3}

1. 中国水产科学研究院南海水产研究所/农业农村部北海渔业可持续利用重点实验室/广东省渔业生态环境重点实验室, 广东广州 510300
2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306
3. 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州), 广东广州 511458

摘要: 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。以南海亮眶灯鱼 (*Diaphus splendidus*) 为研究对象, 提取其胃含物DNA, 选用线粒体基因细胞色素C氧化酶亚基I (Mitochondrial cytochrome oxidase subunit I, COI) 作为分子标记进行扩增, 通过高通量测序鉴定其食物组成。结果显示, 亮眶灯鱼胃含物中共鉴定出饵料生物34种, 隶属于5门7纲11目18科29属。亮眶灯鱼食物组成包括介形类、桡足类、端足类、鱼类、水母类、磷虾类、翼足类和多毛类。其中介形类、桡足类和端足类是其食物组成中的优势类群, 这些优势类群与形态学鉴定方法的结果基本一致, 此外还检测出形态学方法未鉴定到的水母这一食物类群。研究表明宏条形码技术适用于南海亮眶灯鱼的食性分析, 且比基于形态学的食性分析具有更高的鉴别潜力。

关键词: 灯笼鱼; 亮眶灯鱼; 食性; 宏条形码; 胃含物; 南海

中图分类号: S 932.4

文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Preliminary metabacording dietary analysis of *Diaphus splendidus* in South China Sea

CHEN Xiaolei^{1,2,3}, LI Min^{1,3}, CHEN Zuozhi^{1,3}, ZHANG Jun^{1,3}, ZHANG Shuai¹, QI Zhanhui^{1,3}, XU Shannan^{1,3}

1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences/Key Laboratory for Sustainable Utilization of Open-Sea Fishery, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Guangdong Provincial Key Laboratory of Fishery Ecology and Environment, Guangzhou 510300, China
2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China
3. Southern Marine Science and Engineering Guangdong Laboratory (Guangzhou), Guangzhou 511458, China

Abstract: Dietary analysis of fish is an important part of fish biology and ecology as well as the basis of fishery resources development. In this study, the gastric DNA of *Diaphus splendidus* was extracted, and the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (COI) was amplified as a molecular marker. The food composition was identified by high-throughput sequencing. The results show that a total of 34 species belonged to 5 phyla, 7 classes, 11 orders, 18 families and 29 genera. The diet of *D. splendidus* mainly included Ostracoda, Copepoda, Amphipoda, Fish, Jellyfish, Euphausiacea, Gastropod and Polychaeta. Ostracoda, Copepoda and Amphipoda were the dominant groups in its food composition, which is basically consistent with the previous re-

收稿日期: 2021-07-19; 修回日期: 2021-09-22

基金项目: 广东省基础与应用基础研究重大项目(2019B030302004-05); 南方海洋科学与工程广东省实验室(广州)人才团队引进重大专项(GML2019ZD0605); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费资助(2020TD16); 中国水产科学研究院南海水产研究所中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金资助(2021SD04)

作者简介: 陈晓雷(1995—), 男, 硕士研究生, 研究方向为水生生物学。E-mail: 1458681743@qq.com

通信作者: 徐姗楠(1979—), 女, 研究员, 博士, 从事海洋生物学研究。E-mail: xushannan@scsfri.ac.cn

search based on traditional morphological identification, except for jellyfish that was identified only by this study. In conclusion, DNA metabarcoding method is suitable for the food analysis of *D. splendidus* in the South China Sea, and has higher identification potential than the food analysis based on morphology.

Keywords: Myctophidae; *Diaphus splendidus*; Dietary habits; Metabarcoding; Stomach content; South China Sea

灯笼鱼是栖息于中层海域(200~1 000 m)的小型游泳鱼类,广泛分布于全球各大洋开阔海域,是中层鱼的主要生物类群,其资源量巨大,约占全球深海中层鱼类生物量的65%^[1]。灯笼鱼在摄食浮游生物的同时又被更高营养级生物(如大中型鱼类)所捕食,在海洋食物网的能量流动和转换中发挥着重要作用^[2]。

亮眶灯鱼(*Diaphus splendidus*)隶属于灯笼鱼科、眶灯鱼属,是灯笼鱼的主要优势种之一。食性研究是鱼类生物学和生态学研究的重要内容,是了解不同鱼类间营养关系的基础,同时也是探讨摄食策略、评估鱼类生存状况和生态系统功能的重要依据^[3]。目前,国外对灯笼鱼食性研究的相关报道按照区域划分有太平洋^[4-6]、大西洋^[7-8]、印度洋^[9]、阿拉伯海^[10]及南大洋^[11-12]等。国内对灯笼鱼摄食方面的研究也有陆续报道,如东海和黄海海域的七星底灯鱼(*Benthoosema pterotum*)^[13],南海海域的金鼻眶灯鱼(*D. chrysorhynchus*)^[14]、瓦氏眶灯鱼(*D. watasei*)^[15]等。已有研究显示,灯笼鱼的食物组成主要以桡足类、介形类、端足类、磷虾类、翼足类、毛颌类等浮游动物为主,也有少量的头足类和鱼类幼体及其卵,采用的研究方法多为形态学鉴定。胃含物形态学鉴定虽然操作简单,但针对消化程度较高、腐烂程度较严重的胃含物则难以鉴定甚至无法鉴定^[16-17],从而可能低估了食物多样性,不适于个体较小生物的食性分析^[18],且工作量大,对鉴定人员专业技术能力要求高^[17]。

宏条形码技术结合DNA条形码和高通量测序技术,将样本中所有生物作为一个整体提取DNA,使用通用引物进行PCR扩增,对扩增产物进行高通量测序后得到的可操作分类单元(Operational taxonomic units, OTU)进行物种鉴定^[19],具有信息量大、灵敏度高、成效快、成本低等优势,在生物食性研究的应用上越来越广泛^[20]。近年来,该技术已应用于鱼类、翼足类和水母等海洋生物的摄食多样性研究^[21-24],弥补了形态学鉴定方法在鉴别消化程度较高、腐烂程度较严重的胃含物方面的

不足。

目前,尚未有使用宏条形码技术研究南海灯笼鱼食性的报道。本研究选取南海亮眶灯鱼为研究对象,运用宏条形码技术分析其食性组成,探讨宏条形码技术在灯笼鱼食性研究中的可行性,为今后南海灯笼鱼食性研究提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 样品采集

亮眶灯鱼样本由中国水产科学研究院南海水产研究所“南锋”号调查船于2020年7月在南海(110°22.603'E, 16°46.704'N—110°25.950'E, 16°44.952'N)进行中层鱼类拖网中采集。该船总长66.66 m,船宽12.40 m,总吨位1 537 GT,满载排水量1 980 t,主机功率1 920 kW,副机功率450 kW×2。采样点位置水深为1 350 m,使用中层网(主尺度为136.10 m×50.85 m,网囊网目尺寸为10 mm)于500 m水深平行拖网1 h,拖速为3.1 kn。采集的样品经鉴定后于-20℃保存,带回实验室后于-80℃保存。

1.2 样品处理

待鱼体解冻后,随机挑选亮眶灯鱼8尾,用滤纸吸干鱼体表面水分后进行生物学测定(图1),样品的生物学信息见表1。各项测定指标参照GB/T 12763.6—2007《海洋调查规范 第6部分:海洋生物调查》,主要包括体长、体质量和摄食强度等。亮眶灯鱼的摄食强度使用目测法进行鉴定,分为5级(0~4级),分别对应空胃,胃内有少量食物且体积不超过胃腔的1/2,胃内食物较多且体积超过胃腔的1/2,胃内充满食物但胃壁不膨胀和胃内食物饱满、胃壁膨胀变薄5种状态。鉴定完毕后,将亮眶灯鱼的全部胃含物(包括胃内黏液)放入离心管中进行DNA提取。

由于拖网时灯笼鱼形态受损,依据形态特征鉴定较为困难,为确保物种鉴定的准确性,同时取背部肌肉用于分子鉴定。为避免实验过程中的交叉污染,严格按照无污染操作进行实验。



图1 南海亮眶灯鱼与其胃含物

Fig. 1 *D. splendidus* of South China Sea and its stomach contents

表1 亮眶灯鱼生物学信息

Table 1 Sampling information of *D. splendidus*

样品编号 Sample No.	体长 Body length/mm	体质量 Body mass/g	摄食强度 Feeding intensity
LK-1	58	2.88	1
LK-2	47	1.46	1
LK-3	56	2.89	2
LK-4	53	2.19	2
LK-5	54	2.35	1
LK-6	48	1.62	1
LK-7	47	1.69	1
LK-8	38	0.95	2

1.3 DNA 提取与扩增

使用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒 (北京天根) 按照其说明书进行总 DNA 提取。DNA 浓度和质量使用超微量分光光度计测量, 经检验合格后, 进行 PCR 扩增。

肌肉 DNA 使用鱼类通用引物 FishF1 和 FishR1^[25](表 2) 对线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 I (COI) 区域进行 PCR 扩增, 片段大小为 655 bp。扩增总体系为 25 μL : 1.1 \times PCR Mix 22 μL (擎科生物), 正反引物 (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 1 μL , DNA 模板 1 μL 。

扩增程序如下: 98 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 12 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 4 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 检验合格后送至测序公司测序。

胃含物 DNA 使用通用引物 mlCOIintF 和 jgHCO2198^[26-27] (表 2) 对 COI 基因高变区进行扩增, 扩增片段大小约为 313 bp。扩增总体系为 50 μL : 10 \times High Fidelity PCR buffer 5 μL , dNTPs (10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 2 μL , TaKaRa *Taq* 酶 0.2 μL , MgSO_4 (25 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 4 μL , ddH₂O 35.8 μL , 含有 barcode 的正反引物 (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 1 μL , DNA 模板 1 μL 。由于引物简并碱基较多, 简并性较高, 所以采用冷启动降落 PCR 程序尽可能地减少非特异扩增。PCR 程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 16 个降落循环 (95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min), 每个循环退火温度下降 1 $^{\circ}\text{C}$; 25 个普通循环 (95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 46 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min); 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 4 min。PCR 产物通过 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 送至上海生工进行高通量测序。DNA 提取和 PCR 扩增均使用 ddH₂O 做阴性对照, 所有的阴性对照均无目的条带, 表明实验过程中无污染产生。

1.4 数据处理

肌肉序列使用 BLAST 与 GenBank 数据库 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 进行比对, 若两者序列相似度 $\geq 97\%$, 则认为可以鉴定到种水平^[22], 即为亮眶灯鱼。

通过 Illumina Miseq 2 \times 300 bp 测序平台 (Illumina, 美国) 双端测序得到下机数据, 去除引物接头序列, 根据 PE reads 之间的重叠关系, 将成对的读长拼接成一条序列, 然后按照标签序列识别并区分样品得到各样本数据, 最后对各样本数据进行质控过滤, 得到各样本的有效序列。应用 Usearch (11.0.667)^[28] 软件对有效序列按照 97% 的序列相似

表2 亮眶灯鱼肌肉和胃含物种类鉴定的PCR引物

Table 2 PCR primers for species identification of muscle and stomach contents of *D. splendidus*

引物 Primer	序列 (5'—3') Sequence (5'—3')	退火温度 Annealing temperature/ $^{\circ}\text{C}$	片段长度 Fragment length/bp	参考文献 Reference
FishF1	TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC	55	655	[25]
FishR1	TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA			
mlCOIintF	GGWACWGWGTGAACWGTWTAYCCYCC	62~46	313	[26-27]
jgHCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAARAAYCA			

度进行聚类得到 OTU, 选择 OTU 代表序列使用 BLAST 与 NCBI NT (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 数据库比对进行物种注释并人工校对, 筛选出序列的最佳比对结果。若满足序列相似度 (per. identity) $\geq 97\%$, 则认为鉴定到种水平; 若满足序列相似度 $90\% \sim 97\%$, 则认为鉴定到属水平^[29-30], 不满足条件的序列则被归为未分类。通过 OTU 分析可得出胃含物组成的多样性和不同物种的相对丰度 (Relative abundance, 即单个物种的序列数/总序列数)。

2 结果

2.1 分类地位鉴定

肌肉样本的分子鉴定结果显示, 除了 LK-3 外其余样本与形态学鉴定结果一致, 均是亮眶灯鱼 (LK-3 序列相似度 $< 97\%$, 仅鉴定到眶灯鱼属, 做舍弃处理)。

胃含物样本共获得长度约为 313bp 的序列 138 414 条, 剔除亮眶灯鱼的自身序列、未分类序列以及丰度较低的序列后, 共获得 14 533 条序列。按照 97% 相似性聚类后得到 34 条 OTU 代表序列, 注释得到 34 种饵料生物 (表 3), 分属于 5 门 7 纲 11 目 18 科 29 属, 其中有 79.41% 的 OTU 鉴定到种水平。

2.2 胃含物组成

根据亮眶灯鱼胃含物的相对丰度显示 (图 2), 介形虫纲占比最高 (79.12%), 其次是甲壳纲 (11.28%), 其余纲占比如下: 软甲纲 4.03% 、水螅纲 2.66% 、辐鳍亚纲 1.94% 、腹足纲 0.81% 、多毛纲 0.16% 。从饵料种类数量来看, 辐鳍亚纲的生物种类最多, 共 11 种, 甲壳纲和介形虫纲均为 7 种, 软甲纲和腹足纲均为 3 种, 水螅纲 2 种, 多毛纲 1 种。

根据物种序列丰度百分比显示 (表 3), 排在前三位的种类分别是胖海浮萤 (*Halocypris inflata*)、茗荷属和武装片戎 (*Vibilia armata*), 合计占亮眶灯鱼饵料生物相对丰度的 91.1% 。从种类数量上分析, 鱼类、桡足类和介形类是亮眶灯鱼重要的食物组成, 分别有 11、7 和 7 种, 占总数量的 82.35% 。此外还检测到 3 种翼足类: *Clio pyramidata*、*Diacria major* 和驼龟螺; 2 种水母类: 棍手水母属 (*Rhopalonema* sp.) 和 *Botrynema* sp.; 1 种磷虾类: 拟遂足磷虾 (*Thysanopoda aequalis*); 1 种十足类: 莫氏硬壳寄居蟹 (*Calcinus morgani*); 1 种多毛类:

叶须虫属 (*Phyllodoce* sp. 11BIOAK-1631)。

3 讨论

3.1 亮眶灯鱼的食物组成特征

研究物种的食性特征, 首先要确定其食物组成结构。本次研究共鉴定出 34 种饵料生物, 分属于 9 大类群。从亮眶灯鱼的食物种类组成分析, 浮游甲壳动物是其主要的摄食对象, 包括桡足类、介形类、磷虾类、端足类以及十足类, 共 17 种, 占总种类数量的 50% ; 其中桡足类和介形类为绝对优势类群, 共 14 种, 种类数占 41.2% 。龚玉艳等^[14]利用传统形态学方法研究金鼻眶灯鱼的食性时, 同样发现食物组成中的浮游甲壳动物占绝对优势, 其中桡足类的种类数量最多, 占总种类数量的 68.38% ; 因此推测浮游甲壳动物是眶灯鱼属灯笼鱼的主要摄食对象。此外, 仅从生物类群来看, 鱼类的种类数最多, 共 11 种, 占总种类数量的 32.35% , 因此, 鱼类也是亮眶灯鱼的重要食物组成。根据龚玉艳等^[14]的研究结果, 灯笼鱼捕食的鱼类多为仔稚鱼或灯笼鱼科幼鱼^[14]。从亮眶灯鱼的食物序列丰度分析, 同样是浮游甲壳动物的序列丰度最高, 占总序列丰度的 95.5% , 其中胖海浮萤所占比例最高 (77.71%), 其次是茗荷属物种 (9.83%) 和武装片戎 (3.56%), 结果表明胖海浮萤是介形类生物中的优势饵料生物。Clarke 等^[31]使用宏条形码技术对 4 种裸灯鱼属灯笼鱼的食性研究结果显示, 甲壳类浮游动物的序列占总饵料生物序列的 90% 以上, 因此推测甲壳类浮游动物是灯笼鱼的主要摄食类群。

水母是浮游动物群落中的一类常见物种, 在各大海域广泛分布。本研究从亮眶灯鱼胃含物中检测出棍手水母属和 *Botrynema* sp. 两种水母。同样, Clarke 等^[31]利用宏条形码技术在后鳍裸灯鱼 (*Gymnoscopelus opisthopterus*) 的胃含物中检测出水母。然而, 以往的食性的报道中^[13-15,32]并未鉴定出水母这一食物类群, 可能因为水母及其幼体形态差异小且消化程度高而难以鉴别, 因此被忽略或归为不可辨认类别。例如在解剖亮眶灯鱼的胃部时发现其胃含物多为食糜状态, 难以用形态学方法鉴定 (图 1)。而宏条形码技术不依赖形态学特征, 可利用高度降解、片段小的 DNA 以发掘更多物种信息^[21], 因此宏条形码技术可作为传统形态学鉴定方法的潜在应用工具, 运用于灯笼鱼的食性研究。

表3 亮眶灯鱼胃含物组成
Table 3 Stomach contents of *D. splendidus*

纲 Class	饵料生物 Prey species	相对丰度百分比 Percentage of abundance/%	排序 Rank	生物类群 Biome
甲壳纲 Hexanauplia	瘦乳点水蚤 <i>Pleuromamma gracilis</i>	0.10	20	桡足类
	剑乳点水蚤 <i>Pleuromamma xiphias</i>	0.47	8	桡足类
	腹突乳点水蚤 <i>Pleuromamma abdominalis</i>	0.07	24	桡足类
	美丽长腹水蚤 <i>Metridia venusta</i>	0.13	14	桡足类
	普通波水蚤 <i>Undinula vulgaris</i>	0.28	17	桡足类
	波刺水蚤属 <i>Undeuchaeta</i> sp.	0.41	11	桡足类
	茗荷属 <i>Conchoderma</i> sp.	9.83	2	桡足类
介形虫纲 Ostracoda	长拟浮萤 <i>Paraconchoecia oblonga</i>	0.09	22	介形类
	猬刺拟浮萤 <i>Paraconchoecia echinata</i>	0.44	10	介形类
	胖海浮萤 <i>Halocypris inflata</i>	77.70	1	介形类
	吸海萤属 <i>Halocypris</i> sp. USNM IZ 1 448 950	0.06	27	介形类
	双浮萤属 <i>Discoconchoecia</i> sp. S8-D6	0.67	6	介形类
	短刺直浮萤 <i>Orthoconchoecia secernenda</i>	0.11	19	介形类
	刺额葱萤 <i>Porroecia spinirostris</i>	0.04	30	介形类
软甲纲 Malacostraca	拟遂足磷虾 <i>Thysanopoda aequalis</i>	0.40	12	磷虾类
	武装片戎 <i>Vibilia armata</i>	3.56	3	端足类
	莫氏硬壳寄居蟹 <i>Calcinus morgani</i>	0.07	24	十足类
辐鳍亚纲 Actinopteri	半裸银斧鱼 <i>Argyropelecus hemigygnus</i>	0.03	31	鱼类
	长银斧鱼 <i>Argyropelecus affinis</i>	0.07	24	鱼类
	勃氏圆罩鱼 <i>Cyclothone braueri</i>	0.10	20	鱼类
	大西洋钻光鱼 <i>Gonostoma atlanticum</i>	0.36	13	鱼类
	离光鱼属 <i>Woodsia</i> sp.	0.03	32	鱼类
	黑须黑巨口鱼 <i>Melanostomias tentaculatus</i>	0.06	27	鱼类
	眶灯鱼属 <i>Diaphus</i> sp.	0.12	18	鱼类
	吕氏眶灯鱼 <i>Diaphus luetkeni</i>	0.08	23	鱼类
	眶暗虹灯鱼 <i>Bolinichthys pyrsobolus</i>	0.05	29	鱼类
	后肛鱼 <i>Opisthoproctus soleatus</i>	0.45	9	鱼类
水螅纲 Hydrozoa	棍手水母属 <i>Rhopalonema</i> sp.	0.23	15	水母类
	<i>Botrynema</i> sp.	2.43	4	水母类
腹足纲 Gastropoda	<i>Clio pyramidata</i>	0.78	5	翼足类
	<i>Diacria major</i>	0.01	34	翼足类
	驼龟螺 <i>Cavolinia gibbosa</i>	0.02	33	翼足类
多毛纲 Polychaeta	叶须虫属 <i>Phyllodoce</i> sp. 11BIOAK-1 631	0.16	16	多毛类

此外,本研究与利用形态学鉴定方法对南海海域灯笼鱼食性组成的研究做了对比(表4),结果显

示共同检测到的食物类群包括介形类、桡足类、端足类、鱼类和磷虾类,说明这5大类是南海灯笼鱼

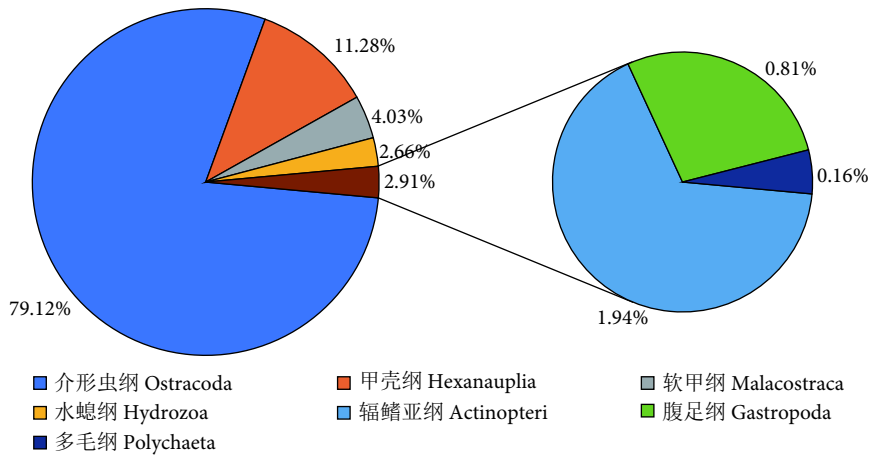


图2 亮眶灯鱼胃含物相对丰度组成百分比 (纲水平)

Fig. 2 Relative abundance proportion of stomach contents for *D. splendidus* (class level)

表4 南海海域不同灯笼鱼胃含物比较

Table 4 Stomach contents of different Myctophidae fishes from South China Sea

生物类群 Biome	亮眶灯鱼 (本研究) <i>D. splendidus</i> (this study)	金鼻眶灯鱼 ^[14] <i>D. chrysohynchus</i>	瓦氏眶灯鱼 ^[15] <i>D. watasei</i>	尾明角灯鱼 ^[32] <i>Ceratoscopelus warmingii</i>
介形类 Ostracoda	√	√	√	√
桡足类 Copepoda	√	√	√	√
端足类 Amphipoda	√	√	√	√
鱼类 Fish	√	√	√	√
磷虾类 Euphausiacea	√	√	√	√
腹足类 Gastropod	√	√		√
十足类 Decapoda	√	√		
多毛类 Polychaeta	√	√		
水母类 Jellyfish	√			
萤虾类 Lucifer		√		
等足类 Sopoda		√		
毛颚类 Chaetognatha		√		
头足类 Cephalopoda		√	√	

的重要食物来源。另外，从检测的饵料生物种类数量来看，两项研究结果差异较大，本研究鉴定出 34 种饵料生物，龚玉艳等^[14] 鉴定出 117 种饵料生物 (其中包括未鉴定到种及不可辨认种类)，可能原因如下：1) 本研究的样本量较小 (7 尾 vs 50 尾)；2) 本研究中亮眶灯鱼的摄食强度位于 1~2 级间，胃含物呈食糜状态，而龚玉艳等^[14] 研究中金鼻眶灯鱼的摄食强度普遍较高 (3~4 级占 72%)。摄食强度的差异由样本采集时间不同所致，摄食强度高的样本包含更多的食物组成信息，因此能够检测到更多的饵料生物。同时，由于采集灯笼鱼的种类、水域、季节不同，其结果也可能存在差异。

3.2 饵料的生物学特征

鱼类的食性特征受到饵料生物种类及其分布的影响，浮游动物作为亮眶灯鱼的主要食物类群，其种类组成和数量分布对亮眶灯鱼的摄食习性有着重要影响。龚玉艳等^[33] 对南海浮游动物群落的空间分布研究结果显示，桡足类、端足类、介形类、水母类为主要生物类群，本研究中检测到的亮眶灯鱼的主要食物类群与该研究基本一致。此外，灯笼鱼具有明显的昼夜垂直迁移习性，白天一般栖息于 300~700 m 水层，晚上则游至 200 m 以浅觅食^[9,34-35]，这一特征与浮游动物的分布密切相关^[36]。浮游动物具有明显的垂直分层现象，该现象受其昼

夜垂直迁移影响导致浮游动物在水层中分布不均,使得生物的种类和丰度总体随水深的增加而减少,即 0~200 m 水层生物种类最丰富,600~750 m 水层最贫乏。因此推断,捕食时随饵料生物迁移是灯笼鱼昼夜垂直迁移的原因之一。

3.3 宏条形码技术的不足

宏条形码技术在鱼类食性研究中的应用越来越广泛,但也存在一些不容忽视的局限性。如无法区分鱼类自身序列的具体来源、PCR 扩增偏向性等,这可能导致一些丰度低的食物类群无法被鉴定出来,使得获取的食物组成信息不够完整。

本研究所获得的序列中亮眶灯鱼自身序列占 88.33%,如此高的自身序列比例很难确定具体来源,推测主要与亮眶灯鱼自身 DNA 的干扰、同类自食行为以及同类基因碎片有关。亮眶灯鱼自身 DNA 的干扰主要来源于胃液中,在提取胃含物总 DNA 时一并提取出来,后经 PCR 扩增不断放大。关于灯笼鱼的同类自食行为已有研究证实,如瓦氏眶灯鱼是一种比较凶猛的肉食性中层鱼,在捕食时偶尔会摄食同类^[15]。金海卫等^[13]在利用形态学方法鉴定七星底灯鱼的食物组成时发现其胃含物中有同类残骸,因此推测亮眶灯鱼同种之间也存在自食行为,从而在胃含物中检测到同类的 DNA。同类基因碎片(如同类的皮肤碎片、黏膜、唾液和粪便等)主要来源于亮眶灯鱼栖息的水体中,这些碎片可能在亮眶灯鱼进食过程中带到胃内,从而被扩增出来。目前,为了去除自身序列的干扰,最简便且常用的方法是将测序结果中含有目标物种本身的序列剔除^[21-23],更优化的方法是通过设计阻断引物以阻止自身序列的扩增^[37-38]。

鱼类胃含物是包含多种生物模板的混合物,由于不同模板与引物的结合程度不同,在 PCR 扩增中,其扩增效率也不同,扩增效率高的模板很可能对扩增效率低的产生抑制作用,导致 PCR 受到抑制的食物类群被低估甚至无法鉴别^[20]。因此,选择合适的引物、增加实验重复以及测序深度,对提高物种的检出率有很大作用^[39]。

由于本研究的样本量有限,仅作为利用宏条形码技术对亮眶灯鱼食性组成的初步探究,在今后的研究中将增加样本量并分析不同时空分布灯笼鱼的食性组成和特征。本研究结果表明宏条形码技术作为灯笼鱼食性分析的有效工具,显示出了良好的食

性鉴别潜力,尤其是难以通过形态学鉴定的鱼类食性研究。

参考文献:

- [1] HULLEY P A. Upper-slope distributions of oceanic lanternfishes (family: Myctophidae)[J]. Mar Biol, 1992, 114(3): 365-383.
- [2] HUDSON J M, STEINBERG D K, SUTTON T T, et al. Myctophid feeding ecology and carbon transport along the northern Mid-Atlantic Ridge[J]. Deep Sea Res I, 2014, 93(10): 104-116.
- [3] FRID A, MARLIAVE J. Predatory fishes affect trophic cascades and apparent competition in temperate reefs[J]. Biol Lett, 2010, 6(4): 533-536.
- [4] MOKU M, KAWAGUCHI K, WATANABE H, et al. Feeding habits of three dominant myctophid fishes, *Diaphus theta*, *Stenobrachius leucopsarus* and *S. nannochir*, in the subarctic and transitional waters of the western north Pacific[J]. Mar Ecol Prog Ser, 2000, 207: 129-140.
- [5] WATANABE H, KAWAGUCHI K. Decadal change in the diets of the surface migratory myctophid fish *myctophum nitidulum* in the kuroshio region of the western north Pacific: predation on sardine larvae by myctophids[J]. Jap Soc Fish Sci, 2003, 69(4): 716-721.
- [6] TAKAGI K, YATSU A, ITOH H, et al. Comparison of feeding habits of myctophid fishes and juvenile small epipelagic fishes in the western north Pacific[J]. Mar Biol, 2009, 156(4): 641-659.
- [7] SHREEVE R S, COLLINS M A, TARLING G A, et al. Feeding ecology of myctophid fishes in the northern Scotia Sea[J]. Mar Ecol Prog Ser, 2009, 386: 221-236.
- [8] PUSCH C, SCHNACK-SCHIEL S, MIZDALSKI E, et al. Feeding ecology of three myctophid species at the greatmeteor seamount (northeast Atlantic)[J]. Arch Fish Mar Res, 2004, 51(1-3): 251-271.
- [9] DALPADADO P, GJØSETER J. Feeding ecology of the lanternfish *bentosema pterotum* from the Indian Ocean[J]. Mar Biol, 1988, 99(4): 555-567.
- [10] JOHANNES K, RUTH B S, KNUD S. Aspects of horizontal distribution and diet of myctophid fish in the Arabian Sea with reference to the deep water oxygen deficiency[J]. Deep Sea Res II, 1993, 40(3): 783-800.
- [11] SAUNDERS R A, HILL S L, TARLING G A, et al. Myctophid fish (family myctophidae) are central consumers in the food web of the Scotia Sea (southern ocean)[J]. Front Mar Sci, 2019: 6.
- [12] PAKHOMOV E A, PERISSINOTTO R, MCQUAID C D. Prey composition and daily rations of myctophid fishes in the Southern Ocean[J]. Mar Ecol Prog Ser, 1996, 134(1/2/3): 1-14.
- [13] 金海卫, 薛利建, 潘国良, 等. 东海和黄海南部七星底灯鱼摄食习性的研究 [J]. 海洋渔业, 2011, 33(4): 368-377.
- [14] 龚玉艳, 陈作志, 张俊, 等. 南海北部陆坡海域秋季金鼻眶灯鱼的摄食习性 [J]. 南方水产科学, 2015, 11(5): 90-99.

- [15] 龚玉艳, 杨玉滔, 孔啸兰, 等. 南海北部陆坡海域瓦氏眶灯鱼的渔业生物学特征 [J]. 中国水产科学, 2018, 25(5): 1901-1101.
- [16] 郑光美, 赵欣如, 宋杰, 等. 黄腹角雉的食性研究 [J]. 生态学报, 1986, 4(3): 283-288.
- [17] 武正军, 李义明, 王彦平. 洗胃法与剖胃法在四种蛙食性分析中的对比 [J]. 动物学报, 2007, 4(2): 364-372.
- [18] POMPANON F, DEAGLE B E, SYMONDSON W O C, et al. Who is eating what: diet assessment using next generation sequencing[J]. Mol Ecol, 2012, 21(8): 1931-1950.
- [19] JI Y, ASHTON L, PEDLEY S M, et al. Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding[J]. Ecol Lett, 2013, 16(10): 1245-1257.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 周天成, 胡思敏, 林先智, 等. 基于 18S rDNA 条形码技术的珊瑚礁区塔形马蹄螺 (*Tectus pyramis*) 食性分析 [J]. 海洋科学, 2020, 44(2): 99-107.
- [23] 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.
- [24] 徐盛楠, 孙婷婷, 张建设, 等. 基于高通量测序技术的两种水螅水母现场食物研究 [J]. 应用海洋学学报, 2020, 39(1): 49-56.
- [25] WARD R D, ZEMLAK T S, INNES B H, et al. DNA barcoding Australia's fish species[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2005, 360(1462): 1847-1857.
- [26] 杨江华. 太湖流域浮游动物物种多样性与环境污染群落生态效应研究 [D]. 南京: 南京大学, 2017: 32-33.
- [27] 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]. Front Zool, 2013, 10(1). DOI: 10.1186/1742-9994-10-34.
- [28] EDGAR C E. Uparse: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads[J]. Nat Methods, 2013, 10: 996-998.
- [29] PEAY K G, GARBELOTTO M, BRUNS T D. Spore heat resistance plays an important role in disturbance-mediated assemblage shift of ectomycorrhizal fungi colonizing *Pinus muricata* seedlings[J]. J Ecol, 2009, 97(3): 537-547.
- [30] NIETO M P, CARBONE S S. Characterization of juvenile maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) ectomycorrhizal fungal community using morphotyping, direct sequencing and fruit bodies sampling[J]. Mycorrhiza, 2009, 19(2): 91-98.
- [31] CLARKE L J, TREBILCO R, WALTERS A, et al. DNA-based diet analysis of mesopelagic fish from the southern *Kerguelen axis* [J]. Deep-Sea Res II, 2020, 172: 104494.
- [32] 孔啸兰, 江艳娥, 龚玉艳, 等. 南海中北部尾明角灯鱼渔业生物学特性的初步研究 [J]. 南方水产科学, 2016, 12(4): 117-124.
- [33] 龚玉艳, 杨玉滔, 范江涛, 等. 南海北部陆架斜坡海域夏季浮游动物群落的空间分布 [J]. 南方水产科学, 2017, 13(5): 8-15.
- [34] WANG J T M, CHEN C T. A review of lanternfishes (families: Myctophidae and Neoscopelidae) and their distributions around Taiwan and the Tungsha Islands with notes on seventeen new records[J]. Zool Stud, 2001, 40(2): 103-126.
- [35] 张俊, 江艳娥, 陈作志, 等. 南海中南部中层鱼资源声学积分值及时空分布初探 [J]. 中国水产科学, 2017, 24(1): 120-135.
- [36] 左涛, 王荣, 王克, 等. 夏季南黄海浮游动物的垂直分布与昼夜垂直移动 [J]. 生态学报, 2004, 4(3): 524-530.
- [37] O'RORKE R, LAVERY S, JEFFS A. PCR enrichment techniques to identify the diet of predators[J]. Mol Ecol Resour, 2012, 12(1): 5-17.
- [38] VESTHEIM H, JARMAN S N. Blocking primers to enhance PCR amplification of rare sequences in mixed samples: A case study on prey DNA in antarctic krill stomachs[J]. Front Zool, 2008, 5: 12.
- [39] 李哈溪, 黄雪娜, 李世国, 等. 基于环境 DNA-宏条形码技术的水生生态系统入侵生物的早期监测与预警 [J]. 生物多样性, 2019, 27(5): 491-504.