DOI: 10.5846/stxb201903100451
高养春, 李海涛, 王孝程, 孙艺, 战爱斌, Aileen TAN Shau-Hwai, 李宏俊.利用宏 DNA 条形码研究浮游动物多样性——以鸭绿江口为例.生态学报,2020,40(11):3822-3832.
Gao Y C, Li H T, Wang X C, Sun Y, Zhan A B, Aileen Tan Shau-Hwai, Li H J.Research on zooplankton diversity using DNA-based metabarcoding technique: a case study in the Yalvjiang Estuary.Acta Ecologica Sinica,2020,40(11):3822-3832.

利用宏 DNA 条形码研究浮游动物多样性
——以鸭绿江口为例

高养春[1,2,5], 李海涛[3], 王孝程[1], 孙 艺[1], 战爱斌[2], Aileen TAN Shau-Hwai[4], 李宏俊[1,*]

1 国家海洋环境监测中心,大连 116023
2 中国科学院生态环境研究中心,北京 100853
3 国家海洋局南海环境监测中心,广州 510300
4 Centre for Marine and Coastal Studies, Universiti Sains Malaysia (USM), 11800, Penang, Malaysia
5 广东省生物资源应用研究所,广州 510260

摘要:为评价宏 DNA 条形码技术在我国海洋生物多样性监测中的应用潜力,采集了 22 份鸭绿江口浮游动物样品,分别利用宏条形码分子鉴定和形态鉴定方法对优势类群桡足类进行多样性的比较研究。结果显示:(1)利用宏条形码分子鉴定方法共鉴定出 4 目 23 科 32 属 229 个操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OTUs),形态方法共鉴定出 3 目 5 科 5 属 6 种;同时,利用形态鉴定得到的分类阶元多数(目:100%、科:80%、属:80%)能用宏条形码分子鉴定方法鉴定出来,而宏条形码分子鉴定方法鉴定得到的分类阶元多数(目:25%、科:83%、属:88%)却未能用形态鉴定出来,表明宏条形码分子鉴定方法在鉴定物种丰富度方面具有明显优势。(2)利用宏条形码分子鉴定与形态鉴定桡足类的多样性指数呈显著的一致性($r=0.524$, $P=0.024$),表明宏条形码鉴定方法与形态方法在评价物种多样性方面具有较好的可比性。本研究表明宏条形码分子鉴定方法在我国海洋浮游动物业务化监测中具有较高的应用潜力。

关键词:浮游动物;群落结构;宏 DNA 条形码;18S;鸭绿江口

Research on zooplankton diversity using DNA-based metabarcoding technique: a case study in the Yalvjiang Estuary

GAO Yangchun[1,2,5], LI Haitao[3], WANG Xiaocheng[1], SUN Yi[1], ZHAN Aibin[2], Aileen TAN Shau-Hwai[4], LI Hongjun[1,*]

1 *National Marine Environmental Monitoring Center*, *Dalian* 116023, *China*
2 *Research Center for Eco-Environmental Sciences*, *Chinese Academy of Sciences*, *Beijing* 100853, *China*
3 *South China Sea Environmental Monitoring Center*, *State Oceanic Administration*, *Guangzhou* 510300, *China*
4 *Centre for Marine and Coastal Studies*, *Universiti Sains Malaysia*, 11800, *Penang*, *Malaysia*
5 *Guangdong Institute of Applied Biological Resources*, *Guangzhou* 510260, *China*

Abstract: In order to assess the power of DNA-based metabarcoding in the monitoring of marine biodiversity, we ultilized both metabarcoding technique and morphological method to compare communtiy diverstiy of copepods, which were collected from 22 sites along the Yalvjiang Estuary of China. The results showed that: (1) a total of four order, 23 family, 32 genus

基金项目:国家自然科学基金项目(31572595);中国—东盟海上合作基金(全球变化背景下南中国海近海生态系统监测与保护管理示范);业务化监测项目(鸭绿江口生态综合监测示范)
收稿日期:2019-03-10; **网络出版日期**:2019-11-07

* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: oceanlhj@163.com

and 229 operational taxonomic units (OTUs) were detected through the metabarcoding technique, whereas only three order, five familiy, five genus and six species were identified based on the morphological method. In addition, most taxonomic categories (100% order, 80% family, and 80% genus) identified based on the morphological method could be also detected using the metabarcoding technique. Reversly, however most taxonomic categories (25% order, 83% family and 88% genus) detected using the the metbarcoding technique could not be identified based on the morphological method. The results suggested that the metabarcoding technique was more powerful than the morphological method in the assessment of copepod diversity. (2) The variation of diversity index based on the metabarcoding method was significantly consistent with the morphological method ($r = 0.542$, $P = 0.024$), suggesting good comparability between the two methods. Our results indicated that the DNA-based metabarcoding technique had high application potential in efficient assessment of marine biodivesity.

Key Words: zooplankton; biodiversity; metabarcoding; 18S; Yalvjiang Estuary

浮游动物种类多、数量大、分布广,是海洋生物多样性的重要组成部分[1]。作为海洋初级生产力向高营养级传递的关键环节,浮游动物在海洋生态系统的物质循环和能量流动中起着重要作用,同时浮游动物对环境扰动非常敏感,其种类组成和群落结构可作为海洋生态系统结构变化的重要指示[2],可以为评价海洋生态系统环境质量和健康状况提供指标[3]。浮游动物种类的准确鉴定是浮游生态学研究的基础,传统形态鉴定方法无法满足现代海洋生态管理与保护自动化、标准化的数据需求,ZOOSCAN 图像识别[4]和 DNA 条形码技术[5]等新技术的出现,极大推动了浮游动物分类学、生态学及相关领域的研究进展。

为加强海洋生态监测和强化海洋生态管理,我国自 2003 年开始组织建立海洋生态监控区并实施业务化监测,目前已经在我国近岸海域生态脆弱区和敏感区建立了 21 个生态监控区。海洋生物多样性是生态监控区业务化监测的重要内容,其目的是掌握海洋生物种类和数量的分布及变化趋势,监测对象包括浮游植物、浮游动物、底栖生物和游泳动物等[6]。浮游动物类群具有多样性高的特点,传统基于形态学的显微计数法对鉴定人员的专业技能要求较高,并且不同鉴定人员的结果可比性较差,导致不同年际间的结果也缺乏可比性,这些缺陷导致基于形态学的鉴定方法难以满足业务化监测的需求,因此,急需开发自动化、标准化的浮游动物种类鉴定技术[5,7]。此外,在海洋浮游动物中,隐存种广泛存在,形态鉴定导致种类多样性被低估[8]。随着高通量测序技术的发展和浮游动物 DNA 条形码数据库的不断扩充,分子鉴定为浮游动物种类鉴定及多样性的评估提供了机遇,基于高通量测序的宏 DNA 条形码技术为浮游生物物种、种群和群落的分子生态鉴定和生态监测提供了契机[9-12]。在业务监测领域,分子鉴定技术在欧洲水框架指令(European Water Framework Directive)已经成为生物种类形态鉴定的有益补充,甚至在未来有望取代形态鉴定[13]。我国海域辽阔,跨越温带、亚热带和热带三个气候带,生物多样性丰富,我国海洋生物多样性监测急需准确和高效的技术方法。

自 2003 年 Hebert 等[14]提出 DNA 条形码技术以来,DNA 条形码技术和数据库不断完善,目前生命条形码联盟(The Consortium for the Barcode of Life,CBOL)已经拥有来自 40 多个国家的 120 多个成员组织,生命条形码数据系统(The Barcode of Life Data System,BOLD)已经收录 DNA 条形码序列超过 600 万条。选择合适的 DNA 条形码是开展分子种类鉴定的基础,需要满足合适的变异速率、足够的分辨率、保守的通用引物等条件[15]。在浮游动物 DNA 条形码研究中应用较多的标记包括核糖体大亚基(Ribosomal Large Subunit, LSU)、核糖体小亚基(Ribosomal Small Subunit, SSU)和线粒体细胞色素氧化酶亚基 I(Cytochrome Oxidase Subunit I, COI)等[9],不同条形码在实际应用中各有优缺点。SSU 因具有较快的进化速率且易于设计出覆盖较广物种类别的通用引物而广泛应用于基于宏条形码水生生物多样性的研究中[16-19]。

本研究在鸭绿江口海域采集了 22 份浮游动物样品,分别利用宏条形码鉴定方法和形态鉴定方法分析浮游动物群落组成,并通过比较两种方法得出的多样性指数来评价基于高通量测序的宏条形码分子鉴定方法在我国海洋生物多样性业务化监测中的应用潜力。

1 试验方法

1.1 样品采集

2017 年 8 月沿鸭绿江入海口在中国海域布设 22 个浮游动物站位(图 1)进行采样。使用浅水 II 型浮游生物网(网目孔径 0.160 mm,网口内径 31.6 cm,网长 140 cm),依据《海洋监测规范》(GB 17378.7—2007)采集浮游动物样品。每个站位采集的样品进行充分混匀后均分成两份:一份用 5%甲醛固定用于形态学鉴定,另一份用同孔径筛绢过滤掉海水后,加入无水乙醇固定用于分子鉴定。

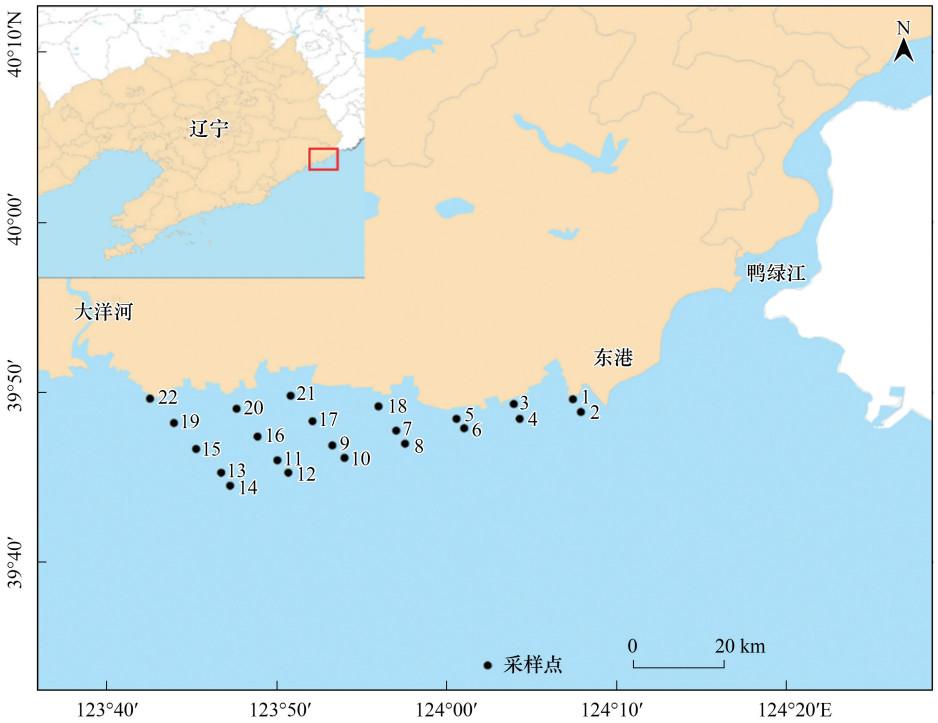

图 1 鸭绿江口海域浮游动物样品采集点

Fig.1 Sampling sites along the coastal regions of Yalvjiang Estuary

1.2 种类鉴定

形态鉴定:在体视显微镜下对浮游动物样品进行分类鉴定和计数。

分子鉴定:分别从每份酒精(总体积 100 mL)保存的样品中分三次吸取浮游动物样品,每次吸取 10 mL,三次吸取的浮游动物样品合并在一起,并用 20 μm 的筛绢过滤,除去酒精及残留的浮游藻类等。采用 DNA 血液及组织提取试剂盒(Qiagen Canada lnc., ON, Canada)提取浮游动物基因组 DNA,提取的 DNA 采用 NanoDrop 2000 (Thermo Scientific lnc., USA)进行质量评价。利用浮游动物通用引物(Uni18S:AGGGCAAKYCTGGTGCCAGC; Uni18SR:GRCGGTATCTRATCGYCTT)扩增核糖体小亚基的 V4 区[20],此引物已证实可以成功扩增几乎所有的浮游动物类别[21]。为了将 22 份浮游动物样品进行混合测序,我们对每份样品聚合酶链式扩增(Polymerase Chain Reaction, PCR)的引物添加 8 碱基的条形码,同时也便于后续数据的拆分。PCR 反应体系如下(25 μL):1×Ex Taq Buffer(20 mmol/L Mg^{2+}plus, TaKaRa, 大连,中国),5.0 mmol/L dNTP,15 pmol 含 barcodes 的引物,100 ng 基因组 DNA;PCR 反应程序为 95℃ 5min,35 个 PCR 循环(95℃ 30s,50℃ 45s,72℃ 30s),72℃ 7min 的延伸;为了保证取样的均一性,每个样品进行 8 次 PCR 重复。扩增产物经电泳质检后用 Qiagen PCR production purification kit 进行 PCR 产物的纯化,纯化的 DNA 经 NanoDrop 2000 定量后进行样品间的等量混合。构建好的文库于 Miseq PE300 进行测序。

高通量测序下机数据用 fastaq_strip_barcode.relablel2.py 脚本进行数据的拆分并去除非生物学序列,如测序接头、样品标签序列及引物。利用 USEARCH V8.1 对拆分的数据进行长度的修剪、质量过滤、操作分类单元(Operational Taxonomic Units, OTUs)聚类等处理。因源于 Miseq PE300 的序列右端的测序质量急剧下降,尤其是最后 20 bp,故将所有数据右端的 20 bp 删除,以提高序列的整体质量。质量过滤采用 USEARCH V8.1 推荐的方法,将期望误差阈值设为 1.0。采用 97%的阈值进行 OTUs 的聚类。除此之外,在后续的数据分析中,我们采用不删除 OTUs 单体、二体及三体的方式,因为这些物种可能是真实存在的物种,只是以低丰度的形式存在[20]。采用 SEED V1.46[22] 软件对聚类出 OTUs 比对到美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)中的非冗余蛋白质序列数据库(Non-Redundant Protein Sequence Database, NR)中进行物种的注释。比对的结果只保留序列的覆盖度大于 85%、相似度大于 90%的注释结果[20]。

1.3　统计分析

为便于宏条形码鉴定方法与形态学方法的比较,我们选取海洋浮游动物中丰度较高的桡足亚纲(Copepoda)进行分析。采用 PRIMER 6.0[23] 计算形态学及分子鉴定物种的多样性指数,包括物种丰度(Species richness)和香浓维纳多样性指数(Shannon Winner diversity index)。采用 SPSS 18.0 并应用 Pearson 相关系数对两种方法多样性指数进行相关性分析。

2　结果

高通量测序总计产出 291.6 万条序列,每个采样点得到的序列数在 7.3 万至 27.0 万之间,平均为 13.3 万条,数据已上传到 NCBI (SRA accession: PRJNA490610)。经去除重复序列、OTUs 聚类等步骤,共获得 1957 个 OTUs。序列数与物种数(OTUs)关系的稀疏曲线(图 2)显示:随着序列数的急剧升高,物种数增加的速度逐渐变慢,表明各采样点的测序量足够覆盖大部分的种类。将获得的 OTUs 与 NR 进行比对,成功注释 1502 个,其中 229 个 OTUs 被注释为浮游桡足亚纲(Copepoda),隶属于 4 目、23 科、32 属(表 1)。共鉴定浮游桡足类 1069394 条序列,其中哲水蚤目(Calanoida)包含 12 属(57.628%),剑水蚤目(Cyclopoida)包含 6 属(36.359%),鞘口水蚤目(Poecilostomatoida)包含 12 属(5.406%),管口虱目(Siphonostomatoida)包含 2 属(0.607%);并且样点内哲水蚤目和鞘口水蚤目相对丰度沿采样点 1 至 12 逐渐升高,而剑水蚤目和管口虱目相对丰度沿采样点 1 至 12 逐渐下降(图 3)。在这些属中,丰度最高的种类分别为拟哲水蚤属(*Paracalanus*)和长腹剑水蚤属(*Oithona*),且样点内拟哲水蚤属(*Paracalanus*)的相对丰度沿采样点 1 至 22 逐渐升高,而长腹剑水蚤属(*Oithona*)具有逐渐降低的趋势(图 4)。

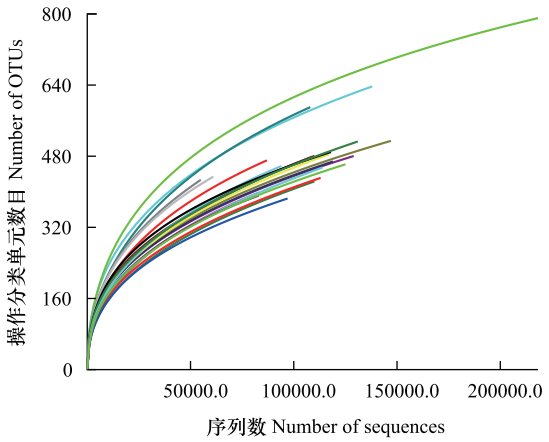

图 2　鸭绿江口 22 个浮游动物样品高通量测序稀疏曲线

Fig. 2　Rarefaction plots of 22 zooplankton samples based on metabarcoding methods

OTUs:操作分类单元 Operational Taxonomic Units

基于形态学特征,共鉴定出桡足纲 3 目、5 科、5 属、6 种(表 1;图 5;图 6)。哲水蚤目(Calanoida)包含 4 属(66.67%),剑水蚤目(Cyclopoida)和鞘口水蚤目(Poecilostomatoida)各包含 1 属(16.67%);且哲水蚤目(Calanoida)的相对丰度沿采样点 1 至 12 逐渐降低,而鞘口水蚤目(Poecilostomatoida)逐渐升高(图 5)。其中丰度最高的物种是拟哲水蚤属(*Paracalanus*),在大部分采样点拟哲水蚤属(*Paracalanus*)所占的比例均较高,少部分采样点(7 和 8)长腹剑水蚤属(*Oithona*)所占的比例较高(图 6);并且拟哲水蚤属(*Paracalanus*)的相对丰度沿采样点 1 至 12 逐渐降低,而属于鞘口水蚤目(Poecilostomatoida)的剑水蚤属(*Corycaeus*)相对丰度逐渐升高(图 6)。

表 1 基于宏条形码分子鉴定和形态学鉴定的浮游桡足类

Table 1 Copepoda identified based on both metabarcodng technique and morphological identification

目 Order		科 Family		属 Genera	
分子鉴定 Mol. Iden.	形态鉴定 Mor. Iden	分子鉴定 Mol. Iden.	形态鉴定 Mor. Iden	分子鉴定 Mol. Iden.	形态鉴定 Mor. Iden
哲水蚤目 Calanoida	哲水蚤目 Calanoida	Paracalanidae	Paracalanidae	*Paracalanus*	*Paracalanus*
		Pontellidae	Pontellidae	*Labidocera*	*Labidocera*
		Calanidae	Tortanidae	*Parvocalanus*	*Tortanus*
		Acartiidae		*Calanus*	
		Centropagidae		*Acartia*	
		Temoridae		*Centropages*	
		Pseudodiaptomidae		*Eurytemora*	
		Diaptomidae		*Anomalocera*	
			Pseudodiaptomus		
			Neodiaptomus		
			Sinocalanus		
			Pontella		
剑水蚤目 Cyclopoida	剑水蚤目 Cyclopoida	Oithonidae	Oithonidae	*Oithona*	*Oithona*
		Anthessiidae		*Anthessius*	
		Cyclopidae		*Thermocyclops*	
		Rhynchomolgidae		*Mesocyclops*	
			Critomolgus		
			Macrocyclops		
鞘口水蚤目 Poecilostomatoida	鞘口水蚤目 Poecilostomatoida	Corycaeidae	Corycaeidae	*Ditrichocorycaeus*	*Ditrichocorycaeus*
		Clausidiidae		*Conchyliurus*	
		Synaptiphilidae		*Synaptiphilus*	
		Pseudanthessiidae		*Pseudanthessius*	
		Lichomolgidae		*Hemicyclops*	
		Sapphirinidae		*Modiolicola*	
		Taeniacanthidae		*Copilia*	
		Bomolochidae		*Pseudotaeniacanthus*	
		Catiniidae		*Corycaeus*	
			Nothobomolochus		
			Catinia		
			Herrmannella		
管口虱目 Siphonostomatoida		Dinopontiidae		*Stenopontius*	
		Hatschekiidae		*Hatschekia*	

Mol. Iden:分子鉴定 Molecular identification;Mor. Iden.:形态鉴定 Morphological identification

基于高通量测序的宏条形码分子鉴定方法每个采样点平均鉴定出 19 个属,样点间的属数变异为 15—22,而基于形态学方法每个采样点平均鉴定出 4 个属,样点间的属数变异为 3—5(表 2)。利用形态学方法鉴定出来的大部分类别(目:100%、科:80%、属:80%)同时能用分子方法鉴定出来,而分子方法鉴定出的大部分类别(目:25%、科:83%、属:88%)却不能用形态学方法鉴定出来(表 1)。对于物种多样性指数,基于分子鉴定的物种丰度指数均高于基于形态学特征鉴定的结果(图 7,表 2)。同时,基于分子方法鉴定的平均香浓维纳指数(1.52±0.23)也高于基于形态学鉴定的结果(1.32±0.32)(表 2)。对于大部分采样点,基于分子方法鉴定的香浓维纳指数与基于形态学方法鉴定得出的香浓维纳指数差异较小,只有在较少的采样点(1、2、3、4 及 15)中发现两种方法鉴定的结果存在较大的差异(图 8)。

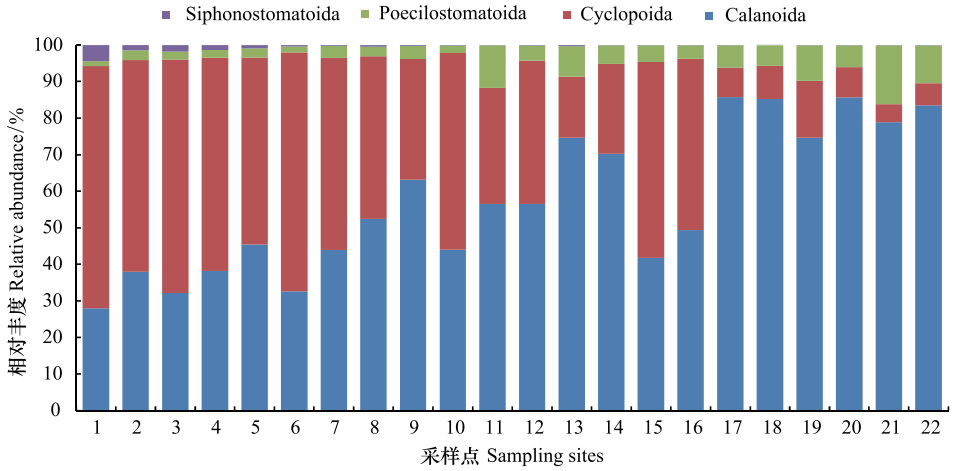

图 3　在目水平分子鉴定物种相对丰度

Fig.3　Histogram of relative abundance for each sampling site based on metabarcoding method at the order level

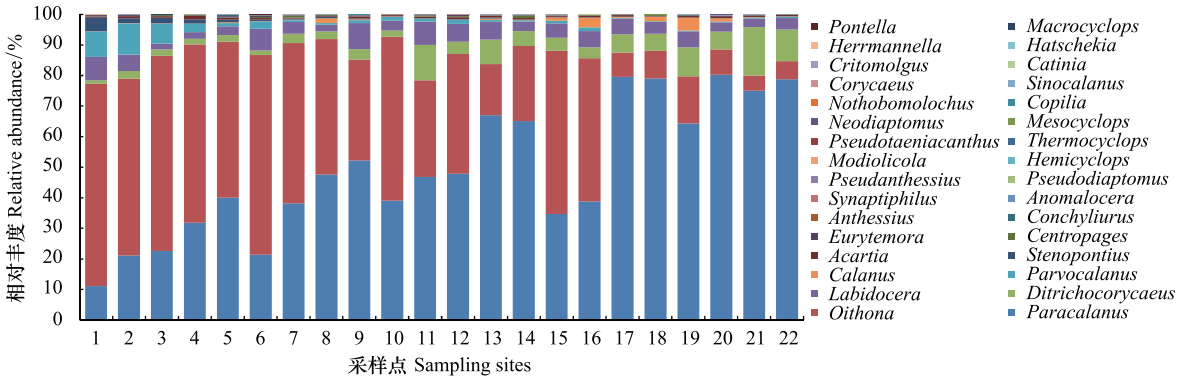

图 4　在属水平分子鉴定物种相对丰度

Fig.4　Histogram of relative abundance for each sampling site based on metabarcoding method at the genera level

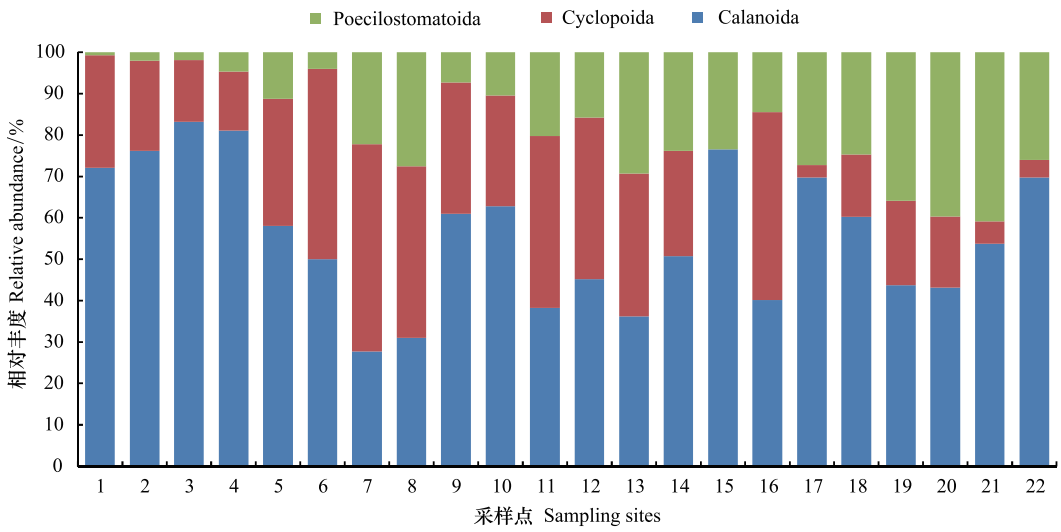

图 5　在目水平形态鉴定物种相对丰度

Fig.5　Histogram of relative abundance for each sampling site based on morphological method at the order level

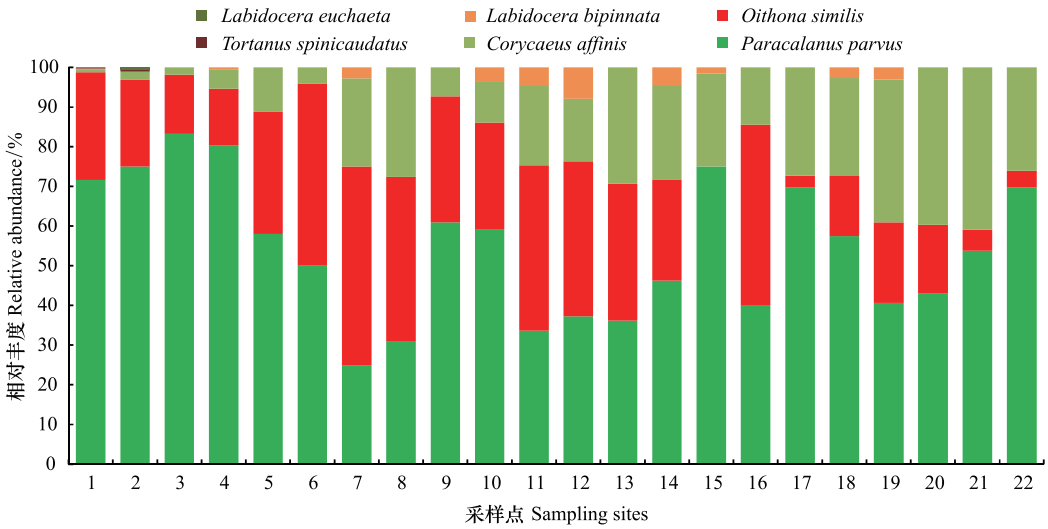

图 6 在种水平形态鉴定物种相对丰度

Fig.6 Histogram of relative abundance for each sampling site based on morphological method at the species level

表 2 基于宏条形码分子鉴定和形态学鉴定浮游桡足类在属水平的多样性指数

Table 2 Diversity index based on both metabarcodng technique and morphological identification at genera level

采样点 Sampling sites	种类数 Taxon number		种类丰度 Taxon abundance		香浓维纳指数 Shannon-Wiener index	
	分子鉴定 Mol. Iden.	形态鉴定 Mor. Iden.	分子鉴定 Mol. Iden.	形态鉴定 Mor. Iden.	分子鉴定 Mol. Iden.	形态鉴定 Mor. Iden.
1	22	5	1.93	0.36	1.70	0.95
2	18	5	1.57	0.36	1.84	0.99
3	20	3	1.78	0.18	1.59	0.74
4	17	4	1.48	0.29	1.56	0.91
5	17	3	1.46	0.21	1.58	1.33
6	21	3	1.83	0.20	1.56	1.20
7	18	4	1.64	0.34	1.56	1.63
8	18	3	1.68	0.22	1.53	1.56
9	19	3	1.66	0.23	1.71	1.24
10	17	4	1.46	0.31	1.44	1.47
11	19	4	1.68	0.31	1.87	1.72
12	20	4	1.74	0.29	1.69	1.77
13	19	3	1.65	0.22	1.54	1.58
14	20	4	1.74	0.33	1.46	1.71
15	18	3	1.60	0.22	1.64	0.90
16	19	3	1.68	0.20	1.76	1.45
17	20	3	1.79	0.22	1.14	1.03
18	18	4	1.53	0.34	1.18	1.51
19	21	4	1.83	0.34	1.68	1.68
20	20	3	1.84	0.23	1.14	1.49
21	22	3	1.89	0.22	1.21	1.24
22	15	3	1.31	0.21	1.13	1.06

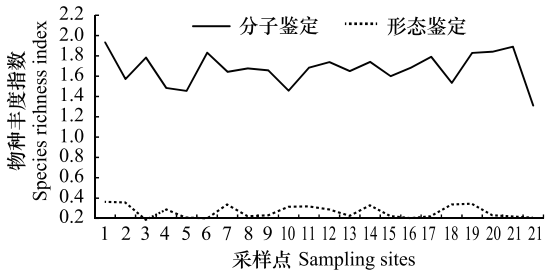

图 7　分子和形态鉴定结果的物种丰度比较

Fig.7　Variation of species richness index along the sampling sites based on both metabarcoding and morphological methods

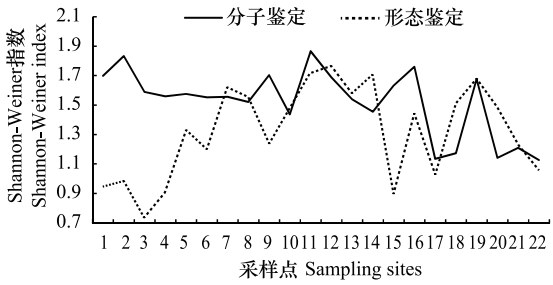

图 8　分子鉴定和形态鉴定结果的香浓维纳指数比较

Fig. 8　Variation of Shannon-Wiener index along the sampling sites based on metabarcoding and morphological methods

而在一致性方面,对于所有采样点,基于分子鉴定与基于形态鉴定得出的多样性指数没有显著的一致性($r=0.080$, $P=0.723$,图 9)。但当排除香浓维纳指数差异较大的少量采样点(1、2、3、4 及 15,22.73%),只关注差异较小的多数样点(77.27%)时,基于分子与基于形态的香浓维纳指数呈现显著的一致性($r=0.542$, $P=0.024$,图 10)。

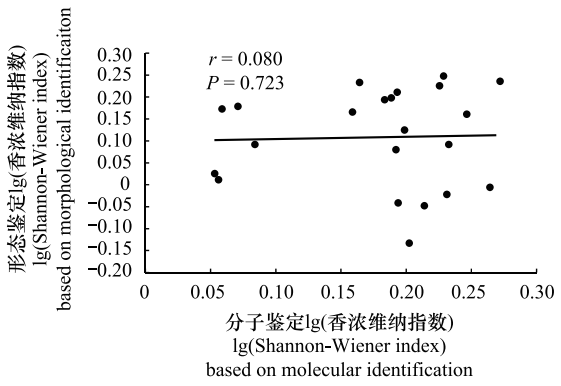

图 9　基于所有采样点分子鉴定与形态鉴定的香浓维纳指数相关性

Fig.9　Correlation of Shannon-Wiener index between metabarcoding and morphological methods for all sampling sites

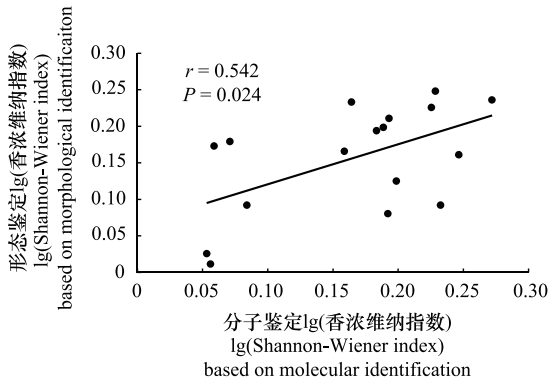

图 10　基于大部分采样点(77.28%)分子鉴定与形态鉴定的香浓维纳指数相关性

Fig.10　Correlation of Shannon-Wiener diversity index between metabarcoding and morphological methods for most sampling sites (77.28%)

3　讨论

DNA 宏条形码技术基于标准化 DNA 序列进行 PCR 扩增、高通量测序和比对,可以实现不同物种的批量鉴定。伴随着高通量测序技术的发展和 DNA 条形码数据库的扩充,宏 DNA 条形码可以同时完成批量样品中批量物种的分子种类鉴定,从而实现全面、快速评估群落种类组成和物种多样性的目的。利用 DNA 宏条形码进行种类鉴定需要选择合适的标准序列和相应的通用引物,标准序列需要具备足够的种间 DNA 变异,通用引物需要实现不同类群的高效扩增。由于 DNA 条形码在不同类群的分辨率和通用性不同,目前尚未找到适用于所有分类阶元的通用引物。海洋浮游动物 DNA 条形码研究常用的标准序列包括 LSU、SSU 和 COI 等[12]。虽然 COI 具有较高的物种分辨率,但因其物种间具有较大的序列变异,导致无法在较广的分类单元上设计出通用引物,这限制了其在宏条形码分子鉴定中的应用。尽管 SSU 物种分辨率不及 COI,但可以设计出通用性较好的引物,可较好地用于物种多样性的评价。本文选取的 Uni18S-Uni18SR[20] 已广泛应用于海洋及淡水生

物多样性的评价中[24-25]。虽然此引物并不能将所有物种鉴定到种的水平,但对大部分种类而言鉴定到科及属水平具有较高可信度[20-21]。利用此引物进行宏条形码的测定及分析鉴定出了大量的物种类别,宏条形码分子方法鉴定出的物种丰度明显高于形态学鉴定出的物种丰度:基于分子鉴定出的桡足类的类别在科及属水平上明显多于形态学鉴定,发现了基于形态学特征无法鉴定出的管口水蚤目,且鉴定出了基于形态学特征无法分类的幼虫期桡足类。此结果与国外在浮游动物、底栖生物及浮游藻类的研究结果一致[26-28]。这些发现表明基于高通量测序的分子鉴定方法可揭示出传统基于形态学特征鉴定方法无法揭示出的物种多样性。

本研究中,虽然对于小部分采样点(22.73%),基于分子的多样性指数高于形态鉴定出的多样性指数;但对于大部分采样点(77.27%),基于分子的多样性指数均低于形态鉴定出的多样性指数,并且变化趋势呈现显著的一致性($r=0.542$, $P=0.024$)。国外的研究中也普遍发现类似的结果[29-30]。Lejzerowicz 等[30]在苏格兰的利斯莫尔岛海域采集了 10 个样品,通过比较基于宏条形码和形态学鉴定的结果发现,基于两种方法得出的生物评价指数(Infaunal Trophic Index 和 AZTI Marine Biotic Index)具有较高的一致性($P < 0.01$)。这些结果表明在海洋浮游动物多样性评价中,分子鉴定的结果与形态鉴定的结果具有较好的可比性。

与形态学鉴定方法相比,分子鉴定除了具有省时、省力、不需要专业的形态学鉴定人员等优点外[12,18,30-31],还具有能鉴定出光学显微镜下难以发现的物种的优点,致使鉴定出的种类丰度明显高于形态学鉴定出的结果。本研究中利用形态鉴定得到的分类阶元多数(目:100%、科:80%、属:80%)能用宏条形码方法鉴定出来,而分子方法鉴定得到的分类阶元多数(目:25%、科:83%、属:88%)却未能用形态鉴定出来基于宏条形码方法得出,此结果进一步证实了这个观点的正确性。且宏条形码鉴定方法已在国外的海洋生物多样性评价中得到了广泛的应用[16-18],在我国海洋浮游动物多样性评价中具有较高的应用潜力。

在海洋浮游动物多样性评价所需成本方面,我们估算了鉴定每份浮游动物样本所需的时间成本和经济成本(表 3),根据国家海洋局印发的《海域使用论证收费标准(试行)》,对于浮游动物的鉴定,每个站位的样品(包含 I 型网和 II 型网两份样品)鉴定需要花费 1500 元,每个样品的鉴定费用也将约在 750 元。而利用宏条形码分子鉴定,一个站位的花费仅为 103—203 元(建库费用 60 元+Miseq 测序费用 135 元/Hiseq 测序费用 35 元+分析费用 8 元),约是采用形态学方法所需花费的 1/13—1/27 之间。而随着测序成本的不断降低及形态学鉴定所需人工成本的不断增加,这种差距还将持续增加。根据我国海洋监测机构反映,完成 1 个浮游动物样品物种鉴定及多样性分析的时间为 1.5—3 个小时,而利用宏条形码技术完成 22 份浮游动物样品分析总共需要一个普通环境监测人员 20 个小时(8 个小时建库+12 小时数据分析),平均每份样品花费约 1 小时。从时间成本考虑,利用宏条形码技术所需的时间仅为形态学鉴定的 1/3—1/2,表明利用宏条形码技术极大地提高了浮游动物分析工作的效率。

表 3 基于宏条形码和形态学鉴定方法的每份浮游动物样本所需金钱成本与时间成本

Table 3 Economical and time cost of analyzing one zooplankton sample based on both metabarcoding and morphological methods

	分子鉴定方法 Molecular identification	形态学方法 Morphological identification
金钱成本 Economical cost	103—203 元	750 元
时间成本 Time cost	1 h(普通环境监测人员)	1.5—3 h(海洋监测机构人员)

目前 DNA 宏条形码鉴定技术在我国海洋浮游动物业务化监测应用,仍有几个方面有待于提升。首先,同一个种的不同地理种群会因遗传漂变、建群者效应及自然选择等进化生态学过程发生遗传分化[32-34],尤其在较大的地理尺度上如大洋、区域甚至国家之间[35]。如果遗传分化发生在宏条形码所选择的引物区间,欧美国家所构建的参考数据库可能就会不适用于我国。所以,宏条形码鉴定方法可靠的前提是建立我国甚至我国特定海域的条形码数据库。其次,本研究中,对于浮游动物类群,之所以一部分形态学鉴定出的种类没有被宏条形码方法鉴定出,可能是因为数据库中没有对应的物种序列,也有可能是因为本研究中所采用的宏条形码引物序列并不能与这些物种的相应的序列很好的匹配。所以,在今后的研究工作中应根据我国海域浮游动物条

形码的序列特征,对现有的宏条形码引物进行改进或者重新设计适应于我国海域浮游动物分子特征的引物,以提高宏条形码方法鉴定物种类别的覆盖度,另外,构建本地化 DNA 条形码数据库也是开展基于 DNA 条形码浮游动物种类业务化监测的必要条件。最后,在 PCR 扩增及高通量测序过程均会产生假阳性及假阴性的错误,虽然 PCRfree 建库策略能有效减少假阳性的错误[21],但在高通量测序过程中容易丢失丰度较低的物种而引起假阴性,在未来的生物信息学领域,通过改进现有软件或开发新软件有望降低这些过程所引起的错误。

现阶段,形态学鉴定方法是我国海洋浮游生物多样性监测的主要手段。因其在生物多样性评价中存在许多方面的缺陷,尤其比较耗时费力,致使很难在短期内完成大尺度多样品的多样性评价工作。而基于高通量测序的宏条形码方法提供了可供选择的海洋浮游生物多样性快速评价方法。虽然宏条形码技术具有其固有缺陷,如不能反映生物的生长阶段,无法准确对浮游生物进行准确定量等。但因其具有鉴定效率高、花费较低等优点使其有望在未来成为一种互补甚至替代现有评价方法的技术体系。随着宏条形码技术体系的不断完善,我国有可能在海洋浮游生物多样性评价方法方面打破既有的体系,形成新的技术体系及规范。

参考文献(References):

[1] 李少菁, 许振祖, 黄加祺, 曹文清, 陈钢, 柯才焕, 陈丽华. 海洋浮游动物学研究. 厦门大学学报: 自然科学版, 2001, 40(2): 574-585.

[2] Peterson J, Griffis R, Zador S G, Sigler M F, Joyce J E, Hunsicker M, Bograd S, Crozier L G, McClatchie S, Morris J A Jr, Peterson W T, Price C, Woodworth-Jefcoats P A, Karnauskas M, Muñoz R C, Schueller A M, Craig J K, Bacheler N, Burton M L, Gore K, Kellison T, Hare J, Friedland K D, Miller T J. Climate change impacts on fisheries and aquaculture of the United States//Phillips B F, Pérez-Ramírez M, eds. Climate Change Impacts on Fisheries and Aquaculture: A Global Analysis. Chichester, West Sussex: Wiley Blackwell, 2017.

[3] 祁帆, 李晴新, 朱琳. 海洋生态系统健康评价研究进展. 海洋通报, 2007, 26(3): 97-104.

[4] Grosjean P, Picheral M, Warembourg C, Gorsky G. Enumeration, measurement, and identification of net zooplankton samples using the ZOOSCAN digital imaging system. ICES Journal of Marine Science, 2004, 61(4): 518-525.

[5] 李超伦, 王敏晓, 程方平, 孙松. DNA 条形码及其在海洋浮游动物生态学研究中的应用. 生物多样性, 2011, 19(6): 805-814.

[6] 韩庚辰, 樊景凤. 我国近岸海域生态环境现状及发展趋势. 北京: 中国海洋出版社, 2016.

[7] 孙晓霞, 孙松, 王世伟, 刘梦坛, 赵永芳. 图像自动识别技术在胶州湾浮游动物生态学研究中的应用. 海洋与湖沼, 2011, 42(5): 647-653.

[8] 陈钢. 海洋生物中的隐藏生物多样性与物种形成: 终生浮游生物悖论(英文). 厦门大学学报: 自然科学版, 2006, 45(S2): 68-76.

[9] Bucklin A, Lindeque P K, Rodriguez-Ezpeleta N, Albaina A, Lehtiniemi M. Metabarcoding of marine zooplankton: prospects, progress and pitfalls. Journal of Plankton Research, 2016, 38(3): 393-400.

[10] 张宛宛, 谢玉为, 杨江华, 杨雅楠, 李娣, 张咏, 于红霞, 张效伟. DNA 宏条形码(metabarcoding)技术在浮游植物群落监测研究中的应用. 生态毒理学报, 2017, 12(1): 15-24.

[11] Djurhuus A, Pitz K, Sawaya N A, Rojas-Múrquez J, Michaud B, Montes E, Muller-Karger F, Breitbart M. Evaluation of marine zooplankton community structure through environmental DNA metabarcoding. Limnology and Oceanography Methods, 2018, 16(4): 209-221.

[12] 林森杰, 王路, 郑连明, 董云伟, 柳淑芳, 丁少雄, 叶乃好, 曹文清, 庄志猛. 海洋生物 DNA 条形码研究现状与展望. 海洋学报, 2014, 36(12): 1-17.

[13] Hering D, Borja A, Jones J I, Pont D, Boets P, Bouchez A, Bruce K, Drakare S, Hänfling B, Kahlert M, Leese F, Meissner K, Mergen P, Reyjol Y, Segurado P, Vogler A, Kelly M. Implementation options for DNA-based identification into ecological status assessment under the european water framework directive. Water Research, 2018, 138: 192-205.

[14] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, deWaard J R. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of B: Biological Sciences, 2003, 270(1512): 313-321.

[15] Taberlet P, Coissac E, Pompanon F, Gielly L, Miquel C, Valentini A, Vermat T, Corthier G, Brochmann C, Willerslev E. Power and limitations of the chloroplast *trn* L (UAA) intron for plant DNA barcoding. Nucleic Acids Research, 2007, 35(3): e14.

[16] Amaral-Zettler L A, McCliment E A, Ducklow H W, Huse S M. A method for studying protistan diversity using massively parallel sequencing of V9 hypervariable regions of small-subunit ribosomal RNA genes. PLoS One, 2009, 4(7): e6372.

[17] Fonseca V G, Carvalho G R, Sung W, Johnson H F, Power D M, Neill S P, Packer M, Blaxter M L, Lambshead P J D, Thomas W K, Creer S. Second-generation environmental sequencing unmasks marine metazoan biodiversity. Nature Communications, 2010, 1(7): 98.

[18] Abad D, Albaina A, Aguirre M, Laza-Martínez A, Uriarte I, Iriarte A, Villate F, Estonba A. Is metabarcoding suitable for estuarine plankton

monitoring? A comparative study with microscopy. Marine Biology, 2016, 163(7): 149.

[19] Gao Y C, Dong Y H, Li H T, Zhan A B. Influence of environmental factors on spatial-temporal distribution patterns of dinoflagellate cyst communities in the South China Sea. Marine Biodiversity, 2019, 49(2): 769-781.

[20] Zhan A B, Hulák M, Sylvester F, Huang X T, Adebayo A A, Abbott C L, Adamowicz S J, Heath D D, Cristescu M E, MacIsaac H J. High sensitivity of 454 pyrosequencing for detection of rare species in aquatic communities. Methods in Ecology and Evolution, 2013, 4(6): 558-565.

[21] Zhan A B, Bailey S A, Heath D D, Macisaac H J. Performance comparison of genetic markers for high-throughput sequencing-based biodiversity assessment in complex communities. Molecular Ecology Resources, 2014, 14(5): 1049-1059.

[22] Větrovský T, Baldrian P. The variability of the 16S rRNA gene in bacterial genomes and its consequences for bacterial community analyses. PLoS One, 2013, 8(2):e57923.

[23] Clarke K R, Gorley R N. PRIMER V5: User Mannual/Tutorial. Plymouth: PRIMER-E Limited, 2001.

[24] Peng H, Xiong W, Zhan A B. Fine-scale environmental gradients formed by local pollutants largely impact zooplankton communities in running water ecosystems. Aquatic Biology, 2018, 27: 43-53.

[25] Xiong W, Ni P, Chen Y Y, Gao Y C, Shan B Q, Zhan A B. Zooplankton community structure along a pollution gradient at fine geographical scales in river ecosystems: the importance of species sorting over dispersal. Molecular Ecology, 2017, 26(16): 4351-4360.

[26] Šigut M, Kostovčík M, Šigutová H, Hulcr J, Drozd P, Hrček J. Performance of DNA metabarcoding, standard barcoding, and morphological approach in the identification of host-parasitoid interactions. PLoS One, 2017, 12(12): e0187803.

[27] Zimmermann J, Glöckner G, Jahn R, Enke N, Gemeinholzer B. Metabarcoding vs. morphological identification to assess diatom diversity in environmental studies. Molecular Ecology Resources, 2015, 15(3): 526-542.

[28] Cahill A E, Pearman J K, Borja A, Carugati L, Carvalho S, Danovaro R, Dashfield S, David R, Féral J P, Olenin S, Šiaulys A, Somerfield P J, Trayanova A, Uyarra M C, Chenuil A. A comparative analysis of metabarcoding and morphology-based identification of benthic communities across different regional seas. Ecology and Evolution, 2018, 8(17): 8908-8920.

[29] Simberloff D, Martin J L, Genovesi P, Maris V, Wardle D A, Aronson J, Courchamp F, Galil B, García-Berthou E, Pascal M, Pyšek P, Sousa R, Tabacchi E, Vilà M. Impacts of biological invasions: what's what and the way forward. Trends in Ecology & Evolution, 2013, 28(1): 58-66.

[30] Lejzerowicz F, Esling P, Pillet L, Wilding T A, Black K D, Pawlowski J. High-throughput sequencing and morphology perform equally well for benthic monitoring of marine ecosystems. Scientific Reports, 2015, 5: 13932.

[31] 高养春, 董燕红, 李海涛, 战爱斌. 有害甲藻孢囊的分类鉴定研究进展. 生物安全学报, 2016, 25(4): 238-254.

[32] Benestan L, Quinn B K, Maaroufi H, Laporte M, Clark F K, Greenwood S J, Rochette R, Bernatchez L. Seascape genomics provides evidence for thermal adaptation and current-mediated population structure in American lobster (*Homarus americanus*). Molecular Ecology, 2016, 25(20): 5073-5092.

[33] Moran E V, Alexander J M. Evolutionary responses to global change: lessons from invasive species. Ecology Letters, 2014, 17(5): 637-649.

[34] Sandoval-Castillo J, Robinson N A, Hart A M, Strain L W S, Beheregaray L B. Seascape genomics reveals adaptive divergence in a connected and commercially important mollusc, the greenlip abalone (*Haliotis laevigata*), along a longitudinal environmental gradient. Molecular Ecology, 2018, 27(7): 1603-1620.

[35] Vera M, Díez-del-Molino D, García-Marín J L. Genomic survey provides insights into the evolutionary changes that occurred during European expansion of the invasive mosquitofish (*Gambusia holbrooki*). Molecular Ecology, 2016, 25(5): 1089-1105.