DOI: 10.5846/stxb201911022308
孙鹏,凌建忠,张辉,唐保军,姜亚洲.基于高通量测序的象山港海域黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)食性分析.生态学报,2021,41(3):1221-1228.
Sun P, Ling J Z, Zhang H, Tang B J, Jiang Y Z.Diet composition and feeding habits of black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) in Xiangshan Bay based on high-throughput sequencing.Acta Ecologica Sinica,2021,41(3):1221-1228.

基于高通量测序的象山港海域黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*)食性分析

孙 鹏,凌建忠,张 辉,唐保军,姜亚洲*
中国水产科学研究院东海水产研究所,农业农村部东海与远洋渔业资源开发利用重点实验室, 上海 200090

摘要:选取象山港黑鲷个体为研究对象,以 18S rDNA 为靶标,利用 Illumina Miseq 高通量测序方法研究黑鲷饵料生物组成特征,分析不同龄组黑鲷的食性异同。通过序列比对,共在黑鲷胃含物中鉴定出 41 个属中的 62 种饵料生物,分属 9 个门,其中节肢动物门(Arthropoda)、绿藻门(Chlorophyta)和软体动物门(Mollusca)是黑鲷饵料生物的优势组成门类。从饵料生物相对丰度和出现频率上分析,石莼(*Ulva lactuca*)、熊本牡蛎(*Crassostrea sikamea*)、胸刺水蚤(*Centropages hamatus*)、日本蟳(*Charybdis japonica*)、毛蚶(*Scapharca subcrenata*)和褐菖鲉(*Sebastiscus marmoratus*)是黑鲷的优势饵料物种,所占饵料生物总相对丰度的比重达 60.90%。相似性分析检验(ANOSIM)结果显示:1 至 4 龄黑鲷个体的饵料生物组成不存在显著性差异。与传统食性分析方法相比,高通量测序法在黑鲷饵料生物检测灵敏性上显现了较为明显的优势,保障黑鲷等重要物种的种群稳定对于该海域具有重要的生态和经济意义。

关键词:黑鲷;食性;高通量测序;胃含物

Diet composition and feeding habits of black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*) in Xiangshan Bay based on high-throughput sequencing

SUN Peng, LING Jianzhong, ZHANG Hui, TANG Baojun, JIANG Yazhou*
Key Laboratory of East China Sea and Oceanic Fishery Resources Exploitation, Ministry of Agriculture, East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, *China*

Abstract: Xiangshan Bay is a semi-closed bay in the central coast of Zhejiang Province, China. It is also a centralized distribution area of various fishery resources, and many economic fish species breeding there every year. However, due to long-term overfishing, ocean development and environmental pollution, deterioration of ecological environment was found in this sea area, which also caused the increasingly recession of local fishery resources. In recent years, after fishery resources conservation, fishery resources in this water have been restored. It also provides a good habitat for reef-loving species such as the black sea bream *Acanthopagrus schlegelii*. *A. schlegelii* is an important fish species targeted by recreational and commercial fisheries in Xiangshan Bay. Maintaining population stability of this species is economically and ecologically important for the embayment. Knowledge of the feeding ecology is of great value for conservation strategies, as it is thoroughly linked to subjects such as resource partitioning, habitat preferences, prey selection, predation, competition and energy transfer within and between ecosystems. However, relatively little work has been done on this aspect in *A. schlegelii*. In this study, 21 individuals of *A. schlegelii* were collected in Xiangshan Bay, and diet composition and feeding habits were

基金项目:中国水产科学研究院基本科研业务费(2019ZD1102);国家公益性行业(农业)科研专项经费项目(201303047);上海市自然科学基金项目(17ZR1439500)
收稿日期:2019-11-02; **网络出版日期**:2020-12-14
* 通讯作者 Corresponding author.E-mail: yazhoujiang@ 163.com

analyzed by high-throughput sequencing methods targeting 18S rDNA gene. By Illumina high-throughput sequencing, 913,254 target fragments with length of about 420 bp were obtained. The minimum sequence number of samples was 30,826, while the maximum one was 52,374. A total of 554 OTU (operational taxonomic units) were obtained from 21 samples after clustering. And 62 species in 9 categories were identified in the stomach contents of this species after sequence alignment, in which Mollusca, Arthropoda and Chlorophyta exhibited the highest abundance, followed by Chordata, Platyhelminthes, Bacillariophyta and Annelida. *Ulva lactuca*, *Crassostrea sikamea*, *Centropages hamatus*, *Charybdis japonica*, *Scapharca subcrenata* and *Sebastiscus marmoratus* were dominant prey items for *A. schlegelii* in Xiangshan Bay. The above prey items accounted for 60.90% of the total abundance of gastric contents. In addition, a number of species, including *Caprella scaura*, *Oithona* sp., *Melosira* sp., *Cyclotella* sp., *Chlorella stigmatophora*, *Picochlorum* sp., *Torodinium robustum*, and *Chromadorina* sp., with quite low abundance were also detected. These prey items were distributed in different ecological communities, including macroalgae, shellfish, zooplankton, phytoplankton, macrozoobenthos, fish, and crab. These data suggests that *A. schlegelii* is a relatively large omnivorous consumer. Result from the analysis of similarities (ANOSIM) showed no significant difference in diet composition for fish among different age groups. This indicates that *A. schlegelii* did not alter feeding habits after 1 year old. Considering the limited sample size, however, further studies are still needed to address this conclusion. Compared with the traditional analysis methods, high-throughput sequencing has the characteristics of less sample demand, less workload, and more species detection. Meanwhile, due to its sensitivity, some species with low abundance that could not be found by traditional methods can also be detected. Hence, high-throughput sequencing technology has obvious advantages in fish diet studies and can provide strong support for marine organisms feeding and ecological studies.

Key Words: black sea bream; feeding habits; high-throughput sequencing; stomach content

黑鲷(*Acanthopagrus schlegelii*, Bleeker, 1854)隶属于鲈形目(Perciformes),鲷科(Sparidae)、棘鲷属(*Acanthopagrus*),为暖温性底层鱼类,栖息于近岸岩礁海区、内湾以及咸淡水水域,广泛分布于包括我国沿海在内的西北太平洋温暖水域[1],为我国东南沿海重要的捕捞品种和增养殖对象[2-4]。象山港位于我国浙江中部沿海,是一个半封闭性港湾,其自然生态环境优良,是多种渔业资源的集中分布区,也是多种经济鱼类的繁殖、育幼场所[5-6]。黑鲷是象山港的优势鱼种和重要捕捞对象,在生态系统物质循环和能量流动过程中起着重要作用[7]。近年来,象山港所面临的人为胁迫日趋严重,在此背景下保障黑鲷等重要物种的种群稳定对于该海域具有重要的生态和经济意义。

鱼类基础生态学研究是制定鱼类资源增殖养护策略的科学依据[8]。摄食习性作为基础生态学的重要研究内容,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、构建栖息地选择模型等相关热点问题的重要依据[9-12]。食性分析方法的准确性和精确性是影响分析结果应用价值的重要因素[13]。近年来,随着高通量测序技术的发展,该技术逐渐被应用到野生动物的食性分析中,有效提升了食性分析的效率,拓宽了食性分析的应用范围,并在数据量、灵敏度和分辨率方面较传统的食性分析方法显现出一定的优势[14]。

针对黑鲷食性研究的薄弱现状,以象山港采捕黑鲷个体为研究对象,以 18S rDNA 为靶标,利用 Illumina Miseq 高通量测序方法探究黑鲷饵料生物组成特征,分析不同龄组黑鲷食性的异同,以期在丰富象山港黑鲷摄食生态学认知的同时,为制定该海域黑鲷资源增殖养护措施提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集

实验所用样品为 2019 年 3 至 4 月份通过桁杆拖网和流刺网收集于浙江宁波象山港海域的黑鲷渔获样

本,本次研究共选取其中 21 尾用于食性分析。为保持样品新鲜及胃含物不被进一步分解,捕捉后立即使用丁香酚麻醉处死并于现场进行常规生物学测量(体长、体重、性别、胃重、空胃重等),随即解剖取得胃含物于干冰中保存备用。与此同时,采集矢耳石用于年龄鉴定。参考海洋调查[15]规范将黑鲷渔获样品摄食强度分为 5 级(0 级—4 级),分别对应空胃、食物不超过胃腔 50%、食物超过胃腔 50%、食物充满不膨胀和食物充满胃腔并且膨胀等五种状态。对胃饱满度高的黑鲷个体,将含量较多的食物物种进行单独称重,再从其中定量选取一部分与其他含量少的物种一起混合保存于无菌离心管中;对胃饱满度较低的个体,将所有胃含物一起收集;称量并记录离心管中样品重量;对空胃个体取其胃内粘液进行测序分析。实验黑鲷样品的生物学信息如表 1 所示。

表 1　黑鲷样品基础生物学信息

Table 1　Biological information of black sea bream samples

样品编号 Sample number	年龄/a Age	体长 Body length/cm	体重 Weight/g	摄食强度 Feeding intensity
1	1	14.2	77.2	1
2	1	11.1	40.5	3
3	1	16.3	120.1	3
4	1	16.8	136.6	0
5	1	15.6	105.3	0
6	1	19.6	238.2	2
7	1	184	209.6	4
8	2	28.6	751.4	1
9	2	24.5	517.2	0
10	2	20.5	246.1	1
11	2	29.5	816.3	1
12	2	22.5	295.6	4
13	3	34.8	1310.6	3
14	3	35.3	1349.1	0
15	3	36.8	1703.1	3
16	3	32.5	992	4
17	3	35.4	1549.3	1
18	4	39.7	2229.6	4
19	4	41.2	2311.2	1
20	4	37.5	1901.4	4
21	4	39.8	2341.5	3

1.2　DNA 提取

胃含物在实验室中经磷酸盐缓冲液(pH 7.2—7.6)冲洗后进行匀浆处理。充分匀浆后的胃含物经定量后采用海洋生物 DNA 提取试剂盒(北京天根)并参照说明书进行总 DNA 提取。所得总 DNA 经 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测,并采用紫外分光光度计定量,随后于-20℃保存备用。

1.3　Illumina Miseq 高通量测序

使用扩增片段约为 420 bp 的通用引物 547F: 5′-CCAGCASCYGCGGTAATTCC- 3′ 和 V4R: 5′-ACTTTCGTTCTTGATYRA-3′[16]对 18S rDNA V4 区域进行扩增。PCR 反应在一个 20 μL 体系中进行,反应体系如下:5×缓冲液 4 μL,dNTPs(2.5 mmol/L)2 μL, 正反引物(5 μmol/L)各 1 μL,Q5 高保真 Taq 酶(NEB,北京) 0.5 μL,DNA 模板 10 ng。PCR 程序为:95℃预变性 7min,95℃变性 45 s,55℃退火 30 s,72℃延伸 45 s,最后 72℃延伸 10 min,反应循环数为 29。PCR 扩增产物通过 2%琼脂糖凝胶电泳进行检测和纯化后,在 Illumina Miseq 测序平台(Illumina,美国)进行双端测序。

1.4　数据分析

下机数据经过初步筛选并去除嵌合体后得到有效数据。应用 QIIME 软件对序列按照 97%的序列相似度

进行归并和操作分类单元(operational taxonomic units,OTU)划分,再选择 OTU 中的代表性序列与 Silva 数据库(http://www.arb-silva.de/)进行物种注释分析以及黑鲷自身序列剔除,并结合象山港海洋各生态类型水生生物分布信息对所注释物种进行人工校对[5]。并运用 QIIME 软件对所得 OTU 进行聚类以分析不同样品胃含物的物种组成。通过 OTU 分析可得出饵料生物的多样性和不同物种的相对丰度。

为分析不同龄组黑鲷饵料生物组成的差异,基于上述高通量测序结果,建立“个体×饵料生物相对丰度”矩阵,基于聚类分析对不同龄组黑鲷个体的饵料生物组成进行二维排序,并利用相似性分析检验(Analysis of similarities,ANOSIM)检验不同龄组黑鲷饵料生物组成差异的显著性[17-18]。为权衡稀有物种和优势物种的权重,在进行多元分析前,对原始数据进行了 4 次方根转化[19]。

2 结果

2.1 OTU 划分与分类地位鉴定

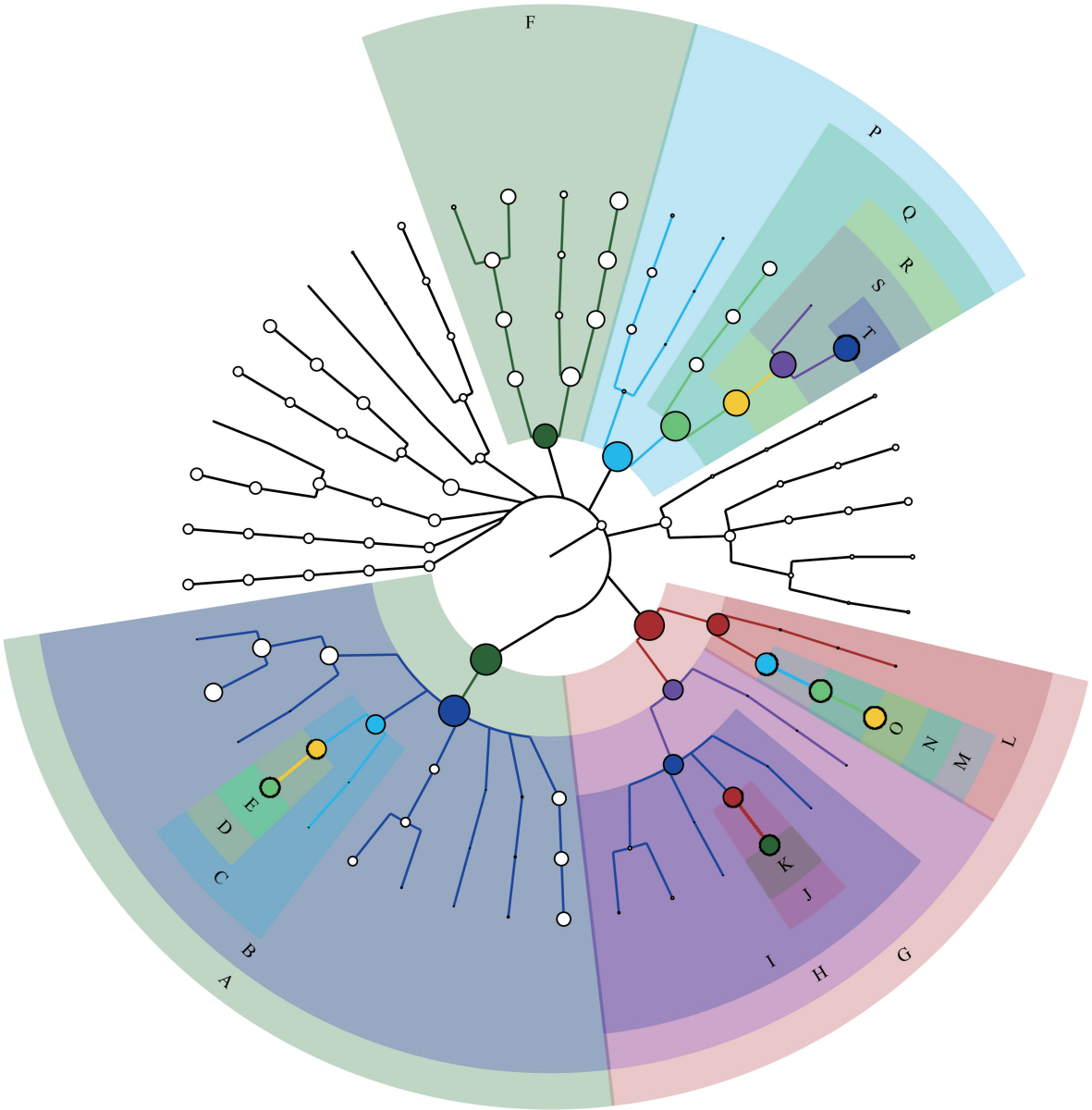
经 Illumina 高通量测序共从 21 个样品中获得长度约为 420 bp 的目的片段 913254 条,样品的序列数目最低为 30826 条,最高为 52374 条,平均序列数为(43488±5843)条。21 个样品经过聚类共获得 554 个 OTU,不同样品中含有 OTU 数目差异较大,其 OTU 划分和分类地位鉴定结果参见表 2。

表 2 可操作分类单划分和分类地位鉴定结果统计表

Table 2 Statistics of operational taxonomic units (OTU) identification and classification status

样品编号 Sample number	操作分类单元 Operational taxonomic units						
	门 Phylum	纲 Class	目 Order	科 Family	属 Genus	种 Species	未分类 Unclassified
1	2	2	2	2	2	2	0
2	73	73	73	73	73	73	0
3	70	71	72	72	72	72	0
4	17	17	17	17	17	17	0
5	31	31	31	31	31	31	0
6	3	3	3	3	3	3	0
7	87	77	87	87	87	87	0
8	3	2	3	3	3	3	0
9	11	9	11	11	11	11	0
10	18	16	14	14	18	18	0
11	1	1	1	1	1	1	0
12	14	14	14	14	14	14	0
13	7	6	7	7	7	7	0
14	9	9	9	9	10	10	0
15	29	28	24	24	29	29	0
16	49	49	49	49	49	49	0
17	6	6	6	6	6	6	0
18	29	30	27	27	30	30	0
19	11	11	11	11	11	11	0
20	7	7	8	8	8	8	0
21	11	12	11	11	12	12	0

图 1 所示为黑鲷胃含物样本所含饵料生物相对丰度前 20 位的分类单元的总体分类等级树图。以不同颜色区分各分类单元,并通过节点大小反映它们的相对丰度分布,可直观反应黑鲷饵料生物的优势类群。本研究利用高通量测序方法共在黑鲷胃含物中鉴定出 9 个门类的 62 种饵料生物,这些饵料生物分属于 41 个属。其中,软体动物门(Mollusca)、节肢动物门(Arthropoda)和绿藻门(Chlorophyta)的相对丰度较高,其次是脊索动物门(Chordata)、扁形动物门(Platyhelminthes)、硅藻门(Bacillariophyta)和环节动物门(Annelida),线虫动物门(Nematoda)的相对丰度较低,此外还有部分 OTU 未能归属到已知分类单元。



A 软体动物门 Mollusca
B 双壳纲 Bivalvia
C 牡蛎目 Ostreoida
D 牡蛎科 Ostreidae
E 巨蛎属 Crassostrea
F 脊索动物门 Chordata
G 节肢动物门 Arthropoda
H 软甲纲 Malacostraca
I 十足目 Decapoda
J 梭子蟹科 Portunidae
K 蟳属 Charybdis
L 六肢幼虫纲Hexanauplia
M 哲水蚤目Calanoida
N 胸刺水蚤科 Centropagidae
O 胸刺水蚤属 Centropages
P 绿藻门 Chlorophyta
Q 石莼纲 Ulvophyceae
R 石莼目Ulvales
S 石莼科 Ulvaceae
T 石莼属 Ulva

图 1　黑鲷饵料生物的总体分类等级树

Fig.1　General classification tree of prey items for the black sea bream

2.2　黑鲷饵料生物组成

表 3 列举了相对丰度排序前 20 位的黑鲷饵料生物种类。从饵料生物出现频率和相对丰度分析,石莼(*Ulva lactuca*)、熊本牡蛎(*Crassostrea sikamea*)、胸刺水蚤(*Centropages hamatus*)、日本蟳(*Charybdis japonica*)、毛蚶(*Scapharca subcrenata*)和褐菖鲉(*Sebastiscus marmoratus*)是象山港黑鲷最重要的饵料生物种类,其在黑鲷

胃含物中不仅出现的频率较高,而且相对丰度较大,6 个种类合计占据的黑鲷饵料生物相对丰度比重高达 60.90%。此外,还有部分饵料生物虽相对丰度较高但出现频率较低,如小刀蛏(*Cultellus attenuatus*)、平角涡虫(*Planocera multitentaculata*)、粗尾沟藻(*Torodinium robustum*)、尖尾全沟藻(*Teleaulax acuta*)和海洋线虫(*Chromadorina* sp.)等仅出现于单个样品中。

从饵料生物组成类型上看,象山港海域黑鲷食性较为复杂,摄食对象包含大型藻类(石莼等)、贝类(熊本牡蛎和毛蚶等)、浮游动物(胸刺水蚤等)、浮游植物(尖尾全沟藻等)、底栖动物(沙蚕 *Dendronereis* sp.等)、鱼类(褐菖鲉等)和蟹类(日本蟳等)等多个海洋生物类群,黑鲷展现了较为典型的杂食性特征。

表 3 黑鲷主要饵料物种的出现频率和相对丰度百分比

Table 3 Percentage of abundance and occurrence rate of dominant prey items for black sea bream

排序 Rank	饵料生物 Prey items	相对丰度百分比 Percentage of abundance/%	出现频率 Occurrence rate/%
1	石莼(*Ulva lactuca*)	15.40	61.90
2	胸刺水蚤(*Centropages hamatus*)	11.80	38.09
3	日本蟳(*Charybdis japonica*)	9.50	38.09
4	熊本牡蛎(*Crassostrea sikamea*)	8.90	28.57
5	毛蚶(*Scapharca subcrenata*)	7.90	38.09
6	褐菖鲉(*Sebastiscus marmoratus*)	7.4	80.95
7	乳突皮海鞘(*Molgula manhattensis*)	5.40	23.80
8	假根羽藻(*Bryopsis corticulans*)	4.70	9.52
9	锉蛤(*Lima* sp.)	4.70	14.28
10	尖尾全沟藻(*Teleaulax acuta*)	3.90	4.76
11	平角涡虫(*Planocera multitentaculata*)	3.5	19.05
12	沙蚕(*Dendronereis* sp.)	2.60	14.29
13	海洋线虫(*Chromadorina* sp.)	2.40	4.76
14	小刀蛏(*Cultellus attenuatus*)	2.10	4.76
15	粗尾沟藻(*Torodinium robustum*)	1.20	4.76
16	直链藻(*Melosira* sp.)	0.90	14.29
17	太平洋海链藻(*Thalassiosira pacifica*)	0.40	4.76
18	尖刺拟菱形藻(*Pseudo—nitzschia pungens*)	0.40	4.76
19	浒苔(*U. prolifera*)	0.20	33.33
20	日本大眼蟹(*Macrophthalmus japonicus*)	0.20	9.52

2.3 不同龄组黑鲷食性特征

在 1 至 4 龄组黑鲷样品中检出并鉴定饵料生物种类数分别 21、23、23 和 17 种。其中,石莼、熊本牡蛎、胸刺水蚤、日本蟳、毛蚶和褐菖鲉等重要饵料生物种类在 4 个龄组黑鲷样本中均有分布,上述种类在各龄组黑鲷饵料生物相对丰度中的占比为 44.3%—77.8%。各龄组黑鲷优势饵料生物种类组成略有差异,如 1 龄黑鲷个体优势饵料生物为胸刺水蚤(31.52%,相对丰度百分比,下同)、石莼(22.13%)和日本蟳(13.72%);2 龄黑鲷个体优势饵料生物为日本蟳(21.16%)、锉蛤(19.65%)和石莼(16.04%);3 龄黑鲷个体优势饵料生物为褐菖鲉(18.42%)、毛蚶(18.30%)和石莼(10.80%);4 龄黑鲷个体优势饵料生物为熊本牡蛎(58.21%)、石莼(8.35%)和褐菖鲉(3.44%)。

聚类分析结果如图 2 所示,象山港黑鲷个体的饵料生物组成并未呈现明显的龄组差异格局(横坐标表示个体的年龄)。相似性分析检验(ANOSIM)结果也显示:不同年龄组黑鲷的饵料生物组成差异尚未达到显著性水平($R=0.014$, $P=0.446$)。

3 讨论

鱼类营养供应是决定其生长发育的关键因素,也是影响渔业资源可持续产出的重要因子。食性分析方法的准确性和精确性直接关系到食性相关理论的探索,同时也关乎研究结果在鱼类保护实践过程中的应用。黑

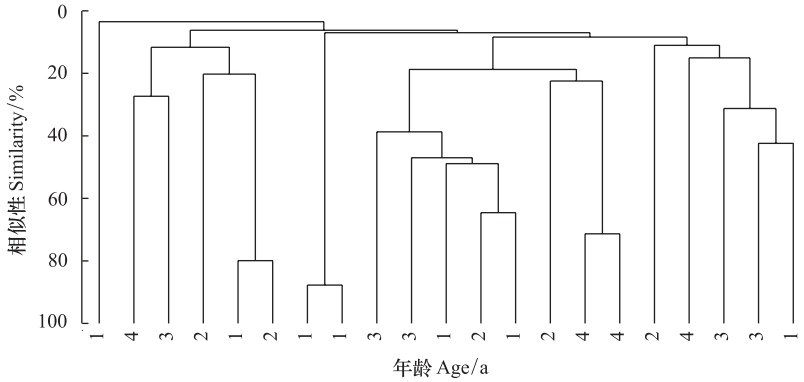


图 2　不同龄组黑鲷个体饵料生物组成的聚类分析图

Fig.2　Cluster of prey composition in black sea bream of different ages

鲷是我国近海重要的增殖养护对象,其增殖养护措施的精细化设置需要食性特征等基础生态学理论的支撑。目前,国内关于黑鲷在自然海域摄食习性的研究仅见于柏怀萍[20]等利用胃含物分析法的相关研究报道,胃含物分析法虽具简便易操作的特点,可对个体较大且消化程度较低的胃含物直接根据形态特征加以判别,但对消化较为充分的胃含物则仅能通过耳石、眼珠、残肢等一些难以消化的残留物进行鉴定,精确性存在较大欠缺[21-24]。近年来,食性分析方法也在不断改进和更新[25-29],高通量测序法因其高效性受到研究人员的青睐。本研究利用高通量测序法在鱼类食性分析过程所具备的高灵敏度的技术特点,对象山港黑鲷的饵料生物组成进行探索研究,研究结果可为准确、系统掌握黑鲷摄食习性提供有益补充。

与传统的胃含物分析结果相比[23-24],高通量测序法所检测到的黑鲷主要饵料生物种类组成相似,但高通量测序法具有明显的样品需求少、工作量小和检出物种多的特点。此外,借助于高通量测序法的灵敏性高的特点,本研究从消化程度较高的空胃黑鲷胃部粘液样品中检测鉴定得到石莼、浒苔、日本蟳、熊本牡蛎、胸刺水蚤、毛蚶以及多种藻类饵料生物种类,并鉴定出部分传统胃含物分析法未能检测到的微藻和小球藻等相对丰度较低的黑鲷饵料生物种类,高通量测序法在黑鲷等杂食性鱼类摄食生态研究中显现出较为明显的技术优势[23]。此外,发现 18S rDNA 的保守性以及目前按照 97%的序列相似度进行归并的分析标准也会影响到高通量测序对某些物种鉴别的精准度,对此可考虑将克隆测序法与之相结合以达到更优的鉴定结果;而本次研究过程中基于已有的象山港海区资源调查名录,将序列比对所得的注释物种加以人工校对也显著地提高了所鉴定物种的准确性。相信随着测序技术以及数据分析技术的快速发展,高通量测序技术在鱼类食性研究中将具有更广阔的应用前景。

结果显示,黑鲷摄食种类范围较广,仅本次分析就在黑鲷胃含物中鉴定出 9 个门类中的 62 种饵料生物,这些饵料生物分属于大型藻类、贝类、浮游动物、浮游植物、底栖动物、鱼类和蟹类等多个海洋生物类群,黑鲷展现了较为典型的杂食性特征。石莼、熊本牡蛎、胸刺水蚤、日本蟳、毛蚶和褐菖鲉是象山港黑鲷优势饵料生物种类,其中石莼、熊本牡蛎和褐菖鲉均为典型的岩相生境分布物种,其对应的分布水域与黑鲷(礁栖鱼类)基本一致,是象山港黑鲷的主要饵料供给对象[30]。

早期黑鲷调查发现,黑鲷幼鱼和成鱼食性存在差异,其中幼鱼以环节动物和虾类为主要食物类群,而成鱼以藻类、环节动物、甲壳类和贝类为主[20]。结果表明,1 龄黑鲷个体优势饵料生物为胸刺水蚤、石莼和日本蟳;2 龄黑鲷个体优势饵料生物为日本蟳、锉蛤和石莼;3 龄黑鲷个体优势饵料生物为褐菖鲉、毛蚶和石莼;4 龄黑鲷个体优势饵料生物为熊本牡蛎、石莼和褐菖鲉。由此可见,其主要饵料物种组成与之前调查结果相似。由于本次研究所捕捉黑鲷个体均为 1 年龄以上的成鱼,故未能对幼鱼食性进行分析比较。而对本次不同年龄组之间的比较发现 1 至 4 龄黑鲷个体的摄食食性有所差别,其中 1 龄和 2 龄个体中优势饵料生物相似性较高,而 3 龄和 4 龄个体中的优势饵料生物相似性较高。同时,我们结合黑鲷年龄和体长特征,利用相似性分析

检验(ANOSIM)检验了不同年龄组黑鲷成鱼个体的饵料物种分布特征,但结果显示不同年龄组黑鲷饵料物种组成并无显著性差异。考虑到本次研究分析所用的黑鲷个体数量有限,这可能会影响到黑鲷不同龄组间的饵料物种差异分析;同时,由于鱼类摄食受自身生长和环境饵料生物组成等诸多因素的影响,黑鲷样品所处的具体生活环境也可对饵料物种组成造成影响,如本次检出物种中虾类和螺类样品较少,且部分其他食物种类也与传统方法鉴定结果存在一定的差异。鉴于上述情况,建议在后续研究中适当扩充黑鲷样品采集范围(包括取样季节、样品规格、采集区域和样品数量等),并结合样品采集水样的生物和环境信息,系统分析黑鲷摄食对象、摄食策略等营养生态特征,以期为科学制定黑鲷增殖养护措施、保持黑鲷物种种群稳定性提供科学依据。

参考文献(References):

[1] 陈大刚, 张美昭. 中国海洋鱼类. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2016: 1231.
[2] 汤建华, 陈铭惠, 柏怀萍, 张振敏. 江浙沿海黑鲷增殖放流试验. 上海水产大学学报, 1998, 7(2): 167-171.
[3] 刘岩, 杨长平, 单斌斌, 孙典荣, 刘胜男, 李腾, 刘蔓婷, 谢啟健. 大亚湾黑鲷标志放流及回捕率调查. 中国水产科学, 2019, 26(1): 63-70.
[4] Hu Q S, Bao N, Rahman H A, Jiang Y Z, Zhang S Y, Li J, Shentu J K. Effectiveness of stocking *Sparus macrocephalus* fry in situ in the East China Sea. Aquaculture and Fisheries, 2019, 4(2): 74-79.
[5] 尤仲杰, 焦海峰. 象山港生态环境保护与修复技术研究. 北京: 海洋出版社, 2011: 5-30.
[6] 姜亚洲, 林楠, 袁兴伟, 焦海峰, 凌建忠, 李圣法. 象山港游泳动物群落结构及多样性. 生态学杂志, 2013, 32(4): 920-926.
[7] 杨林林, 姜亚洲, 袁兴伟, 林楠, 刘尊雷, 李圣法. 象山港生态系统结构与功能的 Ecopath 模型评价. 海洋渔业, 2015, 37(5): 399-408.
[8] Braga R R, Bornatowski H, Vitule J R S. Feeding ecology of fishes: an overview of worldwide publications. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 2012, 22(4): 915-929.
[9] Guedes A P P, Araújo F G. Trophic resource partitioning among five flatfish species (Actinopterygii, Pleuronectiformes) in a tropical bay in south-eastern Brazil. Journal of Fish Biology, 2008, 72(4): 1035-1054.
[10] Motta P J, Wilga C D. Advances in the study of feeding behaviors, mechanisms, and mechanics of sharks. Environmental Biology of Fishes, 2001, 60(1/3): 131-156.
[11] Frid A, Marliave J. Predatory fishes affect trophic cascades and apparent competition in temperate reefs. Biology Letters, 2010, 6(4): 533-536.
[12] Svanbäck R, Bolnick D I. Intraspecific competition drives increased resource use diversity within a natural population. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2007, 274(1611): 839-844.
[13] Sheppard S K, Harwood J D. Advances in molecular ecology: tracking trophic links through predator-prey food-webs. Functional Ecology, 2005, 19(5): 751-762.
[14] 刘刚, 宁宇, 夏晓飞, 龚明昊. 高通量测序技术在野生动物食性分析中的应用. 生态学报, 2018, 38(9): 3347-3356.
[15] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 12763.6—2007 海洋调查规范(第 6 部分海洋生物调查). 北京: 中国标准出版社, 2007.
[16] Stoeck T, Bass D, Nebel M, Christen R, Jones M D M, Breiner H W, Richards T A. Multiple marker parallel tag environmental DNA sequencing reveals a highly complex eukaryotic community in marine anoxic water. Molecular Ecology, 2010, 19(S1): 21-31.
[17] Warwick R M, Clarke K R. A comparison of some methods for analysing changes in benthic community structure. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 1991, 71(1): 225-244.
[18] Kendrick A J, Hyndes G A. Variations in the dietary compositions of morphologically diverse syngnathid fishes. Environmental Biology of Fishes, 2005, 72(4): 415-427.
[19] Arula T, Kotta J, Lankov A, Simm M, Põlme S. Diet composition and feeding activity of larval spring-spawning herring: importance of environmental variability. Journal of Sea Research, 2012, 68: 33-40.
[20] 柏怀萍. 象山港黑鲷的摄食习性. 宁波大学学报: 理工版, 1999, 12(4): 42-47.
[21] Riemann L, Alfredsson H, Hansen M M, Als T D, Nielsen T G, Munk P, Aarestrup K, Maes G E, Sparholt H, Petersen M I, Bachler M, Castonguay M. Qualitative assessment of the diet of European eel larvae in the Sargasso Sea resolved by DNA barcoding. Biology Letters, 2010, 6(6): 819-822.
[22] 林先智, 胡思敏, 刘胜, 黄晖. 传统测序与高通量测序在稚鱼食性分析中的比较. 应用生态学报, 2018, 29(9): 3093-3101.
[23] 李振华, 徐开达, 蒋日进, 朱增军. 东海中北部小眼绿鳍鱼食性的季节变化. 海洋渔业, 2010, 32(2): 192-198.
[24] 刘守海, 徐兆礼. 长江口和杭州湾凤鲚胃含物与海洋浮游动物的种类组成比较. 生态学报, 2011, 31(8): 2263-2271.
[25] Leray M, Yang J Y, Meyer C P, Mills S C, Agudelo N, Ranwez V, Boehm J T, Machida R J. 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. Frontiers in Zoology, 2013, 10(1): 34.
[26] Bade L M, Balakrishnan C N, Pilgrim E M, McRae S B, Luczkovich J J. A genetic technique to identify the diet of cownose rays, *Rhinoptera bonasus*: analysis of shellfish prey items from North Carolina and Virginia. Environmental Biology of Fishes, 2014, 97(9): 999-1012.
[27] 王雪琴, 王光华, 乔飞, 高其康, Heong K L, 祝增荣, 程家乐. 高通量测序及其在食物网解析中的应用进展. 生态学报, 2017, 37(8): 2530-2539.
[28] Leal M C, Ferrier-Pagès C. Molecular trophic markers in marine food webs and their potential use for coral ecology. Marine Genomics, 2016, 29: 1-7.
[29] Hirai J, Hidaka K, Nagai S, Ichikawa T. Molecular-based diet analysis of the early post-larvae of Japanese sardine *Sardinops melanostictus* and Pacific round herring *Etrumeus teres*. Marine Ecology Progress Series, 2017, 564: 99-113.
[30] 魏永杰, 何东海, 费岳军, 赵强, 曹维, 蔡燕红. 象山港海域生态分区研究. 应用海洋学学报, 2015, 34(4): 509-517.