

采用 DNA 条形码技术对厦门海域 鱼卵、仔稚鱼种类的鉴定

周美玉¹, 陈 晓², 杨圣云¹

(1. 厦门大学 海洋与地球学院 福建 厦门 361102; 2. 广西红树林研究中心 广西 北海 536007)

摘 要: 以厦门海域采集到的鱼卵、仔稚鱼为研究对象。首先根据形态学特征将其分为 2 种类型鱼卵和 3 种类型仔稚鱼, 然后应用 DNA 条形码技术分析鉴定得到 3 个鱼卵种类和 4 个仔稚鱼种类。其中 6 种鉴定到种的水平, 分别为汉氏棱鯷 (*Thryssa hamiltonii*) 鱼卵、颈带鲷 (*Nuchequula nuchalis*) 鱼卵、纹缟鰕虎鱼 (*Tridentiger trigonocephalus*) 仔鱼、髯缟鰕虎鱼 (*Tridentiger barbatus*) 仔鱼、斑鰕 (*Konosirus punctatus*) 仔鱼和鲷 (*Platycephalus indicus*) 稚鱼; 1 种鉴定到属, 即双边鱼属 (*Ambassis* sp.) 鱼卵。研究结果表明, 将鱼卵、仔稚鱼鉴定到种的水平, 绝大多数都需要借助于形态学之外的手段, 尤其是形态特征表现相近的鱼卵。而 DNA 条形码技术采用自动化和标准化应用系统, 能有效地对形态特征相似鱼卵、仔稚鱼进行种类鉴定, 具有准确性高、重复性好、人为误差少等优点, 已成为传统形态学物种鉴定的强有力补充, 在鱼类生物多样性研究中具有广阔的应用前景。

关键词: 鱼卵; 仔稚鱼; mtCOI 序列; DNA 条形码

中图分类号: Q959.4; S932.4

文献标识码: A

文章编号: 1007-6336(2015)01-0120-06

DOI:10.13634/j.cnki.mes.2015.01.021

Identification of several fish eggs and larvae by DNA barcoding in Xiamen Water

ZHOU Mei-yu¹, CHEN Xiao², YANG Sheng-yun¹

(1. College of Ocean & Earth Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China; 2. Guangxi Mangrove Research Center, Beihai 536007, China)

Abstract: This research focus on identification of fish eggs and larvae collected in Xiamen waters. The samples were distinguished to 2 types of fish eggs and 3 types of fish larvae by morphological characters and were identified as 3 species fish eggs and 4 species fish larvae by DNA barcoding technology. In which, there were six species and one genus were identified, including *Thryssa kammalensis* egg, *Nuchequula nuchalis* egg, *Tridentiger trigonocephalus* larva, *Tridentiger barbatus* larva, *Konosirus punctatus* larva, *Platycephalus indicus* larva and *Ambassis* sp. egg. The results showed that molecular technology was necessary in identification of fish eggs and larvae to species, especially those species without enough morphological characters. By using automation and standardization system, DNA barcoding technology can identify the species of fish eggs and larvae effectively. This technology with the advantages of high reliability, excellent repetition and less error is a powerful complement for traditional identification by morphology and has wide application prospects in the study of ichthyoplankton diversity.

Key words: fish eggs; fish larvae; mtCOI sequence; DNA barcoding

鱼类浮游生物是指鱼类生活史早期发育阶段 个体, 包括鱼卵、仔稚鱼。作为鱼类种群补充的重

收稿日期: 2014-08-18 修订日期: 2014-11-04

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目(2011J05116); 广西红树林保护与利用重点实验室系统性研究课题(GKLMC-201307)

作者简介: 周美玉(1981-), 女, 江西南昌人, 海洋生物学专业博士研究生, E-mail: myzhou@xmu.edu.cn

通讯作者: 杨圣云, E-mail: yangsy@xmu.edu.cn

要来源, 鱼卵、仔稚鱼的种类分布和数量变化是评估海域鱼类产卵场、亲鱼资源量、渔业资源补充量最直接有效的数据资料。由于鱼卵、仔稚鱼的形态特征复杂多变, 特别是鱼卵, 用于鉴定的可识别特征较少。而鱼卵、仔稚鱼种类的准确鉴定, 对于确切知道不同鱼类的产卵时间和产卵场等信息, 都有十分重要的意义。因此, 寻求稳定、可靠的分类依据及鉴定方法, 是鱼类浮游生物研究亟待解决的重大问题。

长期以来, 鱼类浮游生物种类鉴定的方法在不断探索之中, 除了根据形态学以外, 还有一些技术如扫描电镜、单克隆抗体免疫染色和遗传学等在鱼类浮游生物鉴定中均获得使用。但存在扫描电镜的结果可信度比较差^[1-2], 单克隆抗体免疫染色技术的费用较高、且特异性抗体的筛选和制备非常困难等缺陷。上世纪 90 年代以来, 分子生物学技术由于其准确性高和操作简便等优点, 开始广泛应用于遗传多样性分析、基因组鉴定和系统学研究等领域, 在鱼类种类鉴定方面也有较多应用^[3-5]。近年来, 随着 DNA 条形码技术的提出, 越来越多的学者开始尝试采用 DNA 条形码来解决鱼卵、仔稚鱼种类鉴定问题^[6-11]。

厦门海域为亚热带河口海湾, 初级生产力水平较高^[12], 水生生物物种丰富^[13]。黄良敏等^[14]整理分析得到厦门海域有记录鱼类共 649 种, 现有鱼类 331 种。在鱼类资源如此丰富的海域, 有关鱼卵、仔稚鱼的调查研究中^[15-18]均有不少的鱼卵、仔稚鱼未能鉴定。本研究初步应用 DNA 条形码(mtCOI 基因片段序列) 技术对厦门海域采集到的一些鱼卵、仔稚鱼进行种类鉴定, 为探讨分子生物学技术在鱼卵、仔稚鱼研究中应用积累科学资料。

1 材料与方法

1.1 材料来源

本研究所用的鱼卵、仔稚鱼样品均采自福建省厦门港和平码头附近海域。采样时间为 2011 年 3 月~5 月, 选择邻近大潮期的日期, 于高潮前 2 h 左右开始采样。采样时使用浮游生物浅水 I 型网(网口直径 50 cm, 网目 0.505 mm) 在海水表层进行水平拖网获得活体浮游动物样品; 至实验室内挑取鱼卵、仔稚鱼至盛有过滤海水的结晶皿中饲养过夜。

由于活体鱼卵、仔稚鱼对水质要求较高, 采集到的混合水样样品到实验室时已经有较多鱼卵、仔稚鱼死亡。本研究挑选活体的鱼卵、仔稚鱼至盛有过滤海水的结晶皿中饲养过夜, 次日仍会有部分鱼卵、仔稚鱼死亡。最后存活的个体于体视显微镜(Nikon-SMZ1000) 下分别进行形态特征的观察和显微拍照, 获得鱼卵卵膜、卵膜腔、卵黄囊、胚体发育和色素分布等形态特征, 并测得鱼卵卵径、油球径等参数; 仔稚鱼获得体型、体长、肛长、肌节数、鳍条发育和色素分布等特征。通过对鱼卵、仔稚鱼形态特征的分析, 得到初步鉴定结果。

1.2 基因组 DNA 提取

样品观察拍照后即用于灭菌双蒸水对鱼卵、仔稚鱼进行冲洗, 最后样品置于 TE 溶液中, 采用传统的酚-氯仿法进行样品的 DNA 提取。鱼卵取单个整粒鱼卵, 体长小的仔鱼取整条, 较大的仔稚鱼取尾部。提取前需对样品进行组织破碎。

1.3 PCR 及测序

mtCOI 序列的扩增采用通用引物 LCO-1490 和 HCO-2198^[19] 进行。反应体系为 25 μ L, 按说明书进行各成分的配比; 反应程序中退火温度为 50 $^{\circ}$ C, 循环 35 次。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检查扩增效果, 选取条带明亮的 PCR 产物送至上海生工进行测序。

1.4 序列分析

采用 Chromas 2.33 软件对获得的碱基序列进行峰值图的检查, 确定 mtCOI 序列的准确性及截取有效片段长度; Mega 5.01 软件(Center for Evolutionary Functional Genomics) 用来分析序列间的相似度。

由于鱼卵、仔稚鱼样品在 DNA 提取、PCR 扩增和测序的实验过程中, 均有可能出现结果不佳的情况, 所以本文以最终获得的有效的 mtCOI 序列的个体来进行分析。

将确定有效的 mtCOI 序列在 Genbank 数据库中进行 BLAST 序列相似性搜索。由于早期的 Genbank 数据提交者往往未将序列两端质量较差的碱基删除, 会对搜索结果造成影响, 因此在初步确定相似种类后, 将相关种类的序列下载后进行整理, 然后分别与作者获得的鱼卵仔鱼序列进行比对, 以保证比对的准确性。

2 结果与讨论

2.1 形态特征

本文获得的鱼卵、仔稚鱼样品,依据外部形态特征初步分为2种类型的鱼卵和3种类型的仔稚鱼,分别称为鱼卵-1型、鱼卵-2型、仔稚鱼-1型、仔稚鱼-2型和仔稚鱼-3型,见图1。

鱼卵-1型样品仅获得1个个体。卵呈圆球形,卵径约1.33 mm,卵周隙较小,无油球。胚体细长,绕卵黄3/4周,未发现色素(图1-a)。根据文献,该鱼卵可能为长蛇鲻(*Saurida elongata*)或蛇鲻类似卵(*Saurida* sp.)^[20,21]以及棱鯷属^[22]等鱼类的鱼卵。

鱼卵-2型样品获得5个个体。卵呈圆球形,卵径较小,为0.66~0.68 mm,卵周隙小,油球径0.13~0.17 mm,卵尚处于发育初期(图1-b)。根据参考文献^[21]描述,该鱼卵可能为鱈科、鲷科、鲈科等鱼类的鱼卵。

仔稚鱼-1型样品包括2尾仔鱼。体型纺锤型,肛门开口于体中央位置,腹腔前背部有明显的气鳔。体长3.1 mm的个体如图1-c所示,肌节9+16,体内卵黄残留,耳囊明显,肛门位于体中央靠前的位置;背鳍膜起始于头后部,仅尾鳍出现弹丝;躯体上色素较多较大,呈树枝状由体腹部向背部方向包裹于体2/5和2/3处,耳囊后消化道与躯干间隙也有树枝状色素向上延伸。体长7.2 mm的个体如图1-d所示,肌节10+17;未出现腹鳍,背鳍膜尚在,臀鳍原基已发育有弱丝,尾鳍原基已发育出下三角,脊索尾端明显向上屈曲;整个个体黑色素不多,在气鳔背部和尾柄前体腹部有较明显黑色素丛,臀鳍原基处有少许色素。根据资料^[21]2尾仔鱼可能为鰕虎鱼科或鲷科。

仔稚鱼-2型样品包括3尾仔鱼。体型细长(体高/体长>1/15),体长(SL)5.4~5.6 mm,肛前距约占体长的80%~88%;部分个体卵黄囊未被吸收完,在前期仔鱼卵黄囊中未发现油球;消化道极细长,后面1/2部分稍粗于前1/2部分;背鳍膜较低,起始于脑后;肩带缝合部的前后各具1和2条长线状色素;消化道前1/2部分的2列色素位于体腹与消化道接触处,消化道后面部分的2列色素位于消化道腹面,色素基本呈点状,且体前部分的色素稍小于体后部分的色素;消化道末端与体腹接触面有较多色素分布;尾柄处背、腹侧均有一列小色素分布,背面色素短于腹面,如图1-e。参考文献^[21,23]将这些仔鱼鉴定为斑鲷的仔鱼。

仔稚鱼-3型样品包括6尾稚鱼。纺锤型体

型,具延长的胸鳍和较强的棘要素。体长11.8 mm的个体各鳍已发育完全,背鳍X+13;吻端伸长、扁平;头部的棘要素发达,有眼上棘、头顶棘、前鳃盖棘、鼻棘和翼耳棘等等;胸鳍发达,上半部分延长且布满点状黑色素;如图1-f所示。体长13.8 mm的个体头部纵扁,眼向上移动明显;胸鳍上的色素更浓密,身体各部位的色素范围扩大且更浓密,尾鳍上出现较多黑色,如图1-g所示。根据参考文献^[21,24]该型可鉴定为鲷的稚鱼。

2.2 mtCOI 序列分析

通过基因组DNA提取、PCR和测序,得到各个体的mtCOI基因片段。经DNA比对,将由形态特征分为5种类型的鱼卵、仔稚鱼鉴别为7个不同序列类型。

如表1所示,厦门海域鱼卵-1型为汉氏棱鯷;鱼卵-2型之L1-L4鱼卵为颈带鲷。仔稚鱼-1型之G1为纹缟鰕虎鱼、仔稚鱼-1型之G2为髯缟鰕虎鱼,仔鱼-2型为斑鲷,仔鱼-3型为鲷。鱼卵-2型之Am个体序列未能搜索到高度匹配的序列,Genbank数据库现有数据中与其遗传相似度最高的种类为玛丽双边鱼(93%)和杜氏双边鱼(92%)。据此判断其为双边鱼属种类。

2.3 讨论

DNA条形码(DNA Barcoding)技术是通过一个标准化的短基因片段的序列差异来对物种进行鉴定,该技术已经成为国际物种种类鉴定的一个发展趋势。早在2003年,加拿大科学家Hebert等^[25]就提出基因条形码(DNA barcode)的概念,同时该作者也指出线粒体DNA中的COI序列(mtCOI)可以作为全球动物的生物识别序列标签。在线粒体DNA中,COI基因的进化速率相对较慢^[26],是脊椎动物中包含有良好系统发育信息的基因之一^[27],能有效地对种间、种内等不同水平的物种进行区分鉴定。这项技术很快在形态学方法遭遇瓶颈的鱼卵仔鱼分类鉴定领域得到广泛应用。Pegg等^[8]运用线粒体DNA的HVR1和COI序列,把澳大利亚Great Barrier南部礁石海域的鱼类仔稚鱼鉴定到了属或种的水平。柯慧玲^[9]用mtCOI序列准确鉴定了雀鲷科14种和蝴蝶鱼科5种仔鱼。卞晓东等^[10]结合光学显微镜、扫描电镜和遗传学方法鉴定了黄海海区海藻上的鱼卵,并确定为沙氏下鳚鱼(*Hyporhamphus sajori*)鱼卵。

物种判别标准是分子鉴定研究中最重要因素。Ward等^[4]分析澳大利亚207种鱼类mtCOI基因序列,得到鱼类物种内mtCOI序列的平均遗

传相似度为 99.61% ,属间不同物种的平均遗传相似度为 90.07% ,科间平均遗传相似度为 84.54% ; Ko 等^[28]采用 mtCOI 序列对台湾 100 种

仔稚鱼的种类鉴定实验中 ,依据遗传相似度 > 99% 认定为种的水平、92% ~ 99% 为属的水平、85% ~ 92% 为科的水平。

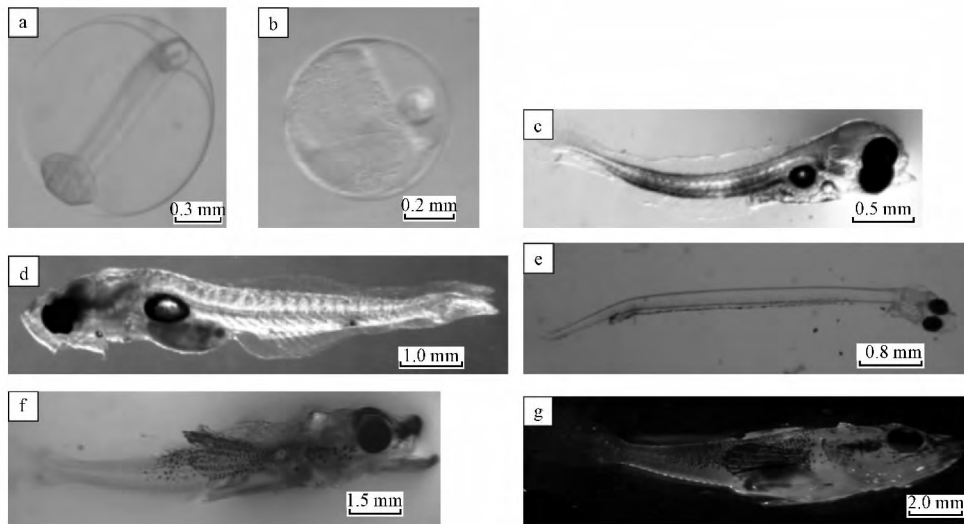


图 1 厦门海域采集到的鱼卵、仔稚鱼(a 为鱼卵-1 型; b 为鱼卵-2 型; c 和 d 为仔稚鱼-1 型; e 为仔稚鱼-2 型; f 和 g 为仔稚鱼-3 型)

Fig. 1 The fish eggs and larvae in Xiamen water (a , egg type 1; b , egg type 2; c and d , larva type 1; e , larva type 2; f and g , larva type 3)

表 1 厦门海域几种鱼卵、仔稚鱼 mtCOI 序列进行比对的结果

Tab. 1 Sequence comparisons of mtCOI from the fish eggs and larvae gained in Xiamen water by BLAST method

名称	序列长度	分子鉴定结果	相似度	参考数据来源
鱼卵-1 型	601 bp	汉氏棱鯧 <i>Thryssa hamiltonii</i>	100%	JQ681498 ^[29] HQ993148 & HQ993151 ^[30]
鱼卵-2 型之 L1 ~ L4	523 bp	颈带鲷 <i>Nuchequula nuchalis</i>	99% ~ 100%	AY541633 ^[31] EF607435 & EF607436 ^[32] JF952775-JF952777 ^[33]
鱼卵-2 型之 Am	523 bp	双边鱼属 <i>Ambassis</i> sp.	92% ~ 93%	杜氏双边鱼* <i>A. dussumieri</i> (JF492813 , Steinke et al. unpublished ^① ; KF918315-KF918331 & KF770831-KF770834 , Deepak et al. , unpublished ^② 玛丽双边鱼* <i>A. marianus</i> (HM006950 ^[35] HM180928 ^[36] ;
仔稚鱼-1 型之 G1	630bp	纹缟鰕虎鱼 <i>Tridentiger trignocephalus</i>	99% ~ 100%	JQ738448 , Li et al. , unpublished ^③ ; KF642975-KF642980 , Gu and Chen , unpublished ^④ .
仔稚鱼-1 型之 G2	655bp	髯缟鰕虎鱼 <i>Tridentiger barbatus</i>	99% ~ 100%	JX536694 , Xu et al. , unpublished ^⑤ ; KF642954-KF642960 , Gu and Chen , unpublished ^④ . JQ753955 ^[37] ;
仔稚鱼-2 型	639 bp	斑鯧 <i>Konosirus punctatus</i>	99% ~ 100%	AP011612 ^[38] ; GU479050 , Wen et al. , unpublished ^⑥ ; JQ738560-JQ738564 , Li et al. , unpublished ^③ . HM180788-HM180794 ^[36] ;
仔稚鱼-3 型	640 bp	鲷 <i>Platycephalus indicus</i>	99% ~ 100%	HQ711867 , Wen et al. , unpublished ^⑥ ; JQ738577-JQ738591 , Liet al. , unpublished ^③ .

注: 玛丽双边鱼和杜氏双边鱼的中文名称依据参考文献[34].

- ① STEINKE D, ZEMLAK T S, CONNELL A D, et al. DNA Barcodes: Linking adults and immatures of marine fishes. Unpublished. Biodiversity Institute of Ontario, University of Guelph, 50 Stone Road E, Guelph, Ontario N1G2W1, Canada.
- ② DEEPAK J, NEETHU V S and HARIKRISHNAN M. Molecular Phylogeny of Genus *Ambassis*. Unpublished. School of Industrial Fisheries, Cochin University of Science and Technology, Fine Arts Avenue, Ernakulam, Kerala 682016, India.
- ③ LI Y, SHUAI L, WANG Y, et al. DNA barcoding commercial marine fish of China Yellow Sea. Unpublished. Marine Biological Museum, Institute of Oceanology, 7 Nanhai Road, Qingdao, Shandong 266071, China.
- ④ GU C and CHEN Y. DNA barcodes characterizing intertidal Tridentiger gobies of Zhoushan Islands. Unpublished. College of Marine Science & Technology, Zhejiang Ocean University, Changzhi Island, Zhoushan, Zhejiang 316022, China.
- ⑤ XU T J, JIN X X and CHENG Y Z. Direct Submission. College of Marine Science, Zhejiang Ocean University, 105 Wenhua Road, Zhoushan, Zhejiang 316000, China.
- ⑥ WEN A, YOU F, WU Z, et al. DNA barcoding of fish species from Rongcheng Bay through seasons. Unpublished. Key Laboratory of Experimental Marine Biology, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 7 Nanhai Road, Qingdao, Shandong 266071, China.

根据以上研究结果,本文采用遗传相似度 > 99% 的 2 条序列视为同一种类、90% ~ 98% 为同一属、80% ~ 88% 为同一科的标准对厦门海域的鱼卵、仔稚鱼进行种类判定。如表 1 所示,除了鱼卵-2 型之 Am 仅被鉴定到属的水平以外(92% ~ 93%),其余 6 种序列类型都被鉴定到了种的水平(99% ~ 100%)。在这 6 个鉴定到种的样品中,除了鱼卵-1 型只找到一个完全匹配的序列外,其余 5 个样品都与多个作者基于不同标本分别提交的序列高度匹配,显示物种鉴定结果较可靠。鱼卵-2 型之 Am 样品虽然没有搜索到完全匹配的序列,但是与双边鱼属两种鱼类 92% ~ 93% 的相似度可以将其归于双边鱼属。同样地,这两种双边鱼的序列也是由不同作者分别独立提交的。

根据以上分析不难发现,形态学方法分为 5 种类型的鱼卵、仔稚鱼,经过 DNA 条形码技术能鉴定 6 种 1 属共 7 个类型。特别是外部形态类似的鱼卵-2 型,其中 1 个个体与其它 4 个个体实为 2 个完全不同科的种类(1 个为双边鱼属鱼卵,其它 4 个个体为颈带鳎鱼卵)。根据形态学方法,本研究中的两种类型鱼卵(鱼卵-1 型和鱼卵-2 型)及仔鱼-1 型均难以准确鉴定出种类,且经过细分还存在种类混淆或无法确定种类的情况;而 DNA 条形码技术能对不同种类进行较准确的区分,且多数能鉴定到种的水平。文中仔稚鱼的形态学鉴定结果与 DNA 条形码技术在科的水平上较为统一,但要准确鉴定至种的水平,较多种类还需借助于 DNA 条形码技术。

将鱼卵、仔稚鱼准确地鉴定到较低分类水平有助于群聚生态的研究^[9]。由于鱼卵、仔稚鱼的形态特征较少,受观察手段及个人主观判断影响也较大,形态学的鉴定结果正确率总体较低。Ko 等^[28]采用 DNA 条形码技术对 5 个实验室进行

100 种仔稚鱼种类的形态鉴定准确性的实验结果表明,剔除未鉴定出的种类后计算,形态学方法鉴定仔稚鱼的结果中,鉴定到属水平的正确率为 75.4%、种水平的正确率仅 43.7%。

研究再一次证实,DNA 条形码技术对于正确鉴定鱼卵、仔稚鱼种类是很有必要的,特别是对鱼卵的鉴定。不过,鱼类基因序列库种类齐全和鉴定准确是应用 DNA 条形码对鱼卵、仔稚鱼准确鉴定的必要和前提条件。错误的序列将会误导后续的研究者。本文在序列搜索时也受到了错误鉴定的干扰,例如 Kim 等就将一条鲷的序列命名为褐篮子鱼 *Siganus fuscescens* 提交至 Genbank (HM180875)^[36]。因此分子条码数据库必须基于可靠的标本鉴定基础上。目前全球鱼类基因条码计划(Fish-BOL)已经启动,我国也于 2008 年 4 月加入该计划,成为国际生命条形码计划四个中心节点之一,我国成鱼基因资料库在不断补充和完善中,为 DNA 条形码技术的开展建立强大的信息基础。

3 结 论

本文采用 DNA 条形码技术,对厦门海域采集到的几种鱼卵、仔稚鱼进行了种类鉴定,结果表明,形态学方法鉴定为 5 种类型的鱼卵、仔稚鱼经 DNA 条形码技术分析鉴定为 7 个类型。其中,鱼卵-2 型鉴定出 2 个种类(颈带鳎和双边鱼属鱼卵),仔稚鱼-1 型鉴定出纹缟鰕虎鱼和髯缟鰕虎鱼 2 种仔鱼;其它 3 个种类亦均鉴定到种的水平,包括汉氏棱鯷鱼卵、斑鰕仔鱼和鲷稚鱼。

本研究结果表明,DNA 条形码技术能有效地对形态特征不多的鱼卵进行种类鉴定,且较多能鉴定到种的水平;形态学方法与 DNA 条形码技术对仔稚鱼的鉴定在科的鉴定水平较为统一。部分

种类要鉴定至种的水平,更需要借助 DNA 条形码技术。DNA 条形码技术具有准确性高、重复性好、人为误差小等优点,已成为传统形态学物种鉴定的强有力补充,在鱼类生物多样性研究中具有广阔的应用前景。

致谢:本研究工作得到厦门大学海洋与地球学院浮游生物生理生态组郑连明博士的指导和帮助,审稿专家对论文的修改提出了很多关键性意见,谨致谢忱。

参考文献:

- [1] SHAO K T, CHEN K C, WU J H. Identification of marine fish eggs in Taiwan using light microscope, scanning electric microscope and mtDNA sequencing [J]. Marine and Freshwater Research 2002, 53: 355-365.
- [2] GWO H H. Morphology of the fertilizable mature egg in the *Acanthopagrus latus*, *A. schlegelii* and *Sparus sarba* (Teleostei: perciformes: sparidae) [J]. Journal of Microsc 2008, 232: 442-452.
- [3] 郑光明,朱新平,张跃,等. RAPD 技术鉴定 3 种鲮的研究 [J]. 华中农业大学学报, 1999, 18 (4): 371-374.
- [4] 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 2005, 360: 1847-1857.
- [5] 刘光明,史千玉,曹敏杰,等. 利用 PCR 和限制性酶切技术鉴别 3 种鳊鱼 [J]. 集美大学学报(自然科学版) 2011, 16 (3): 179-181.
- [6] PEREZ J, ÁLVAREZ P, MARTINEZ J L, et al. Genetic identification of hake and megrim eggs in formaldehyde-fixed plankton samples [J]. ICES Journal of Marine Science, 2005, 62: 908-914.
- [7] GARCÍA-VÁZQUEZ E, ÁLVAREZ P, LOPES P, et al. PCR-SSCP of the 16S rRNA gene: a simple methodology for species identification of fish eggs and larvae [J]. Scientia Marina, 2006, 70 (S2): 13-21.
- [8] PEGG G G, SINCLAIR B, BRISKEY L, et al. MitDNA barcode identification of fish larvae in the southern Great Barrier Reef, Australia [J]. Scientia Marina 2006, 70 (S2): 7-12.
- [9] 柯慧玲. 南台湾垦丁周边海域仔鱼群聚之时空分布及 DNA 生命条码在鉴种上之应用 [D]. 台湾: 海洋生物研究所 2007.
- [10] 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 [J]. 水产学报 2008, 32 (3): 342-352.
- [11] 张继民,刘霜,赵建民,等. 带鱼 (*Trichiurus haumela*) 鱼卵 DNA 的提取及其 18S rDNA 初步分析 [J]. 海洋通报 2009, 28 (6): 62-65.
- [12] 张远辉,陈国辉. 厦门海域二氧化碳及其生物生产力的估算 [J]. 海洋通报 2000, 19 (2): 30-35.
- [13] 黄宗国. 厦门湾物种多样性 [M]. 北京: 海洋出版社, 2006, 5-6.
- [14] 黄良敏,谢仰杰,李军,等. 厦门海域鱼类群落分类多样性的研究 [J]. 海洋学报 2013, 35 (2): 126-132.
- [15] 蔡秉及,王志远. 厦门港及邻近海域的浮性鱼卵和仔、稚鱼 [J]. 台湾海峡, 1994, 13 (2): 204-208.
- [16] 江素菲,陈枫. 九龙江口鱼类浮游生物的生态 [J]. 台湾海峡, 1993, 12 (4): 351-358.
- [17] 林楠,沈长春,钟俊生. 九龙江口沿岸碎波带仔稚鱼种类组成 [J]. 上海海洋大学学报 2009a, 18 (6): 686-694.
- [18] 林楠,沈长春,钟俊生. 九龙江口仔、稚鱼种类组成和季节变化 [J]. 南方水产 2009b, 5 (4): 1-8.
- [19] FOLMER O, BLACK M, HOEH W, et al. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates [J]. Molecular Marine Biology and Biotechnology 1994, 3 (5): 294-299.
- [20] 邵广昭,杨瑞森,陈康青,等. 台湾海域鱼卵图鉴 [M]. 台北: 中央研究院动物研究所 2001.
- [21] 冲山宗雄. 日本产稚鱼图鉴 [M]. 东京: 东京大学出版社, 1988.
- [22] 张孝威,陈真然,阮洪超,等. 赤鼻棱鯧、中颌棱鯧卵子、仔稚鱼的发育 [J]. 动物学报, 1982, 28 (2): 183-189.
- [23] 陈真然,张孝威. 斑鯧卵子和仔、稚、幼鱼的形态特征 [J]. 海洋与湖沼, 1965, 7 (3): 205-214.
- [24] 张孝威,沙学绅,何桂芬,等. 鲷鱼卵子和仔、稚鱼的形态观察 [J]. 海洋与湖沼, 1980, 11 (2): 161-168.
- [25] HEBERT P D N, CVWINSKA A, BALL S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. Proceedings of the Royal Society Of London Series B 2003, 270: 313-321.
- [26] LYNCH M, JARRELL P E. A method for calibrating molecular clocks and its application to animal mitochondrial DNA [J]. Genetics 1993, 135: 1197-1208.
- [27] ZARDOYA R, MEYER A. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates [J]. Molecular Biology and Evolution, 1996, 13 (7): 933-942.
- [28] 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): 1-7.
- [29] WANG Z D, GUO Y S, LIU X M, et al. DNA barcoding South China Sea fishes [J]. Mitochondrial DNA, 2012, 23 (5): 405-410.
- [30] CHAKRABARTY P, DAVIS M P, SMITH W L, et al. Evolution of the light organ system in ponyfishes (Teleostei: Leiognathidae) [J]. J Morphol 2011, 272 (6): 704-721.
- [31] SPARKS J S and DUNLAP P V. A Clade of Non-Sexually Dimorphic Ponyfishes (Teleostei: Perciformes: Leiognathidae): Phylogeny, Taxonomy, and Description of a New Species [J]. Am Mus Novit 2004, 3459: 1-21.
- [32] ZHANG J. Species Identification of Marine Fishes in China with DNA Barcoding [J]. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2011 (2), online doi: 10.1155/2011/978253.

(下转第 135 页)

年在各国的发展,该项制度逐渐丰富、完善。庇古的外部不经济性理论、亚里士多德的正义论、罗尔斯的分配正义论不仅解释了油污基金制度存在的合理性和重要意义,还为我国船舶油污损害赔偿基金未来的发展完善指明了方向。

参考文献:

- [1] 韩立新. 船舶污染损害赔偿法律制度研究[M]. 北京: 法律出版社 2007: 331.
- [2] 陈德敏. 环境法原理专著[M]. 北京: 法律出版社 2008: 214.
- [3] 保罗·R. 伯特尼, 罗伯特·N. 史蒂文斯. 环境保护的公共政策[M]. 穆贤清, 方志伟, 译. 上海: 上海人民出版社 2004: 61.
- [4] 韩德培. 环境保护法教程[M]. 北京: 法律出版社 2007: 78.
- [5] 绿色和平. 中国 2010 年十大环境事件[EB/OL]. <http://www.greenpeace.org/china/zh/news/stories/other/2011/01/2010-top10-environment-event/>, 2011-01-14.
- [6] 搜狐滚动. 近年国际石油污染诉讼案例[EB/OL]. <http://roll.sohu.com/20120703/n347110524.shtml>, 2012-07-03.
- [7] 国家安全生产监督管理总局. 山东省青岛市“11·22”中石化东黄输油管道泄漏爆炸特别重大事故调查报告[EB/OL]. http://www.chinasafety.gov.cn/newpage/Contents/Channel_20132/2014/0110/229137/content_229137.htm, 2014 年 1 月 11 日.
- [8] E·博登海默. 法理学法律哲学与法学方法[M]. 邓正来, 译. 北京: 中国政法大学出版社 2004: 330.
- [9] 张巍. 侵权行为法的“危机”与“革命”[EB/OL]. <http://www.civillaw.com.cn/article/default.asp?id=13462>, 2013 年 12 月 27 日.
- [10] Christon Lapoyade Deschamps, RTDC, 2-1998: 369. 见: 陈银平. 论侵权损害赔偿的“补偿原则”[D]. 北京: 对外经济贸易大学 2009.
- [11] 程世礼. 评罗尔斯的正义论[J]. 华南师范大学学报(社会科学版) 2002(5): 23-26.
- [12] 匿名. 被石油“捆绑”的生活: 从太空飞船到垃圾袋[J]. VIS-TA 看天下 2013(24): 72.
- [13] 搜狐网站. 2014 年全球最富有的 10 家公司[EB/OL]. http://finance.eastmoney.com/news/1365_20140326371468391_4.html, 2014-03-26.
- [33] ZHANG J, HANNER R. DNA barcoding is a useful tool for the identification of marine fishes from Japan [J]. *Biochem Syst Ecol* 2011, 39 (1): 31-42.
- [34] 伍汉霖, 邵广昭, 赖春福. 拉汉世界鱼类名典[M]. 台湾: 水产出版社, 1999.
- [35] PAGE T J, HUGHES J M. Comparing the performance of multiple mitochondrial genes in the analysis of Australian freshwater fishes[J]. *J Fish Biol* 2010, 77 (9): 2093-2122.
- [36] KIM D W, YOO W G, PARK H C, et al. DNA barcoding of fish, insects, and shellfish in Korea [J]. *Genomics Inform* 2012, 10 (3): 206-211.
- [37] LI M, SHI S, WANG M, et al. Complete mitochondrial genome of the dotted gizzard shad *Konosirus punctatus* (Teleostei, Clupeidae) [J]. *Mitochondrial DNA* 2012, 23 (4): 295-297.
- [38] LAVOUE S, MIYA M, MUSIKASINTHORN P, et al. Mitogenomic evidence for an Indo-West Pacific origin of the Clupeoidei (Teleostei: Clupeiformes) [J]. *PLOS one* 2013, 8 (2). DOI: 10.1371/journal.pone.0056485.

(上接第 125 页)