

CO I 条形码辅助分析雷州半岛红树林区 鱼类的物种多样性*

张 顺 廖 健 柏 琴 陈 冲 郭昱嵩 刘楚吾 王中铎^①

(广东海洋大学 南海水产经济动物增养殖广东普通高校重点实验室 湛江 524025)

摘要 于 2014 年 3 月至 2015 年 7 月从我国雷州半岛红树林区采集成鱼和幼鱼样本共 1720 尾, 在依据 FishBase 等鱼类形态分类系统进行鉴定的基础上, 利用 CO I 条形码技术确认存在 94 个物种, 分属 11 目 33 科 72 属。结果表明: 红树林区鱼类种群极其丰富, 其中鲈形目(Perciformes)鱼类物种最多, 为 59 种, 占总物种数的 62.77%, 其次是鲱形目(Clupeiformes)和鲮形目(Mugiliformes), 分别占 6.38%和 5.32%。鲈形目中又以虾虎鱼科(Gobiidae)为优势类群, 含 29 种(占 30.85%)。按生态类群分: 海洋洄游鱼类最多, 占物种总数的 32.98%, 其次为海洋偶见鱼类、两侧洄游鱼类, 分别占 22.34%、17.02%, 以虾虎鱼类物种为主的红树林定居鱼类约占 11%。本研究表明红树林生态系统是许多海水、淡水和洄游性鱼类在特定生活阶段的重要栖息地和育幼场所。另外, CO I 条形码技术可有效快捷地鉴定出红树林海域的鱼类。

关键词 红树林; CO I 基因; DNA 条形码; 鱼类鉴定; 物种多样性

中图分类号 Q178.53 **doi:** 10.11693/hyhz20160100013

红树林生态系统(Mangrove ecosystem)是近海三大生态系统之一, 多分布于海陆交界的河口区, 受潮汐影响明显, 生态环境变化多样, 不仅物种多样性极其丰富(Field *et al.*, 1998), 还具有净化温室气体、抵抗水污染等重要功能(Li *et al.*, 2014), 国内外已有广泛的研究(张乔民等, 2001; Castellanos-Galindo *et al.*, 2013)。红树林因其独特的根部结构以及丰富的藻类等食物资源而成为鱼类理想的栖息地(Blaber, 2007; Gajdzik *et al.*, 2014)和育幼场(Kimirei *et al.*, 2013)。Nickerson(1999)研究表明, 美国、印度等地区 60%以上的鱼类在其一生的发育过程中与红树林密切相关。我国雷州半岛拥有红树林及其附近滩涂面积约 20279hm², 是国家级红树林重点保护区之一。近些年来, 人口不断增加, 环境的恶化以及加上人为的过度开发, 致使原本生态环境比较脆弱的红树林生态系统逐渐被破坏, 近海渔业资源日渐枯竭。据“我国近

海海洋综合调查与评价”显示, 近半个世纪以来, 我国红树林湿地丧失近 73%, 由 55 万 hm² 减至 15 万 hm² (谢庆裕, 2012)。通过相关学者对我国广东(Han *et al.*, 2003)、广西(黄德练等, 2013)、台湾(Kuo *et al.*, 1999)等地红树林的调查结果表明, 自红树林划入自然保护区后, 我国红树林湿地的物种多样性有所提升, 但相比鼎盛时期依然存在较大差距, 需要进一步研究和保护。

近年来, 世界鱼类数据库 FishBase (<http://fishbase.org/>)已被广泛应用于鱼类形态学鉴定, 由于鱼类栖息环境变化大, 性状特征变异快, 及各区域研究水平不一, 单一的形态学分类法作为基本的分类法存在诸多的局限性。随之, DNA 条形码(DNA barcodes)作为一个标准化和世界通用的物种识别系统被 Hebert 等(2003)提出, 即通过使用短的、标准化的基因片段来进行物种鉴定, 成为了传统形态学分类的辅助工

* 国家自然科学基金项目, 31201996 号; 广东省高等学校优秀青年教师培养计划项目, Yq2013089 号。张顺, 硕士研究生, E-mail: zhangs0916@foxmail.com

通讯作者: 王中铎, 硕士生导师, 副教授, E-mail: aduofa@gmail.com

收稿日期: 2016-01-19, 收修改稿日期: 2016-03-08

具(Hajibabaei *et al.*, 2007)。Ward等(2005)用CO I基因(Cytochrome *c* oxidase subunit I)中的655bp片段对澳大利亚207种海洋鱼类进行分析,发现所有物种都能被有效地区分,通过重建系统发生关系,认为CO I作为海洋鱼类的DNA条形码标准序列是可行的。王中铎等(2009)用CO I基因对南海硬骨鱼类40个物种89个样本进行了分析,结果表明CO I序列广泛适用于硬骨鱼类的物种鉴别,并可用于低级分类阶元的系统进化分析。DNA条形码技术应用于物种多样性的评价也有广泛的研究(Swartz *et al.*, 2008; Triantafyllidis *et al.*, 2011)。本文将形态学分类法与DNA条形码相结合应用于红树林鱼类物种的分类鉴定,分析鱼类生态类群组成的特点,以探讨红树林生态系统作为鱼类栖息地和育幼场的功能,同时进一步完善该区域鱼类的DNA条形码数据库。

1 材料与方法

1.1 实验材料与形态学鉴定

2014年3月至2015年7月于雷州半岛红树林海域(廉江高桥(109°47'E, 21°36'N)、雷州流沙湾(109°56'E, 20°26'N)、霞山东海岛(110°20'E, 20°6'N)、遂溪九龙山(110°17'E, 20°39'N))共采集成鱼和幼鱼样本1720尾,每月采用围网、地笼、拖网以及200目的手抄网进行随机采集。依据Fish Base数据库等鱼类形态分类系统(伍汉霖等, 2008)初步确认存在94个物种,最终参考《拉汉世界鱼类系统名典》(伍汉霖等, 2012)和综合分类学信息系统(Integrated Taxonomic Information System, ITIS)对物种的有效名以及分类地位进行确定。取背部肌肉组织提取DNA,剩余样品用95%的乙醇固定, -40°C保存备用。

1.2 DNA的提取、PCR扩增及测序

取约0.2g鱼的肌肉经Protease K消化后,参考《分子克隆实验指南》的酚/氯仿抽提法(萨姆布鲁克等, 2008),提取DNA。CO I基因序列扩增引物(Ward *et al.*, 2005): Fish F: 5'-TCAACC AACCACAAAGACAA TGGCAC-3'; Fish R: 5'-TAG ACTTCTGGGTGCC AAAGAATCA-3'。PCR反应总体积为25μL,包括2.5μL 10×Buffer, 2.0μL dNTP (2.5 mmol/L),上下游引物各1μL (5μmol/L), 0.2μL Taq DNA聚合酶(5U/μL), 0.5—2.0μL模板DNA,超纯水补齐。PCR反应的循环参数为:94°C预变性3min;94°C变性30s、55°C退火30s、72°C延伸50s,共30个循环;最后72°C延伸5min,最后,4°C下保存。扩增产物用1%琼脂糖凝

胶电泳检测合格后,委托生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

1.3 物种鉴定与序列分析

利用BioEdit软件对获得的碱基序列检测后,导入NCBI(National Center for Biotechnology Information)数据库和BOLD(The Barcode of Life Data System)系统进行序列相似度比对,并结合鱼类形态学资料进行辅助鉴定,确保其准确性。通过MEGA6.0软件分析CO I基因序列特征及序列间的遗传距离。利用DNAsp5软件(Rozas *et al.*, 1999)计算种间平均核苷酸差异数(*K*)及单倍型分析。选用Kimura 2-parameter(K2P)计算遗传距离,邻接法(Neighbor-Joining method, NJ)构建系统进化树,经1000次重复抽样(Bootstraps)检测分子系统树分枝的置信度。

1.4 鱼类生态类群的组成分析

依据Elliott等(2007)建立的鱼类生态类群分类方法,并结合描述鱼类生活史特征的其它相关资料,将红树林鱼类分为海洋偶见鱼类(marine stragglers, MS)、海洋洄游鱼类(marine migrants, MM)、红树林定居鱼类(estuarine species, ES)、溯河洄游鱼类(anadromous, AN)、降海洄游鱼类(catadromous, CA)、淡水洄游鱼类(freshwater migrants, FM)、淡水偶见鱼类(freshwater stragglers, FS)、两侧洄游鱼类(amphidromous, AM)八类。采用SPSS 17.0软件进行数据统计和分析。

2 结果与分析

2.1 CO I序列特征及序列间遗传距离分析

利用CO I条形码辅助形态分类法进行物种鉴定,获得115条有效长度约为560bp的碱基序列,未存在插入和缺失。由表1可得知,A+T碱基含量(54.1%)高于G+C含量(45.9%),表现出A+T碱基组成偏向性;第1密码子位点的G+C含量(55.1%)高于第2和第3密码子位点(42.8%和39.6%),密码子组成也表现出一定的偏倚性。从总体来看,含有295个多态位点,约占52.7%,简约信息位点数为265个(约占47.3%),转换/颠换之比为1.56,说明序列突变已达到饱和;种间平均核苷酸差异数为49,约占总核苷酸数的29.17%。

由各分类阶元K2P遗传距离(表2)可知,种内不同个体的遗传距离平均为0.0032,而同属不同物种间的遗传距离为0.0562,约为种内遗传距离的17倍,符合Hebert等(2003)提出的“10×规则”。种间遗传距离在同科不同属间平均为0.1432,而同目不同科间为

0.2115, 可见, K2P 遗传距离值在科以上的高级阶元的增加明显变缓。此外, 虾虎鱼科与笛鲷科、鲷科和

鲱科两两间平均遗传距离变化范围在 0.2331—0.2534, 科间的遗传距离变异较小。

表 1 94 种鱼类的 CO I 基因序列碱基组成及变异情况

Tab.1 Base composition and variation of all CO I gene sequences of 94 fish species

密码子位点	A	T	G	C	转换/颠换比率 $R=S_i / S_v$
1 st 位点	27.2%	18.0%	29.6%	25.5%	2.79
2 nd 位点	14.9%	42.0%	12.8%	30.0%	0.77
3 rd 位点	30.7%	30.0%	9.9%	29.7%	1.11
全部位点	24.3%	29.8%	17.5%	28.4%	1.56

表 2 各分类阶元遗传距离(K2P)统计表

Tab.2 Genetic divergence (in K2P) within various taxonomic levels

比较范围	最大值	最小值	平均值
种内个体间	0.0060	0.0000	0.0032±0.0014
属内种间	0.0997	0.0012	0.0562±0.0073
科内属间	0.1741	0.0582	0.1432±0.0121
目内科间	0.2743	0.1168	0.2115±0.0167
虾虎鱼科-鲷科	0.2485	0.1969	0.2331±0.0166
虾虎鱼科-鲷科	0.2581	0.1840	0.2343±0.0170
虾虎鱼科-鲱科	0.2835	0.2114	0.2509±0.0167
鲷科-鲷科	0.2655	0.2309	0.2361±0.0198
鲷科-鲱科	0.2943	0.2075	0.2509±0.0187
鲷科-鲱科	0.2919	0.1231	0.2534±0.0172

2.2 物种的鉴定及有效种名的确定

经传统形态学鉴定, 94 个物种分属于 11 目 33 科 72 属, 其最终的物种有效名、分类地位及生态类群见表 3。研究发现, 存在多种鱼类形态变异较小, 传统形态学难以鉴别, 最后通过形态学鉴定到属而未能确定其物种名的有 12 个物种(以“*”或“**”表示)。

由于形态学分类法存在一定的局限性, 再将所获取的 CO I 基因序列导入到 NCBI 的 GenBank 数据库和 BOLD 系统进行序列相似度比对, 其中 59 种鱼类形态学鉴定结果与两者比对结果相对应(Ident 98%)。存在 13 种鱼类形态学鉴定结果仅与 NCBI 数据库相似度最高的比对结果相对应, 而与 BOLD 系统未能高度匹配(“△”标注), 6 种鱼类形态学鉴定结果仅与 BOLD 系统相似度最高的比对结果相对应(“▽”标注)。研究发现, 数据库中与形态鉴定为弹涂鱼(*P. modestus*) 一致性最高的序列为尾斑舌塘鳢(*Parioglossus dotui*) (Ident 99%), 但后者形态特征与分布情况同该鱼种差距甚大, 因此将该样本确定为弹涂鱼(“§”标注)。另外, 12 个物种通过形态学可鉴定到种, 分子鉴定到科的有 8 种(以“*”表示), 分子鉴

定到属的为 4 种(以“**”表示), 说明数据库里的物种 DNA 条形码不够完善, 亟需补充。此外, 通过综合比较物种的有效命名和分类地位, 发现 6 个物种存在分歧, 本文最终以《拉汉世界鱼类名典》和综合分类学信息系统的信息为准(“☆”标注)。

2.3 鱼类群落组成

本次于雷州半岛红树林保护区共采集到鱼类 94 种, 其中鲈形目鱼类有 59 种, 占总物种数的 62.77%, 其次是鲱形目和鲷形目分别为 6 种(占 6.38%)和 5 种(占 5.32%), 而鲤形目的鱼类采集到 2 种(占 2.13%), 鲈形目中种类最多的科是虾虎鱼科, 29 种(占 30.85%), 其次是鲷科有 6 种(占 6.38%)。可能是由于虾虎鱼类绝大多数体型细小, 更适宜于红树林湿地生态环境, 成为了代表性物种。

从生态类群组成来看(图 1), 红树林海域物种数占优势的是海洋洄游鱼类, 共有 31 种, 占物种总数的 32.98%, 其次是海洋偶见鱼类 21 种(占 22.34%)和两侧洄游鱼类 16 种(占 17.02%), 而红树林定居鱼类 10 种, 占物种总数的 10.64%, 其次是淡水偶见鱼类 6 种和淡水洄游鱼类 8 种, 而采集到的降海洄游鱼类有

表 3 94 种鱼类的物种名录、生态类群及相应 DNA 条码序列号
 Tab.3 The list of 94 fish species, ecological groups and the corresponding DNA GenBank accession numbers

分类地位		物种	生态类群	GenBank 序列号
鲈形目 Perciformes	鲷科 Sparidae	棘鲷属 <i>Acanthopagrus</i>		
		黑棘鲷 <i>Acanthopagrus schlegelii</i>	MS	KT951727, KT951729
		黄鳍棘鲷 <i>Acanthopagrus latus</i> [△]	MM	KT951738
		灰鳍棘鲷 <i>Acanthopagrus berda</i>	MM	KT951737
	鲷属 <i>Sparus</i>	鲷属 <i>Sparus</i> sp.**	MM	KT951733
	二长棘鲷属 <i>Parargyrops</i>	二长棘鲷 <i>Parargyrops edita</i>	FS	KT951789
	平鲷属 <i>Rhabdosargus</i>	平鲷 <i>Rhabdosargus sarba</i>	MM	KT951734
	笛鲷科 Lutjanidae	笛鲷属 <i>Lutjanus</i>		
		笛鲷属 <i>Lutjanus</i> sp.*	MS	KT951796
	须鲷科 Mullidae	拟绯鲤属 <i>Pseudupeneus</i>		
		西非拟绯鲤 <i>Pseudupeneus prayensis</i> [▽]	MS	KT951788
	慈鲷科 Cichlidae	罗非鱼属 <i>Oreochromis</i>		
		莫桑比克罗非鱼 <i>Oreochromis mossambicus</i>	AM	KT951783
		尼罗罗非鱼 <i>Oreochromis niloticus</i>	AM	KT951784
	狼鲈科 Moronidae	花鲈属 <i>Lateolabrax</i>		
		中国花鲈 <i>Lateolabrax maculatus</i>	MM	KT951728, KT951730
	石鲈科 Haemulidae	胡椒鲷属 <i>Diagramma</i>		
		密点少棘胡椒鲷 <i>Diagramma pictum</i>	MS	KT951790
	钻嘴鱼科 Gerreidae	银鲈属 <i>Gerres</i>		
		长棘银鲈 <i>Gerres filamentosus</i>	AM	KT951731
		缘边银鲈 <i>Gerres limbatus</i>	AM	KT951791
	鲷科 Leiognathidae	项鲷属 <i>Nuchequula</i>		
		颈斑项鲷 <i>Nuchequula nuchalis</i>	MM	KT951724- KT951726
	沙鲛科 Sillaginidae	沙鲛属 <i>Sillago</i>		
		沙鲛属 <i>Sillago</i> sp.**	MS	KT951735
		亚洲鳊 <i>Sillago asiatica</i>	MS	KT951736
	鲷科 Terapontidae	鲷属 <i>Terapon</i>		
		细鳞鲷 <i>Terapon jarbua</i> [△]	MS	KT951739
	鲷科 Carangidae	鲷属 <i>Trachinotus</i>		
		卵形鲷 <i>Trachinotus ovatus</i> [△]	MS	KT951782
		细鳞属 <i>Selaroides</i>		
		金带细鳞 <i>Selaroides leptolepis</i>	MM	KT951792
		若鲷属 <i>Carangoides</i>		
		马拉巴若鲷 <i>Carangoides malabaricus</i>	MM	KT951793
	蓝子鱼科 Siganidae	蓝子鱼属 <i>Siganus</i>		
		星斑蓝子鱼 <i>Siganus guttatus</i>	MS	KT951794
		银色蓝子鱼 <i>Siganus argenteus</i>	MS	KT951795
	金钱鱼科 Gerreidae	金钱鱼属 <i>Gerres</i>		
		金钱鱼 <i>Scatophagus argus</i>	MM	KT951732
	双边鱼科 Chandidae	双边鱼属 <i>Ambassis</i>		
		玛丽双边鱼 <i>Ambassis marianus</i> [▽]	FM	KT951780, KT951781
	隆头鱼科 Labridae	海猪鱼属 <i>Halichoeres</i>		
		云斑海猪鱼 <i>Halichoeres nigrescens</i>	MS	EU871683
	鱼衔科 Callionymidae	鱼衔属 <i>Callionymus</i>		
		箭鱼衔 <i>Callionymus sagitta</i>	MS	KT951740
	塘鳢科 Eleotridae	脊塘鳢属 <i>Butis</i>		
		脊塘鳢 <i>Butis butis</i> [△]	AM	KT951754
	塘鳢属 <i>Eleotris</i>	塘鳢属 <i>Eleotris</i> sp.*	FM	KT951755, KT951756
	乌塘鳢属 <i>Bostrychus</i>	中华乌塘鳢 <i>Bostrychus sinensis</i>	FM	KT951786
	虾虎鱼科 Gobiidae	大弹涂鱼属 <i>Boleophthalmus</i>		
		大弹涂鱼 <i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	ES	KT951741, KT951742
	弹涂鱼属 <i>Periophthalmus</i>	弹涂鱼 <i>Periophthalmus modestus</i> [§]	ES	KT951743
		大鳍弹涂鱼 <i>Periophthalmus magnuspinnatus</i>	ES	KT951744
	青弹涂鱼属 <i>Scartelaos</i>	青弹涂鱼 <i>Scartelaos histophorus</i>	ES	KT951745- KT951746
	背眼虾虎鱼属 <i>Oxuderces</i>	犬齿背眼虾虎鱼 <i>Oxuderces dentatus</i>	MM	KT951747
	蜂巢虾虎鱼属 <i>Favonigobius</i>	裸项蜂巢虾虎鱼 <i>Favonigobius gymnauchen</i>	AM	KT951748, KT951749

续表

分类地位	物种	生态类群	GenBank 序列号
	雷氏蜂巢虾虎 <i>Favonigobius reichei</i> [▽]	MM	KT951761
韃靼虎鱼属 <i>Amoya</i>	普氏韃靼虎鱼 <i>Amoya pflaumii</i>	ES	KT951752
	舟山韃靼虎鱼 <i>Amoya chusanensis</i> ^{△☆}	MM	KT951753
	绿斑韃靼虎鱼 <i>Amoya chlorostigmatoides</i> ^{△☆}	ES	KT951774, KT951775
叉舌虾虎鱼属 <i>Glossogobius</i>	金黄舌虾虎鱼 <i>Glossogobius aureus</i> [△]	FM	KT951787
	斑纹舌虾虎鱼 <i>Glossogobius olivaceus</i>	AM	KT951757
	钝吻叉舌虾虎鱼 <i>Glossogobius circumspectus</i>	FM	KT951763- KT951765
拟虾虎鱼属 <i>Pseudogobius</i>	爪哇拟虾虎鱼 <i>Pseudogobius javanicus</i>	AM	KT951766
	小口拟虾虎鱼 <i>Pseudogobius masago</i>	ES	KT951767
瓢鳍虾虎鱼属 <i>Sicyopterus</i>	瓢鳍虾虎鱼属 <i>Sicyopterus</i> sp.*	AM	KT951770
	兔头瓢鳍虾虎鱼 <i>Sicyopterus lagocephalus</i> [▽]	AM	KT951771
瓢眼虾虎鱼属 <i>Sicyopus</i>	环带瓢眼虾虎鱼 <i>Sicyopus zosterophorum</i> [▽]	FS	KT951772
鲮虾虎鱼属 <i>Mugilogobius</i>	阿部氏鲮虾虎鱼 <i>Mugilogobius abei</i>	MM	KT951776
	诸氏鲮虾虎鱼 <i>Mugilogobius chulae</i> [△]	AM	KT951777
衔虾虎鱼属 <i>Istigobius</i>	凯氏衔虾虎鱼 <i>Istigobius campbelli</i>	MM	KT951778
缟虾虎鱼属 <i>Tridentiger</i>	髯缟虾虎鱼 <i>Tridentiger barbatus</i>	MM	KT951779
杯虾虎鱼属 <i>Cotylopus</i>	杯虾虎鱼属 <i>Cotylopus</i> sp.*	FS	KT951785
复虾虎鱼属 <i>Acanthogobius</i>	斑尾刺虾虎 <i>Acanthogobius ommaturus</i> ^{△☆}	MM	KT951750, KT951751
枝牙虾虎鱼属 <i>Stiphodon</i>	枝牙虾虎鱼属 <i>Stiphodon</i> sp.*	AM	KT951773
孔鰕虎属 <i>Trypauchen</i>	孔虾虎鱼 <i>Trypauchen vagina</i>	ES	KT951768
吻虾虎鱼属 <i>Rhinogobius</i>	子陵吻虾虎鱼 <i>Rhinogobius giurinus</i>	FM	KT951769
鸚虾虎鱼属 <i>Exyrias</i>	纵带鸚虾虎鱼 <i>Exyrias puntang</i>	MS	KT951758- KT951760
鳍虾虎鱼属 <i>Gobiopterus</i>	湖棲鳍虾虎 <i>Gobiopterus lacustris</i> [△]	FM	KT951762
鲤形目 鲤科 梅氏鳊属	大鳞梅茨鱼 <i>Metzia mesembrinum</i> [△]	FS	KT951797
Characiformes Cyprinidae <i>Metzia</i>			
脂鲤科 颊齿脂鲤	颊齿脂鲤属 <i>Apareiodon</i> sp.**	FS	KT951798
Hemiodontidae <i>Apareiodon</i>			
鲮形目 鲮科 鲮属	金点龟鲮 <i>Chelon parsia</i>	MM	KT951799
Mugiliformes Mugilidae <i>Chelon</i>			
	前鳞龟鲮 <i>Chelon affinis</i> [*]	MM	KT951800
	灰鳍鲮 <i>Chelon melinoptera</i> [*]	MM	KT951801, KT951802
	鲮属 <i>Liza</i> sp. JDD-2011e*	MM	KT951803
	绿背龟鲮 <i>Chelon subviridis</i> [*]	MM	KT951804- KT951806
鹤鲮目 鲮科 下鲮属	缘下鲮鱼 <i>Hyporhamphus limbatus</i>	FM	KT951807, KT951808
Beloniformes Hemiramphidae <i>Hyporhamphus</i>			
异鳞鲮属	异鳞鲮属 <i>Zenarchopterus</i> sp.**	FS	KT951809, KT951810
<i>Zenarchopterus</i>			
圆颌针鱼科 圆颌针鱼属	尾斑圆尾鹤鲮 <i>Strongylura strongylura</i>	MS	KT951811
Belonidae <i>Strongylura</i>			
飞鱼科 细身飞鱼属	黑翼文鳐鱼 <i>Hirundichthys rondeletii</i>	MM	KT951812
Exocoetidae <i>Hirundichthys</i>			

续表

分类地位			物种	生态类群	GenBank 序列号
海鲢目 Elopiformes	海鲢科 Elopidae	海鲢属 <i>Elops</i>	夏威夷海鲢 <i>Elops hawaiiensis</i>	AM	KT951813, KT951814
			大眼海鲢 <i>Elops machnata</i>	MM	KT951815
大海鲢科 Megalopidae	大海鲢属 <i>Megalops</i>		大海鲢 <i>Megalops cyprinoides</i>	MM	KT951816
鲈形目 Tetraodontiformes	四齿鲈科 Tetraodontidae	多纪鲈属 <i>Takifugu</i>	暗纹多纪鲈 <i>Takifugu porphyreus</i> [△]	AN	KT951818, KT951819
			黑点东方鲈 <i>Takifugu niphobles</i>	MM	KT951817
			横纹多纪鲈 <i>Takifugu oblongus</i>	MS	KT951820
拟单角鲈属 <i>Pseudomonacanthus</i>			庇隆氏拟单角鲈 <i>Pseudomonacanthus peroni</i> [▽]	ES	KT951821
鲱形目 Clupeiformes	鲱科 Engraulidae	鲱属 <i>Engraulis</i>	日本鲱 <i>Engraulis japonicus</i> [△]	MM	KT951822
			小公鱼属 <i>Stolephorus</i> sp.*	MM	KT951824
			叶鲱 <i>Escualosa thoracata</i>	MM	KT951823
			黑尾小沙丁鱼 <i>Sardinella melanura</i>	MM	KT951825
			圆吻海鲈 <i>Nematalosa nasus</i>	MM	KT951826
			斑鲈 <i>Konosirus punctatus</i>	ES	KT951832
鲈形目 Scorpaeniformes	鲈科 Scorpaenidae	真裸皮鲈属 <i>Tetraroge</i>	髯真裸皮鲈 <i>Tetraroge barbata</i> [▽]	MS	KT951827
			毒鲈 <i>Synanceia</i> sp.*	MS	KT951828
			褐萑鲈 <i>Sebastiscus marmoratus</i>	MM	KT951829
			日本瞳鲈 <i>Inegocia japonica</i>	MS	KT951830
			印度鲈 <i>Platycephalus indicus</i>	MS	KT951831
鲈形目 Siluriformes	海鲈科 Ariidae	海鲈属 <i>Netuma</i>	大头多齿海鲈 <i>Netuma thalassina</i> [△]	AM	KT951833
鳗鲡目 Anguilliformes	糯鳗科 Congridae	尖尾鳗属 <i>Uroconger</i>	尖尾鳗 <i>Uroconger lepturus</i>	MS	KT951834
	鳗鲡科 Anguillidae	鳗鲡属 <i>Anguilla</i>	日本鳗鲡 <i>Anguilla japonica</i>	CA	KT951835
鲽形目 Pleuronectiformes	鲽科 Soleidae	鲽属 <i>Solea</i>	卵 鲽 <i>Solea ovata</i>	MS	KT951836
			东方宽箬鲽 <i>Brachirus orientalis</i>	AM	KT951837
			长钩须鲽 <i>Paraplagusia bilineata</i>	AM	KT951838

1) △表示形态学鉴定结果与 NCBI 相似度比对结果(Ident 98%)相对应; ▽表示形态学鉴定结果与 BOLD 相似度比对结果(Ident 98%)相对应; ☆NCBI 或 BOLD 系统相似度比对的物种命名与《拉汉世界鱼类名典》的命名存在分歧; §表示 NCBI 和 BOLD 相似度比对结果和 FishBase 存在差异; *表示通过形态学和分子鉴定到属的物种; **表示通过形态学鉴定到属, 分子鉴定到科的物种; 2) MS 表示海洋偶见鱼类, MM 为海洋洄游鱼类, ES 表示红树林定居鱼类, AN 表示溯河洄游鱼类, CA 表示降海洄游鱼类, FM 表示淡水洄游鱼类, FS 表示淡水偶见鱼类

1 种, 为日本鳗鲡(*A. japonica*), 溯河洄游鱼类为 1 种, 为暗纹多纪鲈(*T. porphyreus*)。研究发现, 四个采集点的各生态类群组成具有相似的特征, 以海洋洄游鱼类为优势种群, 以海洋偶见鱼类、红树林定居鱼类、两侧洄游鱼类居多。流沙湾和东海岛的海洋偶见鱼类物种数明显多于九龙山和高桥; 仅各 1 种的溯河洄游鱼类和降海洄游鱼类分别出现于流沙湾和东海岛; 东海岛的两侧洄游鱼类少于另外三个采样点。

2.4 聚类分析

基于 115 条 CO I 序列的 101 个单倍型构建系统关系树, 同种鱼类的不同个体间均可各自聚为独立的一支, 且属内不同物种间界限清晰(如图 2)。虾虎鱼科(Gobiidae)的弹涂鱼属(*Periophthalmus*)、青弹涂鱼属(*Scartelaos*)聚为一支, 与虾虎鱼科(Gobiidae)的背眼虾虎鱼属(*Oxuderces*)及其它的属亲缘关系很近(以◆表示), 从而可以进一步证实经数据库相似度比

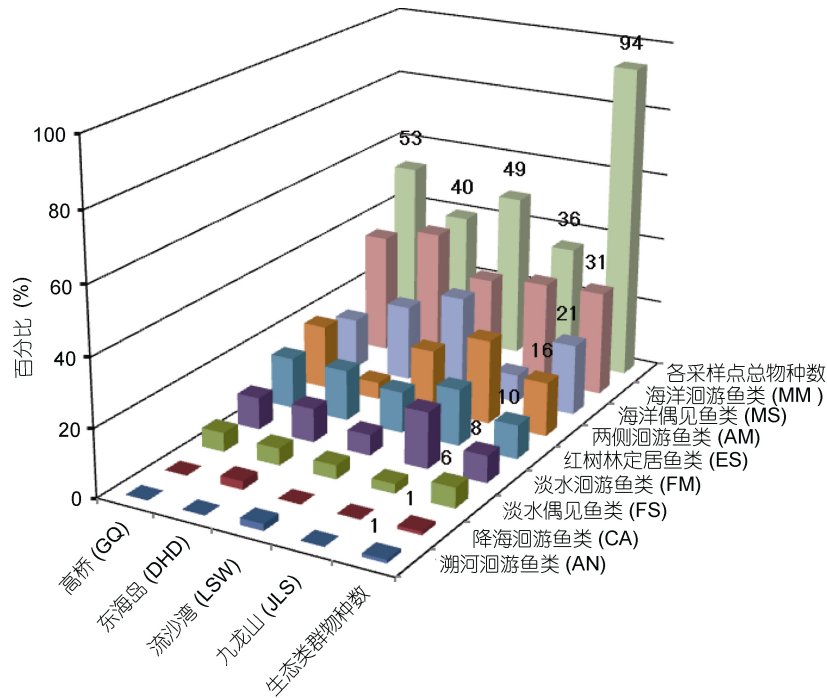


图 1 雷州半岛各采样点的物种数及各生态类群的百分比组成

Fig.1 Composition of fish species and ecological groups of each site in Leizhou Peninsula

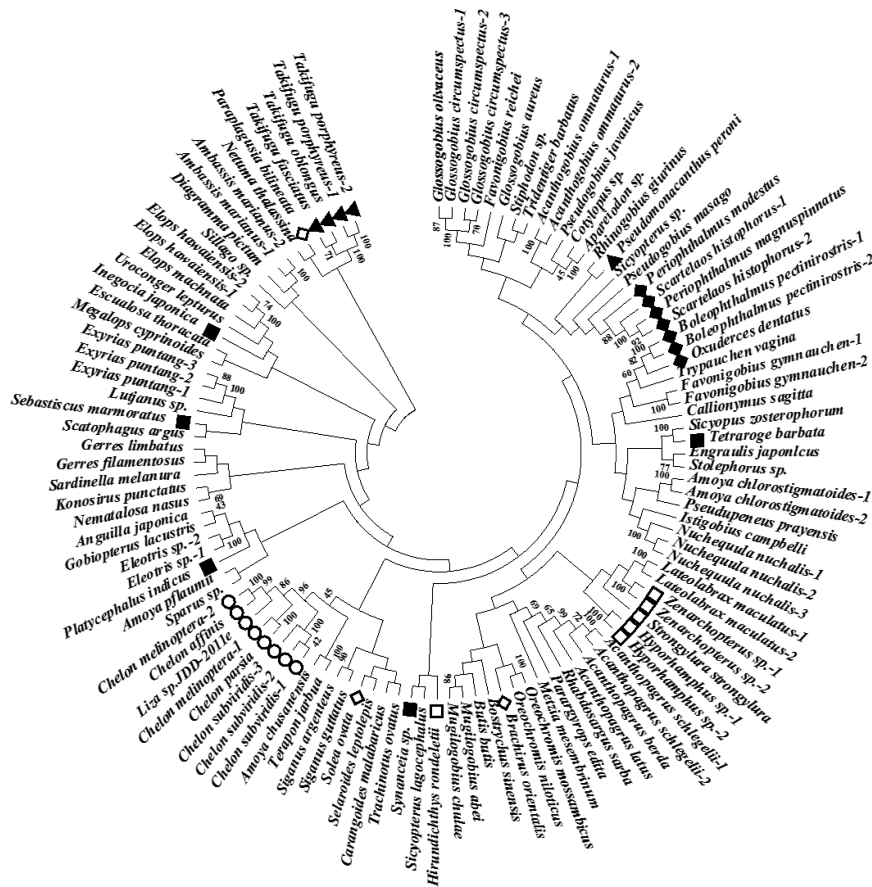


图 2 雷州半岛红树林 94 个物种的 115 条 CO I 序列构建的邻位连接树

Fig.2 The neighbor-joining tree of 115 CO I barcoding sequences of 94 species in mangrove waters of Leizhou Peninsula

对高的物种并非尾斑舌塘鳢(*Parioglossus dotui*), 而是弹涂鱼(*P. modestus*)。另外, 鲈形目(Tetraodontiformes)(以▲表示)及鲻科(Mugilidae)的鲻属(*Chelon*)(以○表示)也能各自聚为独立的一支, 且置信度高。其中, 庇隆氏拟单角鲈(*P. peroni*)与同属于四齿鲈科(Tetraodontidae)的其它鱼类聚类关系较远, 黑翼文鳃鱼(*H. rondeletii*)与同属于鹤鲷目(Beloniformes)(以□表示)的其它鱼类聚类关系较远, 此外, 一些目内科属间的聚类关系出现一些异常, 即鲈形目(Scorpaeniformes)、鲷形目(Pleuronectiformes)(分别以■和◇表示)的物种与其它目的聚类关系比较混乱。

3 讨论

红树林同海草床和珊瑚礁海域存在相通性, 是鱼类重要的栖息地和育幼场, 研究其鱼类的种类对于保护物种多样性具有极其重要的作用(Honda *et al.*, 2013)。由于红树林中鱼类栖息环境变化大, 性状特征变异快及存在隐存种、新物种和杂交种(Zemlak *et al.*, 2009)等问题加大了传统形态学分类鉴定的难度。本研究将 CO I 条形码应用于雷州半岛沿岸红树林鱼类的分类鉴定, 提高物种鉴定的准确性及有利于推动 DNA 条形码数据库共享平台的建设, 同时也揭示出了一些问题。

3.1 应用 CO I 条形码进行鉴定发现的问题

应用 CO I 条形码鉴别出红树林鱼类共计 94 种, 由此可见其作为通用引物的广泛适用性及其优势。但由于 DNA 条形码数据库仍有欠缺, 本研究的鱼类样品中仍有一些物种未能进行分子鉴定, 以及由于时间久远和鉴定方法不够完善, 有的后期研究结果未及时更新至数据库。建议需加强标本资料的收集及进一步完善 DNA 条形码数据库, 推动国际数据库共享平台的建设。另有研究指出单一的 CO I 基因并非适用于所有鱼类物种的鉴别(Krück *et al.*, 2013)。水产养殖中出现了广泛培育杂交种及近海外来物种的侵袭等新的问题, 加大了研究难度, 新的研究工具“多基因条形码”应加大研究和应用(Chesters *et al.*, 2015), 并及时补充低分化物种的其它相关数据(如线粒体 DNA 控制区等)进行更进一步的分析。

3.2 红树林对于不同生态类群鱼类的保育意义和生境危机

红树林区采集的鲤形目(Characiformes)鱼类有 2 种(占 2.13%)与何秀玲等(2002)对雷州半岛红树林区

的调查发现的鲤形目鱼类占总物种数的 3.90%近似, 但远低于长江口潮沟的优势类群鲤形目(占物种总数 14.94%)(金斌松, 2010), 这可能是由于长江口的径流量较雷州半岛红树林河口的径流量大, 更适宜于鲤形目鱼类的生存。由生态类群分析来看, 红树林海域的物种数占优势的是海洋洄游鱼类、海洋偶见鱼类和两侧洄游鱼类, 其特征同金斌松(2010)研究的长江口盐沼潮沟鱼类的生态类群组成相似, 表明红树林生态系统是许多海水、淡水和洄游性鱼类在特定生活阶段的重要栖息地和育幼场所, 且与已有的红树林调查一致(Elliott *et al.*, 2007; Franco *et al.*, 2008; 黄德练等, 2013)。红树林采集到的 10 种定居鱼类, 占物种总数的 10.64%, 主要是虾虎鱼类, 其依靠特化的生理构造, 比其它类型鱼类更能适应盐度波动、潮汐涨落等复杂多变的红树林生态环境, 成为了代表性物种。

3.3 CO I 条形码在系统进化分析中的适用性和局限性

系统关系树中的同种鱼类的不同个体间均可各自聚为独立的一支, 且属内不同物种间界限清晰, 但对于科以上的聚类关系分析不是很清晰, 如鲈形目(Scorpaeniformes)、鲷形目(Pleuronectiformes)的物种与其它目的聚类关系比较混乱, 表明 CO I 条形码具备一定的低阶元系统进化分析能力, 但对于高级阶元的系统进化分析准确性明显降低。究其原因, 可能是 CO I 条形码序列长度仅约 560bp, 信息位点数目有限, 科间变异较大, 且在高级阶元时碱基置换趋于饱和, 这与 CO I 条码序列间 K2P 遗传距离值在种以上的高级阶元的增加明显变缓的特征相符合。

为了获得较为准确的物种系统发生关系, 构建比较客观的进化树, 可以选择 mtDNA 不同区域的多组序列的组合比较的途径; 或选择核 DNA 序列和 mtDNA 不同区域相结合的方法; 或选择整个 mtDNA 全序列来进行研究的方法。近年来, 这些方法也得到过验证(Rocco *et al.*, 2007; Keskin *et al.*, 2009; Catanese *et al.*, 2010)。此外, 研究发现, 庇隆氏拟单角鲈(*P. peroni*)与同属于四齿鲈科(Tetraodontidae)的其它鱼类聚类关系较远, 黑翼文鳃鱼(*H. rondeletii*)与同属于鹤鲷目(Beloniformes)的其它鱼类聚类关系较远, 在一定程度上说明了这两种鱼类目前的分类地位有待进一步的商议。

综上所述, 本文利用 CO I 条形码技术可有效快捷地鉴定出红树林海域的鱼类并发现物种多样性极其丰富, 红树林生态系统更是许多淡水、海水和洄游

性鱼类的重要栖息地和育幼场所。虽然 CO I 条形码在属内的同物种间界限清晰,但对于科以上的聚类关系分析不是很清晰,说明其具备一定的低阶元系统进化分析能力,但对于高级阶元的系统进化分析准确性有所降低,其原因与序列长度较短有关,对于高阶元系统关系分析,应该加强对“多基因条形码技术”的研究,更加准确的确定物种的系统进化关系和分类地位。由于采样方法的限制以及近海生态环境的多变,对组成生态类群的鱼类样本采集不够全面,并且加上人类的过度捕捞,导致近海渔业资源的枯竭,给研究工作带来了一定的困扰。支持 Thomsen 等(2012)提出的可以尝试利用 DNA 条形码来检测水体中的体表细胞或分泌物来研究鱼类的种群分布和活动范围,使条形码技术成为鱼类迁徙、洄游等相关研究的便利工具。

致谢 感谢湛江市红树林保护区林广旋工程师和我校海洋资源与环境监测中心张瑜斌老师等在样本采集方面给予的无私帮助,谨致谢忱。

参 考 文 献

- 王中铎, 郭昱嵩, 陈荣玲等, 2009. 南海常见硬骨鱼类 CO I 条形码序列. 海洋与湖沼, 40(5): 608—614
- 伍汉霖, 邵广昭, 赖春福等, 2012. 拉汉世界鱼类系统名典. 台湾: 水产出版社, 10—550
- 伍汉霖, 钟俊生, 2008. 中国动物志(硬骨鱼纲): 鲈形目 5(虾虎鱼亚目). 北京: 科学出版社, 164—750
- 何秀玲, 叶 宁, 宣立强, 2003. 雷州半岛红树林海区的鱼类种类调查. 湛江海洋大学学报, 23(3): 3—10
- 张乔民, 隋淑珍, 2001. 中国红树林湿地资源及其保护. 自然资源学报, 16(1): 28—34
- 金斌松, 2010. 长江口盐沼潮沟鱼类多样性时空分布格局. 上海: 复旦大学博士论文, 12
- 黄德练, 吴志强, 黄亮亮等, 2013. 广西钦州港红树林区鱼类物种多样性分析. 海洋湖沼通报, (4): 135—142
- 谢庆裕, 2012. 我国红树林半世纪来丧失 73%. 南方日报, A20
- 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W 编著, 黄培堂译, 2008. 分子克隆实验指南(上、下二册). 3 版. 北京: 化学工业出版社, 693
- Blaber S J M, 2007. Mangroves and fishes: issues of diversity, dependence, and dogma. Bulletin of Marine Science, 80(3): 457—472
- Castellanos-Galindo G A, Krumme U, Rubio E A *et al*, 2013. Spatial variability of mangrove fish assemblage composition in the tropical eastern Pacific Ocean. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 23: 69—86
- Catanese G, Machado M, Infante C, 2010. Evolutionary relatedness of mackerels of the genus *Scomber* based on complete mitochondrial genomes: strong support to the recognition of Atlantic *Scomber colias* and Pacific *Scomber japonicus* as distinct species. Gene, 452(1): 35—43
- Chesters D, Zheng W M, Zhu C D, 2015. A DNA Barcoding system integrating multigene sequence data. Methods in Ecology and Evolution, 6(8): 930—937
- Elliott M, Whitfield A K, Potter I C *et al*, 2007. The guild approach to categorizing estuarine fish assemblages: a global review. Fish and Fisheries, 8(3): 241—268
- Field C B, Osborn J G, Hoffman L L *et al*, 1998. Mangrove biodiversity and ecosystem function. Global Ecology and Biogeography Letters, 7(1): 3—14
- Franco A M, Elliott M, Franzoi P *et al*, 2008. Life strategies of fishes in European estuaries: the functional guild approach. Marine Ecology Progress Series, 354: 219—228
- Gajdzik L, Vanreusel A, Koedam N *et al*, 2014. The mangrove forests as nursery habitats for the ichthyofauna of Mida Creek (Kenya, East Africa). Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 94(5): 865—877
- Hajibabaei M, Singer G A C, Hebert P D N *et al*, 2007. DNA barcoding: how it complements taxonomy, molecular phylogenetics and population genetics. Trends in Genetics, 23(4): 167—172
- Han W D, Lui J K, He X L *et al*, 2003. Shellfish and fish biodiversity of mangrove ecosystems in Leizhou Peninsula, China. Journal of Coastal Development, 7(1): 21—29
- Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L *et al*, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 270(1512): 313—321
- Honda K, Nakamura Y, Nakaoka M *et al*, 2013. Habitat use by fishes in coral reefs, seagrass beds and mangrove habitats in the Philippines. PLoS One, 8(8): e65735
- Keskin E, Can A, 2009. Phylogenetic relationships among four species and a sub-species of Mullidae (Actinopterygii; Perciformes) based on mitochondrial cytochrome B, 12S rRNA and cytochrome oxidase II genes. Biochemical Systematics and Ecology, 37(5): 653—661
- Kimirei I A, Nagelkerken I, Mgaya Y D *et al*, 2013. The mangrove nursery paradigm revisited: otolith stable isotopes support nursery-to-reef movements by indo-Pacific fishes. PLoS One, 8(6): e66320
- Krück N C, Tibbetts I R, Ward R D *et al*, 2013. Multi-gene barcoding to discriminate sibling species within a morphologically difficult fish genus (*Sillago*). Fisheries Research, 143: 39—46
- Kuo S R, Lin H J, Shao K T, 1999. Fish assemblages in the mangrove creeks of northern and southern estuaries Taiwan. Estuaries and Coasts, 22(4): 1004—1015
- Li N, Chen P M, Qiao P P *et al*, 2014. Research advances on marine ecological effect and repairing techniques of coastal mangrove wetland. Asian Agricultural Research, 6(8): 60—64
- Nickerson D J, 1999. Trade-offs of mangrove area development in the Philippines. Ecological Economics, 28(2): 279—298
- Rocco L, Liguori I, Costagliola D *et al*, 2007. Molecular and karyological aspects of Batoidea (Chondrichthyes, Elasmobranchi) phylogeny. Gene, 389(1): 80—86

- Rozas J, Rozas R, 1999. DnaSP version 3: An integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics*, 15(2): 174—175
- Swartz E R, Mwale M, Hanner R, 2008. A role for barcoding in the study of African fish diversity and conservation. *South African Journal of Science*, 104(7—8): 293—298
- Thomsen P F, Kielgast J, Iversen L L *et al*, 2012. Detection of a diverse marine fish fauna using environmental DNA from seawater samples. *PLoS One*, 7(8): e41732
- Triantafyllidis A, Bobori D, Koliamitra C *et al*, 2011. DNA barcoding analysis of fish species diversity in four north Greek lakes. *Mitochondrial DNA: The Journal of DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 22(S1): 37—42
- Ward R D, Zemlak T S, Innes B H *et al*, 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462): 1847—1857
- Zemlak T S, Ward R D, Connell A D *et al*, 2009. DNA barcoding reveals overlooked marine fishes. *Molecular Ecology Resources*, 9(S1): 237—242

CO I BARCODE-ASSISTED SPECIES DIVERSITY STUDY ON MANGROVE FISH IN LEIZHOU PENINSULA

ZHANG Shun, LIAO Jian, BAI Qin, CHEN Chong, GUO Yu-Song, LIU Chu-Wu, WANG Zhong-Duo
(*Fisheries College, Guangdong Ocean University Key Laboratory of Aquaculture in South China Sea for Aquatic Economic Animal of Guangdong Higher Education Institutes, Zhanjiang 524025, China*)

Abstract We randomly collected 1720 young and adult fish from March 2014 to July 2015 in mangrove waters of Leizhou Peninsula during a fish survey to enrich local fish species database and the ecological and environmental status, and to test the applicability of combining the CO I barcode technology with FishBase and other fish morphological classification schemes. In total, 94 species were identified, belonging to 72 genera, 33 families, and 11 orders. The results show that fish species in the mangrove waters was abundant, of which Order Perciformes were the most abundant fish (59 species or 62.77% of the total species), followed by Clupeiformes (6 species, 6.38%), Mugiliformes (5 species, 5.32%), and Characiformes (2 species, 2.13%). Of the Perciformes, gobies were dominant species (29 species, 30.85%). In addition, marine migratory fish were the highest species taking 32.98%, followed by marine stragglers 22.34%, amphidromous 17.02%, and few estuarine species. In addition, 11% of major gobies inhabit the mangrove estuarine. Therefore, mangrove waters are an important habitat and nursery field for many marine, fresh, and migratory fishes. On the other hand, CO I barcoding has been proved practical in studying the fish biodiversity.

Key words mangrove; CO I gene; DNA barcode; fishes identification; species diversity