

南海常见硬骨鱼类 CO 条码序列*

王中铎^{1,2} 郭昱嵩¹ 陈荣玲¹ 何晓莹¹ 刘楚吾^{1,2} 刘筠²

(1. 广东海洋大学水产学院 湛江 524066; 2. 湖南师范大学生命科学院 长沙 410081)

提要 运用一对特异性引物扩增并测定了南海硬骨鱼类 40 个物种 89 个样本的线粒体 DNA 的细胞色素 *c* 氧化酶 (CO) 约 660bp 的部分序列, 即 CO 条码序列。综合比较了《中国鱼类系统检索》、《海洋鱼类志》、FishBase 鱼类形态学分类库、ITIS 综合分类学信息系统和生物条码系统(The Barcode of Life Data System, BOLD)的相应形态学与 DNA 序列资料, 在揭示完善我国鱼类检索系统必要性基础上, 探讨了 CO 条码序列在硬骨鱼类辅助物种鉴别和适用性, 并对运用该条码序列库完善我国鱼类检索系统的可能途径进行了初步摸索。结果表明, CO 条码序列获取便捷, 广泛适用硬骨鱼类物种鉴别, 并可用于低级分类阶元的系统进化分析。本研究结果可为分子生物学辅助分类、市场监督、资源有序利用和保护提供参考。

关键词 DNA 条码, CO, 物种鉴别, 硬骨鱼类
中图分类号 Q959

我国海洋鱼类开发和研究的历史相对较短, 与 FishBase(<http://fishbase.org/>)等国际广泛使用的鱼类分类检索系统相比, 中国现有的海洋鱼类分类检索系统的内容亟待补充和修正。DNA 序列辅助分类已经有 30 多年的历史, 被认为是一个理想的辅助形态学分类的手段。但由于不同实验室使用的 DNA 序列区段不同, 致使可比性缺乏, 严重阻碍了 DNA 序列辅助分类的进程。因此, Hebert 等(2003)提出利用线粒体 DNA 细胞色素 *c* 氧化酶 基因(CO)部分片段作为条码构建动物识别系统的设想, 次年“ The Barcode of Life Data System (BOLD) ”系统启动, 并很快与成熟的数据库系统(如 ITIS、NCBI)等数据进行有机的整合, 初步建立起一个全球共享的物种鉴定 DNA 条码系统(<http://www.boldsystems.org/>)。根据初步的估算, 动物 DNA 条码需要至少 10000 万条记录才可完成, 这相当于现在世界上最大的序列库 GenBank 的库存记录(5200 万)的 2 倍。而全世界大约有 3 万种鱼类, 约占脊椎动物物种数的 50%, 鱼类

DNA 条码系统的构建特别需要全球的鱼类研究者的协同努力。截至 2008 年 7 月, BOLD 库中收录了 5249 种鱼类的分子条码, 大部分都是欧美和澳大利亚国家相邻海区的种类。由于鱼类的本地化程度很高, 南海区的鱼类则主要需要中国等周边国家加强研究。

至今, 支持 CO 条码序列的用于物种鉴定的主要证据最初来源于无脊椎动物和鸟类的相关研究(Hebert *et al.*, 2004a, b; Hogg *et al.*, 2004)。尽管有越来越多的数据支持该方法的普遍适用性(Stahls *et al.*, 2008), 但是近期的一些研究显示种间分化不足(Shearer *et al.*, 2008)、种内分化过高(Boyer *et al.*, 2007)和杂交(Whitworth *et al.*, 2007)等对该方法有不可忽视的影响。

本研究试图通过测定和分析南海 40 种经济鱼类的线粒体 DNA 细胞色素 *c* 氧化酶 (CO) 的 DNA 条码序列, 分析该 DNA 条码在硬骨鱼类辅助物种鉴别的适用性, 摸索应用分子生物学手段完善我国鱼类检索系统的可能途径。

* “十一五”国家科技支撑计划项目, 2007BAD29B03 号; 广东省自然科学基金资助项目, 8452408801001272 号。王中铎, 博士, 讲师, E-mail: aduofa@163.com

通讯作者: 刘楚吾, 教授, 博导, E-mail: liucw@gdou.edu.cn

收稿日期: 2008-04-15, 收修改稿日期: 2008-06-19

1 材料与方 法

1.1 实验材料与形态学鉴定

实验鱼(表 1)采自湛江和海南三亚海鲜市场。参照《中国鱼类系统检索》(成庆泰等, 1987)、《台湾鱼类检索》(沈世杰, 1986)、《南海鱼类志》(中国科学院动物研究所, 1962)、《南海诸岛海域鱼类志》(国家水产总局南海水产研究所, 1979)和 FishBase(<http://fishbase.org/>)等进行形态学鉴定; 参考综合分类学信息系统(Integrated Taxonomic Information System, ITIS)和《拉汉世界鱼类名典》(伍汉霖等, 1999)核实物种有效名和分类地位; 拍照记录。分别取实验材料的肌肉、鳍条等组织置于 - 80 °C 低温或无水乙醇保存。

1.2 总 DNA 的提取

参照卢圣栋等(1999)的方法提取 DNA, 4 °C 低温保存备用。

1.3 目标区段的 PCR 扩增和序列测定

扩增线粒体 DNA 的细胞色素 *c* 氧化酶 (CO I) 部分序列, 即 DNA 条码(DNA barcode)所用的引物为:

FishF1-5' TCAACCAACCACAAAGACATTGGC
AC 3'

FishR1-5' TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAAT
CA 3'

PCR 反应体系总体积 50 μ l, 含 1 \times PCR Buffer, 1.5mmol/L MgCl₂, dNTPs 0.3mmol/L, 引物各 0.2 μ mol/L, *rTaq* DNA 聚合酶(TaKaRa)2.5U, 总 DNA 约 100ng。

扩增条件为: 94 °C 预变性 3min; 94 °C 变性 42s, 55 °C 退火 30s, 72 °C 延伸 50s, 循环 30 次; 最后 72 °C 延伸 5min。1.0%的琼脂糖电泳对扩增产物进行检测, PCR 产物直接由上海 Sangon 生物技术公司进行序列单向测定。

1.4 序列核实、对应物种和物种名核对、序列递交

在 MEGA 4.0 (Tamura *et al*, 2007)中比对测定序列并翻译为相应氨基酸序列, 初步确认测定序列为所需的 CO I 编码区段。BLASTN 初步确定 DNA 序列同源度较高序列, 辅助评估形态学分类准确性。在 BOLD Identification System (IDS) (<http://www.barcodinglife.com/views/idrequest.php>)进一步核实分类地位或物种有效名。经核实后的序列及相关资料, 用 Sequin 整理, 最后递交 GenBank, 获取序列号。

1.5 系统进化关系分析

序列比对、K2P 距离计算、以邻位连接法

(Neighbor-Joining method, NJ)经 1000 次抽样检测 (Bootstraps) 可信度构建分子系统进化树等均在 MEGA 4.0 中完成。

2 结果与分析

2.1 样本的种类的形态学鉴定

综合比较我国的海洋鱼类分类学系统书籍: 《中国鱼类系统检索》(成庆泰等, 1987)、《台湾鱼类检索》(沈世杰, 1986)、《南海鱼类志》(中国科学院动物研究所, 1962)、《南海诸岛海域鱼类志》(国家水产总局南海水产研究所, 1979), 发现对种类特征记录相近, 而种类记录以《中国鱼类系统检索》最为齐全, 因此后续分析多依照《中国鱼类系统检索》。所有样本经形态学鉴定, 最终确认的有效种名和分类地位等相关资料如表 1 所示。40 个物种分属于 4 目的 15 科, 其中 21 个物种在《中国鱼类系统检索》(以下简称《检索》)(成庆泰等, 1987)及 FishBase 中的相关描述一致性良好; 12 个物种存在分歧; 6 个物种《检索》未记录 (“#” 标注), 参考 FishBase 进行鉴定; 毒鲉属 (*Synanceia* spp.) 1 种未能确定其物种名。存在分歧的 12 个物种经过 ITIS 系统查询确认: 11 个物种的物种名不一致 (“*” 标注)——《检索》所用均不是有效种名, 主要表现为拉丁单词拼写遗漏, 使用无效属名和同种异名; 2 个科名不一致——《检索》的银鲈科和鲷科的拼写均不是有效形式 (“**” 标注)。

2.2 CO I 区段扩增与序列间遗传距离分析

表 1 中所列样本的 CO I 区段, 除千年笛鲷外, 都能以总 DNA 为模板, 顺利扩增得到单一亮带, 足以满足直接测序要求。而千年笛鲷则通过长距 PCR 得到包含 CO I 区段的纯化 mtDNA 长片段为模板, 得到了单一目标条带。测定的 89 条序列长度约 660bp, 没有插入和缺失或终止密码子, 与所扩增的 CO I 区段为线粒体 DNA 中的蛋白质编码区段相一致, 可以排除假基因干扰可能(Yao *et al*, 2008)¹⁾。

各分类阶元 K2P 遗传距离统计如表 2 所示, 同物种的不同个体间的 K2P 遗传距离平均为 0.0084, 远小于同属不同物种间的 0.1567。换言之, CO I DNA 条码区段在同一属中的种间遗传分化约为种内遗传分化的 18 倍, 有利于物种鉴定。种间遗传距离值在同科的不同属间平均为 0.1839, 而同目不同科间的为 0.2319。可见, K2P 遗传距离值在物种以上的高级阶元的增加明显变缓。

1) Yao Y G, Kong Q P, Salas A *et al*, 2008. Pseudo-mitochondrial genome haunts disease studies. *J Med Genet*, 2008.059782

表 1 物种的有效种名、分类地位与相应 DNA 条码序列号表
Tab.1 The valid name, taxonomic statue and GenBank accession number

中文名和拉丁物种名	分类地位	GenBank 序列号
红(红鳍)笛鲷(<i>L. erythropterus</i>) *∇⊕	鲈形目(Perciformes), 鲈亚目 (Percoidei), 笛鲷科(Lutjanidae)	EU600107、EU600108、EU600109、EU600110、 EU600111、EU600112、EU600113、EU600114
马拉巴笛鲷(<i>L. malabaricus</i>) # §		EU600115、EU600116
千年笛鲷(<i>L. sebae</i>) ⊕		EU600104、EU600105、EU600106
勒氏笛鲷(<i>L. russelli</i>)/(<i>L. russellii</i>) *⊕		EU600117、EU600118、EU600119
约氏笛鲷(<i>L. johni</i>)/(<i>L. johnii</i>) * §		EU600120、EU600121、EU600122
紫红笛鲷(<i>L. argentimaculatus</i>) §		EU600127、EU600128、EU600129、EU600130
星点笛鲷(<i>L. stellatus</i>) #		EU600132、EU600133
四带笛鲷(<i>L. kasmira</i>) ⊕		EU600138
孟加拉笛鲷(<i>L. bengalensis</i>) #		EU600135、EU600136、EU600137
金带笛鲷(<i>L. vaigiensis</i>)/(<i>L. fulvus</i>) *∇		EU600094、EU600095、EU600096
金焰笛鲷(<i>L. fulviflamma</i>) §		EU600123、EU600124、EU600125、EU600126
奥氏笛鲷(<i>L. ophuysenii</i>) #		EU600097、EU600098、EU600099
画眉笛鲷(<i>L. vitta</i>) §		EU600100、EU600101、EU600102、EU600103
白斑(双斑)笛鲷(<i>L. bohar</i>)		EU600131
线纹笛鲷(<i>L. lineolatus</i>)		EU600134
多鳞鲳(<i>Sillago sihama</i>) ⊕	鲳科(Sillaginidae)	EU600155、EU600156、EU871704
长棘银鲈(<i>Gerres filamentosus</i>)	银鲈科(Gerreidae) **	EU871690
日本金线鱼(<i>Nemipterus japonicus</i>)	金线鱼科(Nemipteridae)	EU871686、EU871687
大黄鱼(<i>Pseudosciaena crocea</i>) (<i>Larimichthys crocea</i>) *⊕	石首鱼科(Sciaenidae)	EU871688、EU871689
细鳞鲷(<i>Therapon jarbua</i>)/(<i>Therapon jarbua</i>) *⊕	鲷科(Terapontidae) **	EU871691、EU871692
鲷鱼(<i>T. theraps</i>) *		EU871698、EU871699
列牙鲷(<i>Pelates quadrilineatus</i>) §		EU600152
真鲷(<i>Pagrosomus major</i>)/(<i>Pagrus major</i>) * §	鲷科(Sparidae)	EU871693
二长棘鲷(<i>Parargyrops edita</i>)		EU871694
黄鳍鲷(<i>Sparus latus</i>)/(<i>Acanthopagrus latus</i>) *⊕		EU600151、EU871695
黑鳍大眼鲷(<i>Priacanthus boops</i>) (<i>Heteropriacanthus cruentatus</i>) *	大眼鲷科(Priacanthidae)	EU871696、EU871697
军曹鱼(<i>Rachycentron canadum</i>) §	军曹鱼科(Rachycentridae)	EU600159、EU600160
黑边石斑鱼(<i>Epinephelus fasciatus</i>) ⊕	鲷科(Serranidae)	EU600145、EU600146
青石斑鱼(<i>E. awoara</i>)		EU600143、EU600144
鲑点石斑鱼(<i>E. fario</i>)		EU600141、EU600142
褐点石斑鱼(<i>E. fuscoguttatus</i>)		EU600139、EU600140
橙点石斑(<i>E. akaara</i>) #		EU600147
横纹九棘鲈(<i>Cephalopholis igarashiensis</i>) #		EU871685
斑点马鲛(<i>Scomberomorus guttatus</i>) §	鲭亚目(Scombroidei), 鲭科(Scombridae)	EU871700
三线紫胸鱼(<i>Stethojulis trilineata</i>) ⊕	隆头鱼亚目(Labroidei), 隆头鱼科(Labridae)	EU871681、EU871682
云斑海猪鱼(<i>Halichoeres nigrescens</i>)		EU871683
红双棘鲷(<i>Dispinus ruber</i>) (<i>Sargocentron rubrum</i>) *∇⊕	金眼鲷目(Beryciformes), 鲷科(Holocentridae)	EU600149、EU600150
褐菖鲈(<i>Sebastiscus marmoratus</i>) ⊕	鲷形目(Scorpaeniformes), 鲷科(Scorpaenidae)	EU600153、EU600154、EU871701
毒鲷(<i>Synanceia</i> spp.)	毒鲷科(Synanceiidae)	EU871684
卵鲷(<i>Solea ovata</i>) ⊕	鲽形目(Pleuronectiformes), 鲽科(Soleidae)	EU600148、EU871702、EU871703

* 表示参照 FishBase, 经 ITIS 最终确认的有效种名; # 表示《中国鱼类系统检索》中缺少记录, 依 FishBase 等鱼类检索系统命名的种类; ** 银鲈科(Gerreidae)在《中国鱼类系统检索》中拼写为 Gerridae; 鲷科(Terapontidae)拼写为 Therapontidae; § 表示 BOLD 参考条码库(Reference Barcode Database)中具有—致度大于 98% 的相同物种的 DNA 条码序列; ∇ 表示 BOLD 参考条码库(Reference Barcode Database)中具有—致度大于 98% 的不同物种的 DNA 条码序列; ⊕ 表示仅 BOLD 未审核条码库(All Barcode Records on BOLD)中具有—致度大于 98% 的相同物种 DNA 条码序列; ⊖ 表示 BOLD 未审核条码库(All Barcode Records on BOLD)中具有—致度大于 98% 的不同物种 DNA 条码序列

表 2 各分类阶元遗传距离(K2P)统计表
Tab.2 Summary of genetic divergences (K2P) within various taxonomic levels

比较范围	最大值	最小值	平均值	标准方差
种内个体间	0.0989	0.0000	0.0084^d	0.0054
笛鲷属	0.0989 ^a	0.0000	0.0153	0.0014
石斑鱼属	0.0049	0.0016	0.0031	0.0013
属内种间	0.2084	0.0124	0.1567^e	0.0695
笛鲷属	0.2084	0.0124 ^b	0.1423	0.0088
石斑鱼属	0.1623	0.1001	0.1434	0.0107
鲷鱼属	0.1988	0.1890	0.1844	0.0177
科内属间	0.2032	0.0810	0.1839	0.0144
鲷科	0.2029	0.1861	0.2054	0.0206
鲷科	0.1922	0.0810 ^c	0.1507	0.0136
鲷科	0.2032	0.1909	0.1957	0.0195
目内科间	0.2469	0.1871	0.2319	0.0106
笛鲷科-鲷科	0.2292	0.1871	0.2030	0.0141
笛鲷科-鲷科	0.2469	0.1891	0.2215	0.0139
鲷科-鲷科	0.2465	0.2046	0.2319	0.0168
鲷科-鲷科	0.2429	0.2088	0.2244	0.0166
鲷科-鲷科	0.2454	0.2061	0.2243	0.0180

注: a 出现于约氏笛鲷个体间(YS3, EU600122)与(YS1, EU600120)和(YS2, EU600121); b 出现于约氏笛鲷(YS1, YS2)与金焰笛鲷(JY3, EU600125 和 JY4, EU600126); c 出现于真鲷(ZD1, EU871693)与二长棘鲷(ERJD1, EU871693); d 由本研究所有包含多条序列的 28 个物种统计得到; e 不可将不同属的物种间距离混进来计算

2.3 DNA 条码序列核对与递交

与 GenBank 等数据库比较, BOLD 专注于 DNA 条码物种鉴别系统的建立。BOLD 参考条码库(Reference Barcode Database)提供了经严格审查的物种的形态学报告和 DNA 条码序列, 可以作为物种鉴定直观准确的工具。BOLD 未审核条码库(All Barcode Records on BOLD)则未提供相应的图片等形态资料, 尚未经过管理者严格审核, 因此仅可作为参考。另外, BOLD 库推荐的种内一致度应 98%。

将表 1 所列 40 个物种的序列导入 BOLD IDS 系统中搜索进一步核实了分类地位或物种有效名。共有 21 个物种在 BOLD 未审核条码库中具有一致度大于 98%的相同物种 DNA 条码序列, 其中的 9 个物种在 BOLD 参考条码库中也具有一致度大于 98%的相同物种的 DNA 条码序列。另外有 15 个物种在 BOLD 库中搜索到相应的物种 DNA 条码序列的相似度在 90%—96%, 只能作为确认到属一级的分类阶元的依据。

研究中特别注意到(表 1 中“∇”和“⊕”标识): 红

鳍笛鲷(*Lutjanus erythropterus*)、金带笛鲷(*L. fulvus*)和红双棘鲷(*Sargocentron rubrum*)在 BOLD 参考条码库和未审核条码库中一致度最高的 DNA 条码序列分别对应马拉巴笛鲷(*L. malabaricus*, = 98.3%)和红鳍笛鲷(*L. erythropterus*, = 99.21%)、褶尾笛鲷(*L. lemniscatus*, = 99.53%)和褶尾笛鲷(*L. lemniscatus*, = 99.53%), 黑点棘鳞鱼(*Sargocentron melanospilos*, = 98.5%)和红双棘鲷(*S. rubrum*, = 100%); 青石斑鱼(*E. awoara*)在 BOLD 参考条码库中无高相似度序列, 而未审核条码库中对应的相似度最高(= 99.84%)的物种为点带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)。

马拉巴笛鲷、褶尾笛鲷、黑点棘鳞鱼和点带石斑鱼在《检索》中都没有相关记录。经 FishBase 等数据库检索分析确认均为有效物种, 且在南海海区有分布。除马拉巴笛鲷在以往研究中依靠采集到的材料与红鳍笛鲷进行了形态学比较研究外, 另外三个物种只通过 FishBase 等查阅相关形态学描述和图片。分析产生此类“同种异名”问题的原因, 主要有以下两点:

(1) 样本资料缺乏, 形态学鉴定错误, 命名时张冠李戴。例如: 金带笛鲷与褶尾笛鲷, 青石斑鱼与点带石斑鱼。尽管在以往的研究和本研究的形态学鉴定阶段综合借鉴《检索》和 FishBase 等的形态描述, 但由于金带笛鲷与褶尾笛鲷形态很接近且《检索》未对褶尾笛鲷进行记录, 可能导致了错误命名, 即本文的金带笛鲷可能应该为褶尾笛鲷; 青石斑鱼与点带石斑鱼也是类似情况。

(2) 外型酷似且物种间遗传分化水平不高, CO 条码序列难于分辨。例如: 马拉巴笛鲷与红鳍笛鲷, 黑点棘鳞鱼和红双棘鲷。由于马拉巴笛鲷与红鳍笛鲷是南海海区周边各国的重要养殖对象, 且形态学上难于分辨, 已有的线粒体 DNA 细胞色素 *b* 等分析也表明两者遗传分化不高(Guo *et al.*, 2007a)。本研究中, 通过红鳍笛鲷与马拉巴笛鲷的 CO 条码序列计算的种间遗传距离仅为 0.0250, 远小于石斑鱼属和鲷鱼属的种间遗传距离最小值 0.1001 和 0.1890(表 2), 无法将两者清晰分辨开来。《检索》中鲷属(*Sargocentron*)仅记录了有红双棘鲷(*S. rubrum*)一个物种。作者从 FishBase 资料比较推断本文中的红双棘鲷的形态学鉴定结果正确, BOLD 未审核条码库中对应相似度 100%的样本在一定程度上支持这一推断, 而 BOLD 参考条码库中对应的黑点棘鳞鱼相似度为 98.5%可理解为两物种 CO 条码序列分化程度较低。

最后, 将经核对的 DNA 条码序列递交 GenBank 得到的序列号: EU600094—EU6001156、EU6001159、EU6001160、EU871681—EU871704。

2.4 CO 条码序列的分子系统学分析

基于 40 个物种的 89 条 CO 序列间的 K2P 遗传距离, 使用邻位连接法得到的系统树如图 1 所示。除约氏笛鲷(*L. johnii*)外, 同物种的不同个体都聚在了一起, 不同物种之间界限大多十分明晰。属内种间的聚类基本依形态学分类关系。例如, 鲷科(Serranidae)的石斑鱼属(*Epinephelus*)鱼类先聚为一支; 隶属笛鲷科(Lutjanidae)的笛鲷属鱼类(*Lutjanus*)也都聚为独立一支。不过属内种间的聚类也出现一些聚类异常, 例如, 鲷鱼属的细鳞鲷(*Terapon jarbua*, XLL)与鲷鱼(*T. theraps*, LY)在系统树分别与不同目的鱼类先聚到一起。

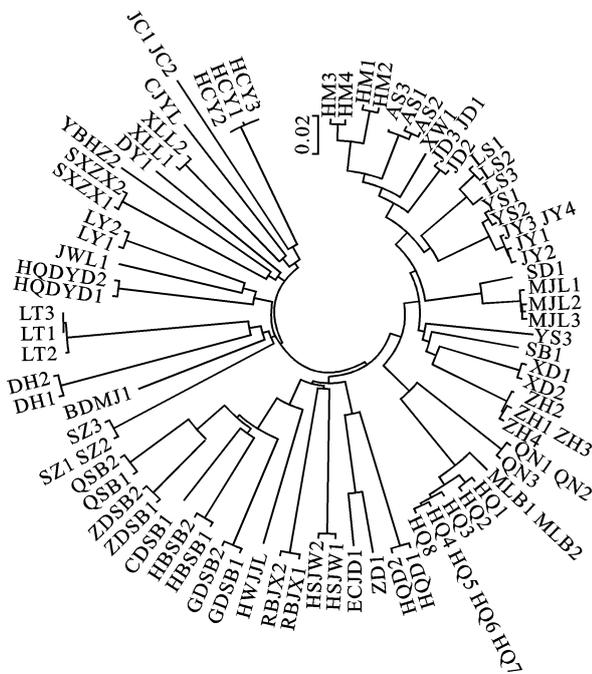


图 1 基于 89 条 CO 条码序列的邻位连接树

Fig.1 The neighbor-joining tree of 89 CO barcoding sequences

注: 序列代号为物种名的汉语拼音首字母, 具体信息见 GenBank 的序列 EU600094—EU6001156、EU6001159、EU6001160、EU871681—EU871704。非鲷亚目(Percoidae)物种名为粗体

3 讨论

本课题组利用线粒体 DNA 序列测定等分子生物

学技术对中国笛鲷属鱼类的分类进行了长期的系统研究, 在此过程中深切感受到补充和修订鱼类形态学分类系统十分必要和紧迫(Guo *et al.*, 2007a, b; Liu *et al.*, 2007; 王中锋等, 2005; 郭昱嵩, 2007¹⁾)。本文中所分析的 40 个物种大多为南海区的常见物种, 其中的笛鲷鱼类(snapper)、石斑鱼类(grouper)和鲷科是包括中国在内的世界各国都重视的经济种。从表 1 可见, 其中部分种类的物种名存在分歧。比如, 红笛鲷(*L. sanguineus*)的记录就有待商榷: 红鳍笛鲷(*L. erythropterus*)是南海海域传统经济种, 如果依照 Fishbase 中的描述, 红笛鲷在中国邻海应没有分布, 背鳍的鳍棘(鳍式: 10-10)少于红鳍笛鲷(11-11); 因此, 《中国鱼类检索系统》中对红笛鲷(*L. sanguineus*)的记录应为红鳍笛鲷(*L. erythropterus*)。另外, 科一级命名也有不一致的表现。其中的银鲷科(Gerreidae)误拼为 Gerridae, 鲷科(Terapontidae)被误拼为 Therapontidae、Teraponidae 或者 Theraponidae。形态学分类的分歧是影响学术交流的无形障碍, 而本文中研究的 CO 条码序列从分子辅助分类的角度对补充和修订我国鱼类检索系统的途径进行的初步探讨, 为人们提供了一座跨越障碍、增加交流的桥梁。

3.1 CO 条码序列获取和分析的潜在干扰

研究采用的 BOLD 库推荐的鱼类 CO 条码序列特异扩增引物, 成功的扩增了分属于硬骨鱼纲 4 个目的 40 个物种的 89 个样本。除千年笛鲷采用了长距 PCR 产物为模板, 其余都直接以总 DNA 为模板扩增获取单一目的条带。序列测定无需克隆, 直接以纯化 PCR 产物为模板, 利用上游扩增引物为测序引物单向测定即可。因此, CO 条码序列获取在鱼类较为方便简易。

假基因对于线粒体 DNA 序列扩增和分析的影响长期以来困扰着研究者。Richly 等(2004)通过比较 *Fugu rupripes* 的线粒体 DNA 和核 DNA 序列检测到 7—8 个假基因。在 CO 条码序列研究方面, Ward 等(2005)在对 211 个鱼类样本的分析中未发现线粒体假基因干扰, 研究中 5 个无法扩增的原因都归结为 DNA 的降解和引物不匹配。本研究中千年笛鲷以多个不同个体总 DNA 为模板扩增均产生小于目的条带(约 700bp)的杂带, 而通过长距 PCR 产物为模板则顺利获取了单一目的条带。这很可能是核 DNA 中存在相应的假基因区段(Richly *et al.*, 2004; Yao *et al.*,

1) 郭昱嵩, 2007. 中国笛鲷属习见种的分子系统发育及遗传多样性研究. 湖南师范大学博士学位论文, 65—70

2008¹⁾)。因此, 尽管 CO 条码序列容易扩增和测定, 研究者仍应注意 CO 条码序列分析, 尽量排除可能存在的假基因影响分析结果。

3.2 CO 条码序列在鱼类物种鉴别的广泛适用性和局限

本研究通过比较在各分类阶元的 K2P 遗传距离变化, 表明 CO 条码序列 CO DNA 条码区段在同属种间遗传分化约为种内遗传分化的 18 倍, 从而揭示了其适合于物种鉴定的内在特征。以 CO 条码序列构建的 NJ 系统进化树(图 1)直观反映出该条码序列能将几乎所有物种分辨开来。进一步, 将序列与 BOLD 库中其他研究者递交序列比对, 结合形态学分类特征分析, 成功对本研究的 40 个物种中的 21 个进行了物种鉴别。另外, 揭示了本研究中金带笛鲷 (*Lutjanus fulvus*) 极可能为褶尾笛鲷 (*L. lemniscatu*); 青石斑鱼 (*Epinephelus awoara*) 与点带石斑鱼 (*E. coioides*) 也可能存在混淆。这类结果对于辅助完善形态学系统, 尤其对补充《中国鱼类系统检索》缺乏记录等将具有很好的指导意义。

但是, CO 条码序列在广泛适用于鱼类物种鉴别的同时也存在局限。一方面, 由于 CO 条码序列长度仅为 660bp 左右, 且突变速率相对线粒体 DNA 控制区等要慢, 因此难于分辨分化程度过低的物种 (Shearer *et al*, 2008)。本研究中的红鳍笛鲷和马拉巴笛鲷就是十分典型的例子。另一方面, 由于线粒体 DNA 母系遗传的特征, 有研究认为种间杂交是另外一个干扰 CO 条码序列适用性的因素 (Whitworth *et al*, 2007)。本文中, 杂交似乎能够很好的解释邻位连接树(图 1)中约氏笛鲷 (*L. johnii*) 的两个个体 (YS1 和 YS2) 与另一个体 (YS3) 分离, 而与金焰笛鲷 (*L. fulviflamma*) 聚为一支的现象。但是因为约氏与金焰笛鲷两种形态学差别较大, 有关两物种的研究中从未发现两者的杂交现象 (Guo *et al*, 2007a), 基本可以排除杂交导致两种聚为一支的推测。因此, 作者同意 Ward 等 (2005) 的意见, 也认为杂交对于鱼类 CO 条码序列进行物种鉴定的干扰不明显。

3.3 CO 条码序列仅适于低阶元系统进化分析

对 CO 条码序列构建的 NJ 系统进化树(图 1)的分析表明了 CO 条码序列不但可以进行物种辨识, 也具备一定的低阶元系统进化分析能力, 但用于属以上高级阶元可靠性明显降低。究其原因, 可能是

CO 条码序列长度仅为 650bp 左右, 信息位点数不多, 且在高级阶元时碱基置换趋于饱和。这与 CO 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(表 2)。

总的看来, CO 条码序列能有效的用于鱼类物种鉴别和鱼类形态学分类系统的补充和修订。但 CO 条码序列数据还十分欠缺, 本研究中近半数物种序列都没有搜索到相应序列进行比较。尤其是辅以形态学资料 BOLD 参考条码库 (Reference Barcode Database) 数据量的缺乏, 严重限制了 CO 条码序列在物种鉴定中的桥梁作用。因此, 作者认为 DNA 条码库的发展需要突破库容瓶颈, 尽快达到高质量高库容。当然, 由于 CO 条码序列存在一些固有的限制, 要进一步深入展开分子辅助分类工作, 一方面应加强标本的相关形态学数据和图片资料等的收集, 另一方面对于分化低的物种要补充其他数据(如线粒体 DNA 控制区和核基因)进行分析。

致谢 广东海洋大学水产学院叶富良教授在鱼类形态学分类方面给予大力支持, 谨致谢忱。

参 考 文 献

- 王中铎, 刘楚吾, 郭昱嵩等, 2005. 5 种笛鲷 mtDNA 及 Cyt b 基因片段的 RFLP 比较. 水产学报, 29: 327—332
- 中国科学院动物研究所, 1962. 南海鱼类志. 北京: 科学出版社, 213—421
- 卢圣栋, 1999. 现代分子生物学实验技术. 北京: 中国协和医科大学出版社, 61
- 成庆泰, 郑葆珊, 1987. 中国鱼类系统检索. 北京: 科学出版社, 248—513
- 伍汉霖, 邵广昭, 赖春福, 1999. 拉汉世界鱼类名典. 台湾: 水产出版社, 1—1020
- 沈世杰, 1986. 台湾鱼类检索. 台北: 南天书局, 142—458
- 国家水产总局南海水产研究所, 1979. 南海诸岛海域鱼类志. 北京: 科学出版社, 80—571
- Boyer S A, Baker J E, Giribet G O *et al*, 2007. Deep genetic divergences in *Aoraki denticulata* (Arachnida, Opiliones, Cyphophthalmi): a widespread 'mite harvestman' defies DNA taxonomy. *Mol Ecol*, 16: 4999—5016
- Guo Y S, Wang Z D, Liu C W *et al*, 2007a. Phylogenetic Relationships of South China Sea Snappers (Genus *Lutjanus*; Family Lutjanidae) Based on Mitochondrial DNA Sequences. *Mar Biotechnol* (NY), 9: 682—688
- Guo Y S, Wang Z D, Liu C W *et al*, 2007b. Isolation and characterization of microsatellite DNA loci from Russell's snapper

1) Yao Y G, Kong Q P, Salas A *et al*, 2008. Pseudo-mitochondrial genome haunts disease studies. *J Med Genet*, 2008.059782

- (*Lutjanus russellii*). *Molecular Ecology Notes*, 7: 1219—1221
- Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L E A, 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings: Biological Sciences*, 270: 313—321
- Hebert P D N, Penton E H, Burns J M *et al*, 2004a. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 14812—14817
- Hebert P D N, Stoeckle M Y, Zemplak T S *et al*, 2004b. Identification of birds through DNA barcodes. *PLoS Biol*, 2: 1657—1663
- Hogg I D, Hebert P D N, 2004. Biological identification of springtails (Collembola: Hexapoda) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes. *Can J Zool*, 82: 749—754
- Liu L, Liu C W, 2007. Genetic diversity and molecular markers of five snapper species. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology*, 4: 39—46
- Richly E, Leister D, 2004. NUMTs in sequenced eukaryotic genomes. *Mol Biol Evol*, 21: 1081—1084
- Shearer T L, Coffroth M A, 2008. Barcoding corals: limited by interspecific divergence, not intraspecific variation. *Molecular Ecology Notes*, 8: 247—255
- Stahls G, Savolainen E, 2008. MtDNA COI barcodes reveal cryptic diversity in the *Baetis vernus* group (Ephemeroptera, Baetidae). *Mol Phylogenet Evol*, 46: 82—87
- Tamura K, Dudley J, Nei M *et al*, 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol Biol Evol*, 24: 1596—1599
- Ward R D, Zemplak T S, Innes B H *et al*, 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions: Biological Sciences*, 360: 1847—1857
- Whitworth T L, Dawson R D, Magalon H *et al*, 2007. DNA barcoding cannot reliably identify species of the blowfly genus *Protonotaria* (Diptera: Calliphoridae). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274: 1731—1739

CO BARCODING SEQUENCES OF TELEOSTS IN THE SOUTH CHINA SEA

WANG Zhong-Duo^{1,2}, GUO Yu-Song¹, CHEN Rong-Ling¹, HE Xiao-Ying¹,
LIU Chu-Wu^{1,2}, LIU Yun²

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, 524066; 2. College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha, 410081)

Abstract Forty species of teleosts in the South China Sea were sequenced (barcoded) in a 660bp region of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene (CO I). Most of the species were represented by multiple specimens, and 89 sequences were generated. The average intra-species, -genus, -family, and -order of Kimura two parameter (K2P) distances are 0.0084, 0.1567, 0.1839 and 0.2319, respectively. All the species could be differentiated in CO I sequence, despite of single individuals of any two species had haplotypes characteristic of a congener. Although DNA barcoding aims to develop species identification systems, some phylogenetic signals are apparent in the data. In the neighbour-joining tree for all 89 sequences, species of a genera clustered invariably in three major clusters: snappers, groupers, and the other fishes. The former two clades revealed after bootstrapping generally corresponded well with expectations. It is concluded that CO I sequencing, or 'barcoding', can be used to identify fish species.

Key words DNA barcodes, CO I, Species identification, Teleosts