

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.17068

## 基于 CO I 基因的福建近海部分仔稚鱼 DNA 条形码分析

徐春燕, 沈长春, 蔡建堤, 刘勇, 马超, 庄之栋, 葛辉

福建省水产研究所, 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室, 福建 厦门 361013

**摘要:** 为研究 DNA 条形码技术在遭遇瓶颈的仔稚鱼种类鉴定中的适用性, 2015年7月17—20日采集福建近海仔稚鱼样品, 并挑选80尾进行DNA条形码分析。获得仔稚鱼的CO I基因序列73条, 鉴定仔稚鱼26种, 隶属于7目22科25属, 另有5个物种仅鉴定到属, 2个物种仅鉴定到科。种内平均遗传距离为0.0023, 属内种间遗传距离为0.1797, 约为种内遗传距离的78倍, 说明利用CO I基因可以进行有效的仔稚鱼物种鉴定。科内属间、目内科间的遗传距离分别为0.1937、0.2420, 遗传距离随着分类阶元的提高而增大。在系统进化树的分析中, 同一种类的不同个体都聚在一支, 所有物种都分别聚为独立的一支, 这些物种都能有效区分开来。以上结果表明, 线粒体CO I基因作为DNA条形码可以实现仔稚鱼的物种鉴定, 且较多能鉴定到种的水平。

**关键词:** CO I 基因; 福建近海; 仔稚鱼; DNA 条形码; 鱼类鉴定

中图分类号: S93

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)06-1176-08

鱼类早期个体(包括鱼卵、仔稚鱼)是鱼类种群补充的重要来源, 其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<sup>[1]</sup>。目前, 鱼类早期个体种类鉴定主要应用传统形态学方法, 但鱼类早期发育过程中形态变化复杂, 且形态特征种间差异不显著, 分类鉴定工作难度较大, 只有少数发育后期阶段的个体可以鉴定到种, 多数只能鉴定到科或属的水平。而且传统形态学方法过分依赖鉴定者的个人经验和观察手段, 不同鉴定者的鉴定结论时常不一致, 甚至出现误鉴<sup>[2-4]</sup>。柯慧玲等<sup>[2]</sup>利用DNA条形码技术验证了中国台湾5个实验室应用形态学方法鉴定仔稚鱼的准确性, 结果表明, 形态学鉴定结果正确率很低, 科、属水平的平均正确率为80.1%、41.1%, 种水平的平均正确率仅为13.5%。鉴于传统形态学分析方法的局限性, DNA条形码技术为仔稚鱼的准确鉴定提供了新的思路。

DNA条形码技术是利用生物共有的、种间差异明显的一段或几段DNA序列来鉴定物种<sup>[5]</sup>, 目前, 该技术已经成为一个被广泛接受的物种鉴定工具。鱼类早期个体分类鉴定遭遇瓶颈, 利用DNA条形码技术能有效地对形态特征相似、处于不同发育阶段甚至隐存的鱼卵、仔稚鱼进行鉴定。海洋动物常用的标准条形码基因以线粒体细胞色素C氧化酶亚基I (cytochrome C oxidase subunit I, CO I)基因为主, 被广泛应用于物种鉴定和多样性分析<sup>[6]</sup>。近年来, 国外已有应用DNA条形码技术进行仔稚鱼分类鉴定的报道<sup>[7-10]</sup>, 如Pegg等<sup>[7]</sup>运用DNA条形码技术, 将澳大利亚大堡礁南部海域的仔稚鱼鉴定到属或种的水平, Valdez-Moreno等<sup>[8]</sup>运用此技术鉴定墨西哥尤卡坦半岛的仔稚鱼。国内鱼类早期个体的研究相对落后, 种类的鉴定多采用传统形态学的方法, 应用DNA条形码技术进行鱼类早期个体鉴别的报道很少, 且大

收稿日期: 2017-03-10; 修订日期: 2017-05-04.

基金项目: 福建省省属公益类科研院所基本科研专项(2015R1003-5); 福建省海洋生物增殖与高值化利用重点实验室开放课题(2016fjscq04); 闽台重要海洋生物资源高值化开发技术公共服务平台(2014FJPT01); 福建重要海洋经济生物种质库与资源高效开发技术公共服务平台(14PZY017NF17).

作者简介: 徐春燕(1986-), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事渔业资源生物学及生态学研究. E-mail: xuchunyan218@126.com

多聚焦于少量已知特定类群(科、属等)的种类鉴定<sup>[1, 11-12]</sup>, 尚无将该技术应用于大范围海域仔稚鱼样品分析与鉴定的相关报道。本研究应用基于 CO I 基因序列的 DNA 条形码技术, 分析福建近海仔稚鱼 73 条 CO I 序列, 通过比较该基因序列的种内和种间差异, 验证其在大范围海域未知仔稚鱼种类鉴定中的适用性; 同时本研究可为仔稚鱼的分类研究提供基础资料, 从而促进仔稚鱼分类学的研究。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样品采集与形态学鉴定

2015 年 7 月 17—20 日, 在福建近海设置 12 个采样站位(图 1), 利用仔稚鱼网(网口直径 1.3 m, 网目 0.505 mm, 网衣 6 m)采集仔稚鱼样品, 采集方式为水平拖网, 拖网时网口保持没入水面状态, 拖速 2 kn, 每站拖曳 10 min。样品用 95% 的酒精现场固定, 带回实验室进行形态学鉴定和分子生物学分析。首先将样品在体视显微镜(奥林巴斯 SZX7)下依据形态特征进行鉴定, 根据初步的鉴定结果, 每一种选取代表性个体进行 DNA 条形码分析。具体的采样和分析方法参见 GB/T 12763.6-2007《海洋调查规范 第 6 部分: 海洋生物调查》<sup>[13]</sup>。

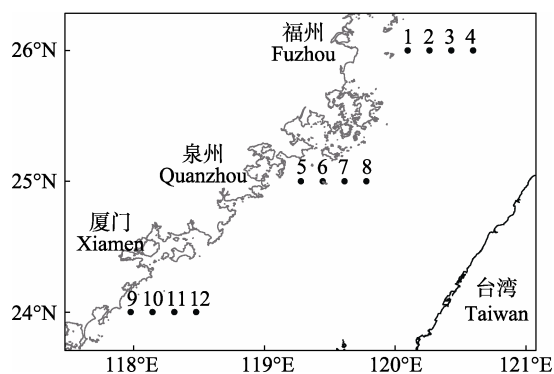


图 1 采样站位(●)设置

Fig. 1 The survey stations (●) of fish larvae and juveniles

### 1.2 DNA 提取、PCR 扩增及测序

使用 DNeasy Blood & Tissue Kit 试剂盒按照说明书提取基因组 DNA, 体长小的仔鱼取整条, 较大的仔稚鱼取尾部。CO I 基因序列扩增引物为: Fish F1: 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGG-CAC-3', Fish R1: 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCA-

AAGAATCA-3'。反应体系为 25  $\mu$ L, 包含 2.5  $\mu$ L 10 $\times$ buffer, 2  $\mu$ L dNTPs(2.5 mmol/L), 正反引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.5  $\mu$ L, 0.3  $\mu$ L Taq 酶, DNA 模板 1  $\mu$ L, 其余用超纯水补足。反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 9 min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检查扩增效果, 选取条带单一明亮的 PCR 产物送至上海生工进行双向测序。

### 1.3 序列分析

利用 Dnastar 软件包对正反向序列进行拼接, 并辅以手工调整, 将所得序列同时在 NCBI(national center for biotechnology information)和 BOLD(barcode of life database)网站进行比对, 获得与之最相似的物种序列。经核实后的序列及相关信息, 用 Sequin 整理并递交至 GenBank 获取序列号。用 MEGA6.0 软件分析所获序列的长度、碱基组成、保守位点、变异位点、简约信息位点、单突变位点等参数, 基于 Kimura-2-parameter 双参数模型(K2P)计算遗传距离, 利用邻接法(neighbor joining)构建系统进化树, 经 1000 次重复抽样(bootstrap)检验其置信度。

## 2 结果与分析

### 2.1 CO I 基因序列分析

本研究共选取 80 尾仔稚鱼样品进行 DNA 提取、PCR 扩增及测序, 最终获得 73 条 CO I 基因序列, 另有 7 个样品由于 DNA 降解的原因其 CO I 序列扩增失败。所获序列长度均约 655 bp(不含引物区), 序列上传至 GenBank, 序列号为 KY3-15340~KY315395、KY315397~KY315413。没有插入和缺失或终止密码子, 序列的平均碱基组成为 T: 29.9%、C: 28.2%、A: 23.3%、G: 18.6%, A+T 含量(53.2%)高于 G+C 含量(46.8%), 这符合多数鱼类 COI 序列的碱基组成特征。第 3 个密码子位点 G+C 含量(56.8%)显著高于第 1 和第 2 密码子位点(42.6%和 41.0%), 各密码子碱基组成表现出明显的差异性。全部位点中包括保守位点 363 个, 变异位点 293, 简约信息位点 279 个, 单突变位点 14 个。

## 2.2 序列比对

为了更准确地对样品进行鉴定,所有样品 COI 序列均导入到 GenBank 和 BOLD 数据库中进行比对,依据遗传相似度  $\geq 98\%$ 、 $92\% \sim 98\%$ 、 $85\% \sim 92\%$ ,将仔稚鱼样品鉴定为同一种、属、科的水

平<sup>[14]</sup>。DNA 条形码鉴定结果见表 1,26 个种类的仔稚鱼在数据库中能准确鉴定到种,隶属于 7 目 22 科 25 属;5 个样品仅能鉴定到鰺科(Blenniidae),在 GenBank 和 BOLD 数据库中最大相似度均在  $85\% \sim 86\%$ ;6 个样品序列与两数据库中的红尾银

表 1 物种名称、分类地位及相应的 GenBank 序列号  
Tab. 1 Species name, taxonomic status and GenBank accession numbers

种名 species	拉丁名 Latin name	分类地位 taxonomic status	GenBank 序列号 GenBank accession numbers
短棘银鲈	<i>Gerres limbatus</i>	鲈形目银鲈科银鲈属	KY315350, KY315355, KY315357
银鲈属 <sup>①</sup>	<i>Gerres</i> sp.	鲈形目银鲈科银鲈属	KY315340~KY315341, KY315346~KY315348, KY315356
红狼牙虾虎鱼	<i>Odontamblyopus rubicundus</i>	鲈形目鰻虾虎鱼科狼牙虾虎鱼属	KY315374, KY315377~KY315378
孔虾虎鱼	<i>Trypauchen vagina</i>	鲈形目鰻虾虎鱼科孔虾虎鱼属	KY315379
拟矛尾虾虎鱼	<i>Parachaeturichthys polynema</i>	鲈形目虾虎鱼科拟矛尾虾虎鱼属	KY315375~KY315376
鲷科 <sup>③</sup>	<i>Sparidae</i> sp.	鲈形目鲷科	KY315349
银大眼鲷	<i>Monodactylus argenteus</i>	鲈形目大眼鲷科大眼鲷属	KY315354
密点少棘胡椒鲷	<i>Diagramma pictum</i>	鲈形目仿石鲈科少棘胡椒鲷属	KY315397
伏氏眶棘鲈	<i>Scolopsis vosmeri</i>	鲈形目石鲈科眶棘鲈属	KY315395
玛丽双边鱼	<i>Ambassis marianus</i>	鲈形目锯盖鱼科双边鱼属	KY315360
洛神颈鳍鱼	<i>Iniistius dea</i>	鲈形目隆头鱼科颈鳍鱼属	KY315386~KY315387, KY315390
麒麟	<i>Coryphaena hippurus</i>	鲈形目麒麟科麒麟属	KY315383
石斑鱼属 <sup>①</sup>	<i>Epinephelus</i> sp.	鲈形目鲷科石斑鱼属	KY315402~KY315404
舵鲹属 <sup>①</sup>	<i>Auxis</i> sp.	鲈形目鲹科舵鲹属	KY315398
丽叶鲹	<i>Alepes kleinii</i>	鲈形目鲹科鲹属	KY315370~KY315371, KY315373, KY315405
鰺科 <sup>②</sup>	<i>Blenniidae</i> sp.	鲈形目鰺科	KY315342~KY315344, KY315358, KY315362
斑点肩鰺	<i>Omobranchus punctatus</i>	鲈形目鰺科肩鰺属	KY315353, KY315359, KY315361, KY315364
亚洲鳉	<i>Sillago asiatica</i>	鲈形目鳉科鳉属	KY315363
条尾绯鲤	<i>Upeneus japonicus</i>	鲈形目羊鱼科绯鲤属	KY315368, KY315384~KY315385, KY315412
裘氏小沙丁鱼	<i>Sardinella jussieu</i>	鲱形目鲱科小沙丁鱼属	KY315365~KY315366, KY315369, KY315392
银灰半棱鲷	<i>Encrasicholina punctifer</i>	鲱形目鲷科半棱鲷属	KY315391
日本鲷	<i>Engraulis japonicus</i>	鲱形目鲷科鲷属	KY315380~KY315381
多鳞短额鲷	<i>Engyprosopon multisquama</i>	鲱形目鲷科短额鲷属	KY315400
多斑羊舌鲷	<i>Arnoglossus polyspilus</i>	鲱形目鲷科羊舌鲷属	KY315399
日本须鲷	<i>Paraplagusia japonica</i>	鲱形目舌鲷科须鲷属	KY315394
须鲷	<i>Paraplagusia bilineata</i>	鲱形目舌鲷科须鲷属	KY315401
龙头鱼	<i>Harpadon nehereus</i>	灯笼鱼目狗母鱼科龙头鱼属	KY315382
蛇鲻属 <sup>①</sup>	<i>Saurida</i> sp.	灯笼鱼目狗母鱼科蛇鲻属	KY315393
鲻属 <sup>②</sup>	<i>Hemiramphus</i> sp.	颌针鱼目鲻科鲻属	KY315367, KY315372
无斑圆颌针鱼	<i>Strongylura leiura</i>	颌针鱼目颌针鱼科圆颌针鱼属	KY315352
凡氏下银汉鱼	<i>Hypoatherina valenciennei</i>	银汉鱼目银汉鱼科下银汉鱼属	KY315345, KY315351
硬头鲷	<i>Mugil strongylocephalus</i>	鲷形目鲷科鲷属	KY315388~KY315389, KY315410~KY315411, KY315413
六指马鲛	<i>Polydactylus sextarius</i>	鲷形目马鲛科马鲛属	KY315406~KY315409

注:“①”表示样品序列与数据库中多个物种相似性  $\geq 98\%$ ,仅鉴定到属的水平,如银鲈属、石斑鱼属、舵鲹属、蛇鲻属。

“②”表示样品序列相似性在  $85\% \sim 92\%$ ,仅鉴定到科的水平,如鰺科。

“③”表示样品序列在 GenBank 和 BOLD 的比对结果不一致,如鲷科、鲻属。

Note: “①” indicates samples that sequences had high similarity ( $\geq 98\%$ ) with many species in DNA barcode database, such as *Gerres* sp., *Epinephelus* sp., *Auxis* sp., *Saurida* sp..

“②” indicates samples that sequences similarity was between  $85\% \sim 92\%$ , such as *Blenniidae* sp..

“③” indicates samples that results of sequence alignment were different between GenBank and BOLD, such as *Sparidae* sp., *Hemiramphus* sp..

鲈(*Gerres oyena*)和日本十棘银鲈(*G. japonicus*)的相似度均>98%, 因此只能将其鉴定为银鲈属(*Gerres* sp.), 无法确定具体为哪一种, 另有 3 个种类出现以上情况, 分别鉴定为石斑鱼属(*Epinephelus* sp.)、蛇鲻属(*Saurida* sp.)和舵鲉属(*Auxis* sp.)。

样品在 GenBank 和 BOLD 数据库中比对结果基本一致, 仅有两处存在分歧。Sparidae sp. 与 BOLD 数据库中的金头鲷(*Sparus aurata*)的相似性达 99%, 但与 GenBank 数据库中金头鲷的相似性较低, 仅 85%, 为慎重起见, 最终将其鉴定到科的水平。*Hemiramphus* sp. 与 GenBank 和 BOLD 数据库中斑鲷(*Hemiramphus far*)相似性分别为 96%、99%, 最终将其鉴定到属的水平。

### 2.3 遗传距离

利用 MEGA6 软件, 基于 K2P 模型计算各分类阶元的遗传距离(表 2)。种内的遗传距离分布在 0~0.0051, 平均为 0.0023(SD=0.00156); 多个物种的种内遗传距离都为 0, 红狼牙虾虎鱼(*Odontam-*

*blyopus rubicundus*)种内遗传距离最大。同属不同物种间遗传距离明显增大, 范围在 0.1578~0.2016, 最大值、最小值分别出现在银鲈属(*Gerres*)和须鲷属(*Paraplagusia*)的物种间, 平均种间遗传距离为 0.1797(SD=0.02190), 约为种内遗传距离的 78 倍, 与 2004 年 Hebert 等<sup>[15]</sup>提出的“10×规则”相符, 即 COI 基因序列的种间遗传距离为平均种内遗传距离的 10 倍以上才足以用来区分物种。科内属间遗传距离最小值为鲆科(Bothidae)的短额鲆属(*Engyproson*)和羊舌鲆属(*Arnoglossus*), 其遗传距离为 0.1474, 最大值为狗母鱼科(Synodidae)的龙头鱼属(*Harpodon*)和蛇鲻属, 其遗传距离为 0.2344, 平均为 0.1937(SD=0.02845)。目内科间遗传距离最小值为鲭科(Scombridae)和鲈科(Carangidae), 遗传距离为 0.1775, 最大值为鲆科和舌鲷科(Cynoglossidae), 遗传距离为 0.2902, 平均为 0.2420(SD=0.02214)。由此可见, 遗传距离随着分类阶元的提高而增大, 但增长速度随着等级的升高明显减缓。

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

比较范围 coverage	最小值 minimum	最大值 maximum	平均值 average	标准差 standard deviation
种内 species	0.0000	0.0051	0.0023	0.00156
同属种间 among species within genus	0.1578	0.2016	0.1797	0.02190
同科属间 among genera within family	0.1474	0.2344	0.1937	0.02845
同目科间 among families within order	0.1775	0.2902	0.2420	0.02214

### 2.4 系统进化分析

基于 33 个物种的 73 条 COI 基因序列构建系统进化树(图 2)。由图可以看出, 本研究的所有物种都分别聚为独立的一支, 同一物种的不同个体都能聚在一支, 且置信度很高(99%)。同属、同科的个体聚类效果也很明显, 如银鲈属、须鲷属内的不同物种分别聚为一支, 鲷科、鰻虾虎鱼科(Taenioididae)、鰻科(Engraulidae)、鲆科、狗母鱼科内不同属的个体也分别聚为一支。但同一目内的不同科间聚类效果不清晰, 例如鲆科的多斑羊舌鲆(*A. polyspilus*)与多鳞短额鲆(*Engyproson multisquama*)聚为一支、舌鲷科的日本须鲷(*Paraplagusia japonica*)与须鲷(*P. bilineata*)聚为

一支, 但鲆科与舌鲷科并未聚为一支。不同的目间也没有形成平行的独立分支, 本实验涉及的鲈形目(Perciformes)、鲱形目(Clupeiformes)、鲷形目(Pleuronectiformes)、灯笼鱼目(Myctophiformes)、颌针鱼目(Beloniformes)、银汉鱼目(Atheriniformes)、鲻形目(Mugiliformes)聚类关系相互交叉、比较混乱。

### 3 讨论

鱼类早期发育过程复杂多样, 且许多鱼类的早期发育过程非常类似, 从而导致了仔稚鱼分类鉴定难度较大。在实际的鉴定工作中, 鉴定者通常是对照参考资料依据经验进行种类鉴别, 但鱼

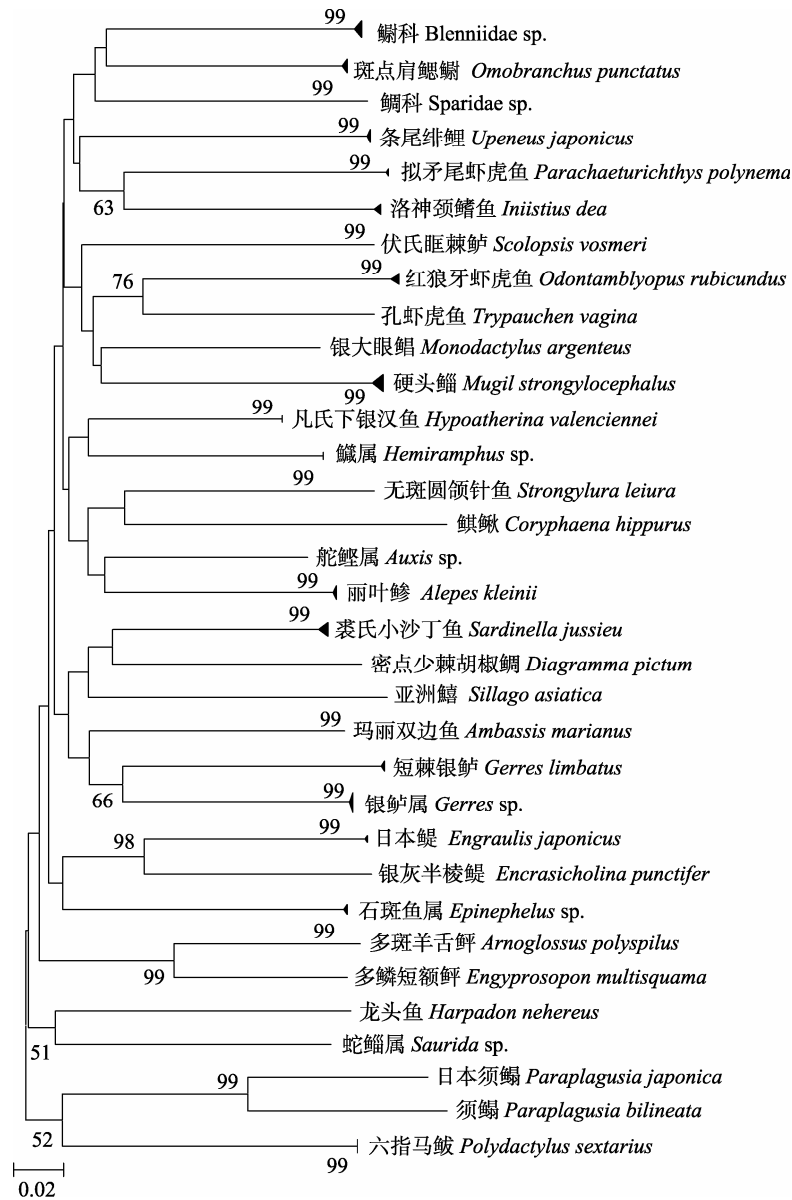


图 2 基于 CO I 基因序列构建的系统进化树  
 利用邻接法构建系统进化树，经 1000 次重复抽样检验其置信度。

Fig. 2 Neighbor joining phylogenetic tree based on mitochondrial CO I sequences  
 Neighbor joining method is used to construct phylogenetic tree. Bootstrap values were obtained with 1000 resaplings.

类早期生活史的相关研究严重滞后，相关资料有限且不能全面收录每种仔稚鱼各个发育时期的不同的形态特征，加上缺乏专业的分类学家，鉴定工作者的知识水平参差不齐，鉴定结果往往存在出入。近几年兴起的 DNA 条形码技术突破了传统分类学只能依靠形态特征鉴定物种的限制，为仔稚鱼准确鉴定提供了新的方法。2003 年，Hebert 等<sup>[5]</sup>首次提出 DNA 条形码的概念，并指出 CO I 基因可以作为动物物种鉴定的 DNA 条形码。此

后，CO I 基因广泛应用于鱼类、贝类、头足类、水母类及浮游动物等海洋生物的种类鉴定<sup>[16-22]</sup>。本研究应用 CO I 条形码对福建近海采集的部分仔稚鱼进行鉴定，验证 CO I 序列在大范围海域未知仔稚鱼种类鉴定中的适用性，以期促进仔稚鱼分类学的相关研究。

### 3.1 CO I 条形码在仔稚鱼种类鉴定中的适用性和局限性

通过比较各分类阶元的遗传距离，表明 CO I

基因序列在同属种间的遗传距离(0.1797)远远大于种内遗传距离(0.0023), 以 CO I 基因构建的系统进化树直观反映出该条形码能将所有物种分辨开来, 这表明 CO I 序列可以有效区分仔稚鱼种类。但对系统进化树的分析也表明, 其对于科以上的聚类关系分析不是很清晰, 这与 CO I 序列间遗传距离随着分类阶元提高而增加明显变缓的特征相符合。这说明 CO I 条形码序列仅适用于低分类阶元系统进化分析, 对种以上高分类阶元的物种鉴定存在局限性, 这与其他研究者的研究结论一致<sup>[21-22]</sup>。

通过序列比对, 成功将 33 个物种中的 26 个鉴定到种, 说明其在仔稚鱼鉴定中的适用性。但仍有 7 个物种未鉴定到种的水平, 说明 DNA 条形码技术在仔稚鱼鉴定方面存在一些不足。有 4 个物种与数据库中多个种类高度匹配, 相似性均 > 98%, 仅鉴定到属 (*Gerres* sp., *Epinephelus* sp., *Auxis* sp., *Saurida* sp.), 说明有些鱼类物种间亲缘性很高, 不仅外部形态相似无法区分, 其序列差异也较小, 利用 CO I 序列无法完成其种类鉴定, 必须结合其他 DNA 条形码加以鉴别。Krück 等<sup>[23]</sup>的研究指出, 单一的 CO I 基因并非适用于所有鱼类物种的鉴别, 未来的发展趋势是多基因标记的 DNA 条形码生物物种分类鉴定方法, 包括 CO I 基因和其他基因联合标记<sup>[24]</sup>, 以鉴定进化关系近、序列差异小的近源种。利用多基因条形码技术, 可以选择线粒体 DNA 不同区域序列的组合, 例如 16S rDNA、Cytb、ND 基因等, 或选择核 DNA 结合线粒体 DNA, 例如 18S rDNA、28S rDNA、ITSs 等<sup>[6]</sup>, 片段组合效果有待进一步尝试、探索。

另有 1 个物种受 DNA 数据库中可用于比对的序列数量的限制, 其在 GenBank 和 BOLD 数据库中最大相似度均在 85%~86%, 仅鉴定到科 (*Blenniidae* sp.); 2 个物种在两个数据库中比对到的最相似物种一致, 但相似性存在分歧, 为慎重起见, 仅分别鉴定到的科和属的水平 (*Sparidae* sp., *Hemiramphus* sp.)。DNA 条形码基因序列库的完整和准确是物种准确鉴定的前提, 目前, DNA 条形码数据库并不完整, 尤其是缺乏一些非经济种和难以鉴定的鱼类种类, 在一定程度上限制了 DNA 条形码技术的应用。另外, 数据库中错误的

数据也会干扰序列的比对和物种的鉴定。因此, 必须进一步完善 DNA 条形码数据库, 提高数据库中序列的数量和质量, 更好地发挥其在物种鉴定中的桥梁作用。

### 3.2 应用 DNA 条形码技术发现福建新记录种

线粒体 CO I 基因片段序列作为 DNA 条形码已被广泛接受, 其在种内序列变异较小, 而种间差异显著, 常被用于物种鉴定、新记录种或新种的发现、隐存种发掘等<sup>[25]</sup>。本研究通过条形码鉴定出的亚洲鱈系是福建沿海的首次记录, 经过比对, 其序列与 NCBI 及 BOLD 中序列的相似性均为 100%。中国沿海分布的鱈科鱼类常见的主要有多鳞鱈(*Sillago sihama*)、少鳞鱈(*S. japonica*)和斑鱈(*S. aeolus*)。2011 年 Gao 等<sup>[25]</sup>发现鱈属鱼类新种中国鱈(*S. sinica*); Chang 等<sup>[26]</sup>报道了台湾 1245 种鱼类的 DNA 条形码序列, 其中包括亚洲鱈的 CO I 基因序列; 而福建近海并未见亚洲鱈的相关报道, 因此亚洲鱈在福建沿海应属于新记录种。这一发现也说明, 由于鱈属鱼类仔稚鱼形态十分相似, 过去传统的形态学鉴定的方法存在将亚洲鱈鉴定为鱈属其他常见种类的可能。但由于本实验样本量少, 仅有 1 尾亚洲鱈仔稚鱼, 无法明确亚洲鱈与鱈属其他种类的形态差异, 本课题组将进一步收集亚洲鱈仔稚鱼样品, 进一步探究其在福建沿海的分布情况。

综上所述, DNA 条形码技术可有效的对形态特征不多的大量仔稚鱼进行种类鉴定, 且较多能鉴定到种的水平。对某些亲缘关系较近的仔稚鱼种, 应加强多基因条形码技术的研究, 以克服单一 CO I 基因序列鉴定物种的不足。建议进一步完善 DNA 条形码数据库, 提高数据库中序列的数量和质量, 以充分发挥其在物种鉴定中的作用。

### 参考文献:

- [1] Zhou M Y, Chen X, Yang S Y. Identification of several fish eggs and larval by DNA barcoding in Xiamen Water[J]. Marine Environmental Science, 2015, 34(1): 120-125, 135. [周美玉, 陈骁, 杨圣云. 采用 DNA 条形码技术对厦门海域鱼卵、仔稚鱼种类的鉴定[J]. 海洋环境科学, 2015, 34(1): 120-125, 135.]
- [2] 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): e53451.

- [3] Puncher G N, Alemany F, Arrizabalaga H, et al. Misidentification of bluefin tuna larvae: a call for caution and taxonomic reform[J]. *Rev Fish Biol Fisheries*, 2015, 25(3): 485–502.
- [4] Becker R A, Sales N G, Santos G M, et al. DNA barcoding and morphological identification of neotropical ichthyoplankton from the upper Paraná and São Francisco[J]. *J Fish Biol*, 2015, 87(1): 159–168.
- [5] Hebert P D, Ratnasingham S, deWaard J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. *Proc Biol Sci*, 2003, 270(S1): 96–99.
- [6] Lin S J, Wang L, Zheng L M, et al. Current status and future prospect of DNA barcoding in marine biology[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2014, 36(12): 1–17. [林森杰, 王路, 郑连明, 等. 海洋生物 DNA 条形码研究现状与展望[J]. *海洋学报*, 2014, 36(12): 1–17.]
- [7] Pegg G G, Sinclair B, Briskey L, et al. MtDNA barcode identification of fish larvae in the southern Great Barrier Reef-Australia[J]. *Scientia Marina*, 2006, 70(S2): 7–12.
- [8] Valdez-Moreno M, Vásquez-Yeomans L, Elías-Gutiérrez M, et al. Using DNA barcodes to connect adults and early life stages of marine fishes from the Yucatan Peninsula, Mexico: potential in fisheries management[J]. *Mar Freshwater Res*, 2010, 61(6): 655.
- [9] Victor B C, Hanner R, Shivji M, et al. Identification of the larval and juvenile stages of the Cubera Snapper, *Lutjanus cyanopterus*, using DNA barcoding[J]. *Zootaxa*, 2009, 2009(2215): 24–36.
- [10] Hubert N, Delrieu-Trottin E, Irisson J O, et al. Identifying coral reef fish larvae through DNA barcoding: a test case with the families Acanthuridae and Holocentridae[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2010, 55(3): 1195–1203.
- [11] Bian X D, Zhang X M, Xiao S Y, et al. Identification of fish eggs of Japanese halfbeak (*Hyporhamphus sajori*) using mtDNA sequencing[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2007, 37(sup): 111–116. [卞晓东, 张秀梅, 肖永双, 等. 线粒体 DNA 序列在沙氏下鱚鱼鱼卵鉴别上的应用[J]. *中国海洋大学学报*, 2007, 37(增刊): 111–116.]
- [12] Zhang J M, Liu S, Zhao J M, et al. Preliminary study on DNA extraction and 18S rDNA of the *Trichiurus haumela* fish egg[J]. *Marine Science Bulletin*, 2009, 28(6): 62–65. [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.]
- [13] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. GB/T 12763.6-2007, specifications for oceanographic survey- part 6: marine biological survey[S]. Beijing: Standards Press of China, 2007. [中华人民共和国国家质量监督检验检疫局, 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[S]. 北京: 中国标准出版社, 2007.]
- [14] Zhang S, Liao J, Bai Q, et al. CO I barcode-assisted species diversity study on mangrove fish in Leizhou peninsula[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2016, 47(3): 663–672. [张顺, 廖健, 柏琴, 等. 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[J]. *海洋与湖沼*, 2016, 47(3): 663–672.]
- [15] Hebert P D, Stoeckle M Y, Zemlak T S, et al. Identification of birds through DNA barcodes[J]. *PLoS Biol*, 2004, 2(10): e312.
- [16] Weng C H, Xie Y J, Xiao Z Q, et al. Molecular identification of the taxonomic status of *Sinonovacula rivularis* and genus *Sinonovacula* using mitochondrial CO I and 16S rRNA fragments [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2013, 37(4): 684–690. [翁朝红, 谢仰杰, 肖志群, 等. 线粒体 CO I 和 16S rRNA 片段确定近江蛭和缢蛭属的分类地位[J]. *水生生物学报*, 2013, 37(4): 684–690.]
- [17] Wang M Y, Zhao Q Z, Liu B, et al. Species authority of fish and its derived products in Shanghai by DNA barcoding[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2016, 37(10): 49–61. [王梦怡, 赵庆珠, 刘博, 等. 运用 DNA 条形码技术分析市售鱼类及制品的物种真实性[J]. *食品工业科技*, 2016, 37(10): 49–61.]
- [18] Wang X M, Cheng F P, Li C L, et al. DNA barcoding of zooplankton in the Jiaozhou Bay for species identification[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2011, 42(5): 702–710. [王敏晓, 程方平, 李超伦, 等. 基于线粒体 CO I 片段序列胶州湾浮游动物物种组成分析[J]. *海洋与湖沼*, 2011, 42(5): 702–710.]
- [19] Wang H, Lin L, Liu S F, et al. DNA Barcoding for Cephalopoda in classification and phylogeny [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2011, 18(2): 245–255. [王鹤, 林琳, 柳淑芳, 等. 中国近海习见头足类 DNA 条形码及其分子系统进化[J]. *中国水产科学*, 2011, 18(2): 245–255.]
- [20] Cheng F P, Wang X M, Wang Y T, et al. DNA barcoding of common medusozoa in northern China based on mtCO I sequence[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2012, 43(3): 451–459. [程方平, 王敏晓, 王彦涛, 等. 中国北方习见水母类的 DNA 条形码分析[J]. *海洋与湖沼*, 2012, 43(3): 451–459.]
- [21] Wang Z D, Guo Y S, Chen R L, et al. CO I barcoding sequences of teleosts in the South China Sea[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2009, 40(5): 608–614. [王中锋, 郭昱嵩, 陈荣玲, 等. 南海常见硬骨鱼类 CO I 条码序列[J]. *海洋与湖沼*, 2009, 40(5): 608–614.]
- [22] Zhang X Y, Liu Y, Zhang X M. Species identification of some commercial fishes in southwest Atlantic based on CO I barcoding[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(6): 1161–1167. [张馨月, 刘岩, 张秀梅. 基于 CO I 基因的西南大西洋部分经济鱼类 DNA 条形码鉴定[J]. *水生生物学报*, 2014, 38(6): 1161–1167.]
- [23] Krück N C, Tibbetts I R, Ward R D, et al. Multi-gene barcoding to discriminate sibling species within a morphologically difficult fish genus (*Sillago*)[J]. *Fish Res*, 2013, 143: 39–46.
- [24] Ma Y, Lu L. Research advance in DNA barcode technology [J]. *Chinese Journal of Vector Biology and Control*, 2010, 21(3): 275–280. [马英, 鲁亮. DNA 条形码技术研究新进展

- [J]. 中国媒介生物学及控制杂志, 2010, 21(3): 275–280.]
- [25] Li Y, Zhang L Y, Song P Q. A new record of *Sillago* species in Fujian coastal waters—*Sillago sinica* (Gao and Xue, 2011)[J]. Journal of Applied Oceanography, 2014, 33(4): 546–552. [李渊, 张丽艳, 宋普庆. 福建省沿海鱮属 (*Sillago*) 鱼类新纪录种—中国鱮(*Sillago sinica* Gao and Xue, 2011)[J]. 应用海洋学学报, 2014, 33(4): 546–552.]
- [26] Chang C H, Shao K T, Lin H Y, et al. DNA barcodes of the native ray-finned fishes in Taiwan[J]. Mol Ecol Resour, 2017, 17(4): 796–805.

## Species identification of partial fish larvae and juveniles in Fujian coastal areas based on cytochrome C oxidase subunit I barcoding

XU Chunyan, SHEN Changchun, CAI Jiandi, LIU Yong, MA Chao, ZHUANG Zhidong, GE Hui

Fisheries Research Institute of Fujian; Key Laboratory of Cultivation and High-value Utilization of Marine Organisms in Fujian Province, Xiamen 361013, China

**Abstract:** Fish eggs, larvae, and juveniles are important food sources for fish populations. Correct identification of fish eggs, larvae, and juveniles can let us understand which species are spawning where and when, their hatching and nursery grounds, and their possible migration routes during their early life history. At present, fish larval and juvenile identification mostly relies on morphological characters. But since different species often share similar characters and species change greatly during their early development stages, identification of fish larvae and juveniles is very hard, most of which can only be identified to the family or genus level, except for a few fish juveniles that can be identified to species. Moreover, because traditional morphological methods rely too much on personal experience and observation methods, it is easy to misidentify fish larvae and juveniles and difficult to identify to the genus or species level. In view of the limitations of traditional morphological methods, DNA barcode techniques could be a rapid tool to survey many uncertain species, species composition, and cryptic species and to distinguish morphologically similar species. To study the applicability of this technique to identify fish larvae and juveniles, samples were collected in Fujian coastal areas from July 17 to 20, 2015, and 80 samples were selected for DNA barcoding analysis. A total of 73 valid cytochrome C oxidase subunit I (CO I) gene sequences of fish larvae and juveniles in Fujian coastal areas were obtained. Five species were identified to the level of genus, two were identified to the level of family, and another 26 species were identified to the level of species. The results showed that the average Kimura-2-parameter (K2P) distances within species, genus, family, and order were 0.0023, 0.1797, 0.1937, and 0.2420, respectively. The interspecific genetic distance was much larger than the intraspecific distance, and K2P genetic distance values increased with taxonomic level. All sequences formed species units in a neighbor-joining phylogenetic tree, indicating that the DNA barcode can be used to identify these 33 species. Consequently, CO I barcoding is one of the useful tools to identify fish larvae and juveniles. However, this test highlights the limitations of DNA barcoding. The neighbor-joining tree cannot analyze cluster relations clearly above the taxonomic level of family, which corresponds to the slower-increasing trend of genetic distance values with the higher taxa. This means that CO I barcoding is only suitable for phylogenetic analysis of lower taxa, and is not applicable for species identification of higher taxa. Four sequences having high similarity (greater than 98%) with many species in the database were identified only to genus (*Gerres* sp., *Epinephelus* sp., *Auxis* sp., and *Saurida* sp.). That indicates that some fish species are similar not only in shape but also in CO I sequences, and sequence identification cannot be done using only CO I barcoding. We should strengthen the research of multi-gene barcode technology in order to overcome the deficiency of the single CO I gene sequence. Another sequence, limited by the number of sequences that can be used in the DNA database, with a maximum similarity between 85%–86%, was identified to the level of family. It is suggested to further improve the sequence quantity and quality of the DNA barcode database, so as to let it be more useful for species identification.

**Key words:** cytochrome C oxidase subunit I (CO I); Fujian coastal areas; fish larvae and juveniles; DNA barcoding; fish identification

**Corresponding author:** XU Chunyan. E-mail: xuchunyan218@126.com