

DOI: 10.12264/JFSC2021-0149

南极鱼亚目鱼类 DNA 条形码及分子系统学

姜邴轩^{1,2,3}, 张吉昌², 樊钢洲², 李昂^{2,3}, 柳淑芳^{2,3}, 庄志猛²

1. 浙江海洋大学水产学院, 浙江 舟山 316022;
2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 农业农村部海洋渔业可持续发展重点实验室, 山东 青岛 266071;
3. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室, 海洋渔业科学与食物产出过程功能实验室, 山东 青岛 266071

摘要: 以南极海域“南极海洋生物资源养护委员会”(The Commission for the Conservation of Antarctic Marine Living Resources, CCAMLR) 48.1、48.2 和 48.3 亚区的南极磷虾(*Euphausia superba*)渔业兼捕所得 97 份南极鱼样品为研究对象, 经形态学特征分析和 DNA 条形码将其鉴定为南极鱼亚目 4 科 17 属 17 个有效种, 其中依据形态学特征只鉴定出 6 个物种, 其余 11 个物种则依据 DNA 条形码得到准确鉴定。可见, 在形态学鉴定经验不足或样品形态不完整的情况下, DNA 条形码可以有效地实现物种鉴定。继而, 分析了南极鱼类 97 条 DNA 条形码的碱基组成特征, 发现 GC 含量第一密码子最高且第二密码子最低可能为南极鱼亚目类群的特有现象, 但其生物学意义尚有待于进一步研究。将本研究采集的南极鱼亚目 17 种鱼类与从 BOLD 数据库中筛选的 64 种鱼类的 DNA 条形码合并, 构建了南极鱼亚目 4 科 39 属 81 种鱼类的系统关系树, 这是迄今为止包含种类最多的南极鱼亚目鱼类分子鉴别和系统进化关系分析。遗传距离和系统关系树分析进一步证明 DNA 条形码对于南极鱼类物种鉴定的适用性与可行性, 另外还发现南极鱼亚目鱼类的个别物种其分子系统关系与形态学分类地位不一致。本研究结果证实了 DNA 条形码技术对南极鱼亚目分类群的识别效率, 弥补了传统形态学鉴定方法的局限和不足, 丰富了南极鱼类 DNA 条形码数据库, 为南大洋鱼类多样性与适应性进化研究奠定了基础, 同时为南极渔业资源保护和可持续开发利用提供了科学依据。

关键词: 南极鱼亚目; COI 基因; DNA 条形码; 遗传距离; 分子系统关系

中图分类号: S931

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)11-1396-10

南大洋具有低温寒冷、高营养盐、低叶绿素等独特的海洋生态环境, 造就了其生物组成和食物网结构的特殊性。南极鱼类是该海域的代表性生物类群之一, 是南大洋生态系统物质循环和能量流动的重要载体。南极鱼亚目(Notothenioidei)隶属于硬骨鱼纲(Osteichthyes)鲈形目(Perciform), 由共同营底栖生活的温带祖先在南极变冷过程中快速演化而来, 为南极海域的原始种^[1], 目前的记录种共有 8 科 48 属 227 种^[2], 占南大洋鱼类总数的 46%, 在南大洋鱼类其丰度和生物量中的占比均高达 90%以上^[3], 是南大洋鱼类的绝对优势

种。因此, 对南极鱼亚目鱼类进行准确的物种分类鉴定具有重要生物学和生态学意义。

当前, 传统形态学方法对南极鱼亚目鱼类进行定性和定量研究尚具有较大的局限性, 一则南极鱼亚目鱼类形态特征和生理适应高度特化, 加之样品获取难度大, 人们对其形态学分类和物种多样性认知有限; 二来受环境和食物等因素的季节变化影响, 多数南极鱼亚目鱼类体型较小、生长缓慢, 使其形态相似难以区分; 三是受保存和运输条件所限, 样本的新鲜程度和完整性无法保障。上述原因给南极鱼亚目物种分类鉴定带来了

收稿日期: 2021-04-13; **修订日期:** 2021-05-17.

基金项目: 山东省重大科技创新工程专项(2018SDKJ0302); 国家重点研发计划项目(2018YFC1406800); 农业农村部财政专项“海洋渔业生物资源收集与保藏”和“南极海洋生物资源开发利用科研支撑”。

作者简介: 姜邴轩(1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向为渔业资源分子生态学. E-mail: 895972465@qq.com

通信作者: 柳淑芳, 研究员, 研究方向为渔业资源分子生态学. E-mail: liusf@ysfri.ac.cn

诸多困难。DNA 条形码技术是对传统分类学方法的完善、发展和创新,目前已广泛应用于生物分类鉴定工作中,成为物种鉴定的有力工具之一。早在 2007—2008 年开展的南极海洋生物普查计划(The Census of Antarctic Marine Life, CAML)中,便开始使用 DNA 条形码技术鉴定南极大陆架东部的鱼类物种信息。由于当时 DNA 条形码技术处于起步阶段, BOLD 数据库中的 DNA 条形码参考序列信息较为有限,使得该技术对于某些南极鱼类分类群的识别效率受到质疑^[4]。但 CAML 计划及随后开展的罗斯海区动物区系调查均表明,南极鱼类物种多样性之前被低估了,且 DNA 条形码技术有助于精确定位需要在形态学上重新鉴定的标本,相关研究结果还提示南极某些类群有进一步开展 DNA 条形码辅助形态分类工作的必要性^[4-5]。

本研究拟以南极海域“南极海洋生物资源养护委员会”(The Commission for the Conservation Antarctic Marine Living Resources, CCAMLR) 48.1、48.2 和 48.3 亚区的南极磷虾(*Euphausia superba*)渔业兼捕所得南极鱼类为研究对象,在形态学分类基础上,采集南极鱼亚目标准 DNA 条形码,同时探讨 DNA 条形码技术对南极鱼亚目分类群的识别效率,弥补传统形态学鉴定方法的局限和不足,丰富南极鱼类 DNA 条形码数据库,为南大洋鱼类多样性与适应性进化研究奠定基础,同时为南极渔业资源保护和可持续开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

南极鱼类样品采样时间为 2018/2019 渔季和 2019/2020 渔季,由南极磷虾渔船“福荣海”和“福远渔 9818”分别在 CCAMLR 48.1、48.2 和 48.3 亚区兼捕获取,共计 97 份样品,其中 75 份为完整鱼类样品,22 份为肌肉组织样品。样品用无水乙醇浸泡固定并于冷库中保存。运回实验室后,先依据形态学特征^[6-8]对鱼类样品进行初步的形态学鉴定,随后取背部肌肉组织用于 DNA 条形码鉴定。

1.2 DNA 提取与 DNA 条形码序列扩增

取肌肉约 30 mg,使用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取模板 DNA,琼脂糖凝胶电泳和核酸蛋白测定仪检测 DNA 质量与浓度。

PCR 反应体系为 25 μ L,其中包括上下游引物各 1 μ L, Mix dNTP 12.5 μ L, 模板 DNA 3 μ L, 加双蒸水至总体积 25 μ L。DNA 条形码扩增使用 COI 基因通用扩增引物,上下游引物^[9]分别为: Fish-F: 5'-TCGACTAATCATAAAGATATCGGCAC-3', Fish-R: 5'-ACTTCAGGGTGACCGAAGAATCAGAA-3'。

PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 0.5 min, 54 $^{\circ}$ C 退火 0.5 min 和 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 最后保持在 4 $^{\circ}$ C。

PCR 产物约 680 bp,经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 产物由青岛 BGI 华大基因完成双向测序。DNA 条形码序列经校准后上传中国渔业生物 DNA 条形码信息平台(<http://www.fishery-barcode.cn>)。

1.3 参考 DNA 条形码序列下载

为了全面分析南极鱼亚目鱼类系统关系,从 BOLD (<http://v3.boldsystems.org/index.php/>)筛选和下载了 4 科 28 属 64 种南极鱼亚目鱼类 DNA 条形码。将 BOLD 数据库下载的 64 条 COI 基因序列与本研究获得的 97 条序列合并分析。同时,下载了青鳉(*Oryzias latipes*) DNA 条形码序列作为外类群序列。下载的 COI 基因序列信息如表 1 所示。

1.4 序列分析

利用 sequencher 软件对每个样品测序结果进行处理,并辅以人工校对,校对后的序列同 NCBI 数据库进行 BLAST 相似性比对,以确保结果的准确性。通过 MEGA-X 软件基于 ClustalW 对所有序列进行比对,计算序列的长度、GC 含量、简约信息位点等参数。基于 Kimura-2-parameter (K-2-P) 双参数模型计算科内种间遗传距离(interspecific genetic distance)和种内遗传距离(intraspecific genetic distance)。使用 MEGA-X 软件构建邻接法(neighbour-joining, NJ)系统树,系统树的可靠性采用 Bootstrap 检验,经 1000 次重复抽样评估。

表 1 BOLD 下载的南极鱼亚目鱼类 COI 信息
Tab. 1 The COI information of Notothenioidei download from BOLD

科名 family	属名 genus	种名 species	序列号 accession no.	
南极鱼科 Nototheniidae	寒极鱼属 <i>Cryothernia</i>	海神寒极鱼 <i>Cryothernia amphitreta</i>	ANGBF3818-12	
		斑条寒极鱼 <i>Cryothernia peninsulae</i>	ANTFI187-06	
	犬牙南极鱼属 <i>Dissostichus</i>	小鳞犬牙南极鱼 <i>Dissostichus eleginoides</i>	ANGBF7552-12	
	鲷南极鱼属 <i>Gobionotothen</i>	尖吻鲷南极鱼 <i>Gobionotothen acuta</i>	FKCI025-11	
		鲷南极鱼 <i>Gobionotothen gibberifrons</i>	ANGBF3822-12	
		马里恩岛鲷南极鱼 <i>Gobionotothen marionensis</i>	FKCI045-11	
	雅南极鱼属 <i>Lepidonotothen</i>	灰雅南极鱼 <i>Lepidonotothen mizops</i>	FKCI028-11	
		裸身雅南极鱼 <i>Lepidonotothen nudifrons</i>	ANTFI046-06	
		大鳞雅南极鱼 <i>Lepidonotothen squamifrons</i>	ANGBF3819-12	
	南极鱼属 <i>Notothenia</i>	狭头副南极鱼 <i>Notothenia angustata</i>	FKCI069-11	
		小鳞副南极鱼 <i>Notothenia microlepidota</i>	FNZC082-09	
		多鳍南极鱼 <i>Notothenia neglecta</i>	EATFR010-12	
		花纹南极鱼 <i>Notothenia rossii</i>	ANTFI355-07	
	南冰鲷属 <i>Pagothenia</i>	博氏南冰鲷 <i>Pagothenia borchgrevinki</i>	GBMIN130827-17	
	副南极鱼属 <i>Paranotothenia</i>	新西兰副南极鱼 <i>Paranotothenia magellanica</i>	EATFR011-12	
	南美南极鱼属 <i>Patagonotothen</i>	冈氏南美南极鱼 <i>Patagonotothen guntheri</i>	ANGBF3821-12	
		拉氏南美南极鱼 <i>Patagonotothen ramsayi</i>	FARG065-06	
		鳞头南美南极鱼 <i>Patagonotothen squamiceps</i>	GBGCA9095-15	
		短吻南美南极鱼 <i>Patagonotothen tessellate</i>	FARG135-06	
		大眼南美南极鱼 <i>Patagonotothen wiltoni</i>	FKCI060-11	
鳕冰鱼科 Channichthyidae	肩孔南极鱼属 <i>Trematomus</i>	伯氏肩孔南极鱼 <i>Trematomus bernacchii</i>	AADBE048-10	
		汉氏肩孔南极鱼 <i>Trematomus hansonii</i>	ANGBF656-12	
		吻鳞肩孔南极鱼 <i>Trematomus lepidorhinus</i>	ANGBF668-12	
		尼氏肩孔南极鱼 <i>Trematomus nicolai</i>	ANGBF679-12	
		彭氏肩孔南极鱼 <i>Trematomus pennellii</i>	ANGBF686-12	
		斯氏肩孔南极鱼 <i>Trematomus scotti</i>	ANGBF691-12	
		托氏肩孔南极鱼 <i>Trematomus tokarevi</i>	EATF391-10	
	棘冰鱼属 <i>Chaenodraco</i>	威氏棘冰鱼 <i>Chaenodraco wilsoni</i>	EATF465-10	
	冰鱼属 <i>Channichthys</i>	独角冰鱼 <i>Channichthys rhinoceras</i>	FOAE194-06	
	雪冰鲷属 <i>Chionobathyscus</i>	雪冰鲷 <i>Chionobathyscus dewitti</i>	EATF507-10	
	雪冰鱼属 <i>Chionodraco</i>	独角雪冰鱼 <i>Chionodraco hamatus</i>	EATF091-10	
		龙嘴雪冰鱼 <i>Chionodraco myersi</i>	EATF126-10	
	小带腭鱼属 <i>Cryodraco</i>	南极小带腭鱼 <i>Cryodraco antarcticus</i>	EATF049-10	
		罗斯海小带腭鱼 <i>Cryodraco atkinsoni</i>	FNZB029-08	
	螯冰鱼属 <i>Dacodraco</i>	螯冰鱼 <i>Dacodraco hunteri</i>	EATF155-10	
	拟冰鲷属 <i>Pagetopsis</i>	大鳍拟冰鲷 <i>Pagetopsis macropterus</i>	EATF234-10	
	渊龙鲷科 Bathydraconidae	裸头龙鲷属 <i>Akarotaxis</i>	裸头龙鲷 <i>Akarotaxis nudiceps</i>	EATF192-10
		棘龙鲷属 <i>Acanthodraco</i>	棘龙鲷 <i>Acanthodraco dewitti</i>	GBMNC19258-20
		渊龙鲷属 <i>Bathydraco</i>	南极渊龙鲷 <i>Bathydraco antarcticus</i>	ANTFI281-06
			断线渊龙鲷 <i>Bathydraco scotiae</i>	FNZB161-08
		大鳞渊龙鲷 <i>Bathydraco macrolepis</i>	ANTFI325-06	
		斑条渊龙鲷 <i>Bathydraco marri</i>	EATF152-10	
		多耙渊龙鲷 <i>Bathydraco joannae</i>	ANTFI298-06	

(待续 to be continued)

(续表 1 Tab. 1 continued)

科名 family	属名 genus	种名 species	序列号 accession no.
渊龙鳕科 Bathydraconidae	天鹅龙鳕属 <i>Cygnodraco</i>	天鹅龙鳕 <i>Cygnodraco mawsoni</i>	EATF123-10
	副带腭鱼属 <i>Parachaenichthys</i>	副带腭鱼 <i>Parachaenichthys georgianus</i>	EATFR019-12
		扁嘴副带腭鱼 <i>Parachaenichthys charcoti</i>	ANTFI092-06
	锯渊龙鳕属 <i>Prionodraco</i>	锯渊龙鳕 <i>Prionodraco evansii</i>	ANTFI193-06
	滑龙鳕属 <i>Psilodraco</i>	滑龙鳕 <i>Psilodraco breviceps</i>	ANGBF23259-19
	拉氏渊龙鳕属 <i>Racovitzia</i>	拉氏渊龙鳕 <i>Racovitzia glacialis</i>	EATF092-10
	犁齿龙鳕属 <i>Vomeridens</i>	犁齿龙鳕 <i>Vomeridens infuscipinnis</i>	EATF165-10
	阿氏龙鳕属 <i>Artedidraco</i>	阿氏龙鳕 <i>Artedidraco mirus</i>	GBGCA8804-15
		大口阿氏龙鳕 <i>Artedidraco shackletoni</i>	EATF339-10
		尖须阿氏龙鳕 <i>Artedidraco lonnbergi</i>	EATF004-10
阿氏龙鳕科 Artedidraconidae		管鳞阿氏龙鳕 <i>Artedidraco orianae</i>	EATF157-10
	帆龙鳕属 <i>Histiodraco</i>	帆龙鳕 <i>Histiodraco velifer</i>	EATF227-10
	须鳕属 <i>Pogonophryne</i>	史氏须鳕 <i>Pogonophryne scotti</i>	EATF228-10
		斑块须鳕 <i>Pogonophryne marmorata</i>	FNZB052-08
		巴氏须鳕 <i>Pogonophryne barsukovi</i>	FNZB276-08
		斑头须鳕 <i>Pogonophryne mentella</i>	FNZ683-06
		白鳍须鳕 <i>Pogonophryne albipinna</i>	FNZ571-06
		无斑须鳕 <i>Pogonophryne immaculata</i>	FNZ1009-07
		暗色须鳕 <i>Pogonophryne fusca</i>	FNZ1014-07
		奥兰治须鳕 <i>Pogonophryne orangiensis</i>	FNZ1000-07
		伊氏须鳕 <i>Pogonophryne eakini</i>	FNZ958-07

2 结果与分析

2.1 南极鱼类形态学初步鉴定

本次采集的样品体型较小(图 1), 有的处于幼鱼阶段, 有的只保存了部分肌肉组织样品, 且样品用乙醇固定后已脱色和脱水变形, 因此形态学鉴定难度较大。根据南极磷虾渔业国家科学观察员提供的鱼类照片和样品信息, 依据南极鱼亚目的典型形态学特征, 首先将 97 个样品分成 17 组, 初步判断本次采集的样品有 17 种。进而对其中 13 组具有完整形态的样品进行专业的形态学分类鉴定, 有 6 组样品鉴定到种(样品序号: 01、02、03、07、08、14); 其余 7 组样品由于形态学鉴定经验不足或形态特征被破坏等因素未能鉴定到种。另外有 4 组样品为组织样品, 无法进行专业的形态学分类。形态学特征分类信息详见表 2。

2.2 DNA 条形码分析与物种鉴定

2.2.1 BLAST 相似性比对与 DNA 条形码序列特征

经 ClustalW 序列比对分析, 本研究采集的 97

尾南极鱼类 DNA 条形码序列可分成 17 组。BLAST 相似性比对分析结果显示, 17 组序列分别与 17 个物种的相似度超过了 99%。17 个物种隶属于南极鱼亚目的鳄冰鱼科(Channichthyidae)、南极鱼科(Nototheniidae)、渊龙鳕科(Bathydraconidae)和阿氏龙鳕科(Artedidraconidae)等 4 科的 17 个属(表 2)。17 组样品中, 6 组有形态学鉴定结果的样品, 其 BLAST 相似性比对分析结果与形态学鉴定结果一致; 11 组无法根据形态学特征鉴定物种的样品, 其 DNA 条形码序列通过 BLAST 分析可以在 NCBI 公共数据库中匹配到相似度超过 99% 的物种。

对 97 尾南极鱼类样品的 DNA 条形码进行分析, 去除两段引物序列保留共有序列 570 bp, 其碱基组成比例为 A 22.3%、G 18.4%、C 28.9%、和 T 30.4%。A+T 碱基含量(52.7%)明显高于 G+C 碱基含量(47.3%)。COI 序列密码子的碱基组成特征分析表明, 第二位密码子的 A+T 含量最多(57.2%), 其次是第三位密码子(53.9%), 第一位密



图 1 南极鱼类样品照片

图中 13 个样品序号与表 2 样品序号对应; 另有 4 组样品为肌肉组织, 未在图中展示.

Fig. 1 Photos of Antarctic fish samples

The sequence numbers of 13 samples in the figure correspond to those in Tab. 2, and the other 4 samples are muscle tissues, which are not shown in this figure.

表 2 南极鱼类的形态学和 DNA 条形码分类鉴定结果

序号 number	科名 family	属名 genus	种名 species	取样点 sample point	数量 quantity	样品状态 sample state	物种鉴定方法 species identification
01	鳕冰鱼科 Channichthyidae	头带冰鱼属 <i>Chaenocephalus</i>	短腹头带冰鱼 <i>Chaenocephalus aceratus</i>	48.2, 48.3	6	整鱼 whole fish	形态学特征, DNA 条形码 morphology character, DNA barcoding
02		拟冰鱼属 <i>Pseudochaenichthys</i>	南乔治亚尼拟冰鱼 <i>Pseudochaenichthys georgianus</i>	48.1, 48.2	6	整鱼 whole fish	形态学特征, DNA 条形码 morphology character, DNA barcoding
03		雪冰鱼属 <i>Chionodraco</i>	眼斑雪冰鱼 <i>Chionodraco rastrispinosus</i>	48.1	17	整鱼 whole fish	形态学特征, DNA 条形码 morphology character, DNA barcoding
04		鳕头冰鱼属 <i>Champscephalus</i>	裘氏鳕头冰鱼 <i>Champscephalus gunnari</i>	48.2, 48.3	6	肌肉组织 muscle tissues	DNA 条形码 DNA barcoding
05		新拟冰鳕属 <i>Neopagetopsis</i>	南极新拟冰鳕 <i>Neopagetopsis ionah</i>	48.2	2	肌肉组织 muscle tissues	DNA 条形码 DNA barcoding
06		拟冰鳕属 <i>Pagetopsis</i>	云纹拟冰鳕 <i>Pagetopsis maculatus</i>	48.1	4	整鱼 whole fish	DNA 条形码 DNA barcoding
07	南极鱼科 Nototheniidae	侧纹南极鱼属 <i>Pleuragramma</i>	侧纹南极鱼 <i>Pleuragramma Antarctica</i>	48.1, 48.3	9	整鱼 whole fish	形态学特征, DNA 条形码 morphology character, DNA barcoding
08		拟南极鱼属 <i>Nototheniops</i>	拉森氏拟南极鱼 <i>Nototheniops larseni</i>	48.1, 48.3	21	整鱼 whole fish	形态学特征, DNA 条形码 morphology character, DNA barcoding

(待续 to be continued)

(续表 2 Tab. 2 continued)

序号 number	科名 family	属名 genus	种名 species	取样点 sample point	数量 quantity	样品状态 sample state	物种鉴定方法 species identification
09	南极鱼科 Nototheniidae	肩孔南极鱼属 <i>Trematomus</i>	真鳞肩孔南极鱼 <i>Trematomus eulepidotus</i>	48.1	1	整鱼 whole fish	DNA 条形码 DNA barcoding
10		犬牙南极鱼属 <i>Dissostichus</i>	莫氏犬牙南极鱼 <i>Dissostichus mawsoni</i>	48.3	2	整鱼 whole fish	DNA 条形码 DNA barcoding
11		肩孔南极鱼属 <i>Trematomus</i>	纽氏肩孔南极鱼 <i>Trematomus newnesi</i>	48.1	1	整鱼 whole fish	DNA 条形码 DNA barcoding
12		南极鱼属 <i>Notothenia</i>	革首南极鱼 <i>Notothenia coriiceps</i>	48.2	8	肌肉组织 muscle tissues	DNA 条形码 DNA barcoding
13		奇南极鳕属 <i>Aethotaxis</i>	奇南极鳕 <i>Aethotaxis mitopteryx</i>	48.2	6	肌肉组织 muscle tissues	DNA 条形码 DNA barcoding
14	渊龙鳕科 Bathydraconidae	裸龙鳕属 <i>Gymnodraco</i>	尖头裸龙鳕 <i>Gymnodraco acuticeps</i>	48.1	5	整鱼 whole fish	形态学特征, DNA 条形码 morphology character, DNA barcoding
15		姥龙鳕属 <i>Gerlachea</i>	澳洲姥龙鳕 <i>Gerlachea australis</i>	48.1	1	整鱼 whole fish	DNA 条形码 DNA barcoding
16	阿氏龙鳕科 Artedidraconidae	多罗龙鳕属 <i>Dolloidraco</i>	长背多罗龙鳕 <i>Dolloidraco longedorsalis</i>	48.1	1	整鱼 whole fish	DNA 条形码 DNA barcoding
17		阿氏龙鳕属 <i>Artedidraco</i>	长胸鳍阿氏龙鳕 <i>Artedidraco skottsbergi</i>	48.2	1	整鱼 whole fish	DNA 条形码 DNA barcoding

注: 取样点是指“南极海洋生物资源养护委员会”(The Commission for the Conservation Antarctic Marine Living Resources, CCAMLR) 48.1、48.2 和 48.3 亚区。
Note: Sampling points refer to Subarea 48.1, 48.2 and 48.3 of CCAMLR (The Commission for the Conservation Antarctic Marine Living Resources).

码子的 A+T 含量最少(47.2%); G+C 含量最高的则是第一位密码子(52.8%), 其次是第三位密码子(46.1%), 而第二位密码子 G+C 含量最低(42.8%)(表 3)。序列保守位点有 378 个, 变异位点 192 个, 简约信息位点 184 个, 单突变位点 8 个, 无插入/缺失位点(表 3)。

表 3 密码子第一位、第二位和第三位平均组成统计表
Tab. 3 Statistics of the average composition of the first, second and third codons

碱基 base	总频率 frequency	第一位 1st site of codon	第二位 2nd site of codon	第三位 3rd site of codon
A	22.3	27.5	14.8	24.5
G	18.4	28.3	13.2	13.5
C	28.9	24.5	29.6	32.6
T	30.4	19.7	42.4	29.4
A+T	52.7	47.2	57.2	53.9
G+C	47.3	52.8	42.8	46.1

2.2.2 属间、种间及种内遗传距离 利用 MEGA-X 软件基于 Kimura-2-parameter 模型计算 97 条

DNA 条形码的遗传距离(表 4)。结果显示, 17 种南极鱼亚目鱼类种内遗传距离范围为 0~0.0198, 平均值为 0.0033, 均低于 2%的种间遗传分化界限^[10]; 种间遗传距离范围为 0.0201~0.2136, 平均值为 0.0746, 均高于 2%的种间遗传分化界限; 种间和种内平均遗传距离相差 23 倍, 符合 Hebert 提出的物种鉴定“10×法则”标准^[10-14], 明显为 17 个有效种。

对 4 科鱼类的同科种间的遗传距离分析发现, 南极鱼科鱼类的种间遗传距离平均值为 0.1551, 其中拉森氏拟南极鱼(*Nototheniops larseni*)和真鳞肩孔南极鱼(*Trematomus eulepidotus*)种间遗传距离最大为 0.2136, 莫氏犬牙南极鱼(*Dissostichus mawsoni*)和奇南极鳕(*Aethotaxis mitopteryx*)种间遗传距离最小为 0.0809; 鳕冰鱼科鱼类的种间遗传距离平均值为 0.0699, 其中南乔治亚尼拟冰鱼(*Pseudochaenichthys georgianus*)和裘氏鳕头冰鱼(*Champocephalus gunnari*)种间遗传距离最大为 0.1015, 短腹头带冰鱼(*Notothenia coriiceps*)和眼斑雪冰鱼(*Chionodraco rastrispinosus*)种间遗传距

离最小为 0.0330; 渊龙 𩚑 科的尖头裸龙 𩚑 (*Gymnodraco acuticeps*)和澳洲姥龙 𩚑(*Gerlachea australis*)种间遗传距离为 0.0534; 阿氏龙 𩚑科的种间遗传距离在 4 科中最小, 长背多罗龙 𩚑 (*Dolloidraco longedorsalis*)和长胸 𩚑 阿氏龙 𩚑 (*Artedidraco skottsbergi*)种间遗传距离为 0.0201。

表 4 不同分类单元遗传距离(K2P)统计表
Tab. 4 Summary of genetic divergences (K2P) within various taxonomic levels

比较范围 comparison range	最大值 maximum	最小值 minimum	平均值 average
鳕冰鱼科鱼类种间 interspecific of Nototheniidae	0.1015	0.0330	0.0699
南极鱼科鱼类种间 interspecific of Channichthyidae	0.2136	0.0809	0.1551
渊龙 𩚑 科鱼类种间 interspecific of Bathydraconidae	0.0534	0.0534	0.0534
阿氏龙 𩚑 科鱼类种间 Interspecific of Artedidraconidae	0.0200	0.0200	0.0201
南极鱼亚目鱼类种内 Intraspecific of Notothenioidei	0.0198	0.0000	0.0033

2.2.3 南极鱼亚目鱼类系统关系构建 为了进一步验证上述物种鉴定结果的准确性, 以便全面分析南极鱼亚目鱼类系统关系, 将本研究自测的南极鱼亚目 4 科 17 属 17 种鱼类的 97 条 DNA 条形码, 与 BOLD 数据库下载的 4 科 28 属 64 种南极鱼亚目鱼类 DNA 条形码合并分析。本次构建的南极鱼亚目鱼类系统关系树包括 4 科 39 属 81 种, 其中南极鱼科 34 种、鳕冰鱼科 15 种、渊龙 𩚑 科 16 种和阿氏龙 𩚑 科 16 种。

NJ 系统树中南极鱼亚目鱼类总体上聚为 6 支, 具有较高的节点支持率, 其中, 南极鱼科 (Nototheniidae)位于系统树根部, 由 3 支组成, 为并系群(paraphyletic group); 其次是鳕冰鱼科 (Channichthyidae), 属单系群(monophyletic group); 渊 龙 𩚑 科 (Bathydraconidae) 和 阿 氏 龙 𩚑 科 (Artedidraconidae)分化时间更晚, 均为单系群。在属的水平上, 绝大多数同属物种都各自聚在一起, 仅有南极鱼科的寒极鱼属(*Cryothernia*)、鳕冰鱼科的雪冰鱼属(*Chionodraco*)和阿氏龙 𩚑 科的阿氏龙 𩚑 属(*Artedidraco*)等 3 个属的物种未聚成独立的小分支。另外, 副南极鱼属(*Paranotothenia*)鱼类与南极鱼属(*Notothenia*)的 5 个种聚在一个分支内 (图 2)。

3 讨论

南极鱼亚目鱼类是南极鱼类中物种多样性最丰富的类群, 虽然多数物种个体较小, 且数量有限, 但该类群是适应性进化和耐寒机制研究的良

好生物模型, 因而具有重要的科学意义和经济价值。南极鱼类资源研究不仅为适应性进化机制研究和生物技术创新带来机遇, 亦将促进国际社会对南极生态与环境保护及其生物资源权属与管理等问题达成共识。南极鱼类的准确分类鉴定是其保护生物学、进化生物学和生物地理学等研究的前提。据报道, 南极鱼类每年都有新物种被发现^[5]。DNA 条形码提供了有效的遗传分类学标准, 采集南极鱼类 DNA 条形码信息是发现新物种和隐存种、丰富南大洋生物多样性认识的便捷途径之一, 能为研究南极鱼类的进化规律和遗传变异提供基础数据。本研究中的 97 份南极鱼样品经形态学特征分析和 DNA 条形码鉴定为南极鱼亚目 4 科 17 属 17 个有效种, 其中依据形态学特征只鉴定出 6 个物种, 其余 11 个物种则依据 DNA 条形码得到准确鉴定。可见, 在形态学鉴定经验不足或样品形态不完整的情况下, DNA 条形码可以有效地实现物种鉴定。

Ward 等^[9]曾报道了 143 种硬骨鱼类的 DNA 条形码第一密码子 GC 含量最高、第三密码子 GC 含量最低; 彭居俐等^[15]分析了鲤科(Cyprinidae)鱼类 DNA 条形码密码子 GC 含量, 得出与 Ward 等^[9]一致的结果; 柳淑芳等^[16]则发现石首鱼科 (Sciaenidae) DNA 条形码的第二密码子 GC 含量最高, 第三密码子 GC 含量最低; 赵娜等^[17]分析了 15 种南极鱼科和鳕冰鱼科鱼类的 36 条 DNA 条形码及 NCBI 下载的两科鱼类 61 条 DNA 条形码, 发现该类群第一密码子 GC 含量最高(51.3%),

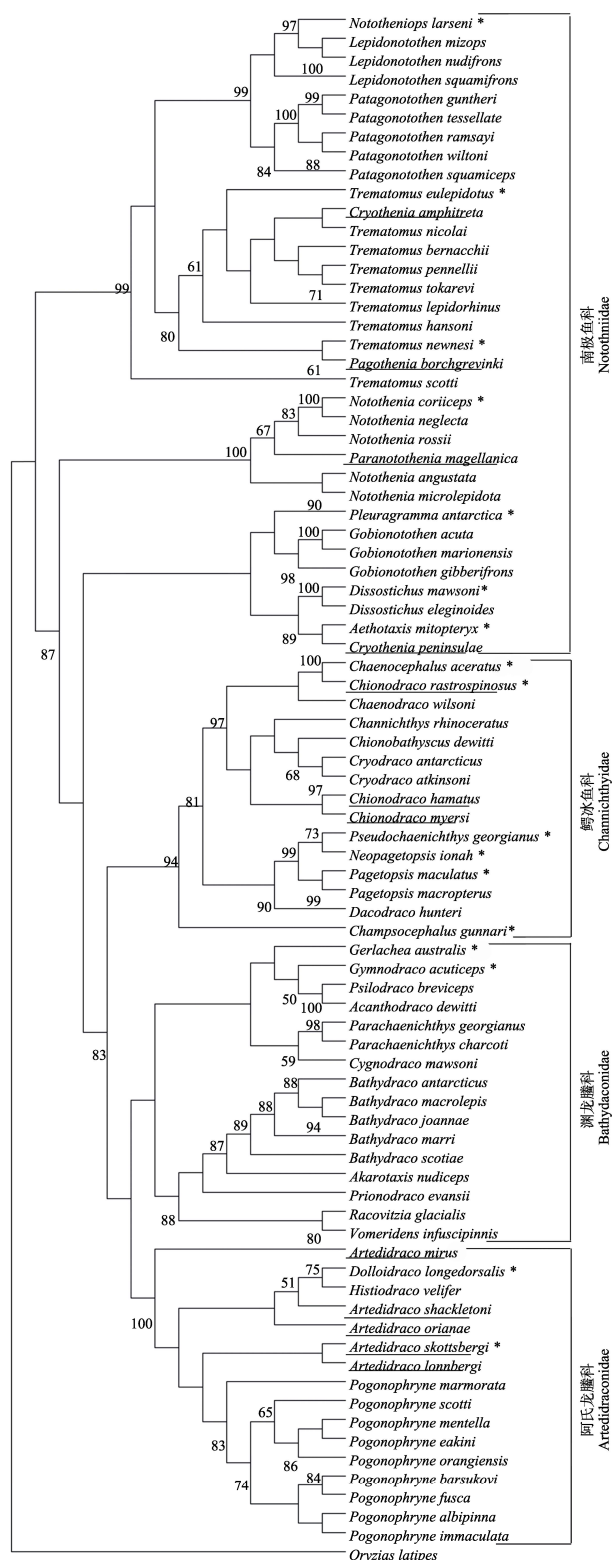


图 2 81 种南极鱼亚目鱼类的 DNA 条形码 NJ 分子系统树
*标注为本研究自测样品。

Fig. 2 Neighbor-joining phylogenetic tree of DNA barcodes for 81 species of Notothenioidei
Marked with * are the samples determined in this study

第二密码子含量最低(42%)。本研究分析了 97 条南极鱼类 DNA 条形码的碱基组成特征,发现 AT 平均含量(52.7%)显著高于 GC 平均含量(47.3%),其中第一密码子 GC 含量最高(52.8%),第二密码子 GC 含量最低(42.8%)。本研究结果与赵娜等^[17]的结果相一致,但有别于其他硬骨鱼类的 DNA 条形码碱基组成特征。可见,不同类群鱼类的 DNA 条形码碱基组成有所不同,第一密码子 GC 含量最高且第二密码子最低是否为南极鱼亚目类群的特有现象? 该现象有何生物学意义? 这些问题尚有待于进一步研究。

本研究采集的南极鱼亚目 17 种鱼类 DNA 条形码,结合从 BOLD 筛选和下载的南极鱼亚目 64 种鱼类 DNA 条形码,构建了南极鱼亚目 4 科 39 属 81 种鱼类的系统关系树,其中包括南极鱼科 34 种、鳕冰鱼科 15 种、渊龙膳科 16 种和阿氏龙膳科 16 种。迄今为止,本研究为包含种类最多的南极鱼亚目鱼类分子鉴别和系统进化关系分析,物种和属分别占已有记录的 35.68%和 81.25%。NJ 系统树显示,南极鱼亚目 4 个科聚类效果明显且节点支持率较高。但是属级的物种聚类时,有部分物种在系统树上的位置与传统的分类地位不一致。比如: (1)寒极鱼属(*Cryothenia*)的两个物种在系统树中的位置异于预期。其中,海神寒极鱼(*Cryothenia amphitreta*)与肩孔南极鱼属(*Trematomus*)和南冰膳属(*Pagothenia*)的物种聚为一支,该分支内的物种均隶属于 Trematominae 亚科;斑条寒极鱼(*Cryothenia peninsulae*)却并未与其同属姊妹种海神寒极鱼(*C. amphitreta*)聚在一起,而且游离于 Trematominae 亚科的分支之外。赵娜等^[17]也曾发现了此类现象,可见该属的分类地位尚有待于深入探究。(2)个别物种的属级分类单元的有效性值得商榷。在系统树中,博氏南冰膳(*Pagothenia borchgrevinki*)聚在肩孔南极鱼属(*Trematomus*)分支中,新西兰副南极鱼(*Paranotothenia magellanica*)聚在南极鱼属(*Notothenia*)分支中。在 FishBase 中检索两个物种的曾用名,发现博氏南冰膳的同种异名之一为 *Trematomus borchgrevinki*,而新西兰副南极鱼的同种异名之一为 *Notothenia*

magellanica。据此,本研究结果不支持南冰鳕属(*Pagothenia*)和副南极鱼属(*Paranotothenia*)的物种独立成属,还需要有更多的同属物种的形态学和分子分类学证据进行佐证。(3)鳕冰鱼科的雪冰鱼属(*Chionodraco*)和阿氏龙鳕科的阿氏龙鳕属(*Artedidraco*)的属内物种没有聚到一起,这两个属的物种分类地位还需要补充更多的样品进行深入分析。

综上所述,根据 DNA 条形码计算南极鱼亚目鱼类的种间和种内平均遗传距离,符合 Hebert 提出的物种鉴定“10×法则”标准;NJ 系统树上,南极鱼科、鳕冰鱼科、渊龙鳕科和阿氏龙鳕科各科物种聚类效果明显,大部分的同属物种也各自聚为一支;遗传距离和系统关系树分析进一步证明 DNA 条形码对于南极鱼类物种鉴定的适用性与可行性;南极鱼亚目鱼类的个别物种其分子系统关系与形态学分类地位不一致。可见, DNA 条形码对种类繁多、形态相似的山极鱼亚目鱼类可实现快速准确、简便高效的物种鉴定,不仅能辅助传统形态学方法为南极鱼亚目分类系统提供必要补充和佐证,而且适用于南极鱼亚目物种的系统发育关系构建。

参考文献:

- [1] Andriashev A P. A general review of the Antarctic fish fauna [M]//Biogeography and Ecology in Antarctica. Dordrecht: Springer, 1965: 491-550.
- [2] Li Y. Characterization and functional analysis of dm-SEPP cDNA and its role in cold response[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2018: 3-4. [李艳. 南极鱼 Dm-SEPP 基因 cDNA 结构和功能分析及对低温响应机制初探[D]. 上海: 上海海洋大学, 2018: 3-4.]
- [3] Eastman J T. The nature of the diversity of Antarctic fishes [J]. Polar Biology, 2005, 28(2): 93-107.
- [4] Dettai A, Lautredou A C, Bonillo C, et al. The actinopterygian diversity of the CEAMARC cruises: Barcoding and molecular taxonomy as a multi-level tool for new findings[J]. Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography, 2011, 58(1-2): 250-263.
- [5] Smith P J, Steinke D, Dettai A, et al. DNA barcodes and species identifications in Ross Sea and Southern Ocean fishes[J]. Polar Biology, 2012, 35(9): 1297-1310.
- [6] Fischer W, Hureau J C. FAO species identification sheets for fishery purposes: Southern ocean: Fishing areas 48, 58 and 88 (CCAMLR Convention Area) (Volume II)[R]. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1985: 282-284, 323-385.
- [7] Gon O, Heemstra P C. Fishes of the Southern Ocean[M]. Grahamstown: J. L. B. Smith Institute of Ichthyology, 1990.
- [8] Voronina E, Neelov A V. Structural traits of alimentary tract of fishes of the family Channichthyidae (Notothenioide)[J]. Journal of Ichthyology, 2001, 41(9): 778-788.
- [9] Ward R D, Zemlak T S, Innes B H, et al. DNA barcoding Australia's fish species[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences, 2005, 360(1462): 1847-1857.
- [10] Hebert P D N, Ratnasingham S, de Waard J R. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2003, 270(Suppl 1): S96-S99.
- [11] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2003, 270(1512): 313-321.
- [12] Meyer C P, Paulay G. DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling[J]. PLoS Biology, 2005, 3(12): e422.
- [13] Čandek K, Kuntner M. DNA barcoding gap: Reliable species identification over morphological and geographical scales[J]. Molecular Ecology Resources, 2015, 15(2): 268-277.
- [14] Meyer C P, Geller J B, Paulay G. Fine scale endemism on coral reefs: Archipelagic differentiation in turbinid gastropods[J]. Evolution, 2005, 59(1): 113-125.
- [15] Peng J L, Wang X Z, Wang D, et al. Application of DNA barcoding based on the mitochondrial COI gene sequences in classification of *Culter* (Pisces: Cyprinidae)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2009, 33(2): 271-276. [彭居俐, 王绪祯, 王丁, 等. 基于线粒体 COI 基因序列的 DNA 条形码在鲤科鲃属鱼类物种鉴定中的应用[J]. 水生生物学报, 2009, 33(2): 271-276.]
- [16] Liu S F, Chen L L, Dai F Q, et al. Application of DNA barcoding gene COI for classifying family Sciaenidae[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2010, 41(2): 223-232. [柳淑芳, 陈亮亮, 戴芳群, 等. 基于线粒体 COI 基因的 DNA 条形码在石首鱼科(Sciaenidae)鱼类系统分类中的应用[J]. 海洋与湖沼, 2010, 41(2): 223-232.]
- [17] Zhao N, Ma C Y, Song W, et al. DNA barcoding, classification, and phylogeny of Antarctic fishes[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(4): 728-736. [赵娜, 马春艳, 宋炜, 等. 南极鱼类 DNA 条形码及分子系统进化研究[J]. 中国水产科学, 2018, 25(4): 728-736.]

DNA barcoding and molecular systematics of *Notothenioidei*

JIANG Lixuan^{1,2,3}, ZHANG Jichang², FAN Gangzhou², LI Ang^{2,3}, LIU Shufang^{2,3}, ZHUANG Zhimeng²

1. College of Fisheries, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China;
2. Key Laboratory of Sustainable Development of Marine Fisheries, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;
3. Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China;

Abstract: *Notothenioidei* is the dominant species in the Southern Ocean. Due to its high degree of specialization in morphological characteristics and physiological adaptation, the small size of most species and the difficulty in obtaining samples, the traditional morphological classification method has great limitations. DNA barcode technology provides the standard of genetic taxonomy and effective molecular taxonomy, and is the improvement, development and innovation of traditional taxonomy methods, which is helpful to accurately locate the specimens that need to be re-identified in morphology. 97 Antarctic fish samples were obtained from Antarctic krill fisheries in CCAMLR 48.1, 48.2 and 48.3 sub regions. By morphological analysis and DNA barcoding, these samples were identified as 17 effective species belonging to 17 genera and 4 families of *Notothenioidei*. Only 6 species were identified according to morphological characteristics, and the other 11 species were identified accurately according to DNA barcoding. So DNA barcoding can effectively identify species in the case of lack of morphological identification experience or incomplete sample morphology. Then, 97 DNA barcodes of *Notothenioidei* were analyzed. It was found that the highest GC content in the first codon and the lowest GC content in the second codon were the unique phenomenon of *Notothenioidei*. However, its biological significance needs to be further studied. A phylogenetic tree of 81 species of fishes belonging to 39 genera and 4 families was constructed by combining the DNA barcodes of 17 species collected in this study with 64 species screened by bold. This is the most abundant molecular identification and phylogenetic analysis of *Notothenioidei* up to now. Genetic distance and phylogenetic tree analysis further proved the applicability and feasibility of DNA barcoding for species identification of *Notothenioidei*. In addition, it was found that the molecular phylogenetic relationship and morphological taxonomy position of individual species of *Notothenioidei* were inconsistent. The results of this study confirmed the efficiency of DNA barcoding technology in the identification of suborder taxa of Antarctic fish, made up for the limitations and shortcomings of traditional morphological identification methods, enriched the DNA barcoding database of Antarctic fish, laid the foundation for the study of Antarctic fish diversity and adaptive evolution, and provided scientific basis for the protection and sustainable development and utilization of Antarctic fishery resources.

Key words: *Notothenioidei*; COI gene; DNA barcoding; genetic distance; molecular phylogenetic relationships

Corresponding author: LIU Shufang. E-mail: liusf@ysfri.ac.cn