

DOI: 10.12264/JFSC2021-0191

鲹科鱼类 DNA 条形码分类系统

杨龙^{1,2,3}, 李昂^{2,3}, 李步苏^{2,3}, 王焕^{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: 为了验证 DNA 条形码在鲹科(Carangidae)鱼类物种鉴定和系统分类中的适用性, 本研究自测 6 属 7 种 17 条序列, 同时筛选了 BOLD 数据库中的有效序列, 共获得 25 属 95 种 273 条鲹科鱼类 DNA 条形码序列, 通过 BLAST 比对、遗传距离和系统关系树, 构建了鲹科鱼类的 DNA 条形码分类系统。结果表明: (1) 鲹科鱼类属间、种间、属内种间和种内三级分类单元遗传距离的平均水平分别为 0.186、0.169、0.090 和 0.008, 种间平均遗传距离是种内平均遗传距离的 21 倍, 可见 DNA 条形码适用于鲹科鱼类分类鉴定; (2) 运用 DNA 条形码技术可以识别出形态鉴定有误的物种, 表明 DNA 条形码可以弥补传统形态学鉴定的局限性, 可对鲹科鱼类形态学分类结果进行精准修正; (3) 鲹科鱼类 DNA 条形码分析表明, BOLD 数据库中仍存在一定的“同种异名”和“异种同名”现象, 建议使用该数据库信息时应严格评估信息的准确性; (4) 鲹科鱼类系统发生关系研究对物种的分类地位提出了新的见解, 即拟鲳鲹(*Parona signata*)和镰鳍波线鲹(*Lichia amia*)亲缘关系较近, 支持将二者均归为鲳鲹亚科(Trachinotinae)。本研究旨在为丰富鲹科鱼类 DNA 条形码数据, 完善鲹科 DNA 条形码分类系统, 并为鲹科鱼类物种鉴定和系统分类提供分子证据。

关键词: 鲹科; DNA 条形码; 分类鉴定; 系统关系

中图分类号: S931

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2021)12–1523–13

鲹科(Carangidae)隶属硬骨鱼纲鲈形目(Perciformes), 为海洋中上层洄游性鱼类, 广泛分布于印度洋、太平洋和大西洋, 特别是热带和亚热带海域。鲹科鱼类具有种类多、数量大, 且生长速度快、肉质鲜美、营养丰富等特点, 是世界重要暖水性和暖温性海洋经济鱼类。以日本为例, 近几年五条鲷(*Seriola quinqueradiata*)、高体鲷(*Seriola dumerili*)和黄尾鲷(*Seriola lalandi*) 3 种鲹科鲷属(*Seriola*)鱼类养殖产量占日本海水养殖鱼类总产量的 56%以上^[1]。当前我国近海渔业资源严重衰退, 为缓解资源生态压力、保障优质蛋白供给, 亟需拓展大洋洄游性鱼类资源的开发利用。

鲹科鱼类恰恰是未来深远海捕捞和养殖开发的主要对象。鲹科种类众多, 且近缘种形态相近, 传统形态学方法对其进行的研究具有较大的局限性。Gushiken 等^[2]根据外部形态和解剖学特征将鲹科鱼类分为鲹亚科(Caranginae)、鲳鲹亚科(Trachinotinae)、鲷亚科(Naucratinae)和似鲹亚科(Scombrodinae), 包括 32 属 140 种。学者们对我国分布的鲹科物种数意见尚不统一, 孟庆闻等^[3]报道我国约有 21 属 58 种鲹科鱼类, 而黄宗国等^[4]认为我国的鲹科记录种有 74 种。鲹科鱼类的准确分类鉴定是其资源养护和可持续开发利用的前提, 因此, 鲹科鱼类 DNA 条形码研究具有重要科学意义和

收稿日期: 2021-04-23; **修订日期:** 2021-05-18.

基金项目: 国家自然科学基金项目(42076132); 中国水产科学研究院基本科研业务费资助项目(2021JC01); 国家海洋水产种质资源库项目.

作者简介: 杨龙(1994–), 男, 硕士研究生, 研究方向为渔业资源分子生态学. E-mail: 1262804971@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

经济学意义。

DNA 条形码提供了遗传学分类标准,是对传统形态学分类方法的完善和发展,目前已广泛应用于生物分类鉴定工作。采集鲹科 DNA 条形码信息是丰富其物种多样性认识、理清“同种异形”和“异种同形”现象、发现新物种和隐存种的便捷途径之一,能为鲹科鱼类遗传变异和进化规律研究提供可靠数据。迄今,关于鲹科鱼类 DNA 条形码的报道较少,且仅是针对部分物种或特定海域样品开展的研究,如:许则滩等^[5]利用 COI 序列对舟山普陀海域 7 属 8 种 18 尾鲹科鱼类的 DNA 条形码和物种多样性进行了研究分析;Jaafar 等^[6]对马来群岛海域的 36 种鲹的 COI 基因进行了序列分析,发现其遗传距离范围变化趋势与分类层次结构的期望基本保持一致等。本研究拟在自行采集鲹科鱼类标准 DNA 条形码的基础上,广泛获取 BOLD (Barcode of Life Data)数据库中的有效鲹科鱼类 DNA 条形码序列,探讨 DNA 条形码技术对鲹科鱼类的识别效率,弥补传统形态学鉴定方法的局限和不足,旨在丰富鲹科鱼类 DNA 条形码数据库、完善 DNA 条形码分类系统,为物种鉴定及其系统关系构建等提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

17 份鲹科鱼类组织样品来自“中国渔业生物 DNA 条形码样本库”,均采自中国南海。根据形态学特征^[7],初步鉴定为 7 属 7 种,分别为叶鲹属(*Atule*)的游鳍叶鲹(*Atule mate*)、丝鲹属(*Alectis*)的印度丝鲹(*Alectis indica*)、副业鲹属(*Alepes*)的克氏副叶鲹(*Alepes klein*)、若鲹属(*Carangoides*)的高体若鲹(*Carangoides equula*)、大甲鲹属(*Megalaspis*)的大甲鲹(*Megalaspis cordyla*)、拟鲹属(*Pseudocaranx*)的黄带拟鲹(*Pseudocaranx dentex*)及竹荚鱼属(*Trachurus*)的日本竹荚鱼(*Trachurus japonicus*)。

1.2 DNA 提取、扩增和测序

使用 TIANGEN 公司的 TIANamp Marine Animals DNA Kit 试剂盒提取样本 DNA(具体操作方法参考 TIANGEN 使用说明书)。COI 基因序列

扩增引物参考 Ward 等^[8]研究:

FishF1: 5'-TCAACCAACCACAAAGACATT-GGCAC-3',

FishR1: 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAG-AATCA-3'。

PCR 反应总体积为 25 μ L,其中包含: MIX 反应体系 12.5 μ L,引物各 1 μ L,模板 2 μ L,再加超纯水补至 25 μ L。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 0.5 min, 52 $^{\circ}$ 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。扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,达标产物送往青岛 BGI 华大基因双向测序。

1.3 COI 序列处理

利用 DNA Star (<https://www.dnastar.com>)软件对每个样品正反向测序结果进行拼接,并辅以人工校对,校对后的序列同 NCBI 数据库进行相似性比对,以确保鉴定结果的准确性。

从 BOLD 数据库(<http://v4.boldsystems.org/index.php/>)下载鲹科鱼类 COI 序列。经筛选和分析,获取 BOLD 数据库鲹科 24 属 88 种 256 条 DNA 条形码序列(表 1)。合并自测鲹科鱼类 COI 基因序列和 BOLD 下载数据。本研究建立的鲹科鱼类 DNA 条形码分类系统,经初步统计,包括 4 亚科 26 属 95 种 273 条序列,包括了鲹科鱼类记录种的 67.86%,占鲹科属级分类的 81.25%。同时,下载斑马鱼(*Danio rerio*) DNA 条形码序列作为系统树的外类群序列。

通过 MEGA 6.0 软件对所有序列进行比对,计算序列的长度、碱基组成、GC 含量、简约信息位点等参数(表 2)。基于 Kimura-2-parameter (K2P)双参数模型分别计算属间(intergeneric)、种间(interspecific)、属内种间(interspecific within genera)和种内(intraspecific)三级分类单元遗传距离。利用 MEGA 6.0 软件构建邻接法(neighbor joining, NJ)系统树,同时采用 PAUP 4.0 软件构建最大简约法(maximum parsimony, MP)系统树进行两组结果相互对照和验证。系统树可信度均采用 bootstrap 检验,经 1000 次重复抽样检验得到分支树节点支持率。

表 1 95 种鲹科鱼类 DNA 条形码信息
Tab. 1 DNA barcode information of 95 species of carangidae

亚科 subfamily	属 genus	种 species	条数 number	序列号 accession no.
鲹亚科 Caranginae	叶鲹属 <i>Atule</i>	游鳍叶鲹 <i>Atule mate</i>	2	自测 sequenced in this study
	丝鲹属 <i>Alectis</i>	印度丝鲹 <i>Alectis indica</i>	2	自测 sequenced in this study
	副叶鲹属 <i>Alepes</i>	亚历山大丝鲹 <i>Alectis alexandrina</i>	2	BIM076-13 GBMIN121540-17
		克氏副叶鲹 <i>Alepes klein</i>	3	自测 sequenced in this study
		细尾副叶鲹 <i>Alepes apercna</i>	3	GBGCA11488-15 GBGCA11489-15 GBGCA11490-15
		黑鳍副叶鲹 <i>Alepes melanoptera</i>	3	DBMF016-10 DBMF028-10 DBMF042-10
		范氏副叶鲹 <i>Alepes vari</i>	3	DBMF282-10 DBMF002-10 DBMF283-10
	钩鲹属 <i>Atropus</i>	沟鲹 <i>Atropus atropus</i>	3	DBMF040-10 DBMF057-10 DBMF384-10
	若鲹属 <i>Carangoides</i>	高体若鲹 <i>Carangoides equula</i>	2	自测 sequenced in this study
		甲若鲹 <i>Carangoides armatus</i>	3	DBMF153-10 DBMF150-10 DBMF397-10
		橘点若鲹 <i>Carangoides bajad</i>	3	DBMF246-10 FOAN488-11 FOAN527-11
		长吻若鲹 <i>Carangoides chrysophrys</i>	3	CFCS028-08 CFCS029-08 CFCS227-08
		青羽若鲹 <i>Carangoides coeruleopinnatus</i>	3	DBMF046-10 DBMF176-10 DBMF238-10
		黄点若鲹 <i>Carangoides fulvoguttatus</i>	3	DBMF243-10 DBMF244-10 DBMF245-10
		裸胸若鲹 <i>Carangoides gymnostethus</i>	3	DBMF171-10 DBMF174-10 DBMF338-10
		海兰德若鲹 <i>Carangoides hedlandensis</i>	3	DBMF009-10 DBMF116-10 DBMF120-10
		马拉巴若鲹 <i>Carangoides malabaricus</i>	3	DBMF062-10 FOA1137-08 FOAJ505-09
		横带若鲹 <i>Carangoides plagiotaenia</i>	2	SAIAB049-06 SAIAB551-07
		白舌若鲹 <i>Carangoides talamparoides</i>	2	DBMF067-10 FMVIC728-08
	鲹属 <i>Caranx</i>	蓝点鲹 <i>Caranx bucculentus</i>	3	FOAC443-05 FOAC445-05 FOAL909-10
		犬鲹 <i>Caranx caninus</i>	3	RDFCA231-05 RFE270-05 SEMAR100-10
		金鲹 <i>Caranx crysos</i>	3	BIM118-13 BIM119-13 BIM161-13

(待续 to be continued)

(续表 1 Tab. 1 continued)

亚科 subfamily	属 genus	种 species	条数 number	序列号 accession no.
鲹亚科 Caranginae	鲹属 <i>Caranx</i>	黑眼鲹 <i>Caranx latus</i>	3	MFSP377-10 MFSP421-10 MFSP427-10
		阔步鲹 <i>Caranx lugubris</i>	3	AUSTR481-13 DSFSG867-13 MBFB045-07
		泰勒鲹 <i>Caranx tille</i>	3	DBMF634-10 DBMF706-10 DBMF773-10
		大马鲹 <i>Caranx caballus</i>	3	RDFCA268-05 RDFCA270-05 RDFCA384-05
		希伯氏鲹 <i>Caranx heberi</i>	3	DSFSG944-13 DSLAF740-08 DSLAF744-08
		马鲹 <i>Caranx hippos</i>	3	FOAC497-05 FOAC498-05 FOAC499-05
		浪人鲹 <i>Caranx ignobilis</i>	3	BTL062-10 BTL064-10 DBMF565-10
		蓝鳍鲹 <i>Caranx melampygus</i>	3	KANB110-17 MARQ343-12 SAIAB414-06
		巴布亚鲹 <i>Caranx papuensis</i>	3	GAMBA088-12 LIFS296-08 MBFB042-07
		六带鲹 <i>Caranx sexfasciatus</i>	3	BIFB247-13 BIFD1742-14 DBMF005-10
	鲭鲹属 <i>Chloroscombrus</i>	绿鲭鲹 <i>Chloroscombrus chrysurus</i>	3	FBW033-14 FBW035-14 FBW036-14
	圆鲹属 <i>Decapterus</i>	红尾圆鲹 <i>Decapterus akaadsi</i>	3	ABFJ204-07 FSCS194-06 FSCS195-06
		无斑圆鲹 <i>Decapterus kurroides</i>	3	DBMF651-10 DBMF653-10 DBMF670-10
		颌圆鲹 <i>Decapterus macarellus</i>	3	DSLAR375-08 DSLAR376-08 DSLAR473-09
		长身圆鲹 <i>Decapterus macrosoma</i>	3	DBMF278-10 DBMF281-10 DBMF550-10
		穆氏圆鲹 <i>Decapterus muroadsi</i>	3	FOAF558-07 FOAF559-07 FOAF560-07
		黑点圆鲹 <i>Decapterus punctatus</i>	3	MFLII520-07 SCAFB627-07 SCAFB628-07
		罗氏圆鲹 <i>Decapterus russelli</i>	3	BIM164-13 DSLAF435-07 DSFSE232-07
		泰伯圆鲹 <i>Decapterus tabl</i>	3	MLIII375-08 MLIII525-08 UNAFI001-18

(待续 to be continued)

(续表 1 Tab. 1 continued)

亚科 subfamily	属 genus	种 species	条数 number	序列号 accession no.	
鲹亚科 Caranginae	无齿鲹属 <i>Gnathanodon</i>	无齿鲹 <i>Gnathanodon speciosus</i>	3	DBMF508-10 DBMF510-10 DBMF511-10	
		大甲鲹属 <i>Megalaspis</i>	大甲鲹 <i>Megalaspis cordyla</i>	3	自测 sequenced in this study
		乌鲹属 <i>Parastromateus</i>	乌鲹 <i>Parastromateus niger</i>	3	DBMF044-10 DBMF073-10 DBMF189-10
	拟鲹属 <i>Pseudocaranx</i>	黄带拟鲹 <i>Pseudocaranx dentex</i>	3	自测 sequenced in this study	
		乔奇拟鲹 <i>Pseudocaranx georgianus</i>	3	FMVIC822-08 FMVIC823-08 FMVIC824-08	
		沙拟鲹 <i>Pseudocaranx wrighti</i>	3	FMVIC825-08 FMVIC826-08 FMVIC827-08	
	凹肩鲹属 <i>Selar</i>	牛目凹肩鲹 <i>Selar boops</i>	3	DBMF012-10 DBMF125-10 DBMF127-10	
		脂眼凹肩鲹 <i>Selar crumenophthalmus</i>	3	DBMF001-10 DBMF013-10 DBMF036-10	
	月鲹属 <i>Selene</i>	布雷氏月鲹 <i>Selene brevoortii</i>	3	MFC015-08 MOP146-12 MOP663-12	
		太平洋月鲹 <i>Selene peruviana</i>	3	FISHP021-15 FISHP022-15 FISHP023-15	
		大西洋月鲹 <i>Selene setapinnis</i>	3	BCOLL431-08 BCOLL432-08 BCOLL433-08	
		突颌月鲹 <i>Selene vomer</i>	3	BAHIA137-14 BAHIA138-14 CFSAN082-11	
	竹荚鱼属 <i>Trachurus</i>	日本竹荚鱼 <i>Trachurus japonicus</i>	2	自测 sequenced in this study	
		南非竹荚鱼 <i>Trachurus capensis</i>	3	ANGBF7097-12 ANGBF7186-12 ANGBF7187-12	
		青背竹荚鱼 <i>Trachurus declivis</i>	3	FMVIC383-08 FMVIC829-08 FMVIC833-08	
		沙竹荚鱼 <i>Trachurus delagoa</i>	3	DSFSG489-11 DSLAGE1326-11 DSLAGE770-10	
		粗鳞竹荚鱼 <i>Trachurus lathami</i>	3	FARG460-08 FARG553-08 GBMIN124525-17	
		地中海竹荚鱼 <i>Trachurus mediterraneus</i>	3	BIM155-13 BIM283-13 BIM547-18	
		智利竹荚鱼 <i>Trachurus murphyi</i>	3	DSFSG941-13 FCHIL053-06 FCHIL172-06	
		新西兰竹荚鱼 <i>Trachurus novaezelandiae</i>	3	FOAC461-05 FOAK561-10 FOAK578-10	
		蓝竹荚鱼 <i>Trachurus picturatus</i>	3	BIM548-18 BIM550-18 BIM467-16	

(待续 to be continued)

(续表 1 Tab. 1 continued)

亚科 subfamily	属 genus	种 species	条数 number	序列号 accession no.
鲹亚科 Caranginae	竹荚鱼属 <i>Trachurus</i>	太平洋竹荚鱼 <i>Trachurus symmetricus</i>	3	AMS935-08 FMV191-08 UKFBJ117-08
		竹荚鱼 <i>Trachurus trachurus</i>	3	BIM036-13 BNSF027-11 BNSF028-11
		短线竹荚鱼 <i>Trachurus trecae</i>	2	IPMAF007-18 IPMAF008-18
	羽鳃鲹属 <i>Ulua</i>	短丝羽鳃鲹 <i>Ulua mentalis</i>	3	DBMF041-10 DBMF533-10 DBMF534-10
	尾甲鲹属 <i>Uraspis</i>	白舌尾甲鲹 <i>Uraspis helvola</i>	2	GBMIN124989-90 NNPF125-10
		棉口尾甲鲹 <i>Uraspis secunda</i>	3	FOAI767-09 FOAJ538-09 AMS919-08
		白口尾甲鲹 <i>Uraspis uraspis</i>	3	DBMF024-10 DBMF051-10 DBMF555-10
似鲹亚科 Scombrodinae	革鲹属 <i>Oligoplites</i>	跳革鲹 <i>Oligoplites saliens</i>	3	MFSP519-10 MFSP521-10 MFSP606-10
		革鲹 <i>Oligoplites saurus</i>	2	MFSP606-10 SMSA262-09
	拟鲳鲹属 <i>Parona</i>	拟鲳鲹 <i>Parona signata</i>	3	FARG062-06 FARG063-06 FARG064-06
	逆钩鲹属 <i>Scomberoides</i>	逆钩鲹 <i>Scomberoides lysan</i>	3	FOAM608-10 FTWS780-09 DBFN279-12
		横斑似鲹 <i>Scomberoides tala</i>	3	DBMF096-10 DBMF097-10 DBMF098-10
		革似鲹 <i>Scomberoides tol</i>	3	ANGEN180-15 DBMF102-10 DBMF101-10
	鲷亚科 Naucratinae	鲷属 <i>Seriola</i>	高体鲷 <i>Seriola dumerili</i>	3
马鲷 <i>Seriola hippos</i>			3	FOAC497-05 FOAC498-05 FOAC499-05
长鳍鲷 <i>Seriola rivoliana</i>			3	CFSAN118-11 DSFSG483-11 ANGBF10671-12
环带鲷 <i>Seriola zonata</i>			3	MFSP490-10 MFSP491-10 MFSP557-10
小甘鲹属 <i>Seriolina</i>		小甘鲹 <i>Seriolina nigrofasciata</i>	3	DBMF033-10 DBMF052-10 DBMF568-10
带鲹属 <i>Elagatis</i>		双带鲹 <i>Elagatis bipinnulata</i>	3	COFPL051-15 DBMF644-10 DBMF648-10
黑带鲹属 <i>Naucrates</i>		黑带鲹 <i>Naucrates ductor</i>	3	DSL830-10 FTWS554-09 SCS418-16

(待续 to be continued)

(续表 1 Tab. 1 continued)

亚科 subfamily	属 genus	种 species	条数 number	序列号 accession no.
鲷亚科 Trachinotinae	鲷属 <i>Trachinotus</i>	非洲鲷 <i>Trachinotus africanus</i>	3	FOAH845-08 FOAH846-08 TZMSC063-05
		阿訶鲷 <i>Trachinotus anak</i>	2	FOAC409-05 FOAC410-05
		斐氏鲷 <i>Trachinotus bailloni</i>	3	DBMF106-10 DBMF107-10 DBMF108-10
		布氏鲷 <i>Trachinotus blochii</i>	3	NNPF154-10 DBMF055-10 FOAM499-10
		大斑鲷 <i>Trachinotus botla</i>	3	TZMSA220-04 TZMSA300-04 TZMSC524-05
		北美鲷 <i>Trachinotus carolinus</i>	3	BCOLL391-08 MXV298-11 MXV299-11
		科氏鲷 <i>Trachinotus coppingeri</i>	3	FOAD511-05 FOAD512-05 FOAD514-05
		镰鳍鲷 <i>Trachinotus falcatus</i>	3	MFLE348-13 MLIII183-08 MLIII196-08
		穀氏鲷 <i>Trachinotus goode</i>	3	BZLWD654-09 MFSP141-09 MFSP143-09
		长鳍鲷 <i>Trachinotus goreensis</i>	3	BAFEN355-10 BAFEN356-10 BAFEN357-10
		穆克鲷 <i>Trachinotus mookalee</i>	3	GBMIN119993-17 GBMIN124842-17 GBMIN124843-17
		登鲷 <i>Trachinotus stilbe</i>	2	LIDMA1275-12 LIDMA836-11
	波线鲷属 <i>Lichia</i>	镰鳍波线鲷 <i>Lichia amia</i>	3	DNATR805-13 DSLAR113-08 DSLAR177-08

2 结果与分析

2.1 鲷科鱼类 DNA 条形码序列比对分析及其分子多态性

将本研究自测获得的 17 条 DNA 条形码序列在 GenBank 数据库进行 BLAST 比对, 结果显示 17 条序列与数据库中 7 个物种的序列相似性均超过 99%。其中, 6 个物种(印度丝鲷、克氏副叶鲷、高体若鲷、大甲鲷、黄带拟鲷及日本竹荚鱼)与形态学鉴定结果一致; 另外一个物种形态学鉴定为游鳍叶鲷(*Atule mate*), BLAST 比对结果显示该物种 DNA 条形码序列与吉打副叶鲷(*Alepes djedaba*)的相似度达到 99.14%。根据 FishBase (<https://www.fishbase.de/>)中两个物种的形态学特征描

述, 游鳍叶鲷和吉打副叶鲷的外观形态较为相似, 形态学鉴定有误的几率极高; 而 DNA 条形码的相似度分析结果判定该物种为吉打副叶鲷。经综合研判, 判定该物种为吉打副叶鲷。由此, 自测获得的 DNA 条形码序列实际为 6 属 7 种 17 条, 与 BOLD 数据库鲷科 24 属 88 种 256 条序列合并后得到鲷科鱼类 DNA 条形码序列为 25 属 95 种 273 条。

鲷科 4 亚科 25 属 95 种鱼类的 273 条 DNA 条形码序列, 去除两端引物序列保留共有序列 555 bp, 其碱基组成比例为: A 24.2%、G 17.5%、C 27.9%和 T 30.3%, A+T 含量(54.5%)明显高于 G+C 含量(45.4%)。鲷科鱼类 DNA 条形码序列的密码

子碱基组成表现出明显偏倚性,第三位密码子的 A+T 含量最多(60.9%),其次是第二位密码子(58.2%),第一位密码子的 A+T 含量最少(44.6%); G+C 含量最高的则是第一位密码子(55.3%),其次是第二位密码子(41.5%),而第三位密码子 G+C 含量最低(39.5%)(表 2)。序列全部位点中保守位点 329 个,变异位点 226 个,简约信息位点 217 个,单突变位点 9 个。

表 2 密码子第 1 位、第 2 位和第 3 位平均组成统计表
Tab. 2 Statistics of the average composition of the first, second and third codons

碱基 base	总频率 frequency	第 1 位 1st site of codon	第 2 位 2nd site of codon	第 3 位 3rd site of codon
A	24.2	27.6	14.2	30.9
G	17.5	29.6	13.5	9.5
C	27.9	25.7	28	30
T	30.3	17	44	30
A+T	54.5	44.6	58.2	60.9
G+C	45.4	55.3	41.5	39.5

2.2 鲈科鱼类遗传距离

利用 MEGA 6.0 软件基于 K2P 模型计算 25 属 95 种 273 条鲈科鱼类 DNA 条形码的遗传距离(表 3)。结果显示,95 种鲈科鱼类的种内遗传距离范围为 0~0.124,平均值为 0.008。其中 86 种(90.53%)的种内遗传距离为 0~0.02,低于 2%的种间遗传分化界限^[9];有 9 种(9.47%)的种内遗传距离为 0.021~0.124,超过 2%的种间遗传分化界限。例如:白舌若鲈(*Carangoides talamparoides*) 2 条序列(DBMF067-10、FMVIC728-08)的遗传距达到 0.124。经 BOLD 数据库信息溯源,发现白舌若鲈 2 个样本来源地距离相隔甚远,分别来自于马来西亚雪兰莪州附近的马六甲海峡(101.096°E, 3.503°N)和澳大利亚西部(118.853°E, 17.517°S),初步推测出现上述现象的可能原因有: (1) BOLD 数据库中白舌若鲈 DNA 条形码信息不准确,可能是物种鉴定有误所致; (2)白舌若鲈可能存在“异种同名”的现象; (3)该物种的两个个体来自不同地理群,二者之间经长期地理隔离发生的遗传分化已达到种的水平。

种间遗传距离范围为 0.002~0.271,平均值为 0.169。大多数物种种间遗传距离大于 2%,仅有部分物种出现种间遗传距离小于 2%的现象。例如:太平洋竹荚鱼(*Trachurus symmetricus*)和智利竹荚鱼(*Trachurus murphyi*)的种间遗传距离为 0.002,提示这两物种可能存在“同种异名”现象。学者们通常认为, BOLD 数据库中的 DNA 条形码信息准确率较高,并将其作为物种鉴定的标准 DNA 条形码^[10],但鲈科鱼类 DNA 条形码分析表明, BOLD 数据库中仍存在一定的人为鉴定错误或者数据上传信息不准确等情况。由此得到的重要启示是, BOLD 条形码数据库中某些物种信息的准确性尚需严格审核与校准。

属内种间遗传距离范围在 0.022~0.136,平均值为 0.090。其中,竹荚鱼属(*Trachurus*)下物种间遗传距离最小,月鲈属(*Selene*)下物种间遗传距离最大。属间遗传距离范围在 0.037~0.255,平均值为 0.186,副叶鲈属(*Alepes*)和波线鲈属(*Lichia*)间遗传距离最大,沟鲈属(*Atropus*)和羽鳃鲈属(*Ulua*)间遗传距离最小。

经上述分析计算,鲈科鱼类种间遗传距离平均值(0.169)是种内遗传距离平均值(0.008)的 21 倍,符合 Hebert 等^[11]提出的“10×规则”,即物种鉴定到种的最小标准是 COI 基因序列的种间遗传距离为种内遗传距离的 10 倍以上。同时, 25 个属间的遗传距离平均值为 0.186, 4 个亚科间的遗传距离平均值为 0.203 (表 3)。可见,随着分类单元等级的提高,遗传距离也相应升高。

表 3 不同分类单元遗传距离(K2P)统计表

Tab. 3 Statistical table of genetic distance (K2P)

比较范围 comparative scope	最大值 maximum	最小值 minimum	平均值 mean
亚科间 inter-subfamily	0.208	0.192	0.203
属间 inter-genus	0.255	0.037	0.186
属内种间 inter-species in genus	0.136	0.022	0.090
种间 inter-species	0.271	0.002	0.169
种内 within species	0.124	0	0.008

2.3 鲈科鱼类系统关系树

为全面分析鲈科鱼类 DNA 条形码分类系统,利用 MEGA 6.0 和 PAUP 4.0 软件对鲈科 4 亚科 25

属 95 种鱼类 DNA 条形码分别构建邻接法(NJ)和最大简约法(MP)系统树。NJ 树和 MP 树的聚类结果基本一致, 鲷亚科独自形成单系分支, 鲷亚科、鲷亚科和似鲷亚科 3 个亚科形成另外 3 个单系分支。虽然鲷亚科、鲷亚科和似鲷亚科均为单系, 但稍有区别的是, NJ 树中, 似鲷亚科与鲷亚科先聚为一支, 再与鲷亚科聚为一支; 而 MP 树中, 似鲷亚科与鲷亚科先聚为一支, 再与鲷亚科聚为一支。NJ 树与 MP 树的树形差异, 推测是两个软件基于不同模型和算法所致。

值得关注的是, 拟鲷(*Parona signata*)和镰鳍波线鲷(*Lichia amia*)两个物种的分子分类地位和系统关系与传统的形态学观点不一致。Smith-Vaniz^[12]和 Gushiken^[2]根据外部形态和解剖学特征, 均将拟鲷归到似鲷亚科, 镰鳍波线鲷归为鲷亚科。本研究的 DNA 条形码聚类分析结果显示, 拟鲷和镰鳍波线鲷亲缘关系较近, 二者始终聚为一支, 在 NJ 树中归入似鲷亚科, 而在 MP 树中则归入鲷亚科。为了进一步确认两个物种的分类地位, 本研究对鲷亚科、似鲷亚科和鲷亚科 26 个物种的 DNA 条形码序列利用 NJ 和 MP 两种方法单独重新构建系统发生树, 拟鲷和镰鳍波线鲷两个物种序列分别取 3 条, 黄带拟鲷作为外类群。NJ 和 MP 结果均显示拟鲷和镰鳍波线鲷聚为一个分支后一起被归为鲷亚科。由此可见, 在分子水平上, 拟鲷和镰鳍波线鲷亲缘关系较近, 均应被归为鲷亚科。

另外, 多数同属物种的聚类效果比较理想, 如竹荚鱼属(*Trachurus*) 12 个物种、鲷属(*trachinotus*) 12 个物种、鲷属(*Caranx*) 13 个物种以属为单位全部聚成各自的分支。吉打副叶鲷(*Alepes djedaba*) (本研究最初形态学鉴定为游鳍叶鲷)与克氏副叶鲷(*Alepes kleinii*)聚为一个分支, bootstrap 值达 99, 结合 BLAST 比对结果, 再次验证了该物种的 DNA 条形码鉴定结果的准确性。个别物种的系统关系与传统形态学分类地位稍有出入, 如高体若鲷(*Carangoides equula*)并没有与同属其他个体聚在一起, 而是同拟鲷属(*Pseudocaranx*)聚在一起。

3 讨论

鲷科鱼类广泛分布于全球暖温性海域, 极喜游动的特性使其具有高度发达的肌肉组织, 因而一度成为许多国家或者地区高端食材的来源, 特别在当前近海渔业资源日渐衰竭的大环境下, 鲷科鱼类成为开发大洋性洄游鱼类资源, 发展高产量、高价值鱼类资源生产养殖的首选对象, 具有重要的科学意义和经济价值。对鲷科鱼类的准确分类鉴定, 是研究鲷科鱼类生物多样性、开发优良种质资源和推行渔业资源可持续利用和发展的前提和基础。在传统形态学鉴定有限的情况下, DNA 条形码提供了一种高效、简易的分子分类学标准, 为鲷科鱼类的进化发展及遗传变异提供了分子水平上的证据。本研究获得的 17 条鲷科鱼类 DNA 条形码序列经比对分析为 7 个有效种, 其中有 6 个物种与形态学鉴定结果一致; 另外一个物种形态学鉴定为游鳍叶鲷, 而 DNA 条形码的 BLAST 比对结果和系统发生树均支持该物种为吉打副叶鲷。据 FishBase 资料显示, 这两个物种外观形态相似度较高, 如两物种背鳍均呈暗黄色, 鳍棘均有 9 根, 软条均为 22~25, 而臀鳍鳍条, 游鳍叶鲷为 18~21, 吉打副叶鲷为 18~20, 并且两个物种均在中国南海有分布, 二者形态相似且分布范围有重叠, 导致其形态学鉴别比较困难, 因此鉴定错误的几率较大。DNA 条形码可以弥补传统形态学鉴定方法的局限和不足, 为物种的准确鉴定提供可靠的分子证据。经综合研判, 本研究将该物种鉴定为吉打副叶鲷。

本研究对鲷科 25 属 95 个物种进行种内、种间遗传距离计算时发现, 有部分物种的种内遗传距离大于 2%, 这与 Hebert 提出的 2% 的种间划分界限相冲突。经过相关背景信息溯源, 根据样品的地理分布、曾用名情况等推断可能是形态学鉴定有误、物种存在“异种同名”或者该物种因地理隔离已发生分化等原因。种间遗传距离显示, 有部分物种种间遗传距离小于 2%, 这与 Hebert 理论再次发生冲突。经过曾用名信息溯源和系统关系综合分析, 结果表明部分物种疑似“同种异名”, 提示 BOLD 条形码数据库中确实存在部分数据信

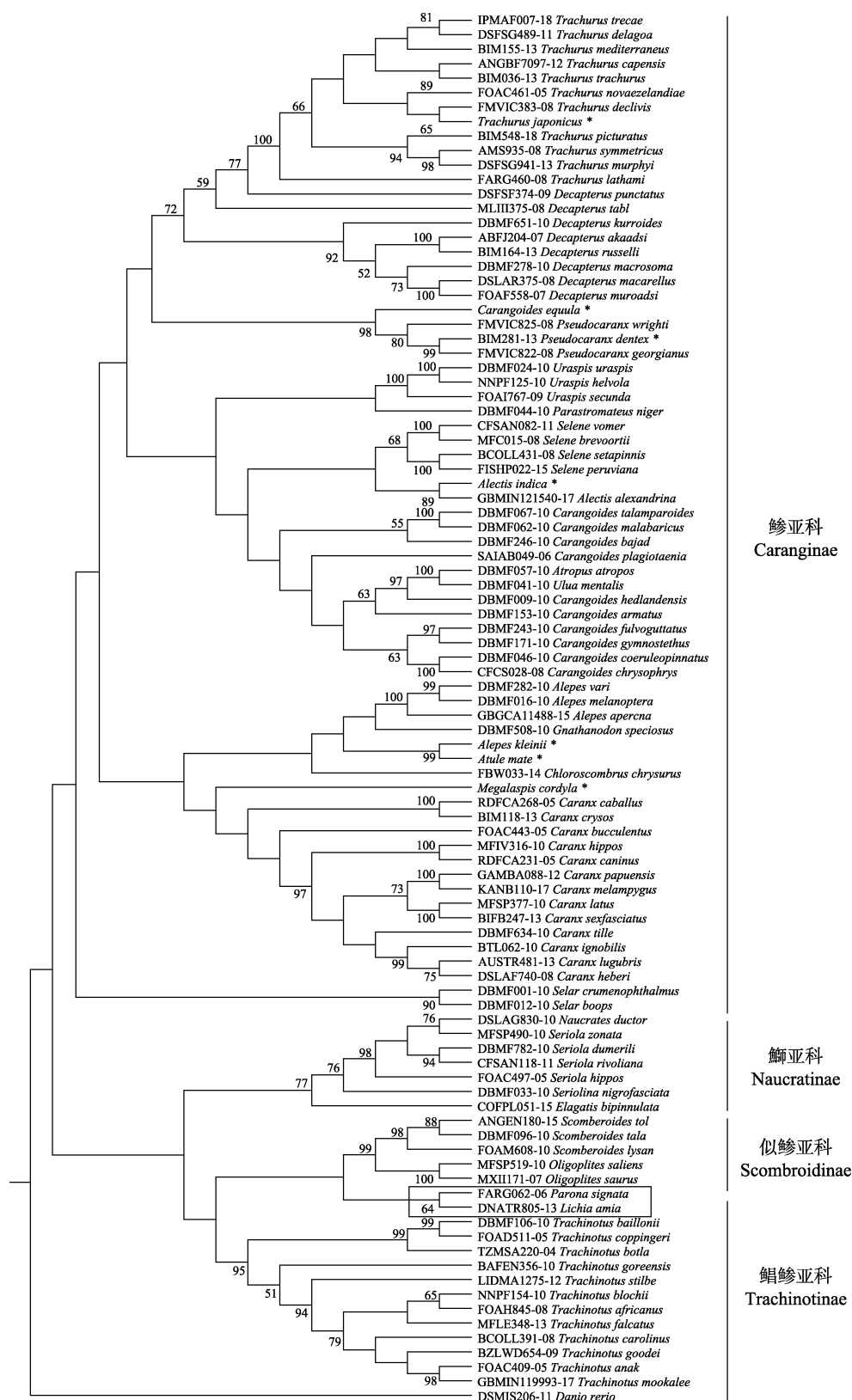


图 1 95 种鲭科鱼类 DNA 条形码 NJ 系统发生树

*表示本研究所测样品。方框内物种为与形态学观点不同的物种。

Fig. 1 Neighbor-joining phylogenetic tree of DNA barcodes for 95 species of Carangidae.

Marked with * are the samples determined in this study. The species in the box are those that are in dispute with the morphological.

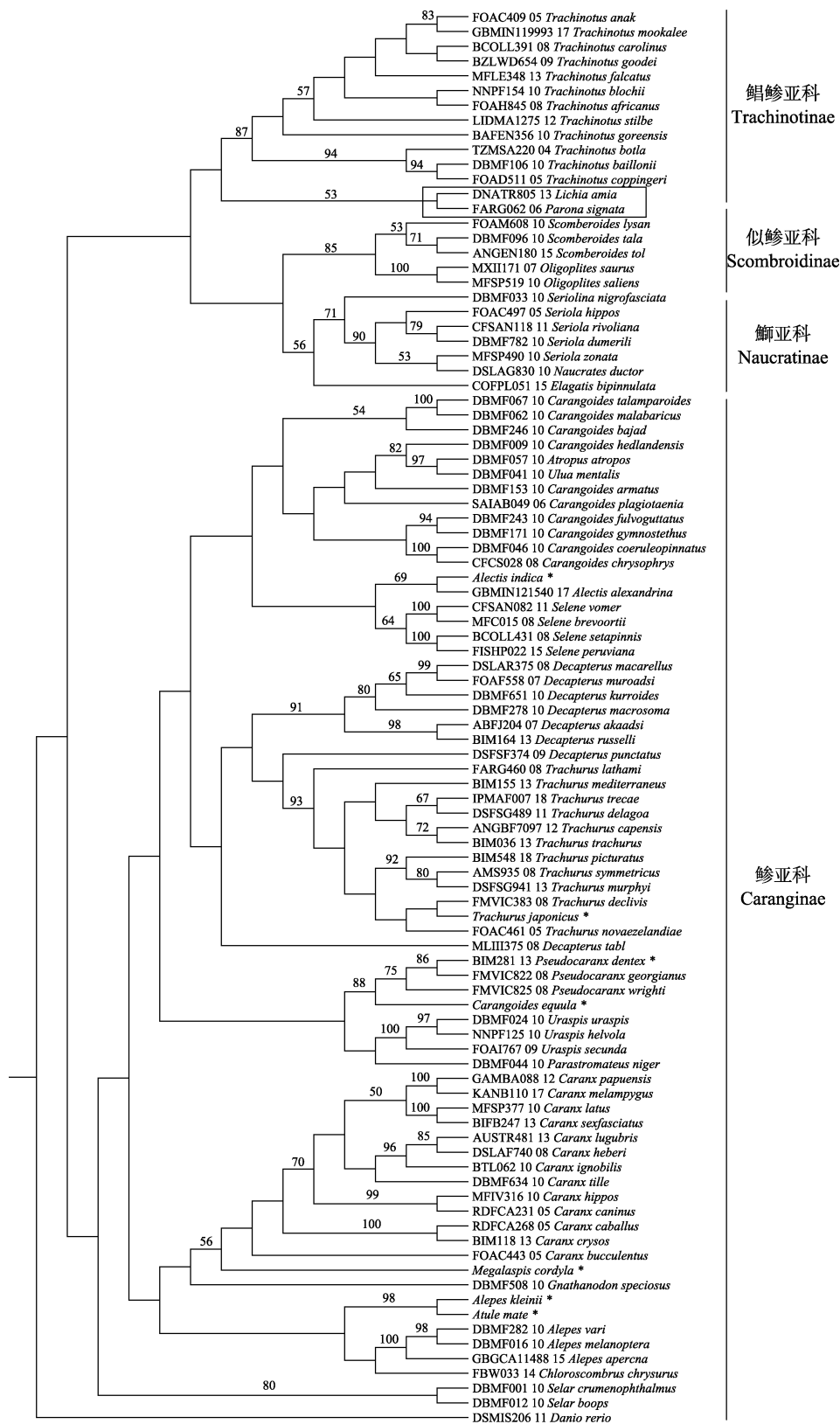


图 2 95 种鲭科鱼类 DNA 条形码 MP 系统发生树

*表示本研究所测样品。方框内物种为与形态学观点不同的物种。

Fig. 2 Maximum parsimony phylogenetic tree of DNA barcodes for 95 species of Carangidae

Marked with * are the samples determined in this study. The species in the box are those that are in dispute with the morphological.

息不准确的情况,导致以上分析结果与实际情况不符。因此,建议使用 BOLD 数据库信息时务必要设法评估信息的准确性,避免不准确的数据对后续研究和结果分析产生干扰和困惑。

本研究对近 70%的鲙科鱼类记录种进行了系统发育分析。系统发生树显示所有物种形成 4 个单系分支,即鲙亚科(Caranginae)、鲙鲙亚科(Trachinotinae)、鲙亚科(Naucratinae)和似鲙亚科(Scombrodinae) 4 个亚科均形成单系分支。两种树形均显示鲙亚科、鲙鲙亚科和似鲙亚科关系较近,聚在一起之后再同鲙亚科聚在一起,与 Jaafar 等^[6]利用 COI 基因通过邻接法(NJ)构建的部分鲙科鱼类系统发育关系相一致。而 Reed^[13]利用线粒体细胞色素 b (Cyt b)通过最大简约法(MP)、最大似然法(ML)以及 Bayesian 方法构建的部分鲙科鱼类系统发育关系表明,鲙亚科和鲙亚科先聚在一起,之后再与鲙鲙亚科聚在一起,最后似鲙亚科同前面三个亚科聚在一起。郑文娟等^[14]利用线粒体 16S rRNA 构建的部分鲙科鱼类线粒体系统发育结果也得出了同 Reed 相似的结论,表明根据不同基因得出的鲙科鱼类的 4 个亚科之间的亲缘关系存在一定差异。Gushiken 等^[2]认为拟鲙鲙和镰鳍波线鲙应分别属于似鲙亚科和鲙鲙亚科,然而本研究中这两个物种聚为一个分支,且在 2 个树形中两个物种被划分到两个不同的亚科,提示在分子水平上 2 个物种亲缘关系较近,之后对 2 个物种重建系统发生树结果更支持将拟鲙鲙和镰鳍波线鲙归为鲙鲙亚科,据此对 2 个物种的分类地位和系统关系提出了新的见解。

综上所述, DNA 条形码分类系统对于鲙科鱼类形态学分类鉴定结果的修正、“同种异名”和“异种同名”现象的澄清提供了有力的分子生物学证据,同时也为系统关系重建提供了必要的补充和修订,可为鲙科鱼类生物多样性保护、优良种质资源开发和渔业资源可持续利用及发展提供理论依据与技术支持。

参考文献:

- [1] Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan. Annual Statistics of Fishery and Aquaculture Production[R].

- Statistics Department. http://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/kaimen_gyosei/attach/pdf/index-7.pdf (in Japanese). 2017.
- [2] Gushiken S. Phylogenetic relationships of the perciform genera of the family Carangidae[J]. Ichthyological Research, 1988, 34(4): 444.
- [3] Meng Q W, Su J X, Liao X Z. Fish Taxonomy[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1995: 532-533. [孟庆闻, 苏锦祥, 缪学祖. 鱼类分类学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 532-533.]
- [4] Huang Z G. Marine Species and Their Distributions in China's Seas[M]. Beijing: China Ocean Press, 2008: 666-754. [黄宗国. 中国海洋生物种类与分布[M]. 北京: 海洋出版社, 2008: 666-754.]
- [5] Xu Z T, Wang H P, Gu H M, Cheng Y J. DNA Barcoding Carangids in Putuo Sea[J]. Journal of Zhejiang Ocean University: Natural Science, 2015, 34(2): 105-111. [许则滩, 王红萍, 顾寒梅, 陈永久. 普陀海域鲙科的 DNA 条形码研究[J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 2015, 34(2): 105-111.]
- [6] Jaafar T M, Taylor M I, Nor S M, et al. DNA barcoding reveals cryptic diversity within commercially exploited Indo-Malay Carangidae (Teleostei: Perciformes)[J]. PloS ONE, 2012, 7(11): 49623.
- [7] Chen D G, Zhang M Z. Marine Fish of China[M]. Qingdao: Ocean University of China Press, 2015: 1075-1112. [陈大刚, 张美昭. 中国海洋鱼类[M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2015: 1075-1112.]
- [8] 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: Biological Sciences, 2005, 360(1462): 1847-1857.
- [9] Hebert Paul D N, Cywinska Alina, Ball Shelley L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2003, 270(1512): 313-320.
- [10] Ratnasingham S, Hebert P D N. BOLD: The barcode of life data system (www.barcodinglife.org)[J]. Molecular Ecology Notes, 2007, 7(3): 355-364.
- [11] Hebert P, Ratnasingham S, Waard J D. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. Proceedings of the Royal Society B, 2003, 270: 96-99.
- [12] Smith-Vaniz W F. Carangidae: relationships[M]//Moser H G, Richards W J, Cohen D M, et al. Ontogeny and Systematics of Fishes. Amer Soc Ichthyol Herpetol: Special Publication, 1984: 522-533.
- [13] Reed D L, Carpenter K E, deGravelle M J. Molecular sys-

tematics of the Jacks (Perciformes: Carangidae) based on mitochondrial cytochrome b sequences using parsimony, likelihood, and Bayesian approaches[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2002, 23(3): 513-524.

[14] Zheng W J, Zhu S H, Zou J X, et al. Molecular phylogenetic

relationship of Carangidae based on partial sequence of mitochondrial 16S ribosomal RNA gene[J]. Journal of Fisheries of China, 2008, 32(6): 847-854. [郑文娟, 朱世华, 邹记兴, 等. 基于 16S rRNA 部分序列探讨 12 种鲹科鱼类的分子系统进化关系[J]. 水产学报, 2008, 32(6): 847-854.]

DNA barcode analysis: species identification and phylogenetic relationships of the Carangidae family

YANG Long^{1,2,3}, LI Ang^{2,3}, LI Busu^{2,3}, WANG Huan^{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: Species of the Carangidae family are important warm water and temperature marine economic fish. They are also a primary product of future deep-sea fishing and aquaculture development in China. However, as there are many species of Carangidae, and their related species are similar in morphology, traditional morphological identification methods have significant limitations. The accurate classification and identification of Carangidae species is a focus area of resource conservation and sustainable development and utilization. Therefore, research on the DNA barcoding of Trachinidae fish is scientifically significant and has economic value. To verify the applicability of DNA barcodes in the identification and classification of Carangidae, 17 sequences were collected from 7 species and 6 genera, and other valid sequences in Barcode of Life Data (BOLD) were screened. A total of 273 DNA barcode sequences of 95 species in 25 genera were obtained. Then the DNA barcode classification system for Carangidae was constructed by BLAST comparison, genetic distance calculation, and phylogenetic relationship analysis. Results indicated that: (1) The average genetic distance levels of three taxa, intergeneric, interspecific within genera, interspecific, and intraspecific of Carangidae were 0.186, 0.169, 0.090, and 0.008, respectively. The average genetic distance of the interspecific was 21 times that of the intraspecific. DNA barcoding is suitable for the classification and identification of Carangidae. (2) DNA barcode technology could identify species with incorrect morphological identifications, indicating that DNA barcodes can make up for the limitations of traditional morphological identification and accurately correct the morphological classification results of Carangidae. (3) DNA barcode analysis of Carangidae shows that there are still certain “homologous” and “heterologous” phenomena in BOLD. It is suggested that the information accuracy should be strictly evaluated when using the database information. (4) The phylogenetic analysis results of 95 species of Carangidae support the classification of *Parona signata* as Trachinotinae and provide new insights into the taxonomic status of this species. This study has enriched the DNA barcode database of Carangidae and provided molecular biological evidence for the species identification and systematic classification of Carangidae.

Key words: Carangidae; DNA barcode; classification and identification; phylogenetic relationship

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