

DOI: 10.12264/JFSC2022-0151

黄渤海虾虎鱼 DNA 条形码分类体系构建

李明晖^{1,2}, 安长廷¹, 李昂^{1,3}, 刘凯莹¹, 柳淑芳^{1,3}, 庄志猛¹

1. 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;
2. 中国农业科学院研究生院, 北京 100081;
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: 虾虎鱼(Gobiidae)是海洋底层食物链中的关键环节, 在生态系统的物质循环和能量流动中发挥重要作用。因虾虎鱼种类繁多、分布广泛、体型较小, 加之形态上存在不同程度的特化, 对形态学分类鉴定带来极大挑战。本研究对采自黄渤海的 73 尾虾虎鱼成鱼和幼鱼样本分别进行了形态学鉴定和 DNA 条形码分析, 依据形态学分类特征, 鉴定出 9 属 12 种; 而运用 DNA 条形码技术, 共鉴定出 13 种, 隶属于虾虎鱼科 10 属。可见, 在形态学鉴定经验不足或幼鱼形态学特征不明显的情况下, DNA 条形码可以有效地实现物种鉴定。同时, 系统整理了黄渤海虾虎鱼科记录种名录, 共计 29 属 47 种。依据物种名录, 从 BOLD 及 NCBI 数据库中筛选并下载了 18 属 29 种虾虎鱼科鱼类的 DNA 条形码, 与本研究鉴定出的 10 属 13 种虾虎鱼类合并分析, 构建了虾虎鱼科 26 属 42 种鱼类的系统关系树, 覆盖了黄渤海虾虎鱼科 89.36% 的记录种, 通过对虾虎鱼科鱼类的分子系统发育关系与形态学分类地位进行确认和修订, 初步建立了黄渤海虾虎鱼科 DNA 条形码分类体系。本研究结果证明了 DNA 条形码技术对虾虎鱼物种具有较高识别效率, 有效弥补了传统形态学鉴定方法的缺点和局限, 丰富了虾虎鱼 DNA 条形码数据库, 完善了虾虎鱼 DNA 条形码分类体系, 为虾虎鱼的保护生物学、进化生物学及生物地理学等研究提供了科学依据。

关键词: 虾虎鱼; DNA 条形码; 物种鉴定; 系统发育关系; DNA 条形码分类体系

中图分类号: S931

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2022)08–1179–10

虾虎鱼科(Gobiidae)是硬骨鱼类中最为丰富的类群之一, 在我国分布广泛^[1]。黄渤海地处温带, 虾虎鱼种类较东海和南海少, 但在不同文献记载中, 分布于黄渤海的虾虎鱼科鱼类组成和数目出入较大, 如张春霖在 20 世纪 50 年代完成的《黄渤海鱼类调查报告》^[2]中记载了 23 种; 伍汉霖和钟俊生在本世纪初出版的《中国动物志》(硬骨鱼纲 鲈形目五 虾虎鱼亚目)^[3]中记录了 34 种; 同一时期, 李晴^[4]通过在黄渤海区实地取样和对保存于中国科学院动物研究所的虾虎鱼标本进行重新鉴定和相关资料整理, 共得到 39 种虾虎鱼; 刘静^[5]则认为有 26 种虾虎鱼科鱼类分布于黄渤海。

在生态系统中, 虾虎鱼既是底栖生物的主要捕食者, 又是许多高营养级鱼类的饵料生物, 是底层食物链中的关键环节, 在生态系统物质循环和能量流动中起着重要的作用^[6]。近年来, 随着近海渔业资源衰退, 虾虎鱼的经济价值日渐凸显, 如斑尾刺虾虎鱼(*Acanthogobius ommaturus*)、矛尾虾虎鱼(*Chaeturichthys stigmatias*)等常以优势种身份出现在渤海渔业资源调查中^[7], 在地域性渔业中具有重要意义。其他小型虾虎鱼类虽然经济价值较小, 因极高繁殖力和较强适应性, 其生态价值也越来越受到人们的关注。

对虾虎鱼进行准确的分类鉴定是其保护生物

收稿日期: 2022-04-20; **修订日期:** 2022-04-26.

基金项目: 国家重点研发计划蓝色粮仓项目(2018YFD0900803); 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: 李明晖(1996–), 男, 硕士研究生, 研究方向为渔业资源分子生态学. E-mail: 598545891@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

学、进化生物学和生物地理学等研究的前提,具有重要的生物学和生态学意义。然而,传统形态学方法对虾虎鱼类的分类鉴定尚存在一定局限性:一则虾虎鱼种类繁多,有的虾虎鱼较少见,人们对其形态学分类和物种多样性认知有限;二来虾虎鱼形态存在不同程度的特化,给基于形态特征的物种间系统关系确认带来巨大挑战,致使在属级和科级水平的分类存在较大争议;三是虾虎鱼幼鱼形态学特征不明显,物种鉴定难度较大。上述原因给虾虎鱼物种分类鉴定带来了诸多困难。

DNA 条形码技术是一种利用较为短小的 DNA 片段鉴定生物物种身份信息的新分类学方法^[8],是对传统分类学方法的完善、发展和创新,目前已广泛应用于鱼类^[9-10]、鸟类^[11]、昆虫^[12-13]等动物分类鉴定工作中,成为物种鉴定的有力工具之一。本研究拟在形态学鉴定的基础上,运用 DNA 条形码技术,对黄渤海虾虎鱼科鱼类进行分类鉴定,旨在建立黄渤海虾虎鱼科 DNA 条形码分类体系,为虾虎鱼资源开发和养护提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究 73 尾虾虎鱼样品,于 2020–2021 年分别采自黄渤海潮间带(40 尾)和黄渤海资源调查(33 尾),其中成鱼 50 尾,幼鱼 23 尾。样品冷冻保存,运回实验室后,先依据形态学特征^[3,14]对样品进行初步的物种鉴定,随后取肌肉组织保存于 95%乙醇溶液,用于 DNA 条形码鉴定。

1.2 DNA 提取

使用天根生物科技有限公司的海洋生物组织基因组 DNA 提取试剂盒,提取 73 尾虾虎鱼肌肉组织的 DNA。

1.3 PCR 扩增及 DNA 测序

DNA 条形码扩增采用 Ward 等^[15]设计的鱼类通用引物,上下游引物序列分别为 Fish-F: 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3', Fish-R: 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3'。

PCR 反应体系:每 25 μ L 反应体系包括 2 \times Rapid Taq Master Mix 12.5 μ L,鱼类通用引物 F1/R1 各 1 μ L, DNA 模板 2 μ L,灭菌水 8.5 μ L。

PCR 反应条件:变性温度 95 $^{\circ}$ C,持续 3 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 56 $^{\circ}$ C 10 s, 72 $^{\circ}$ C 40 s,循环 35 次; 75 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

PCR 产物长度约为 680 bp,经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,合格扩增产物送至青岛华大基因完成双向测序。

1.4 虾虎鱼记录种名录整理及 DNA 条形码序列下载

依据张春霖^[2]的《黄渤海鱼类调查报告》、伍汉霖和钟俊生^[3]主编的《中国动物志》(硬骨鱼纲鲈形目五 虾虎鱼亚目)、李晴^[4]的《中国黄渤海区虾虎鱼类》和刘静等^[5]的《黄渤海鱼类图志》,系统整理出黄渤海虾虎鱼科记录种名录。

为了进一步验证 DNA 条形码分类结果的准确性、明确虾虎鱼科物种的系统关系、建立黄渤海虾虎鱼类 DNA 条形码分类体系,根据上述物种名录,另从 GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)和 BOLD 数据库(<https://v3.boldsystems.org/>)筛选出分布于黄渤海的 18 属 29 种虾虎鱼类的 DNA 条形码(表 1),其样本采集地多为黄渤海。将下载的 DNA 条形码与本研究自测获得的 73 条 DNA 条形码序列合并分析。同时,下载了方氏云鳎(*Pholis fangi*) DNA 条形码序列(ANGBF2243-12)作为外类群。

1.5 数据分析

使用 Lasergene7.0^[16]对测序的原始序列进行组装,组装完成的序列利用 MEGA7.0^[17]中 ClustalW 程序,对序列进行比对,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^[18]计算种间遗传距离(interspecific genetic distance)和种内遗传距离(intraspecific genetic distance)。利用邻接法(neighbour-joining, NJ)建立分子系统发育树,系统发育树分支的置信度利用 Bootstrap 检验,重复次数为 1000。

通过 BOLD 数据库(<http://www.boldsystems.org/index.php/databases>)及 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)对样品序列进行同步比对分析。

表 1 黄渤海虾虎鱼科记录种及其 DNA 条形码信息

Tab. 1 Recorded species and DNA barcoding information of Gobiidae family in the Yellow Sea and Bohai Sea

种名 species	分类地位 taxonomy	参考文献 references	DNA 条形码 DNA barcoding
长体刺虾虎鱼 <i>Acanthogobius elongata</i>		[3-5]	ANGBF2673-12
黄鳍刺虾虎鱼 <i>Acanthogobius flavimanus</i>		[2-5]	本研究 3 尾
乳色刺虾虎鱼 <i>Acanthogobius lactipes</i>	拟虾虎鱼亚科 刺虾虎鱼属 <i>Acanthogobius</i> of Gobionellinae	[2-5]	ANGBF2672-12
棕刺虾虎鱼 <i>Acanthogobius luridus</i>		[3-5]	ANGBF2611-12
斑尾刺虾虎鱼 <i>Acanthogobius ommaturus</i>		[2-5]	本研究 8 尾
六丝钝尾虾虎鱼 <i>Amblychaeturichthys hexanema</i>	拟虾虎鱼亚科 钝尾虾虎鱼属 <i>Amblychaeturichthys</i> of Gobionellinae	[2-5]	本研究 3 尾
七棘裸身虾虎鱼 <i>Gymnogobius heptacanthus</i>		[3, 4]	GBMIN122821-17
网纹裸身虾虎鱼 <i>Gymnogobius mororanus</i>		[2-5]	ANGBF2667-12
大颌裸身虾虎鱼 <i>Gymnogobius macrogathos</i>	拟虾虎鱼亚科 裸身虾虎鱼属 <i>Gymnogobius</i> of Gobionellinae	[3, 4]	ANGBF15102-19
栗色裸身虾虎鱼 <i>Gymnogobius castaneus</i>		[4]	ABFJ033-06
黄带裸身虾虎鱼 <i>Gymnogobius laevis</i>		[4]	MW049117
条尾裸身虾虎鱼 <i>Gymnogobius urotaenia</i>		[4]	ANGBF2666-12
矛尾虾虎鱼 <i>Chaeturichthys stigmatias</i>	拟虾虎鱼亚科 矛尾虾虎鱼属 <i>Chaeturichthys</i> of Gobionellinae	[2-5]	本研究 2 尾
大口裸头虾虎鱼 <i>Chaenogobius gulosus</i>	拟虾虎鱼亚科 裸头虾虎鱼属 <i>Chaenogobius</i> of Gobionellinae	[2-5]	本研究 2 尾
带虾虎鱼 <i>Eutaeniichthys gilli</i>	拟虾虎鱼亚科 带虾虎鱼属 <i>Eutaeniichthys</i> of Gobionellinae	[2-5]	无
五带高鳍虾虎鱼 <i>Pterogobius zacalles</i>	拟虾虎鱼亚科 高鳍虾虎鱼属 <i>Pterogobius</i> of Gobionellinae	[3-5]	ANGBF2597-12
蛇首高鳍虾虎鱼 <i>Pterogobius elapoides</i>		[3]	无
髯缟虾虎鱼 <i>Tridentiger barbatus</i>		[2-5]	本研究 3 尾
短棘缟虾虎鱼 <i>Tridentiger brevispinis</i>		[3-5]	ANGBF1627-12
纹缟虾虎鱼 <i>Tridentiger trigonocephalus</i>	拟虾虎鱼亚科 缟虾虎鱼属 <i>Tridentiger</i> of Gobionellinae	[2-5]	本研究 12 尾
双带缟虾虎鱼 <i>Tridentiger bifasciatus</i>		[3, 4]	本研究 15 尾
裸项缟虾虎鱼 <i>Tridentiger nudicervicus</i>		[3, 4]	ANGBF2592-12
暗缟虾虎鱼 <i>Tridentiger obscurus</i>		[2]	ANGBF2591-12
睛尾蝌蚪虾虎鱼 <i>Lophiogobius ocellicauda</i>	拟虾虎鱼亚科 蝌蚪虾虎鱼属 <i>Lophiogobius</i> of Gobionellinae	[2-5]	无
竿虾虎鱼 <i>Luciogobius guttatus</i>	拟虾虎鱼亚科 竿虾虎鱼属 <i>Luciogobius</i> of Gobionellinae	[2-5]	本研究 2 尾
阿部鲷虾虎鱼 <i>Mugilogobius abei</i>	拟虾虎鱼亚科 鲷虾虎鱼属 <i>Mugilogobius</i> of Gobionellinae	[2-4]	ANGBF2662-12
小鳞沟虾虎鱼 <i>Oxyurichthys microlepis</i>	拟虾虎鱼亚科 沟虾虎鱼属 <i>Oxyurichthys</i> of Gobionellinae	[4]	FOAI103-08
爪哇拟虾虎鱼 <i>Pseudogobius javanicus</i>	拟虾虎鱼亚科 拟虾虎鱼属 <i>Pseudogobius</i> of Gobionellinae	[4]	ANGBF15303-19
普氏细棘虾虎鱼 <i>Acentrogobius pflaumii</i>	虾虎鱼亚科 细棘虾虎鱼属 <i>Acentrogobius</i> of Gobiinae	[2-5]	ANGBF36065-19
裸项蜂巢虾虎鱼 <i>Favonigobius gymnauchen</i>	虾虎鱼亚科 蜂巢虾虎鱼属 <i>Favonigobius</i> of Gobiinae	[2-5]	本研究 6 尾
凯氏衔虾虎鱼 <i>Istigobius campbelli</i>	虾虎鱼亚科 衔虾虎鱼属 <i>Istigobius</i> of Gobiinae	[3, 4]	ANGBF2665-12
拟矛尾虾虎鱼 <i>Parachaeturichthys polynema</i>	虾虎鱼亚科 拟矛尾虾虎鱼属 <i>Parachaeturichthys</i> of Gobiinae	[3, 4]	ANGBF36379-19

(待续 to be continued)

(续表 1 Tab. 1 continued)

种名 species	分类地位 taxonomy	参考文献 references	DNA 条形码 DNA barcoding
舌虾虎鱼 <i>Glossogobius giuris</i>	虾虎鱼亚科 舌虾虎鱼属 <i>Glossogobius</i> of Gobiinae	[4]	ANGBF36247-19
斑纹舌虾虎鱼 <i>Glossogobius olivaceus</i>		[4]	GBMNA15236-19
长丝犁突虾虎鱼 <i>Myersina filifer</i>	虾虎鱼亚科 犁突虾虎鱼属 <i>Myersina</i> of Gobiinae	[2-5]	本研究 5 尾
马都拉叉牙虾虎鱼 <i>Apocryptodon madurensis</i>	背眼虾虎鱼亚科 叉牙虾虎鱼属 <i>Apocryptodon</i> of Oxudercinae	[2-5]	GBMNB7364-20
大弹涂鱼 <i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	背眼虾虎鱼亚科 大弹涂鱼属 <i>Boleophthalmus</i> of Oxudercinae	[2-5]	ANGBF2670-12
弹涂鱼 <i>Periophthalmus modestus</i>	背眼虾虎鱼亚科 弹涂鱼属 <i>Periophthalmus</i> of Oxudercinae	[2, 3, 5]	ANGBF2598-12
大鳍弹涂鱼 <i>Periophthalmus magnuspinnatus</i>		[3, 4]	ANGBF2659-12
青弹涂鱼 <i>Scartelaos histophorus</i>	背眼虾虎鱼亚科 青弹涂鱼属 <i>Scartelaos</i> of Oxudercinae	[4]	ANGBF50199-19
犬齿背眼虾虎鱼 <i>Oxuderces dentatus</i>	背眼虾虎鱼亚科 背眼虾虎鱼属 <i>Oxuderces</i> of Oxudercinae	[4]	GBMIN129802-17
中华栉孔虾虎鱼 <i>Ctenotrypauchen chinensis</i>	近盲虾虎鱼亚科 栉孔虾虎鱼属 <i>Ctenotrypauchen</i> of Amblyopinae	[2-5]	无
小头副孔虾虎鱼 <i>Paratrypauchen microcephalus</i>	近盲虾虎鱼亚科 副孔虾虎鱼属 <i>Paratrypauchen</i> of Amblyopinae	[3-5]	本研究 6 尾
拉氏狼牙虾虎鱼 <i>Odontamblyopus lacepedii</i>	近盲虾虎鱼亚科 狼牙虾虎鱼属 <i>Odontamblyopus</i> of Amblyopinae	[2-5]	本研究 6 尾
鳊形鳗虾虎鱼 <i>Taenioides anguillaris</i>	近盲虾虎鱼亚科 鳗虾虎鱼属 <i>Taenioides</i> of Amblyopinae	[4]	GBMNA15228-19
须鳗虾虎鱼 <i>Taenioides cirratus</i>		[4]	无
孔虾虎鱼 <i>Trypauchen vagina</i>	近盲虾虎鱼亚科 孔虾虎鱼属 <i>Trypauchen</i> of Amblyopinae	[4]	ANGBF15211-19

2 结果与分析

2.1 黄渤海虾虎鱼记录种名录

对《黄渤海鱼类调查报告》^[2]记载的黄渤海虾虎鱼科 18 属 23 种、《中国动物志》(硬骨鱼纲 鲈形目 五 虾虎鱼亚目)^[3]记录的虾虎鱼科 23 属 34 种、《中国黄渤海区虾虎鱼类》^[4]鉴定出的虾虎鱼科 27 属 39 种和《黄渤海鱼类图志》^[5]收录的虾虎鱼科 19 属 26 种进行系统梳理, 最终整理出黄渤海虾虎鱼科记录种共计 29 属 47 种(表 1), 获得完整的黄渤海虾虎鱼科记录种名录。

2.2 虾虎鱼样品形态学初步鉴定

依据虾虎鱼的典型形态学特征, 首先将 73 尾虾虎鱼样品中的 50 尾初步鉴定为 12 种虾虎鱼, 剩余 23 尾由于处于幼鱼阶段, 形态特征不明显, 无法鉴定到种。形态学特征分类信息详见表 2。

2.3 DNA 条形码物种鉴定

2.3.1 BLAST 相似性比对与 DNA 条形码序列特征

首先, 通过聚类分析将 73 条虾虎鱼 COI 序列聚为 13 组, 分别与 GenBank、BOLD 数据库进行比对分析, 结果显示 13 组序列均匹配到大于 99% 的同源 DNA 条形码序列。与形态学初步鉴定结果进行对照, 其中 12 组成鱼序列的 BLAST 比对分析结果与形态学鉴定结果一致(GP1-12); 无法根据形态学特征鉴定的 23 尾幼鱼样品, DNA 条形码序列比对结果分别是双带缟虾虎鱼(*T. bifasciatus*)(GP5)、纹缟虾虎鱼(*T. trigonocephalus*)(GP6)、拉氏狼牙虾虎鱼(*O. lacepedii*)(GP13)。

通过比对分析, 13 种虾虎鱼 73 条序列保留长度均为 609 bp, 平均碱基组成为: T: 30.0%, C: 26.6%, A: 24.3%, G: 19.1%, 其中 A+T 的含量 (54.3%) 明显高于 C+G 含量 (45.7%)。COI 基因密

表 2 虾虎鱼类形态学和 DNA 条形码分类鉴定结果
Tab. 2 Identification and classification of Gobiidae by morphology and DNA barcoding

组别 group	亚科名 subfamily	属名 genus	种名 species	数量 quantity	物种鉴定方法 species identification		
					形态学特征 morphology character	DNA 条形码 DNA barcoding	
GP1		刺虾虎鱼属 <i>Acanthogobius</i>	斑尾刺虾虎鱼 <i>A. ommaturus</i>	成鱼 8 尾 8 ind. adult	√	√	
GP2			黄鳍刺虾虎鱼 <i>A. flavimanus</i>	成鱼 3 尾 3 ind. adult	√	√	
GP3		钝尾虾虎鱼属 <i>Amblychaeturichthys</i>	六丝钝尾虾虎鱼 <i>A. hexanema</i>	成鱼 3 尾 3 ind. adult	√	√	
GP4		矛尾虾虎鱼属 <i>Chaeturichthys</i>	矛尾虾虎鱼 <i>C. stigmatias</i>	成鱼 2 尾 2 ind. adult	√	√	
GP5	拟虾虎鱼亚科 Gobionellinae		缟虾虎鱼属 <i>Tridentiger</i>	双带缟虾虎鱼 <i>T. bifasciatus</i>	成鱼 5 尾 5 ind. adult	√	√
					幼鱼 10 尾 10 ind. juvenile		√
GP6				纹缟虾虎鱼 <i>T. trigonocephalus</i>	成鱼 5 尾 5 ind. adult	√	√
					幼鱼 7 尾 7 ind. juvenile		√
GP7			髭缟虾虎鱼 <i>T. barbatus</i>	成鱼 3 尾 3 ind. adult	√	√	
GP8		裸头虾虎鱼属 <i>Chaenogobius</i>	大口裸头虾虎鱼 <i>C. gulosus</i>	成鱼 2 尾 2 ind. adult	√	√	
GP9		竿虾虎鱼属 <i>Luciogobius</i>	竿虾虎鱼 <i>L. guttatus</i>	成鱼 2 尾 2 ind. adult	√	√	
GP10	虾虎鱼亚科 Gobiinae	犁突虾虎鱼属 <i>Myersina</i>	长丝犁突虾虎鱼 <i>M. filifer</i>	成鱼 5 尾 5 ind. adult	√	√	
GP11		蜂巢虾虎鱼属 <i>Favonigobius</i>	裸项蜂巢虾虎鱼 <i>F. gymnauchen</i>	成鱼 6 尾 6 ind. adult	√	√	
GP12	近盲虾虎鱼亚科 Amblyopinae	副孔虾虎鱼属 <i>Paratrypauchen</i>	小头副孔虾虎鱼 <i>P. microcephalus</i>	成鱼 6 尾 6 ind. adult	√	√	
GP13		狼牙虾虎鱼属 <i>Odontamblyopus</i>	拉氏狼牙虾虎鱼 <i>O. lacepedii</i>	幼鱼 6 尾 6 ind. juvenile		√	

码子碱基组成特征表现为, 第一密码子的 G+C 含量最高(56.2%), 第二密码子的 A+T 含量最高(56.1%), 可见在碱基密码子在使用频率上具有一定的偏向性(表 3)。在 609 bp 的序列中, 共有 365 个保守位点, 变异位点 244 个, 其中简约信息位点 242 个, 单一信息位点 2 个, 无插入/缺失位点。

2.3.2 种间及种内遗传距离 根据 Kimura 2-parameter 模型计算得 13 种虾虎鱼种内及种间遗传距离(表 4)。13 种虾虎鱼的种内遗传距离为 0.001~0.009, 平均值为 0.003, 均低于 2%的种间遗传分化界限^[9]; 种间遗传距离为 0.149~0.282, 平均值为 0.216, 均高于 2%的种间遗传分化界限^[9]; 种间与

表 3 13 种虾虎鱼 COI 基因中碱基使用频率
Tab. 3 Bases usage frequency in COI gene of 13 Gobiidae

碱基 base	总频率 frequency	密码子第 1 位碱基 1st site of codon	密码子第 2 位碱基 2nd site of codon	密码子第 3 位碱基 3rd site of codon
T	30.0	17.1	41.8	31.2
C	26.6	24.9	29.0	25.9
A	24.3	26.7	14.3	31.9
G	19.1	31.3	14.9	11.0
A+T	54.3	43.8	56.1	63.1
G+C	45.7	56.2	43.9	36.9

表 4 13 种虾虎鱼种内遗传距离(对角线)种间遗传距离(对角线下)比较
Tab. 4 Comparison of intraspecific genetic distance (diagonal) and interspecific genetic distance (below diagonal) of 13 species of Gobiidae

组号 number	GP1	GP2	GP3	GP4	GP5	GP6	GP7	GP8	GP9	GP10	GP11	GP12	GP13
GP1	0.001												
GP2	0.226	0.002											
GP3	0.238	0.177	0.005										
GP4	0.253	0.280	0.251	0.008									
GP5	0.231	0.241	0.241	0.248	0.001								
GP6	0.240	0.234	0.228	0.245	0.117	0.004							
GP7	0.230	0.230	0.245	0.228	0.239	0.238	0.007						
GP8	0.223	0.264	0.228	0.249	0.258	0.251	0.264	0.001					
GP9	0.237	0.252	0.245	0.201	0.240	0.235	0.223	0.168	0.003				
GP10	0.149	0.243	0.235	0.227	0.235	0.258	0.234	0.240	0.219	0.001			
GP11	0.247	0.255	0.261	0.197	0.247	0.232	0.261	0.282	0.241	0.227	0.001		
GP12	0.215	0.243	0.238	0.263	0.226	0.230	0.218	0.268	0.227	0.242	0.283	0.003	
GP13	0.214	0.165	0.194	0.254	0.234	0.189	0.222	0.226	0.213	0.224	0.230	0.242	0.009

种内遗传距离的比值符合 Hebert 提出的物种鉴定“10×法则”标准^[9-10,12], 据此判定为 13 个有效种。

2.4 虾虎鱼系统发育关系分析

为进一步验证鉴定结果的准确性和可靠性, 建立虾虎鱼科鱼类的 DNA 条形码分类体系, 将本研究自测的虾虎鱼科 10 属 13 种 73 条虾虎鱼 DNA 条形码, 与 BOLD 数据库下载的 18 属 29 种虾虎鱼 DNA 条形码合并分析, 构建了虾虎鱼科 26 属 42 种的邻接法分子系统树(图 1), 包括虾虎鱼亚科(Gobiinae) 6 属 7 种, 拟虾虎鱼亚科(Gobionellinae) 11 属 25 种, 背眼虾虎鱼亚科(Oxudercinae) 5 属 6 种, 近盲虾虎鱼亚科(Amblyopinae) 4 属 4 种。

系统发育树中, 亚科水平上, 虾虎鱼亚科(Gobiinae)、拟虾虎鱼亚科(Gobionellinae)、近盲虾虎鱼亚科(Amblyopinae)、背眼虾虎鱼亚科(Oxudercinae)的聚类并不明显, 均未单独聚为一支; 属的水平上, 除裸身虾虎鱼属(*Gymnogobius*)外, 其他属均能独立聚为一支; 在种的水平上, 42 种虾虎鱼的 DNA 条形码序列均能单独聚为一支。

3 讨论

虾虎鱼因种类繁多、形态特征特化及多样化的生活史和生态特征, 给传统形态学分类鉴定带来巨大挑战。DNA 条形码作为一种高效、简易的鉴定方法, 为物种分类鉴定提供了新的强有力证

据。本研究采集的 73 条虾虎鱼经形态鉴定和 DNA 条形码序列比对分析, 最终鉴定为 13 个有效种, 其中 12 种成鱼的 DNA 条形码与形态鉴定结果一致, 另外 23 尾幼鱼仅能利用 DNA 条形码确定其种类, 鉴定结果为纹缟虾虎鱼(*T. trigonocephalus*)、双带缟虾虎鱼(*T. bifasciatus*)和拉氏狼牙虾虎鱼(*O. lacepedii*)。虾虎鱼幼鱼阶段的样本, 其典型形态学鉴定特征不甚明显, 难以运用形态学方法实现物种鉴定, 而通过 DNA 条形码则可以对其准确鉴定, 这充分体现了 DNA 条形码在幼鱼鉴定过程中的优势, 因此这项技术在虾虎鱼类仔稚鱼的分类中具有较好的应用前景。

DNA 条形码为虾虎鱼有效种名的确认提供了有力的分子证据。比如, 纹缟虾虎鱼(*T. trigonocephalus*)与双带缟虾虎鱼(*T. bifasciatus*)形态学特征较为相似, 甚至早期曾有学者把双带缟虾虎鱼(*T. bifasciatus*)作为纹缟虾虎鱼(*T. trigonocephalus*)的同物异名^[2]。本研究运用 DNA 条形码分析发现, 双带缟虾虎鱼(*T. bifasciatus*)、纹缟虾虎鱼(*T. trigonocephalus*)的种内遗传距离分别为 0.005 和 0.002, 种间遗传距离为 0.177, 种间与种内遗传距离比值符合 Hebert 提出的物种鉴定“10×法则”标准, 表明纹缟虾虎鱼(*T. trigonocephalus*)与双带缟虾虎鱼(*T. bifasciatus*)为两个有效种。同时, 本研究还确认了拉氏狼牙虾虎鱼(*O. lacepedii*)为黄渤海有效记录种。在早期的分类资料中, 分类

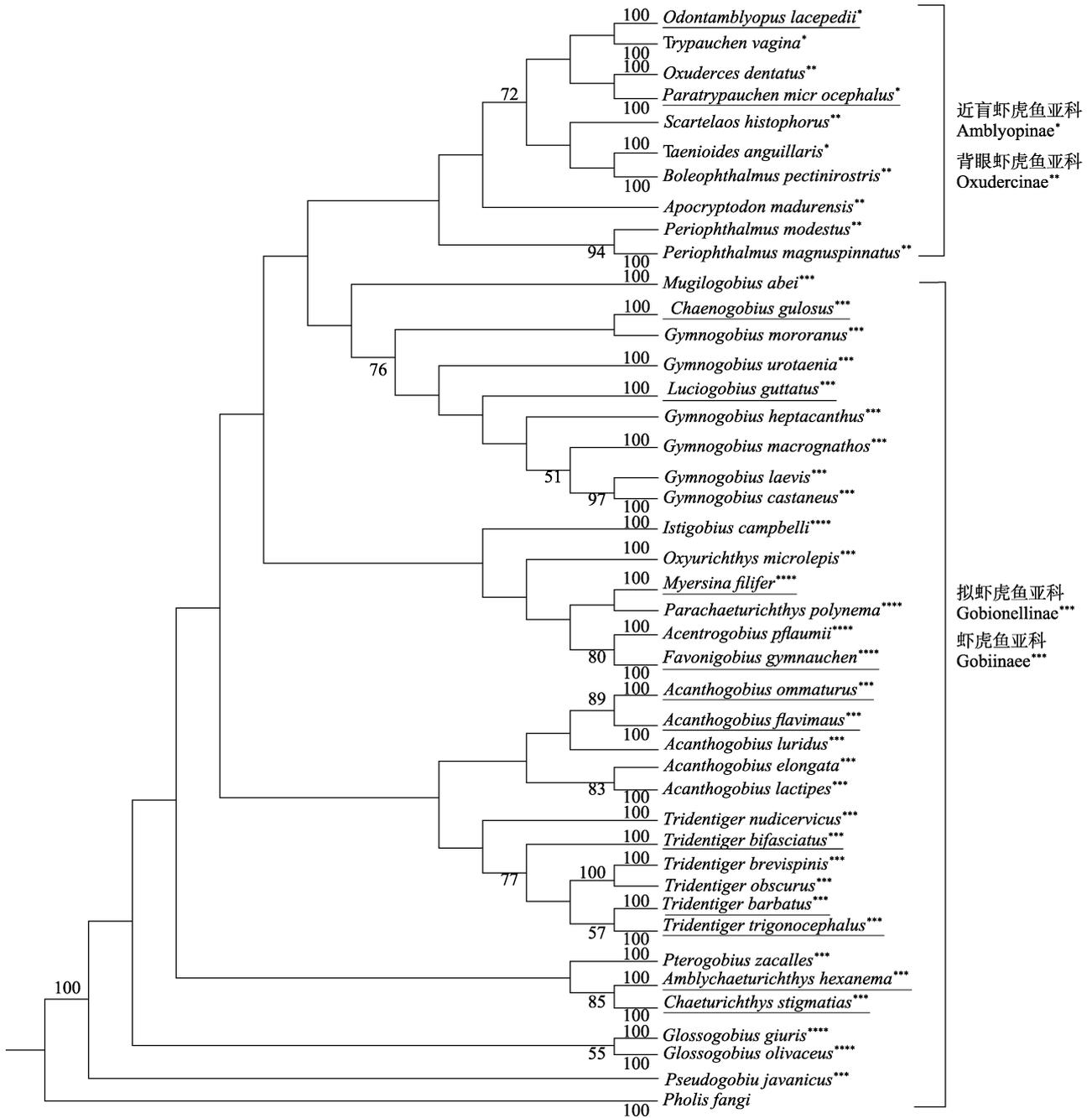


图 1 42 种虾虎鱼 DNA 条形码邻接关系法分子系统树

下划线标注为自测样本, *标注为近盲虾虎鱼亚科鱼类, **标注为背眼虾虎鱼亚科鱼类, ***标注为拟虾虎鱼亚科鱼类, ****标注为虾虎鱼亚科鱼类, *Pholis fangi* 为外类群.

Fig. 1 Neighbor-joining phylogenetic tree of DNA barcodes for 42 species of Gobiidae
Marked with underline are the samples determined in this study; Marked with * are the samples of Amblyopinae;
Marked with ** are the samples of Oxudercinae; Marked with *** are the samples of Gobionellinae;
Marked with **** are the samples of Gobiinae; *Pholis fangi* is the outgroup.

学家朱元鼎^[19]曾将分布于中国的该物种鉴定为红狼牙虾虎鱼(*O. rubicundus*)。但伍汉霖^[3]在《中国动物志》(硬骨鱼纲 鲈形目五 虾虎鱼亚目)中明确指出,“红狼牙虾虎鱼(*O. rubicundus*)的模式

产地为印度恒河, 仅存在于印度东部沿海, 与来自中国的样本在背鳍、臀鳍、尾椎等主要鉴别特征上存在明显的差异, 产自中国的“红狼牙虾虎鱼(*O. rubicundus*)”实为拉氏狼牙虾虎鱼(*O. lace-*

pedii)”。拉氏狼牙虾虎鱼(*O. lacepedii*)模式种采自日本,仅分布于朝鲜半岛、日本以及中国沿海^[3]。本研究在黄海中部采到 6 尾狼牙虾虎鱼(*Odontamblyopus* sp.)幼鱼,经 DNA 条形码比对分析,发现其与 BOLD 数据库中收录的分别标注为红狼牙虾虎鱼(*O. rubicundus*)和拉氏狼牙虾虎鱼(*O. lacepedii*)的序列相似度均较高(均>99%)。为了进一步明确该物种的鉴定结果,本研究从 BOLD 数据库筛选出采自中国和印度的红狼牙虾虎鱼(*O. rubicundus*)及采自中国的拉氏狼牙虾虎鱼(*O. lacepedii*)DNA 条形码序列,通过聚类分析和遗传距离计算,发现本研究自测序列与数据库中采自我国的红狼牙虾虎鱼(*O. rubicundus*)和拉氏狼牙虾虎鱼(*O. lacepedii*)在系统树中聚为一支(A 分支),且遗传距离仅为 0.009;而印度的红狼牙虾虎鱼(*O. rubicundus*)序列单独一个支(B 分支),遗传距离为 0.007;A 与 B 两个分支的遗传距离为 0.146(图 2)。综合 DNA 条形码分析结果与伍汉霖的观点^[3],判断图 2 中 B 分支的印度样品为的红狼牙虾虎鱼(*O. rubicundus*),A 分支的中国样品则

为拉氏狼牙虾虎鱼(*O. lacepedii*)。另外,裸身虾虎鱼属中的黄带裸身虾虎鱼(*G. laevis*)与条尾裸身虾虎鱼(*G. urotaenia*)两个物种的有效性尚存在一定争议,国外学者^[20]和 WoRMS (<https://www.marinespecies.org/>)认为黄带裸身虾虎鱼(*G. laevis*)是条尾裸身虾虎鱼(*G. urotaenia*)的同种异名;但伍汉霖等^[3]认为根据背鳍、头部感觉管孔、吻部及体侧有无黑斑,二者存在明显差异,认为两者均为有效种。本研究通过 DNA 条形码分析,二者遗传距离大于 0.02,且系统发育树二者也未聚为一支,因此,支持黄带裸身虾虎鱼(*G. laevis*)与条尾裸身虾虎鱼(*G. urotaenia*)均为有效种的观点。

本研究构建了黄渤海虾虎鱼科 4 亚科 26 属 42 种鱼类的 NJ 系统发育树。从拓扑结构可见,4 个亚科并未各自聚成独立的分支。究其原因,其一,DNA 条形码适合于鱼类的物种鉴定,但在较高级分类阶元的系统发育关系方面缺少明显优势;其二,传统的虾虎鱼系统关系判别依据主要是典型的形态特征,而 DNA 条形码分子标记尚不能反映出这种表型差异,二者在系统发育关系的构建

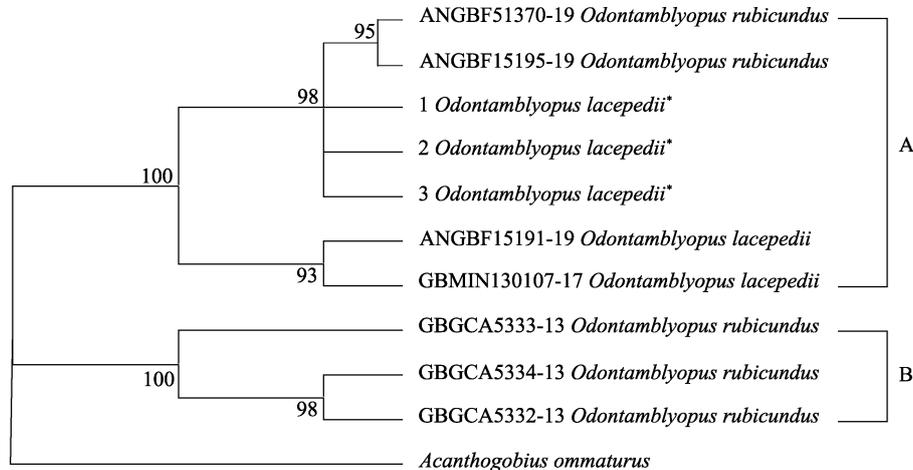


图 2 拉氏狼牙虾虎鱼与红狼牙虾虎鱼聚类分析

*表示本研究自测序列; GBMIN130107-17 (采自中国山东青岛)及 ANGBF15191-19 (采自中国广东广州)为 BOLD 数据库下载拉氏狼牙虾虎鱼 DNA 条形码序列; ANGBF51370-19 (采自中国福建厦门)、ANGBF15195-19(采自中国福建厦门)和 GBGCA5332-13(采自印度)、GBGCA5333-13(采自印度)、GBGCA5334-13(采自印度)为 BOLD 数据库下载的红狼牙虾虎鱼 DNA 条形码序列; 斑尾刺虾虎鱼为外类群。

Fig. 2 Clustal analysis of *Odontamblyopus lacepedii* and *Odontamblyopus rubicundus*
Marked with * are the samples determined in this study; GBMIN130107-17 (from Qingdao, China) and ANGBF15191-19 (from Guangzhou, China) are the DNA barcodes of *Odontamblyopus lacepedii* download by BOLD database; ANGBF51370-19 (from Xiamen, China), ANGBF15195-19 (from Xiamen, China), GBGCA5332-13 (from India), GBGCA5333-133 (from India), GBGCA5334-133 (from India) are the DNA barcodes of *Odontamblyopus rubicundus* download by BOLD database; *Acanthogobius ommaturus* is the outgroup.

中均表现出不同程度的局限性,甚至两种方法构建系统发育树会出现较大偏差;加之,虾虎鱼形态特征的特化,致使其科级、亚科级的分类尚未达成共识^[21]。因此,本研究暂不考虑虾虎鱼亚科级的系统关系。属的水平上,黄渤海虾虎鱼科的 26 属中,除了裸身虾虎鱼属(*Gymnogobius*),具有多个种类的属大多能独立聚为一支。在种的水平上,42 种虾虎鱼的 DNA 条形码序列均能单独聚为一支。由此可见,42 种虾虎鱼分子系统树再次验证了 DNA 条形码对虾虎鱼物种鉴定和有效种确认的准确性。本研究构建的虾虎鱼科 DNA 条形码分类体系包括 26 属 42 种,覆盖了 89.36% 黄渤海虾虎鱼科记录种(47 种),为黄渤海虾虎鱼多样性研究和保护、资源开发和利用提供基础数据,同时也为虾虎鱼的适应性进化和生物地理学研究提供了科学依据。

本研究尚存在一定的不足,在对黄渤海虾虎鱼科记录种名录的整理过程中发现,李晴的《中国黄渤海区虾虎鱼类》^[4]中记录的黄渤海虾虎鱼种类最多,其样品获取途径有两种:一是在黄渤海区实地取样;二是对保存于中国科学院动物研究所的虾虎鱼标本进行重新鉴定和相关资料整理,因大量标本固定时间多在 1930 年至 1980 年之间,标本较陈旧且标本采集地等记录可能模糊,导致其信息准确性存疑。例如:在《中国动物志》(硬骨鱼纲 鲈形目五 虾虎鱼亚目)^[3]中,舌虾虎鱼属舌虾虎鱼(*G. giuris*)、斑纹舌虾虎鱼(*G. olivaceus*)被认为仅分布在东海及南海;裸身虾虎鱼属黄带裸身虾虎鱼(*G. laevis*)、条尾裸身虾虎鱼(*G. urotaenia*)等物种只出现在淡水水域,但这些种类却被李晴^[4]记录为分布于黄渤海,且这些种类在近年的黄渤海调查中均未出现。然而基于目前所掌握的资料,本研究尚无法判断这些种类在早期黄渤海海域调查中是否存在。本研究本着不遗漏物种的原则将这几类虾虎鱼暂纳入黄渤海记录种名录,但其客观性尚有待后续研究逐一进行判别与探讨。

参考文献:

- [1] Wu H L, Zhong J S. Key to Marine and Estuarial Fishes of China[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2021: 1034-1127. [伍汉霖, 钟俊生. 中国海洋及河口鱼类系统检索[M]. 北

京: 中国农业出版社, 2021: 1034-1127]

- [2] Zhang C L. Investigation Report on Fish in the Yellow Sea and Bohai Sea[M]. Beijing: Science Press, 1955: 197-231. [张春霖. 黄渤海鱼类调查报告[M]. 北京: 科学出版社, 1955: 197-231.]
- [3] Wu H L, Zhong J S. Fauna of China Osteichthyes: Perciformes (V) Gobioidae[M]. Beijing: Science Press, 2008: 196-753. [伍汉霖, 钟俊生. 中国动物志 硬骨鱼纲: 鲈形目(五)虾虎鱼亚目[M]. 北京: 科学出版社, 2008: 196-753.]
- [4] Li Q. Gobioidae fishes on Chinese Yellow Sea and Bohai Sea area[D]. Nanchang: Nanchang University, 2008. [李晴. 中国黄渤海区虾虎鱼类[D]. 南昌: 南昌大学, 2008.]
- [5] Liu J, Chen Y L, Ma L. Fish of Bohai Sea and Yellow Sea[M]. Beijing: Science Press, 2015:225-250. [刘静, 陈咏霞, 马琳. 黄渤海鱼类图志[M]. 北京: 科学出版社, 2015: 225-250.]
- [6] Han D Y, Xue Y, Ji Y P, et al. Trophic and spatial niche of five gobiid fishes in Jiaozhou Bay[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2013, 20(1): 148-156. [韩东燕, 薛莹, 纪毓鹏, 等. 胶州湾 5 种虾虎鱼类的营养和空间生态位[J]. 中国水产科学, 2013, 20(1): 148-156.]
- [7] Li Z Y, Wu Q, Shan X J, et al. Keystone species of fish community structure in the Bohai Sea[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2018, 25(2): 229-236. [李忠义, 吴强, 单秀娟, 等. 渤海鱼类群落结构关键种[J]. 中国水产科学, 2018, 25(2): 229-236.]
- [8] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings Biological Sciences, 2003, 270(1512): 313-321.
- [9] Hebert P D N, Ratnasingham S, DeWaard J R. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. Proceedings Biological Sciences, 2003, 270(Suppl 1): S96-S99.
- [10] Jiang L X, Zhang J C, Fan G Z, et al. DNA barcoding and molecular systematics of notothenioidae[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2021, 28(11): 1396-1405. [姜郇轩, 张吉昌, 樊钢洲, 等. 南极鱼亚目鱼类 DNA 条形码及分子系统学[J]. 中国水产科学, 2021, 28(11): 1396-1405.]
- [11] Hebert P D N, Stoeckle M Y, Zemlak T S, et al. Identification of birds through DNA barcodes[J]. PLoS Biology, 2004, 2(10): e312.
- [12] Hajibabaei M, Janzen D H, Burns J M, et al. DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(4): 968-971.
- [13] Hebert P D N, Penton E H, Burns J M, et al. Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(41): 14812-14817.
- [14] Chen D G, Zhang M Z. Marine Fishes of China[M]. Qingdao: China Ocean University Press, 2016: 1696-1831. [陈大刚, 张美昭. 中国海洋鱼类[M]. 青岛: 中国海洋大学出版社,

- 2016: 1696-1831.]
- [15] Ward R D, Zemlak T S, Innes B H, et al. DNA barcoding Australia fish species[J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B, Biological Sciences*, 2005, 360(1462): 1847-1857.
- [16] Swindell S R, Plasterer T N. SEQMAN. Contig assembly[J]. *Methods in Molecular Biology*, 1997, 70(70): 75.
- [17] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [18] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences[J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16(2): 111-120.
- [19] Zhu Y D. Fishes of the East China Sea[M]. Beijing: Science Press, 1963: 412-450. [朱元鼎. 东海鱼类志[M]. 北京: 科学出版社, 1963: 412-450.]
- [20] Stevenson D E. Systematics and distribution of fishes of the Asian goby genera *Chaenogobius* and *Gymnogobius* (Osteichthyes: Perciformes: Gobiidae), with the description of a new species[J]. *Species Diversity*, 2002, 7(3): 251-312.
- [21] Thacker C E. Molecular phylogeny of the gobioid fishes (teleostei: Perciformes: Gobioidei)[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2003, 26(3): 354-368.

DNA barcodes enable higher taxonomic assignments in goby in the Bohai Sea and Yellow Sea of China

LI Minghui^{1,2}, AN Changting¹, LI Ang^{1,3}, LIU Kaiying¹, LIU Shufang^{1,3}, ZHUANG Zhimeng¹

1. 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;
2. Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;
3. Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Qingdao National Laboratory for Marine Science and Technology, Qingdao 266071, China

Abstract: The goby is a key link in the food chain at the bottom of the ocean and plays an important role in the material circulation and energy flow of the ecosystem. Due to the large variety, extensive distribution, and small size of the goby, as well as different degrees of degradation and specialization in morphology, it presents great challenges to morphological classification and identification. In this study, 73 adult and juvenile goby samples from the Yellow Sea and Bohai Sea were identified by morphology and DNA barcoding. According to the morphological classification, 12 species of 9 genera were identified, while 13 species were identified belonging to 10 genera of family Gobiidae. Thus, in the case of insufficient experience in morphological identification or unclear morphological characteristics of juvenile fish, DNA barcoding can effectively identify species. At the same time, the list of recorded species of family Gobiidae in the Bohai Sea and Yellow Sea of China was systematically sorted out, with a total of 47 species of 29 genera. According to the recorded species list, the DNA barcodes of 29 species of 18 genera belonging to the family Gobiidae were screened and downloaded from the BOLD and NCBI databases. Combined with the 13 species of 10 genera of gobies identified in this study, a phylogenetic tree of 42 species of 26 genera was constructed, covering 89.36% of the recorded species of gobies in the Bohai Sea and Yellow Sea of China. The DNA barcode classification system of gobies was established by confirming and revising the molecular phylogenetic relationship and morphological classification status of gobies. The results of this study demonstrate the recognition efficiency of DNA barcoding in the classification of the gobies, make up for the shortcomings and limitations of traditional morphological identification methods, enrich the goby DNA barcode database, improve the goby DNA barcoding classification system, and provide a scientific basis for research on the conservation biology, evolutionary biology, and biogeography of goby fish.

Key words: gobies; DNA barcoding; species identification; molecular phylogenetic relationships; DNA barcode classification system

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