

DOI: 10.12264/JFSC2022-0168

三种养殖石首鱼类的 DNA 条形码鉴定及有效种名确认

李昂^{1,2}, 柳淑芳^{1,2}, 安长廷¹, 万瑞景¹, 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. 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: 针对部分养殖石首鱼种质资源存在命名混乱、物种鉴定不准确的问题, 本研究在形态学观察与测量的基础上, 利用 DNA 条形码技术对 3 种养殖石首鱼类进行了物种鉴定。测序获取待测样品 DNA 条形码序列 15 条, 在 GenBank 中对序列进行相似性比对分析, 同时在中国重要渔业生物 DNA 条形码信息平台验证了比对结果的准确性; 结合已报道的 18 条石首鱼类 DNA 条形码序列对全部样品进行分析, 运用 Kimura 2-paramater (K2P) 模型构建其系统进化关系, 进一步确定待测样品的种类及分类地位。研究结果将 3 种养殖石首鱼分别定种为黄唇鱼 [*Bahaba taipingensis* (Herre, 1932)]、元鼎黄姑鱼 [*Nibea chui* Trewavas, 1971] 和双棘原黄姑鱼 [*Protonibea diacanthus* (Lacepède, 1802)], 厘清了 3 个物种的有效种名及分类特征, 证实了石首鱼外部形态、鳃、耳石的典型特征可作为其物种鉴定的重要证据, 对 DNA 条形码物种鉴定具有辅助作用, 表明 DNA 条形码技术可解决石首鱼类幼鱼由于形态特征尚不明显等问题造成的定种困难。研究结果为国家一级保护野生动物黄唇鱼的繁殖驯养报备和登记提供了科学证据, 也为石首鱼类种质资源鉴定、评价及其开发和保护提供了技术支撑。

关键词: 石首鱼类; DNA 条形码; 物种鉴定; 有效种名

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005–8737–(2022)11–1541–10

石首鱼科 (Sciaenidae) 鱼类简称石首鱼类, 隶属于鲈形目 (Perciformes), 广泛分布于热带、亚热带及温带海域 (少数种类分布于淡水)^[1], 其种类繁多, 目前中国沿海可确定的至少有 14 属 27 种^[2], 在我国海洋渔业中占有重要地位, 也是海水养殖的重要对象。石首鱼类的很多物种在形态上较为相近, 尤其是在幼鱼阶段, 一些可用于成鱼种类区分的形态特征尚不明显, 给石首鱼类物种的鉴定带来较大困难^[1,3]。种质资源鉴定与评价的首要任务与前提是对物种进行精准、有效鉴定。海水鱼种质资源调查实践中发现, 很多养殖石首鱼种质资源存在命名混乱、物种鉴定不准确的问题^[1], 如: 黄唇鱼 [*Bahaba taipingensis* (Herre, 1932)] 常因鉴定能力与经验的不足无法实现准确定种; 有

效种名“元鼎黄姑鱼 [*Nibea chui* Trewavas, 1971]”与其同种异名“浅色黄姑鱼 [*Nibea coibor* (Hamilton, 1822)]”在不同文献中同时被广泛使用^[2,4-5]; 本为同种的双棘原黄姑鱼 [*Protonibea diacanthus* (Lacepède, 1802)] 和褐毛鲈 [*Megalonibea fusca* Chu, Lo & Wu, 1963] 长期被记录为不同物种^[2,6-11], 致使其形态特征未得到统一的描述。另外, 石首鱼养殖新种质开发中也存在难以确定亲鱼种类, 不同种类混杂养殖的现象。上述问题给石首鱼类的种质资源养护与开发利用带来不利影响, 制约着相关产业的发展, 目前针对石首鱼类种质资源的关键种亟需建立有效的物种鉴定方法, 厘清物种的有效种名及其分类特征。

本研究选取来自同一养殖场的 3 种石首鱼类

收稿日期: 2022-04-29; **修订日期:** 2022-06-24.

基金项目: 国家现代农业产业技术体系资助项目 (CARS-47); 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: 李昂 (1985–), 男, 博士, 研究方向为渔业资源分子生态学. E-mail: liang@ysfri.ac.cn

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

为研究对象。2020 年广东鳎鲸海洋生物科技有限公司在筛选一批福建野生幼苗养成的疑似元鼎黄姑鱼亲鱼时,发现有个别体型同元鼎黄姑鱼相近、但体色略有差异的亲鱼个体,暂定为疑似黄唇鱼,经一年多的蓄养培育,于 2021 年 6 月份成功繁殖出一批 F1 幼苗。本研究对上述疑似黄唇鱼亲鱼、疑似元鼎黄姑鱼亲鱼、F1 幼鱼中的疑似黄唇鱼和疑似元鼎黄姑鱼,以及来自同一养殖场的疑似双棘原黄姑鱼幼鱼进行了物种鉴定。

随着分子生物学和生物信息学的发展与应用, DNA 条形码技术克服了传统分类的诸多局限,为物种鉴定提供了可信息化的分类标准和有效的分类手段^[12]。目前, DNA 条形码技术已在鱼类物种鉴定和系统分类学上得到了广泛的应用,石首鱼类的 DNA 条形码数据也获得了较为丰富的积累^[1,13-14]。本研究针对石首鱼类在鉴定中存在的问题,在形态学鉴定的基础上测定了来自人工繁育的疑似黄唇鱼、疑似元鼎黄姑鱼和疑似双棘原黄姑鱼样品的 DNA 条形码序列,结合已报道的数种石首鱼相关种类的 DNA 条形码序列对三者进行了鉴定分析,以期厘清其因分类地位存在争议、同种异名等问题带来的物种命名混乱,并进一步明确三者的形态分类特征,为其种质资源的开发和保护提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

待测样品由广东鳎鲸海洋生物科技有限公司提供,包括疑似黄唇鱼亲鱼鳍条组织样品 1 份、疑似元鼎黄姑鱼亲鱼鳍条组织样品 1 份、人工育成的 F1 幼鱼全鱼共 13 尾(包括疑似黄唇鱼 6 尾、疑似元鼎黄姑鱼 4 尾和疑似双棘原黄姑鱼 3 尾)(表 1)。从中国渔业生物 DNA 条形码信息平台(<http://www.fishery-barcode.cn>)的 DNA 条形码凭证标本库选取了黄姑鱼(*Nibea albiflora*)凭证标本 1 份和鲢(*Miichthys miiuy*)凭证标本 2 份作为对照样品(表 1)。从 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)下载双棘原黄姑鱼(*Protonibea diacanthus*)、白姑鱼(*Pennahia argentata*)、小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)、大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、棘头梅

童鱼(*Collichthys lucidus*)、黄唇鱼(*Bahaba taipingensis*)、黄姑鱼(*Nibea albiflora*)及元鼎黄姑鱼(*Nibea chui*)等 8 种石首鱼类的共 15 条 DNA 条形码序列用于同源序列比较分析及系统发育关系构建(表 1)。为有效重建近缘属间的系统关系,选取与上述种类系统关系相对较远的横带九棘鲈(*Cephalopholis boenak*)和四指马鲛(*Eleutheronema tetradactylum*)作为外群,其序列信息来自 GenBank (表 1)。

1.2 实验方法

1.2.1 形态学鉴定 主要依据《中国石首鱼类分类系统的研究和新属新种的叙述》^[6]和《中国海洋及河口鱼类系统检索》^[7]对待测石首鱼 13 尾全鱼样品的形态特征进行观察描述,初步鉴定物种。首先观察与测量样品的外部形态(包括背鳍、臀鳍、胸鳍、腹鳍鳍条数等可数性状和体长、体高、头长、吻长、眼径等量度特征),再对样品进行解剖,分离鳔与耳石。将鳔与周围组织分离,保持其处于原本位置及形状不变,并进行观察拍照。将成对的矢耳石从鱼头部球囊中取出,放置于盛有蒸馏水的 1.5 mL 离心管中浸泡 24 h 以上,之后将离心管放置于超声波清洗器中清洗 30 min 以上,以清除耳石表面残留的有机杂质。清洗完毕后将耳石置于 50 °C 下干燥 24 h。在 Leica S8APO 体式显微镜下对耳石进行观察拍照,拍照时将耳石凸面朝上。

1.2.2 DNA 提取与序列扩增 取鳍条或肌肉组织约 100 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)提取基因组 DNA。使用鱼类 DNA 条形码通用引物扩增线粒体 CO I 基因片段^[19],上下游引物序列分别为 Fish-F: 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3', Fish-R: 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3'。25 μL PCR 反应体系: Taq 酶 0.25 μL, DNA 模板 1 μL, 上下游引物(5 μmol/L)各 1 μL, dNTP 2 μL, 10×PCR buffer 2.5 μL, 去离子水 17.25 μL。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 52 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 循环 35 次; 然后 72 °C 延伸 10 min。将扩增产物送往北京六合华大基因公司进行正反链测序。

表 1 本研究所用样品及序列信息
Tab. 1 Samples and sequences information used in this study

序号 no.	种类 species	样品数量 number of samples	样品编号/序列登录号 specimen no./GenBank access. no.	参考文献 reference
1	疑似黄唇鱼(亲鱼) suspected <i>Bahaba taipingensis</i> (parent fish)	1	L12	本研究 this study
2	疑似黄唇鱼(F1 幼鱼) suspected <i>Bahaba taipingensis</i> (F1 juvenile)	6	L8–L11, L14–L15	本研究 this study
3	疑似元鼎黄姑鱼(亲鱼) suspected <i>Nibea chui</i> (parent fish)	1	L13	本研究 this study
4	疑似元鼎黄姑鱼(F1 幼鱼) suspected <i>Nibea chui</i> (F1 juvenile)	4	L4–L7	本研究 this study
5	疑似双棘原黄姑鱼(F1 幼鱼) suspected <i>Protonibea diacanthus</i> (F1 juvenile)	3	L1–L3	本研究 this study
6	黄姑鱼 <i>Nibea albiflora</i>	1	L16	中国渔业生物 DNA 条形码信息平台凭证标本 Chinese Fishery DNA Barcoding System (www.fishery-barcode.cn)
		1	NC015205	[15]
7	鲢 <i>Miichthys miiuy</i>	2	L17, L18	中国渔业生物 DNA 条形码信息平台凭证标本 Chinese Fishery DNA Barcoding System (www.fishery-barcode.cn)
8	黄唇鱼 <i>Bahaba taipingensis</i>	2	KP722703, JX232404	[16-17]
9	双棘原黄姑鱼 <i>Protonibea diacanthus</i>	7	NC024573, KJ643927, KP722766, DQ107821, EF528231, KY117237, KM257722	[18-22]
10	元鼎黄姑鱼 <i>Nibea chui</i>	1	KP722744	[16]
11	白姑鱼 <i>Pennahia argentata</i>	2	KC545800	[23]
12	小黄鱼 <i>Larimichthys polyactis</i>	1	GU586227	[24]
13	大黄鱼 <i>Larimichthys crocea</i>	1	EU339149	[25]
14	棘头梅童鱼 <i>Collichthys lucidus</i>	1	JN857362	[26]
15	横带九棘鲈 <i>Cephalopholis boenak</i>	1	KC537759	[27]
16	四指马鲛 <i>Eleutheronema tetradactylum</i>	1	KC878730	[28]

1.2.3 序列分析 使用 DNASTAR 软件包(DNASTAR Inc., Madison, USA)对测得序列进行编辑和人工校正; 用 BLAST 在 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)中进行序列相似性比对分析, 同时在中国重要渔业生物 DNA 条形码信息平台 (<http://www.fishery-barcode.cn/web/index.aspx>) 通过相似性比对分析验证上述比对结果的准确性。在 GenBank 数据库中下载近缘种同源序列片段(表 1)进行比较分析, 通过 MEGA6.0 软件基于 Kimura 2-parameter (K2P)模型构建邻接(Neighbor-Joining)关系树, 实现 DNA 条形码物种鉴定。

2 结果与分析

2.1 形态学鉴定

2.1.1 疑似黄唇鱼 分别对疑似黄唇鱼样品的外

部形态特征、鰾形态特征、耳石形态特征进行观察测量可知, 6 尾样品具有以下一致特征: 背鳍 VII, I-24, 臀鳍 II-7, 胸鳍 17, 腹鳍 I-5; 体长为体高的 3.6~3.8 倍, 为头长的 3.6~3.7 倍; 头长为吻长的 4.2~4.4 倍, 为眼径的 5.0~5.5 倍(表 2)。体背侧灰棕, 腹侧灰白色, 胸鳍基部有 1 黑斑(图 1a), 符合黄唇鱼的典型外部形态特征^[6-7]; 鰾呈圆筒形, 前缘宽平, 端侧向后呈管状延长, 与鰾平行, 伸达鰾的末端, 鰾侧无侧肢, 符合黄唇鱼鰾的典型特征(图 1b)^[6-7]; 耳石远轴面具有 2~3 个瘤状突起, 近轴面具一较为明显的蝌蚪形印迹, 符合黄唇鱼耳石的形态特征(图 1c)^[6-7], 综上将疑似黄唇鱼 6 尾样品初步鉴定为黄唇鱼(*Bahaba taipingensis*)。

2.1.2 疑似元鼎黄姑鱼 分别对疑似元鼎黄姑鱼样品的外部形态特征、鰾形态特征、耳石形态特

表 2 3 种石首鱼类的量度特征比较
Tab. 2 Morphometric characters of three sciaenid fishes

量度特征 morphometric character	疑似黄唇鱼 suspected <i>Bahaba taipingensis</i>	疑似元鼎黄姑鱼 suspected <i>Nibea chui</i>	疑似双棘原黄姑鱼 suspected <i>Protonibea diacanthus</i>
体长/cm body length	15.04–19.05	10.48–13.92	18.03–18.96
体高/cm body depth	4.01–5.32	3.21–4.12	5.41–5.58
头长/cm head length	4.09–5.30	3.15–3.96	5.82–6.04
吻长/cm snout length	0.98–1.24	0.89–1.16	1.48–1.52
眼径/cm eye diameter	0.82–1.02	0.67–0.80	0.98–1.05
体长/体高 body length/body depth	3.6–3.8	3.2–3.4	3.3–3.4
体长/头长 body length/head length	3.6–3.7	3.3–3.5	3.1–3.2
头长/吻长 head length/snout length	4.2–4.4	3.4–3.5	3.9–4.0
头长/眼径 head length/eye diameter	5.0–5.5	4.7–5.1	5.7–6.0



图 1 疑似黄唇鱼样品的形态特征
a. 外部形态, b. 鳔, c. 耳石.

Fig. 1 Morphological characteristics of the suspected *Bahaba taipingensis* samples
a. External morphology; b. Swim bladder; c. Otolith.

征进行观察测量可知, 4 尾样品具有以下一致特征: 背鳍 X, I-24~25, 臀鳍 II-7, 胸鳍 16~17, 腹鳍

I-5; 体长为体高的 3.2~3.4 倍, 为头长的 3.3~3.5 倍, 头长为吻长的 3.4~3.5 倍, 为眼径的 4.7~5.1 倍(表 2)。体背侧银灰色, 腹部银白色, 胸鳍、腹鳍、臀鳍和尾鳍呈灰黄色(图 2a), 与朱元鼎等^[6]在《中国石首鱼类分类系统的研究和新属新种的叙述》中对浅色黄姑鱼的描述接近, 与《中国沿海石首鱼科鱼类的鉴定、分类和分子系统发育研究》^[2]一文中对元鼎黄姑鱼的描述一致; 鳔呈圆筒形, 两侧具树枝状侧肢, 侧肢细密难以分辨(图 2b); 耳石远轴面具有不规则突起, 近轴面存在一个较为明显的蝌蚪形印迹(图 2c), 上述鳔与耳石特征符合朱元鼎等^[6]《中国石首鱼类分类系统的研究和新属新种的叙述》中对浅色黄姑鱼的描述, 及《中国海洋及河口鱼类系统检索》^[7]、《中国沿海石首鱼科鱼类的鉴定、分类和分子系统发育研究》^[2]中对元鼎黄姑鱼的描述。综上将疑似元鼎黄姑鱼初步鉴定为元鼎黄姑鱼(*Nibea chui*)。

2.1.3 疑似双棘原黄姑鱼 分别对疑似双棘原黄姑鱼样品的外部形态特征、鳔形态特征、耳石形态特征进行观察可知, 3 尾样品具有以下一致特征: 背鳍 X, I-22, 臀鳍 II-7, 胸鳍 16, 腹鳍 I-5; 体长为体高的 3.3~3.4 倍, 为头长的 3.1~3.2 倍, 头长为吻长的 3.9~4.0 倍, 为眼径的 5.7~6.0 倍(表 2)。体侧上方、背鳍及尾鳍具有许多小于眼径的不规则黑色斑点(图 3a), 符合朱元鼎等^[6]《中国石首鱼类分类系统的研究和新属新种的叙述》中所描述的双棘黄姑鱼(*Nibea diacanthus*)及伍汉霖^[7]等《中国海洋及河口鱼类系统检索》中所描述的双棘原黄姑鱼(*Protonibea diacanthus*)的典型外部形态特

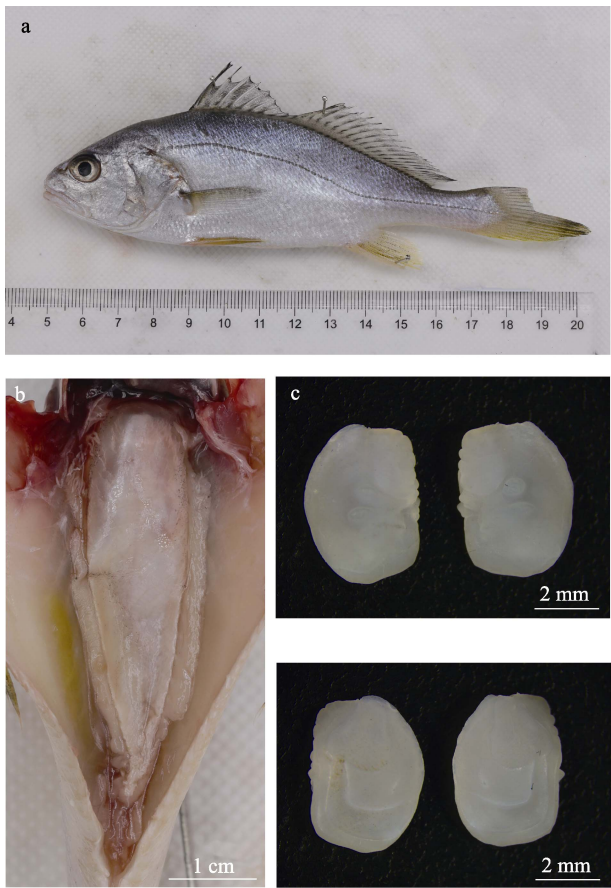


图 2 疑似元鼎黄姑鱼样品的形态特征
a. 外部形态, b. 鳔, c. 耳石.
Fig. 2 Morphological characteristics of the suspected *Nibea chui* samples
a. External morphology; b. Swim bladder; c. Otolith.

征; 鳔呈圆筒形, 两侧具树枝状侧枝, 侧枝具分支, 符合朱元鼎等^[6]《中国石首鱼类分类系统的研究和新属新种的叙述》中所描述的双棘黄姑鱼(*Nibea diacanthus*)及伍汉霖等^[7]《中国海洋及河口鱼类系统检索》中所描述的双棘原黄姑鱼(*Protonibea diacanthus*)鳔的形态特征(图 3b); 耳石呈耳状, 外缘弧形光滑, 内缘波曲, 远轴面具多个较大不规则瘤状突起, 兼具朱元鼎等^[6]《中国石首鱼类分类系统的研究和新属新种的叙述》和伍汉霖等^[7]《中国海洋及河口鱼类系统检索》中所描述的双棘黄姑鱼(*Nibea diacanthus*)及双棘原黄姑鱼(*Protonibea diacanthus*)耳石的形态特征(图 3c)。另外, 上述疑似双棘原黄姑鱼样品形态特征与《中国沿海石首鱼类的鉴定、分类和分子系统发育研究》^[2]一文中对双棘毛鲳(*Megalonibea*

diacantha)幼鱼的描述相一致。该研究认为褐毛鲳和双棘原黄姑鱼为同一种的不同发育阶段, 并将该种命名为双棘毛鲳(*Megalonibea diacantha*)^[2]。对上述 3 个种名进行文献调研发现, 目前种名“双棘黄姑鱼(*Nibea diacanthus*)”已被“双棘原黄姑鱼(*Protonibea diacanthus*)”所代替^[29], 而双棘毛鲳(*Megalonibea diacantha*)这一种名尚未正式发表^[2], 故将疑似双棘原黄姑鱼 3 尾样品初步鉴定为双棘原黄姑鱼(*Protonibea diacanthus*)。

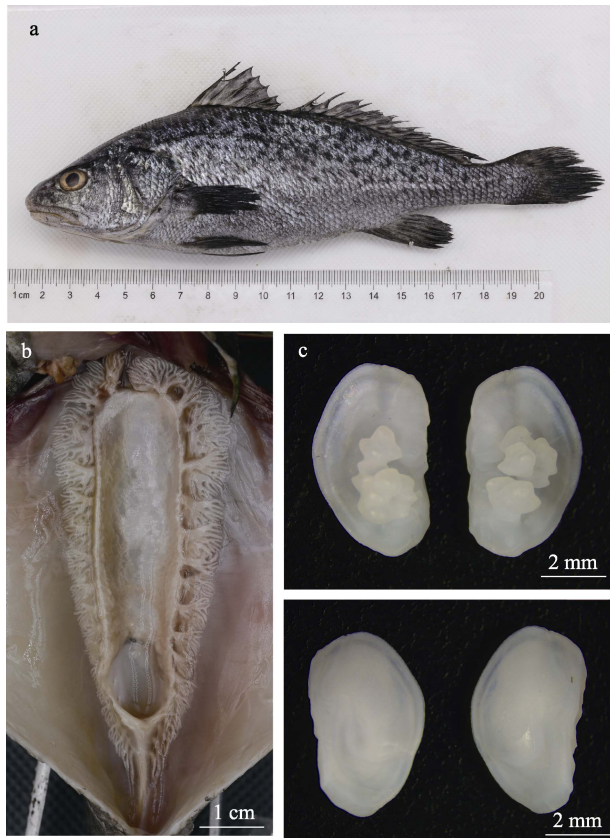


图 3 疑似双棘原黄姑鱼样品的形态特征
a. 外部形态, b. 鳔, c. 耳石.
Fig. 3 Morphological characteristics of the suspected *Protonibea diacanthus* samples
a. External morphology; b. Swim bladder; c. Otolith.

2.2 DNA 条形码分析与物种鉴定
2.2.1 BLAST 相似性比对 本研究共获得 3 种石首鱼类 DNA 条形码序列共 15 条, 每条长度 610 bp。BLAST 相似性比对分析结果显示, 除 1 尾疑似黄唇鱼样品外(L15), 其余 6 份疑似黄唇鱼样品(L8、L9、L10、L11、L12、L14)的 DNA 条形码

序列完全一致,与 GenBank 中黄唇鱼序列 JX232404 的相似度最高,为 100%。疑似黄唇鱼样品 L15 序列与其他疑似黄唇鱼序列仅相差 1 个碱基,与 GenBank 中黄唇鱼序列 MH260402、KP722703 的相似度均为 100%,与黄唇鱼序列 JX232404 的相似度为 99.84%。上述结果支持将本研究所有疑似黄唇鱼样品定种为黄唇鱼(*Bahaba taipingensis*)。

全部疑似元鼎黄姑鱼样品(L4、L5、L6、L7、L13)的 DNA 条形码序列完全一致,均与 GenBank 中的元鼎黄姑鱼序列 KP722744 相似度为 99.84%,与浅色黄姑鱼序列 KM233452 的相似度为 99.84%,与尖头黄鳍牙鲷序列 JQ692068 的相似度为 100%。在上述参考序列中,由于尖头黄鳍牙鲷序列 JQ692068 并未有相关文献发表,而元鼎黄姑鱼序列 KX778097 已有发表,且疑似元鼎黄姑鱼样品在形态上与尖头黄鳍牙鲷相差较大,故排除样品为尖头黄鳍牙鲷的可能;另外由于浅色黄姑鱼为元鼎黄姑鱼的同种异名,综上将本研究所有疑似元鼎黄姑鱼样品定种为元鼎黄姑鱼(*Nibea chui*)。

全部疑似双棘原黄姑鱼样品(L1、L2、L3)的 DNA 条形码序列完全一致,与 GenBank 中的褐毛鲈(*Megalonibea fusca*)序列 KP722735 和双棘原黄姑鱼(*Protonibea diacanthus*)序列 KX778097 的相似度均为 100%,与双棘原黄姑鱼序列 KY117237、KX778095、KM257722、FJ238008 的相似度均为 99.84%。上述结果支持褐毛鲈与双棘原黄姑鱼为同一物种的观点^[2],按照目前普遍命名习惯,将本研究所有疑似双棘原黄姑鱼样品定种为双棘原黄姑鱼(*Protonibea diacanthus*)。

2.2.2 系统发育关系构建 利用全部样品的 DNA 条形码序列及 8 种石首鱼类的同源序列(另外包括 2 种外群)以邻接法构建的系统进化关系显示(图 4),全部疑似黄唇鱼样品的 DNA 条形码序列均与已发表的黄唇鱼序列聚为一支;全部疑似元鼎黄姑鱼样品的 DNA 条形码序列均与已发表的元鼎黄姑鱼序列聚为一支;全部疑似双棘原黄姑鱼样品的 DNA 条形码序列均与已发表的双棘原黄姑鱼序列聚为一支。在系统进化树中,虽然全部的双棘原黄姑鱼聚为一支,但其中包含了两

个明显的分支,并且两分支间遗传距离较远。上述结果支持将本研究的疑似黄唇鱼亲鱼鳍条组织样品和人工育成的 F1 疑似黄唇鱼幼鱼样品鉴定为黄唇鱼(*Bahaba taipingensis*);将疑似元鼎黄姑鱼亲鱼鳍条组织样品和人工育成的 F1 疑似元鼎黄姑鱼幼鱼样品鉴定为元鼎黄姑鱼(*Nibea chui*);将疑似双棘原黄姑鱼样品鉴定为双棘原黄姑鱼(*Protonibea diacanthus*)。

3 讨论

以往研究对石首鱼类不同物种的形态特征进行了大量总结与描述^[2,6-7,30],然而由于石首鱼类中一些近缘种在形态上较为相似与趋同,在实际操作中仍然很难根据外部形态对其进行有效的物种鉴定。如:朱元鼎等^[6]在《中国石首鱼类分类系统的研究和新属新种的叙述》中对黄唇鱼的外部形态特征、形态测量特征、鰾特征、耳石特征及骨骼特征等进行了较为详尽的描述,然而其中较为明显的可用于种类辨别的特征多集中于鰾与耳石,鉴定过程需进行解剖,且要求鉴定者具备一定的形态学知识和技能,加之该种较为罕见,其较大成年个体与同样较为稀见的双棘原黄姑鱼在体型和体色上存在一定的相似之处,在偶然捕获时由于认知和经验的不足常常存在种类辨识混淆的情况。本研究对黄唇鱼、元鼎黄姑鱼及双棘原黄姑鱼 3 种石首鱼类进行了有效的物种鉴定,证实了 DNA 条形码技术能够克服传统形态学方法在石首鱼类鉴定中的局限,可将石首鱼类不同种类进行准确区分,并可实现对其分类学形态特征不明显幼鱼的高效、准确鉴定。在本研究中,运用形态学方法与 DNA 条形码技术对 3 种石首鱼类的鉴定得出了相同的结论,这进一步明确了已有分类学文献中对 3 种石首鱼类典型形态描述的可靠性^[2,6-7],修正了其在定种、命名及分类地位确定上存在的问题,证实了外部形态、鰾和耳石的典型特征可作为 3 种石首鱼类种类鉴定的重要证据,对 DNA 条形码物种鉴定具有辅助作用,这种形态学分析和 DNA 条形码相结合的方法可推广及其他石首鱼类的物种鉴定。

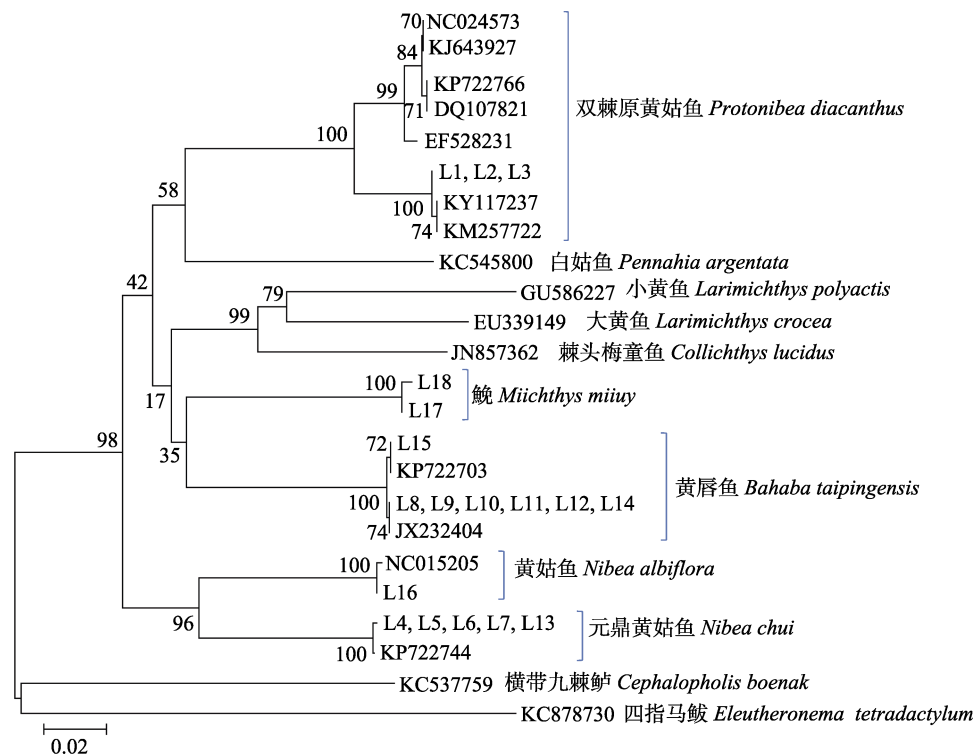


图 4 基于 DNA 条形码序列构建的 9 种石首鱼类的 NJ 系统树
各分支上数字为 1000 次重抽样分析得到的支持率。

Fig. 4 NJ phylogenetic trees of 9 species of Sciaenidae based on DNA barcoding sequences
Bootstrap supports from 1000 replicates are shown on the nodes.

在利用已发表的石首鱼类 DNA 条形码序列对样品进行相似性比对和系统发育关系构建中,本研究对 3 种石首鱼类的命名及 GenBank 中一些序列错误上传情况进行了梳理。在疑似元鼎黄姑鱼样品的鉴定中,发现 GenBank 中 1 条标明为尖头黄鳍牙鲷(*Chrysochir aureus*)的序列(JQ692068)实则来自元鼎黄姑鱼(*Nibea chui*)。此现象提示在利用 GenBank 进行相似性比对过程中,应对选用序列做充分考察,尽量选取已用于发表文献的、已经过有效物种鉴定的序列作为参考。在比对中发现,GenBank 中元鼎黄姑鱼序列(KP722744)与 1 条浅色黄姑鱼(*Nibea coibor*)序列(KM233452)的相似度大于 99%,本研究的疑似元鼎黄姑鱼样品序列与二者的相似度均为 99.84%。这一结果支持了以往研究已无太多争议的浅色黄姑鱼(*Nibea coibor*)为元鼎黄姑鱼(*Nibea chui*)同种异名的观点^[2,7,30],此同种异名的存在是由于种名及其译名的使用曾发生变化的结果,按照物种命名的优先律原则,应将其种名定名为 *Nibea chui* Trewavas, 1971, 对应中

文学名为元鼎黄姑鱼。然而,文献调研过程中发现,目前该物种学名的使用仍较为混乱,尤以养殖相关文献为甚,使用浅色黄姑鱼(*Nibea coibor*)这一异名的情况还普遍存在^[2,4-5]。另外,黄姑鱼属内及与其近缘的很多种类存在多个名称混乱使用或定种争议的问题,其中不乏一些常见的养殖种类^[2]。本研究结果为元鼎黄姑鱼种名的规范使用提供了新的证据,研究方法可作为其他石首鱼类的物种鉴定和命名厘定的参考。朱元鼎等^[6]在《中国石首鱼类分类系统的研究和新属新种的叙述》中同时对褐毛鲈(*Megalonibea fusca*)和双棘黄姑鱼(*Nibea diacanthus*)两个物种进行了描述,其中褐毛鲈被作为新种首次确认。Trewavas^[29]后将双棘黄姑鱼(*Nibea diacanthus*)分类为双棘原黄姑鱼(*Protonibea diacanthus*)。2017 年,郭昶畅^[2]发现,褐毛鲈和双棘原黄姑鱼实为同一种的不同发育阶段,并综合以往研究对二者的描述及石首鱼分类专家(日本的 Sasaki 博士、中国台湾的赵宁教授等)的意见,将该种命名为双棘毛鲈(*Megalonibea*

diacantha), 并对其幼鱼及成鱼的形态特征(包括了鳔和耳石等)进行了重新描述。本研究在疑似双棘原黄姑样品的鉴定中, 发现其 DNA 条形码序列与 GenBank 中 1 条褐毛鲢(*Megalonibea fusca*) 序列和 1 条双棘原黄姑鱼(*Protonibea diacanthus*) 序列的相似度均为 100%, 支持褐毛鲢与双棘原黄姑鱼为同种异名的观点^[2], 结合形态特征比较结果, 同时支持“双棘原黄姑(*Protonibea diacanthus*)”为“褐毛鲢(*Megalonibea fusca*)”的幼鱼阶段^[2]。按照目前普遍命名习惯, 本研究保留使用了“双棘原黄姑鱼 [*Protonibea diacanthus* (Lacepède, 1802)]”这一种名。在系统进化树构建中发现, 双棘原黄姑鱼被分为遗传距离较远的两个明显分支, 提示其种内可能存在遗传分化, 或有隐存种的存在, 此推论的确认尚需开展更为深入及广泛的研究。从上述分析可以看出, DNA 条形码有助于厘清部分石首鱼类在定种和分类地位上的争议, 纠正种类辨识混淆和学名使用混乱的问题, 并可在物种鉴定中提示隐存多样性的存在。

对物种进行精准、有效鉴定是种质资源鉴定、评价与保护的前提。本研究 3 种石首鱼类研究对象均为具有较高经济价值的濒危、易危物种^[7], 其中黄唇鱼主要分布于长江口到珠江口海域, 是中国特有种。近几十年来, 由于过度捕捞和经济快速发展带来的环境问题, 其资源量急剧下降, 已濒临灭绝^[31]。2021 年, 黄唇鱼被列入国家一级保护野生动物名录^[32], 成为目前唯一的国家一级保护海洋鱼类。同年, 我国启动了中国历史上规模最大的农业种质资源普查, 经遴选黄唇鱼被列为水产优异资源之一; 元鼎黄姑鱼被《中国物种红色名录》列为易危(VU)物种^[33], 近年在福建、广东近海已有网箱养殖, 是中国重要的海水养殖经济鱼类^[7]; 双棘原黄姑鱼被《中国物种红色名录》列为易危(VU)物种, 与之同种异名的褐毛鲢被列为濒危物种(EN)^[33], 目前福建沿海已有人工养殖^[7]。本研究对 3 种石首鱼类的成功鉴定、有效种名的确认及分类特征的厘清, 为三者种质资源的开发及新种质的创制奠定了基础, 为养殖石首鱼类种质资源的鉴定与评价提供了重要参考。尤其是黄唇鱼物种的有效鉴定, 为养殖企业对现有繁殖驯

养国家一级保护野生动物进行报备和登记提供了科学证据, 体现了物种有效鉴定对种质资源保护的重要意义。

参考文献:

- [1] Lv J L. DNA barcoding and molecular phylogeny of Sciaenidae in coastal waters of China[D]. Guangzhou: Jinan University, 2017. [吕金磊. 中国近海石首鱼科鱼类 DNA 条形码及分子系统学研究[D]. 广州: 暨南大学, 2017.]
- [2] Guo Y C. Identification, classification and molecular phylogeny of Sciaenidae species from Chinese waters[D]. Xiamen: Xiamen University, 2017. [郭昶畅. 中国沿海石首鱼科鱼类的鉴定、分类和分子系统发育研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2017.]
- [3] Lee S J, Kim J K. Molecular identification and morphological comparison of juveniles of two *Collichthys* species (Pisces: Sciaenidae) from the Yellow Sea[J]. Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 2014, 47(1): 79-83.
- [4] Tong X, Du B, Yu D H, et al. Sequence analysis of mitochondrial 16S rRNA gene fragment in Chu's croaker (*Nibea coibor*)[J]. Marine Fisheries Research, 2007, 28(3): 85-91. [童馨, 杜博, 喻达辉, 等. 浅色黄姑鱼线粒体 16S rRNA 基因片段序列特征分析[J]. 海洋水产研究, 2007, 28(3): 85-91.]
- [5] Zhang Y Z, Hu J C, Xie Y J, et al. Feeding habits and growth characteristics of *Nibea chui* in early developmental stages[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2006, 25(5): 74-79. [张雅芝, 胡家财, 谢仰杰, 等. 浅色黄姑鱼早期发育阶段的摄食习性与生长特性[J]. 热带海洋学报, 2006, 25(5): 74-79.]
- [6] Zhu Y D, Luo Y L, Wu H L. A Study on the Classification of the Sciaenoid Fishes of China, with Description of New Genera and Species[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1963. [朱元鼎, 罗云林, 伍汉霖. 中国石首鱼类分类系统的研究和新属新种的叙述[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1963.]
- [7] Wu H L, Zhong J S. Systematic Retrieval of Marine and Estuarine Fishes in China[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2021. [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.]
- [8] Chen P X, Zeng Z N. Study of artificial propagation technology of *Megalonibea fusca*[J]. Marine Sciences, 2013, 37(4): 57-64. [陈朴贤, 曾志南. 褐毛鲢全人工繁殖技术研究[J]. 海洋科学, 2013, 37(4): 57-64.]
- [9] Ou Y J, Li J E, Liu Q. Studies on behavior selectivity and swimming ability of *Megalonibea fusca* in early development stages[J]. Ecological Science, 2016, 35(4): 1-11. [区又君, 李加儿, 柳琪. 褐毛鲢早期发育阶段行为选择和游泳能力的研究[J]. 生态科学, 2016, 35(4): 1-11.]
- [10] Shi Z H, Xia L J, Wang J G. A study on artificial propagation technique of *Nibea diacanthus* (Lacépède)[J]. Marine

- Sciences, 2004, 28(10): 34-37. [施兆鸿, 夏连军, 王建钢. 双棘黄姑鱼人工育苗技术的研究[J]. 海洋科学, 2004, 28(10): 34-37.]
- [11] Guo M L, Su Y Q, Ding S X, et al. Genetic diversity analysis of reared *Nibea diacanthus* stock by RAPD[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science), 2006, 45(2): 293-296. [郭明兰, 苏永全, 丁少雄, 等. 双棘黄姑鱼人工繁育群体遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2006, 45(2): 293-296.]
- [12] 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.]
- [13] Liu S F, Chen L L, Dai F Q, et al. Application of DNA barcoding gene CO I 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 CO I 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.]
- [14] Xu C Y, Liu Y, Ma C, et al. Application of DNA barcoding based on CO I gene in phylogenetic classification of Sciaenidae[J]. Journal of Fisheries Research, 2019, 41(5): 359-65. [徐春燕, 刘勇, 马超, 等. 基于 CO I 基因的 DNA 条形码技术在石首鱼科鱼类系统分类中的应用[J]. 渔业研究, 2019, 41(5): 359-365.]
- [15] Cheng Y Z, Xu T J, Jin X X, et al. Complete mitochondrial genome of the yellow drum *Nibea albiflora* (Perciformes, Sciaenidae)[J]. Mitochondrial DNA, 2011, 22(4): 80-82.
- [16] Lo P C, Liu S H, Chao N L, et al. A multi-gene dataset reveals a tropical New World origin and early miocene diversification of croakers (Perciformes: Sciaenidae)[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2015, 88: 132-143.
- [17] Zhao L L, Gao T X, Lu W H, et al. The complete mitogenome of the Chinese Bahaba *Bahaba taipingensis* (Perciformes: Sciaenidae)[J]. Mitochondrial DNA, 2012, 23(6): 411-413.
- [18] Taillebois L, Crook D, Saunders T, et al. The complete mitochondrial genome of the black jewfish *Protonibea diacanthus* (Perciformes: Sciaenidae)[J]. Mitochondrial DNA Part A, DNA Mapping, Sequencing, and Analysis, 2016, 27(1): 779-780.
- [19] 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.
- [20] Lakra W S, Goswami M, Gopalakrishnan A. Molecular identification and phylogenetic relationships of seven Indian sciaenids (Pisces: Perciformes, Sciaenidae) based on 16S rRNA and cytochrome c oxidase subunit I mitochondrial genes[J]. Molecular Biology Reports, 2009, 36(5): 831-839.
- [21] Hu Z H, Chai X J, Wang Y B. Characterization of the complete mitochondrial genome sequence of *Nibea diacanthus* and its phylogenetic implication[J]. Mitochondrial DNA Part B, 2020, 5(1): 525-527.
- [22] Liu L, Yang H R, Yang Z T, et al. The complete mitochondrial genome of the blackspotted croaker *Protonibea diacanthus* (Perciformes, Sciaenidae)[J]. Mitochondrial DNA Part A, DNA Mapping, Sequencing, and Analysis, 2016, 27(3): 1671-1673.
- [23] Li A, Sun D R, Li Y, et al. Mitochondrial genome sequence of the Japanese white croaker *Pennahia argentata* (Perciformes: Sciaenidae)[J]. Mitochondrial DNA, 2014, 25(2): 117-119.
- [24] Cheng Y Z, Wang R X, Sun Y N, et al. The complete mitochondrial genome of the small yellow croaker and partitioned Bayesian analysis of Sciaenidae fish phylogeny[J]. Genetics and Molecular Biology, 2012, 35(1): 191-99.
- [25] Cui Z X, Liu Y, Li C P, et al. The complete mitochondrial genome of the large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Perciformes, Sciaenidae): Unusual features of its control region and the phylogenetic position of the Sciaenidae[J]. Gene, 2009, 432(1-2): 33-43.
- [26] Cheng J, Ma G Q, Miao Z Q, et al. Complete mitochondrial genome sequence of the spinyhead croaker *Collichthys lucidus* (Perciformes, Sciaenidae) with phylogenetic considerations[J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(4): 4249-4259.
- [27] Li J L, Liu M, Wang Y Y. Complete mitochondrial genome of the chocolate hind *Cephalopholis boenak* (Pisces: Perciformes)[J]. Mitochondrial DNA, 2014, 25(3): 167-168.
- [28] Zhang B, Sun Y N, Shi G. The complete mitochondrial genome of the fourfinger threadfin *Eleutheronema tetradactylum* (Perciformes: Polynemidae) and comparison of light strand replication origin within Percoidei[J]. Mitochondrial DNA, 2014, 25(6): 411-413.
- [29] Trewavas. The sciaenid fishes (croakers or drums) of the Indo-West-Pacific[J]. The Transactions of the Zoological Society of London, 1977, 33(4): 255-541.
- [30] Chen D G, Zhang M Z. Marine Fishes of China[M]. Qingdao: China Ocean University Press, 2016. [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.]
- [31] Lu B Q, Lu C S, Huang J Q, et al. Preliminary study on the biology of Chinese bahaba (*Bahaba flavolabiata*)[J]. Hubei Agricultural Sciences, 2021, 60(14): 100-102. [陆丙乾, 陆昌胜, 黄建强, 等. 黄唇鱼的生物学初步研究[J]. 湖北农业科学, 2021, 60(14): 100-102.]
- [32] National Forestry and Grassland Administration, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. Government Notice, 2021, No. 3, List of key protected wild animals in China[R]. 2021-2-5. [国家林业和草原局, 农业

农村部. 公告 2021 年第 3 号, 国家重点保护野生动物名录 [R]. 2021-2-5.]

[33] Wang S, Xie Y. China Species Red List[M]. Beijing: Higher

Education Press, 2004. [汪松, 解焱. 中国物种红色名录—第一卷—红色名录[中英文本][M]. 北京: 高等教育出版社, 2004.]

Species identification and taxonomic classification of three cultured sciaenid species based on DNA barcoding

LI Ang^{1,2}, LIU Shufang^{1,2}, AN Changting¹, WAN Ruijing¹, 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. Function Laboratory for Marine Fisheries Science and Food Production Processes, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071, China

Abstract: The family Sciaenidae (sciaenid), commonly referred to fishes such as croakers and drums, is a large taxonomic group in the order Perciformes. The sciaenids are commonly found in shallow coastal waters of tropical to temperate seas, and a few species inhabit freshwater. There are 27 sciaenid species belonging to 14 genera in the coastal waters of China and most of them are commercially important, both in capture and aquaculture fisheries. Due to the high levels of similarity between related species and the paucity of observable morphological features among juvenile fish, species delineation and identification are difficult in the sciaenid species. Thus, the traditional morphological identification method cannot meet the needs of species identification. Meanwhile, there are several synonyms and invalid species names in the published taxa of sciaenid aquaculture species. The above situations bring confusion to the taxonomic study and aquaculture production of sciaenid fish. In recent years, DNA barcoding has been suggested as a useful molecular technique to complement traditional taxonomic expertise and provides an important tool for species identification and classification. In this study, we used DNA barcoding for effective identification of juveniles from three cultured sciaenid species (including 15 samples from the same aquaculture system) and confirmed their valid species names. The preliminary identification of the three species was based on the analyses of the external morphology and morphology of the swim bladder and otolith. Meanwhile, we examined the DNA barcode fragment of 610 bp of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (CO I) gene. BLAST searches were performed to identify similar sequences in GenBank. Homologous sequences from closely related species were also included in the comparative analysis and species identification. Phylogenetic relationships among nine species of the family Sciaenidae were reconstructed based on neighbor-joining (NJ) based Kimura-2 parameter (K2P) net genetic distance. It was shown that the results of morphological and DNA barcoding analysis were consistent, indicating that the samples from three species could be identified as *Bahaba taipingensis* (Herre, 1932), *Nibea chui* Trewavas, 1971 and *Protonibea diacanthus* (Lacepède, 1802) respectively. We conclude that DNA barcoding can be used to identify the species of juvenile individuals in the family Sciaenidae and the morphology analysis could play an important supporting role. All the three species in this study have been classified as endangered or vulnerable species in the China Species Red List, and the effective species identification and the clarification of valid species names provide scientific basis for the conservation and utilization of their germplasm resources.

Key words: sciaenid; DNA barcoding; species identification; valid species name

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