

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17360

南极鱼类 DNA 条形码及分子系统进化研究

赵娜^{1,2}, 马春艳¹, 宋炜¹, 冯春雷¹, 王鲁民¹, 张凤英¹, 蒋科技¹, 赵宪勇³, 马凌波¹

1. 中国水产科学研究院东海水产研究所, 上海 200090;

2. 上海海洋大学, 上海 200090;

3. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071

摘要: 本文采用 COI 基因兼引物对 15 种 36 个南极鱼类 DNA 进行扩增测序, 并结合 GenBank 已有序列进行联配分析, 对南极鱼 2 科 22 属 43 种共 97 条 COI 基因片段(539 bp)进行序列比较和系统发生关系研究, 探索了 DNA 条形码技术在辅助鱼类物种鉴定和分类中的适应性与可行性。结果分析表明, 43 种南极鱼科和鳕冰鱼科的鱼类 COI 基因的平均碱基组成为 T: 31.9%、G: 18.3%、A: 22.2%和 C: 27.6%, 具有明显的碱基偏倚性。南极鱼类的种间平均距离为 0.157, 种内平均遗传距离为 0.002, 种间平均遗传距离是种内平均距离的 79 倍; 系统分析结果显示, 除南极小带腭鱼(*Cryodraco antarcticus*)和罗斯海小带腭鱼(*Cryodraco atkinsoni*)外, 其余的鱼类皆能够形成独立的分支, 且与形态学分支一致。由此可见, DNA 条形码对南极鱼亚目鳕冰鱼科和南极鱼科鱼类能够进行有效的物种鉴定, 基于 COI 基因所建的 NJ (neighbor-joining) 树对物种分类具有较为准确的辨识力。系统发生关系表明, DNA 条形码可以对除南极小带腭鱼(*Cryodraco antarcticus*)和罗斯海小带腭鱼(*Cryodraco atkinsoni*)外的南极鱼物种进行鉴定, 不仅可以作为形态学的辅助手段为南极鱼分类系统的必要补充和佐证, 并且可以用于探讨南极鱼类近缘种的系统发育关系。

关键词: DNA 条形码; COI; 系统进化; 南极鱼科; 鳕冰鱼科

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)04-0728-09

DNA 条形码技术(DNA barcoding)指的是通过对一个标准目的基因的 DNA 序列进行分析从而进行物种鉴定的技术^[1]。海洋生物多样性作为生态系统健康的重要指标之一, 是开发利用海洋生物资源的物质基础^[2]。传统的形态学手段在物种分类中存在一定缺陷, 要求样本的完整性并且难以较为相似的物种, DNA 条形码作为辅助手段可有效克服这一缺陷, 逐渐成为新的研究方向和热点。DNA 条形码技术不仅能够在生物的不同生长阶段鉴别物种, 而且能够准确地辨别形态相似性很高的物种^[1]。此外, DNA 条形码作为一个有价值的分子工具, 不仅能够鉴定样本, 并且可以标

记鱼类, 而且能够洞察基因流问题^[3]。南大洋占世界海洋面积的十分之一, 但生物量仅占海洋生物的 1.5%, 由于部分地区受到商业捕捞的影响, 无法准确的认识到动物区系的组成并且怀疑该地区生物量被低估^[3]。由于南极地区与其他地区的地理环境和气候有着巨大的差异, 南极鱼类具有丰富的形态与物种多样性, 这些生物资源是研究系统发育和生物地理学的珍贵的研究材料。

南极鱼科和鳕冰鱼科隶属于脊椎动物门(Vertebrata)、硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲈形目(Perciform)、南极鱼亚目(Notothenoide), 由共同的营底栖生活的祖先进化而来, 是南极海域的原

收稿日期: 2017-09-30; 修订日期: 2018-02-26.

基金项目: 科技部科技基础性工作专项(2013FY110700); 中国水产科学研究院基本科研业务费专项(2014A11); 国家科技支撑计划项目(2013BAD13B03).

作者简介: 赵娜(1991-), 硕士研究生, 研究方向为生物学. E-mail: m13122225387@163.com

通信作者: 马凌波, 研究员, 研究方向为生物学. E-mail: malingbo@vip.sina.com

始种^[4-5]。南极绕极流将整个南极地区和南大洋地区与其他区域分割开来, 环境极其寒冷。新生代期间陆块缓慢漂移, 世间万物也在不断运动之中, 南极鱼亚目鱼类祖先发生了快速进化, 并发展壮大成为南大洋地区的优势物种。南极鱼类具有丰富的形态, 生理和适应的多样性, 具有高度特化的地方性特征^[6]。南极鱼亚目鱼类最为丰富, 是研究进化的良好材料。辐鳍亚纲鱼类的多样性是我们研究脊椎动物的最后一个巨大的挑战, 它们在海洋生态系统中占有重要地位, 如何准确和可靠地识别鱼类是科学研究的基础^[7-8]。

Smith 等^[3]发现南大洋地区物种之间近期发生了分化, 但形态描述仍然是基于较早的描述。在南极海洋生物普查计划(The Census of Antarctic Marine Life, CAML)中, 大部分鱼类的分类工作虽已经完成, 但分类的范围并不完整, 需要进一步开展分子标记手段辅助形态学鉴定的工作^[6]。南大洋海洋鱼类的开发与研究的历史相对较短, 与 FishBase (<http://fishbase.org/>)等国际广泛使用的鱼类分类检索系统相比, 海洋鱼类分类检索系统的内容亟待补充和修正^[9]。本研究以南大洋地区的南极鱼 43 种鱼类为材料, 在形态学分类鉴定的基础上, 测定线粒体 COI 基因序列, 探讨 DNA 条形码在南极鱼类分类中的应用, 弥补传统形态鉴定不足, 丰富条形码数据库, 为其种质资源保护和分类范围完善提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本研究采集来自南大洋地区的伯氏肩孔南极鱼、威氏棘冰鱼、独角雪冰鱼等 10 属 15 种共计 36 个个体作为样本。在进行形态鉴定后, 取背部肌肉组织样品, 使用海洋动物组织基因组 DNA 提取试剂盒(北京, 天根生化科技有限公司)提取总 DNA, -20℃冷冻保存备用。PCR 反应体系为 25 μL, 其中包括上下游引物各 1 μL, Mix dNTP 12.5 μL, 模板 DNA 1 μL, 加双蒸水至总体积 25 μL。上下游引物为实验室设计的简并引物 CFF: TCRACYAAYCAYAAAGAYATYGGCAC, CFR: ACTTCWGGGTGRCCRAAGAATCA。PCR 样品

在 AG-22331 型 PCR 仪(Eppendorf)上进行扩增, 94℃预变性 5 min; 94℃变性 45 s, 52℃退火 1 min, 72℃延伸 60 s, 35 个循环; 72℃延伸 10 min; 4℃保存。扩增产物在使用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测后送至上海杰李生物技术有限公司, 割胶回收正向测序。

1.2 基因序列下载

从 GenBank 下载 19 属 28 种 61 个个体的南极鱼科和鳄冰鱼科鱼类 COI 基因序列, 与本研究 10 属 15 种 36 个个体(GenBank 登录号: MG729450~MG729485)一起分析, 选取本实验室自己扩增的考氏背鳞鱼(*Notolepis coatsi*)(GenBank 登录号: MG742212~MG742213)作为外群。所分析物种 COI 基因及其相关信息如表 1 所示。

1.3 序列分析

利用 BioEdit 生物软件对所获得的序列进行分析, 使用 Clustal X^[10]对序列进行对位排列, 人工核查与校正后, 在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/blast.cgi>)和 BOLD (<http://www.boldsystems.org>)分别进行相似性检索, 结果一致序列进行下一步的分析。使用 MEGA5.1^[11]软件构建邻接法(neighbour-joining, NJ)系统关系树, 系统树的可靠性采用 1000 次重复抽样评估, 并且计算样本的碱基组成、转换颠换频率, 基于 Kimura-2-parameter 模型计算遗传距离。

2 结果与分析

2.1 南极鱼亚目 COI 基因序列特征

本研究共得到南极鱼亚目 10 属 15 种共 36 个个体的部分 COI 序列(约 600 bp)。与 NCBI 中下载南极鱼科和鳄冰鱼科的鱼类进行聚类 and 排序后, 保留共有序列 539 bp。所有 97 个个体的平均碱基含量为: T, 31.9%; G, 18.3%; A, 22.2%; C, 27.6%; A+T (54.1%)明显高于 G+C (45.9%); 平均 GC 含量在鳞头南美南极鱼(*Patagonotothen squamiceps*)(42.1%)和独角冰鱼(*Channichthys rhinoceratus*)(49.0%)之间; 鳄冰鱼科平均 GC 含量(47.7%)明显高于南极鱼科(44.4%)。在 COI 基因序列中, 密码子第一位的各碱基含量基本相同, A-1 含量相对较高, 为 28.4%; 密码子第二位各碱基含量

表 1 南极鱼科与鳄冰鱼科 22 属 43 种鱼类 COI 基本信息
Tab. 1 Information of COI genes of 43 Channichthyidae and Nototheniidae species

序号 No.	物种 species	属名 genus	个数 number	GenBank 序列号 GenBank accession no.
Gp1	独角雪冰鱼 <i>Chionodraco hamatus</i>	雪冰鱼属 <i>Chionodraco</i>	2	MG729458~MG729459
Gp2	龙嘴雪冰鱼 <i>Chionodraco myersi</i>	雪冰鱼属 <i>Chionodraco</i>	2	HQ712914~HQ712915
Gp3	头带冰鱼 <i>Chaenocephalus aceratus</i>	头带冰 <i>Chaenocephalus</i>	3	EU326330~EU326332
Gp4	威氏棘冰鱼 <i>Chaenodraco wilsoni</i>	棘冰鱼属 <i>Chaenodraco</i>	3	MG729452~MG729454
Gp5	裘氏鳄头冰鱼 <i>Champscephalus gunnari</i>	鳄头冰鱼属 <i>Champscephalus</i>	3	JN640600~JN640602
Gp6	独角冰鱼 <i>Channichthys rhinoceratus</i>	冰鱼属 <i>Channichthys</i>	3	JN640610~JN640612
Gp7	雪冰鳐 <i>Chionobathyscus dewitti</i>	雪冰鳐属 <i>Chionobathyscus</i>	3	JN640815~JN640817
Gp8	螯冰鱼 <i>Dacodraco hunteri</i>	螯冰鱼属 <i>Dacodraco</i>	2	HQ712960~HQ712961
Gp9	南极新拟冰鳐 <i>Neopagetopsis ionah</i>	新拟冰鳐 <i>Neopagetopsis</i>	1	MG729450
Gp10	云纹拟冰鳐 <i>Pagetopsis maculatus</i>	拟冰鳐属 <i>Pagetopsis</i>	3	HQ713121~HQ713123
Gp11	大鳍拟冰鳐 <i>Pagetopsis macropterus</i>	拟冰鳐属 <i>Pagetopsis</i>	2	MG729467~MG729468
Gp12	南乔治亚拟冰鱼 <i>Pseudochaenichthys georgianus</i>	拟冰鱼属 <i>Pseudochaenichthys</i>	2	EU326419~EU326420
Gp13	南极小带腭鱼 <i>Cryodraco antarcticus</i>	小带腭鱼属 <i>Cryodraco</i>	3	MG729464~MG729466
Gp14	罗斯海小带腭鱼 <i>Cryodraco atkinsoni</i>	小带腭鱼属 <i>Cryodraco</i>	3	JN640874~JN640876
Gp15	奇南极鳐 <i>Aethotaxis mitopteryx</i>	奇南极鳐属 <i>Aethotaxis</i>	3	JN640756~JN640758
Gp16	海神寒极鱼 <i>Cryothenia amphitreta</i>	寒极鱼属 <i>Cryothenia</i>	1	JQ063170
Gp17	斑条寒极鱼 <i>Cryothenia peninsulae</i>	寒极鱼属 <i>Cryothenia</i>	1	EU326339
Gp18	小牙犬齿南极鱼 <i>Dissostichus eleginoides</i>	犬牙南极鱼属 <i>Dissostichus</i>	2	JN640622~JN640623
Gp19	莫氏犬牙南极鱼 <i>Dissostichus mawsoni</i>	犬牙南极鱼属 <i>Dissostichus</i>	1	MG729451
Gp20	马里恩岛鲷南极鱼 <i>Gobionotothen marionensis</i>	鲷南极鱼属 <i>Gobionotothen</i>	2	KP745352~KP745353
Gp21	尖吻鲷南极鱼 <i>Gobionotothen acuta</i>	鲷南极鱼属 <i>Gobionotothen</i>	2	JN640643~JN640644
Gp22	鲷南极鱼 <i>Gobionotothen gibberifrons</i>	鲷南极鱼属 <i>Gobionotothen</i>	1	MG729463
Gp23	鳞头犬牙南极鱼 <i>Lepidonotothen larseni</i>	雅南极鱼属 <i>Lepidonotothen</i>	4	MG729472~MG729475
Gp24	灰雅南极鱼 <i>Lepidonotothen mizops</i>	雅南极鱼属 <i>Lepidonotothen</i>	2	JN640669~JN640670
Gp25	裸身雅南极鱼 <i>Lepidonotothen nudifrons</i>	雅南极鱼属 <i>Lepidonotothen</i>	2	EU326359~EU326360
Gp26	大鳞雅南极鱼 <i>Lepidonotothen squamifrons</i>	雅南极鱼属 <i>Lepidonotothen</i>	2	JN640672~JN640673
Gp27	革首南极鱼 <i>Notothenia coriiceps</i>	南极鱼属 <i>Notothenia</i>	3	MG729469~MG729471
Gp28	花纹南极鱼 <i>Notothenia rossii</i>	南极鱼属 <i>Notothenia</i>	3	EU326392~EU326394
Gp29	博氏南冰鳐 <i>Pagothenia borchgrevinki</i>	南冰鳐属 <i>Pagothenia</i>	3	GU997397~GU997399
Gp30	新西兰副南极鱼 <i>Paranotothenia magellanica</i>	副南极鱼属 <i>Paranotothenia</i>	1	KF412868
Gp31	冈氏南美南极鱼 <i>Patagonotothen guntheri</i>	南美南极鱼属 <i>Patagonotothen</i>	1	EU326412
Gp32	鳞头南美南极鱼 <i>Patagonotothen squamiceps</i>	南美南极鱼属 <i>Patagonotothen</i>	1	KF412871
Gp33	短吻南美南极鱼 <i>Patagonotothen tessellata</i>	南美南极鱼属 <i>Patagonotothen</i>	3	EU074536~EU074538
Gp34	拉氏南美南极鱼 <i>Patagonotothen ramsayi</i>	南美南极鱼属 <i>Patagonotothen</i>	2	EU074530, EU074533
Gp35	侧纹南极鱼 <i>Pleuragramma antarcticum</i>	侧纹南极鱼属 <i>Pleuragramma</i>	3	MG729455~MG729457
Gp36	伯氏肩孔南极鱼 <i>Trematomus bernacchii</i>	肩孔南极鱼属 <i>Trematomus</i>	5	MG729476~MG729480
Gp37	尼氏肩孔南极鱼 <i>Trematomus nicolai</i>	肩孔南极鱼属 <i>Trematomus</i>	3	MG729483~MG729485
Gp38	汉氏肩孔南极鱼 <i>Trematomus hansonii</i>	肩孔南极鱼属 <i>Trematomus</i>	1	MG729481
Gp39	纽氏肩孔南极鱼 <i>Trematomus newnesi</i>	肩孔南极鱼属 <i>Trematomus</i>	1	MG729482
Gp40	真鳞肩孔南极鱼 <i>Trematomus eulepidotus</i>	肩孔南极鱼属 <i>Trematomus</i>	3	MG729460~MG729462
Gp41	彭氏肩孔南极鱼 <i>Trematomus pennellii</i>	肩孔南极鱼属 <i>Trematomus</i>	2	HQ713271~HQ713272
Gp42	斯氏肩孔南极鱼 <i>Trematomus scotti</i>	肩孔南极鱼属 <i>Trematomus</i>	2	HQ713281~HQ713282
Gp43	托氏肩孔南极鱼 <i>Trematomus tokarevi</i>	肩孔南极鱼属 <i>Trematomus</i>	2	HQ713352~HQ713353

差异最大, T-2 含量最高(43%); 相对来说, 密码子第三位的各碱基含量差异较大, T-3 含量相对较高为 33%; 总体来说, 第 1 个密码子位点的 G+C 含量(51.3%)明显高于第 2 和第 3 密码子位点(42.0%和 44.0%)(表 2)。所有个体的密码子碱基变异情况如表 3 所示。在总共 539 个位点中变异位点共有 206 个(38.21%), 转换位点有 153 个(74.27%), 颠换位点有 53 个(25.73%)。密码子碱基变异中第 3 密码子位点变异位点最多(110 个), 转换和颠换的位点均属第 3 密码子位点最多, 分别为 90 个和 20 个。鳕冰鱼科和南极鱼科鱼类的第一位和第三位密码子转换与颠换比分别为 9.94 和 4.43, 均大于 2.0, 以后的遗传变异会向着颠换发展; 第二位密码子转换与颠换比为 0.02, 小于 2.0, 遗传变异会向着转换方向发展; 就整体而言转换颠换比大于 2.0, 序列位点没有突变饱和, 可用于系统树的构建分析, 鱼类以后的遗传变异会向着颠换方向^[11]。

表 2 鳕冰鱼科和南极鱼科 43 种鱼 97 个个体的 COI 基因部分序列中各碱基平均分布频率

Tab. 2 Average nucleotide frequencies of COI partial sequences of 43 species in Channichthyidae and Nototheniidae %

碱基 base	总频率 frequency	密码子 第 1 位点 1 st site of codon	密码子第 2 位点 2 nd site of codon	密码子 第 3 位点 3 rd site of codon
T	31.9	20.3	43.0	33.0
C	27.6	23.1	29.0	30.6
A	22.2	28.4	15.0	23.0
G	18.3	28.2	13.0	13.4

表 3 鳕冰鱼科和南极鱼科 43 种鱼 97 个个体的 COI 部分序列各密码子碱基变异情况

Tab. 3 Sequences variation of COI gene of 43 species in Channichthyidae and Nototheniidae

密码子位点 codon site	变异位点/个 variation site	转换/% conversion	颠换/% transversion	转换/ 颠换 R=si/sv
第 1 位点 1 st site	27	90.86	9.14	9.94
第 2 位点 2 nd site	9	1.74	98.26	0.02
第 3 位点 3 rd site	170	81.59	18.41	4.43
全部位点 all sites	206	73.61	26.39	2.79

2.2 种间及种内的遗传距离

使用 MEGA5.1, 基于 Kimura-2-parameter 计算南极鱼亚目两个科 43 种鱼类的种内和种间遗

传距离。由表 4 可知, 39 种南极鱼亚目鱼类种内遗传距离平均值为 0.002, 种间遗传距离平均值为 0.157, 种间遗传距离是种内的 79 倍, 表明 DNA 条形码对 39 种南极鱼科和鳕冰鱼科鱼类是适用的。

表 4 不同分类阶元遗传距离(K2P)统计表

Tab. 4 Summary of genetic divergences (K2P) within various taxonomic levels

比较范围 coverage	最小值 minimum	最大值 maximum	平均值 average	标准差 standard deviation
种内 species	0	0.0075	0.0023	0.01982
同属种间 among species within genus	0.0310	0.2330	0.1567	0.05611
同科属间 among genera within family	0.0260	0.0914	0.0654	0.02495

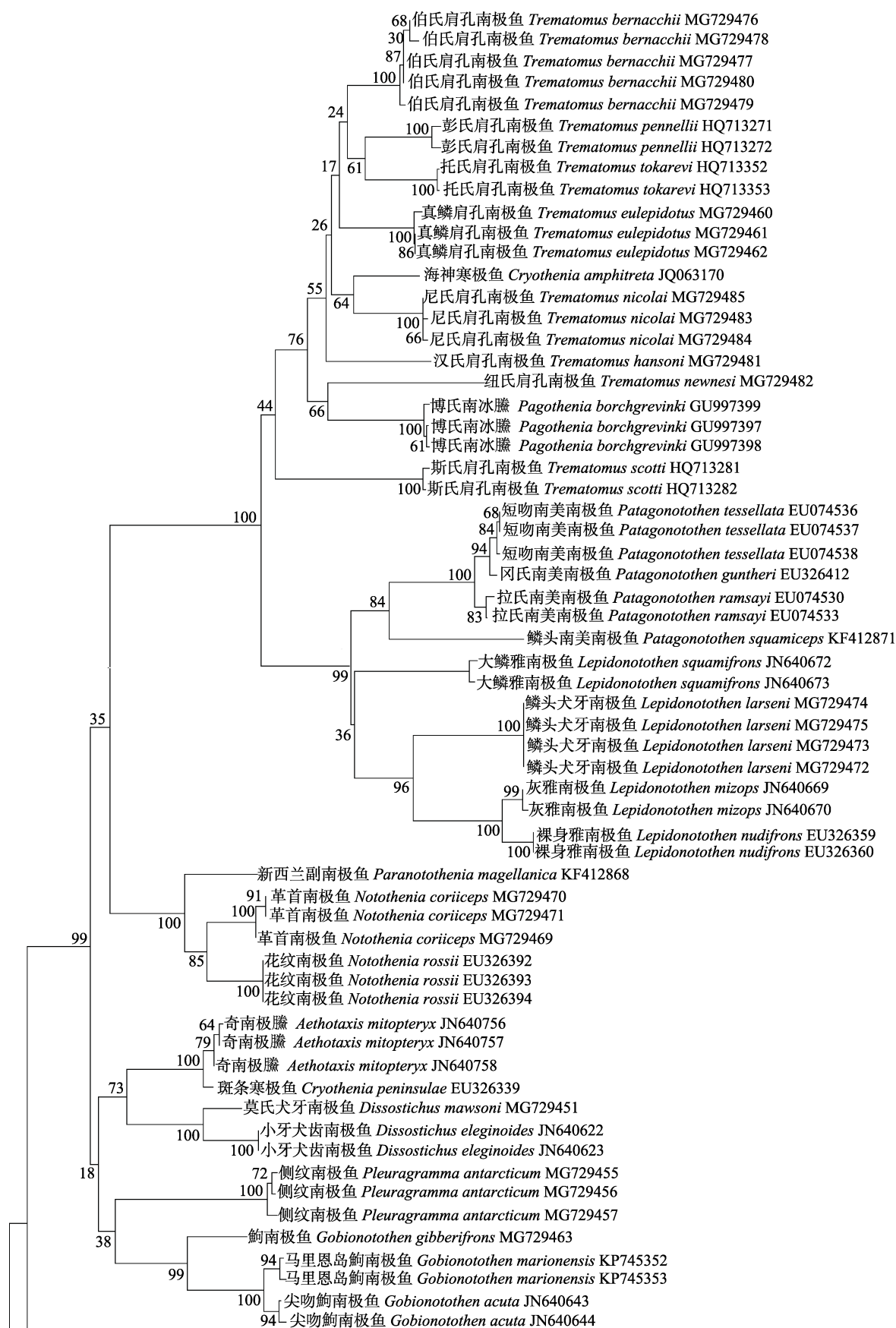
鳕冰鱼科种间遗传距离最大的是裘氏鳕头冰鱼和云纹拟冰鳕, 为 0.111; 遗传距离最小的是南极小带腭鱼和罗斯海小带腭鱼, 为 0.002; 所有的鳕冰鱼科鱼类的种内遗传距离均小于 0.020。南极鱼科种间遗传距离最大的是裸身雅南极鱼和侧纹南极鱼, 为 0.239; 遗传距离最小的是奇南极鳕和斑条寒极鱼, 仅为 0.009, 南极鱼科的种内遗传距离均小于 0.020。相比较而言, 鳕冰鱼科各种鱼类之间遗传距离较小, 南极鱼科各个鱼类之间遗传距离较大。

2.3 鳕冰鱼科和南极鱼科分类及分子系统树

对南极鱼亚目两个科 22 属 43 种鱼类的 97 个 COI 基因序列构建 NJ 树, 进行了 1000 次自展分支检验, 结果如图 1 所示。就整个系统树来看, 除南极小带腭鱼和罗斯海小带腭鱼外, 其余的鱼类皆能够形成独立的分支, 具有较高的节点支持率, 且与形态学分支一致, 进一步证明条形码 COI 除以上物种的适用性和可行性。NJ 树结果显示, 南极鱼科和鳕冰鱼科分为两个大支, 海神寒南极鱼在形态学分支上属于寒极鱼属, 但在分子树上跟肩孔南极鱼属与博氏南冰鳕属聚为一支, 其他各个属聚为一支且支持率较高。

3 讨论

Ward 等^[12]分析了 207 种鱼类的 COI 基因序



(待续 to be continued)

(续图 1 Fig.1 continued)

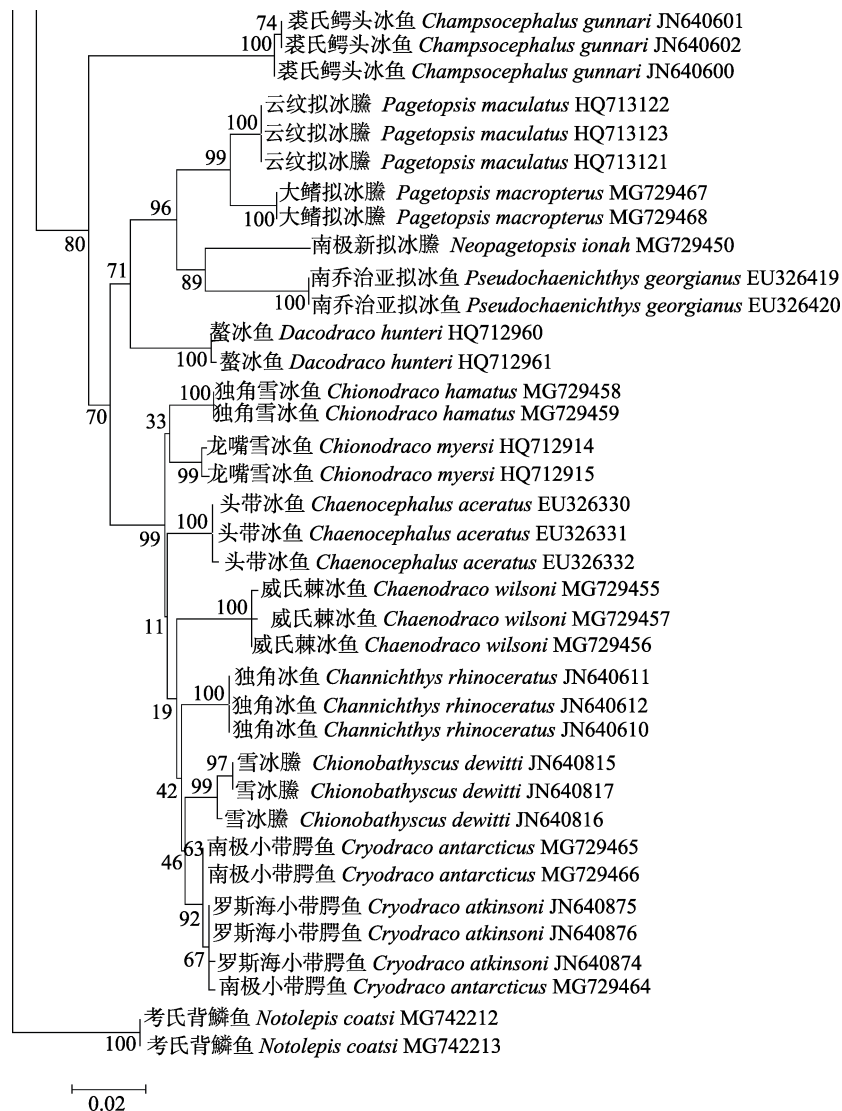


图 1 NJ 法构建的鳄冰鱼科和南极鱼科系统树

节点上数字显示 1000 次重复的 bootstrap 验证分析中支持率, 标尺代表遗传距离单位为 0.02/百万年。

Fig. 1 NJ tree resulting from analysis of COI gene data of 43 Channichthyidae and Nototheniidae species

Bootstrap value in 1000 replications are shown on branches. The scale represents the genetic distance of 0.02/million years.

列, AT 平均含量高于 GC 平均含量, 其中 143 种硬骨鱼类的 COI 序列第 1 密码子的 GC 平均含量最高, 并且第 3 密码子 GC 含量最低; 彭居俐等^[13]的研究表明 COI 基因序列的第 1 密码子位点 GC 含量在鲤鲷科属 4 种鱼类 32 个体中也最高, 同样的第 3 密码子 GC 含量也是最低; 柳淑芳等^[14]发现石首鱼科鱼类的 COI 碱基序列第 2 密码子 GC 含量最高, 第 3 密码子 GC 含量最低。本研究中, 43 种南极鱼 97 个个体 A+T(54.1%)明显高于 G+C(45.9%), 第 1 密码子的 GC 含量明显高于第 2

和第 3 密码子(42.0%和 44.0%), 第 1 密码子的 GC 含量最高(51.3%), 这与 Ward 等^[12]和彭居俐等^[13]的研究结果一致而 43 种南极鱼的第 2 位密码子的 GC 含量最低, 与上述报道结果所有差异, 这种差异是否为南极鱼类的特有现象, 有待于进一步研究。

种间的序列差异是否足够大是能否将物种准确鉴定的先决条件^[13]。Hebert 等^[12]通过对 11 个门 13320 个物种进行分析发现大部分物种的种内遗传距离小于 0.010, 很少有大于 0.020 的, 鉴定条形码 COI 可行性的关键标准是种间的遗传距

离必须大于种内的遗传距离的 10 倍以上^[15-16]。本研究中南极鱼亚目两个科 39 种鱼类种内遗传距离平均值为 0.002, 种间遗传距离平均值为 0.157, 种间遗传距离是种内的 79 倍, 由此可以说明, COI 基因序列能够对 39 种鱼类进行有效的物种鉴定。

南极小带腭鱼和罗斯海小带腭鱼的种间遗传距离为 0.002, 奇南极鳕和斑条寒极鱼种间遗传距离为 0.009。分子系统树显示, 南极小带腭鱼和罗斯海小带腭鱼这两个同属物种无法通过条形码 COI 序列区别开, 这与 Smith^[3]的研究结果一致。La 等^[17]研究了更多的样本, 发现二者皆是环南大洋分布。Near 等^[18]利用线粒体 3 个基因得出二者有分支, 但并没有提供 COI 序列。因此, 需要进一步进行核基因线粒体基因联合分析, 辅以形态学和细胞学证据来对二者分类地位进行有效的确定。奇南极鳕和斑条寒极鱼的遗传距离(0.009)较近, 没有达到种水平分化, 两种鱼类较为稀少, 缺乏样本来进行形态方面的进一步证实, 二者之间的关系有待进一步研究。Balushkin^[19]、Iwami^[20]和 Bargelloni^[21]利用形态特征研究了鳕冰鱼科内部系统发育关系, Chen 等^[22]利用线粒体 Cyt *b* 序列也研究了鳕冰鱼科内部系统发育关系, 本研究得到系统树与 Chen 等^[22]一致, 与 Iwami^[20]和 Bargelloni^[21]的推断非常相似仅在头带冰鱼位置有所差别。研究方法和取样的不同会导致系统树拓扑结构的差异, 为了更好地研究鱼类的系统发育关系建议将多种手段一起分析, 形成一个更具有一致性的系统树。

本研究利用 DNA 条形码 COI 基因对南大洋地区的鳕冰鱼科和南极鱼科的鱼类的物种分子鉴定的可行性与有效性。研究结果显示南极鱼亚目南极鱼科和鳕冰鱼科的鱼类与大多数硬骨鱼类一致第 1 密码子的 GC 含量较第 2、第 3 位密码子较高, 符合硬骨鱼类线粒体序列特征, 条形码 COI 适用于南极鱼亚目的鳕冰鱼科和南极鱼科除南极小带腭鱼与罗斯海小带腭鱼、奇南极鳕和斑条寒极鱼外的鱼类, 具有一定程度上的可行性与适用性, 可用于辅助形态鉴定, 探讨南极鱼类近缘种的系统发育关系。

参考文献:

[1] Peng J L, Wang X Z, Heng S P, et al. The progress and ap-

plication of DNA barcoding[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2008, 32(6): 916-919. [彭居俐, 王绪桢, 何舜平, 等. DNA 条形码技术的研究进展及其应用[J]. *水生生物学报*, 2008, 32(6): 916-919.]

- [2] Shen G Y, Huang L F, Guo F, et al. *Marine Ecology* (3rd edition)[M]. Beijing: Science Press, 2010. [沈国英, 黄凌风, 郭丰, 等. *海洋生态学*: 第 3 版[M]. 北京: 科学出版社, 2010.]
- [3] 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.
- [4] Xu Q H, Wu Z C, Chen L B. Biodiversity and adaptive evolution of Antarctic notothenioid fishes[J]. *Biodiversity Science*, 2014, 22(1): 80-87. [许强华, 吴智超, 陈良标. 南极鱼类多样性和适应性进化研究进展[J]. *生物多样性*, 2014, 22(1): 80-87.]
- [5] Andriashev A P. A general review of the Antarctic fish fauna[J]. *Monograph Biology*, 1965, 15: 491-550.
- [6] 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 II*, 2011, 58(1-2): 250-263.
- [7] Bely A, Weisblat D A. Lessons from leeches: a call for DNA barcoding in the lab[J]. *Evolution and Development*, 2006, 8(6): 491-501.
- [8] Bortolus A. Error cascades in the biological sciences: The unwanted consequences of using bad taxonomy in ecology[J]. *AMBIO*, 2008, 37(2): 114-118.
- [9] Wang Z D, Guo Y S, Chen R L, et al. CO I barcoding sequences of teleosts in the south china sea[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2009, 40(5): 608-614. [王中铎, 郭昱嵩, 陈荣玲, 等. 南海常见硬骨鱼类 CO I 条码序列[J]. *海洋与湖沼*, 2009, 40(5): 608-614.]
- [10] Avise J C. The history and purview of phylogeography: a personal reflection[J]. *Molecular Ecology*, 1998, 7(4): 371-379.
- [11] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [12] Ward R D, Zemlak T S, Innes B H, et al. DNA barcoding Australia's fish species[J]. *Philosophical Transactions: Biological Science*, 2005, 360(1462): 1847-1857.
- [13] Peng J L, Wang X Z, Wang D, et al. Application of DNA barcoding based on the mitochondrial CO I gene sequences in classification of Culter (pisces: cyprinidae)[J]. *Acta Hy-*

- drobiologica Sinica, 2009, 33(2): 271-276. [彭居俐, 王绪祯, 王丁, 等. 基于线粒体 CO1 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.]
- [14] 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.]
- [15] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identification through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society of London B, 2003, 270: 313-321.
- [16] Hebert P D N, Ratnasingham S, Waard J R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. Proceedings of the Royal Society B, 2003, 270: 96-99.
- [17] La Mesa M, Vacchi M, Iwami T, et al. Taxonomic studies of the Antarctic icefish genus *Cryodraco* Dollo, 1990 (Notothenioidei: Channichthyidae)[J]. Polar Biology, 2002, 25(5): 384-390.
- [18] Near T J, Pesavento J J, Cheng C H C. Mitochondrial DNA, morphology, and the phylogenetic relationships of Antarctic icefishes (Notothenioidei: Channichthyidae)[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2003, 28(1): 87-98.
- [19] Balushkin A V. Morphology, classification, and evolution of notothenioid fishes of the Southern Ocean (Notothenioidei, Perciformes)[J]. Journal of Applied Ichthyology, 2000, 40: 74-109.
- [20] Iwami T. Osteology and relationships of the family Channichthyidae[J]. Memoirs of the National Institute of Polar Research, 1985, 36: 1-69.
- [21] Bargelloni L, Marcato S, Zane L, et al. Mitochondrial phylogeny of notothenioids: a molecular approach to Antarctic fish evolution and biogeography[J]. Systematic Biology, 2000, 49(1): 114-129.
- [22] Chen W J, Bonillo C, Lecointre G. Phylogeny of the Channichthyidae (Notothenioidei, Teleostei) based on two mitochondrial genes[M]// di Prisco G, Pisano E, Clarke A (Eds.). Fishes of Antarctica: A Biological Overview. Berlin: Springer, 1998: 287-298.

DNA barcoding, classification, and phylogeny of Antarctic fishes

ZHAO Na^{1,2}, MA Chunyan¹, SONG Wei¹, FENG Chunlei¹, WANG Lumin¹, ZHANG Fengying¹, JIANG Keji¹, ZHAO Xianyong³, MA Lingbo¹

1. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090, China;

2. Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China;

3. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China

Abstract: The Southern Ocean accounts for 10% of the world's oceans, but has a relatively low species richness. Some areas have been subject to commercial fishing, and the species compositions and population structures have been underestimated. As a promising tool, DNA barcoding has advanced to aid species identification and discovery. Even for experts, despite extensive taxonomic studies, the identification of fishes can be problematic for many reasons. In the present study, 43 Antarctic fish species were identified and analyzed using DNA barcoding, and the data obtained was examined. We collected and morphologically identified specimens from the Southern Ocean during 2013 and 2016. In total, 97 individuals from 43 species pertaining to 22 genera of Notothenioidei and Channichthyidae were barcoded using the COI gene, sequenced, and compared with that of other species recorded in GenBank and the Barcode of Life Data System (BOLD). Our results indicated that the mean T, G, A, and C contents were 31.9%, 18.3%, 22.2%, and 27.6%, the GC content of codon position 1 averaged 51.3%, that of position 3 averaged 44.0%, and that of position 2 averaged 42.0%. Therefore, the COI sequences of Antarctic fishes were obviously base biased. The average value of transition/transversion ratios was 2.79. Using the Kimura-2-parameter model, the mean genetic distance among pairwise species (0.157) was calculated as 79 times higher than that within species (0.002). From the phylogenetic tree, 41 species, except *Cryodraco antarcticus* and *Cryodraco atkinsoni*, were clustered, which suggested that COI barcoding could effectively be used to identify the remaining 41 species. But, COI barcoding provided limited phylogenetic resolution of *C. antarcticus* and *C. atkinsoni*, since they shared COI haplotypes. The similarity in results indicated that we should develop multigene barcode technology to overcome the deficiency of the single COI gene sequence. For the two species, *C. antarcticus* and *C. atkinsoni*, that were difficult to distinguish using DNA barcoding, we need more samples to analyze their phylogenetic relationships, including morphological, cytological, and molecular evolution. Although this study compared the results with that of other studies, we found that different methods and sampling could lead to different results. To determine more comprehensive phylogenetic relationships of fishes, we need to analyze a variety of methods together to form more consistent results. During the course of the study, we found that for some sister species or recently differentiated subspecies, COI barcoding mostly can not be separated, and mitochondrial and nuclear genes should be analyzed together.

Key words: DNA barcode; COI; phylogeny; Notothenioidei; Channichthyidae

Corresponding author: MA Lingbo. E-mail: malingbo@vip.sina.com