

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.18036

线粒体 COI 基因条形码在鲮科鱼类物种鉴定中的应用

梁宏伟^{1,2}, 孟彦¹, 罗相忠¹, 李忠¹, 邹桂伟¹

1. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 武汉 430223;
2. 农业农村部水生动物基因组学重点实验室, 湖北 武汉 430223

摘要: 为了探讨线粒体 COI 基因作为 DNA 条形码在中国鲮科(Bagridae)鱼类物种鉴定中的有效性, 以及系统发育中的适用性, 本研究对 4 属 11 种鲮科鱼类进行 PCR 扩增, 获得 48 条线粒体 COI 基因序列, 同时从 GenBank 筛选获得 8 种鲮科鱼类的 12 条 COI 基因序列进行分析。19 种鲮科鱼类的 COI 基因序列特征显示: 长度为 674 bp 的 COI 序列片段平均碱基组成为 24.82% A, 30.44% T, 27.10% C 和 17.64% G, 碱基组成呈现明显的 AT 偏倚性(55.26%), 具有硬骨鱼类的线粒体 COI 基因的碱基组成的典型特征。核苷酸位点中有变异位点 226 个, 简约信息位点 195 个, 单一信息位点 31 个, 转换颠换比为 3.35。19 种鲮科鱼类的种内、种间和属间平均遗传距离分别为 0.0041、0.1136 和 0.1268, 种间遗传距离平均为种内遗传距离的 27.7 倍。在本研究中, 鲮科鱼类所有的物种均形成单系, 在物种鉴别上与形态学分类结果基本一致, 然而鲮科的 4 个属中只有鳊属形成单系, 黄颡鱼属、鮡属和拟鲮属均未形成单系, 其进化地位需要进一步研究。线粒体 COI 基因作为条形码可有效对鲮科鱼类进行物种鉴定, 也为鲮科的系统发育提供了参考。

关键词: 鲮科; DNA 条形码; COI 基因; 物种鉴定; 系统发育

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)04-0772-11

鲮科(Bagridae)属于硬骨鱼纲(Osteichthyes)、鲇形目(Siluriformes), 包括中国、日本、朝鲜半岛、越南北部和西伯利亚东部 4 个属的 40 多种鱼类, 广泛分布在亚洲的淡水水域中^[1]。1999 年出版的《中国动物志 硬骨鱼纲 鲇形目》中首次系统记载, 中国鲇形目鲮科由黄颡鱼属、鮡属、拟鲮属和鳊属的 4 属 30 种鱼类组成, 随后也陆续有一些新的种被发现和记录^[2-4]。一直以来, 鲮科鱼类主要以可数性状和可量性状等形态特征为主要依据, 再综合一些内部结构特点进行分类鉴定。程建丽等^[4]基于形态和骨骼特征分析确定仅分布于长江上游的中国凹尾拟鲮为鲮科的一个有效种。俞纯方等^[5]利用乳酸脱氢酶(LDH)对鲮科的瓦氏黄颡鱼、光泽黄颡鱼、粗唇鮡和大鳍鳊四种鱼进行比

较分析后发现, 这 4 种鱼的血清同工酶 LDH 图谱具有种间特异性。尽管科研人员运用形态特征、骨骼特征和同工酶酶谱等对鲮科鱼类的分类进行了相关研究, 然而, 截至目前, 一些鲮科鱼类的分类地位和系统进化关系仍然模糊不清, 存在一定的疑问^[6]。传统的鱼类分类需要对大量标本的可量和可数性状进行统计和测量, 但是, 随着生态环境恶化和人为活动干扰等因素的加剧, 众多渔业资源遭受到严重破坏, 导致对鱼类标本收集的难度增加, 尤其是对于那些固有资源量较少的鱼类而言, 标本采集更是难上加难。另外, 由于个体差异、性别差异和地理环境差异等因素的影响, 在传统鱼类分类鉴定时极易造成相似种的混淆; 此外, 还有一些鱼类原产地、性状等历史信

收稿日期: 2018-01-27; 修订日期: 2018-05-11.

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); 国家水产种质资源共享服务平台(2018DKA30470).

作者简介: 梁宏伟(1978-), 男, 博士, 副研究员, 从事水产种质资源与遗传育种研究. E-mail: lianghw@yfi.ac.cn

通信作者: 邹桂伟, 研究员, 从事水产动物遗传育种研究. E-mail: zougw@yfi.ac.cn

息描述不清, 亦或模式物种标本缺失, 诸如此类因素都增加了利用传统方法对鱼类分类鉴定的难度。因而, 之前单一的形态学鉴定已经无法满足鱼类近缘物种鉴定的需求, 选择一种更为有效、便捷的鱼类鉴定方法, 并将其用于分类和进化研究已经成为必需。

DNA 条形码(DNA barcoding)是一种在分子水平辅助物种鉴定的技术, 主要就是利用一段在种内保守而种间具有明显差异的 DNA 序列片段进行物种鉴定, 该技术自 2003 年被 Hebert 等^[7]提出至今得到了飞速发展。DNA 条形码在海洋鱼类的鉴别上可准确到已描述物种的 98%, 淡水鱼类的鉴别准确率达 93%^[7]。国际上也建立了 FISH-BOL 数据库(Fish Barcode of Life, <http://www.fishbol.org>), 旨在规范性地收集全世界鱼类的 DNA 条形码^[8]。线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 I (cytochrome c oxidase subunit I, COI)基因 5'端有一段约 650 bp 的序列, 具有进化速率高、种间变异明显而种内相对保守、且引物通用性好和易于扩增的特点, 已经作为有效的 DNA 条形码被广泛地用于物种的分类鉴定和进化分析^[9-11], 该基因不仅可以用于鉴定难以区分的近缘种、发现未知种和探索隐在种^[12], 而且还可以用于鱼类等生物类群的遗传多样性分析和系统进化分析方面^[13-14]。迄今为止, 基于 COI 基因的 DNA 条形码技术在鲱形目、鲉形目、鲷科和舌鳎亚科等鱼类上的分类鉴定及系统进化中得到了应用, 并取得了良好的研究结果^[15-18]。

鳢科作为鱼类系统中的一个重要分类单元之一, 也有部分研究利用 *cyt b* 基因和线粒体 DNA 控制区等用于鳢科物种鉴定和系统进化关系研究, 但部分鳢科鱼类的系统发育关系仍未得到一致结论^[19-20], 而在鳢科鱼类中, 利用线粒体 COI 基因作为 DNA 条形码对中国鳢科鱼类进行分类鉴定的研究还比较匮乏。本研究旨在通过对鳢科 4 属 19 种鱼类线粒体 COI 基因的序列进行分析, 验证基于 COI 基因 DNA 条形码在鳢科鱼类中作为物种鉴定和系统发育研究的有效性, 以期对鳢科鱼类的物种鉴定和系统发育提供支撑。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用的样本于 2013 年 6 月至 2017 年 7 月分别采集于长江水系的重庆、云阳、宜宾、宜昌、荆州等江段。采集样品经初步形态学鉴定后, 用无水乙醇保存标本并存放于中国水产科学研究院长江水产研究所长江流域渔业生物标本库。形态学的分类鉴定参考《中国动物志 硬骨鱼纲 鲇形目》^[3]、《中国鱼类系统检索》^[21]、《鱼类分类学》^[22], 经鉴定采集的 48 份样本分属于鳢科的 4 属 11 种鱼类(表 1)。

1.2 DNA 的提取、COI 基因扩增及测序

取采集样本的肌肉组织, 用本实验室改进的高盐法进行基因组 DNA 提取^[23], 提取基因组 DNA 经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测后置于-20℃冰箱保存备用。线粒体 COI 基因 PCR 扩增引物为鱼类 DNA 条形码 COI 基因的通用引物 COI-1F/COI-1R, 并在通用引物两侧加 M13 接头, 目的片段长度约为 680 bp。引物序列为 MCOI-1F: GTAAAACGACGGCCAGTCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC; MCOI-1R: CAGGAAACAGCTATGACACCTCAGGGTGTCCGAARAATCARAA。引物由武汉天一辉远生物科技有限公司合成。PCR 扩增反应总体积为 25 μL, 包含 10×PCR Buffer 2.5 μL, 0.25 mmol/L dNTP 2 μL, *Taq* DNA 聚合酶(TaKaRa) 1 U, 0.2 mmol/L 上下游引物各 1 μL, 模板 DNA 50 ng, 由超纯水补足体系。PCR 扩增程序为: 94℃预变性 5 min; 然后 35 个循环, 每个循环 94℃ 30 s, 52℃ 45 s, 72℃ 50 s; 最后 72℃延伸 10 min, 4℃保存。扩增产物经 2.0%的琼脂糖凝胶电泳检测后, 送至武汉天一辉远生物科技有限公司进行双向测序。

1.3 鳢科 COI 基因序列的获取

从 NCBI 的 GenBank 数据库下载分析所用的鳢科鱼类线粒体 COI 基因序列, 比对分析后选取与本研究扩增序列对应的 COI 基因片段序列, 共计从数据库中获得中国鳢科 8 种鱼类的 12 条 COI 序列片段, 并通过 FISH-BOL 数据库进行序列的准确性验证, 通过 FishBase 数据库进行物种名的有效性验证。结合本研究中扩增得到的 48 条 COI

表 1 本研究 19 种鲮科鱼类 COI 基因信息
Tab. 1 COI gene information of 19 Bagridae species in this study

属 genus	物种 species	采集地 locations	编号 No.	样品数 number	GeneBank 序列号 GeneBank accession No.
黄颡鱼属 <i>Pelteobagrus</i>	黄颡鱼(<i>Pelteobagrus fulvidraco</i>)	荆州	Pfu	10	MH317141~MH317150
	瓦氏黄颡鱼(<i>Pelteobagrus vachellii</i>)	荆州	Pva	5	MH317151~MH317155
	光泽黄颡鱼(<i>Pelteobagrus nitidus</i>)	荆州	Pni	10	MH317156~MH317165
	长须黄颡鱼(<i>Pelteobagrus eupogon</i>)	宜昌	Peu	3	MH317166~MH317168
	中间黄颡鱼(<i>Pelteobagrus intermedius</i>)		Pin	1	KY962416
鲮属 <i>Leiocassis</i>	长吻鲮(<i>Leiocassis longirostris</i>)	荆州	Llo	6	MH317171~MH317176
	粗唇鲮(<i>Leiocassis crassilabris</i>)	云阳	Lcr	2	MH317169~MH317170
拟鲮属 <i>Pseudobagrus</i>	切尾拟鲮(<i>Pseudobagrus truncatus</i>)	荆州	Ptru	4	MH317181~MH317184
	乌苏拟鲮(<i>Pseudobagrus ussuriensis</i>)	宜宾	Pus	2	MH317185, MH317186
	中臀拟鲮(<i>Pseudobagrus medianalis</i>)	重庆	Pme	1	MH317187
	短尾拟鲮(<i>Pseudobagrus brevicaudatus</i>)	荆州	Pbr	1	MH317188
	盎堂拟鲮(<i>Pseudobagrus ondon</i>)		Pon	3	KJ960303, KJ530689, NC_022725
	白边拟鲮(<i>Pseudobagrus albomarginatus</i>)		Pal	1	NC_022726
	三线拟鲮(<i>Pseudobagrus trilineatus</i>)		Ptri	1	NC_022705
	凹尾拟鲮(<i>Pseudobagrus emarginatus</i>)		Pem	1	NC_024279
	圆尾拟鲮(<i>Pseudobagrus tenuis</i>)		Pte	1	NC035498
鲮属 <i>Hemibagrus</i>	大鳍鲮(<i>Hemibagrus macropterus</i>)	荆州	Hma	4	MH317177~MH317180
	丝尾鲮(<i>Hemibagrus nemurus</i>)		Hne	2	KM454860.1, NC_024273.1
	斑鲮(<i>Hemibagrus guttatus</i>)		Hgu	2	NC_023976.1, KJ584373.1

注: MH317141~MH317188 为本研究克隆的序列。

Note: MH317141~MH317188 sequences were obtained in this study.

基因条形码序列, 最终共获得 4 属 19 种 60 条鲮科鱼类的 COI 基因序列, 具体信息如表 1 所示。

1.4 数据分析

利用 DNASTar 软件包和 Clustal W 软件对本研究所用序列进行比对, 校正除去两端冗余序列。用 DnaSP 5.10 软件计算序列的简约信息位点 (Pi)、保守位点 (C)、变异位点 (V) 等参数; 用 MEGA7.0 计算 COI 基因序列的碱基组成、序列间的碱基变异频率、序列的转换和颠换频率及比率等。基于 K2P (Kimura 2-parameter) 双参数替代模型计算种内、种间和属间的遗传距离, 采用邻接法 (Neighbor-Joining, NJ) 构建系统发育树, 并进行 1000 次自展检验 (bootstraps) 检测置信度。基于 Modeltest 3.7 软件进行最佳替代模型的选择, 并利用选择的 GTR+I+G 模型, 运行 2000000 代进行贝叶斯推断法构建系统发育树。

2 结果与分析

2.1 COI 基因序列特征与变异分析

通过实验获得 48 条线粒体 COI 基因条形码

序列 (GenBank 号为 MH317141~MH317188), 再结合下载的 12 条已知 COI 基因序列, 本研究共获得 4 属 19 种鲮科鱼类 60 条线粒体 COI 基因同源片段序列, 经比对分析选取长度为 674 bp 的序列片段, 该序列片段位于 COI 基因 5' 端。序列分析表明, 在 674 个序列位点中未发现碱基的插入和缺失; 有变异位点 226 个, 占总序列长度的 33.5%; 简约信息位点 195 个, 占 28.9%; 单一信息位点为 31 个。序列中 A、T、C 和 G 四种碱基的平均含量分别为 24.82%、30.44%、27.10% 和 17.64%, A+T 含量为 55.26%, 高于 G+C 含量 (44.74%), 碱基组成呈现明显的 AT 偏倚性 (表 2)。第一密码子的 GC 含量变化幅度较大, 为 30.67%~43.56%, 平均含量为 34.24%; 第二密码子 GC 含量显著高于第一密码子, 平均含量为 57.02% (55.11%~57.78%); 第三密码子碱基含量变化最稳定 (42.71%~43.30%), 平均含量为 42.96% (表 3)。获得的基因序列中全部位点中不变位点有 611 个, 转换位点和颠换位点分别为 48 个和 14 个; 其中第三密码子的不变位点最多, 为 223 个; 第一密码子的转换和颠换

表2 鲮科 19 种鱼 COI 基因序列碱基组成
Tab. 2 Nucleotide composition of COI sequences of 19 Bagridae catfishes %

碱基 base	平均 average	密码子第 1 位点 1 st codon	密码子第 2 位点 2 nd codon	密码子第 3 位点 3 rd codon
A	24.82	34.78	24.00	15.63
T	30.44	30.98	18.98	41.41
C	27.10	28.03	25.06	28.23
G	17.64	6.21	31.96	14.73

表3 鲮科 19 种鱼 COI 基因密码子位点 GC 含量
Tab. 3 GC content of COI sequences of 19 Bagridae catfishes in different codon positions %

种 species	GC 含量 GC content			
	1 st 位点 1 st codon	2 nd 位点 2 nd codon	3 rd 位点 3 rd codon	全部位点 all codons
Pfu	42.13	56.89	43.30	47.45
Pva	31.46	56.89	42.86	43.74
Pni	30.67	57.69	42.81	43.72
Peu	31.70	57.48	42.71	43.97
Pin	43.11	56.44	43.30	47.63
Llo	32.00	57.70	42.85	44.19
Lcr	31.11	57.78	42.85	44.21
Ptru	30.67	57.78	42.85	43.77
Pus	32.67	56.00	43.0	43.84
Pme	43.56	56.44	43.30	47.77
Pbr	33.33	57.33	42.85	44.51
Pon	41.19	55.56	42.85	46.69
Pal	33.33	57.78	43.30	44.51
Ptri	37.33	55.11	42.85	45.10
Pem	33.77	56.44	42.85	44.36
Pte	33.33	57.78	42.85	44.66
Hma	31.33	56.44	42.85	43.54
Hne	31.44	56.00	42.85	43.47
Hgu	31.11	56.00	42.85	43.32
全部 total	34.24	57.01	42.95	44.74

位点最多, 分别为 41 个和 14 个; 第三密码子位点最为稳定, 碱基转换与颠换的比值为 3.35, 转换明显多于颠换。

2.2 鲮科鱼类遗传距离分析

利用 MEGA 7.0 计算基于 K2P 双参数模型的鲮科 4 属 19 种鱼类的遗传距离(表 4)。结果表明, 19 种鲮科鱼类种内遗传距离为 0~0.0096, 平均值为 0.0041, 种内遗传距离均明显小于 Hebert 提出的 0.02 的标准。种间遗传距离为 0.0060~0.1942,

平均值为 0.1136, 种间平均遗传距离是种内平均遗传距离的 27.7 倍, 大部分鲮科鱼类种间遗传距离均大于种内遗传距离的 10 倍以上, 4 个属的属间平均遗传距离为 0.1268。同时, 在黄颡鱼属和鮠属也有部分鱼类之间的遗传距离小于种内遗传距离的 10 倍。种间遗传距离比种内遗传距离小于 10 的物种对有: 光泽黄颡鱼与瓦氏黄颡鱼(7.7)、光泽黄颡鱼与长须黄颡鱼(6.1)、长须黄颡鱼与瓦氏黄颡鱼(8.7)、长吻鮠与切尾拟鲮(7.7)和粗唇鮠和切尾拟鲮(3.5)。

2.3 系统发育树构建

以长臀鮠 (*Cranoglanis boudierus*, NC_008280) 为外群, 利用 19 种鲮科鱼类的 60 条线粒体 COI 基因序列, 基于 GTR+I+G 模型构建贝叶斯系统发育树(图 1), 基于 K2P 模型采用邻接法构建的 NJ 系统发育树(图 2), 两种方法构建的系统发育树结果一致。结果表明, 鲮科的 19 种鱼类各成一支, 全部形成了单系, 这在物种鉴别上与形态学分类基本一致。在存在外群长臀鮠时, 整个鲮科鱼类形成一个单系, 四个属形成两个大的分支, 其中鲮科的鳊属为较为特化的属, 单独形成一个单系; 而鲮科的黄颡鱼属、鮠属和拟鲮属三个属形成另外一个大的分支, 其中黄颡鱼属的瓦氏黄颡鱼、长须黄颡鱼和光泽黄颡鱼, 鮠属的长吻鮠和粗唇鮠, 拟鲮属的白边拟鲮、圆尾拟鲮、切尾拟鲮、短尾拟鲮、凹尾拟鲮和乌苏拟鲮聚在一起形成一支, 黄颡鱼属的黄颡鱼和中间黄颡鱼、拟鲮属的盍堂拟鲮和中臀拟鲮形成一支, 然后两支聚在一起后再与拟鲮属的三线拟鲮聚在一起。鮠属的长吻鮠和粗唇鮠并没有直接形成单系, 而是与拟鲮属的白边拟鲮、圆尾拟鲮、切尾拟鲮和短尾拟鲮交错在一起。五种黄颡鱼也分属于两个分支, 黄颡鱼和中间黄颡鱼处在一个分支上, 而长须黄颡鱼、瓦氏黄颡鱼和光泽黄颡鱼处在另外一个分支上。

3 讨论

3.1 鲮科鱼类 COI 基因序列特征

在 19 种鲮科鱼类长度为 674 bp 的 COI 基因序列片段中, AT 碱基含量表现出明显的偏倚性

表 4 鲮科 19 种鱼的种内遗传距离和种间遗传距离
 Tab. 4 Genetic distance within species and pairwise-species in 19 Bagridae catfishes

	Pfu	Pva	Pni	Peu	Pin	Llo	Lcr	Ptru	Pus	Pme	Pbr	Pon	Pal	Ptri	Pem	Pte	Hma	Hne	Hgu	
Pfu	0.0033																			
Pva	0.1198	0.0096																		
Pni	0.1093	0.0577	0.0075																	
Peu	0.1116	0.0303	0.0436	0.0050																
Pin	0.0847	0.1092	0.1036	0.1034	—															
Llo	0.1129	0.0498	0.0497	0.0344	0.1131	0.0005														
Lcr	0.1235	0.0576	0.0559	0.0372	0.1182	0.0122	0.0000													
Ptru	0.1244	0.0576	0.0567	0.0376	0.1182	0.0115	0.0052	0.0015												
Pus	0.1421	0.0777	0.0749	0.0742	0.1103	0.0807	0.0890	0.0855	0.0015											
Pme	0.0881	0.1079	0.1043	0.1017	0.0045	0.1078	0.1128	0.1128	0.1105	—										
Pbr	0.1142	0.0447	0.0446	0.0325	0.1039	0.0322	0.0335	0.0343	0.0702	0.1022	—									
Pon	0.0945	0.1245	0.1121	0.1097	0.0802	0.1239	0.1235	0.1244	0.1467	0.0853	0.1139	0.0050								
Pal	0.1085	0.0635	0.0603	0.0484	0.1144	0.0168	0.0289	0.0281	0.0924	0.1127	0.0446	0.1239	—							
Ptri	0.1331	0.1417	0.1316	0.1322	0.1264	0.1396	0.1337	0.1375	0.1398	0.1319	0.1353	0.1270	0.1408	—						
Pem	0.1382	0.0802	0.0723	0.0779	0.1112	0.0798	0.0881	0.0889	0.0128	0.1113	0.0677	0.1437	0.0914	0.1388	—					
Pte	0.1053	0.0604	0.0571	0.0453	0.1110	0.0138	0.0258	0.0251	0.0891	0.1093	0.0431	0.1205	0.0060	0.1374	0.0882	—				
Hma	0.1638	0.1529	0.1692	0.1547	0.1726	0.1700	0.1714	0.1695	0.1782	0.1708	0.1691	0.1726	0.1793	0.1942	0.1831	0.1756	0.0015			
Hne	0.1842	0.1599	0.1782	0.1619	0.1759	0.1782	0.1757	0.1777	0.1906	0.1741	0.1774	0.1819	0.1836	0.1853	0.1978	0.1759	0.0455	0.0001		
Hgu	0.1816	0.1813	0.1794	0.1786	0.1965	0.1933	0.1907	0.1918	0.1983	0.1999	0.1911	0.1781	0.2009	0.1767	0.1953	0.1971	0.1587	0.1672	0.0060	

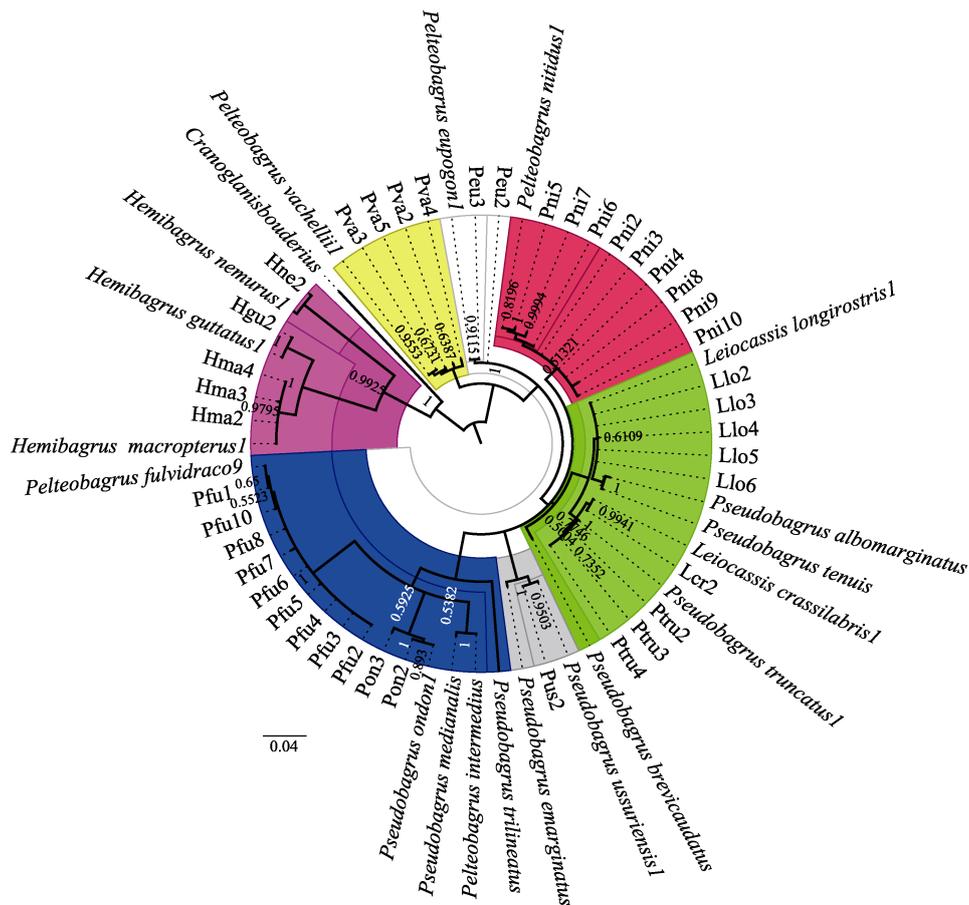


图 1 基于 COI 基因的 19 种鲮科鱼类贝叶斯系统发育树
 Fig. 1 Bayesian phylogenetic tree of 19 Bagridae catfishes based on COI gene

(55.26%), 具有硬骨鱼类线粒体 COI 基因碱基组成的典型特征^[23]。GC 碱基含量受密码子变异的影响, 第 1 密码子位点的碱基变异最多, 因而 GC 含量变化幅度也比较大(30.67%~43.56%), 第 2 密码子位点的 GC 含量最高(平均为 57.02%), 第 3 密码子位点的 GC 含量变化则最为稳定(42.71%~43.30%)。研究发现不同生物体或者基因中 GC 含量和其在密码子的不同位置具有一定的特异性, 而且这种特异性和密码子的偏好性关系密切^[24]。本研究中, COI 基因序列 GC 碱基含量最高的位点为第 2 密码子位点, 与在沙鳅亚科和鲤科鲃属中第 1 密码子位点 GC 含量最高的结果不一致^[25-26], 也与七种虾虎鱼 COI 基因序列密码子第一位碱基的 GC 含量最恒定、第三位碱基的 GC 含量最高的研究结果不同^[27]。DNA 序列在进化过程中经常发生转换或颠换的碱基突变, 而且一般情况下转换要比颠换发生的频率高, 因此, 转换与颠换的比值 R 可用于 DNA 进化过程中序列饱和度估测, 也是反映进化速率的一个重要参数。如果 $R > 2$, 说明序列替换远未达到饱和, R 会随着分歧时间的增加而逐渐减小, R 值越小, 说明序列中多重替换数增加, 表明分歧时间越长、不同阶元物种的亲缘关系越远^[28]。鳢科鱼类 COI 基因序列变异中的转换频率高于颠换, 而且第 3 密码子位点的 R 值最小, 第 2 密码子位点进化速度最慢, 第 1 密码子位点居中, 这种突变状况与之前在鲱形目和亚东鲑等鱼类上的研究结果一致^[15, 29]。在鱼类中, 不同物种、不同分类单元的线粒体 COI 基因序列密码子的不同位点 GC 含量存在差异的这一特点及作用还有待对其深入研究。

3.2 COI 基因在鳢科鱼类物种鉴别中的适用性

鱼类 DNA 条形码最重要的作用就是对鱼类进行准确鉴别, 弥补传统形态学鉴定方法的不足, 发现或纠正传统分类学中隐含的错误, 明确全球主要水域的鱼类的种类、发展历史以及与生态环境的相互作用, 为有效利用鱼类资源、保护鱼类多样性提供科学依据^[29]。基因序列分析过程中, 不同物种的种间和种内遗传距离大小是物种鉴定的一个重要判别标准, Hellberg 等^[12]利用线粒体 COI 基因作为条形码对动物界物种鉴别研究时,

认为种内的遗传距离不得大于 2%, 种间的遗传距离需明显大于种内距离, 且至少为同属内种间遗传距离的 10 倍以上才可有效判别物种。本研究中 19 个鳢科鱼类的种内遗传距离平均为 0.0041, 种间平均遗传距离为 0.1136, 种间遗传距离是种内遗传距离的 27.7 倍, 说明 COI 基因序列在鳢科鱼类中的遗传差异为有效鉴定不同种类的鱼提供了良好的基础, 利用线粒体 COI 基因作为 DNA 条形码进行鳢科鱼类的鉴别是可行的。然而, 在本研究中的 19 种鳢科鱼类也并非所有的种间遗传距离都超出种内遗传距离 10 倍以上, 比如, 光泽黄颡鱼与瓦氏黄颡鱼和长须黄颡鱼, 长须黄颡鱼与瓦氏黄颡鱼, 切尾拟鳢与长吻鲢和粗唇鲢之间距离比均小于 10 倍, 因此, 这几个物种间的关系还需要进一步的研究确定。但从整体而言, 鳢科 4 属 19 种鱼类的系统发育树表明, 除了鳢属 3 个种明显聚为一支, 形成独特单元外, 其他 3 个属的 16 个鳢科不同种类的鱼聚为一个大类, 并且不同个体根据其物种的分类地位聚成独立的分支, 尽管在最终形成 3 个大属的分类单元中略有交叉, 如鲢属(*Leiocassis*)的长吻鲢(*Leiocassis longirostris*)、粗唇鲢(*Leiocassis crassilabris*)和拟鳢属(*Pseudobagrus*)的圆尾拟鳢(*Pseudobagrus tenuis*)、白边拟鳢(*Pseudobagrus albomarginatus*)交叉在一起, 但从本研究结果整体而言, 线粒体 COI 基因条形码能对鳢科的这 19 种鱼类在种间进行有效区分。

3.3 基于 COI 基因的鳢科鱼类系统进化分析

以长臀鲢为外群, 本研究中的鳢科 4 属 19 种鱼类的 COI 基因在系统进化树上聚成一个单系, 但是在属的阶元上, 黄颡鱼属、拟鳢属、鲢属均未形成单系, 仅鳢属的 3 个种聚成独立的分支单元, 这说明以 COI 基因为 DNA 条形码在种的分类鉴别上可有效区分, 但是在属的阶元的系统进化关系还有待进一步研究, 这与之前关于 DNA 条形码对种以上阶元的鉴定存在局限性的结论相符^[30]。鳢科是鲈形目鱼类中分类最为复杂的科之一, 虽然前人对鳢科鱼类的形态学特征分析和分子系统学研究很多, 但是其分类地位仍存在一些争议。鳢科中, 除了鳢属呈现明显的单系群外, 黄

鲮鱼属、鲮属和拟鲮属三个属间的分类地位问题一直没有得到很好的解决。梁宏伟^[23]利用线粒体基因组研究发现拟鲮属的切尾拟鲮与鲮属的粗唇鲮和长吻鲮亲缘关系比较近, 彭作刚等^[19]利用线粒体细胞色素 b (cyt b) 基因对东亚鲮科鱼类的系统发育研究也表明拟鲮属的切尾拟鲮和鲮属的粗唇鲮首先聚在一起, 再与拟鲮属的圆尾拟鲮和鲮属的长吻鲮结合在一起。本研究对线粒体 COI 基因序列的分析也证实拟鲮属的切尾拟鲮与鲮属的粗唇鲮亲缘关系更近, 而鲮属的长吻鲮与拟鲮属的白边拟鲮和圆尾拟鲮亲缘关系较近, 即拟鲮属的切尾拟鲮、圆尾拟鲮和鲮属的粗唇鲮和长吻鲮具有较近的亲缘关系。张耀光等^[31]通过形态学分类发现, 拟鲮属的短尾拟鲮的骨骼性状与鲮属的粗唇鲮相似, 而与本属的切尾拟鲮差别很大, 因此, 认为短尾拟鲮应属于鲮属; 另外, 短尾拟鲮和粗唇鲮在骨骼性状上也有明显的种间差别, 并且少数特征与拟鲮属鱼类相似, 表现出一定的中间性状。此外, 从本研究构建的系统进化关系来看, 拟鲮属的切尾拟鲮可能与鲮属的粗唇鲮有较近的亲缘关系, 而与拟鲮属的短尾拟鲮关系较远, 这与上述用骨骼性状鉴定的结果不一致。形态学分类上, 拟鲮属的凹尾拟鲮、乌苏里拟鲮和短尾拟鲮均胸刺前缘光滑无锯齿, 颌须较短, 后伸不超过胸鳍起点, 具有中等分叉的尾鳍, 但凹尾拟鲮与乌苏里拟鲮在游离脊椎骨数目和背刺长短的性状上存在差异, 与短尾拟鲮在背刺后缘程度、枕骨棘与项背骨间的间距上有区别^[32], 结合本研究中的系统进化树结果, 可以认为拟鲮属的凹尾拟鲮与乌苏里拟鲮亲缘关系较近, 而与短尾拟鲮亲缘关系较远。Ku 等^[1]在对东亚鲮科鱼类的线粒体 DNA 的进化关系研究时发现, 鲮科的黄颡鱼属、鲮属和拟鲮属被分为两个分支, 本研究也得到了类似的结果, 即黄颡鱼属的瓦氏黄颡鱼、光泽黄颡鱼、鲮属的长吻鲮、粗唇鲮、拟鲮属的乌苏拟鲮、圆尾拟鲮和切尾拟鲮亲缘关系较近, 而黄颡鱼属的黄颡鱼与拟鲮属的盎堂拟鲮亲缘关系较近。

本研究中, 鲮科的黄颡鱼属、鲮属和拟鲮属的鱼类之间在聚类上存在交叉现象, 未能依据之前研究的属的分类地位单独形成一个属间的分类单

元。戴凤田等^[33]根据骨骼的内在特征分析认为鲮科的鲮属较为特化, 黄颡鱼属次之, 鲮属最为原始, 拟鲮属介于黄颡鱼属和鲮属之间。鲮科现有的鱼类中依然存在同物异名和同名异物现象, 加之前人的研究在物种的选取、分子标记的选择, 以及选择的标记的序列长度中存在差异, 因而得到的物种进化关系结论也不尽相同^[22]。在本研究开展过程中, 尽可能地多采集鲮科鱼类的样本种类和数量, 但由于凭证样本采集确实存在难度, 所以用于分析的样本数量还比较有限, 甚至在从 GenBank 中获取的个别鲮科鱼类的 COI 基因序列也仅有 1 条, 因此, 采用线粒体 COI 基因序列 674 bp 片段作为 DNA 条形码用于分析 4 个属的分类和进化关系所包含的遗传信息还相对有限, 特别是对黄颡鱼属、鲮属和拟鲮属鱼类在属间的分类地位仍略显不足。因此, 要阐明这几个属和种间的分类关系还需今后采集更多研究对象的凭证标本, 增加分析验证。同时由于本研究仅仅采用了 COI 基因序列, 其结果还有待于今后结合线粒体其他区域或核基因进行综合分析验证。

总之, 本研究在形态学特征的基础上, 结合线粒体 COI 基因作为 DNA 条形码的分子生物学分析, 对我国鲮科 4 属 19 种鱼类的进行分类鉴定和系统进化分析, 结果不仅证实了 COI 基因作为 DNA 条形码在鲮科鱼类种间分类和系统进化关系上的适用性, 也为鲮科鱼类的分类提供了一定的参考。

参考文献:

- [1] Ku X Y, Peng Z G, Diogo R, et al. mtDNA phylogeny provides evidence of generic polyphyleticism for East Asian bagrid catfishes[J]. *Hydrobiologia*, 2007, 579: 147-159.
- [2] Editorial Committee of Fauna Sinica of China. *Fauna Sinica, Class Teleostei, Siluriformes*[M]. Beijing: Science Press, 1999. [中国科学院中国动物志编辑委员会. 中国动物志: 硬骨鱼纲·鲮形目[M]. 北京: 科学出版社, 1999.]
- [3] Yang J, Chen X Y, Yang J X. A new record of bagrid fish in Yunnan *Pseudobagrus Kyphus* Mai, 1978[J]. *Zoological Research*. 2008, 29(3): 328-330. [杨剑, 陈小勇, 杨君兴. 云南鲮科鱼类一新记录-越南拟鲮[J]. *动物学研究*, 2008, 29(3): 328-330.]

- [4] Cheng J L, Ishihara H, Zhang E. *Pseudobagrus brachyrhabdion*, a new catfish (Teleostei: Bagridae) from the middle Yangtze River drainage, South China[J]. Ichthyological Research, 2008, 55: 112-123.
- [5] Yu C F, Li D C, Li Z Q, et al. Studies on relationship of four bagridae catfishes by discontinuous polyacrylamide gel electrophoresis[J]. Journal of Sichuan Vocational and Technical College, 2003, 13(1): 86-88. [俞纯方, 刘大翠, 刘中全, 等. 鲮科四种鱼 LDH 同工酶谱的研究[J]. 四川职业技术学院学报, 2003, 13(1): 86-88.]
- [6] Cheng J L, Zhang E. A taxonomic research situation of the bagrid catfish genus *pseudobagrus*[J]. Journal of Jinggangshan University (Natural Science), 2012, 33(2): 94-98. [程建丽, 张鄂. 拟鲮属鱼类分类学研究概况[J]. 井冈山大学学报(自然科学版), 2012, 33(2): 94-98.]
- [7] Ward R D, Hanner R, Hebert P D N. The campaign to DNA barcode all fishes, FISH-BOL[J]. Journal of Fish Biology, 2009, 74: 329-356.
- [8] Ratnasingham S, Hebert P D N. BOLD: The barcode of life data system (www.barcodinglife.org)[J]. Molecular Ecology Notes, 2007, 7: 355-364.
- [9] Pollack S J, Kawalek M D, Williams-Hill D M, et al. Evaluation of DNA barcoding methodologies for the identification of fish species in cooked products[J]. Food Control, 2018, 84: 297-304.
- [10] Barco A, Raupach M J, Laakmann S, et al. Identification of north sea molluscs with DNA barcoding[J]. Molecular Ecology Resources, 2016, 16: 288-297.
- [11] Cheng J, Sha Z L, Liu R Y. DNA barcoding of genus *Metapenaeopsis* (Decapoda: Penaeidae) and molecular phylogeny inferred from mitochondrial and nuclear DNA sequences[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2015, 61: 376-384.
- [12] Hellberg R S, Kawalek M D, Van K T, et al. Comparison of DNA extraction and PCR setup methods for use in highthroughput DNA barcoding of fish species[J]. Food Analytical Methods, 2014, 7: 1950-1959.
- [13] Mueller S, Handy S M, Deeds J R, et al. Development of a *COX1* based PCR-RFLP method for fish species identification[J]. Food Control, 2015, 55: 39-42.
- [14] Shen Y J, Guan L H, Wang D Q, et al. DNA barcoding and evaluation of genetic diversity in Cyprinidae fish in the mid-stream of the Yangtze River[J]. Ecology Evolution, 2016, 6(9): 2702-2713.
- [15] Li X R, Liu S F, Li D, et al. Species identification and phylogenetic relationships in order Clupeiformes based on DNA barcoding[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2015, 22(6): 1133-1141. [李献儒, 柳淑芳, 李达, 等. DNA 条形码在鲱形目鱼类物种鉴定和系统进化分析中的应用[J]. 中国水产科学, 2015, 22(6): 1133-1141.]
- [16] Gao C X. DNA barcoding of Tetraodontiformes in coastal waters of China[D]. Guangzhou: Jinan University, 2015. [鄧星晨. 基于线粒体 COI 序列的中国沿海鲉形目鱼类 DNA 条形码研究[D]. 广州: 暨南大学, 2015.]
- [17] Liu L, Sun D R, Li C H, et al. Application of DNA barcoding in classification of *mugilidae* fishes[J]. Periodical of Ocean University of China, 2016, 46(11): 178-186. [刘璐, 孙典荣, 李纯厚, 等. DNA 条形码技术在鲢科鱼类鉴定中的应用[J]. 中国海洋大学学报, 2016, 46(11): 178-186.]
- [18] Song C, Yu Y N, Zhang T, et al. Phylogenetic analysis of Cynoglossidae in the Yangtze Estuary based on partial sequence of mitochondrial COI[J]. Chinese Journal of Zoology, 2014, 49(5): 716-726. [宋超, 于亚男, 张涛, 等. 基于线粒体 CO I 基因部分序列的长江口舌鳎科鱼类系统分类研究[J]. 动物学杂志, 2014, 49(5): 716-726.]
- [19] Peng Z G, He S P, Zhang Y G. Cytochrome b gene variation and phylogeny of Asian Bagrid catfishes[J]. Progress in Natural Science, 2002, 12(6): 596-600. [彭作刚, 何舜平, 张耀光. 细胞色素 b 基因序列变异与东亚鲮科鱼类系统发育[J]. 自然科学进展, 2002, 12(6): 596-600.]
- [20] Zhang Y, Zhang E, He S P. Studies on the structure of the control region of the bagridae in China and its phylogenetic significance[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2003, 27(5): 463-467. [张燕, 张鄂, 何舜平. 中国鲮科鱼类线粒体 DNA 控制区结构及其系统发育分析[J]. 水生生物学报, 2003, 27(5): 463-467.]
- [21] Cheng Q T, Zheng B S. Systematic Synopsis of Chinese Fishes[M]. Beijing: Science Press, 1987. [成庆泰, 郑葆珊. 中国鱼类系统检索[M]. 北京: 科学出版社, 1987.]
- [22] Meng Q W, Su J W, Miao X Z. Systematics of Fishes[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1995: 153-172. [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: 153-172.]
- [23] Liang H W. The complete mitochondrial genomes of six catfishes (*Siluriformes*) and the phylogenetic relationships analysis[D]. Yangling: Northwest A & F University, 2012. [梁宏伟. 六种鲇形目鱼类线粒体基因组克隆及其系统发育研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2012.]
- [24] Duan X K. Study on complete mitochondrial genome of

- parabramis pekinesis strenosoma* and codon usage patterns of *Megalabrama amblycephala*[D]. Wuhan: Huazhong Agriculture University, 2015. [段晓克. 壮体长春鳊线粒体基因组全长测定及团头鲂密码子偏好模型分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.]
- [25] Peng J L, Wang X Z, Wang D, et al. Application of DNA barcoding based on the mitochondrial COI gene sequences in classification of *Culter* (Pisces: Cyprinidae)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2009, 33(2): 271-276. [彭居俐, 王绪祯, 王丁, 等. 基于线粒体 COI 基因序列的 DNA 条形码在鲤科鲃属鱼类物种鉴定中的应用[J]. *水生生物学报*, 2009, 33(2): 271-276.]
- [26] Mao Y T, Gan X N, Wang X Z. DNA barcodes and molecular phylogeny of botiinae fishes based on the mitochondrial COI gene[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2014, 38(4): 737-744. [毛云涛, 甘小妮, 王绪祯. 基于线粒体 COI 基因的沙鳅亚科鱼类 DNA 条形码及其分子系统发育研究[J]. *水生生物学报*. 2014, 38(4): 737-744.]
- [27] Yu Y N, Song C, Hou J L, et al. System classification for *Gobiidae* derived from the Yangtze River based on mitochondrial COI gene partial sequence[J]. *Freshwater Fisheries*, 2014, 44(5): 3-8. [于亚男, 宋超, 侯俊利, 等. 基于线粒体 COI 基因部分序列的长江口虾虎鱼科鱼类系统分类[J]. *淡水渔业*, 2014, 44(5): 3-8.]
- [28] Huang Y. *Molecular Phylogenetics: Principle, Method and Application*[M]. Beijing: China Agriculture Press, 1998. [黄原. *分子系统学: 原理、方法及应用*[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998.]
- [29] Meng W, Yang T Y, Hai S, et al. Study of DNA barcoding based on the mitochondrial COI gene sequences in *Salmo trutta fraio*[J]. *Chinese Journal of Fisheries*, 2010, 23(1): 6-10. [孟玮, 杨天燕, 海萨, 等. 基于线粒体 COI 基因序列的亚东鲑 DNA 条形码研究[J]. *水产学杂志*, 2010, 23(1): 6-10.]
- [30] Chen Z X, Guo S L, Gong Y Q. Progress on application of fish DNA barcoding: a review[J]. *Fisheries Science*, 2017, 36(6): 834-842. [陈忠信, 郭书林, 龚艳青. 鱼类 DNA 条形码技术的应用进展[J]. *水产科学*, 2017, 36(6): 834-842.]
- [31] Zhang Y G, Wang D S. Studies on the taxonomical position of *Pseudobagrus brevicaudatus* (Bagridae, Siluriformes)[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1996, 20(4): 379-382. [张耀光, 王德寿. 短尾拟鲮分类地位的探讨[J]. *水生生物学报*, 1996, 20(4): 379-382.]
- [32] Cheng J L, Zhang E, Zhang J Q, et al. *Pseudobagrus emarginatus* (Regan, 1913), a valid Chinese bagrid species from the upper Yangtze River drainage (Teleostei: Bagridae)[J]. *Journal of Jinggangshan University (Natural Science)*, 2016, 37(3): 99-106.
- [33] Dai F T, Su J X. Studies on isozymes, skeleton characters of eight Bagrid catfishes and comments on phylogenetic relationship (Siluriformes: Bagridae)[J]. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 1998, 23(4): 432-439. [戴凤田, 苏锦祥. 鲮科八种鱼类同工酶和骨骼特征分析及系统演化的探讨(鲃形目: 鲮科)[J]. *动物分类学报*, 1998, 23(4): 432-439.]

Species identification of DNA barcoding based on COI gene sequences in Bagridae catfishes

LIANG Hongwei^{1,2}, MENG Yan¹, LUO Xiangzhong¹, LI Zhong¹, ZOU Guiwei¹

1. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;

2. Key Laboratory of Aquatic Genomics, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Wuhan 430223, China

Abstract: The Bagridae catfishes, belonging to the order Siluriformes and class Osteichthyes, are widely distributed in freshwater areas in Asia, such as China, Japan, Korean peninsula, and Vietnam. In China, Bagridae catfishes include more than 30 species across 4 genera. In recent years, due to environmental deterioration and human disturbance, populations of the native Bagridae had sharply decreased and some of them were difficult to collect. However, the classification of some Bagridae catfishes is ambiguous due to the difference of individuals, genders, or habitat. A species identification technique for various fishes based on DNA barcoding has been rapidly developed and widely employed. For many fishes, DNA barcoding requires additional validation before use. Herein, we have developed and evaluated DNA barcoding based on COI gene sequences for identifying Bagridae species. Altogether, 11 Bagridae catfish species were collected and sequenced with the standard DNA barcoding protocols, then combined with 8 available species acquired from the GenBank. A total of 60 sequences from 19 species pertaining to 4 genera were analyzed. DnaSP 5 and MEGA7.0 were employed to calculate the base composition, sequence characterization, and genetic distance, and construct the neighbor-joining phylogenetic tree. The mrbayes software was used to construct the Bayesian tree. The result showed that the mean base contents were: 24.82% A, 30.44% T, 27.10% C, and 17.64% G. AT contents (55.26) were higher and the base composition was biased as others teleost fishes were also commonly observed. The nucleotide sequences included 226 variant sites, 195 parsimony informative sites, and 31 singleton sites. The average transition/transversion ratio was 3.35. Genetic distances within species, genus, and families were 0.0041, 0.1136, and 0.1268, respectively. The ratio of genetic distances between interspecies and intraspecies was 27.7, which indicated a notable genetic difference of the COI gene sequence. The efficiency of DNA barcoding based on the COI gene was reaffirmed from its successful identification of all 19 Bagridae catfishes in this study. This classification result is consistent with their morphologies. However, only *Hemibagrus* catfishes can be clustered into a single phylogenetic tree branch. Other Bagridae species were intertwined, and their phylogenetic status needs further research combined with data from more samples. The results revealed that the COI gene was suitable as a DNA barcoding parameter for identifying species; it provided a useful reference for the phylogenetic relationships of Bagridae.

Key words: *Siluriformes*; DNA barcoding; COI gene; species identification; phylogenetic analysis

Corresponding author: ZOU Guiwei. E-mail: zougw@yfi.ac.cn