

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.18062

基于 DNA 条码基因的鳢科鱼类系统进化与物种鉴定

赵建¹, 梁宏伟², 孙博³, 李伟¹, 朱新平^{1,4}, 叶朝阳^{1,4}, 上官清^{1,4}, 陈昆慈¹

1. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 农业农村部热带亚热带水产资源利用与养殖重点实验室, 广东 广州 510380;
2. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 湖北 武汉 430223;
3. 中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 中国水产科学研究院特殊生境鱼类种质特性与抗逆育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150001;
4. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 鳢科(Channidae)鱼类在亚洲分布广泛, 其中中国的土著种类是重要养殖品种, 国外很多种类主要作为观赏鱼引进我国。本研究利用线粒体 COI 基因序列, 对分布于我国的鳢科鱼类不同种群样本序列, 及在 GenBank 中获得其他鳢科鱼类的序列进行分析, 探讨其作为 DNA 条形码基因对鳢科进行物种鉴定和系统进化分析的可行性。通过对本研究采集的 149 个鳢样本和 122 条 GenBank 中已有序列进行分析, 结果显示, 所研究的鳢科鱼类的 COI 基因 576 bp 片段中不存在碱基插入缺失现象, 其平均碱基含量 A+T (51.4%)高于 G+C 含量(48.6%), 存在偏倚性; 多态位点占 47.2%。利用 Mega 6.0 软件基于 Kimura's 2-parameter 模型计算 25 种鳢种内平均遗传距离为 0.028, 其中巴卡鳢(*Channidae barca*)种内遗传距离最大, 为 0.137, 超过了某些种间遗传距离; 种间遗传距离为 0.030~0.302, 平均为 0.217。其中最大距离 0.302 为饰鳍鳢(*Channidae ornatipinnis*)和黑体鳢(*Channidae melasoma*)之间, 甚至超过了与外群之间的距离。利用邻接法(Neighbour-Joining, NJ)和最大似然法(Maximum Likelihood Tree, ML)分别构建系统进化树, 同种个体获得较高支持率, 而不同种间的关系支持率较低, 同时发现存在由多个种组成的巴卡鳢和南鳢复合支系。本研究表明, 进行我国土著鳢科鱼类物种鉴定时 COI 基因是有效的工具, 而进行外来观赏鱼鉴定, 尤其是巴卡鳢、斯氏鳢等物种进行鉴定时, 需结合多方面信息; COI 基因不适合鳢科鱼类种间遗传进化关系的研究。

关键词: 鳢; 线粒体 COI 基因; DNA 条码

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)04-0793-10

鳢科(Channidae)属鲈形目(Perciformes)鱼类, 因其头部形状与蛇头相似而被称为蛇头鱼(snake-heads), 主要分布在亚洲和非洲。鳢科鱼类主要有两个属组成: 鳢属(*Channa*)和副鳢属(*parachanna*)。其中, 副鳢属主要分布在西非中部, 共 3 种; 鳢属主要分布在亚洲, 共有 26 种, 西起中东的伊朗, 经南亚、东南亚、中国, 到朝鲜半岛、俄罗斯远东地区都有分布^[1]。

我国鳢科鱼类主要有乌鳢(*Channa argus*)、斑

鳢(*Channa maculata*)、月鳢(*Channa asiatica*)和南鳢(*Channa gachua*)^[2]。在中国、南亚和东南亚国家, 鳢是重要经济鱼类。其中, 乌鳢、斑鳢及其杂交种是我国重要养殖对象, 年产量达 50 多万吨^[3]。乌鳢在我国分布广泛, 除高原外, 从长江流域往北一直到黑龙江都有分布; 斑鳢由于低温适应能力较差, 主要分布在珠江流域及以南地区。月鳢主要分布在长江流域及以南地区, 包括台湾、海南岛等^[4]。Zhang 等^[4]报道我国广西一鳢科鱼类

收稿日期: 2018-02-15; 修订日期: 2018-04-23.

基金项目: 科技基础性工作专项(2013FY110700); 现代农业产业技术体系专项资金(CARS-46); 中国水产科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2014A11); 广州市珠江科技新星专项(201710010174).

作者简介: 赵建(1982-), 副研究员, 研究方向为种质资源与遗传育种. E-mail: zj.8286@163.com

通信作者: 陈昆慈, 研究员, 研究方向为种质资源与遗传育种. E-mail: chenkcnci@aliyun.com

新物种黑月鳢(*Channa nox*), 认为其与月鳢相近但存在显著形态差异, 应为独立物种。南鳢分布非常广泛, 在南亚、东南亚和中国都有分布, 世界自然保护联盟(IUCN)认为其为分类地位并未完全厘清, 可能是复合物种, 并将其列入红色保护名录, 其保护级别为 LC (Least Concern) (<http://www.iucnredlist.org/details/166123/0>)。

除我国的土著品种外, 原产南亚和东南亚的多种鳢科鱼类由于体色艳丽, 主要以观赏为目的引进我国, 被称为雷龙鱼。主要有巴卡雷龙(巴卡鳢 *Channa barca*)、黄金眼镜蛇雷龙(橙斑鳢 *Channa aurantimaculata*)、蓝宝石雷龙(斯氏鳢 *Channa stewartii*)、七彩雷龙(布氏鳢 *Channa bleheri*)、大铅笔(小盾鳢 *Channa micropeltes*)等。南亚和东南亚鳢科鱼类种类众多, 有些种实际为复合种, 并不断有新种被发现和确认^[5-6]。由此可见对鳢科鱼类的分类学研究需要更加深入。

对鳢科鱼类的系统进化研究, 中外学者都有开展相关研究。Zhu 等^[7]、朱树人等^[8]先后对 COI 和 16S rRNA 序列对乌鳢、斑鳢和月鳢进行了研究。陈晨等^[9]利用 COI 序列对乌鳢及其他 18 种鳢进行了进化分析, 认为乌鳢和斑鳢进化关系更近。薛丹等^[10]利用线粒体控制区序列分析了云南澜沧江和海南岛水系宽额鳢(南鳢)的遗传变异, 认为云南组群和海南组群间高度分化, 可能受云贵高原隆起和海南岛陆海分离影响。Li 等^[1]利用 NADH 脱氢酶亚基 2 (ND2) 基因进行了 20 种鳢科鱼类系统进化研究。Lakra 等^[11]利用 COI 序列重点对喜马拉雅山东部的鳢科鱼类进行了分析; Conte-Grand 等^[12]又利用较大数量序列, 进行了更大范围分析, 解决了一些物种误判对系统分类带来的矛盾。

线粒体 DNA 是独立于核基因之外的母系遗传的遗传物质, 具有进化速率快的特点, 是进行系统进化分析的常用工具之一。其中的细胞色素氧化酶亚基 I 基因(cytochrome oxidase subunit I gene, COI)相对比较保守, 易于扩增, 在物种鉴定中被广泛使用^[13]。被越来越多的国内外学者用于构建 DNA 条形码数据库^[14], 用于物种鉴定和系统发育分析。本研究利用 COI 基因对我国鳢科鱼

类土著种乌鳢、斑鳢、月鳢不同种群样品及其他鳢科鱼类进行分析, 检测其不同群体的多样性, 探讨其用于物种鉴定的可行性。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究采集分布于我国的鳢科鱼类乌鳢、斑鳢、月鳢、南鳢 4 种及引进观赏鱼小盾鳢样本, 共 149 个体样本。其中乌鳢样本包括黑龙江(抚远段)27 个、湖北长江流域样本 13 个、湖南湘江样本 8 个; 斑鳢样本包括珠江流域桂江段、贺江、北江段、三角洲(花都)、茂名鉴江、福建九龙江各 10 个, 以及海南昌化江和万泉河各 1 个; 月鳢样本包括长江流域 17 个、茂名鉴江 3 个、阳江漠阳河 7 个; 南鳢为海南昌化江 2 个(CHJNL1, CHJNL2)、万泉河 1 个(WQHNL); 小盾鳢样本 9 个购于广州花地湾观赏鱼市场。从 GenBank 数据库中下载其他鳢科鱼类 COI 基因序列 122 条, 本研究共分析鳢科 25 种 271 个样本。另外采集同属攀鲈亚目的攀鲈 10 个、叉尾斗鱼 5 个, 鲤形目的鲤和鳊各 8 个样本作为鳢科鱼类系统进化分析的外群样本。标本的鳍条组织保存于无水乙醇中, 收藏于中国水产科学研究院珠江水产研究所。物种的形态学特征鉴定主要依据《中国淡水鱼类检索》^[15]、《广东淡水鱼类志》^[2]和《海南岛淡水及河口鱼类志》^[16]。研究样本信息如表 1 所示。

1.2 COI 基因序列测定

首先按照 Omega 组织 DNA 提取试剂盒(E.Z.N.A.TM Tissue DNA Kit)操作程序提取样本 DNA, 琼脂糖凝胶电泳检测质量后于-20℃冰箱保存。

COI 基因扩增使用鱼类通用引物 FISH F1/FISH R1 和 FISH F2/FISH R2^[17], 引物序列如下:

FISH F1: 5'-TCAACCAACCACAAAGACAT-TGGCAC-3'

FISH R1: 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAA-GAATCA-3'

FISH F2: 5'-TCGACTAATCATAAAGATAT-CGGCAC-3'

FISH R2: 5'-ACTTCAGGGTGACCGAAGA-ATCAGAA-3'

表 1 样本名录及相关信息
Tab. 1 Sampling information and GenBank accession numbers of COI genes

序号 No.	物种 species	样品数 number of samples	GenBank 登录号 GenBank No.
1	乌鳢 <i>Channa argus</i>	52	本研究 this study (n=48) KM077026, JX978723, KC823605, AP006041
2	阿萨姆鳢 <i>Channa andrao</i>	1	MF496661.1
3	月鳢 <i>Channa asiatica</i>	31	本研究 this study (n=27) KU852442, MF496669, KC819602, KC819605
4	橙斑鳢 <i>Channa aurantimaculata</i>	4	MF496671, HM117175, KJ847161, KJ937387
5	斑卡鳢 <i>Channa bankanensis</i>	4	MF496694, MF496674, KJ937371, KJ937395
6	巴卡鳢 <i>Channa barca</i>	7	MF496698, MF496699, HM117180, HM117181, KJ847151, KJ847149, KJ847150
7	布氏鳢 <i>Channa bleheri</i>	5	MF496700, MF496704, EU924638, HM117182, HM117186
8	缅甸鳢 <i>Channa burmanica</i>	2	MF496706.1, MF496707.1
9	红鳢 <i>Channa diplogramma</i>	2	KJ937431, MF496709
10	南鳢 <i>Channa gachua</i>	12	本研究 this study (n=3) MF496738, MF496739, MF496741, KT960763, KJ936866, KT001932, KJ937429, KJ937358, KJ937342
11	茵列鳢 <i>Channa harcourtbutleri</i>	6	MF496808, MF496809, LC190225, LC190210, LC190096, LC189620
12	红尾鳢 <i>Channa limbata</i>	4	LC190112, LC190110, LC190123, LC190129
13	带鳢 <i>Channa lucius</i>	6	MF496830, MF496832, KT001056, KT001933, KJ937433, JF781234
14	斑鳢 <i>Channa maculata</i>	64	本研究 this study (n=62) MC020011, KC823606
15	眼鳢 <i>Channa marulius</i>	7	KY425557, KY425554, KY425553, KY425550, KY290039, KY290038, KY694512
16	黑体鳢 <i>Channa melasoma</i>	3	MF496853, MF496860, KJ937380
17	小盾鳢 <i>Channa micropeltes</i>	12	本研究 this study (n=9) JN024961, KM213040, KJ937408
18	东方鳢 <i>Channa orientalis</i>	11	MF496870, MF496868, KY290045, FJ459484, JN245991, KU667386, KT364793, KJ847131, KJ937436, KF742438, JX105474
19	饰鳍鳢 <i>Channa ornatipinnis</i>	5	MF496875, KU667361, KJ937428, MF496872, KJ847165
20	帕瑯鳢 <i>Channa panaw</i>	2	MF496877.1, LC190351.1
21	侧眼鳢 <i>Channa pleurophthalma</i>	3	MF496881, KM213041, KJ937345
22	拟眼鳢 <i>Channa pseudomarulius</i>	4	KY425566.1, KY425565.1, KY425568.1, MF496884.1
23	翠鳢 <i>Channa punctata</i>	11	MF462277, MF496905, MG181947, KY867666, KY290125, KY290124, KU043334, EU417796, JN245992, JN245990, HM117201
24	斯氏鳢 <i>Channa stewartii</i>	7	MF496932, MF496928, KU667366, KU667362, KJ937455, KF742419, KJ847152
25	线鳢 <i>Channa striata</i>	6	MF462281, MF462282, MG438366, MF496970, LC190237, LC189770
26	攀鲈 <i>Anabas testudineus</i>	10	本研究 this study
27	叉尾斗鱼 <i>Macropodus opercularis</i>	5	本研究 this study
28	鲤 <i>Cyprinus carpio</i>	8	本研究 this study
29	鳙 <i>Aristichthys nobilis</i>	8	本研究 this study

PCR 扩增反应体系为 20 μL, 包括: dNTP mix (0.25 mmol/L) 1 μL, 10×Taq buffer 2 μL, MgCl₂ 2 μL, 模板 DNA 20 ng, 上下游引物(10 mmol/L) 各 1.0 μL, 加水补足 20 μL。PCR 扩增条件: 94℃

预变性 10 min; 然后 94℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 运行 35 循环; 最后 72℃延伸 8 min。PCR 扩增后用 1%琼脂糖电泳检测目标产物, 并用 E.Z.N.A.TM Gel Extraction Kit (Omega

Bio-Tek, Guangzhou, China)纯化回收, 委托广州艾基生物技术有限公司进行测序。

1.3 数据分析

首先对获得的 149 个鳢和 31 个外群物种 COI 基因序列进行拼接比对, 并进一步与 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中进行 Blast 比对, 确保扩增序列的准确性。利用 MEGA 6.0 软件统计基因序列和相应氨基酸序列的变异, 利用 Kimura's 2-parameter^[18]模型对种间和种内的遗传距离进行计算, 用邻接法(Neighbour-Joining, NJ)和最大似然法(Maximum Likelihood Tree, ML)分别构建分子系统进化树。

2 结果分析

2.1 鳢 DNA 条码 COI 基因序列多态性

本研究获得的 149 条 COI 基因序列与从 GenBank 下载的 122 条序列进行比对。为使所有序列具有可比性, 将较长序列进行裁剪, 最终长

度为 576 bp。所有物种中均未出现碱基插入和缺失现象。鳢科鱼类 COI 序列的碱基 A、T、C、G 分别为 23.8%、27.7%、31.2%和 17.4%, C+G 含量为 48.6%; 271 条序列中, 多态性位点数总计 272 个, 多态位点比例为 47.2%, 其中 parsim-informative 位点数为 261 个, 占 45.3%。序列共编码 192 个氨基酸, 其中多态位点为 59 个, 多态比例为 30.7%。

2.2 鳢种内、种间遗传距离

利用 MEGA6.0 软件的 Kimura's 2-parameter 模型对鳢属及外群的种内和种间的遗传距离进行计算(表 2)。25 种鳢的种内平均遗传距离为 0.028, 其中橙斑鳢、侧眼鳢和拟眼鳢种内遗传距离为 0, 巴卡鳢种内遗传距离最大为 0.137, 超过了某些种间遗传距离。25 种鳢的种间遗传距离为 0.030~0.302, 平均为 0.217。其中最大距离 0.302 为饰鳍鳢和黑体鳢之间, 甚至超过了与外群之间的距离。

表 2 基于 K2P 模型的鳢属 25 个物种及 4 个外群种间(对角线下)及种内遗传距离(对角线内)
Tab. 2 Genetic distance within-species 23 and between 28 Siluriformes species based on Kimura's 2-parameter distance

物种 species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. 外群 叉尾斗鱼 outgroup <i>Macropodus opercularis</i>	0.000													
2. 外群 鲮 outgroup <i>Aristichthys nobilis</i>	0.229	0.000												
3. 外群 鲤 outgroup <i>Cyprinus carpio</i>	0.273	0.169	0.003											
4. 外群 攀鲈 outgroup <i>Anabas testudineus</i>	0.264	0.266	0.271	0.000										
5. 阿萨姆鳢 <i>Channa andrao</i>	0.246	0.259	0.283	0.281	N/C									
6. 乌鳢 <i>Channa argus</i>	0.289	0.276	0.251	0.242	0.260	0.001								
7. 月鳢 <i>Channa asiatica</i>	0.242	0.240	0.231	0.238	0.235	0.184	0.021							
8. 橙斑鳢 <i>Channa aurantimaculata</i>	0.261	0.270	0.277	0.271	0.168	0.225	0.226	0.000						
9. 斑卡鳢 <i>Channa bankanensis</i>	0.261	0.244	0.231	0.259	0.257	0.193	0.206	0.235	0.041					
10. 巴卡鳢 <i>Channa barca</i>	0.293	0.286	0.299	0.308	0.181	0.241	0.242	0.136	0.263	0.137				
11. 布氏鳢 <i>Channa bleheri</i>	0.268	0.269	0.283	0.274	0.171	0.226	0.219	0.145	0.245	0.130	0.040			
12. 缅甸鳢 <i>Channa burmanica</i>	0.266	0.271	0.294	0.288	0.181	0.248	0.239	0.124	0.256	0.157	0.150	0.002		
13. 红鳢 <i>Channa diplogramme</i>	0.259	0.239	0.223	0.233	0.218	0.213	0.201	0.219	0.196	0.245	0.249	0.240	0.009	
14. 南鳢 <i>Channa gachua</i>	0.282	0.259	0.284	0.265	0.158	0.245	0.227	0.128	0.246	0.173	0.159	0.156	0.224	0.038
15. 茵列鳢 <i>Channa harcourtbutleri</i>	0.287	0.265	0.272	0.269	0.158	0.254	0.234	0.132	0.242	0.185	0.167	0.161	0.227	0.054
16. 红尾鳢 <i>Channa limbata</i>	0.281	0.271	0.280	0.265	0.155	0.252	0.233	0.132	0.250	0.178	0.161	0.155	0.229	0.053

(待续 to be continued)

(续表 2 Tab. 2 continued)															
物种 species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
17. 带鳢 <i>Channa lucius</i>	0.242	0.242	0.216	0.251	0.261	0.192	0.199	0.251	0.110	0.268	0.255	0.261	0.201	0.268	
18. 斑鳢 <i>Channa maculata</i>	0.271	0.263	0.233	0.222	0.254	0.101	0.198	0.243	0.215	0.253	0.243	0.254	0.186	0.251	
19. 眼鳢 <i>Channa marulius</i>	0.275	0.249	0.257	0.250	0.234	0.201	0.196	0.240	0.223	0.242	0.220	0.218	0.183	0.239	
20. 黑体鳢 <i>Channa melasoma</i>	0.285	0.262	0.251	0.270	0.255	0.234	0.204	0.262	0.224	0.267	0.260	0.267	0.181	0.254	
21. 小盾鳢 <i>Channa micropeltes</i>	0.269	0.254	0.246	0.244	0.238	0.203	0.200	0.237	0.204	0.253	0.253	0.260	0.094	0.247	
22. 东方鳢 <i>Channa orientalis</i>	0.252	0.246	0.264	0.268	0.200	0.235	0.251	0.164	0.257	0.194	0.169	0.177	0.228	0.192	
23. 饰鳍鳢 <i>Channa ornatipinnis</i>	0.285	0.277	0.307	0.311	0.239	0.263	0.241	0.220	0.252	0.233	0.209	0.243	0.254	0.236	
24. 帕瑯鳢 <i>Channa panaw</i>	0.253	0.246	0.272	0.272	0.270	0.209	0.215	0.229	0.225	0.245	0.234	0.236	0.198	0.233	
25. 侧眼鳢 <i>Channa pleurophthalma</i>	0.261	0.241	0.254	0.248	0.232	0.219	0.211	0.246	0.224	0.256	0.244	0.259	0.145	0.198	
26. 拟眼鳢 <i>Channa pseudomarulius</i>	0.267	0.249	0.261	0.226	0.233	0.188	0.210	0.222	0.211	0.245	0.231	0.224	0.191	0.225	
27. 翠鳢 <i>Channa punctata</i>	0.252	0.269	0.246	0.242	0.218	0.212	0.209	0.206	0.232	0.230	0.202	0.234	0.203	0.220	
28. 斯氏鳢 <i>Channa stewartii</i>	0.285	0.272	0.280	0.287	0.163	0.234	0.236	0.124	0.247	0.138	0.160	0.134	0.228	0.109	
29. 线鳢 <i>Channa striata</i>	0.247	0.244	0.264	0.256	0.215	0.225	0.186	0.233	0.246	0.255	0.246	0.255	0.219	0.225	
物种 species	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
15. 茵列鳢 <i>Channa harcourtbutleri</i>	0.016														
16. 红尾鳢 <i>Channa limbata</i>	0.030	0.031													
17. 带鳢 <i>Channa lucius</i>	0.258	0.261	0.042												
18. 斑鳢 <i>Channa maculata</i>	0.252	0.253	0.200	0.001											
19. 眼鳢 <i>Channa marulius</i>	0.253	0.243	0.212	0.190	0.024										
20. 黑体鳢 <i>Channa melasoma</i>	0.254	0.259	0.252	0.217	0.214	0.001									
21. 小盾鳢 <i>Channa micropeltes</i>	0.244	0.253	0.194	0.193	0.189	0.186	0.002								
22. 东方鳢 <i>Channa orientalis</i>	0.182	0.185	0.252	0.234	0.240	0.267	0.232	0.060							
23. 饰鳍鳢 <i>Channa ornatipinnis</i>	0.233	0.231	0.240	0.246	0.239	0.302	0.249	0.199	0.059						
24. 帕瑯鳢 <i>Channa panaw</i>	0.239	0.237	0.229	0.216	0.216	0.221	0.220	0.234	0.261	0.003					
25. 侧眼鳢 <i>Channa pleurophthalma</i>	0.218	0.221	0.242	0.207	0.244	0.209	0.163	0.239	0.253	0.203	0.000				
26. 拟眼鳢 <i>Channa pseudomarulius</i>	0.248	0.236	0.211	0.213	0.096	0.205	0.201	0.229	0.263	0.219	0.223	0.000			
27. 翠鳢 <i>Channa punctata</i>	0.227	0.227	0.233	0.209	0.185	0.208	0.199	0.197	0.252	0.219	0.228	0.179	0.018		
28. 斯氏鳢 <i>Channa stewartii</i>	0.105	0.240	0.229	0.253	0.245	0.188	0.239	0.231	0.230	0.220	0.230	0.220	0.218	0.099	
29. 线鳢 <i>Channa striata</i>	0.237	0.211	0.198	0.127	0.206	0.245	0.263	0.226	0.210	0.188	0.210	0.188	0.186	0.235	0.023

2.3 鳢属种间系统进化关系

以鲤形目的鲤、鲮和与鳢同属攀鲈亚目的攀鲈和叉尾斗鱼为外群, 基于邻接法(Neighbour-Joining, NJ)和最大似然法(Maximum likelihood, ML)构建的鳢属种间系统进化树(图 1, 图 2)。两种方法构

建的进化树中, 多数物种种内个体均以较高支持率聚为一支, 然而巴卡鳢的 7 个样本分成 3 个差异极大的类群, 分别与橙斑鳢、斯氏鳢、布氏鳢组成不同的进化支系, 这 4 种鳢与缅甸鳢组成了一个巴卡鳢复合支系(图 3A); 斯氏鳢的 7 个样本中 4 个在巴

卡鳢复合支系中, 而另外 3 个样本与南鳢、红尾鳢和茵列鳢组成南鳢复合支系(图 3B)。基于两种方法构建的进化树中, 作为外群的攀鲈都被归入了鳢属

内, 而且与乌鳢、斑鳢、月鳢较近。鳢科鱼类种内个体间聚类支持率均较高, 包括巴卡鳢和南鳢复合支系内, 而种间或姊妹群间相互关系支持率均较低。

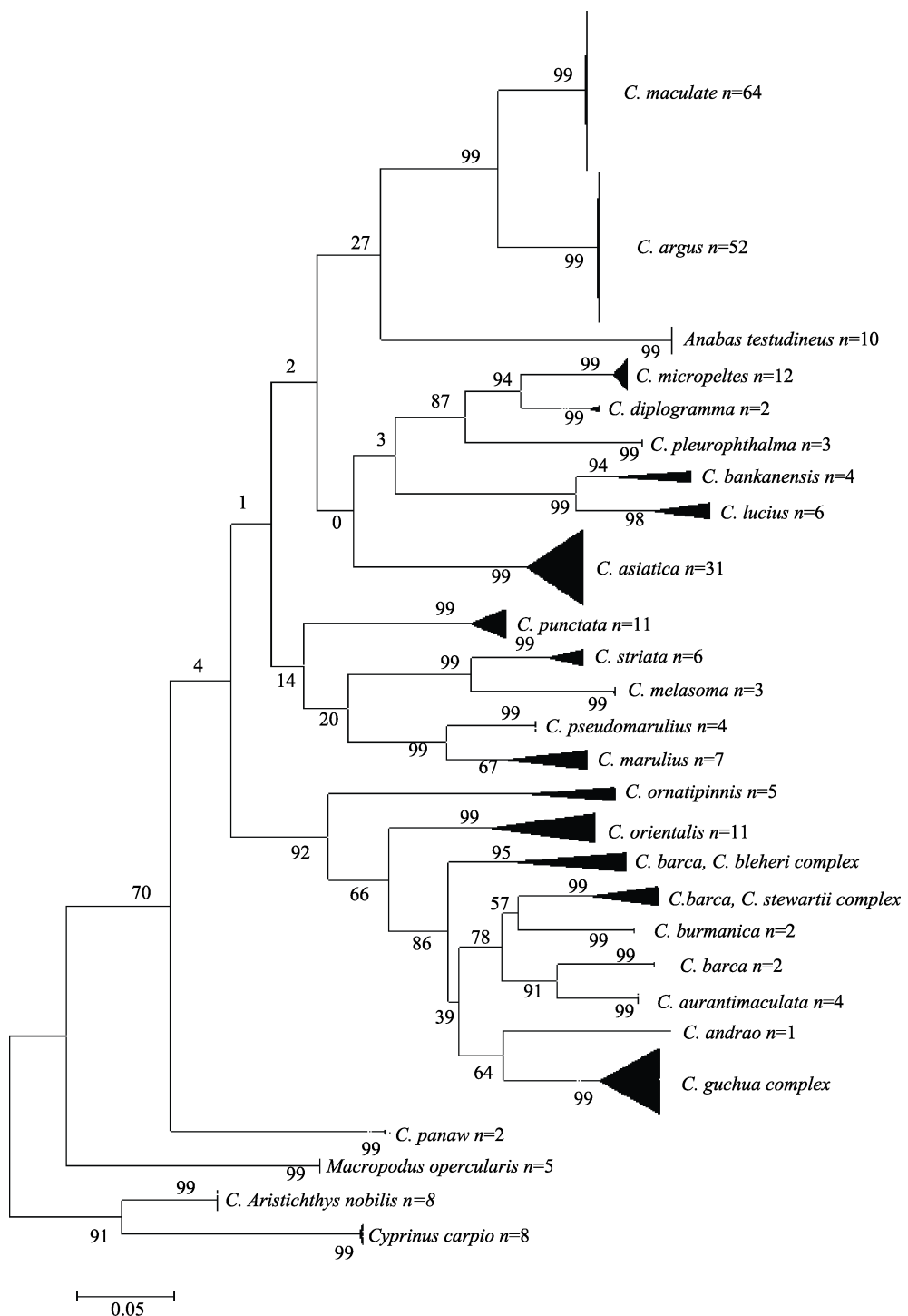


图 1 基于 COI 基因序列构建的鳢属种间 NJ 进化树

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

Fig. 1 Neighbour-joining tree based on the COI gene sequences of *Channa*

Bootstrap values in 1000 replications are shown on branches. Scale represents the genetic distance of 0.02/million years.

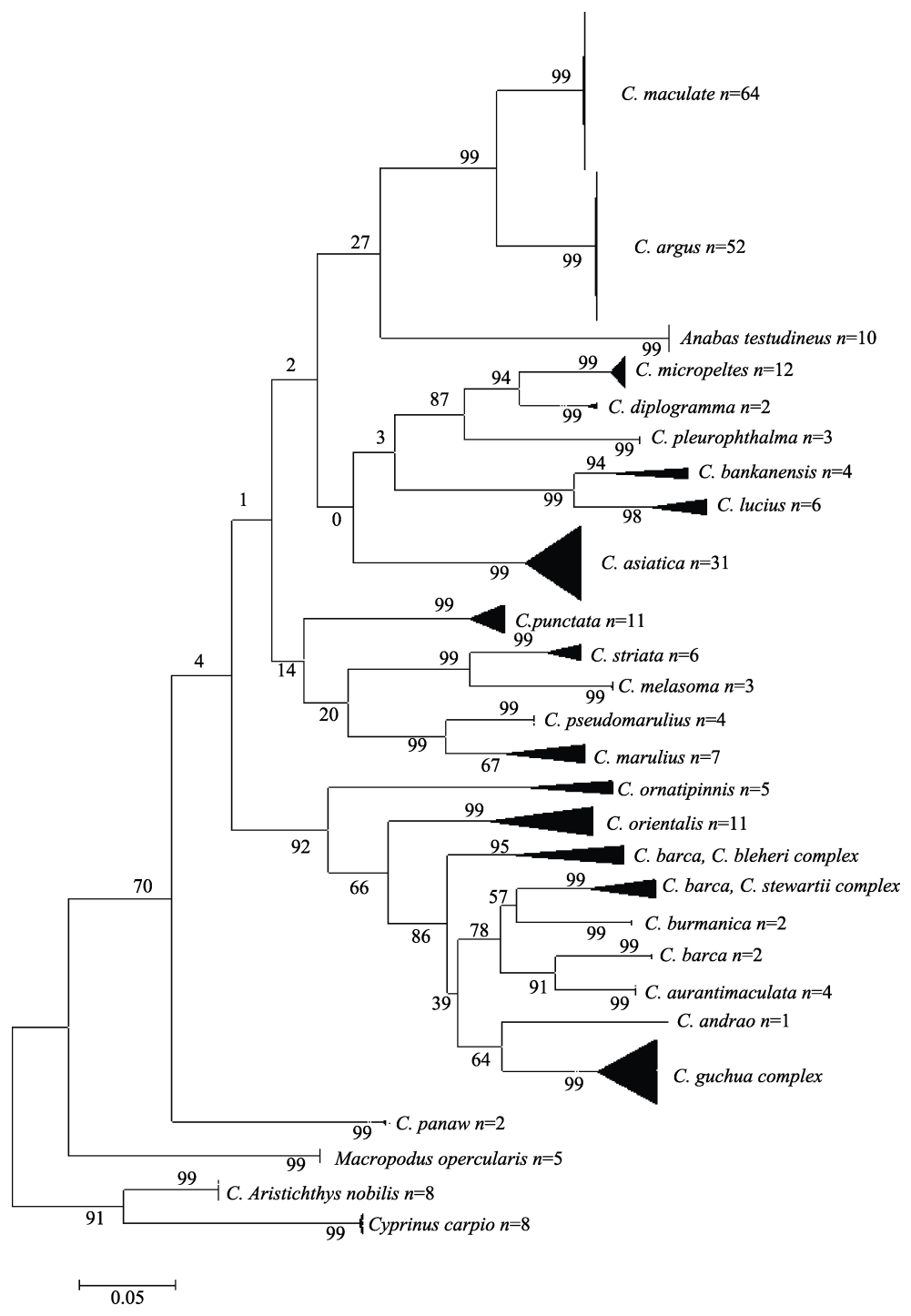


图 2 基于 COI 基因序列构建的鳢属种间 ML 进化树
节点上数字显示 1000 次重复的 bootstrap 验证分析支持率, 标尺代表遗传距离单位为 0.05/百万年。
Fig. 2 Maximum likelihood tree based on the COI gene sequences of *Channa*
Bootstrap values in 1000 replications are shown on branches. Scale represents the genetic distance of 0.05/million years.

3 讨论

3.1 鳢科鱼类 COI 基因遗传多样性

鳢科鱼类的 COI 基因序列 GC 含量为 48.6%,

比 AT 含量稍少, 与线粒体全序列^[19]和鲮科鱼类^[20]的 GC 含量相当, 显著高于鲮科鱼类^[21], 存在偏倚现象但不明显。在所有 271 条序列中, 未出现碱基插入和缺失位点, 多态性位点数总计 272 个,

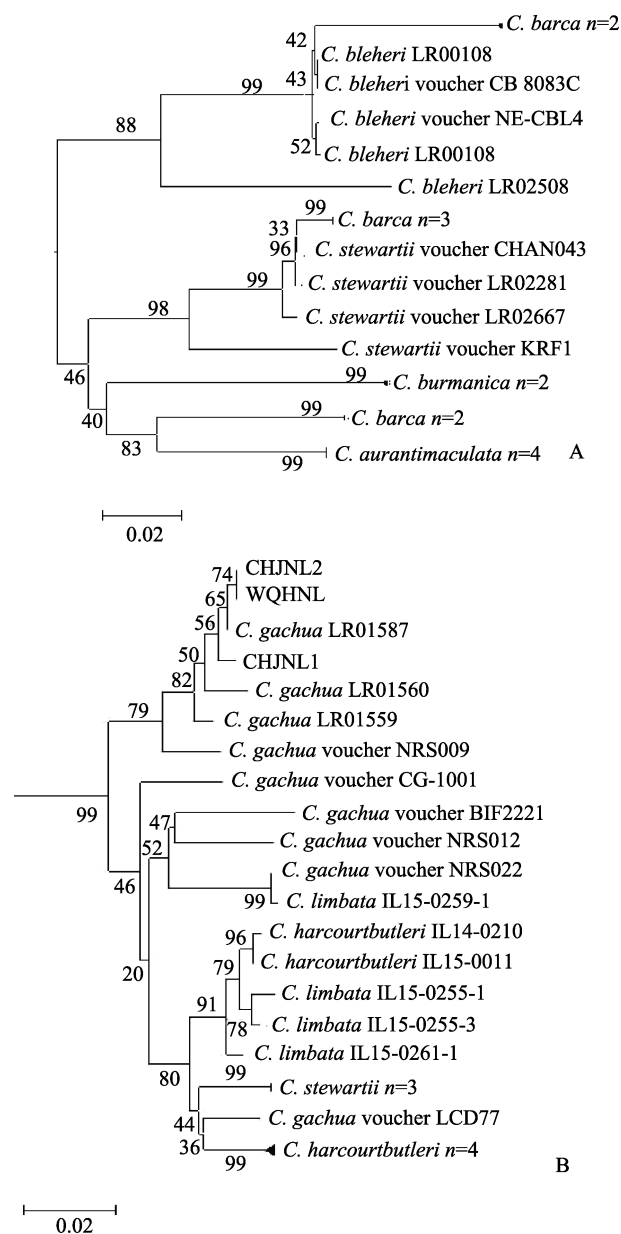


图 3 巴卡鳢(A)和南鳢(B)复合支系中物种的进化关系

Fig. 3 Phylogenetic relationship of the *C. barca* and *C. gachua* complex lineage

多态位点比例为 47.2%，编码氨基酸多态比例为 30.7%。多态性显著高于其他鱼类^[20-21]，而低于对虾类^[22]。

基于 Kimura's 2-parameter 模型的种间和种内遗传距离显示，乌鳢和斑鳢虽在我国分布广泛，但其种内多样性并不高，两个物种间的遗传距离也比较小。而其他分布于东南亚和南亚的鳢，如巴卡鳢、斯氏鳢等种内遗传距离很大，甚至超过了一些种间的距离。造成这种情况的原因可能是

由于物种鉴定的误判^[12]。不同鳢种间的遗传距离较大，有些种间遗传距离(如饰鳍鳢和黑体鳢之间达到 0.302)甚至超过了与外群的遗传距离。这说明鳢科鱼类种间 COI 基因序列遗传多样性较高。

3.2 利用 COI 基因进行鳢科鱼类的系统进化和物种鉴定

利用邻接法和最大似然法分别构建鳢的系统进化树，其种内个体和部分种间的聚类支持率较高，而且对巴卡鳢和南鳢复合支系内的支持率也较高，这与其他同类研究的结果一致^[7, 11, 23-26]。而不同种或姊妹群间的支持率较低，而且两种方法获得的进化树的拓扑结构也存在一定的差异，这说明利用 COI 基因不能很好地体现鳢科鱼类的进化关系。

Hebert 等^[13]提出的物种间遗传变异高于种内变异 10 倍，可以作为物种鉴定的 DNA 条形码标准。Zhu 等^[7]利用 COI 序列作为 DNA 条码对乌鳢、斑鳢、月鳢和线鳢进行鉴定，种间距离最小为 0.091，种内距离最大为 0.027，可以进行准确鉴定。本研究对不同地理种群的乌鳢、斑鳢、月鳢及南鳢进行分析，其种间距离均显著大于种内距离，在进化树中聚类支持率很高，按照以上标准，我国土著的鳢科鱼类通过 COI 序列进行物种鉴定是准确的。

由于南鳢和巴卡鳢复合支系的存在，对相关物种的鉴定造成了影响。Conte-Grand 等^[12]注意到了鳢科鱼类间的物种鉴定的不一致，进行了较大规模重新分析和鉴定，利用较大数据量解决了一些种类的物种鉴定问题，但对于一些样本较稀少的种类如巴卡鳢等，数据积累还不够。本研究的结果也表明不同研究人员获得的巴卡鳢样本聚类时分别与橙斑鳢、布氏鳢和斯氏鳢聚为一支，但它们之间的遗传距离也达到 0.13 以上，遗传分化明显。由于这两个复合支系的物种在我国主要以观赏鱼存在，在对观赏鱼市场采集的样本进行鉴别时，COI 序列结果并不准确，需要根据样本的形态分类特征进行鉴别。另一方面，由于观赏鱼市场种质引进和保种规范性问题，其种质可能存在混杂，进行物种鉴定时需要进行多方面的调查和研究。

参考文献:

- [1] Li X, Musikasinthorn P, Kumazawa Y. Molecular phylogenetic analyses of snakeheads (Perciformes: Channidae) using mitochondrial DNA sequences[J]. Ichthyological Research, 2006, 53(2): 148-159.
- [2] Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences. Freshwater Fishes of Guangdong Province[M]. Guangzhou: Guangdong Science & Technology Press, 1991. [中国水产科学研究院珠江水产研究所. 广东淡水鱼类志[M]. 广州: 广东科技出版社, 1991.]
- [3] Administration Bureau of Fisheries and Fishery management of Ministry of Agriculture. Annual Book of China Fishery Statistics 2016[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2016. [农业部渔业渔政管理局, 2016 中国渔业统计年鉴[M]. 北京: 中国农业出版社, 2016.]
- [4] Zhang C G, Musikasinthorn P, Watanabe K. *Channa nox*, a new channid fish lacking a pelvic fin from Guangxi, China[J]. Ichthyological Research, 2002, 49(2): 140-146.
- [5] Britz R. *Channa andrao*, a new species of dwarf snakehead from West Bengal, India (Teleostei: Channidae)[J]. Zootaxa, 2013, 3731: 287-294.
- [6] Britz R, Adamson E, Raghavan R, et al. *Channa pseudomaculatus*, a valid species of snakehead from the Western Ghats region of Peninsular India (Teleostei: Channidae), with comments on *Ophicephalus grandinosus*, *O. theophrasti* and *O. leucopunctatus*[J]. Zootaxa, 2017, 4299: 529-545.
- [7] Zhu S R, Fu J J, Wang Q, et al. Identification of *Channa* species using the partial cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene as a DNA barcoding marker[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2013, 51: 117-122.
- [8] Zhu S R, Meng Q L, Sun Y X, et al. Phylogenetic analysis of *Channa* based on the mitochondrial 16S rRNA gene sequence[J]. Journal of Yangtze University (Natural Science Edition), 2015, 12(27): 25-29. [朱树人, 孟庆磊, 孙玉旋, 等. 基于线粒体 16S rRNA 基因序列的鳢属鱼类系统进化探讨[J]. 长江大学学报(自然科学版), 2015, 12(27): 25-29.]
- [9] Chen C, He J J, Shao Q C, et al. Sequencing and phylogenetic relationship analysis of mitochondrial COI gene[J]. Journal of Jiangsu Agriculture Science, 2016, 44(8): 297-299. [陈晨, 贺晶晶, 邵青臣, 等. 乌鳢(*Channa argus*)线粒体 COI 基因序列测定及其系统发育关系分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(8): 297-299.]
- [10] Xue D, Zhang Q, Gao X C, et al. The analysis of genetic variation based on mtDNA control region sequences of *Channa gachus* in the Lancang River in Yunnan Province and the main rivers in Hainan Province of China[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2015, 39(6): 1107-1116. [薛丹, 章群, 邵星晨, 等. 基于线粒体控制区的云南澜沧江和海南岛主要水系宽额鳢遗传变异分析[J]. 水生生物学报, 2015, 39(6): 1107-1116.]
- [11] Lakra W S, Goswami M., Gopalakrishnan A, et al. Genetic relatedness among fish species of genus *Channa* using mitochondrial DNA genes[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2010, 38(6): 1212-1219.
- [12] Conte-Grand C, Britz R, Dahanukar N, et al. Barcoding snakeheads (Teleostei, Channidae) revisited: Discovering greater species diversity and resolving perpetuated taxonomic confusions[J]. PLoS ONE, 2017, 12(9): e0184017.
- [13] Hebert P D, Ratnasingham S, deWaard J R. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. Proceedings: Biological Sciences, 2003, 270: S96-S99.
- [14] Joly S, Davies T J, Archambault A, et al. Ecology in the age of DNA barcoding: The resource, the promise and the challenges ahead[J]. Molecular Ecology Resources, 2014, 14(2): 221-232.
- [15] Zhu S Q. Synopsis of Freshwater Fishes of China[M]. Nanjing: Phoenix Science Press, 1995: 1-549. [朱松泉. 中国淡水鱼类检索[M]. 南京: 江苏科学技术出版社, 1995: 1-549.]
- [16] Pearl River Fisheries Research Institute of Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai Fisheries University, East China Sea Fisheries Research Institute of Chinese Academy of Fishery Sciences, et al. Fishes in Freshwater and Estuarine Delta of Hainan Island[M]. Guangzhou: Guangdong Science & Technology Press, 1986. [中国水产科学研究院珠江水产研究所, 上海水产大学, 中国水产科学研究院东海水产研究所, 等. 海南岛淡水及河口鱼类志[M]. 广州: 广东科技出版社, 1986.]
- [17] Gong Y Y, Li W, Zhao J, et al. Identification and classification application of mitochondrial COI gene in ornamental fish[J]. Genomics and Applied Biology, 2017, 36(9): 3728-3734. [公月月, 李伟, 赵建, 等. 线粒体 COI 基因在观赏鱼中物种鉴定与分类应用[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(9): 3728-3734.]
- [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] Zhang X C, Zhu X P, Chen K C, et al. Comparison of the northern snakehead (*Channa argus*) and blotched snakehead (*Channa maculata*) and their reciprocal hybrids (*C. maculata* ♀ × *C. argus* ♂ and *C. argus* ♀ × *C. maculata* ♂) based on complete mitochondrial DNA sequences[J]. Mitochondrial DNA, 2015, 26(5): 805-806.
- [20] Chen L, Huang B D, Xue D, et al. DNA barcoding of Terapontidae and taxonomic status of a new record of *Terapon puta* in coastal waters of China[J]. Marine Fisheries, 2017, 39(2): 121-130. [陈璐, 黄伯炎, 薛丹, 等. 中国沿海鲷科鱼类 DNA 条形码研究及新记录种三线鲷分类地位探讨[J]. 海洋渔业, 2017, 39(2): 121-130.]
- [21] Chen Y X, Wu R X, Liang N, et al. Phylogenetic relationship

- in family sparidae of China in mitochondrial COI gene sequence[J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2015, 46(3): 611-619. [陈咏霞, 吴仁协, 梁娜, 等. 基于线粒体 COI 基因序列的中国鲷科鱼类系统进化关系[J]. *海洋与湖沼*, 2015, 46(3): 611-619.]
- [22] Yi X, Wang P P, Wang J, et al. The research of COI-based DNA barcoding in *Penaeidae*' identification[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2018, 42(1): 1-9. [易啸, 王攀攀, 王军, 等. 基于线粒体 COI 的 DNA 条形码在对虾科种类鉴定中的研究[J]. *水产学报*, 2018, 42(1): 1-9.]
- [23] Adamson E A S, Hurwood D A, Mather P B A. Reappraisal of the evolution of Asian snakehead fishes (*Pisces*, *Channidae*) using molecular data from multiple genes and fossil calibration[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2010, 56(2): 707-717.
- [24] Benziger A, Philip S, Raghavan R, et al. Unraveling a 146 years old taxonomic puzzle: Validation of Malabar snakehead, species-status and its relevance for channid systematics and evolution[J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(6): e21272.
- [25] Serrao N R, Steinke D, Hanner R H. Calibrating snakehead diversity with DNA barcodes: expanding taxonomic coverage to enable identification of potential and established invasive species[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(6): e99546.
- [26] Tan M P, Jamsari A F J, Muchlisin Z A, et al. Mitochondrial genetic variation and population structure of the striped snakehead, *Channa striata*, in Malaysia and Sumatra, Indonesia[J]. *Biochemical Systematics & Ecology*, 2015, 60: 99-105.

Phylogenetic and species identification analysis on the snakeheads (Channidae) based on the DNA barcoding sequence

ZHAO Jian¹, LIANG Hongwei², SUN Bo³, LI Wei¹, ZHU Xinping^{1,4}, YE Zhaoyang^{1,4}, SHANGGUAN Qing^{1,4}, CHEN Kunci¹

1. Key Laboratory of Tropical & Subtropical Fishery Resource Application & Cultivation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs; Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;
2. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China;
3. Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150001, China;
4. College of Fisheries and Life, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Snakeheads are of important cultural value as ornamental fishes in China. In this study, the mitochondrial COI (cytochrome oxidase subunit I) gene fragments 576 bp long were used to analyze the phylogenetic and diversity of snakeheads in and out of China, to probe the probability of the COI gene to be used as a barcoding sequence for species identification. Including 149 specimens of different geographic populations of *C. argus*, *C. maculata*, *C. asiatica*, and *C. gachua* native to China, and 122 sequences of other species downloaded from GenBank, a total of 271 snakehead individuals of 25 species, were analyzed. Of all the sequences, no insertion-deletion sites existed. The average content of A+T (51.4%) was higher than that of G+C (48.6%). The average intraspecies genetic distance was 0.028, but reached 0.137 in *C. barca*, which was higher than some interspecies distances. The interspecies distances ranged from 0.030 to 0.302, with an average of 0.217. The largest distance exists between *C. ornatipinnis* and *C. melasoma*, exceeding some distances to outgroup. Phylogenetic trees based on the neighbor-joining and maximum likelihood method were constructed. Most individuals from the same species formed a monophyly, and high bootstrap values were obtained for them, but this was not the case for several other species. However, the relationships of species have low bootstrap values, indicating improper phylogenetic analysis of the COI gene for snakeheads. Furtherly, a *C. barca* compound and a *C. gachua* compound were formed according to the phylogenetic trees. The results of this research indicate that the COI gene is proper for the species identification of native species of snakeheads in China, but more information regarding imported ornamental snakeheads is needed.

Key words: snakeheads (*Channidae*); mitochondrial COI gene; DNA barcoding

Corresponding author: CHEN Kunci. E-mail: chenkunci@aliyun.com