

• 研究报告 •

我国沿海棱鲉属鱼类的物种鉴定与系统发育

张 静^{1,4} 李 渊² 宋 娜¹ 林龙山² 高天翔^{3*}

1 (中国海洋大学水产学院, 山东青岛 266003)

2 (国家海洋局第三海洋研究所海洋生物与生态实验室, 福建厦门 361005)

3 (浙江海洋大学水产学院, 浙江舟山 316000)

4 (集美大学水产学院, 福建厦门 361021)

摘要: 利用DNA条形码技术对中国沿海分布的6种棱鲉属(*Thryssa*)鱼类样品进行了物种鉴定, 并每种取5尾用于探讨该属系统发育关系。结果显示: 棱鲉属鱼类的主要形态鉴别特征为上颌骨伸达位置和第一鳃耙的下鳃耙数量。在525 bp的目的片段上有175个变异位点, 其中简约信息位点172个, 单一信息位点3个, 无插入缺失现象, 转换数为182, 颠换数为57。A+T含量明显高于G+C含量, 并且表现出明显的反G偏倚。结合GenBank中相关的同源序列进行比较发现, 所有序列明显分为10个组群, 表明已提交的棱鲉属鱼类COI基因序列中仍存在一定的分歧。从各组群间的遗传距离和氨基酸遗传差异水平可以看出, 10个组群应为不同的有效种, 但是否存在隐存种还有待于进一步确定。从NJ树上可以看出, 长颌棱鲉(*T. setirostris*)是最先分化出的物种, 保持着最原始的特征, 而中颌棱鲉(*T. mystax*)与黄吻棱鲉(*T. vitrirostris*)聚类到一起, 二者间存在共享单倍型。棱鲉属鱼类最早分化于中新世早期。在今后的研究中仍需要结合更多的分子标记对长颌棱鲉和黄吻棱鲉的分类地位作进一步的探讨。

关键词: 棱鲉属; 系统发育关系; DNA条形码; 遗传距离; 形态学

Species identification and phylogenetic relationship of *Thryssa* species in the coastal waters of China

Jing Zhang^{1,4}, Yuan Li², Na Song¹, Longshan Lin², Tianxiang Gao^{3*}

1 Fisheries College, Ocean University of China, Qingdao, Shandong 266003

2 Laboratory of Marine Biology and Ecology, Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen, Fujian 361005

3 School of Fishery, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, Zhejiang 316000

4 Fisheries College, Jimei University, Xiamen, Fujian 361021

Abstract: Six *Thryssa* species were collected from Chinese coastal waters for morphological description and phylogenetic relationships analysis. Results indicated that the position of maxillary extend and number of lower gill rake in the first gill rake were the main morphological characteristics for the identification of six *Thryssa* species. Mitochondrial COI gene fragments were amplified and sequenced for thirty individuals of *Thryssa* species. A 525 bp sequence was obtained, containing 175 variable sites, which determines 172 parsimony informative sites, 3 singleton sites, no indels/deletions, 182 transitions, and 57 transversions. An obvious anti-G biasness was noted from the base composition of A and T higher than that of G and C. Comparing homologous sequences from GenBank with our study validates that there are variations among *Thryssa* species based on the COI sequence. Moreover ten absolute groups were also identified in all sequences based on genetic differences in amino acids and genetic distances between groups. However, this requires further investigation to determine whether there are uncovered cryptic species. The NJ tree indicated that *T. setirostris* was the first species derived from the genus, and sequences of *T. mystax* were disorderly clustered with that of *T. vitrirostris*. The divergence date of *Thryssa* species presented here is early Miocene. It is suggested that more molecular markers be needed to clarify variations in *T. mystax* and *T. vitrirostris* in the future.

收稿日期: 2016-03-22; 接受日期: 2016-05-13

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201303048)、全球变化与海气相互作用专项(GASI-02-SCS-YSWspr, GASI-02-SCS-YSWaut)和国家海洋局海洋国际合作及履约项目(2200207)

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: gaotianxiang0611@163.com

Key words: *Thryssa*; phylogenetic relationship; DNA barcoding; genetic distance; morphology

棱鲉属(*Thryssa*)鱼类隶属于鲱形目、鲉科, 广泛分布于印度-太平洋(朱元鼎等, 1984; 张世义, 2001; 孙典荣和陈铮, 2013)。作为近海中上层小型鱼类, 其生长迅速、性成熟较快、资源恢复能力较强, 在海洋生态系统能量流动与转换中起着承上启下的作用, 是海洋食物网中的关键种(贾晓平等, 2004)。迄今为止, 已报道棱鲉属鱼类有24种(Whitehead et al, 1988), 在中国近海报道分布的仅有6种, 分别为赤鼻棱鲉(*T. kammalensis*)、中颌棱鲉(*T. mystax*)、杜氏棱鲉(*T. dussumieri*)、长颌棱鲉(*T. setirostris*)、汉氏棱鲉(*T. hamiltonii*)和黄吻棱鲉(*T. vitrirostris*)。随着大黄鱼(*Larimichthys crocea*)、小黄鱼(*L. polyactis*)、带鱼(*Trichiurus japonicus*)等传统经济鱼类资源的相继衰退, 过去不受重视的棱鲉属等小型鱼类逐渐成为了重要的捕捞对象。目前有关棱鲉属鱼类的研究较少, 主要集中在分类学(朱元鼎等, 1984; 张世义, 2001; 孙典荣和陈铮, 2013)、渔业生物学(郭学武和唐启升, 2000; 李忠义等, 2007)、资源量的分布与利用(Whitehead et al, 1988)和系统发育(马春艳等, 2010; Lavoué et al, 2010; Bloom & Lovejoy, 2012)等方面。

依据传统形态分类方法, 中国近海棱鲉属鱼类的主要外部鉴别特征为上颌骨末端伸达的位置(朱元鼎等, 1984; 张世义, 2001; 孙典荣和陈铮, 2013)。例如: 上颌骨末端伸达鳃盖或鳃孔的为赤鼻棱鲉和汉氏棱鲉, 其中吻较长且呈赤红色的为赤鼻棱鲉; 上颌骨末端伸达胸鳍基部的为中颌棱鲉和黄吻棱鲉, 其中下鳃耙数少于17的为中颌棱鲉; 上颌骨末端超过胸鳍基部几达腹鳍起点的为杜氏棱鲉; 上颌骨末端伸达肛门的为长颌棱鲉。其中, 争议最大的为中颌棱鲉和黄吻棱鲉。马春艳等(2010)利用线粒体16S rRNA基因序列探讨了棱鲉属的系统进化关系, 认为中颌棱鲉和黄吻棱鲉可能为同一种, 这一结论明显不同于传统形态学的分类结果。

DNA条形码即利用线粒体COI基因片段序列作为物种快速鉴定的标记, 并以此建立DNA序列和生物物种之间的一一对应关系(Hebert et al, 2003)。线粒体COI基因进化速率低、保守性高, 种内的COI序列变异很小, 而种间的COI序列差异显著, 能明

显区分不同的物种, 并适用于种以上水平的系统进化研究(Hebert et al, 2003; Zhang & Hanner, 2012; Zhang et al, 2013)。如今, 该技术已被广泛应用于种类鉴别(Hebert et al, 2003; 李渊等, 2013)、新记录种或新种的发现(Gao et al, 2011; 李渊等, 2014)、隐存种发掘(Chen et al, 2015; Shen et al, 2016a)、鱼卵仔稚鱼鉴定(Ko et al, 2012; 周美玉等, 2015)、水产品检测(Shen et al, 2016b)等。迄今为止, 尚未见利用COI基因片段对棱鲉属鱼类进行种类鉴别和系统发育的相关研究。因此, 本研究采集了中国沿海分布的棱鲉属鱼类, 利用条形码技术对其进行种类鉴定, 并结合GenBank中该属相同拉丁学名下的所有COI基因序列进行系统发育研究, 纠正出现的错误序列, 以期为今后棱鲉属鱼类的分类和遗传学研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

于2009–2014年间采集中国沿海棱鲉属鱼类, 在确定种类鉴别无误后, 每个物种选取1个地理群体用于后续相关研究(表1), 目前所有样品均保存于中国海洋大学渔业生态学实验室。

1.2 实验方法

1.2.1 形态学

依据朱元鼎等(1984)的分类鉴别方法对采集的棱鲉属鱼类进行鉴定。对其第一鳃耙下鳃耙、背鳍、胸鳍和臀鳍的鳍棘和鳍条等可数性状进行计数, 并对体长(A)、体高(B)、头长(C)、吻长(D)、眼径(E)、尾柄长(F)和尾柄高(G)等可量性状进行测量, 精确到0.1 mm。

1.2.2 分子遗传学

取适量肌肉组织, 采用海洋动物组织DNA提取试剂盒提取基因组DNA, 4℃保存备用。用于扩增COI片段的引物为(Hebert et al, 2003): F1: 5'-TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC-3'; R1: 5'-TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA-3'。PCR反应体系为25 μL (李渊等, 2013), 包括1.25 U *Taq* DNA聚合酶, 各种反应组分的终浓度为200 nM的正反向引物; 200 μM的dNTP, 10 mM Tris pH 8.3,

表1 研究所用棱鲉属鱼类样品和相关序列信息
Table 1 Information of *Thryssa* samples and sequences in this study

种名 Species	本研究 This study			引用序列号 Accession no.
	地点 Sampling sites	采样时间 Sampling time	编号 Number	
赤鼻棱鲉 <i>T. kammalensis</i>	福建省晋江市 Jinjiang, Fujian	2014.3	CB1-CB5	EF607590-607596, JN813096, JQ738607-738609, KF951618, KP260469, KP260453
中颌棱鲉 <i>T. mystax</i>	山东省东营市 Dongying, Shandong	2009.10	ZH1-ZH5	———
杜氏棱鲉 <i>T. dussumieri</i>	福建省漳州市 Zhangzhou, Fujian	2013.5	DS1-DS5	JX983287-983289
长颌棱鲉 <i>T. setirostris</i>	福建省泉州市 Quanzhou, Fujian	2013.5	CH1-CH5	EF607597-607599, EU541324, JF494684-494688
汉氏棱鲉 <i>T. hamiltonii</i>	福建省晋江市 Jinjiang, Fujian	2013.11	HS1-HS5	EF607588, EF607589, JQ681498, EU148567-148570
黄吻棱鲉 <i>T. vitrirostris</i>	广东省江门市 Jiangmen, Guangdong	2013.3	HW1-HW5	JF494689-494693

50 mM KCl和1.5 mM MgCl₂。反应条件为: 94℃预变性3 min; 94℃变性45 s, 52℃退火45 s, 72℃延伸45 s, 30个循环; 72℃延伸10 min。以上反应均设阴性对照以排除DNA污染的情况。取3 μL PCR扩增产物进行1%琼脂糖凝胶电泳检测(U = 5 V/cm), 对符合测序浓度的PCR产物进行纯化回收, 并送生物公司进行双向测序。

依据外部形态特征对中颌棱鲉和黄吻棱鲉进行初步分类, 但由于二者形态上的相似性, 很容易将其混淆。因此, 本研究对采集的中颌棱鲉(东营、南通、宁德、晋江、泉州、九龙江口和三娘湾)和黄吻棱鲉(三沙湾和江门)所有样本的COI基因片段进行双向测序。对鉴定无误的种类各选取5尾用于后续分子遗传学研究。

1.3 数据处理

将测得的目的片段序列用DNASar软件包中的Seqman软件进行比对, 并辅以人工校正。下载GenBank中6种棱鲉属鱼类的所有COI同源序列进行比对分析。以斑鲹(*Clupandon punctatus*)和日本鲉(*Engraulis japonicus*)为外群, 基于K2P模型并利用MEGA 4.0软件构建NJ系统发育树, 并计算组群内和组群间的遗传距离。由于缺乏棱鲉属鱼类的化石记录, 无法确定棱鲉属鱼类准确的核苷酸替换速率, 对COI基因片段采用1.2%/百万年的核苷酸分歧速率来估算各物种间的分化年代(Bermingham et al, 1997)。

2 结果

对采集到的6种棱鲉属鱼类的主要形态特征进行测量(表2), 样本体长范围为61-153 mm。除上颌

骨伸达位置作为该属的种类鉴别特征外, 第一鳃耙的下鳃耙数同样可以作为种类鉴别的重要依据。其中赤鼻棱鲉的下鳃耙数最多(27-31), 其次为黄吻棱鲉(20-22), 之后分别为杜氏棱鲉(17-19)、中颌棱鲉(15-17)、汉氏棱鲉(12-15), 而长颌棱鲉的下鳃耙数最少(8-10)。背鳍、臀鳍和胸鳍等可数性状均存在一定的数量交叉。为消除样本因体长不同而产生的差异, 使用标准化方法对样本的可度量特征进行标准化(表2), 结果显示, 5组标准化后的数据间同样存在一定的重叠, 不能很好地区分开6种棱鲉属鱼类。由此看出, 棱鲉属鱼类的种类鉴别主要依靠上颌骨伸达的位置和第一鳃耙的下鳃耙数, 其余形态特征可作为参考补充。

依据下鳃耙数的不同对黄吻棱鲉和中颌棱鲉进行初步分类, 统计结果显示, 黄吻棱鲉下鳃耙数范围为20-22, 共50尾; 中颌棱鲉下鳃耙数范围为15-17, 共128尾。对所有样品的COI序列进行测序, 获得655 bp的目的片段。在测得的32条黄吻棱鲉COI序列中, 获得7个单倍型, 在测得的128条中颌棱鲉COI序列中, 获得23个单倍型, 二者间共享4个单倍型。对所有160条序列进行比较, 发现存在27个变异位点, 但不存在能将二者完全分开的特殊位点; 基于黄吻棱鲉和中颌棱鲉所有单倍型构建邻接系统发育树, 可以看出所有单倍型广泛地分布在系统树上, 未发现与物种单独对应的谱系结构(图1); 二者之间的遗传距离为0.004, 明显低于种间差异水平。由此可以看出COI片段并不能将中颌棱鲉和黄吻棱鲉完全分开。

棱鲉属鱼类每种随机取5尾, 并结合GenBank

表2 棱鲉属鱼类样品的体长范围和数量性状
Table 2 Range of standard length and meristic values of the samples of six *Thryssa* species

种类 Species	数量 No.	体长范围 Standard length (mm)	上颌骨伸达位置 Maxillary extend to position	下颔耙数 Lower gill rake	背鳍 Dorsal fin	臀鳍 Anal fin	胸鳍 Pectoral fin	体高/体长 Body depth /standard length (B/A)	头长/体长 Head length /standard length (C/A)	吻长/头长 Snout length /head length (D/C)	眼眶/头长 Orbit diameter /head length (E/C)	尾柄长/尾柄高 Length of caudal peduncle/ depth of caudal peduncle (F/G)
赤鼻棱鲉 <i>T. hamdaniensis</i>	50	72-106	鳃盖	27-31	1, 13-15	28-34	11-13	0.23-0.26	0.23-0.24	0.20-0.24	0.21-0.24	0.51-0.69
汉氏棱鲉 <i>T. hamiltonii</i>	36	88-153	鳃孔	12-15	1, 13-14	37-42	12-14	0.22-0.26	0.20-0.22	0.17-0.20	0.23-0.26	0.63-0.91
中颌棱鲉 <i>T. mystax</i>	50	65-132	Gill opening 胸鳍基部 Pectoral fin base	15-17	1, 13-15	34-38	12-14	0.21-0.24	0.19-0.26	0.17-0.22	0.24-0.28	0.66-1.03
黄吻棱鲉 <i>T. vitrirostris</i>	50	61-121	胸鳍基部 Pectoral fin base	20-22	1, 10-13	37-42	11-14	0.23-0.26	0.18-0.29	0.19-0.21	0.22-0.27	0.59-1.07
杜氏棱鲉 <i>T. dussumieri</i>	50	69-125	几达腹鳍 Nearly ventral fin	17-19	1, 12-14	34-37	12-13	0.24-0.28	0.22-0.24	0.16-0.18	0.22-0.25	0.76-0.98
长颌棱鲉 <i>T. setirostris</i>	30	89-131	肛门 Anus	8-10	1, 13-15	34-38	13-14	0.22-0.26	0.19-0.21	0.13-0.16	0.23-0.26	0.83-1.14

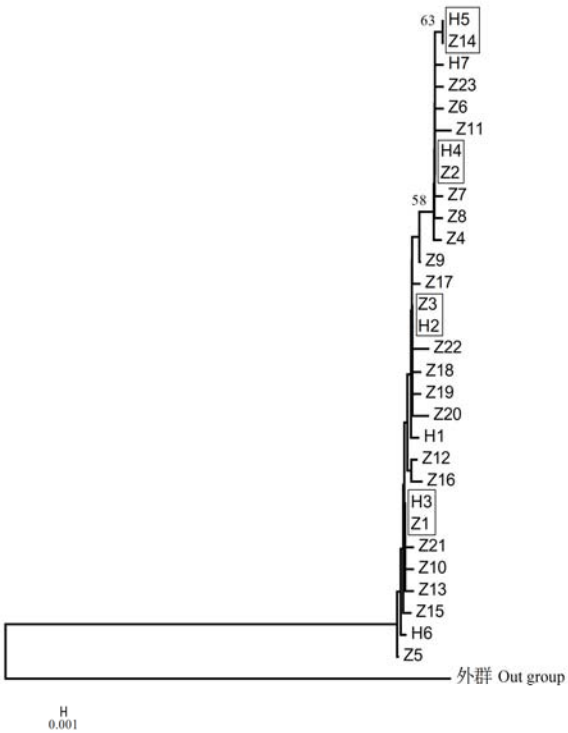


图1 基于单倍型构建黄吻棱鲉和中颌棱鲉的邻接系统发育树(方框内为共享单倍型)
Fig. 1 Phylogenetic tree of *Thryssa vitrirostris* and *T. mystax* based on all haplotypes. Shared haplotypes are in the box.

中下载的该属相关同源序列共68条进行比较分析, 得到目的片段长度为525 bp。所有位点中变异位点175个, 简约信息位点172个, 单一信息位点3个, 无插入缺失现象。转换数为182, 颠换数为57, 转换/颠换比为3.19, 表明该基因的序列突变还未达到饱和。各物种的碱基组成无明显差异, T、C、A、G的平均含量分别为29.9%、26.1%、25.5%、18.5%, 表现出明显的反G偏倚(表3)。在棱鲉属鱼类测得的序列中, 共检测到12个单倍型(表3), 其中赤鼻棱鲉、杜氏棱鲉、汉氏棱鲉和长颌棱鲉分别独享各自单倍型, 而中颌棱鲉和黄吻棱鲉间共享2个单倍型。

以斑鲉和日本鲉为外群, 构建邻接系统发育树(图2)。从系统发育树上可以看到, 所有序列可聚类成10个组群。其中组群1有13条序列, 为赤鼻棱鲉; 组群2有10条序列, 为黄吻棱鲉和中颌棱鲉; 组群3有1条序列; 组群4有6条序列; 组群5有7条序列, 为长颌棱鲉; 组群6有4条序列; 组群7有3条序列; 组群8有5条序列, 为杜氏棱鲉; 组群9有5条序列; 组群10有14条序列, 为汉氏棱鲉, 且各组群间的支持

表3 6种棱鯧属鱼类线粒体COI片段的碱基组成及单倍型数量
Table 3 Base composition and number of haplotypes of mitochondrial COI gene segment in six *Thryssa* species

种类 Species	碱基组成 Nucleotide composition (%)				单倍型数量 Number of haplotypes
	T(U)	C	A	G	
赤鼻棱鯧 <i>T. kammalensis</i>	31.6	25.3	25.5	17.5	1
中颌棱鯧 <i>T. mystax</i>	30.3	26.1	26.1	17.5	2
杜氏棱鯧 <i>T. dussumieri</i>	28.4	26.2	26.6	18.8	2
长颌棱鯧 <i>T. setirostris</i>	28.8	27.1	25.3	18.9	2
汉氏棱鯧 <i>T. hamiltonii</i>	30.3	25.1	25.0	19.6	2
黄吻棱鯧 <i>T. vitrirostris</i>	30.3	26.1	26.1	17.5	3
平均 Average	29.9	26.1	25.5	18.5	—

表4 基于COI基因序列10个组群的组内、组间的遗传距离和分化时间(百万年)
Table 4 Genetic distances within and among groups, the divergence dates between ten groups based on COI gene

	组群1 Group 1	组群2 Group 2	组群3 Group 3	组群4 Group 4	组群5 Group 5	组群6 Group 6	组群7 Group 7	组群8 Group 8	组群9 Group 9	组群10 Group 10
组群1 Group 1	0.001	2.83	2.75	13.58	15.75	15.25	15.33	15.08	13.92	14.50
组群2 Group 2	0.034	0.001	4.00	14.42	15.17	14.00	14.42	15.00	15.33	15.83
组群3 Group 3	0.033	0.048	—	13.58	14.50	14.92	16.75	16.17	14.83	15.50
组群4 Group 4	0.163	0.173	0.163	0.004	15.50	16.08	17.33	14.75	16.25	16.33
组群5 Group 5	0.189	0.182	0.174	0.186	0.002	16.83	17.83	15.83	15.42	17.00
组群6 Group 6	0.183	0.168	0.179	0.193	0.202	0.001	12.25	15.50	15.50	16.33
组群7 Group 7	0.184	0.173	0.201	0.208	0.214	0.147	0.003	14.25	15.92	16.17
组群8 Group 8	0.181	0.180	0.194	0.177	0.190	0.186	0.171	0.003	17.42	16.08
组群9 Group 9	0.167	0.184	0.178	0.195	0.185	0.186	0.191	0.209	—	13.67
组群10 Group 10	0.174	0.190	0.186	0.196	0.204	0.196	0.194	0.193	0.164	0.001

分化时间在对角线上方, 组间遗传距离在对角线下方, 组内遗传距离在对角线上。
The divergence dates between groups are above the diagonal, genetic distances among groups are below the diagonal, and genetic distances within groups are on the diagonal

率均较高。除了6种棱鯧属鱼类外, 仍有5个组群存在。其中组群3和组群4是以“*T. setirostris*”(长颌棱鯧)为学名进行提交的, 组群6是以“*T. hamiltonii*”(汉氏棱鯧)为学名进行提交的, 组群7是以“*T. dussumieri*”(杜氏棱鯧)为学名进行提交的, 组群9是以“*T. vitrirostris*”(黄吻棱鯧)为学名进行提交的。很明显这些序列均不同于本研究对应物种的自测序列。

在COI蛋白质编码基因部分片段中, 大部分的突变是同义突变。在组群9内未发生碱基突变, 组群1、4、5和6内各有1处碱基发生突变, 在组群7中有2处碱基发生突变, 组群8和组群10内有3处碱基发生突变, 组群2内有4处碱基发生突变。在525 bp的目的片段中, 共翻译氨基酸175个, 变异氨基酸数仅为3个, 出现在组群3 (2个)与组群7 (1个)之间。除组群2和组群7中有1处氨基酸序列发生变异外, 其余组群内未检测到变异。

基于K2P核苷酸最佳替换模型分别计算10个组群内及组群间的遗传距离(表4)。组群2由中颌棱鯧和黄吻棱鯧混合组成, 组群内的遗传距离为0.001,

明显低于种间的差异水平。除组群2外, 各组群内的遗传距离范围为0–0.004, 符合种内差异水平; 各组群间的遗传距离为0.033–0.214, 明显超过一般物种间的差异水平。同时可以看出种间遗传距离的最小值与种内遗传距离的最大值无交叉现象, 种间遗传距离明显高于种内遗传距离, 暗示剩余的9个组群可能是不同的物种。

由表4可以看出, 各组群间的分化时间范围在2.75–17.83百万年前, 其中组群1和组群3之间的分化时间最短, 发生在上新世晚期; 组群5和组群7之间分化时间最长, 发生在中新世早期。

3 讨论

棱鯧属鱼类的外部形态相似, 结合之前的形态学测量结果, 可以看出棱鯧属鱼类的主要鉴别特征为上颌骨伸达位置和第一鳃耙下鳃耙数量。由于鉴定者参考的资料和主观原因, 样品的鉴定往往会有一定的出入。因此, 有必要在形态鉴定的同时结合DNA条形码技术对样品进行双重鉴定。本研究在基

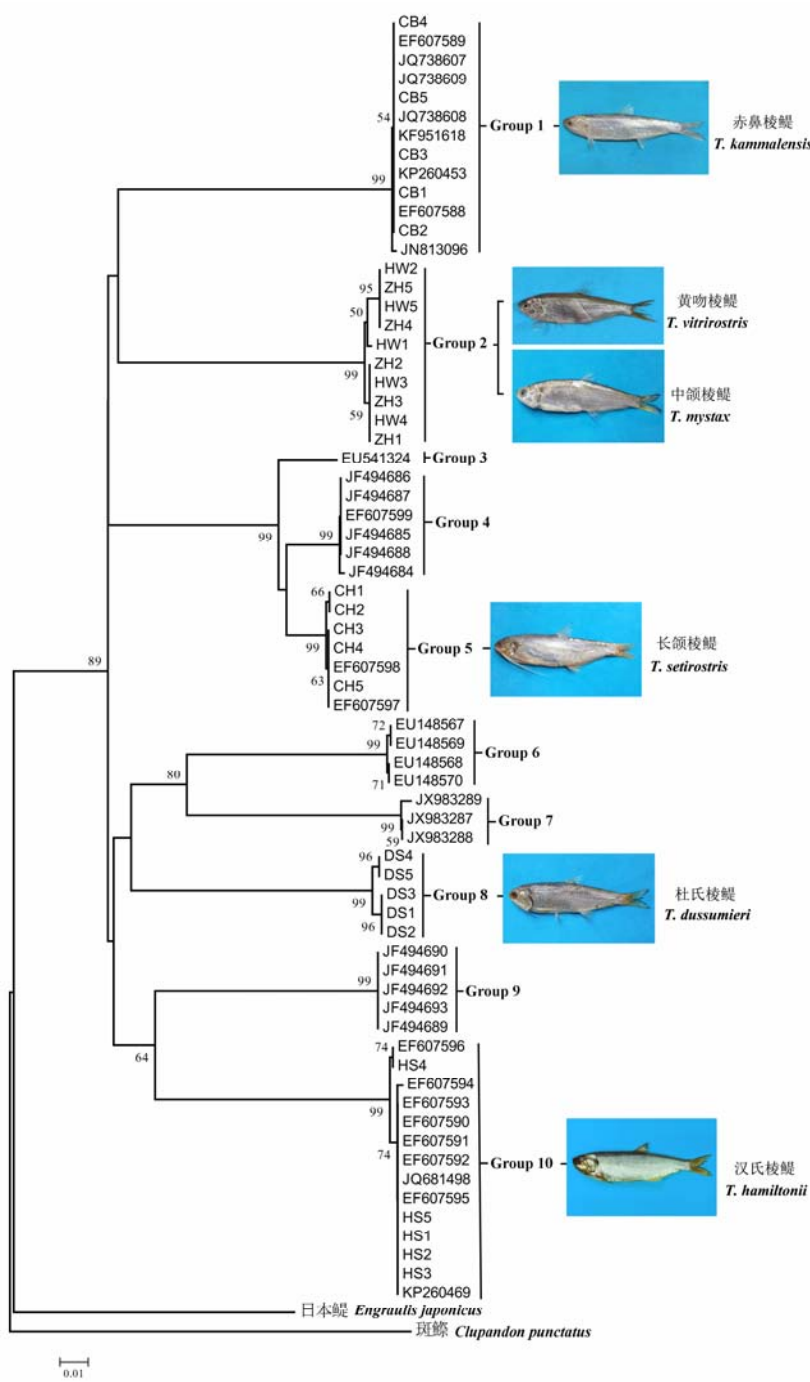


图2 构建棱鲉属鱼类邻接系统发育树
Fig. 2 Phylogenetic tree of *Thryssa* species based on neighbor-joining method

于形态特征和DNA条形码技术对我国沿海分布的棱鲉属鱼类进行鉴别的同时, 结合GenBank中的相关同源序列进行系统发育研究, 并对其中的错误序列进行了纠正。

在碱基组成方面, 棱鲉属鱼类各种的A+T含量高于G+C的含量(表3), 这一现象符合海水鱼类中

A+T含量偏高的规律(Ward et al, 2005)。在序列变异方面, Hebert等(2003)认为在COI基因片段上, 种内差异一般都低于1%, 甚少超过2%; 而种间差异则大于2%。除组群2外, 剩余9个组群的组内和组间差异水平均符合上述水平(表4), 暗示9个组群实为不同的有效物种, 且种间遗传分化明显(图2), 种间遗

传距离平均值明显高于种内遗传距离平均值,基本符合种间与种内遗传距离的“10×”法则(Ward et al, 2005)。

从系统发育树上可以看出,赤鼻棱鲷、黄吻棱鲷和中颌棱鲷、长颌棱鲷、杜氏棱鲷和汉氏棱鲷分别聚为一支,达到种间差异水平,而其余5个组群间的遗传距离同样超过了种的界限(表4)。其中组群3、4和5(自测)中的序列均是以“*T. setirostris*”(长颌棱鲷)为学名进行提交,可以看出组群3和4明显不属于长颌棱鲷;组群6是以“*T. hamiltonii*”(汉氏棱鲷)为学名进行提交,明显不同于自测汉氏棱鲷(组群10);组群9是以“*T. vitirostris*”(黄吻棱鲷)为学名进行提交,同样有别于自测的黄吻棱鲷。分别对组群3、4、6和9的序列在GenBank内重新Blast,未发现与之匹配的序列。由于棱鲷属鱼类大部分种类的COI基因序列尚未报道,且无实际样品对照,因此无法确认该4个组群是属于已报道而未发表相关序列信息的种类,还是属于该属的隐存种。组群7是以“*T. dussumieri*”(杜氏棱鲷)为学名进行提交,明显不同于自测杜氏棱鲷(组群8),重新比对发现其与马拉巴棱鲷(*Thryssa malabarica*)的序列相匹配,由于未获取到马拉巴棱鲷的标本,同样不能判断其准确性。

系统发育树还显示长颌棱鲷属于最先分化出的物种,这一结果与形态学和16S rRNA基因序列分析结果不一致(马春艳等, 2010)。中颌棱鲷与黄吻棱鲷二者间的亲缘关系最近,长颌棱鲷与组群3和组群4互为姐妹种,杜氏棱鲷、汉氏棱鲷、组群6、组群7和组群9互为姐妹种。但这一结果与以上颌骨的长度为原始特征构建的形态分类结果(马春艳等, 2010)并不一致,造成这种结果的原因可能与棱鲷属鱼类各种间的生活习性趋同进化有关(马春艳等, 2010; Krück et al, 2013)。

马春艳等(2010)基于16S rRNA基因序列探讨棱鲷属鱼类的系统进化时发现中颌棱鲷和黄吻棱鲷的差异很小,认为可能为同一种。本研究与该结果相类似,中颌棱鲷和黄吻棱鲷聚类到一起,且二者间的遗传距离明显低于种间差异的一般标准。相似的情况同样在鳙属(*Sillago*)鱼类中出现,*Sillago analis*和*S. ciliata*在外部形态上非常相似,主要鉴别特征存在一定的重叠,且利用COI基因片段并不能将二者区分开,种间遗传距离仅为0.12%,而同时采用线粒体DNA和核基因分子标记能成功地区分

开两种鳙属鱼类,并支持形态上的分类结果(Krück et al, 2013)。由此可见,不能简单地将中颌棱鲷和黄吻棱鲷视为同一物种或两个种,仍需要结合更多分子标记(如核基因分子标记RAG2等)对二者的分类地位作进一步的探讨。而在中颌棱鲷和黄吻棱鲷的单倍型比较中可以看出,二者都有独享单倍型,是否可以利用这些独享单倍型进行种类鉴定,还需要增加样品量来作进一步的验证。

综上所述,本研究利用DNA条形码技术能成功地鉴别出赤鼻棱鲷、汉氏棱鲷、杜氏棱鲷、长颌棱鲷,结果与形态学分类一致,表明DNA条形码能够作为棱鲷属大部分鱼类快速鉴定的有效工具。而未能成功地区分开中颌棱鲷和黄吻棱鲷,可以看出在亲缘关系较近、分化时间较短的物种间,由于其有效的变异不能及时积累,无法提供足够的信息,导致较为保守的基因(如COI)不再适合于物种间鉴别(Summerer et al, 2001)。同样可以看出,GenBank中棱鲷属鱼类的COI基因序列仍存在的问题,其中一些种类以错误学名进行提交,同时还有一些未知种名的序列存在。因此,在今后的工作中有必要加大棱鲷属鱼类样品的采集力度,加强国际间的交流,在寻找形态上分类鉴别特征的同时,评估其隐存多样性水平。同时将传统的鱼类形态分类与DNA条形码技术相结合,才能更准确地鉴别鱼种,进一步确定其分类地位和系统发育关系,为后续研究提供科学依据。

参考文献

- Bermingham E, McCafferty SS, Martin AP (1997) Fish biogeography and molecular clocks: perspectives from the Panamanian Isthmus. In: Molecular Systematics of Fishes (eds Kocher TD, Stepien CA), pp. 113–126. Academic Press, San Diego.
- Bloom DD, Lovejoy NR (2012) Molecular phylogenetics reveals a pattern of biome conservatism in New World anchovies (family Engraulidae). *Journal of Evolutionary Biology*, 25, 701–715.
- Chen WT, Ma XH, Shen YJ, Mao YT, He SP (2015) The fish diversity in the upper reaches of the Salween River, Nujiang River, revealed by DNA barcoding. *Scientific Reports*, Doi: 10.1038/srep17437.
- Gao TX, Ji DP, Xiao YS, Xue TQ, Yanagimoto T, Setoguma T (2011) Description and DNA barcoding of a new *Sillago* species, *Sillago sinica* (Perciformes: Sillaginidae), from coastal waters of China. *Zoological Studies*, 50, 254–263.
- Guo XW, Tang QS (2000) Consumption and ecological conversion efficiency of *Thryssa kammalensis*. *Journal of Fish-*

- eries of China, 24, 422–427. (in Chinese with English abstract) [郭学武, 唐启升 (2000) 赤鼻棱鳀的摄食与生态转换效率. 水产学报, 24, 422–427.]
- Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, deWaard JR (2003) Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 270, 313–321.
- Hyde JR, Vetter RD (2007) The origin, evolution, and diversification of rockfishes of the genus *Sebastes* (Cuvier). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44, 790–811.
- Jia XP, Li YZ, Li CH, Qiu YS, Gan JL (2004) Environment and Fishery Resources in the Exclusive Economic Zone and the Continental Shelf of South China Sea, pp. 339–542. Science Press, Beijing. (in Chinese) [贾晓平, 李永振, 李纯厚, 邱永松, 甘居利 (2004) 南海专属经济区和大陆架渔业生态环境与渔业资源, 339–542. 科学出版社, 北京.]
- Ko HL, Wang YT, Chiu TS, Lee MA, Leu MY, Chang KZ, Chen WY, Shao KT (2012) Evaluating the accuracy of morphological identification of larval fishes by applying DNA barcoding. *PLoS ONE*, 8, e53451.
- Krück NC, Tibbetts IR, Ward RD, Johnson JW, Loh WKW, Ovenden JR (2013) Multi-gene barcoding to discriminate sibling species within a morphologically difficult fish genus (*Sillago*). *Fisheries Research*, 143, 39–46.
- Lavoué S, Miya M, Nishida M (2010) Mitochondrial phylogenomics of anchovies (family Engraulidae) and recurrent origins of pronounced miniaturization in the order Clupeiformes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56, 480–485.
- Li ZY, Jin XS, Zhuang ZM, Su YQ, Tang QS (2007) Food competition of *Engraulis japonicus* and *Thryssa kammaleensis* from the southern Yellow Sea in spring. *Journal of Fishery Sciences of China*, 14, 630–636. (in Chinese with English abstract) [李忠义, 金显仕, 庄志猛, 苏永全, 唐启升 (2007) 南黄海春季鳀和赤鼻棱鳀的食物竞争. 中国水产科学, 14, 630–636.]
- Li Y, Song N, Khan FS, Yanagimoto T, Gao TX (2013) New evidence of morphological characters and DNA barcoding of *Pampus argenteus* (Euphrasen, 1788). *Journal of Fisheries of China*, 37, 1–9. (in Chinese with English abstract) [李渊, 宋娜, Khan FS, 柳本卓, 高天翔 (2013) 银鲳形态特征与DNA条形码研究. 水产学报, 37, 1–9.]
- Li Y, Zhang LY, Song PQ, Zhong ZH, Zhang R, Gao TX, Lin LS (2014) A new record of *Sillago* species in Fujian coastal waters—*Sillago sinica* (Gao and Xue, 2011). *Journal of Applied Oceanography*, 33, 546–552. (in Chinese with English abstract) [李渊, 张丽艳, 宋普庆, 钟指挥, 张然, 高天翔, 林龙山 (2014) 福建省沿海鳀属(*Sillago*)鱼类新记录种——中国鳀(*Sillago sinica* Gao and Xue, 2011). 应用海洋学学报, 33, 546–552.]
- Ma CY, Ma LB, Ni Y, Shen AL, Zhang Y, Zhang FY, Zhao YL (2010) Phylogenetic relationship of *Thryssa* inferred from morphologic characteristic and mitochondrial 16S rRNA gene sequences. *Journal of Fishery Sciences of China*, 17, 471–476. (in Chinese with English abstract) [马春艳, 马凌波, 倪勇, 沈盎绿, 张永, 张凤英, 赵云龙 (2010) 基于形态特征和线粒体16S rRNA基因序列探讨棱鳀属的系统进化. 中国水产科学, 17, 471–476.]
- Shen YJ, Guan LH, Wang DQ, Gan XN (2016a) DNA barcoding and evaluation of genetic diversity in Cyprinidae fish in the midstream of the Yangtze River. *Ecology and Evolution*, Doi:10.1002/ece3.2060.
- Shen YJ, Kang JL, Chen WT, He SP (2016b) DNA barcoding for the identification of common economic aquatic products in Central China and its application for the supervision of the market trade. *Food Control*, 61, 79–91.
- Summerer M, Hanel R, Sturmbauer C (2001) Mitochondrial phylogeny and biogeographic affinities of sea breams of the genus *Diplodus* (Sparidae). *Journal of Fish Biology*, 59, 1638–1652.
- Sun DR, Chen Z (2013) Fish Retrieval of South China Sea (Volume I), pp. 120–123. China Ocean Press, Beijing. (in Chinese) [孙典荣, 陈铮 (2013) 南海鱼类检索 (上册), 120–123. 海洋出版社, 北京.]
- Ward RD, Zemlak TS, Innes BH, Last PR, Hebert PDN (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360, 1847–1857.
- Whitehead PJP, Nelson GJ, Wongratana F (1988) FAO Species Catalogue, Vol. 7: Clupeoid Fishes of the World (suborder Clupeoidei): an Annotated and Illustrated Catalogue of the Herrings, Sardines, Pilchards, Sprats, Shads, Anchovies and Wolf-herrings (Part 2): Enggraulidae, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, pp. 305–579.
- Zhang H, Zhang Y, Zhang ZH, Gao TX (2013) DNA barcodes of eight species in genus *Sebastes*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 48, 45–50.
- Zhang JB, Hanner R (2012) Molecular approach to the identification of fish in the South China Sea. *PLoS ONE*, 7, e30621.
- Zhang SY (2001) Fauna Sinica: Osteichthyes, Acipenseriformes, Elopiforms, Clupeiformes, Gonorhynchiformes, pp. 137–147. Science Press, Beijing. (in Chinese) [张世义 (2001) 中国动物志·硬骨鱼纲: 鲟形目、海鲢目、鲱形目、鼠鲱目, 137–147. 科学出版社, 北京.]
- Zhou MY, Chen X, Yang SY (2015) Identification of several fish eggs and larvae by DNA barcoding in Xiamen Water. *Marine Environmental Science*, 34, 120–125. (in Chinese with English abstract) [周美玉, 陈骁, 杨圣云 (2015) 采用DNA条形码技术对厦门海域鱼卵、仔稚鱼种类的鉴定. 海洋环境科学, 34, 120–125.]
- Zhu YD, Wu HL, Jin XB, Meng QW, Liu J, Lian ZS, Shen GY, Huang ST, Chen HX, Zhang QY, Li WD, Wu XH (1984) Fish of Fujian (Vol. I), pp. 140–153. Fujian Science and Technology Publishing House, Fuzhou. (in Chinese) [朱元鼎, 伍汉霖, 金鑫波, 孟庆闻, 刘基, 连珍水, 沈根媛, 黄少涛, 陈焕新, 张其永, 李婉端, 吴秀鸿 (1984) 福建鱼类志 (上卷), 140–153. 福建科学技术出版社, 福州.]

(责任编辑: 何舜平 责任编辑: 时意专)