

文章编号: 1000-0615(2016)10-1513-08

DOI: 10.11964/jfc.20151010101

基于线粒体CO I基因的中国近海棱鲮属鱼类DNA条形码

官亚运, 章群*, 曹艳, 吕金磊, 杨喜书

(暨南大学水生生物研究中心, 热带亚热带水生态工程教育部工程研究中心, 广东广州 510632)

摘要: 为明确中国大陆近海棱鲮属鱼类的分类地位, 采用国际通用的CO I基因5'端652 bp序列作为DNA条形码, 对中国近海棱鲮属全部6种鱼类62尾标本进行鉴定分析。结果发现, 所分析样品的序列碱基组成为T: 29.0%, C: 26.3%, A: 25.3%, G: 19.4%, A+T含量(54.3%)高于G+C含量(45.7%), 转换/颠换率为3.76。6种棱鲮属鱼类组成5个自展支持率为100%的分支, 除黄吻棱鲮和中颌棱鲮各为单系但聚合为一支外, 其余4种均独立成支; 分支内与分支间平均遗传距离分别为0.2%(0.0%~0.4%)和17.7%(15.7%~19.0%)。赤鼻棱鲮、汉氏棱鲮、杜氏棱鲮和长颌棱鲮均符合Hebert提出的种间遗传距离(15.7%~18.6%)大于或等于10倍种内遗传距离(0.0%~0.3%)的标准, 确定了它们的物种有效性。黄吻棱鲮和中颌棱鲮的种内遗传距离皆为0.1%, 与其他4种棱鲮的种内遗传距离处于同一水平; 但二者种间遗传距离仅为0.6%, 明显低于其他物种间的种间遗传距离, 属于一般物种的种内遗传距离范围, 表明二者亲缘关系很近; 由于外部形态存在一定的差异, 且在分子系统树上各为单系, 二者可作为同一物种的2个不同亚种处理, 但也不排除是2个近期分化形成物种的可能, 在资源管理上应作为2个不同的进化显著单位分别加以管理。

关键词: 棱鲮属; DNA条形码; CO I基因; 中国大陆近海

中图分类号: Q 785; S 917.4

文献标志码: A

棱鲮属(*Thryssa*)隶属辐鳍鱼纲(Actinopterygii), 鲱形目(Clupeiformes), 鲮科(Engraulidae), 广泛分布于大西洋、太平洋和印度洋^[1], 是世界海洋渔业的主要对象之一, 具有重要经济价值; 作为温带和热带近海小型中上层低营养级饵料鱼, 在海洋生态系统能量流动与转换中起着承上启下作用, 是海洋食物网中的关键种^[2]。目前世界上已报道的棱鲮属鱼类有24种^[3], 中国大陆近海分布有赤鼻棱鲮(*T. kammalensis*)、汉氏棱鲮(*T. hamiltonii*)、黄吻棱鲮(*T. vitrirostris*)、中颌棱鲮(*T. mystax*)、杜氏棱鲮(*T. dussumieri*)与长颌棱鲮(*T. setirostris*)^[1]等6种。目前国内棱鲮属鱼类的研究一般见于各地渔业资源调查目录中, 其他还比较少见^[4-6]。

准确的物种鉴定是开展生理生态研究和资源开发利用的前提与基础。传统的鱼类分类主要依据物种的外部形态特征, 并结合比较解剖学特性和生态习性, 虽能区分大部分鱼类, 但过度依赖鉴定者的个人经验, 很多鱼类的条纹、斑点、体色等外部形态易受外界环境^[7]、发育阶段^[8]的影响而产生变化, 在鉴定时难免会出现争议和错误。为此, Hebert等^[9-10]提出通过分析一个标准的目标基因DNA序列对物种进行鉴定, 即DNA条形码(DNA barcoding)。Hebert等^[9-10]对动物界除刺胞动物门外的所有11个门13 320个物种的研究表明, 线粒体CO I (cytochrome oxidase subunit I)基因靠近5'端的一段序列间的差异能够很好地区分所研究的物种, 随着Hebert等^[11]和

收稿日期: 2015-10-10 修回日期: 2016-04-19

资助项目: 国家自然科学基金(41071034); 中央高校基本科研业务费专项(21613105); 欧盟Erasmus Mundus TECHNO I博士后教育交流项目资助

通信作者: 章群, E-mail: tqzhang@jnu.edu.cn

Ward等^[12]分别在北美260种鸟类和澳大利亚207种鱼类中分子鉴定的成功, *CO I* 基因5'端约652 bp的序列已成为动物界物种鉴定的首选DNA条形码, 凭借其快速简单高效的特点, 广泛应用于动物、植物及微生物界的物种鉴定中^[13-15]。DNA条形码突破了传统形态学根据表型性状进行分类的限制, 不受个体发育阶段的影响, 使物种的鉴定过程实现标准化和信息化, 并能反映物种之间的系统发育关系^[12]; 同时, 通过DNA条形码技术, 在大量的研究中发现了隐存种的存在^[11, 16], 给生物分类学带来了新的活力; 在保护生物学和生物多样性调查等领域也发挥着重要作用^[17-18]。

依照传统形态学方法, 中国近海棱鳀属鱼类的物种鉴定主要根据上颌骨末端的长度。黄吻棱鳀和中颌棱鳀的上颌骨末端都伸到胸鳍基部, 但鳃耙和背鳍条数有差异而被分为了2种^[1]; 马春艳等^[5]利用线粒体16S rRNA序列研究棱鳀属鱼类的系统发育关系, 认为黄吻棱鳀和中颌棱鳀是同一物种, 与传统形态分类的观点相悖。虽然分子研究表明黄吻棱鳀和中颌棱鳀亲缘关系很近, 但由于二者外部形态有所不同, 且该研究仅分析了少数样品, 研究结果并没有明确黄吻棱鳀和中颌棱鳀是否各为单系以及是否能在种下进一步区分。此外, 该研究分析的样本仅限于福建海域, 而随着采样地理范围的扩大, 或许能够更为全面地了解中国近海棱鳀属鱼类, 明确其分类地位以及探寻可能存在的隐藏种。为此, 本实验加大了每种棱鳀属采样的地点和数量, 并采用*CO I* 这一目前国际上通用的动物DNA条形码基因来进行分析, 以期全面准确地鉴定中国近海棱鳀属鱼类, 明确棱鳀属尤其是黄吻棱鳀和中颌棱鳀的分类地位, 补充和丰富棱鳀属鱼类DNA条形码数据库, 为中国棱鳀属种质资源的保护和合理开发提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

根据棱鳀属鱼类在中国的分布^[1], 分别在黄海、东海、南海采集样品, 采集后的样品用95%乙醇保存备用。根据《中国动物志》^[1]按照传统的形态学分类方法对11个地点共62尾保存良好的样本进行鉴定, 其中赤鼻棱鳀11尾(黄海、

南海)、汉氏棱鳀11尾(东海、南海)、黄吻棱鳀12尾(东海、南海)、中颌棱鳀9尾(东海、南海)、杜氏棱鳀11尾(南海)、长颌棱鳀8尾(南海)(表1)。

1.2 实验方法和数据处理

取背部肌肉晾干后提取总DNA, 提取方法参考高盐法并进行改进^[19]。PCR采用引物为本实验室自行设计的CX1F2: 5'-ACCTGTGGCAATCACACGCTGAT, TestCXR1a: 5'-ATGTGRTTG GCTTGAAAC, 以及通用引物VF2, R2^[20]。PCR反应体系及反应条件参照乐小亮等^[21]的方法, 将经1%的琼脂糖凝胶电泳检测得到的条带清晰的PCR产物送至北京六合华大基因有限公司, 切胶纯化后在美国Applied Biosystems公司生产的ABI-3730自动测序仪上进

表1 研究所用样品及采集地

Tab. 1 Specimens and their sampling localities in the present study

种名 species	地点 location	数量/尾 number	标本编号 catalog number
赤鼻棱鳀 <i>T.kammalensis</i>	山东石岛(L.SD)	2	<i>T.kammalensis</i> L.SD1—2
	广东碓洲(Y.NZ)	9	<i>T.kammalensis</i> Y.NZ1—9
汉氏棱鳀 <i>T.hamiltoni</i>	广东阳江(Y.YJ)	4	<i>T.hamiltoni</i> Y.YJ1—4
	广东碓洲(Y.NZ)	3	<i>T.hamiltoni</i> Y.NZ1—3
	广东乌石(Y.WS)	3	<i>T.hamiltoni</i> Y.WS1—3
	广东廉江(Y.LJ)	1	<i>T.hamiltoni</i> Y.LJ1
黄吻棱鳀 <i>T.vitirostris</i>	江苏吕四(S.LS)	1	<i>T.vitirostris</i> S.LS1
	浙江温州(Z.WZ)	3	<i>T.vitirostris</i> Z.WZ1—3
	广东南澳(Y.NA)	3	<i>T.vitirostris</i> Y.NA1—3
	广东碓石(Y.JS)	4	<i>T.vitirostris</i> Y.JS1—4
	广东阳江(Y.YJ)	1	<i>T.vitirostris</i> Y.YJ1
中颌棱鳀 <i>T.mystax</i>	江苏吕四(S.LS)	4	<i>T.mystax</i> S.LS1—4
	浙江温州(Z.WZ)	2	<i>T.mystax</i> Z.WZ1—2
	福建龙海(M.LH)	1	<i>T.mystax</i> M.LH1
	广东碓石(Y.JS)	2	<i>T.mystax</i> Y.JS1—2
杜氏棱鳀 <i>T.dussumieri</i>	广东南澳(Y.NA)	3	<i>T.dussumieri</i> Y.NA1—3
	广东阳江(Y.YJ)	4	<i>T.dussumieri</i> Y.YJ1—4
	广东乌石(Y.WS)	4	<i>T.dussumieri</i> Y.WS1—4
长颌棱鳀 <i>T.setirostris</i>	广东南澳(Y.NA)	6	<i>T.setirostris</i> Y.NA1—6
	广东碓洲(Y.NZ)	1	<i>T.setirostris</i> Y.NZ1
	海南海尾(Q.HW)	1	<i>T.setirostris</i> Q.HW1

行测序。测定的序列通过MEGA 6.0^[22]软件进行人工校对, 计算碱基组成、变异位点、转换与颠换的比值以及基于Kimura 2-parameter(K2P)模型的种内和种间遗传距离, 并利用邻接法构建分子系统发育树, 经1000次重复抽样(bootstraps)检测分支置信度。

2 结果

2.1 CO I 基因片段序列特征

将本研究得到的扩增条带进行BLAST, 在GenBank中分别找到与各个物种最为匹配的序列。结果显示, 在GenBank中尚未有中颌棱鳀线粒体CO I 序列的记录, 与其最为相似的为黄鲫属(*Setipinna*)的黄鲫(*S. tenuifilis* HM180874), 但因序列长度仅有618 bp, 本研究不予采用, 除此之外, 其余5种棱鳀分别对应各自的同源序列, 序列号分别为*T. kammalensis* KP260453、*T. hamiltoni* EF607588、*T. vitirostris* JF494693、*T. dussumieri* JX983287和*T. setirostris* EF607597。参照GenBank的同源序列将本研究全部扩增条带的长度截取为652 bp, 全部序列中, 没有碱基插入和缺失, 其中多态位点189个, 简约信息位点185个。T、C、A、G的平均含量分别为29.0%、26.3%、25.3%、19.4%, A+T含量(54.3%)高于C+G含量(45.7%), 表现出明显的碱基组成偏向性, 与其他硬骨鱼类线粒体CO I 基因碱基组成的基本特征一致^[12]。转换与颠换比(R)为3.76, 表明CO I 基因序列的突变未达到饱和, 适合系统发育分析^[23]。

2.2 分子系统发育树

在邻接树上6种棱鳀形成了5个bootstrap支持率为100%的单系支(图1), 分支内平均遗传距离为0.2%(0.0%~0.4%), 分支间平均遗传距离为17.7%(15.7%~19.0%), 分支间的平均遗传距离是分支内的89倍。除黄吻棱鳀和中颌棱鳀在NJ树上位于同一分支外, 其余4种棱鳀各自成支。NJ树的结果表明同处一支的黄吻棱鳀和中颌棱鳀具有十分近的亲缘关系。

2.3 种内及种间遗传距离

6种棱鳀属鱼类基于K2P模型的种内种间遗传距离中, 赤鼻棱鳀最大(0.3%), 长颌棱鳀最小(0.0%), 平均为0.13%; 种间遗传距离最大的是中颌棱鳀和汉氏棱鳀(19.6%), 最小的是黄吻棱鳀

和中颌棱鳀(0.6%), 平均为16.61%, 种间平均遗传距离远远大于种内平均遗传距离(约128倍)(表2)。黄吻棱鳀和中颌棱鳀的种间遗传距离只有0.6%, 同样表明二者具有较近的亲缘关系。如除去聚为一支的黄吻棱鳀和中颌棱鳀, 单独分析其他4种棱鳀时, 则种内遗传距离为(0.0%~0.3%), 种间遗传距离为(15.7%~18.6%), 种间平均遗传距离(17.7%)为种内平均遗传距离(0.15%)的118倍; 其中长颌棱鳀和汉氏棱鳀的种间遗传距离最小(15.7%), 赤鼻棱鳀和汉氏棱鳀的种间遗传距离最大(18.6%)。

3 讨论

3.1 基于CO I 基因的DNA条形码对棱鳀属鱼类鉴定的有效性

已有研究表明, 利用CO I 基因序列进行物种鉴定的主要标准在于种间的遗传距离远大于种内的遗传距离(约10倍以上)^[9]。除腔肠动物门(Cnidaria)外, 大部分动物种内遗传距离小于1%, 很少大于2%, 此后2%作为DNA条形码研究中的物种划分参考值^[10]。本研究中涉及到的多数物种都有来自不同海域的样品, 赤鼻棱鳀来自黄海和南海, 汉氏棱鳀、黄吻棱鳀以及中颌棱鳀来自东海和南海, 杜氏棱鳀和长颌棱鳀来自南海。根据Hebert等^[11]对北美260种鸟类的DNA条形码研究, 其中130种来自相隔约1080 km不同地理位置的样本, 结果发现, 地理距离对种内遗传距离并无太大影响; 同时Huemmer等^[24]基于CO I 基因对欧洲1004种鳞翅目物种的DNA条形码研究发现, 分别来自相距1600 km的2个地点的各个物种, 87.6%的种类的种内最大遗传距离均小于2%, 基于CO I 基因的种内遗传距离能够有效地诊断该研究中98.8%的分类群, 结合上述报道, 本研究得到的种内遗传距离并不会因样品来自不同的海域而受到太大影响。在本研究中, 棱鳀属鱼类的种内遗传距离(0.0%~0.3%)均小于1%, 符合Hebert等^[10]提出的种内遗传距离的标准, 其中赤鼻棱鳀、汉氏棱鳀、杜氏棱鳀、长颌棱鳀互相的种间遗传距离(15.7%~18.6%)都显著大于种间2%遗传差异界限, 且均远远大于它们种内遗传距离的10倍以上, 确定了这4种棱鳀的物种有效性, 得到的鉴定结果与形态学的鉴定一致, 证明CO I 基因作为DNA条形码能够对这4种棱鳀进行准确有效的鉴定。

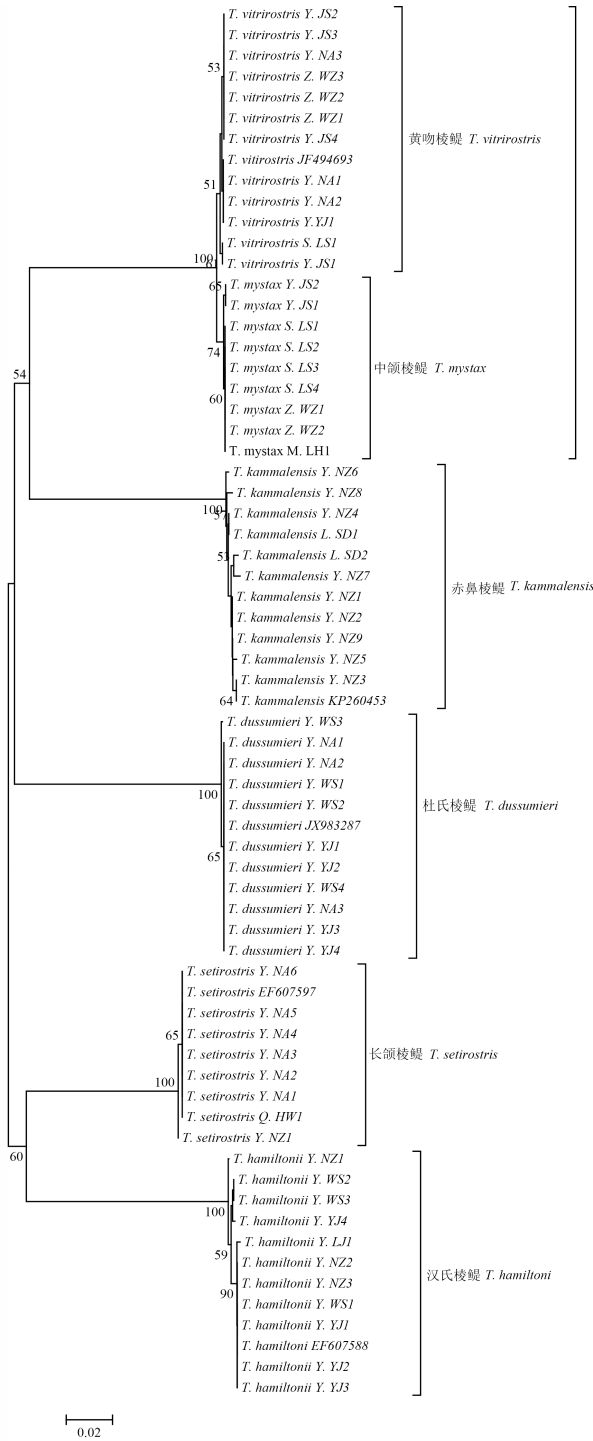


图 1 CO I 基因基于K2P模型构建的NJ树

Fig. 1 The NJ tree based on CO I genes using K2P model

3.2 黄吻棱鲛和中颌棱鲛分类地位的探讨

黄吻棱鲛和中颌棱鲛体型相似，体色皆为银白色，上颌骨末端都伸到胸鳍基部，仅凭这些方面无法对二者进行区分。因此，本研究对12尾黄吻棱鲛和9尾中颌棱鲛进行了形态测量，对2种鱼的几种可数性状进行了比较(表3)。从数

据上看，对黄吻棱鲛和中颌棱鲛可根据背鳍数和鳃耙数的不同来进行区分。

分子研究表明，黄吻棱鲛和中颌棱鲛在NJ树上聚为一支，它们的种内遗传距离皆为0.1%，与其他5种棱鲛属鱼类相当；但种间遗传距离(0.6%)仅在一般物种的种内遗传距离范围(≤2%)范围之

表 2 梭鲃属鱼类基于K2P模型的种间(对角线下)和种内(对角线)遗传距离

Tab. 2 Inter-species(below diagonal) and intra-species(diagonal) genetic distance based on K2P model of *Thryssa*

	赤鼻梭鲃 <i>T.kammalensis</i>	汉氏梭鲃 <i>T.hamiltoni</i>	黄吻梭鲃 <i>T.vitirostris</i>	中颌梭鲃 <i>T.mystax</i>	杜氏梭鲃 <i>T.dussumieri</i>	长颌梭鲃 <i>T.setirostris</i>	%
赤鼻梭鲃 <i>T.kammalensis</i>	0.3						
汉氏梭鲃 <i>T.hamiltoni</i>	18.6	0.2					
黄吻梭鲃 <i>T.vitirostris</i>	17.3	18.8	0.1				
中颌梭鲃 <i>T.mystax</i>	17.1	19.6	0.6	0.1			
杜氏梭鲃 <i>T.dussumieri</i>	18.2	18.0	18.0	18.0	0.1		
长颌梭鲃 <i>T.setirostris</i>	18.2	15.7	16.5	16.8	17.7	0.0	

表 3 黄吻梭鲃和中颌梭鲃的形态特征比较

Tab. 3 The comparison of morphological characteristics of *T.vitirostris* and *T.mystax*

	黄吻梭鲃(12尾) <i>T.vitirostris</i>	中颌梭鲃(9尾) <i>T.mystax</i>
体长/mm length	86~108	96~131
体高/mm height	22~25	22~27
背鳍数/n dorsal fin	11~13	14~15
臀鳍数/n anal fin	38~41	35~39
腹鳍数/n pelvic fin	7	7
胸鳍数/n pectoral fin	12~13	12~14
鳃耙数/n gill raker	13~15+20~22	9~11+14~17
腹缘棱鳞/n ventral scales	16+9~11	15~17+11~12

内; 这一结果与马春艳等^[5]通过16s rRNA的分析得到的黄吻梭鲃和中颌梭鲃的亲缘关系很近, 二者遗传距离在种内范围的结果类似。但由于分析样本数量和地点的增加, 使用的分子标记不同, 本研究发现黄吻梭鲃和中颌梭鲃种间距离(0.6%)虽远小于其他物种的种间遗传距离(15.7%~18.6%), 但较明显地高于梭鲃属鱼类各个种的种内遗传距离(0.0%~0.3%); 同时二者在NJ树上虽聚为一个分支但仍可进一步分为2个单系分支, 表明了二者在分子上有一定的区分。因此本研究推测有2种可能: ①黄吻梭鲃和中颌梭鲃可能是同一个种的不同亚种。程磊等^[25]研究了中国鲫属(*Carassius*) 128尾鱼类CO I 基因651 bp的片段, 结果显示, 在NJ树上同处于一个大支(支持率为100%)的(*C.auratus auratus*)与(*C.auratus gibelio*)形成2个独立的小分支, 且2类群的遗传距离为0.7%, 后与已知的鲫属亚种(*C.auratus langsdorfi*)对比分

析, 最终认为二者是鲫的2个亚种, 该结果与本研究十分相似; 同时郑芳等^[26]基于线粒体CO I 基因序列探讨长江华溪蟹(*Sinopotamon yangtsekiense*)已知的3个亚种的遗传分化得到的NJ树和遗传距离也与本研究的结果类似; 因此, 通过上述报道, 结合黄吻梭鲃和中颌梭鲃虽外部形态相似但有部分性状的差异, 以及本研究中二者虽然亲缘关系较近但分子上可相互区分的特点, 推测黄吻梭鲃和中颌梭鲃有可能是同一个物种的不同亚种。②黄吻梭鲃和中颌梭鲃也有可能是2个近期分化物种。Hebert等^[11]对北美260种鸟类的研究中曾指出, CO I 基因对近期新形成的物种经常难以彻底区分; 同样Shearer等^[27]利用CO I 基因对30个加勒比海珊瑚礁物种的研究发现, 标准CO I 条形码序列长度较短且进化速度较慢, 而近期分化形成的物种种间分化不足, CO I 序列差异较小, 种间和种内的遗传距离相差不大, 比值有时无法达到10倍以上标准, 本研究中黄吻梭鲃和中颌梭鲃也有类似的情况, 二者虽在分支下各自分开聚为一小支, 但种间遗传距离(0.6%)仅为种内遗传距离(皆为0.1%)的6倍, 未满足Hebert等^[9]提出的种间遗传距离是种内遗传距离10倍以上的普遍标准, 因此本研究也不排除黄吻梭鲃和中颌梭鲃是2个近期分化物种的可能。

综上所述, 本研究利用线粒体CO I 基因作为DNA条形码成功鉴定了中国近海梭鲃属鱼类中的赤鼻梭鲃、汉氏梭鲃、杜氏梭鲃、长颌梭鲃, 结果与形态学的鉴定一致, 表明DNA条形码能够作为梭鲃属大部分鱼类快速鉴定的有效工具。由于DNA条形码不依赖个体外部形态, 不受发育阶段影响, 今后可被广泛应用于梭鲃属鱼卵、

仔稚鱼的鉴定工作,为海洋渔业早期调查提供资料;也可用来对棱鳀属鱼类形态学分类系统进行补充和修订。本研究表明,黄吻棱鳀和中颌棱鳀可能为同一物种的2个不同亚种或是2个近期分化形成的物种,从种质资源保护和利用的角度来看,应作为2个进化显著单位分别加以管理。

由于不同种类的棱鳀属鱼类在不同海域的产量和分布以及出现季节并不相同,同时我国东海、南海等各大海域的鱼类资源都在呈现逐年衰退局面^[28-29],使得本研究的采样受到一定程度的限制,未能完全涉及到物种的所有分布范围;同时由于线粒体COI基因相对保守,在近缘物种鉴定中仍存在一定的局限性。在今后的研究中,一方面需要继续扩大采样范围,增加分析样品的地点和数量,同时结合传统生物学和渔业生物学等方法全面分析;另一方面考虑采用更为灵敏的分子标记,研究黄吻棱鳀和中颌棱鳀种间是否存在生殖或遗传隔离等情况,深入研究各种棱鳀属鱼类的遗传背景,以更好地管理保护和开发利用中国近海棱鳀属鱼类种质资源。

参考文献:

- [1] 张世义. 中国动物志: 硬骨鱼纲, 鲱形目, 海鲱目, 鲱形目, 鼠鱚目[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 137-147.
Zhang S Y. Fauna Sinica: Osteichthyes, Acipenseriformes, Elopiformes, Clupeiformes, Gonorhynchiformes[M]. Beijing: Science Press, 2001: 137-147(in Chinese).
- [2] 唐启升, 苏纪兰, 孙松, 等. 中国近海生态系统动力学研究进展[J]. 地球科学进展, 2005, 20(12): 1288-1299.
Tang Q S, Su J L, Sun S, *et al.* A study of marine ecosystem dynamics in the coastal ocean of China[J]. Advances in Earth Science, 2005, 20(12): 1288-1299 (in Chinese).
- [3] Whitehead P J P, Nelson G J, Wongratana F. 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: Eungraulidae[M]. Roma: FAO, 1985: 305-579.
- [4] 李忠义, 金显仕, 庄志猛, 等. 南黄海春季鳀和赤鼻棱鳀的食物竞争[J]. 中国水产科学, 2007, 14(4): 630-636.
Li Z Y, Jin X S, Zhuang Z M, *et al.* Food competition of *Engraulis japonicus* and *Thryssa kammalensis* from the southern Yellow Sea in spring[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(4): 630-636 (in Chinese).
- [5] 马春艳, 马凌波, 倪勇, 等. 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[J]. 中国水产科学, 2010, 17(3): 471-477.
Ma C Y, Ma L B, Ni Y, *et al.* Phylogenetic relationship of *Thryssa* inferred from morphologic characteristic and mitochondrial 16S rRNA gene sequences[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(3): 471-477 (in Chinese).
- [6] 张丽丽, 程起群. 鳀科鱼类线粒体全基因组序列结构特征及系统发育信息分析[J]. 海洋渔业, 2012, 34(1): 7-14.
Zhang L L, Cheng Q Q. Mitochondrial genome characteristics and phylogenetic information of family Engraulidae (Clupeiformes: Clupeoidei) fishes[J]. Marine Fisheries, 2012, 34(1): 7-14 (in Chinese).
- [7] Wilkens H, Strecker U. Convergent evolution of the cavefish *Astyanax* (Characidae, Teleostei): Genetic evidence from reduced eye - size and pigmentation[J]. Biological Journal of the Linnean Society, 2003, 80(4): 545-554.
- [8] Blaxter J H S. 1 Pattern and variety in development[J]. Fish Physiology, 1988, 11: 1-58.
- [9] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2003, 270(1512): 313-321.
- [10] Hebert P D N, Ratnasingham S, de Waard J R. Barcoding animal life: Cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species[J]. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences, 2003, 270(S1): S96-S99.
- [11] Hebert P D N, Stoeckle M Y, Zemplak T S, *et al.* Identification of birds through DNA barcodes[J]. PLoS Biology, 2004, 2(10): e312.
- [12] Ward R D, Zemplak T S, Innes B H, *et al.* DNA barcoding Australia's fish species[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2005, 360(1462): 1847-1857.
- [13] Hajibabaei M, Janzen D H, Burns J M, *et al.* DNA barcodes distinguish species of tropical Lepidoptera[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(4): 968-971.

- [14] Kress W J, Wurdack K J, Zimmer E A, *et al.* Use of DNA barcodes to identify flowering plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(23): 8369-8374.
- [15] Roe A D, Rice A V, Bromilow S E, *et al.* Multilocus species identification and fungal DNA barcoding: Insights from blue stain fungal symbionts of the mountain pine beetle[J]. Molecular Ecology Resources, 2010, 10(6): 946-959.
- [16] Zemlak T S, Ward R D, Connell A D, *et al.* DNA barcoding reveals overlooked marine fishes[J]. Molecular Ecology Resources, 2009, 9(S1): 237-242.
- [17] Witt J D S, Threlloff D L, Hebert P D N. DNA barcoding reveals extraordinary cryptic diversity in an amphipod genus: Implications for desert spring conservation[J]. Molecular Ecology, 2006, 15(10): 3073-3082.
- [18] Kress W J, García-Robledo C, Uriarte M, *et al.* DNA barcodes for ecology, evolution, and conservation[J]. Trends in Ecology & Evolution, 2015, 30(1): 25-35.
- [19] Aljanabi S M, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(22): 4692-4693.
- [20] Ivanova N V, Zemlak T S, Hanner R H, *et al.* Universal primer cocktails for fish DNA barcoding[J]. Molecular Ecology Notes, 2007, 7(4): 544-548.
- [21] 乐小亮, 章群, 赵爽, 等. 中国近海真鲷遗传变异的线粒体控制区序列分析[J]. 广东农业科学, 2010, 37(2): 136-139.
- Yue X L, Zhang Q, Zhao S, *et al.* Genetic variation of red seabream (*Pagrus major*) in coastal waters of China inferred from mitochondrial DNA control region sequence analysis[J]. Guangdong Agricultural Sciences, 2010, 37(2): 136-139 (in Chinese).
- [22] Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0[J]. Molecular Biology and Evolution, 2013, 30(12): 2725-2729.
- [23] Kumar S. Molecular clocks: Four decades of evolution[J]. Nature Reviews Genetics, 2005, 6(8): 654-662.
- [24] Huemer P, Mutanen M, Sefc K M, *et al.* Testing DNA barcode performance in 1000 species of European Lepidoptera: Large geographic distances have small genetic impacts[J]. PLoS One, 2014, 9(12): e115774.
- [25] 程磊, 常玉梅, 鲁翠云, 等. 鲷属鱼类DNA条码及种与亚种划分[J]. 动物学研究, 2012, 33(5): 463-472.
- Cheng L, Chang Y M, Lu C Y, *et al.* DNA barcoding and species and subspecies classification within genus *Carassius*[J]. Zoological Research, 2012, 33(5): 463-472 (in Chinese).
- [26] 郑芳, 吕秀玲, 孙红英, 等. 基于线粒体CO I 基因序列探讨长江华溪蟹的遗传分化[J]. 南京师大学报(自然科学版), 2006, 29(2): 103-105.
- Zheng F, Lü X L, Sun H Y, *et al.* Genetic differentiation of *Sinopotamon yangtsekiense* based on mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene[J]. Journal of Nanjing Normal University (Natural Science), 2006, 29(2): 103-105 (in Chinese).
- [27] Shearer T L, Coffroth M A. DNA BARCODING: Barcoding corals: Limited by interspecific divergence, not intraspecific variation[J]. Molecular Ecology Resources, 2008, 8(2): 247-255.
- [28] 卢振彬, 戴泉水, 肖方森. 闽南-台湾浅滩海域鱼类资源生产量[J]. 热带海洋学报, 2005, 24(1): 60-66.
- Lu Z B, Dai Q S, Xiao F S. Capacity of fish resources in Southern Fujian-Taiwan shoal sea area[J]. Journal of Tropical Oceanography, 2005, 24(1): 60-66 (in Chinese).
- [29] 鞠海龙. 南海渔业资源衰减相关问题研究[J]. 东南亚研究, 2012(6): 51-55.
- Ju H L. Studies on the decrement of fishery resource in the South China Sea[J]. Southeast Asian Studies, 2012(6): 51-55 (in Chinese).

DNA barcoding of *Thryssa* in coastal waters of China based on the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I sequence

GONG Yayun, ZHANG Qun*, CAO Yan, LÜ Jinlei, YANG Xishu

(Engineering Research Center of Tropical and Subtropical Aquatic Ecological Engineering, Ministry of Education,
Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: *Thryssa* of the family Engraulidae are widely distributed in the Atlantic Ocean, the Pacific Ocean and the Indian Ocean, with important commercial values in fishery and aquaculture of many countries. In order to achieve unambiguous species recognition and define species status, 652 bp segments of mtDNA cytochrome oxidase subunit I from 62 specimens representing 6 species of genus *Thryssa* were used as DNA barcoding to examine genetic distances within and among all reported morphological species in coastal waters of China mainland. The results showed that the nucleotide compositions were T: 29.0%, C: 26.3%, A: 25.3%, G: 19.4%, A+T(54.3%) is higher than C+G(45.7%), and the average value of transition/transversion ratios was 3.76. All species were monophyletic and formed into 5 clades with 100% bootstrap supports, of which *T.vitirostris* and *T.mystax* were in the same clade, and the average genetic distances within and among clades were 0.2%(0.0%—0.4%), 17.7%(15.7%—19.0%) respectively. Genetic distances among and within *T.kammalensis*, *T.hamiltoni*, *T.dussumieri* and *T.setirostris* were 15.7%—18.6%, 0.0%—0.3% respectively, i.e., inter-species distances were 10 times greater than intra-species divergence, which confirmed their species status. Although distances within *T.mystax* and *T.vitirostris* were both 0.1%, which were close to the 4 congeneric species, and the genetic distance between *T.vitirostris* and *T.mystax* was 0.6%, which fell within the scope of most reported intra-species distances, suggesting their closer relationship. Due to some distinguishable morphological and molecular differences, *T.mystax* and *T.vitirostris* should be treated as 2 subspecies or recently diverged species. In conclusion, DNA barcoding based on *CO* sequences is useful for identifying correctly 4 *Thryssa* species in coastal waters of China, yet the data also revealed possible cases of unrecognized subspecies or recently diverged species. *T.mystax* and *T.vitirostris* should be managed as 2 significant units, highlighting the importance of synergy between molecular, and biological researches in understanding and documenting Chinese marine fish biodiversity.

Key words: *Thryssa*; DNA barcoding; cytochrome oxidase subunit 1; coastal waters of China mainland

Corresponding author: ZHANG Qun. E-mail: tqzhang@jnu.edu.cn

Funding projects: National Science Foundation of China (41071034); Fundamental Scientific Research Funds for the Central Universities (21613105); Erasmus Mundus TECHNO I post-doc scholarships