

文章编号: 1004-2490(2020)01-0001-09

基于线粒体 *COI* 基因的马鲛科鱼类 DNA 条形码研究

王业磷, 章 群, 邓春兴, 徐 示, 裴丽梅, 黄志基, 罗 纯

(暨南大学生态系, 广州 510632)

摘 要: 为明确中国马鲛科(Polynemidae)鱼类的分类地位,测定了中国7省10个地点马鲛科鱼类3属5种33条*COI*基因5'端序列,结合GenBank下载的5属16种41条同源序列,共分析了6属20种马鲛科鱼类DNA条形码。结果显示,20种鱼类种间平均遗传距离为19.6%,是种内平均遗传距离0.9%的22倍;其中14种形成了单系分支,支持其物种有效性。四指马鲛(*Eleutheronema tetradactylum*)和多鳞四指马鲛(*E. rhadinum*)种间遗传距离(16.0%)是种内平均遗传距离(1.2%)的13倍,支持将二者作为2个独立物种的分类处理。多鳞四指马鲛种内遗传距离(2.3%)大于2%,形成了2个自展数据支持率为99%的分支,分支间遗传距离(4.8%)是分支内平均遗传距离(0.1%)的48倍,表明在中国沿海分布的多鳞四指马鲛有可能存在2个亚种或隐藏种。黑斑多指马鲛(*Polydactylus sextarius*)与马达加斯加多指马鲛(*P. malagasyensis*)外部形态极为相似,种间遗传距离仅为1.0%,且在分子系统树上镶嵌混杂为一支,仅根据分子数据结果,推测二者可能为同一物种;但由于没有可检视的标本,也不能排除GenBank序列种名注释中形态鉴定出错的可能。马伦氏多指马鲛(*P. mullani*)与七丝指马鲛(*Filimanus heptadactylus*)也混为1支,分支内遗传距离仅为0.1%;如果不是GenBank序列种名注释出错,则二者应为同一物种。GenBank序列中来源于北部湾的六丝多指马鲛(*P. sexfilis*),则可能是黑斑多指马鲛的错误鉴定。

关键词: 马鲛科; DNA条形码; *COI*基因

中图分类号: Q 349 **文献标志码:** A

马鲛科(Polynemidae)隶属于硬骨鱼纲(Osteichthyes)辐鳍亚纲(Subclass Neopterygii)鲈形目(Perciformes),广泛分布于温带、亚热带和热带近岸海域以及淡水河流的入海口。马鲛科鱼类如六丝多指马鲛(*Polydactylus sexfilis*),肉质鲜美、营养价值高;还有一些种类如长指马鲛(*Polynemus paradiseus*),形态优美、有较强的观赏性,是珍稀名贵的经济鱼类^[1-2]。全世界已知马鲛科鱼类共有8属43种,其中中国有3属7种^[3-5],分别为四指马鲛属(*Eleutheronema*)的四指马鲛(*E. tetradactylum*)和多鳞四指马鲛(*E. rhadinum*),多指马鲛属(*Polydactylus*)的五指多指马鲛(*P. plebejus*)、黑斑多指马鲛(*P. sextarius*)、

六丝多指马鲛和小口多指马鲛(*P. microstomus*),以及丝指马鲛属(*Filimanus*)的西氏丝指马鲛(*F. sealei*)。在过度捕捞和海洋环境日益恶化的大背景下,马鲛科鱼类的渔业资源在不断减少,特别是市场需求大、价格昂贵的四指马鲛等具高经济价值的马鲛科鱼类,对于该科鱼类的多样性保护十分不利,亟需开展马鲛科鱼类种质资源保护和开发利用研究^[2]。

准确的物种鉴定是种质资源保护和开发利用的前提。目前,MOTOMURA^[1]对马鲛科鱼类基于形态学的再描述是该科鱼类分类的主要依据;叶振江等^[6]对四指马鲛、五指多指马鲛和六丝多指马鲛以及常有民等^[7]对多鳞四指马鲛的耳石

收稿日期: 2019-10-31

基金项目: 国家重点研发计划(2018YFD0900802)

作者简介: 王业磷(1994—),男,硕士研究生,研究方向为分子生态学。E-mail:1341196538@qq.com

通信作者: 章 群,副研究员。E-mail:tzqzhang@jnu.edu.cn

形态特征观察,也为该科鱼类的分类提供了部分依据。但由于马鲛科一些种类外部形态相似度高、分类特征不显著,极易混淆;另外颜色褪变或保存不完整以及不同发育阶段的形态变化,也给鉴定带来较大困难。四指马鲛属鱼类虽是名贵的海产鱼类,但早期的研究资料认为中国沿海分布只有四指马鲛一种,中国没有多鳞四指马鲛的记录^[3-4]。在多鳞四指马鲛作为一个独立有效种确立后,有研究^[8-9]认为原先在中国分布的四指马鲛全部为多鳞四指马鲛,而四指马鲛在中国并无分布。四指马鲛与多鳞四指马鲛形态区分主要是胸鳍颜色的不同,但由于颜色差异并不稳定以及存在着连续变化的可能,常常被误认为同一个种。DNA 条形码技术^[10-11]只需极少量的样品,通过一段标准的 DNA 序列的比较分析就可以对物种进行准确鉴定,从而避免了表型性状鉴定物种存在的不足。已有研究表明,线粒体 *COI* 基因 5' 端一段长度约 652 bp 的序列作为物种鉴定的 DNA 条形码在鱼类^[12]、鸟类^[13] 和昆虫^[14-15] 等动物上都表现出了高可靠性和便利性,且在解决同种异名、异种同名和发现隐存种等方面有着突出优势,已成为了动物界首选 DNA 条形码标记^[16]。

目前,中国马鲛科鱼类 DNA 条形码的研究仅见有严安琪等^[17]对浙江海域四指马鲛和黑斑多指马鲛以及邓春兴^[18]对中国近海四指马鲛属等少数物种局部地区的研究。本研究测定了在中国黄海、东海和南海 7 省 10 个地点采集的 3 属 5 种 33 条标本的线粒体 *COI* 序列,结合 GenBank 中下载的 5 属 16 种的 *COI* 序列,进行中国马鲛科鱼类 DNA 条形码研究,旨在明确该科鱼类的分类地位,为中国马鲛科鱼类种质资源的保护和开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料与分子实验

依据 MOTOMURA^[1] 工作和《南海鱼类检索》^[19] 等相关资料对本实验室多年保存的马鲛科鱼类进行鉴定分类,提取保存于 95% 的乙醇中的中国马鲛科鱼类肌肉组织用于测定 *COI* 序列。本研究测序标本及 GenBank 下载序列来源详见表 1。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增与测序

采用酚-氯仿抽提法^[20]提取总 DNA 后,于 -20 ℃ 中保存。使用通用引物^[12] FishF1: 5' TCAACCAACCACAAAGACATTGGCAC3', FishR1: 5' TAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA3' 对线粒体 *COI* 基因进行 PCR 扩增。反应体系为 30 μL: 15 μL mix, 1 μL FishF1, 1 μL FishR1, 12 μL ddH₂O, 1 μL DNA。反应条件: 95 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 40 s, 54 ℃ 退火 40 s, 72 ℃ 延伸 50 s, 共 35 个循环;最后再 72 ℃ 延伸 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测合格后送华大基因公司进行测序。

1.3 数据处理

经 BioEdit v 7.0.9 对原始序列峰图人工校对,与从 GenBank 下载的 *COI* 序列联并后进行比较。用 MEGA X 计算碱基组成、变异位点、简约位点以及转换/颠换值;基于 K2P (Kimura-2-parameter) 模型,经 1 000 次重复抽样检测置信度构建邻接 (neighbor-joining) 树;分别计算种内种间和分支内分支间的遗传距离。在 <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/abgdweb.html> 网站上利用 ABGD (automatic barcode gap discovery) 法进行假设种分析^[21]。

2 结果与分析

2.1 马鲛科鱼类 *COI* 基因序列分析

在马鲛科鱼类 6 属 20 种 74 个体平均长度为 648 bp (620 bp ~ 652 bp) 的 *COI* 基因序列中,没有碱基插入或缺失,保守位点 394 个,变异位点 258 个,简约信息位点 251 个。T、C、A、G 平均含量分别为: 28.9%、29.3%、22.3%、19.5%, A + T 含量 (51.2%) 高于 G + C 含量 (48.8%), 有一定的偏倚性,与其他硬骨鱼类 *COI* 序列碱基特征基本一致^[12]。转换与颠换比 3.37,说明序列突变没有达到饱和,适用于系统发育分析^[22]。

2.2 种内与种间遗传距离

基于 K2P 模型计算出马鲛科 20 种鱼类的种内遗传距离为 0 ~ 11.9%, 平均遗传距离为 0.9%; 种间遗传距离为 0.1% ~ 27.4%, 平均遗传距离为 19.6%; 种间平均遗传距离是种内平均遗传距离的 22 倍,符合 HEBERT^[10-11] 提出的物种鉴别“十倍法则”,即种间遗传距离远大于种内遗传距离的 10 倍以上。在 DNA 条形码研究中,

除腔肠动物门(Cnidaria)外,2%是绝大部分物种划分的参考值^[10-11],即种内遗传距离一般小于2%,种间一般大于2%。六丝多指马鲛种内遗传距离为11.9%,远大于2%;多鳞四指马鲛种内遗传距离为2.3%;其余种类均远小于2%。黑斑多指马鲛与马达加斯加多指马鲛(*Polydactylus malagasyensis*)的种间遗传距离为1.0%,马伦氏多指马鲛(*Polydactylus mullani*)与七丝指马鲛(*Filimanus heptadactylus*)种间距离仅为0.1%,都小于2%;其他各种类间的种间遗传距离均远大于2%。

表 1 本研究中用于 *COI* 分析的马鲛科鱼类样本的信息
Tab. 1 Specimen information of Polynemidae in the present study

属 Genus	种 Species	采样地点 Sampling site	数量 Number	编号 Catalog number	序列来源 Sequences accession
四指马鲛属 <i>Eleutheronema</i>	四指马鲛 <i>E. tetradactylum</i>	广西东兴	1	E. tet. GX. DX. 1	本研究
		广东阳江	3	E. tet. GD. YJ. 1~3	本研究
		广西东兴	4	E. rha. GX. DX. 1~4	本研究
		海南潭门	3	E. rha. HN. TM. 1~3	本研究
		广东阳江	2	E. rha. GD. YJ. 1~2	本研究
	多鳞四指马鲛 <i>E. rhadinum</i>	福建福州	4	E. rha. FJ. FZ. 1~4	本研究
		浙江洞头	3	E. rha. ZJ. DT. 1~3	本研究
		江苏吕四	3	E. rha. JS. LS. 1~3	本研究
		山东石岛	2	E. rha. SD. SD. 1~2	本研究
		马来西亚	2	E. rha. MAL. 1~2	MG816137/MG816138
丝指马鲛属 <i>Filimanus</i>	七丝指马鲛 <i>F. heptadactylus</i>	印度	3	F. hep. IND. 1~3	EF609524~EF609526
	丛丝指马鲛 <i>F. perplexa</i>	印度尼西亚	2	F. per. INDO. 1~2	HQ564482/HQ564489
	真丝指马鲛 <i>F. similis</i>	印度	3	F. sim. IND. 1~3	MF281364~MF281366
	黄丝指马鲛 <i>F. xanthonema</i>	印度尼西亚	3	F. xan. INDO. 1~3	HQ564506~HQ564508
小黑体马鲛属 <i>Leptomelanosoma</i>	小黑体马鲛 <i>L. indicum</i>	印度	3	L. ind. IND. 1~3	MF281369/ MF281370/EF609539
	大西洋多指马鲛 <i>P. octonemus</i>	墨西哥	3	P. oct. MEX. 1~3	HQ573282/HQ573283/HQ575697
	小口多指马鲛 <i>P. microstomus</i>	印度	2	P. mic. IND. 1~2	MF281377/MF281378
		印度尼西亚	1	P. mic. INDO. 1	HQ564283
多指马鲛属 <i>Polydactylus</i>	太平洋多指马鲛 <i>P. approximans</i>	美国加州	1	P. app. USA. 1	GU440471
		秘鲁	1	P. app. PER. 1	KY572888
	五指多指马鲛 <i>P. plebeius</i>	海南潭门	3	P. ple. HN. TM. 1~3	本研究
	六丝多指马鲛 <i>P. sexfilis</i>	美国夏威夷	1	P. sexf. USA. 1	MG816719
		北部湾	3	P. sexf. BBW. 1~3	KY371977~KY371979
		海南海尾	1	P. sext. HN. HW. 1	本研究
	黑斑多指马鲛 <i>P. sextarius</i>	广东碙洲	1	P. sext. GD. NZ. 1	本研究
		广东阳江	2	P. sext. GD. YJ. 1~2	本研究
	童多指马鲛 <i>P. virginicus</i>	伯利兹	3	P. vir. BEL. 1~3	JQ840220/JQ840221/JQ840651
	马达加斯加多指马鲛 <i>P. malagasyensis</i>	南非	3	P. mal. AFR. 1~3	JF494202~JF494204
	马伦氏多指马鲛 <i>P. mullani</i>	印度	2	P. mul. IND. 1~2	MF281374/MF281375
	黑斑十指马鲛 <i>G. decadactylus</i>	广东广州	1	G. dec. GD. GZ. 1	本研究
马鲛属 <i>Polynemus</i>	野马鲛 <i>P. dubius</i>	越南	1	P. dub. VIE. 1	MH721199
	黑手马鲛 <i>P. melanochir</i>	越南	1	P. mel. VIE. 1	MH721198
	长指马鲛 <i>P. paradiseus</i>	孟加拉国	2	P. par. BAN. 1~2	MF281373/MK572496
		印度	1	P. par. IND. 1	HQ219165

2.3 马鲛科鱼类分子系统发育树

在邻接树中(图1),74条序列形成了19个分支;分支间的平均遗传距离为20.4%(2.8%~27.6%)是分支内平均遗传距离0.1%(0.0%~0.2%)的204倍。20种鱼类有14种形成了单系分支,支持其物种有效。多鳞四指马鲛形成了2个自展数据支持率为99%的分支,部分福州个体、全部东兴个体以及马来西亚个体形成1支(Clade2);广泛分布于中国沿海的其余个体形成1支(Clade1);分支间遗传距离为4.8%。黑斑多指马鲛、北部湾的六丝多指马鲛和马达加斯加多指马鲛混杂于Clade16中,自展数据支持率为99%,分支内遗传距离为0.7%。马伦氏多指马鲛与七丝指马鲛混杂于Clade14中,自展数据支持率为99%,分支内遗传距离仅为0.1%。四指马鲛属、马鲛属分别形成单系群。在ABGD分析中(图3),当种内先验遗传距离 P 为0.46%~2.15%时,马鲛科被分为16个假设种。夏威夷的六丝多指马鲛(Clade4)与五指多指马鲛(Clade5)被归为一个假设种;马鲛属的长指马鲛(*Polynemus paradiseus*)、黑手马鲛(*P. melanochir*)和野马鲛(*P. dubius*)(Clade6、Clade7、Clade8)也被归为一个假设种,这与遗传距离和邻接树的结果不一致;其他种的划分与邻接树形成的分支相一致。

3 讨论

马鲛科20种鱼类的种间平均遗传距离(19.6%)是种内平均遗传距离(0.9%)的22倍;在邻接树上形成了14个单系分支,分支间平均遗传距离(20.4%)是分支内平均遗传距离(0.1%)的204倍,表明存在明显的DNA条形码间隙,符合鉴别物种的“十倍法则”,说明 COI 基因适用于作为马鲛科鱼类鉴定的DNA条形码。

多鳞四指马鲛最早由JORDAN等^[23]根据中国台湾样品提出,但在早期,多鳞四指马鲛被认为是四指马鲛的年幼个体^[24]。MOTOMURA等^[25]于2002年根据侧线鳞数(82~95vs71~80,前者为多鳞四指马鲛,下同)和胸鳍颜色(黑色vs黄色)等形态特征将其与四指马鲛分开,并确定为一个独立的有效种被采用至今。在本研究中,多鳞四指马鲛与四指马鲛种间遗传距离为

16.0%,远大于2%种内遗传阈值,且是种内平均遗传距离1.2%的13倍,从分子水平上支持了该分类的有效性。但多鳞四指马鲛种内遗传距离(2.3%)略大于2%的物种遗传阈值,且在NJ树上形成了2个明显的分支,分支间遗传距离(4.8%)是分支内平均遗传距离(0.1%)的48倍,符合“十倍法则”。杨喜书^[26]发现南海印度鲷(*Platycephalus indicus*)种内遗传距离为4.8%,形成了2个支持率为99%的分支,且分支间的遗传距离(10.4%)是分支内平均遗传距离(0.4%)的26倍,认为印度鲷可能存在隐存种。陈璐等^[27]发现三线鲷(*Terapon puta*)种内遗传距离(2.7%)大于2%,形成了2个分支,分支间遗传距离为5.0%,但与分支内的平均遗传距离(0.85%)不满足“十倍法则”,认为其可能为两个亚种或不同种。参照上述研究,推测中国沿海分布的多鳞四指马鲛可能已分化成2个亚种乃至2个物种,其中东兴个体和部分福州个体为一种或亚种,且在马来西亚见有分布;另一种或亚种在中国黄海、东海以及南海都有分布。多鳞四指马鲛是海水鱼中的名贵品种,同时作为潜在的养殖新品种,具有广阔的开发前景^[28];在今后种质资源开发、利用和保护中,应考虑将其归为2个管理保护单位。

六丝多指马鲛形成了2个距离较远的分支:1)夏威夷个体独立成支;2)北部湾个体与黑斑多指马鲛和马达加斯加多指马鲛混为一支。夏威夷的六丝多指马鲛个体在BOLD网站上有照片记录,经仔细比对后确定鉴定无误。黑斑多指马鲛在中国沿海较常见^[29-30],六丝多指马鲛较稀少,现有报道分布于中国南海南部及中国台湾^[5,19],在北部湾尚未发现有其记录;二者都具有6条游离胸丝,但前者侧线起点附近具有一黑色大斑,后者无黑斑^[1]。北部湾个体可能是因游离胸丝数相同而被误鉴定成六丝多指马鲛,实际应为黑斑多指马鲛。游离的胸丝数是马鲛科鱼类分类的重要特征之一,但由于有些马鲛科鱼类具有相同的胸丝数,且有时胸丝数还可能发生变异,如本实验室还获得具5条胸丝的多鳞四指马鲛;因此,不能以此作为其鉴定的唯一特征,需要结合多个不同特征来确定。

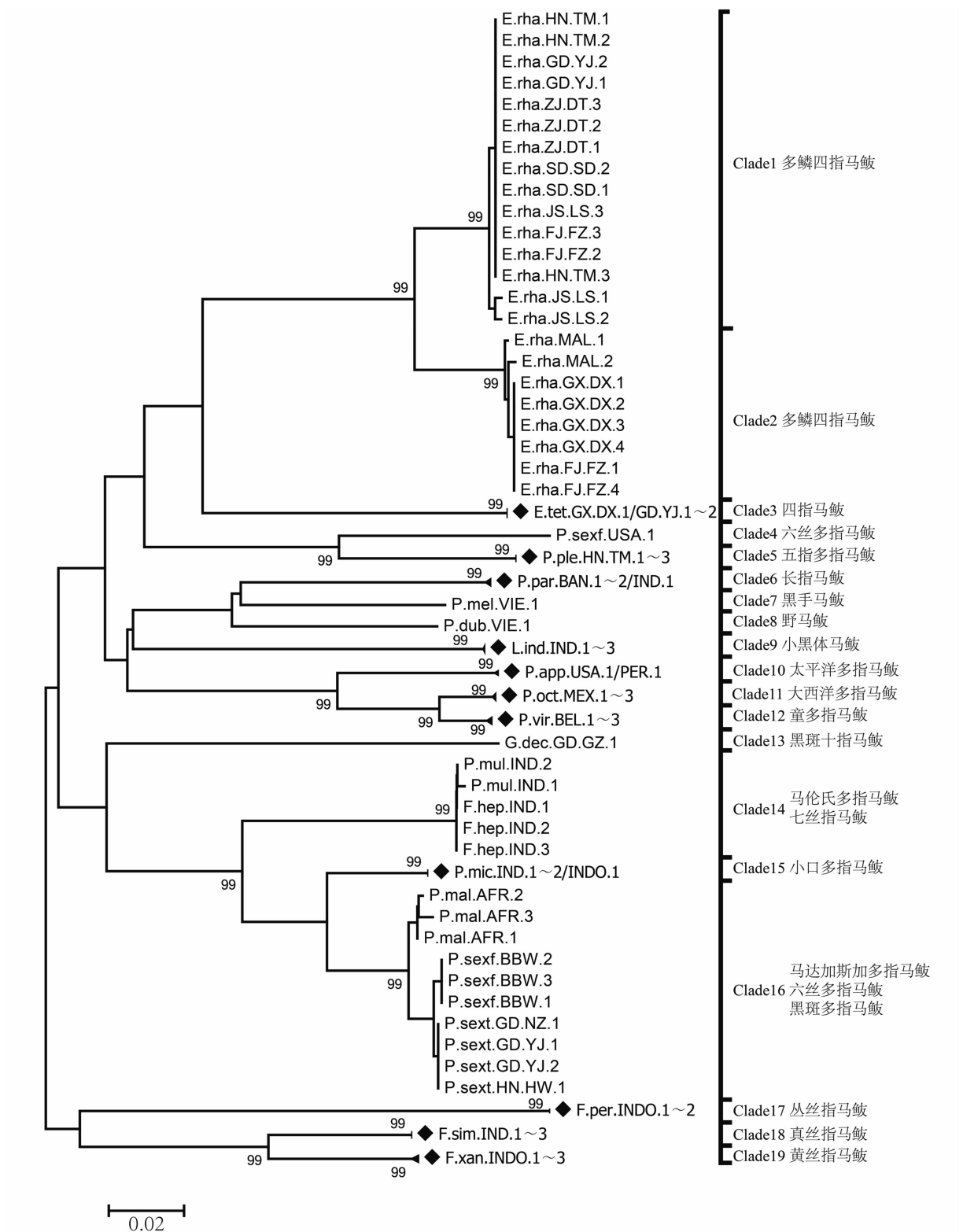


图 1 基于线粒体 *COI* 基因序列的 20 种马鲛科鱼类邻接树

Fig.1 Neighbor-joining tree based on mtDNA *COI* sequences of 20 Polynemid species

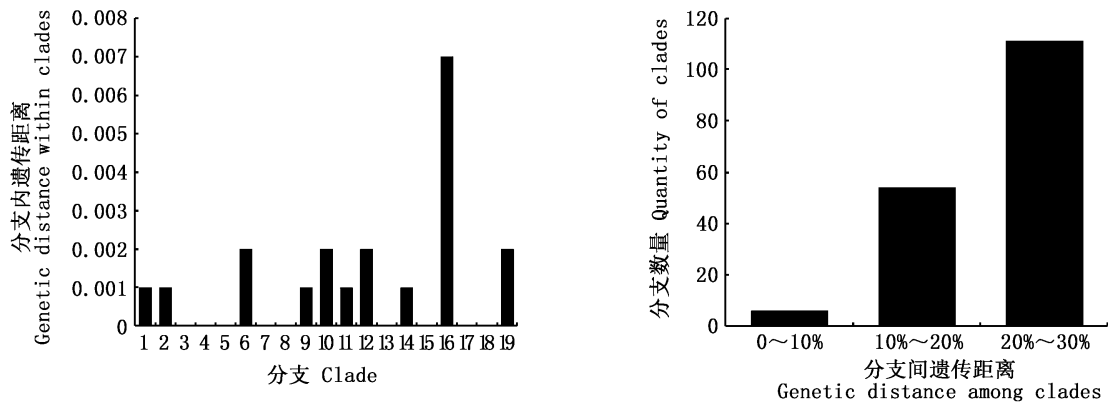


图2 19个分支的分支内(a)与分支间(b)的遗传距离

Fig.2 Histograms of genetic distances within (a) and among 19 clades(b)

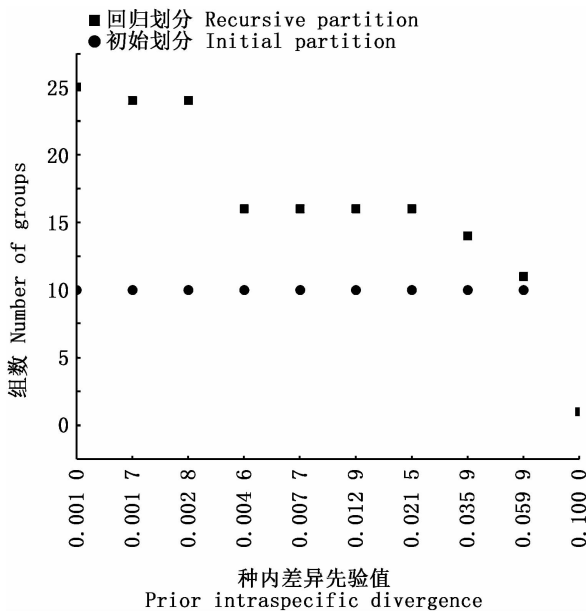


图3 马鲛科鱼类的ABGD分析图

Fig.3 Automatic barcode gap discovery analysis of Polynemidae

黑斑多指马鲛与马达加斯加多指马鲛的种间遗传距离为1.0%,在邻接树上混为一支。黑斑多指马鲛分布广泛,从印度西南部沿岸到巴布亚新几内亚再到日本宫崎;马达加斯加多指马鲛目前只见于马达加斯加、莫桑比克以及南非沿岸^[1];两者外部形态极为相似,都有6条游离胸丝和侧线起点附近有一黑色大斑块,曾被认为同一个种^[31],但前者的鳃耙数(25~30)少于后者(29~35),鳔退化,且第二背鳍基部长相对明显短于后者,被确定为新种^[32]。许多研究表明,某些种类在形态上虽有一定的差异,但在分子上可以表现出相近的关系,如唐楚林等^[33]发现红鳍笛

鲷(*Lutjanus erythropterus*)与马拉巴笛鲷(*L. malabaricus*)的种间遗传距离仅为0.3%,但可以根据侧线下鳞的排列方式进行区分;宫亚运等^[34]发现中颌棱鲷(*Thyssa mystax*)与黄吻棱鲷(*T. vitrirostris*)的种间遗传距离只有0.6%,但可以通过背鳍数和鳃耙数进行区分。黑斑多指马鲛与马达加斯加多指马鲛的情况与之类似,可能为同一种的2个亚种;同时由于标准COI条形码序列长度较短且保守,对近期分化形成的物种往往难以区分^[35],也有可能为近期进化形成的2个不同物种。

马伦氏多指马鲛与七丝指马鲛也混为一支,种间遗传距离为0.1%;它们都有7条游离胸丝,也曾被混淆^[24],但前者侧线起点附近有一黑色大斑块,后者没有,可能仍属于同一物种或为近期分化形成的不同种。马伦氏多指马鲛、七丝指马鲛和马达加斯加多指马鲛的序列源自于GenBank,笔者无法对对应的鱼类进行形态鉴定确认;由于形态过于相似,也不排除形态鉴定出错的可能。

黑斑十指马鲛(*Galeoides decadactylus*)主要分布于非洲西海岸^[1],该鱼在中国尚未有记录,本实验室样品购自广州市场,但未知其明确产地。五指多指马鲛较少见,本实验室也只获得几条,同时在中国大陆有记录的六丝多指马鲛以及在中国台湾有报道的小口多指马鲛和西氏丝指马鲛都未能采集到,特别是多鳞四指马鲛的分类还存在问题等,在今后的研究中,还需进一步扩大采样的范围,补充样品的种类和数量,在详细的形态测量基础上结合多种分子标记展开研究,

以期进一步明确中国马鲛科鱼类的分类地位。

参考文献:

- [1] MOTOMURA, H. Threadfins of the world (Family Polynemidae) [M]. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004.
- [2] 林先智, 区又君, 李加儿, 等. 马鲛科 (Polynemidae) 鱼类的研究现状及展望 [J]. 生物学杂志, 2015, 32 (4): 83 - 87.
LIN X Z, QUN Y J, LIN J E, *et al.* Present status and foreground of family threadfin fishes (Polynemidae) [J]. Journal of Biology, 2015, 32 (4): 83 - 87.
- [3] 中国科学院动物研究所, 中国科学院海洋研究所, 上海水产学院. 南海鱼类志 [M]. 北京: 科学出版社, 1962: 267 - 271.
Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai Ocean University. Fish of the South China Sea [M]. Beijing: Science Press, 1962: 267 - 271.
- [4] 朱元鼎, 张春霖, 成庆泰. 东海鱼类志 [M]. 北京: 科学出版社, 1963.
ZHU Y D, ZHANG C L, CHENG Q T. Fish of the East China Sea [M]. Beijing: Science Press, 1963.
- [5] SHAO K T. Taiwan Fish Database [DB]. 2009.
- [6] 叶振江. 中国海洋鱼类耳石形态学分析及应用研究 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
YE Z J. Study on otolith shape, taxonomy and application for fishes in China Sea [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010.
- [7] 常有民. 多鳞四指马鲛耳石形态、群体判别及年龄鉴定的研究 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2013.
CHANG Y M. The study about otolith morphology, stock discrimination and age determination of *Eleutheronema rhadinum* [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2013.
- [8] 陈大刚, 张美昭. 中国海洋鱼类 [M]. 青岛: 中国海洋大学出版社, 2015.
CHEN D G, ZHANG M Z. Ocean fishes of China [M]. Qingdao: Ocean University of China Press, 2015.
- [9] 倪勇, 伍汉霖. 江苏鱼类志 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2006.
NI Y, WU H L. Fish of Jiangsu [M]. Beijing: China Agriculture Press, 2006.
- [10] HEBERT P D N, CYWINSKA A, BALL S L, *et al.* Biological identifications through DNA barcodes [J]. Proceedings of the Royal Society of London B, 2003, 270 (1512): 313 - 321.
- [11] HEBERT P D N, RATNASINGHAM S, DEWAARD J R. Barcoding animal life: Cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. Biological Sciences, 2003, 270 (Suppl. 1): S96 - S99.
- [12] WARD R, ZEMLAK T, INNES B, *et al.* DNA barcoding Australia's fish species [J]. Biological Sciences, 2005, 360 (1462): 1847 - 1857.
- [13] HEBERT P D N, STOECKLE M, ZEMLAK T. Identification of birds through DNA barcodes [J]. Plos Biology, 2004, 2 (10): 1657 - 1663.
- [14] HAJIBABAEI M, HJANZEN D, HEBERT P D N, *et al.* DNA barcodes distinguish species of tropical *Lepidoptera* [J]. PNAS, 2006, 103 (4): 968 - 971.
- [15] HEBERT P D N, PENTON E, BURNS J, *et al.* Ten species in one: DNA barcoding reveals cryptic species in the neotropical skipper butterfly *Astraptes fulgerator* [J]. PNAS, 2004, 101 (41): 14812 - 14817.
- [16] 黄镇宇, 章群, 卢丽锋, 等. 基于形态测量和 DNA 条形码的中国鲷科鱼类分类研究 [J]. 海洋渔业, 2018, 40 (1): 1 - 9.
HUANG Z Y, ZHANG Q, LU L F, *et al.* Morphological measurements and DNA barcoding of Mugilidae in coastal waters of China [J]. Marine Fisheries, 2018, 40 (1): 1 - 9.
- [17] 严安琪, 高昌礼, 王一凡, 等. DNA 条形码在海洋动物种类鉴别中的应用: 以马鲛为例 [J]. 浙江海洋大学学报 (自然科学版), 2016, 35 (1): 19 - 23.
YAN A Q, GAO Y L, WANG Y F, *et al.* The application of DNA barcoding in species identification of marine animals: Exemplified by threadfins [J]. Journal of Zhejiang Ocean University (Natural Science), 2016, 35 (1): 19 - 23.
- [18] 邓春兴. 基于 COI 基因序列的中国东南沿海四指马鲛属鱼类的遗传多样性分析 [D]. 广州: 暨南大学, 2014.
DENG C X. Genetic diversity of *Eleutheronema* in the East and South China Seas based on mitochondrial COI gene sequences analysis [D]. Guangzhou: Jinan University, 2014.
- [19] 孙典荣, 陈铮, 等. 南海鱼类检索 [M]. 北京: 海洋出版社, 2013.
SU D R, CHEN Z, *et al.* Synopsis of fish of the South China Sea [M]. Beijing: Ocean Press, 2013.
- [20] 乐小亮, 章群, 赵爽, 等. 一种高效快速的鱼类

- 标本基因组 DNA 提取方法[J]. 生物技术通报, 2010(2):202-204.
- LE X L, ZHANG Q, ZHAO S, *et al.* A fast and efficient method for isolation of genomic DNA from fish specimens[J]. Biotechnology Bulletin, 2010(2): 202-204.
- [21] PUILLANDRE N, LAMBERT A, BROUILLET S, *et al.* ABGD, automatic barcode gap discovery for primary species delimitation[J]. Molecular Ecology, 2012, 21(8):1864-1877.
- [22] KNIGHT A, MINDELL D P. Substitutions bias, weighting of DNA sequence evolution, and the phylogenetic positions of *Fea's viper*[J]. Systematic Biology, 1993, 42(1):18-31.
- [23] JORDAN DS, EVERMANN BW. Notes on a collection of fishes from the Island of Formosa[J]. Proceedings of the United States National Museum, 1902, 25:315-368.
- [24] KAGWADE PV. The polynemid fishes of India[M]. Bulletin of the Central Marine Fisheries Research Institute, 1970, 18:1-69.
- [25] MOTOMURA H, IWATSUKI Y, KIMURA S, *et al.* Revision of the Indo-West Pacific polynemid fish genus *Eleutheronema* (Teleostei: Perciformes) [J]. Ichthyological Research, 2002, 49(1):47-61.
- [26] 杨喜书. 中国及邻近地区常见鲷形目鱼类 DNA 条形码研究[D]. 广州:暨南大学, 2017.
- YANG X S. DNA barcoding of common Scorpaeniformes of China and its adjacent areas[D]. Guangzhou: Jinan University, 2017.
- [27] 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(02):121-130.
- CHEN L, HUANG B Y, 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.
- [28] 黄桂云. 多鳞四指马鲛肌肉营养成分分析及幼鱼消化道组织学的研究[D]. 上海:上海海洋大学, 2012.
- HUANG G Y. Study on the muscle nutritional composition analysis in *Eleutheronema rhadinum* and the histology in the digestive tract of the young[D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2012.
- [29] 王雪辉, 林昭进, 杜飞雁, 等. 南海西北部陆架区鱼类的种类组成与群落格局[J]. 生态学报, 2013, 33(7):2225-2235.
- WANG X H, LIN Z J, DU F Y, *et al.* Fish species composition and community pattern in the continental shelf of northwestern South China Sea [J]. Acta Ecological Sinica, 2013, 33(7):2225-2235.
- [30] 董静瑞, 胡成业, 水玉跃, 等. 温州南部沿海岸域鱼类群落特征及其与环境因子的关系[J]. 中国水产科学, 2017, 24(2):209-219.
- DONG J R, HU C, SHUI Y Y, *et al.* Fish community structure and its relationships with environmental factors in the southern inshore waters of Wenzhou [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2017, 24(2):209-219.
- [31] SMITH M M, HEEMSTRA P C. Smiths' sea fishes [M]. Johannesburg: Macmillan South Africa, 1986: 720-721.
- [32] MOTOMURA H, IWATSUKI Y. Review of polydactylus species (Perciformes: Polynemidae) characterized by a large black anterior lateral line spot, with descriptions of two new species [J]. Ichthyological Research, 2001b, 48(4):337-354.
- [33] 唐楚林, 肖林, 章群, 等. 基于 COI 基因的中国及邻近海域部分笛鲷属鱼类 DNA 条形码研究[J]. 海洋渔业, 2019, 41(2):129-137.
- TANG C L, XIAO L, ZHANG Q, *et al.* DNA barcoding of some *Lutjanus* species in China and its adjacent sea areas based on COI gene [J]. Marine Fisheries, 2019, 41(2):129-137.
- [34] 宫亚运, 章群, 曹艳, 等. 基于线粒体 COI 基因的中国近海棱鲷属鱼类 DNA 条形码[J]. 水产学报, 2016, 40(10):1513-1520.
- GONG Y Y, ZHANG Q, CAO Y, *et al.* DNA barcoding of *Thyrssa* in coastal waters of China based on the mitochondrial cytochrome oxidase subunit I sequence [J]. Journal of Fisheries of China, 2016, 40(10):1513-1520.
- [35] SHEARER TL, COFFROTH M A. Barcoding corals: Limited by interspecific divergence, not intraspecific variation [J]. Molecular Ecology Resources, 2008, 8(2):247-255.

DNA barcoding of Polynemidae based on mitochondrial *COI* gene

WANG Ye-lin, ZHANG Qun, DENG Chun-xing, XU Shi, PEI Li-mei, HUANG Zhi-ji, LUO Chun

(Department of Ecology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: To determine species status of some Polynemid species, 5 of mitochondrial *COI* gene sequences of 33 individuals of 5 species of 3 genera from 10 locations in the coastal waters of China were sequenced, and 41 homologous sequences of 16 species of 5 genera were downloaded from GenBank, the combined analyses revealed that the average genetic distance among 20 species (19.6%) was about 22 times those within species (0.9%), and 14 species were monophyletic, supporting their species status. The genetic distance between *Eleutheronema tetradactylum* and *Eleutheronema rhadinum* (16.0%) was about 13 times the average genetic distance within species (1.2%), confirming that *Eleutheronema tetradactylum* and *Eleutheronema rhadinum* were two different species. The intraspecies genetic distance of *Eleutheronema rhadinum* (2.3%) was more than 2%, and was further divided into 2 subclades with 99% bootstrap support, and the genetic distances between the subclades (4.8%) were about 48 times those (0.1%) within subclades, which conformed to the “10 ×” rule, suggesting that *Eleutheronema rhadinum* in coastal waters of China might have evolved to two subspecies or two different species. *Polydactylus sextarius* and *Polydactylus malagasyensis* were very similar in morphological characteristics, and were intertwined in the same clade, and interspecies genetic distance was 1.0%, thus if not misidentified morphologically, the two species might be synonyms. *Polydactylus mullani* and *Filimanus heptadactylus* also were intertwined in the same clade and the genetic distance between species was only 0.1%, if species identification in GenBank were not wrong, they should be treated as synonyms. *Polydactylus sexfilis* collected from the Beibu Bay appeared in the same clade with morphologically checked *Polydactylus sextarius* from various sites in coastal waters of China, which suggested that the sequences were misidentified.

Keywords: Polynemidae; DNA barcoding; *COI* gene