

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20170814001

http://www.yykxjz.cn/

孙超, 刘洪波, 姜涛, 轩中亚, 杨健. 不同鲚属鱼类 Cyt *b* 和 D-loop 序列的比较及其判别早期生活史个体的潜力分析. 渔业科学进展, 2018, 39(5): 27-35

Sun C, Liu HB, Jiang T, Xuan ZY, Yang J. Comparison of D-loop and Cytochrome *b* sequences among different *Coilia* Species and their potential use in analysis for the identification of species at early life stages. Progress in Fishery Sciences, 2018, 39(5): 27-35

不同鲚属鱼类 Cyt *b* 和 D-loop 序列的比较 及其判别早期生活史个体的潜力分析*

孙 超¹ 刘洪波² 姜 涛² 轩中亚¹ 杨 健^{1,2}ⓐ

(1. 南京农业大学无锡渔业学院 无锡 214081; 2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心
中国水产科学研究院内陆渔业生态环境与资源重点开放实验室 无锡 214081)

摘要 使用 mtDNA 作为分子标记, 基于 1022 bp 和 1322 bp 左右的部分序列分析刀鲚(*Coilia nasus*)、湖鲚(*C. nasus taihuensis*)、七丝鲚(*C. grayii*)及凤鲚(*C. mystus*)成鱼之间的遗传关系。结果显示, 刀鲚和湖鲚间的遗传距离分别为 0.0036 ± 0.0008 和 0.0038 ± 0.0008 , 凤鲚与刀鲚、湖鲚的遗传距离分别为 0.1215 ± 0.0111 、 0.1228 ± 0.0111 (Cyt *b*) 和 0.1075 ± 0.0108 、 0.1067 ± 0.0107 (D-loop), 七丝鲚与刀鲚、湖鲚的遗传距离分别为 0.0342 ± 0.0056 、 0.0351 ± 0.0057 (Cyt *b*) 和 0.0527 ± 0.0069 、 0.0529 ± 0.0070 (D-loop), 七丝鲚和凤鲚间的遗传距离分别为 0.1158 ± 0.0111 和 0.1123 ± 0.0111 。用 Kimura 双参数模型构建的 2 种序列的 NJ 分子系统树均显示, 湖鲚和刀鲚不能形成独立的分支, 而是混合聚在一起形成 1 个分支; 七丝鲚和凤鲚则形成另外 2 个分支。首先根据采样点不同可初步断定未知仔幼鱼为刀鲚, 稚鱼为湖鲚, 而后对未知种仔幼鱼、稚鱼和刀、凤鲚鱼卵的 2 种序列的分析发现, 不同采集点内部的这些早期生活个体间的遗传距离分别为 $0.0024 \sim 0.0032$ 和 $0.0025 \sim 0.0082$ 。在 Kimura 双参数模型构建的 NJ 分子系统树中, 未知种仔幼鱼、稚鱼、刀鲚鱼卵与刀鲚、湖鲚聚为一类, 凤鲚鱼卵与凤鲚聚为一支。由此可见, Cyt *b* 基因序列和 D-loop 序列作为分子标记, 虽然可以区分刀鲚、凤鲚以及七丝鲚的仔幼、稚鱼及鱼卵, 但不能有效区分湖鲚和刀鲚的早期生活个体。

关键词 鲚属; 早期生活史; Cyt *b* 基因; D-loop 序列

中图分类号 Q958.8 **文献标识码** A **文章编号** 2095-9869(2018)05-0027-09

对处于早期生活史的鱼类的种类进行准确的鉴定是进行渔业资源量评估的重要方面, 也是进行鱼类整个生活史研究的基础工作。传统的形态学鉴定方法一般基于鱼类的形态学和解剖学特征(何文平等, 2011), 操作简单, 样品可重复使用。在鱼类早期生

活史阶段, 可通过光学显微镜观察鱼卵的形状、颜色、纹理、卵直径和胚胎色素沉着等特征以及胚胎发育过程中鱼卵形态的连续变化来鉴别鱼卵所属物种(Mork *et al*, 2011; Hofmann *et al*, 2017); 也可通过在显微镜下细数仔稚鱼、幼鱼的一些形态学参数判别其所属物

* 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2016PT01)和国家自然科学基金项目(31372533; 31602159)共同资助 [This work was supported by Special Scientific Research Funds for Central Non-Profit Institutes(2016PT01), and National Natural Science Foundation of China (31372533, 31602159)]. 孙 超, E-mail: sunchao159@126.com

① 通讯作者: 杨 健, 研究员, E-mail: jiany@ffrc.cn

收稿日期: 2017-08-14, 收修改稿日期: 2017-10-16

种(Webb *et al*, 2006; 何文平等, 2011)。但这种传统方法操作过程费时费力、依赖经验、主观性较大。不仅如此, 形态特征在不同的物种间(特别是早期生活史个体)还会产生重叠(张冬良等, 2009; Mork *et al*, 2011), 容易产生误判; 有时采样只采到形态不完整的个体(Webb *et al*, 2006), 这时利用传统的物种鉴定方法很难准确判别, 而分子生物学方法能克服形态学鉴定中主观性强、要求研究者具备较高的形态学研究素养、要求样本个体完整性高等局限, 且具有重复性好、灵敏度高等优点(孙超等, 2011)。

线粒体 DNA(Mitochondrial DNA, mtDNA)是一种闭合的环状分子, 分子结构简单, 遵循严格的母系遗传, 几乎不发生重组, 进化速度相对较快, 且不同的区域进化速度存在差异, 因而, 可以选择不同区域进行不同时间尺度的进化分析, 是鱼类分子群体遗传学和分子系统学研究中的重要标记(Xiao *et al*, 2000)。其中, 细胞色素 *b* 基因(Cyt *b*)进化速率适中, 能很好地反映系统演化的较晚期历史(Xiao *et al*, 2000; 孙超等, 2013); 线粒体控制区序列(D-loop)无编码选择压力, 进化速率较其他线粒体基因快, 适合于研究种内种群遗传结构和遗传分化(Liu *et al*, 2004)。线粒体控制区序列(D-loop)较 mtDNA 的其他序列, 其进化速率较快(Liu *et al*, 2004; Chan *et al*, 2016)。因此, 结合线粒体 Cyt *b* 和 D-loop 两种分子序列标记研究鱼类种内的遗传变异和不同的科、属、种的系统进化关系更可靠(胡玉婷等, 2015)。这 2 种线粒体基因已应用于不同物种、群体间的遗传多样性和系统发育物种鉴定研究等方面(阎雪岚等, 2009; 何文平等, 2011; Chan *et al*, 2016; Mansourkiaei *et al*, 2016), 如针对水生生物的物种鉴定(李渊等, 2013; Cheng *et al*, 2013; 张静

等, 2016)、鱼卵仔稚鱼鉴定(Perez *et al*, 2005; Pegg *et al*, 2006; 周美玉等, 2015)、水产品检测(Shen *et al*, 2016; 安丽艳等, 2016)、隐存种发掘(Zemlak *et al*, 2009; Chen *et al*, 2015)新纪录种的发现(Guo *et al*, 2010; Gao *et al*, 2011)等。然而, 从鲟属鱼类的研究来看, 仅有基于 Cyt *b* 基因序列的刀鲟和凤鲟仔稚鱼判别尝试(何文平等, 2011), 但尚未有涉及鱼卵的相关研究报道。本研究采用 Cyt *b* 基因和 D-loop 序列作为分子标记, 将凤鲟、刀鲟鱼卵、未知鲟属仔稚鱼和幼鱼所得序列与刀鲟[*Coilia nasus*, 含其陆封生态型湖鲟(*C. nasus taihuensis*)]、凤鲟(*C. mystus*)、七丝鲟(*C. grayii*)成鱼的相应序列进行比对, 通过计算遗传距离、构建分子系统树等方法对处于早期生活史的鲟属鱼类个体所属的种进行判别, 为分子生物学技术应用于鲟属鱼卵、仔稚鱼鉴别提供理论参考和技术支撑。

1 材料与方法

1.1 样本采集

于 2007 年 5 月~2012 年 2 月间采集样本。湖鲟采自太湖平台山, 七丝鲟采自广东十五涌, 凤鲟鱼卵采自瓯江七都岛永加蒲东村段所获亲鱼, 刀鲟鱼卵采自鄱阳湖星子县所获亲鱼, 未知鲟属稚鱼采自太湖仙岛, 未知鲟属仔幼鱼分别采自长江口崇明岛区域和长江口东滩区域。其中, 凤鲟鱼卵(4~5 期卵)与刀鲟鱼卵(3~4 期卵)(Li *et al*, 2007)分别取自雌性凤鲟和刀鲟体内。研究中刀鲟、湖鲟、七丝鲟和凤鲟成鱼均按照生态习性和形态特征加以鉴别(袁传忠等, 1980)。样本信息见表 1。其中, 未知鲟属仔鱼、稚鱼和幼鱼

表 1 本研究中鲟属鱼类样本的背景
Tab.1 Background information of *Coilia* species in the present study

样本类别 Categorization	采样地点 Sampling location	数量 Number	缩写 Abbreviation
湖鲟 <i>C. nasus taihuensis</i> **	太湖平台山 Pingtaishan of Taihu Lake	9	CET
七丝鲟 <i>C. grayii</i> **	广东十五涌 Shiwuchong in Guangdong	5	CG
刀鲟 <i>C. nasus</i> *	—	—	CE
凤鲟 <i>C. mystus</i> ***	—	—	CM
凤鲟鱼卵 Eggs of <i>C. mystus</i>	七都岛永加蒲东村(瓯江)Qidu Island Yongjiapudong Village (Oujian River)	10	LOJCM
刀鲟鱼卵 Eggs of <i>C. nasus</i>	鄱阳湖星子县 Xingzi County of Poyang Lake	10	PYCE
未知稚鱼 Unknown juveniles	三山岛(太湖仙岛)Sanshan Island (Taihuxian Island) of Taihu Lake	8	NCET
未知仔幼鱼 Unknown larvae	长江口东滩(东旺沙)、崇明岛 Dongtan of Yangtze River Estuary (Dongwangsha), Chongming Island	12	DTCE, CNJ

*: 全部序列载自 GenBank; **: 部分序列载自 GenBank; ***: 部分序列引自孙超等(2013), 部分序列载自 GenBank

*: Sequences were loaded from GenBank entirely; **: Sequences were partially loaded from GenBank; ***: Sequences were cited from Sun *et al*(2013) partially or loaded from GenBank partially

(袁传宓等, 1978; 张冬良等, 2009)的体长分别为 16.4~18.3 mm, 43.5~53.25 mm 和 100.6~122.5 mm; 但部分未知鲚属样本形态不完整, 鱼体残缺无法进行测量。

1.2 基因组 DNA 提取、PCR 扩增及目的片段的纯化

总 DNA 提取采用传统的“酚-氯仿”法(Sambrook *et al.*, 1989)。使用 0.5%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。Cyt *b* 基因扩增使用通用引物 L14724(5'-GAC TTG AAA AAC CAC CGT TC-3')和 H15915(5'-CTC CGA TCT CCG GAT TAC AAG AC-3')(Xiao *et al.*, 2001), PCR 扩增体系和条件参照何文平等(2011)。D-loop 序列扩增使用引物序列为 DF1(5'-CTA ACT CCC AAA GCT AGA ATT CT-3')和 DR2(5'-ATC TTA GCA TCT TCA GTG-3'), PCR 扩增体系和条件参照唐文乔等(2007)。PCR 扩增完成后, 用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。扩增产物用生工生物工程(上海)股份有限公司的 UNIQ-10 柱式 PCR 产物纯化试剂盒回收。

1.3 目的片段的克隆和测序

用购自 TaKaRa 公司的连接试剂盒(pMD[®]18-T Vector)将经纯化回收的目的基因片段与载体进行连接(16°C)。将重组子转化至 DH5 α 感受态细胞(由上海生工高效感受态 Cell 制备试剂盒制备)中, 涂布于 LB 氨苄青霉素(Amp)抗性平板, 经 37°C 过夜培养后, 挑取明显的白斑进行菌液 PCR 验证(菌液量为 5 μ l)。对确认含有目的基因片段的菌液进行扩大培养, 之后送上海生工进行双向测序。部分样本直接采用 PCR 扩增产物纯化后产物进行测序, 测序不理想样本经上述步骤后进行菌液测序。

1.4 数据分析

使用 MEGA 5.05 软件(Tamura *et al.*, 2011)中的 ClustalW 程序对比排列所得序列并辅以手工校正。同时, 利用该软件中的 Kimura 双参数模型计算序列之间的遗传距离(K2P 距离), 并根据 K2P 距离采用邻接法(Neighbour-joining method, NJ)构建种间分化的系统树。通过自展分支检验(Bootstrapping), 获得系统树分支的置信度, 重复次数为 1000 次。

2 结果

鲚属成鱼、未知鲚属仔稚鱼、幼鱼及鱼卵样本的 Cyt *b* 基因和 D-loop 序列均在 1300 bp 左右。经过序列比对和手工校正后, 分别选择其中的 1022 bp 和

1322 bp 进行进一步分析。其中, 本研究所得鲚属成鱼序列已上传至 GenBank(登录号分别为 JX030385~JX030394、JX030382~JX030383 和 JX442546)。部分成鱼序列取自 GenBank, 即 Cyt *b*: CE01~10 (GU371509~18), CET01~02 (EU694405~06); D-loop: CE01~10 (GU371625, 27, 29, 31, 33, 34, 37, 39, 41, 43), CM01~04 (EF419828~31), CET01~08 (EF419804, 06, 08, 22, 23, 25~27), CG02~05 (EF419800~03)。部分序列引自孙超等(2013), 即 Cyt *b*: CM01~05 (JX030395~96), D-loop: CM05 (JX030384)。

Kimura 双参数模型估算刀鲚、湖鲚、七丝鲚、凤鲚成鱼、未知鲚属仔幼鱼、稚鱼及刀鲚、凤鲚鱼卵间 Cyt *b* 基因片段和 D-loop 序列的遗传距离见表 2。结果显示, 刀鲚和湖鲚间的遗传距离分别为 0.0036 ± 0.0008 和 0.0038 ± 0.0008 , 凤鲚与刀鲚、湖鲚的遗传距离分别为 0.1215 ± 0.0111 、 0.1228 ± 0.0111 (Cyt *b*)和 0.1075 ± 0.0108 、 0.1067 ± 0.0107 (D-loop), 七丝鲚与刀鲚、湖鲚的遗传距离分别为 0.0342 ± 0.0056 、 0.0351 ± 0.0057 (Cyt *b*)和 0.0527 ± 0.0069 、 0.0529 ± 0.0070 (D-loop), 七丝鲚和凤鲚间的遗传距离分别为 0.1158 ± 0.0111 (Cyt *b*)和 0.1123 ± 0.0111 (D-loop)。Kimura 双参数模型估算, 未知仔幼鱼、稚鱼、刀鲚和凤鲚鱼卵 4 类各类别内个体间的平均遗传距离分别为 0.0032 ± 0.0009 、 0.0029 ± 0.0010 、 0.0024 ± 0.0009 和 0.0029 ± 0.0008 (Cyt *b*); 0.0076 ± 0.0015 、 0.0062 ± 0.0015 、 0.0082 ± 0.0020 和 0.0025 ± 0.0007 (D-loop)。数据显示, 未知仔幼鱼与刀鲚、湖鲚间的遗传距离分别为 0.0037 ± 0.0008 、 0.0028 ± 0.0007 (Cyt *b*)和 0.0060 ± 0.0012 、 0.0060 ± 0.0011 (D-loop); 而未知仔幼鱼与七丝鲚与凤鲚间的遗传距离较大, 分别为 0.0349 ± 0.0057 、 0.1222 ± 0.0111 (Cyt *b*)和 0.0534 ± 0.0069 、 0.1089 ± 0.1078 (D-loop); 未知稚鱼与刀鲚、湖鲚间的遗传距离分别为 0.0037 ± 0.0008 、 0.0026 ± 0.0008 (Cyt *b*)和 0.0056 ± 0.0012 、 0.0054 ± 0.0012 (D-loop), 而未知稚鱼与七丝鲚、凤鲚间的遗传距离较大, 分别为 0.0344 ± 0.0056 、 0.1219 ± 0.0111 (Cyt *b*)和 0.0528 ± 0.0068 、 0.1085 ± 0.0107 (D-loop); 凤鲚鱼卵与凤鲚间的遗传距离最小为 0.0016 ± 0.0005 (Cyt *b*) 0.0037 ± 0.0009 (D-loop), 与刀鲚、湖鲚、七丝鲚的遗传距离分别为 0.1208 ± 0.0109 、 0.1215 ± 0.0110 、 0.1152 ± 0.0110 (Cyt *b*)和 0.1071 ± 0.0108 、 0.1063 ± 0.0107 、 0.1121 ± 0.0112 (D-loop); 刀鲚鱼卵与刀鲚、湖鲚的遗传距离都较小, 分别为 0.0033 ± 0.0008 、 0.0025 ± 0.0007 (Cyt *b*)和 0.0068 ± 0.0015 、 0.0070 ± 0.0015 (D-loop), 而与七丝鲚、湖鲚的遗传距离较大, 分别为 $0.0344 \pm$

0.0056、0.1220±0.0112 (Cyt b)和 0.0522±0.0067、0.1083±0.0107 (D-loop)。

用 Kimura 双参数模型构建的包括刀鲚、湖鲚、七丝鲚和凤鲚成鱼 Cyt b 基因片段序列和 D-loop 序列的 NJ 树明显分为三支：刀鲚和湖鲚不能形成彼此独立的分支，混合聚在一起形成一支；七丝鲚和凤鲚各自形成一单支(图略)。将未知鲚属仔幼鱼、稚鱼和刀鲚、凤鲚鱼卵一并加入分析后，未知鲚属仔幼鱼、稚鱼、刀鲚鱼卵、刀鲚成鱼和湖鲚成鱼混合聚在一起形成一支(支持率分别为 99%和 100%)，不能各自形成独立的分支；七丝鲚成鱼形成一单支(支持率分别为 98%和 100%)；凤鲚成鱼和凤鲚鱼卵混合在一起形成一支(支持率分别为 99%和 100%)，没有各自形成独立的分支(图 1)。

3 讨论

3.1 不同鲚属鱼类 Cyt b 和 D-loop 序列的比较

由于湖鲚在生活习性和形态上与洄游型刀鲚有一定的差异，袁传宓等(1976、1980)认为，湖鲚属于刀鲚的一个亚种。然而，由于刀鲚和湖鲚的可数和可量性状上存在较大重叠(唐文乔等，2007)，因此，湖鲚的亚种地位一直存在着争议，部分学者(Cheng *et al.*, 2004; 刘文斌等，1995; 唐文乔等，2007; 许志强等，2009; 周晓犊等，2010)通过形态学、生物化学和分子生物学方法对湖鲚亚种的有效性秉持否定的观点，认为湖鲚是刀鲚的一个不同生态型种群，而非一个亚种。本研究用线粒体 Cyt b 和 D-loop 序列构建的系统树显示刀鲚和湖鲚不具单系性，两种序列构成的系统

表 2 不同鲚属鱼类及其早期生活史个体的平均 Kimura 双参数遗传距离

Tab.2 Mean value of the Kimura's two-parameter distance among different *Coilia* species and corresponding eggs, larvae and juveniles

	刀鲚 <i>C. nasus</i>	湖鲚 <i>C. nasus taihuensis</i>	七丝鲚 <i>C. grayii</i>	凤鲚 <i>C. mystus</i>	未知仔幼鱼 Unknown larvae	未知稚鱼 Unknown juveniles	凤鲚鱼卵 Eggs of <i>C. mystus</i>	刀鲚鱼卵 Eggs of <i>C. nasus</i>
刀鲚 <i>C. nasus</i>	-	0.0038± 0.0008	0.0527± 0.0069	0.1075± 0.0108	0.0060± 0.0012	0.0056± 0.0012	0.1071± 0.0108	0.0068± 0.0015
湖鲚 <i>C. nasus taihuensis</i>	0.0036± 0.0008	-	0.0528± 0.0070	0.1067± 0.0107	0.0060± 0.0011	0.0054± 0.0012	0.1063± 0.0107	0.0070± 0.0015
七丝鲚 <i>C. grayii</i>	0.0342± 0.0056	0.0351± 0.0057	-	0.1123± 0.0111	0.0534± 0.0069	0.0528± 0.0068	0.1121± 0.0112	0.0522± 0.0067
凤鲚 <i>C. mystus</i>	0.1215± 0.0111	0.1221± 0.0111	0.1158± 0.0111	-	0.1089± 0.1078	0.1085± 0.0107	0.0037± 0.0009	0.1083± 0.0107
未知仔幼鱼 Unknown larvae	0.0037± 0.0008	0.0028± 0.0007	0.0349± 0.0057	0.1222± 0.0111	0.0032±0.0009 (Cyt b)/ 0.0076±0.0015 (D-loop)	-	-	-
未知稚鱼 Unknown juveniles	0.0037± 0.0008	0.0026± 0.0008	0.0344± 0.0056	0.1219± 0.0111	-	0.0029±0.0010 (Cyt b)/ 0.0062±0.0015 (D-loop)	-	-
凤鲚鱼卵 Eggs of <i>C. mystus</i>	0.1208± 0.0109	0.1215± 0.0110	0.1152± 0.0110	0.0016± 0.0005	-	-	0.0024±0.0009 (Cyt b)/ 0.0082±0.0020 (D-loop)	-
刀鲚鱼卵 Eggs of <i>C. nasus</i>	0.0033± 0.0008	0.0025± 0.0007	0.0344± 0.0056	0.1220± 0.0112	-	-	-	0.0029±0.0008 (Cyt b)/ 0.0025±0.0007 (D-loop)

注：对角线下方：基于 Cyt b 基因序列；上方：基于 D-loop 序列；对角线：类别内个体间的平均 Kimura 双参数遗传距离；-：表示数据未显示

Note: Lower diagonal: Based on Cyt b gene; Upper diagonal: Based on D-loop sequence; Diagonal: Mean value of the Kimura's two-parameter distance among individual within groups; -: Data not displayed

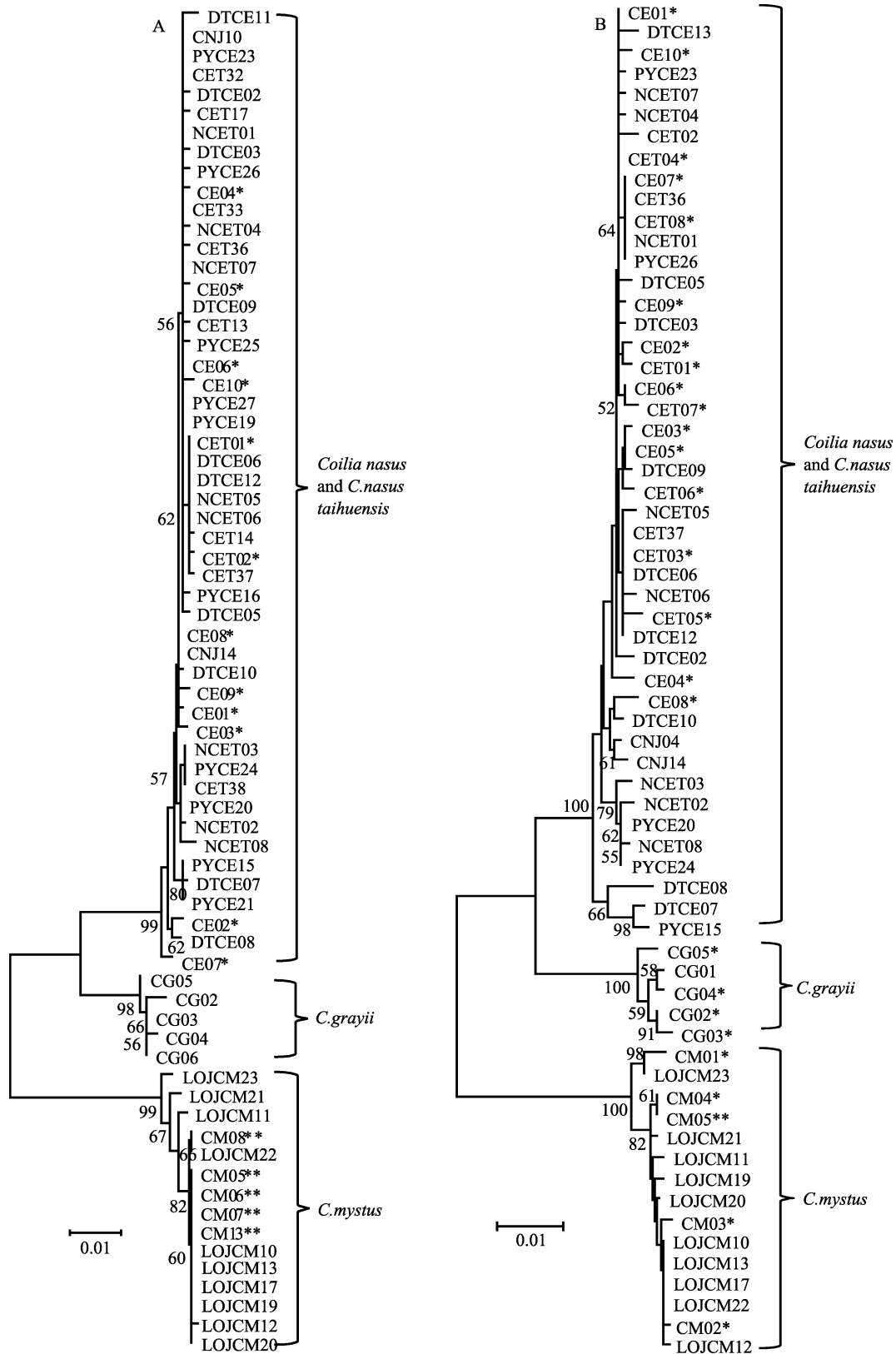


图 1 不同鲚属鱼类基于 Cyt b 基因(A)和 D-loop 序列(B)构建的 NJ 分子系统发生树

Fig.1 Neighbour-joining molecular dendrogram of different *Coilia* species based on the sequences of Cyt b gene (A) and D-loop (B)

*: 载自 GenBank; **: 孙超等(2013); 节点处数字为大于 50%的支持率的自展分支检验值

*: Loaded from GenBank; **: Sun *et al*(2013); Numbers at nodes represented bootstrap values, and only bootstrap values greater than 50% were shown

树中都有湖鲢构成小的分支后与刀鲢相聚或湖鲢直接与刀鲢构成一个分支的情况,这与许志强等(2009)的研究结果相同;刀鲢与湖鲢间的平均遗传距离分别为 0.0036 ± 0.0008 和 0.0038 ± 0.0008 , 介于二者各自内部个体间的遗传距离(Cyt *b*: $0.0023 \sim 0.004$; D-loop: $0.0034 \sim 0.0042$), 且明显小于湖鲢与凤鲢和七丝鲢间的平均遗传距离。因此,从线粒体 Cyt *b* 和 D-loop 序列分析看,湖鲢与刀鲢是同一物种的不同生态型,并未达到亚种水平。因此,应用线粒体 Cyt *b* 和 D-loop 序列虽然可以区分刀鲢、凤鲢以及七丝鲢的仔幼、稚鱼及鱼卵,但很难有效区分湖鲢和刀鲢的早期生活个体。

3.2 基于 Cyt *b* 和 D-loop 序列判别鲢属鱼类早期生活史个体的潜力

本研究中未知鲢属仔幼鱼、稚鱼和刀鲢、凤鲢鱼卵 4 类早期生活个体各类别内个体间基于线粒体 Cyt *b* 和 D-loop 序列的平均遗传距离最大分别为 0.0032 和 0.0082, 远小于相应序列得出的刀鲢(湖鲢)、凤鲢和七丝鲢等 3 种不同种的成鱼之间的遗传距离,表明该 4 类早期生活个体各自属于同一物种。用 Kimura 双参数模型分别计算 4 类早期生活个体与 3 种不同成鱼的遗传距离(表 2)并构建 NJ 系统树(图 1), 可以看出,未知鲢属仔幼鱼及稚鱼与刀鲢和湖鲢的遗传距离明显低于不同种之间的遗传距离,且系统树中与刀鲢、湖鲢、刀鲢鱼卵混在一起,因此,这些未知鲢属仔幼鱼及稚鱼可能是刀鲢或湖鲢,另外,由于刀鲢的另一种淡水定居生态型-短颌鲢与刀鲢、湖鲢也不能有效区分(许志强等, 2009; 周晓捷等, 2010), 所以也有可能是短颌鲢,但长江口和太湖区域一般没有短颌鲢分布(袁传宓等, 1980; 袁传宓等, 1984)。因此未知鲢属仔幼鱼及稚鱼应属于刀鲢或湖鲢。由于湖鲢一般分布于太湖,而在长江口出现的可能性不大(袁传宓等, 1980), 所以采自太湖的稚鱼应为湖鲢,采自长江口的未知鲢属仔鱼和幼鱼应判别为刀鲢,而稚鱼采自太湖,应均为湖鲢(李秀启等, 2015)。同时,刀鲢、凤鲢鱼卵在遗传距离和 NJ 树中也能准确定种。

凤鲢和刀鲢在长江口的繁殖时间有重叠(袁传宓等, 1980), 因此,有理由怀疑凤鲢和刀鲢的早期生活个体有一定的混杂,但目前关于长江口仔稚鱼分布的大量调查中(蒋玫等, 2006; 蒋日进等, 2008; 葛珂珂等, 2009), 尚未有在同一次调查中的同一站点发现刀鲢和凤鲢并存的报道。何文平等(2011)认为,长江口刀鲢和凤鲢在仔鱼阶段的空间生态位存在明显的分离,在本研究中未知鲢属幼鱼于 2 月采自长江口东滩样点,根据序列分析结果及生态分布分析表明该批幼

鱼都为刀鲢。该结果说明了长江口刀鲢和凤鲢在幼鱼阶段的空间生态位也存在明显的分离。与此同时,本研究采用 Cyt *b* 基因和 D-loop 序列对采自刀鲢和凤鲢体内的鱼卵成功进行了区分,由于 mtDNA 呈母系遗传,雌鱼体内鱼卵与未来的受精卵应该有着同一套 mtDNA,而七丝鲢一般分布于闽江、九龙江和珠江口区域(袁传宓等, 1980; 姜涛等, 2015), 不会在长江口与刀鲢、凤鲢产生混淆;因此,本研究的分子生物学方法应该具有判别野外采集到的鲢属鱼类受精卵的潜力。其将有利于今后进一步研究长江口刀鲢和凤鲢早期生活个体间的空间分布和环境因子的关系,闽江、九龙江和珠江口凤鲢和七丝鲢早期生活个体的空间分布特征,从对总体揭示鲢属鱼类的相互作用关系及资源(鱼卵和仔稚鱼)补充过程差异提供重要的理论支撑。

致谢: 本研究相关基因序列分析得到了中国水产科学研究院淡水渔业研究中心傅洪拓研究员、乔慧博士的支持;论文的撰写得到了南京农业大学无锡渔业学院 LY Sokta 女士、Khumbanyiwa Davison Daniel 先生的协助,谨此感谢。

参 考 文 献

- An LY, Meng Z, Qiu K, *et al.* Development of a method for the identification of tuna species in canned tuna by FINS. Food and Fermentation Industries, 2016, 42(6): 159–163 [安丽艳, 孟镇, 仇凯, 等. 应用 PCR-FINS 技术鉴定金枪鱼罐头中金枪鱼种类. 食品与发酵工业, 2016, 42(6): 159–163]
- Chan J, Li W, Hu X, *et al.* Genetic diversity and population structure analysis of Qinghai-Tibetan plateau schizothoracine fish (*Gymnocypris dobula*) based on mtDNA D-loop sequences. Biochemical Systematics and Ecology, 2016, 69: 152–160
- Chen W, Ma X, Shen Y, *et al.* The fish diversity in the upper reaches of the Salween River, Nujiang River, revealed by DNA barcoding. Scientific Reports, 2015, 5: 17437
- Cheng FP, Wang MX, Sun X, *et al.* DNA barcoding of Antarctic marine zooplankton for species identification and recognition. Advances in Polar Science, 2013, 24(2): 119–127
- Cheng QQ, Han JD. Morphological variations and discriminant analysis of two populations of *Coilia ectenes*. Journal of Lake Sciences, 2004, 16(4): 356–364 [程起群, 韩金娣. 鲢属两种群的形态变异及综合判别. 湖泊科学, 2004, 16(4): 356–364]
- Gao TX, Ji DP, Xiao YS, *et al.* Description and DNA barcoding of a new Sillago species, *Sillago sinica* (Perciformes: Sillaginidae), from coastal waters of China. Zoological Studies, 2011, 50(2): 254–263

- Ge KK, Zhong JS, Wu MQ, *et al.* Distribution and abundance of larval Japanese grenadier anchovy *Coilia nasus* in the surf zone of the Yangtze River estuary. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2009, 16(6): 923–930 [葛珂珂, 钟俊生, 吴美琴, 等. 长江口沿岸碎波带刀鲚仔稚鱼的数量分布. *中国水产科学*, 2009, 16(6): 923–930]
- Guo EM, Liu Y, Liu J, *et al.* DNA barcoding discriminates *Pampus minor* from *Pampus* species. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2010, 28(6): 1266–1274
- He WP, Cheng F, Li YX, *et al.* Molecular identification of *Coilia ectenes* and *Coilia mystus* and its application on larval species. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2011, 35(4): 565–571 [何文平, 程飞, 黎雨轩, 等. 刀鲚和凤鲚的分子鉴定及其在仔鱼种类鉴定中的应用. *水生生物学报*, 2011, 35(4): 565–571]
- Hofmann T, Kneibelsberger T, Kloppmann M, *et al.* Egg identification of three economical important fish species using DNA barcoding in comparison to a morphological determination. *Journal of Applied Ichthyology*, 2017, 33(5): 925–932
- Hu YT, Hu W, Ling J, *et al.* Comparative and phylogenetic analysis of mitochondrial Cytochrome *b* gene and control region from natural triploid (*Carassius auratus gibelio*) in Chuzhou. *South China Fisheries Science*, 2015, 11(2): 101–108 [胡玉婷, 胡王, 凌俊, 等. 滁州鲫线粒体细胞色素 *b* 基因和控制区序列比较及其系统进化分析. *南方水产科学*, 2015, 11(2): 101–108]
- Jiang M, Shen XQ, Chen LF, *et al.* Relationship between with abundance distribution of fish eggs, larvae and environmental factors in the Changjiang estuary and vicinity waters in spring. *Marine Environmental Science*, 2006, 26(2): 37–44 [蒋玫, 沈新强, 陈莲芳. 长江口及邻近水域春季鱼卵仔鱼分布与环境因子的关系. *海洋环境科学*, 2006, 26(2): 37–44]
- Jiang RJ, Zhong JS, Zhang DL, *et al.* Species composition and diversity of fish larvae and juveniles in the surf zone of the Yangtze River estuary. *Zoological Research*, 2008, 29(3): 297–304 [蒋日进, 钟俊生, 张冬良, 等. 长江口沿岸碎波带仔稚鱼的种类组成及其多样性特征. *动物学研究*, 2008, 29(3): 297–304]
- Jiang T, Liu HB, Huang HH, *et al.* Otolith microchemistry of *Coilia grayii* from the pearl river estuary, China. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2015, 39(4): 816–821 [姜涛, 刘洪波, 黄洪辉, 等. 珠江口七丝鲚耳石微化学初报. *水生生物学报*, 2015, 39(4): 816–821]
- Li XQ, Liu F, Leng CM, *et al.* Genetic structure and diffusion of population of *Coilia ectenes taihuensis* in Lake Nansi inferred from the mitochondrial control region. *Journal of Lake Sciences*, 2015, 27(4): 686–692 [李秀启, 刘峰, 冷春梅, 等. 基于线粒体 DNA 控制区的南四湖湖鲚 (*Coilia ectenes taihuensis*) 群体遗传结构和种群扩散. *湖泊科学*, 2015, 27(4): 686–692]
- Li Y, Song N, Khan FS, *et al.* New evidence of morphological characters and DNA barcoding of *Pampus argenteus* (Euphrasen, 1788). *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(11): 1601–1608 [李渊, 宋娜, Khan FS, 等. 银鲳形态特征与 DNA 条形码研究. *水产学报*, 2013, 37(11): 1601–1608]
- Li YX, Xie SG, Li ZJ, *et al.* Gonad development of an anadromous fish *Coilia ectenes* (Engraulidae) in lower reach of Yangtze River, China. *Fisheries Science*, 2007, 73(6): 1224–1230
- Liu WB. Biochemical and morphological comparison and interspecific relationships of four species of the genus *Coilia* in China. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1995, 26(5): 558–565 [刘文斌. 中国鲚属 4 种鱼的生化和形态比较及其系统发育的研究. *海洋与湖沼*, 1995, 26(5): 558–565]
- Liu ZJ, Cordes JF. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. *Aquaculture*, 2004, 238(1–4): 1–37
- Mansourkiaei A, Mostafavi PG, Fatemi SMR, *et al.* Phylogenetic relationships of *Scomberomorus commerson* using sequence analysis of the mtDNA D-loop region in the Persian Gulf, Oman Sea and Arabian Sea. *International Aquatic Research*, 2016, 8(2): 137–148
- Mork J, Solemdal P, Sundnes G. Identification of marine fish eggs: A biochemical genetics approach. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2011, 40(3): 361–369
- Pegg GG, Sinclair B, Briskey L, *et al.* mtDNA barcode identification of fish larvae in the southern Great Barrier Reef, Australia. *Scientia Marina*, 2006, 70(70): 7–12
- Perez J, Álvarez P, Martínez JL, *et al.* Genetic identification of hake and megrim eggs in formaldehyde-fixed plankton samples. *ICES Journal of Marine Science*, 2005, 62(5): 908–914
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual* (2nd edn). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- Shen YJ, Kang JL, Chen WT, *et al.* 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*, 2016, 61: 79–91
- Sun C, Liu HB, Jiang T, *et al.* The comparison of ITS1 and Cyt *b* gene sequences in tapertail anchovy *Coilia mystus*. *Fisheries Science*, 2013, 32(9): 536–540 [孙超, 刘洪波, 姜涛, 等. 凤鲚 ITS1 与 Cyt *b* 基因序列的比较研究. *水产科学*, 2013, 32(9): 536–540]
- Sun C, Su YP, Liu HB, *et al.* The Identification of closely related species and origin of aquatic organisms by molecular approaches. *Chinese Journal of Fisheries*, 2011, 24(3): 53–59 [孙超, 苏彦平, 刘洪波, 等. 水生生物近缘种和产地的分子生物学判别. *水产学杂志*, 2011, 24(3): 53–59]
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731–2739

- Tang WQ, Hu XL, Yang JQ, *et al.* Species validities of *Coilia brachygnathus* and *C. nasus taihuensis* based on sequence variations of complete mtDNA control region. *Biodiversity Science*, 2007, 15(3): 224–231 [唐文乔, 胡雪莲, 杨金权. 从线粒体控制区全序列变异看短颌鲚和湖鲚的物种有效性. *生物多样性*, 2007, 15(3): 224–231]
- Webb KE, Barnes DKA, Clark MS, *et al.* DNA barcoding: A molecular tool to identify Antarctic marine larvae. *Deep Sea Research II*, 2006, 53(8–10): 1053–1060
- Xiao WH, Zhang YP, Liu HZ. Molecular systematics of Xenocyprinae (Teleostei: Cyprinidae): Taxonomy, biogeography, and coevolution of a special group restricted in East Asia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2001, 18(2): 163–173
- Xiao WH, Zhang YP. Genetics and evolution of mitochondrial DNA in fish. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, 24(4): 384–391 [肖武汉, 张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化. *水生生物学报*, 2000, 24(4): 384–391]
- Xu ZQ, Ge JC, Huang C, *et al.* Taxonomy of short jaw tapertail anchovy *Coilia brachygnathus* by jaw Length and mitochondrial Cytochrome *b* gene analysis. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2009, 24(3): 242–246 [许志强, 葛家春, 黄成, 等. 基于颌骨长度和线粒体 Cyt *b* 序列变异探讨短颌鲚的分类地位. *大连海洋大学学报*, 2009, 24(3): 242–246]
- Yan XL, Tang WQ, Yang JQ, *et al.* Population genetic structure of tapertail anchovy (*Coilia mystus*) in coastal waters of southeast China based on mtDNA control region sequences. *Biodiversity Science*, 2009, 17(2): 143–150 [阎雪岚, 唐文乔, 杨金权. 基于线粒体控制区的序列变异分析中国东南部沿海凤鲚种群遗传结构. *生物多样性*, 2009, 17(2): 143–150]
- Yuan CB, Lin JB, Liu RH, *et al.* On the age and growth of the Chinese anchovy, *Coilia ectenes*, from the Yangtze River. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1978, 6(3): 285–296 [袁传宓, 林金榜, 刘仁华, 等. 刀鲚的年龄和生长. *水生生物学集刊*, 1978, 6(3): 285–296]
- Yuan CB, Lin JB, Qin AL, *et al.* The history and current situation of the classification of Chinese genus *Coilia*-some experience on the transformation of the old taxonomy of fishes. *Journal of Nanjing University (Natural Sciences)*, 1976(2): 1–12 [袁传宓, 林金榜, 秦安龄, 等. 关于我国鲚属鱼类分类的历史和现状-兼谈改造旧鱼类分类学的几点体会. *南京大学学报(自然科学版)*, 1976(2): 1–12]
- Yuan CB, Qin AL, Liu RH, *et al.* On the classification of the anchovies, *Coilia*, from the lower Yangtze River and the southeast coast of China. *Journal of Nanjing University (Natural Sciences)*, 1980(3): 67–82 [袁传宓, 秦安龄, 刘仁华, 等. 关于长江中下游及东南沿海各省的鲚属鱼类种下分类的探讨. *南京大学学报(自然科学版)*, 1980(3): 67–82]
- Yuan CB, Qin AL. Ecological habits and distribution of *Coilia* along the Chinese coast and its changes of output. *Marine Sciences*, 1984(5): 35–37 [袁传宓, 秦安龄. 我国近海鲚鱼生态习性及其产量变动状况. *海洋科学*, 1984(5): 35–37]
- Zemlak TS, Ward RD, Connell AD, *et al.* DNA barcoding reveals overlooked marine fishes. *Molecular Ecology Resources*, 2009, 9(S1): 237–242
- Zhang DL, Li L, Zhong JS, *et al.* Morphological study on larvae and juveniles of *Coilia nasus* in the surf zone of Yangtze River estuary. *Journal of Shanghai Ocean University*, 2009, 18(2): 150–154 [张冬良, 李黎, 钟俊生, 等. 长江口碎波带刀鲚仔稚鱼的形态学研究. *上海海洋大学学报*, 2009, 18(2): 150–154]
- Zhang J, Li Y, Song N, *et al.* Species identification and phylogenetic relationship of *Thryssa* species in the coastal waters of China. *Biodiversity Science*, 2016, 24(8): 888–895 [张静, 李渊, 宋娜, 等. 我国沿海梭鲟属鱼类的物种鉴定与系统发育. *生物多样性*, 2016, 24(8): 888–895]
- Zhou MY, Chen X, Yang SY, *et al.* Identification of several fish eggs and larvae by DNA barcoding in Xiamen Water. *Marine Environmental Science*, 2015, 34: 120–125 [周美玉, 陈骁, 杨圣云, 等. 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*, 2015, 34: 120–125]
- Zhou XD, Yang JQ, Tang WQ, *et al.* Species validities analyses of Chinese *Coilia* fishes based on mtDNA COI barcoding. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 2010, 35(4): 819–826 [周晓犊, 杨金权, 唐文乔, 等. 基于线粒体 COI 基因 DNA 条形码的中国鲚属物种有效性分析. *动物分类学报*, 2010, 35(4): 819–826]

(编辑 冯小花)

Comparison of D-loop and Cytochrome *b* Sequences Among Different *Coilia* Species and Their Potential Use in Analysis for the Identification of Species at Early Life Stages

SUN Chao¹, LIU Hongbo², JIANG Tao², XUAN Zhongya¹, YANG Jian^{1,2①}

(1. Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081; 2. Key Laboratory of Fishery Ecological Environment Assessment and Resource Conservation in Middle and Lower Reaches of the Yangtze River, Chinese Academy of Fishery Sciences; Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081)

Abstract Based on 1022 bp and 1322 bp sequences, partial nucleotide sequences of Cyt *b* and D-loop segments of mtDNA were analyzed for *Coilia nasus*, *C. nasus taihuensis*, *C. grayii*, and *C. mystus* to develop a reference dataset for species identification in the genus *Coilia*. The genetic distances were 0.00360±0.00083 and 0.00378±0.00082 between *C. nasus* and *C. nasus taihuensis*, 0.12146±0.01106 and 0.10753±0.01076 between *C. mystus* and *C. nasus*, 0.12207±0.01111 and 0.10674±0.01074 between *C. mystus* and *C. nasus taihuensis*, 0.03418±0.00561 and 0.05267±0.00686 between *C. nasus* and *C. grayii*, 0.03506±0.00568 and 0.05287±0.00698 between *C. nasus taihuensis* and *C. grayii*, as well as 0.11585±0.01109 and 0.11233±0.01114 between *C. grayii* and *C. mystus*, respectively. Based on the sequences of the Cyt *b* gene and D-loop and the neighbor-joining (NJ) molecular dendrogram using Kimura 2-parameters, individuals of *C. nasus* and *C. nasus taihuensis* were combined in a cluster while *C. mystus* and *C. grayii* formed another two clusters. First, based on sampling sites, the identities of the unknown larvae from the estuary of the Yangtze River and unknown juveniles from the Taihu Lake could be deduced preliminarily as *C. nasus* and *C. nasus taihuensis*, respectively. Then, nucleotide sequences of Cyt *b* and D-loop of larvae and eggs of genus *Coilia* were analyzed and compared with the reference established above. Genetic distance ranged from 0.0024 to 0.0032 and 0.0025 to 0.0082, respectively, within the larva and egg individuals collected from different places. The NJ molecular dendrogram showed that all the unknown larvae, the eggs of *C. nasus*, adult *C. nasus*, and *C. nasus taihuensis* clustered together. In contrast, individual eggs of *C. mystus* and adult *C. mystus* formed a separate cluster. Thus, Cyt *b* and D-loop sequence analysis could be used to identify unknown *Coilia nasus*, *C. grayii*, and *C. mystus* at early life stages, but could not effectively be used to identify unknown individuals at early life stages between *C. nasus* and *C. nasus taihuensis*.

Key words Genus *Coilia*; Early life stage; Cyt *b* gene sequence; D-loop sequence

① Corresponding author: YANG Jian, E-mail: jiany@ffrc.cn