

文章编号: 1674-5566(2013)04-0524-07

鳗鲡属6种鱼类线粒体CO I和CO II基因序列分析和分类的有效性

龚小玲, 岳丽佳, 崔忠凯, 张晓懿

(上海海洋大学 省部共建水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室, 上海 201306)

摘要: 对鳗鲡属 (*Anguilla*) 的美洲鳗鲡 (*A. rostrata*)、欧洲鳗鲡 (*A. anguilla*)、太平洋双色鳗鲡 (*A. bicolor pacifica*)、花鳗鲡 (*A. marmorata*)、澳洲鳗鲡 (*A. australis*)、日本鳗鲡 (*A. japonica*) 6 种鱼类 54 个体 CO I 和 CO II 基因片段中 1 179 bp 和 633 bp 的序列特征、分子分类的有效性、以及构建的系统关系进行了比较分析, 结果表明: (1) CO I 和 CO II 基因可变位点、简约信息的百分比分别为 17.98%、16.45% 和 12.16%、10.11%, CO I 较 CO II 基因的变异率高; (2) 两种基因序列均表现出明显的反 G 偏倚 (在 CO I 和 CO II 中 G 的百分含量分别为 18.45%、16.67%); (3) 基于 CO I 基因种间遗传距离均高于 CO II 基因, 且均大于 2% (欧洲鳗鲡和美洲鳗鲡基于 CO II 基因序列的种间遗传距离为 1.8% 除外), 种内遗传距离都小于 1%; (4) 以两序列构建的系统树, 各物种所有个体均形成独立、高支持率单系, 但两序列构建的系统关系并不完全一致。由此说明, CO I 和 CO II 都能对鳗鲡属鱼类进行有效的物种分子鉴定, 但在探讨鳗鲡属鱼类系统进化关系上还需要联合其它基因。

研究亮点: 对鳗鲡属 6 种鱼类线粒体 CO I 和 CO II 基因序列组成特点、分类有效性进行了比较分析, 结果表明 CO II 与 CO I 两者基因序列存在一定的差异性, 前者较后者位点变异率低, 但 CO II 基因对鳗鲡属 (*Anguilla*) 6 种鱼类的分子分类也是有效的, 这为分子分类提供了新的参考。

关键词: 鳗鲡属; CO I 基因序列; CO II 基因序列; 物种鉴定; 系统关系

中图分类号: S 917

文献标志码: A

传统分类多以形态性状为分类依据, 但形态性状受环境因子影响较大, 从而导致分类困难甚至错误。FUNK 等^[1]认为, 物种鉴定最理想的是将形态、行为、分子标记等多种数据结合在一起。

CO I 和 CO II 分别是线粒体细胞色素氧化酶亚基 I 和亚基 II 基因, 在物种鉴定和系统演化关系等方面得到了广泛应用^[2-4]。通过验证, HEBERT 等^[5]认为 mtDNA-CO I 基因序列是分子分类的标准基因, 被定义为“DNA 条形码”。而 CO II 基因也能很好解决昆虫属、种及种以下分类阶元间的系统发育关系^[6-7], 在鱼类中相关报道也比较多^[8-9]。

鳗鲡属 (*Anguilla*) 鱼类外部形态十分相似, 形态分类存在较大分歧。松井魁^[10]与 EGE^[11]把世界鳗鲡属鱼类分为 18 个种或亚种, 《中国动物志·硬骨鱼纲·鳗鲡目背棘鱼目》^[12]中记载鳗鲡

属鱼类有 15~18 种。在 Genbank 数据库中检索到 19 种或亚种的线粒体序列, 包括松井魁^[10]提到的所有种类及另一亚种印度鳗鲡 (*A. nebulosa nebulosa*)。在 Fishbase 数据库中, 可以检索到鳗鲡属鱼类 21 个有效物种。2009 年, WATANABE 等^[13]在菲律宾又发现了一新种“吕宋岛鳗鲡” (*A. luzonensis*)。在中国, 鳗鲡属鱼类有日本鳗鲡 (*A. japonica*)、双色鳗鲡 (*A. bicolor*)、花鳗鲡 (*A. marmorata*) 和云纹鳗鲡 (*A. nebulosa*) 4 种或更多^[12]。我国学者伍汉霖等^[14]将双色鳗鲡分双色鳗鲡 (*A. bicolor bicolor*) 和太平洋双色鳗鲡 (*A. bicolor pacifica*) 2 个亚种, 而张春光等^[12]未明确指出中国产的双色鳗鲡是哪一个亚种。

本研究利用线粒体 DNA 的 CO I 和 CO II 基因, 对我国鳗鲡属养殖种类美洲鳗鲡、欧洲鳗鲡、太平洋双色鳗鲡 (*A. bicolor pacifica*)、花鳗鲡、澳

收稿日期: 2013-03-11 修回日期: 2013-04-16

基金项目: 国家自然科学基金(31201995); 上海市科技攻关项目(10dz1200804); 上海市重点学科项目(S30701)

作者简介: 龚小玲(1972—), 女, 博士, 副教授, 研究方向为生物多样性和鱼类系统进化。E-mail: xlgong@shou.edu.cn

洲鳗鲡、日本鳗鲡等 6 种鱼类的这两个基因序列特征进行分析,并对它们分子分类的有效性进行比较和探讨,为鳗鲡属物种的准确分类及鳗鲡属鱼类资源的科学利用提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

采自江西瑞金的美洲鳗鲡和欧洲鳗鲡是 2005 年分别从美国和法国引进,采自广东某养殖场太平洋双色鳗鲡和花鳗鲡是 2003 年分别自菲律宾和越南引进,以上 4 种鳗鲡均为幼鳗,其余样本均为来自各产地的玻璃鳗。鲜活样本以 95% 酒精固定后用于基因组 DNA 的提取,样本量和采样信息见表 1。

1.2 基因组 DNA 提取、PCR 扩增与测序

基因组提取采用常用“酚-氯仿”法^[15],CO I 和 CO II 基因扩增引物分别为 L6468-CO I

(GCTCAGCCATTTTACCTGTG)、H7696-CO I (AGGCCTAGGAAGTGTGAGGGAAG)和 CO II -R (GGCACATCCCTCACAGCTAGG)、CO II -F (TGTGGCATGTCTACTAAGGGTGG)。PCR 反应总体积为 50 μ L,包括上、下游引物各 1.5 μ L (5 μ mol/L)、DNA 模板 150 ~ 200 ng、2 \times PCR Mix 25 μ L (0.1U *Taq* 酶、500 μ mol/L dNTP each、20 mmol/L pH 8.3 Tris-HCl、100 mmol/L KCl、3 mmol/L MgCl₂)、H₂O。扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 5 min、94 $^{\circ}$ C 30 s、55.5 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 1.5 min,40 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延长 10 min,扩增产物经 1.2% 的琼脂糖电泳检测,对于扩增无杂带,目的条带明亮的 PCR 产物送交上海生工生物有限公司测序。CO I 基因采用双向测序、测序引物为 L6468-CO I、H7696-CO I,CO II 基因则采用单向测序,测序引物为 CO II -R。

表 1 样本采集信息

Tab.1 Sampling time and locations of studied eels

种类	采样地	采样时间	原产地	引进时间	样品编号	数量
mzm	江西瑞金	2006-03	美国	2005-03	mzm11 ~ mzm15	5
	上海浦东	2006-03	法国		mzm21 ~ mzm24	4
ozm	江西瑞金	2006-03	法国	2005-03	ozm11 ~ ozm15	5
	上海浦东	2006-03	法国		ozm21 ~ ozm24	4
flb	广东珠海	2006-04	澳大利亚	2003-05	flb11 ~ flb13	3
hml	广东	2006-03	越南	2004-05	hml11 ~ hml18	8
	海南	2007-06	中国		hml21 ~ hml24	4
azm	广东	2006-04	澳大利亚	2004-05	azm11 ~ azm13	3
	澳大利亚	2005-12	澳大利亚		azm21 ~ azm24	4
rbm	上海	2005-04	中国		rbm11 ~ rbm15	5
	日本	2005-02	中国		rbm21 ~ rbm23	3
合计						48

注:mzm 为美洲鳗鲡;ozm 为欧洲鳗鲡;flb 为太平洋双色鳗鲡;hml 为花鳗鲡;azm 为澳洲鳗鲡;rbm 为日本鳗鲡,下同。

1.3 数据 分析

选取测序信号稳定、无杂峰区域进行分析。同时从 NCBI 数据库获得 6 种鳗鲡 CO I 和 CO II 序列,分别是:欧洲鳗鲡(NC_006531)、美洲鳗鲡(NC_006547)、太平洋双色鳗鲡(NC_006535)、澳洲鳗鲡(NC_006532)、日本鳗鲡(NC_002707)、花鳗鲡(NC_006540),并分别编号为 ozm、mzm、flb、azm、rbm、hml,分析总样本为 54 个个体。

所有序列经 Bioedit^[16] 比对,再用软件 Mega 4.0^[17] 将核苷酸序列转换成氨基酸序列进行比对,比对齐整后转回核苷酸序列;用 Mega 软件计

算碱基组成、碱基变异频率、简约信息位点等,用 Kimura's 2 - Parameter 模型计算种内、种间遗传距离。以 Mega 4.0 软件中基于 K2P 模型构建 NJ 树,系统发生树采用 1 000 次内部分支检验来评估各自分支置信度;根据 Modeltest 3.6^[18] 软件估算出数据最优模型为 GTR + I + G。以 Mrbayes 3.1.2 软件^[19] 构建贝叶斯树,设置替换模型 nst = 6 (GTR 模型),位点速率变异模型设置为 rates = gamma,其余参数为 partition region = 3, number of generations (代数) = 1 000 000, number of chains = 4, sample of frequency = 100, starting tree

= random, burn-in = 100, 重复一次, 在舍弃老化样本后, 根据剩余样本构建一致树, 并计算相关参数, 系统树各分支的置信度评估以后验概率表示。

2 结果

2.1 CO I 和 CO II 基因序列特征

通过 PCR 扩增、测序、序列比对, 分别选取 CO I 和 CO II 基因序列中没有任何碱基插入、缺失的 1 179 bp 和 633 bp (分别编码 393 和 211 个氨基酸) 的序列片段进行分析。其中 CO I 基因有 212 个变异位点、194 个简约信息位点、967 个不变位点, 分别占分析序列碱基的 17.98%、16.45%、82.02%。CO II 基因有 77 个变异位点、

64 个简约信息位点、556 个不变位点, 分别占分析序列碱基的 12.16%、10.11%、87.84%。可变异位点、简约信息位点的百分比 CO I 均要高于 CO II 基因。

鳗鲡属 6 种鱼类 CO I 和 CO II 基因平均 GC 含量特征相似 (43.1%、41.5%) 低于 AT 的平均百分含量 (57.9%、58.5%), 表现出线粒体蛋白编码基因的明显偏倚性。密码子各位点的平均 GC 含量均是第一位最高、第三位最低, 但 CO I 基因第一密码子位点的平均 GC 含量低于 CO II 基因的, 而第二位和第三位大多高于 CO II 基因的。花鳗鲡密码子第 3 位 GC 含量在鳗鲡属 6 种鱼类的 2 种基因中均是最低的 (表 2)。

表 2 鳗鲡属 6 种鱼类 CO I 和 CO II 基因序列片段平均 GC 含量

Tab. 2 The GC average content of CO I 和 CO II gene sequences for six eels of genus *Anguilla*

种类	CO I				CO II			
	全部位点	1 st 位点	2 nd 位点	3 rd 位点	全部位点	1 st 位点	2 nd 位点	3 rd 位点
mzm	43.7	54.2	41.1	35.8	41.8	58.8	33.7	33.1
ozm	43.5	53.5	41.1	35.9	41.6	58.7	33.7	32.6
flb	43.1	54.2	41.3	33.8	41.7	57.8	33.7	33.6
hml	42.1	53.4	41.3	31.0	40.9	57.3	33.7	31.7
azm	42.8	54.2	41.1	33.2	41.9	58.3	33.7	33.8
rbm	42.9	53.7	41.4	34.8	41.4	57.8	33.7	32.6
平均值	43.1	53.8	41.3	33.9	41.5	58.1	33.7	32.7

所有个体 CO I 和 CO II 基因序列变异位点见表 3。不变位点百分比在 CO I 和 CO II 基因序列中均为 90% 以上, CO II 基因中更是高达 96.37%, 密码子第 3 位的不变位点百分比最低, 而

第 1、2 位非常近似; 转换和颠换多出现在密码子的第 3 位, CO I 和 CO II 基因序列中均是近 90% 转换来自第 3 位密码子, 在 CO I 中, 颠换 100% 来自第 3 位密码子, 而在 CO II 中, 仅为 80%。

表 3 鳗鲡属 6 种鱼类 CO I 和 CO II 基因序列片段各密码子位点碱基的变异情况

Tab. 3 The sequence variation of the CO I and CO II genes for six eels of genus *Anguilla*

位点	CO I			CO II		
	不变位点	转换位点 (si)	颠换位点 (sv)	不变位点	转换位点 (si)	颠换位点 (sv)
1st	388/35.05	5/8.47	0/0	208/34.10	2/11.11	1/20
2nd	392/35.41	1/1.69	0/0	211/34.59	0/0	0/0
3rd	327/29.54	53/89.83	12/100	191/31.31	16/88.89	4/80
全部	1107/93.89	59/5.00	12/1.02	610/96.37	18/2.84	5/0.79

注: 表格中, “/” 的前者为数值, 后者为百分比。

2.2 遗传距离

种间和种内遗传距离大小是物种判定的主要标准。基于 CO I 和 CO II 基因序列的鳗鲡属鱼类种间遗传距离分别在 3.3% ~ 9.3% 和 1.8% ~ 5.6% 之间, 前者均大于后者, 除欧洲鳗鲡和美洲鳗鲡基于 CO II 基因序列种间遗传距离为 1.8%

外, 其余种间遗传距离均显著高于 HEBERT 等^[5] 设定的 2% 的遗传差异。基于 CO I 和 CO II 基因序列最大种间遗传距离分别发生在日本鳗鲡与美洲鳗鲡和欧洲鳗鲡 (均为 9.3%) 以及澳洲鳗鲡和太平洋双色鳗鲡之间 (5.6%)。基于 CO I 基因序列种内平均遗传距离普遍高于 CO II 基因序

列,但都不超过 1%。

表 4 鳗鲡属 6 种鱼类基于 CO I /CO II 基因序列的种间、种内遗传距离
Tab.4 Genetic distance and pairwise distance between species in six species
of *Anguilla* based on CO I and CO II genes

	种间遗传距离(CO I /CO II)					种内遗传距离(CO I /CO II)	
	mzm	ozm	flb	hml	azm	rbm	
mzm							0.003/0.001
ozm	0.033/0.018					0.006/0.005	
flb	0.086/0.051	0.087/0.048				0.007/0.004	
hml	0.086/0.054	0.091/0.050	0.055/0.041			0.002/0.003	
azm	0.077/0.041	0.079/0.035	0.089/0.056	0.075/0.054	0.001/0.001		
rbm	0.093/0.045	0.093/0.041	0.078/0.046	0.063/0.037	0.088/0.053		0.002/0.002

2.3 分子聚类及支持率

分别对 CO I、CO II 以及 CO I + CO II 序列进行比对,构建鳗鲡属 6 种鱼类分子系统树,除节点支持率(图中仅显示高于 87%)有差异外,基于 CO I 和 CO I + CO II 基因序列构建的系统树拓扑结构一致。在 NJ 树(图 1、图 2、图 3)上,各种类的个体均形成一个单系,基于 CO I 和 CO I + CO II 基因序列各单系节点支持率均为 100%,而欧洲鳗鲡和美洲鳗鲡基于 CO II 基因序列各单系支持率分别为 87% 和 99%,其余为 100%。NJ 树上,欧洲鳗鲡和美洲鳗鲡、太平洋双色鳗鲡和花鳗鲡互为姐妹群。CO I 和 CO I + CO II 基因序列构建的 NJ 树中,6 种鳗鲡形成 3 大支,澳洲鳗鲡单独成支,且位于系统树的基部;在 CO II 序列 NJ 树上却只有 2 支系,欧洲鳗鲡、美洲鳗鲡、澳洲鳗鲡形成 1 支系,太平洋双色鳗鲡、花鳗鲡、日本鳗鲡形成另 1 支系。

基于 CO I 和 CO II 及 CO I + CO II 基因序列、以 Bayesian 法构建的 mrbays 树与它们的 NJ 树除节点支持率有差异外,其余完全一致。

3 讨论

3.1 鳗鲡属鱼类 CO I 和 CO II 基因序列特征

CO I 和 CO II 是细胞色素 C 的 I 和 II 型基因,被 2 个 tRNA 所间隔。对鳗鲡属 6 种鱼类 CO I 和 CO II 基因序列比较分析发现,两种序列存在较多相似性,如(1)G 的百分含量最低,表现出明显的反 G 偏倚;(2)GC 百分含量明显低于 AT 百分含量;(3)可变位点的转换和颠换多来自密码子的第 3 位等。但 CO I、CO II 基因也存在明显的差异:(1)CO I 基因可变位点、简约信息位

点的百分比(17.98%、16.45%)均要高于 CO II 基因的(12.16%、10.11%);(2)在 CO I 基因序列中碱基 T 的百分含量最高(29.73%),而在 CO II 中,则是 A 最高(32.77%);(3)CO I 基因序列编码蛋白密码子第 2、第 3 位 GC 百分含量一般均高于 CO II 基因;(4)CO I 基因序列的颠换 100% 来自编码蛋白密码子的第 3 位,而 CO II 基

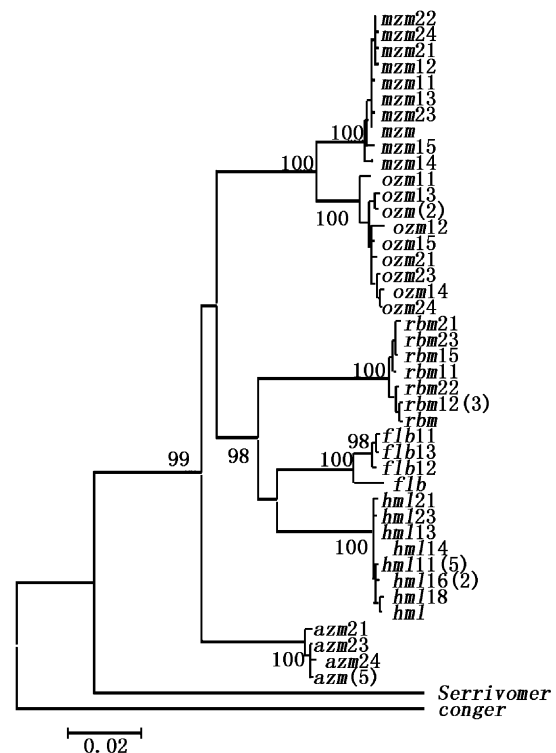


图 1 基于 CO I 基因序列构建鳗鲡属 6 种鱼类 50% 多数一致性 NJ 树

Fig.1 5 Neighbor-Joining trees based on partial sequence of CO I gene

节点上数字为 bootstrap 1 000 次自举检验值(图 2、图 3 同此)。

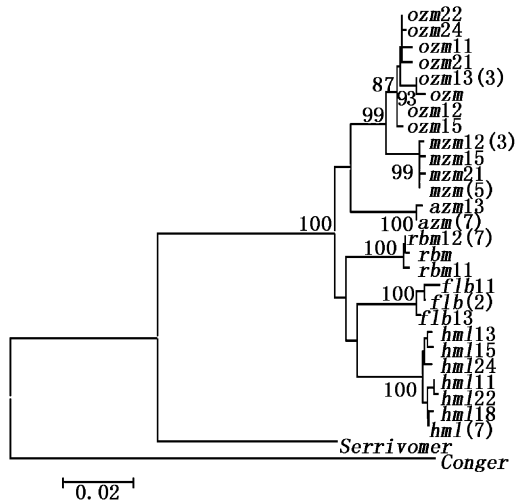


图2 基于 CO II 基因序列构建鳊属 6 种鱼类 50% 多数一致性 NJ 树
Fig.2 5 Neighbor Joining trees based on partial sequence of CO II gene

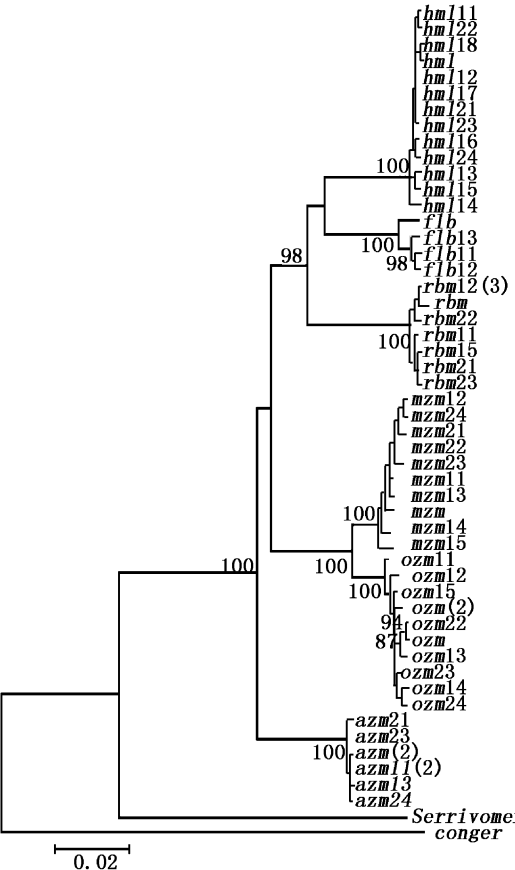


图3 基于 CO I - CO II 基因序列构建鳊属 6 种鱼类的 50% 多数一致性 NJ 树
Fig.3 Neighbor Joining trees based on partial sequence of CO I gene combined with CO II sequence data

因序列的颠换有 20% 是来自密码子的第 1 位。可变位点、简约信息位点百分含量在不同基因、不同类别间存在差异,差异大小与物种亲缘关系远近及分析样本数量密切相关 [8-9,20],在本研究中,CO I 较 CO II 基因的变异率更高些,与吴宁等 [21] 和田鑫江等 [22] 的研究结果一致。

3.2 CO I、CO II 基因对鳊属 6 种鱼类的分类

DNA 条形码技术,应用非常广泛,且在动物界 CO I 基因被认为是 DNA 条形码标准基因 [5],但线粒体中有些序列在物种鉴定中也能发挥作用。VENCES 等 [23] 发现两栖、爬行类中 16S rRNA 基因具有较强的引物适应性,并且序列相对保守,具有 DNA 条形码的特性;何文平等 [24] 利用 Cytb 对刀鲚和凤鲚的仔鱼进行了成功鉴定。SCHMITZ 和 MORITZ 提出,使用 28S rDNA 序列对蜂类进行系统发育分析是可行的,李捷等 [4] 利用 28S rDNA 对姬小蜂科几百个物种进行成功分类。HERAS 等 [3] 运用形态学和 12S rRNA、Cyt b、CO I 基因序列分析相结合的方法对阿根廷 MarChiquita 湖一种未定种鲮鱼进行了分析,研究证实这种鲮鱼为库里玛鲮 (*Mugil curema*) 的白化种。

基于 CO I 基因对鳊属 6 种鱼类构建的 NJ、Mrbays 树中,各种类所有个体均形成支持率(置信度)为 100% 的单系,同时种间、种内遗传距离与 HEBERT 等 [5] 提出利用 CO I 序列有效地进行物种鉴别的关键是种间遗传距离必须大于种内的遗传距离,并且距离差异大约为 10 倍,种间遗传距离大于 2% 的研究结论是一致的。利用 CO II 基因对鳊属 6 种鱼类构建的 NJ 树中,形成单系的支持率除欧洲鳊为 87%、美洲鳊为 99% 外,其余的均为 100%。由此,CO I、CO II 基因对鳊属鱼类的鉴定都是有效的,只是在少数种类中,CO II 基因的支持率稍低些。

综合以上分析结果,对于鳊属 6 种鱼类的 CO I 和 CO II 基因序列特征,尽管存在显著差异,但也有许多相似之处,CO I 基因是分子分类的标准基因,但 CO II 基因也是鳊属鱼类分子分类的有效基因。

本研究部分样本由日本的中村保昭先生、澳大利亚的 Binh Thanh Thai 博士、广东陈凯、张志发、江西刘志军几位先生及上海海洋大学的伍汉霖教授提供,李思发和蔡完其两教授为样本的联系、文章的修改等给了大力支

持,谨致谢忱。

参考文献:

- [1] FUNK D J, OMLAND K E. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA[J]. Annual Review of Ecology and Systematics, 2003,34:397-423.
- [2] CATERINO M S, SPERLING F A H. Papilio phylogeny based on mitochondrial cytochrome oxidase I and II genes [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1999,11:122-137.
- [3] HERAS S, CASTRO M G, ROLDÁN M I. *Mugil curema* in Argentinean waters: combined morphological and molecular approach[J]. Aquaculture, 2006, 261(2): 473-478.
- [4] 李捷,周文卿,张彦周,等. 基于 28S rDNA 序列的姬小蜂科(膜翅目,小蜂总科)分类[J]. 动物分类学报, 2008, 33(2):301-306.
- [5] 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: 313-321.
- [6] JERMIIN L S, CROZIER R H. The cytochrome b region in mitochondria DNA of the ant *Teraponera ruforniger*: sequence divergence in Hymenoptera maybe associated with nucleotide content[J]. Journal of Molecular Evolution, 1994(38):182-194.
- [7] 倪艳,诸立新,王忠锁. 基于 CO I、CO II 和 Cyt b 基因部分序列研究斑粉蝶属(鳞翅目,粉蝶科)分子系统关系[J]. 动物分类学报,2010,35(3):504-517.
- [8] 凌去非,李思发. 鲤科 25 种鱼类线粒体 CO II 基因序列差异及其系统进化关系[J]. 水产学报, 2006,30(6):747-752.
- [9] 齐兴柱,尹绍武,张本,等. 基于 mtDNA-CO II 基因序列对中国南海裸胸鲷属鱼类分子系统进化关系的研究[J]. 水产科学, 2010, 29(10):606-609.
- [10] 松井魁. 鳗学[M]. 东京:恒星社厚生阁株式会社,1972:13.
- [11] EGE V. A revision of the genus *Anguilla* Shaw, a systematic, phylogenetic and geographical study [M]. Dana Report, 1939:16.
- [12] 张春光,唐文乔,刘东,等. 中国动物志,硬骨鱼纲,鳗鲡目背棘鱼目[M]. 北京:科学出版社, 2010:175-183.
- [13] WATANABE S, AOYAMA J, TSUKAMOTO K. A new species of freshwater eel *Anguilla luzonensis* (Teleostei: Anguillidae) from Luzon Island of the Philippines[J]. Fish science, 2009,75: 387-392.
- [14] 伍汉霖,邵广昭,赖春福. 拉汉世界鱼类名典[M]. 台湾:水产出版社,1999:46-47.
- [15] SAMBROO J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual [M]. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989.
- [16] HALL T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. Nucleic Acids Symposium Series, 1998,41:95-98.
- [17] TAMURA K, DUALEY J, NEI M, et al. Mega4: Molecular evolutionary genetics analysis (mega) software version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007,24(8):1596-1599.
- [18] POSADA D, CRANDALL K A. Modeltest: testing the model of DNA substitution[J]. Bioinformatics, 1998,14:817-818.
- [19] HUELSENBECK J P, RONQUIST F. Mrbayes: Bayesian inference of phylogeny [J]. Bioinformatics, 2001, 17(8): 754-755.
- [20] 彭居俐,王绪祯,王丁,等. 基于线粒体 CO I 基因序列的 DNA 条形码在鲤科鲃属鱼类物种鉴定中的应用[J]. 水生生物学报, 2009,33(2):271-276.
- [21] 吴宁,黎中宝,林小云,等. 6 种鳗鲡 (*Anguilla*) 线粒体 DNA CO I 序列的比较研究[J]. 海洋与湖沼,2010,41(6): 930-934.
- [22] 田鑫江,吴宁,黎中宝,等. 6 种鳗鲡 (*Anguilla*) 线粒体 DNA CO II 基因序列分析及其系统发育[J]. 海洋与湖沼, 2011,42(2):279-283.
- [23] VENCES M, THOMAS M, MEIJDEN A V, et al. Comparative performance of the 16S rRNA gene in DNA barcoding of amphibians[J]. Frontier in Zoology, 2005,2(5): 1-12.
- [24] 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[J]. 水生生物学报,2011,35(4): 565-572.

The sequencing analysis and taxonomic effectiveness of *Anguilla* six eels based on mtDNA CO I and CO II gene sequence

GONG Xiao-ling, YUE Li-jia, CUI Zhong-kai, ZHANG Xiao-yi

(The Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Six species of genus *Anguilla*, including *Anguilla rostrata*, *A. anguilla*, *A. bicolor pacifica*, *A. marmorata*, *A. australis* and *A. japonica* are cultured in China. Misidentification on the fry will impact farmers' income because of different *Anguilla* species with different prices in China. In this study, we tried to use two molecular markers (1179bp-length mitochondrial CO I gene and 633bp-length CO II gene) to discriminate the six species based on 54 fry individuals. The percentage of variable sites in CO I and CO II was 17.98% and 16.45% respectively. And the percentage of parsimony-informative sites was 12.16% and 10.11% in CO I and CO II. The negative bias for G was observed in both CO I and CO II genes in checked samples, and their G frequencies were 18.45% and 16.67% respectively. The pairwise distances based on either CO I or CO II among six eel species were almost more than 2% except for only one between *A. rostrata* and *A. anguilla* based on CO II, and the former was a little higher than the latter. But the genetic distances within each species were all less than 1% based on two genes. Although there existed a small difference between two cluster results of six eel species, which was based on CO I gene or CO II gene, all individuals of each species formed a strong monophyletic group on NJ and Mrbayes trees. Taken together, both CO I and CO II genes are good molecular markers to be used in species identification in genus *Anguilla*, and our results may be helpful for eel aquaculture industry in China.

Key words: *Anguilla*; CO I sequence; CO II sequence; species identification; phylogenetic relationship