

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2011.00565

## 刀鲚和凤鲚的分子鉴定及其在仔鱼种类鉴定中的应用

何文平<sup>1,2,3</sup> 程飞<sup>1,2</sup> 黎雨轩<sup>4</sup> 柳明<sup>1</sup> 李钟杰<sup>1</sup> 谢松光<sup>1</sup>

(1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 3. 西南大学荣昌校区水产系, 重庆 402460; 4. 中国水产科学院东海水产研究所, 上海 200090)

**摘要:** 使用 mtDNA Cyt *b* 基因序列作为分子标记, 基于 400 bp 左右的序列分析长颌鲚、短颌鲚及凤鲚成鱼的遗传关系。结果显示长颌鲚和短颌鲚间的遗传距离在 0—0.5% 之间; 凤鲚与长颌鲚、短颌鲚的遗传距离分别在 7.9%—8.9% 和 7.7%—8.6% 之间。用 Kimura 双参数模型构建的 NJ 分子系统树显示, 长颌鲚和短颌鲚不能形成彼此独立的分支, 而是混合聚在一起形成一个分支; 凤鲚则形成另一个分支。对长江口沿岸区域的鲚属仔鱼 Cyt *b* 基因片段序列分析发现, 仔鱼个体之间的遗传距离为 0—0.7%, 仔鱼与长颌鲚、短颌鲚的遗传距离在 0.1%—0.5% 之间, 而与凤鲚的遗传距离为 8.3%—8.8%。在 Kimura 双参数模型构建的 NJ 分子系统树中, 仔鱼与长颌鲚、短颌鲚聚为一类, 而与凤鲚分开, 表明分析的仔鱼样品不包括凤鲚个体。由于长江口一般没有短颌鲚分布, 这些仔鱼应该都是长颌鲚。

**关键词:** 长江口; 刀鲚; 凤鲚; 仔鱼; 种类鉴定; Cyt *b* 基因

中图分类号: Q349 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2011)04-0565-07

传统的鱼类种类鉴定一般基于鱼类的形态学和解剖学特征。在鱼类早期生活史阶段, 形态和结构发生显著改变, 常用于种类鉴定的形态学指标如肌节数量、色素形状和位置、鳍条数等形态学特征常随着发育阶段的变化而改变<sup>[1,2]</sup>。早期个体的种类鉴定是鱼类早期生活史研究的难点。运用分子生物学方法进行种类鉴定可以克服形态学鉴别中主观性强等缺点, 而且还具有重复性好、灵敏度高等优点<sup>[3]</sup>。因为分子生物学方法可以为物种鉴定提供客观的遗传标准, 物种鉴定越来越强调形态学和分子生物学的结合<sup>[4]</sup>。鱼类 mtDNA 结构简单, 具有严格的母系遗传, 一个个体就可以反映出整个母系集团的情况, 是研究近缘种间和种内群体间遗传分化的有力工具<sup>[5]</sup>。mtDNA 上的 Cyt *b* 基因是一种线粒体蛋白质编码基因, 由 1140 个左右的碱基组成, 是 13 个蛋白质编码基因中了解得最为清楚的基因, 被认为是解决亲缘较近的生物之间的系统发育关系最可信的分子标

记之一<sup>[6]</sup>。

刀鲚 (*Coilia ectenes* Jordan et Seale) 和凤鲚 (*Coilia mystus*, Linnaeus) 都是长江口重要的经济鱼类, 但资源量已显著下降<sup>[7,8]</sup>。目前刀鲚已难以形成鱼汛<sup>[9,10]</sup>。凤鲚为河口洄游性鱼类, 在河口繁殖, 繁殖季节在 5 月至 9 月间<sup>[11]</sup>; 刀鲚为溯河洄游性鱼类, 5 月至 6 月间在长江口繁殖, 之后产卵场逐渐上移<sup>[12]</sup>。因此, 刀鲚和凤鲚在河口的繁殖季节重叠。刀鲚和凤鲚生长到幼鱼阶段后根据臀鳍条数和纵列鳞数的差异较易进行种类识别<sup>[13,14]</sup>。刀鲚的臀鳍条数大于 91, 纵列鳞大于 70, 而凤鲚这两个值分别是 73—86 和 53—65。但这些形态性状不能用于鉴别刀鲚和凤鲚仔鱼。另外, 除了洄游性类群外, 刀鲚还包括淡水定居类群和陆封类群<sup>[11,13,14]</sup>。在长江下游洄游性刀鲚的洄游通道, 淡水定居类群与洄游性类群分布重叠, 虽然形态学方法能有效地区分这两种类群<sup>[15]</sup>, 有关不同类群仔鱼的种类鉴别还未见报道。本研究

收稿日期: 2010-05-09; 修订日期: 2010-12-29

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2010CB429000); 国家自然科学基金项目(30770354); 淡水生态与生物技术国家重点实验室开放课题(2009FB15); 中国科学院“百人计划”择优支持项目资助

作者简介: 何文平(1982—), 男, 湖北广水人; 博士; 主要研究方向为鱼类生态学。E-mail: hewenping2008@163.com

通讯作者: 谢松光, 研究员, 博士生导师; E-mail: xiesg@ihb.ac.cn

采用 *Cyt b* 基因片段序列作为分子标记, 建立刀鲚的洄游性类群、淡水定居类群和凤鲚的分子鉴别方法, 在此基础上, 对长江口近岸区域的鲚属仔鱼与成鱼 *Cyt b* 基因片段序列进行比对, 鉴别鲚属仔鱼的种类, 为河口刀鲚和凤鲚的早期生活史研究提供基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本采集

刀鲚洄游性类群(以下称长颌鲚)、淡水定居类群(以下称短颌鲚)和凤鲚成鱼分别于 2009 年 7 月 4 日、9 月 5 日和 6 月 11 日采集于长江南京江段、靖江江段和长江口崇明岛区域(图 1)。样品鱼从流刺网渔获物中收集, 采用形态学方法鉴别刀鲚的不同生态类群和凤鲚<sup>[13, 15]</sup>。成鱼样本信息(表 1)。

仔鱼于 2009 年 6 月 13 日使用动力渔船拖曳 38GG 大型浮游生物网(网目 0.6 mm 和 1.5 mm)在长江口崇明岛的近岸区域采集(图 1)。通过形态学初步鉴别, 分离出鲚属仔鱼样本 15 尾, 标本编号为仔鱼 1—15, 脊索长 7.3—16.9 mm。

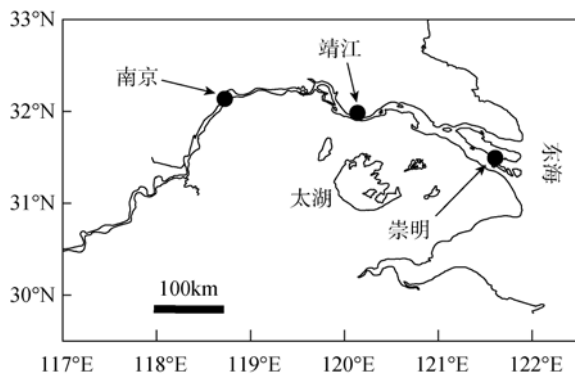


图 1 长江下游和河口

Fig. 1 Lower reach of the Yangtze River and the estuary shows the sampling locations for adults of anadromous *Coilia ectenes* (at Nanjing), freshwater resident *C. ectenes* (at Jingjiang) and *C. mystus* in the estuary (at Chongming), and for larvae of genus *Coilia* in the estuary (at Chongming)

shows the sampling locations for adults of anadromous *Coilia ectenes* (at Nanjing), freshwater resident *C. ectenes* (at Jingjiang) and *C. mystus* in the estuary (at Chongming), and for larvae of genus *Coilia* in the estuary (at Chongming)

表 1 长颌鲚、短颌鲚和凤鲚成鱼的采集地点、数量、样本编号及标准体长

Tab. 1 Sampling location, number, ID and standard length of anadromous *C. ectenes*, freshwater resident *C. ectenes* and *C. mystus*

种类和类群 Species and stocks	采集地 Sampling locations	数量 Number	编号 ID	标准体长 Standard length (mm)
刀鲚 <i>C. ectenes</i>	长颌鲚 南京	5	长颌鲚 1—5	209.2—293.3
	短颌鲚 靖江	5	短颌鲚 1—5	120.2—200.8
凤鲚 <i>C. mystus</i>	崇明	5	凤鲚 1—5	102.5—177.2

### 1.2 总 DNA 提取

总 DNA 提取参照《分子克隆实验指南》<sup>[16]</sup>中的酚-氯仿抽提方法进行。使用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 并将浓度稀释至 5 ng。

### 1.3 PCR 扩增及序列测定

mtDNA *Cyt b* 基因扩增使用通用引物 L14724 和 H15915<sup>[17]</sup>, 引物序列 L14724: 5'-GACTTGAAAAA CCACCGTTC-3'; H15915: 5'-CTCCGATCTCCGGA TTACAAG AC-3'。PCR 反应总体积为 60  $\mu$ L, 其中 10 $\times$ buffer 缓冲溶液(含  $Mg^{2+}$  2.5 mmol/L) 6  $\mu$ L, dNTP (10 mmol/L) 1  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 的通用引物各 1.5  $\mu$ L, 5 U/ $\mu$ L 的 *Taq* DNA 聚合酶 1  $\mu$ L, 模板 DNA 3  $\mu$ L, 加灭菌双蒸水至终体积为 60  $\mu$ L。PCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3min, 然后进行下列程序 30 个循环: 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min。最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。PCR 扩增完成后, 用 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。DNA 纯化、回收和测序由北京六合华大基因科技有限公司武汉测序部完成。测序引物为 L14724。

### 1.4 数据分析

利用 Clustal X 1.83<sup>[18]</sup>软件并使用默认参数对基因序列进行全序列比对并人工校正。利用 MEGA4.0<sup>[19]</sup>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<sup>[20]</sup>。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

成鱼与仔鱼样品的 *Cyt b* 基因均能成功扩增, 扩增片段都在 1300 bp 左右(图 2)。经过序列比对并手工校对后, 选择 *Cyt b* 基因前面的 400 bp 序列进行进一步分析。

Kimura 双参数模型估算长颌鲚、短颌鲚和凤鲚成鱼间 *Cyt b* 基因片段序列的遗传距离表明, 长颌鲚和短颌鲚间的平均遗传距离为 0.2% (0—0.5%), 凤鲚与长颌鲚和短颌鲚间的平均遗传距离分别为

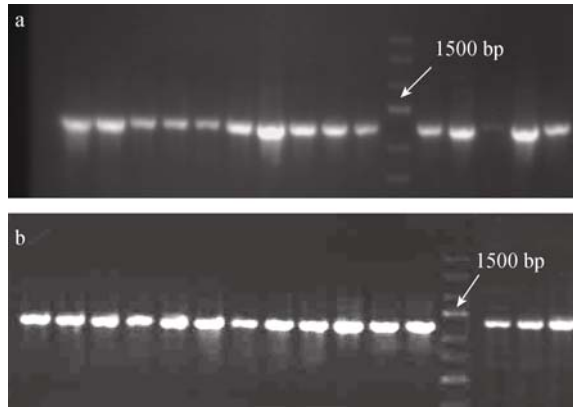


图2 Cyt *b* 基因扩增产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig. 2 Electrophoresis results of PCR products of Cyt *b* gene  
a 为成鱼样品 Cyt *b* 基因扩增产物电泳图, 从左到右依次为长颌鲚 1—5、凤鲚 1—5、短颌鲚 1—5; b 为长江口鲚属仔鱼 Cyt *b* 基因扩增产物电泳图, 从左到右依次为仔鱼 1—15

a was the map for adults of which the first 1—5 from left anadromous *C. ectenes*, 6—10 *C. mystus*, 11, marker ( $\lambda$ DNA/HindIII); and 12—16, freshwater resident *C. ectenes*; b was for larvae of genus *Coilia* from the Yangtze Estuary, which from left to right represented larva 1—12, marker, and larva 13—15

8.5% (7.9%—8.9%)和 8.3% (7.7%—8.6%)(表 2)。按照硬骨鱼类 Cyt *b* 基因为每百万年发生 2%的假定进化速率<sup>[21, 22]</sup>, 长颌鲚和凤鲚的分化时间约在 4.45 万—3.95 万年前在上新世早期。

用 Kimura 双参数模型构建的包括长颌鲚、短颌鲚和凤鲚成鱼 Cyt *b* 基因片段序列的 NJ 分子系统树明显分为两支: 长颌鲚和短颌鲚不能形成彼此独立的分支, 混合聚在一起形成一支; 凤鲚形成另外一支(图 3)。

Kimura 双参数估算表明, 长江口鲚属仔鱼个体间的遗传距离为 0—0.7%, 仔鱼与长颌鲚、短颌鲚和凤鲚间的遗传距离分别为 0.1%—0.5%、0.1%—0.5%和 8.3%—8.8%(表 3)。

用 Kimura 双参数模型构建的包括长颌鲚、短颌鲚、凤鲚成鱼和鲚属仔鱼 Cyt *b* 基因片段序列 NJ 分子系统树分为两支: 长颌鲚、短颌鲚和所有仔鱼不能各自形成独立的分支, 它们混合聚在一起形成一个分支, 支持率为 100%。凤鲚独立形成另一个分支(图 3)。

### 3 讨论

长颌鲚、短颌鲚和湖鲚的分类地位一直存在争议。袁传宓等<sup>[23]</sup>根据它们各自不同的生活史特点和下颌骨的长短、臀鳍鳍条的数目和肝脏大小等形态学参数将它们定义为不同的种。刘文斌<sup>[24]</sup>根据同工酶研究发现长颌鲚、短颌鲚和湖鲚尚未上升到种的水平。唐文乔等<sup>[25]</sup>通过线粒体控制区全系列分析认为短颌鲚和湖鲚为刀鲚的淡水生态型种群, 并非有效物种。最新出版的《中国动物志》将三者合并为一个种类, 并称刀鲚(*C. ectenes*)<sup>[14]</sup>。本研究用线粒体 Cyt *b* 序列构建的系统树显示长颌鲚和短颌鲚不能形成彼此独立的分支, 两者的平均遗传距离为 0.2%。据其他一些动物的 Cyt *b* 基因序列分析的结果, 种内个体间的平均遗传距离一般在 0—4.06%之间, 遗传距离超过 6%则说明有明显的亚种或种的分化<sup>[26, 27]</sup>。因此, 从 Cyt *b* 序列的遗传距离判断, 长颌鲚和短颌鲚的分化没有达到种的水平, 支持了两者应该合并为同一物种的观点。在线粒体 Cyt *b* 序列构建的系统树中, 凤鲚形成独立的分支, 且凤鲚与长颌鲚和短颌鲚的 Cyt *b* 遗传距离均大于 8.0%。利用 Cyt *b* 基因片段序列能将凤鲚与长颌鲚和短颌鲚分开, 但不能将长颌鲚和短颌鲚彼此分开。因此, 可以利用分子方法区分凤鲚和刀鲚仔鱼, 但不能区分刀鲚洄游性类群和淡水定居类群的仔鱼。

长江口鲚属仔鱼个体间的 Cyt *b* 基因片段序列遗传距离为 0—0.7%, 表明这些个体属于同一种类。与成鱼比较, 仔鱼与长颌鲚和短颌鲚的遗传距离为 0.1%—0.5%, 而与凤鲚的遗传距离为 8.3%—8.8%。用 Kimura 双参数模型构建的包括长颌鲚、短颌鲚、凤鲚和鲚属仔鱼的 Cyt *b* 基因片段序列 NJ 分子系统树中, 长颌鲚、短颌鲚和所有鲚属仔鱼构成一个独立分支, 凤鲚构成另一支。这说明仔鱼样品属于长颌鲚或者短颌鲚, 而没有凤鲚个体。因为长江口区域一般没有短颌鲚分布<sup>[9]</sup>, 因此, 分析的仔鱼应

表 2 长颌鲚、短颌鲚和凤鲚间的平均 Kimura 双参数遗传距离

Tab. 2 Mean value of the Kimura's two-parameter distance between each other of anadromous *C. ectenes*, freshwater resident *C. ectenes* and *C. mystus*

		刀鲚 <i>C. ectenes</i>	
		长颌鲚	短颌鲚
刀鲚 <i>C. ectenes</i>	长颌鲚		
	短颌鲚	0.002 (0—0.005)	
凤鲚 <i>C. mystus</i>		0.086 (0.079—0.089)	0.084 (0.077—0.086)

表 3 长颌鲚、短颌鲚和凤鲚成鱼及鲚属仔鱼的 Kimura 双参数遗传距离  
 Tab. 3 The Kimura's two-parameter distance between adults of anadromous *C. ectenes*, freshwater resident *C. mystus* and each of genus *Coilia* larvae

	长颌鲚	短颌鲚	凤鲚	仔鱼 1	仔鱼 2	仔鱼 3	仔鱼 4	仔鱼 5	仔鱼 6	仔鱼 7	仔鱼 8	仔鱼 9	仔鱼 10	仔鱼 11	仔鱼 12	仔鱼 13	仔鱼 14
长颌鲚																	
短颌鲚	0.002																
凤鲚	0.085	0.083															
仔鱼 1	0.002	0.001	0.083														
仔鱼 2	0.001	0.001	0.084	0.001													
仔鱼 3	0.005	0.003	0.085	0.002	0.004												
仔鱼 4	0.005	0.005	0.088	0.005	0.004	0.007											
仔鱼 5	0.001	0.001	0.084	0.001	0.000	0.004	0.004										
仔鱼 6	0.002	0.001	0.083	0.000	0.001	0.002	0.005	0.001									
仔鱼 7	0.001	0.001	0.084	0.001	0.000	0.004	0.004	0.000	0.001								
仔鱼 8	0.002	0.001	0.083	0.000	0.001	0.002	0.005	0.001	0.000	0.001							
仔鱼 9	0.002	0.001	0.083	0.000	0.001	0.002	0.005	0.001	0.000	0.001	0.000						
仔鱼 10	0.005	0.005	0.085	0.005	0.004	0.007	0.007	0.004	0.005	0.004	0.005	0.005					
仔鱼 11	0.001	0.001	0.084	0.001	0.000	0.004	0.004	0.000	0.001	0.000	0.001	0.001	0.004				
仔鱼 12	0.001	0.001	0.084	0.001	0.000	0.004	0.004	0.000	0.001	0.000	0.001	0.001	0.004	0.000			
仔鱼 13	0.001	0.001	0.084	0.001	0.000	0.004	0.004	0.000	0.001	0.000	0.001	0.001	0.004	0.000	0.000		
仔鱼 14	0.001	0.001	0.084	0.001	0.000	0.004	0.004	0.000	0.001	0.000	0.001	0.001	0.004	0.000	0.000	0.000	
仔鱼 15	0.002	0.001	0.083	0.000	0.001	0.002	0.005	0.001	0.000	0.001	0.000	0.000	0.005	0.001	0.001	0.001	0.001

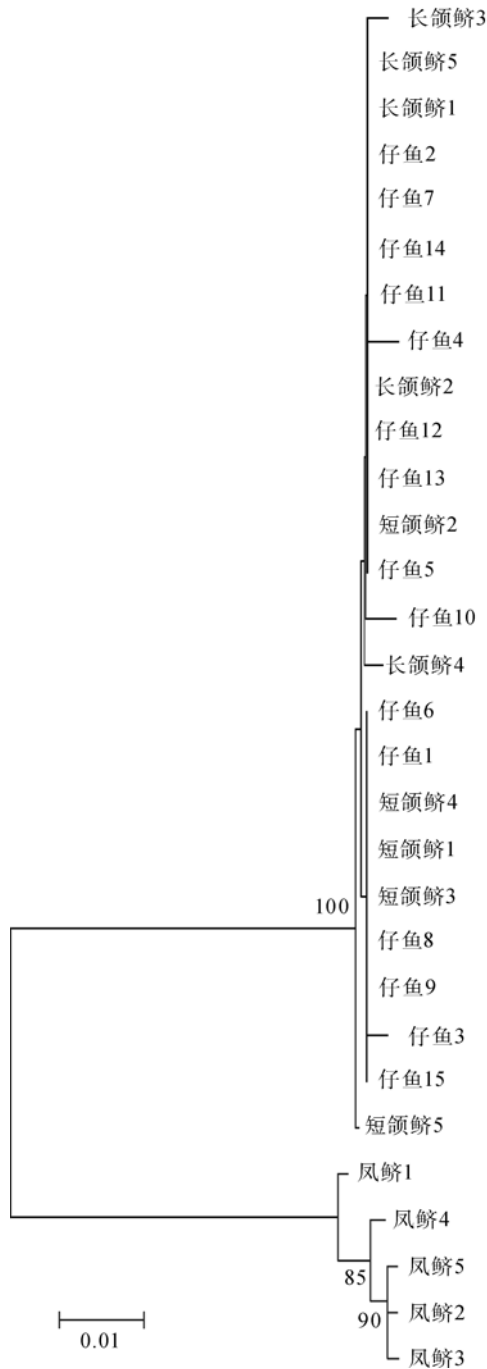


图3 基于 *Cyt b* 基因序列构建的长颌鲚、短颌鲚、凤鲚成鱼和鲚属仔鱼 NJ 分子系统发生树(节点处数字为大于 80%的支持率的自展分支检验值)

Fig. 3 Neighbor-joining molecular dendrogram based on the sequences of *Cyt b* gene of anadromous *C. ectenes*, freshwater resident *C. ectenes* and *C. mystus* and larvae of genus *Coilia* (numbers at nodes represent bootstrap values, only values greater than 80 are shown)

该均为长颌鲚。虽然本研究分析的仔鱼样品只有 15 尾, 前期的形态学比较分析表明同期采集的鲚属仔鱼与分析的样品没有区别(未发表数据)。

蒋日进等<sup>[28]</sup>和葛珂珂等<sup>[29]</sup>发现刀鲚仔稚鱼主要分布在长江口南支及北支上游的淡水或微咸水区域, 他们在沿岸碎波带采集到的鲚属仔稚鱼全部是刀鲚。本研究的仔鱼采集主要在河口近岸区域进行, 紧邻碎波带。在其他长江口仔稚鱼分布调查中也还没有在同一次调查的同一站点中同时发现刀鲚和凤鲚的报道<sup>[30-33]</sup>。蒋玫等<sup>[32]</sup>在长江口口门区域采集到的鲚属仔鱼全部是凤鲚。本研究仔鱼采集在 6 月份进行, 是凤鲚和洄游性刀鲚在长江口的主要繁殖季节<sup>[11, 12]</sup>。本研究和其他刀鲚和凤鲚仔鱼调查结果一起, 说明长江口刀鲚和凤鲚在仔鱼阶段的空间生态位存在明显的分离。进一步调查长江口刀鲚和凤鲚仔鱼阶段的空间分布及其与环境因子的关系, 对揭示两种鱼类的相互作用关系及资源补充过程差异具有十分重要的意义。长江口张网和鳗苗网主要设置在沿岸区, 由于刀鲚仔稚鱼阶段主要分布在河口沿岸带, 与凤鲚相比, 这些渔具对刀鲚补充群体的破坏更加严重。对河口沿岸带刀鲚仔稚鱼摄食和育幼场的保护是刀鲚资源保护和恢复的关键之一。

#### 参考文献:

- [1] Musiy Y I, Sergiyenko V A. Finerlings of the genus *Lutjanus* (Lutjanidae, Perciformes) from the Gulf of Aden [J]. *Journal of Ichthyology*, 1977, **17**: 151—154
- [2] Leis J M, Carson-Ewart B M. The larvae of Indo-Pacific coastal fishes [M]. 2nd edition, Leiden; Boston: Brill. 2004
- [3] Yang G, Cai Y, Liu H. Identification of several imported and exported animal products by mitochondrial DNA [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2004, **39**(5): 40—43 [杨光, 蔡垚, 刘海. mtDNA 标记在几种海关进出口动物产品鉴定中的应用. 动物学杂志, 2004, **39**(5): 40—43]
- [4] Liu Z H, Kong J, Liu P, et al. Application of RAPD technology for identification in three different stocks of *Penaeus chinensis* [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2003, **23**(4): 67—71 [刘振辉, 孔杰, 刘萍, 等. RAPD 技术在中国对虾群体鉴别上的应用. 海洋学报, 2003, **23**(4): 67—71]
- [5] Xiao W H, Zhang Y P. Genetics and evolution of mitochondrial DNA in fish [J]. *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]
- [6] Zardoya R, Meyer A. Phylogenetic Performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving relationships among vertebrates [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1996, **3**(7): 933—942
- [7] Shi W G, Wang B. Status quo of tapertail anchovy resource in the estuaries of the Yangtze River [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, **26**(6): 648—653 [施炜刚, 王博. 长江

- 河口区凤鲚的资源现状. 水生生物学报, 2002, 26(6): 648—653]
- [8] Liu K, Zhang M Y, Xu D P, *et al.* Studies on resource change and MSY of *Coilia mystus* in the Yangtze River estuary [J]. *Journal of Shanghai Fisheries University*, 2004, 13(4): 298—303 [刘凯, 张敏莹, 徐东坡, 等. 长江口凤鲚资源变动及最大持续产量研究. 上海水产大学学报, 2004, 13(4): 298—303]
- [9] Yuan C M, Qin A L. Ecological habits and distribution of *Coilia* along the Chinese coast and its changes of output [J]. *Marine Science*, 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]
- [10] Zhang M Y, Xu D P, Liu K, *et al.* Studies on biological characteristics and changes of resource of *Coilia ectenes* in the lower reaches of Yangtze River [J]. *Resources and Environment in the Yangtze Basin*, 2005, 14(6): 694—698 [张敏莹, 徐东坡, 刘凯, 等. 长江下游刀鲚生物学及最大持续产量研究. 长江流域资源与环境, 2005, 14(6): 694—698]
- [11] Zhuang P, Wang Y H, Li S F, *et al.* Fishes of the Yangtze Estuary [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Press. 2006, 157—160 [庄平, 王幼槐, 李圣法, 等. 长江口鱼类. 上海: 上海科学技术出版社. 2006, 157—160]
- [12] Li Y, Xie S, Li Z, *et al.* Gonad development of an anadromous fish *Coilia ectenes* (Engraulidae) in lower reach of Yangtze River, China [J]. *Fisheries Science*, 2007, 73: 1224—1230
- [13] Cheng Q T, Zheng B S. Systematic synopsis of Chinese fishes (I) [M]. Beijing: Science Press. 1987, 61 [成庆泰, 郑葆珊. 中国鱼类系统检索(上册). 北京: 科学出版社. 1987, 61]
- [14] Zhang S Y. Fauna Sinica (*Osteichthyes: Acipenseriformes, Elopiformes, Clupeiformes, Gonorhynchiformes*) [M]. Beijing: Science Press. 2001, 148—156 [张世义. 中国动物志. 硬骨鱼纲. 鲟形目, 海鲢目, 鲱形目, 鼠鲱目. 北京: 科学出版社. 2001, 148—156]
- [15] Yuan C M, Lin J B, Qin A L. On the classification and status quo of genus *Coilia* in China [J]. *Journal of Nanjing University*, 1976, 2: 1—12 [袁传宓, 林金榜, 秦安龄. 关于我国鲚属鱼类分类的历史和现状. 南京大学学报, 1976, 2: 1—12]
- [16] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual (2nd edn) [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989
- [17] Xiao W H, Zhang Y P, Liu H. Molecular systematics of Xenocyprinae (Teleostei: Cyprinidae): taxonomy, biogeography, and coevolution of a special group restricted in East Asia [J]. *Molecular Phylogenetics Evolution*, 2001, 18(2): 163—173
- [18] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequences alignment aided by analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876—4882
- [19] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 1596—1599
- [20] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, 4(4): 406—425
- [21] Kocher T D, Stepien C A. Molecular Systematics of Fishes [M]. San Diego: Academic Press. 1997, 113—128
- [22] Bowen B W, Bass A L, Rocha L A, *et al.* Phylogeography of the trumpettefishes (Aulostomus): ring species complex on a global scale [J]. *Evolution*, 2001, 55: 1029—1039
- [23] Yuan C M, Qin A L, Liu R H. On the classification of the anchovies, *Coilia*, from the lower Yangtze River and the southeast coast of China [J]. *Journal of Nanjing University*, 1980, (3): 67—82 [袁传宓, 秦安龄, 刘仁华. 关于长江中下游及东南沿海各省的鲚属鱼类种下分类地位的探讨. 南京大学学报, 1980, (3): 67—82]
- [24] Liu W B. Biochemical and morphological comparison and interspecific relationships of four species of the genus *Coilia* in China [J]. *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]
- [25] Tang W Q, Hu X L, Yang J Q. Species validities of *Coilia brachygnathus* and *C. nasus taihuensis* based on sequence variations of complete mtDNA control region [J]. *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]
- [26] Wang Y Q, Xu Q S, Peng X K, *et al.* Taxonomic status of amphioxus *Branchiostoma belcheri* in Xiamen Beach estimated by homologous sequence of Cyt *b* gene [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2004, 50(2): 202—208 [王义权, 许群山, 彭宣克, 等. 通过 Cyt *b* 基因同源序列比较评估厦门文昌鱼的分类学地位. 动物学报, 2004, 50(2): 202—208]
- [27] Bian X D, Zhang X M, Gao T X, *et al.* Morphological and genetic identification of Japanese halfbeak (*Hyporhamphus sajori*) eggs [J]. *Journal of Fisheries of China*, 2008, 32(3): 342—352 [卞晓东, 张秀梅, 高天翔, 等. 沙氏下鲢鱼卵的形态学及遗传学鉴别. 水产学报, 2008, 32(3): 342—352]
- [28] Jiang R J, Zhong J S, Zhang D L, *et al.* Species composition and diversity of fish larvae and juveniles in the surf zone of the Yangtze River Estuary [J]. *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]
- [29] Ge K K, Zhong J S, Wu M Q, *et al.* Distribution and abundance of larval Japanese grenadier anchovy *Coilia nasus* in the surf zone of the Yangtze River estuary [J]. *Journal of Fishery Sciences*, 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]
- [30] Yang D L, Wu G Z, Sun J R. The investigation of pelagic

eggs, larvae and juveniles of fishes at the mouth of the Changjiang River and adjacent areas [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1990, **21**(4): 346—355 [杨东莱, 吴光宪, 孙继仁. 长江口及其邻近海区的浮性鱼卵和仔稚鱼的生态研究. 海洋与湖沼, 1990, **21**(4): 346—355]

- [31] Zhu X H, Liu D, Sha X S. Relationship between community structure of ichthyoplankton and environmental factors in the estuary of Changjiang River in spring [J]. *Studia Marina Sinica*, 2002, **44**: 169—178 [朱鑫华, 刘栋, 沙学绅. 长江口春季鱼类浮游生物群落结构与环境因子的关系. 海洋科学集刊, 2002, **44**: 169—178]
- [32] Jiang M, Shen X Q, Chen L F. Relationship between with

abundance distribution of fish eggs, larvae and environmental factors in the Changjiang Estuary and vicinity waters in spring [J]. *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]

- [33] Han L, Dai X J, Yang H, *et al.* Investigation on the resources status of fish larvae and juveniles in Yangtze Estuary Area [J]. *Journal of Anhui Agriculture Sciences*, 2009, **37**(13): 6023—6026 [韩璐, 戴小杰, 杨红, 等. 长江河口区仔稚鱼资源现状的调查. 安徽农业科学, 2009, **37**(13): 6023—6026]

## MOLECULAR IDENTIFICATION OF *COILIA ECTENES* AND *COILIA MYSTUS* AND ITS APPLICATION ON LARVAL SPECIES

HE Wen-Ping<sup>1, 2, 3</sup>, CHENG Fei<sup>1, 2</sup>, LI Yu-Xuan<sup>4</sup>, LIU Ming<sup>1</sup>, LI Zhong-Jie<sup>1</sup> and XIE Song-Guang<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Department of Fisheries, Rongchang Campus of Southwest University, Chongqing 402460, China; 4. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Sciences, Shanghai 200090, China)

**Abstract:** Based on about 400 bp sequences, nucleotide sequences of Cytochrome (Cyt *b*) segments of mtDNA were analyzed for anadromous *Coilia ectenes*, freshwater resident *C. ectenes* and *C. mystus* in the Yangtze River, China, to develop a reference data for larval species identification of genus *Coilia*. The genetic distance ranged from 0 to 0.5% between the anadromous and freshwater resident *C. ectenes*, 7.9% to 8.9% between *C. mystus* and the anadromous *C. ectenes*, and 7.7% to 8.6% between *C. mystus* and the freshwater resident *C. ectenes*. Neighbor-joining (NJ) molecular dendrogram using Kimura 2-parameter based on the sequences of Cyt *b* gene showed individuals of the anadromous and freshwater resident *C. ectenes* mixed into a cluster, and those of *C. mystus* forming another cluster. Thus, larvae of *C. mystus* could be distinguished from that of *C. ectenes* through Cyt *b* analysis. Nucleotide sequences of Cyt *b* of larvae of genus *Coilia* collected from the Yangtze Estuary were analyzed, and compared to the reference established above. Genetic distance ranged from 0.1% to 0.5% between the larvae and the anadromous and freshwater resident *C. ectenes*, and 8.3% to 8.8% between the larvae and *C. mystus*. NJ molecular dendrogram showed that all the larvae and the anadromous and freshwater resident *C. ectenes* clustered together, while individuals of *C. mystus* forming a separate cluster. Thus, the larvae were not of *C. mystus*. As there is no freshwater resident *C. ectenes* inhabiting in the Estuary, the larvae should be of the anadromous *C. ectenes*.

**Key words:** Yangtze Estuary; *Coilia ectenes*; *Coilia mystus*; Larvae; Species identification; Cyt *b* gene