

何丽斌, 陈芳, 朱志煌, 等. 基于线粒体 16S *rRNA*、*COX1* 和 *Cytb* 基因探讨 11 种小丑鱼的系统发育关系 [J]. 福建农业学报, 2018, 33 (3): 230—235.

HE L B, CHEN F, ZHU Z H, et al. Molecular Phylogeny Determined by Mitochondrial Genes 16S *rRNA*, *COX1* and *Cytb* of Eleven Anemonefish Species [J]. *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 2018, 33 (3): 230—235.

基于线粒体 16S *rRNA*、*COX1* 和 *Cytb* 基因探讨 11 种小丑鱼的系统发育关系

何丽斌¹, 陈芳¹, 朱志煌¹, 马敏宁², 张河长², 吴孙龙², 周宸¹

(1. 福建省水产研究所, 福建 厦门 361013; 2. 福建珊瑚海生态科技有限公司, 福建 福州 350102)

摘要: 采用线粒体 16S *rRNA*、*COX1* 和 *Cytb* 基因测定 11 种小丑鱼的序列, 分析其基因序列差异和遗传距离关系, 并用邻接法、最大似然法和贝叶斯法构建系统进化树, 探讨了 11 种小丑鱼的系统发育关系。序列分析结果显示, 经比对处理后的 3 个基因总长度 4 388 bp, 其中多态位点 1 028 个, 简约信息位点 616 个, 转换与颠换比为 2.12, A+T 的平均含量为 54.7%, 高于 C+G 的平均含量 45.3%。系统发育关系表明: (1) 双锯鱼亚科为单系发生, 但双锯鱼属不为单系发生, 建议对棘颊雀鲷属重新定位; 在双锯鱼属中, 公子小丑鱼 *Amphiprion ocellaris* 和黑边公子小丑鱼 *Amphiprion percula* 聚为一支, 为双锯鱼亚科分子亲缘关系基础; (2) 透红小丑鱼 *Premnas biaculeatus* 在双锯鱼属的定位较为模糊, 贝叶斯树显示透红小丑鱼 *P. biaculeatus* 与公子小丑鱼 *A. ocellaris* 和黑边公子小丑鱼 *A. percula* 聚成一支并位于该支的底端, 而 NJ 树和 ML 树中透红小丑鱼却没能和公子小丑鱼 *A. ocellaris* 和黑边公子小丑鱼 *A. percula* 聚为一支, 而是和其他小丑鱼汇聚成一支; (3) 透红小丑鱼 *P. biaculeatus* 与金透红小丑鱼 *Premnas epigrammata* 是同一种。

关键词: 16S *rRNA* 基因; *COX1* 基因; *Cytb* 基因; 小丑鱼; 遗传差异; 系统进化

中图分类号: S 917.4

文献标识码: A

文章编号: 1008—0384 (2018) 03—230—06

Molecular Phylogeny Determined by Mitochondrial Genes 16S *rRNA*, *COX1* and *Cytb* of Eleven Anemonefish Species

HE Li-bin¹, CHEN Fang¹, ZHU Zhi-huang¹, MA Min-ning¹, ZHANG He-chang², WU Sun-long², ZHOU Chen¹

(1. *Fujian Fisheries Research Institute, Xiamen, Fujian 361013, China;*

2. *Fujian Coral Sea Ecological Technology Co., Ltd., Fuzhou, Fujian 350102, China*)

Abstract: Sequences of mitochondrial 16S *rRNA*, *COX1* and *Cytb* genes were determined to establish the phylogenetic relationship among 11 species of anemonefish using the neighbor-joining (NJ), maximum-likelihood (ML) and Bayesian methods with the divergence and genetic distances determined as well. The 3 genes had a combined length of 4 388 bp that consisted of 1 028 polymorphic and 616 parsimonious-information sites. The ratio of transition to transversion was 2.12, and the average A+T content was 54.7%, which was higher than 45.3% for C+G in the genes. It was found that (1) the subfamily Amphiprioninae was monophyly, but the genus *Amphiprion* was not monophyletic, implying *Premnas* should be reclassified; (2) the phylogenetic trees grouped the percula complex into a clade that formed the ancestral taxon of anemonefish, but the phylogenetic relationship was uncertain in regard to *Premnas biaculeatus*; and, while the Bayesian tree placed the percula complex and *P. biaculeatus* in a same clade, NJ and ML tree classified *P. biaculeatus* in a clade with subgenera *Amphiprion*, *Paramphiprion* and *Phalerebus*; and, (3) the genetic distance between species suggested a possibility of *P. biaculeatus* and *Premnas epigrammata* being identical.

Key words: 16S *rRNA* gene; *COX1* gene; *Cytb* gene; anemonefish; genetic differences; phylogenetic evolution

收稿日期: 2017—11—24 初稿; 2018—01—26 修改稿

作者简介: 何丽斌 (1971—), 女, 副研究员, 主要从事海水观赏鱼繁育研究 (E-mail: helibin1971@sina.com)

基金项目: 福建省海洋与渔业结构调整专项 [闽财指 (2016) 841 号]; 福建省科技计划项目——省属公益类科研院所基本科研专项 (2013R001-7); 福州市“十三五”海洋经济创新发展示范项目 (FZHJ11); 厦门市科学技术局科技计划专项 (3502Z20142008)

小丑鱼隶属于雀鲷科 Pomacentridae，双锯鱼亚科 Amphiprioninae。双锯鱼亚科包括棘颊雀鲷属 *Premnas* 和双锯鱼属 *Amphiprion*。目前已发现的小丑鱼约 28 种，棘颊雀鲷属仅有 1 种。基于形态学特征，双锯鱼属又进一步分为 4 个亚属（*Actinicola*、*Paramphiprion*、*Phalerebus*、*Amphiprion*）。目前，国内对于小丑鱼的研究主要集中在生活习性^[1-2]、人工繁殖及幼体培育^[3-6]、胚胎发育^[7-9]、光照与体色^[10]等方面，而分子遗传方面的研究较少。国外学者 Timm 等^[11]用线粒体控制区分析印度马来群岛公子小丑鱼的种群遗传结构和基因流，得出该群岛的不同区域之间存在高度的多样性和差异化；Jang-Liaw 等^[12]用 12S rRNA 序列对雀鲷科的 48 种鱼构建系统发生树，得出公子小丑鱼 *A. ocellaris*、黑边公子小丑鱼 *A. percula* 和透红小丑鱼 *P. biaculeatus* 聚为一支，并具有原始亲缘关系基础；Tang^[13]利用 12S rRNA 和 16S rRNA 对 23 种雀鲷科鱼类进行 MP 法构建分子系统进化树也得出透红小丑鱼和公子小丑鱼、黑边公子小丑鱼聚为一支，双锯鱼亚科属于单一群系演化的结果。

双锯鱼亚科种类的鉴定主要依赖形态学方法，以体色和条带数目为主要特征。然而不同种类的小丑鱼形态差别不大，同一种类常因外在因素的变化或成长阶段的不同，体表颜色和花纹也会随之改变，例如分类学上透红小丑鱼是棘颊雀鲷属中单独的一类，现在市场上出现一种金透红小丑鱼，这两类幼鱼期都是白色条纹，但金透红小丑鱼白色条纹成年后变成金黄色，市场价格比透红小丑鱼略贵，他们是否为同一物种说法不一，这都给传统分类学鉴定增加难度。因此，有必要用分子遗传学手段对小丑鱼的遗传结构进行进一步阐述。

鱼类线粒体 DNA（mitochondrial DNA，mtDNA）具有母系单倍体遗传特性，具有分子小、结构简单、进化速度快、不同区域进化速度存在差异等特点，是研究属、种间系统发育较好的分子标记^[14-16]。16S rRNA、COX1 和 Cytb 是鱼类体内线粒体基因，具有较好的系统发育信息，通过对这些基因进行 PCR 扩增和序列测定，可以对双锯鱼亚科鱼类种间变异程度和亲缘关系进行分析比较。本研究以菲律宾海域和印尼巴东海域的 11 种小丑鱼为研究对象，对其 16S rRNA、COX1 和 Cytb 基因序列的变异情况进行分析，建立分子系统树，进一步探讨小丑鱼分类学中存在的争议，为小丑鱼的分分类体系完善提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

小丑鱼采集于西太平洋南海菲律宾海域、印尼巴东海域（表 1），每种 2 条。根据 Allen^[17]分类方法对样本外部形态进行初步鉴别，测序后与 NCBI 数据库进行对比确定物种。为探索双锯鱼亚科的系统发育关系，以雀鲷亚科条纹豆娘鱼 *Abudefduf vaigiensis* 和鲷科的蓝点马鲛 *Scomberomorus niphonius* 作为外群构建分子系统发生树，其 Genbank 登录号分别为 AP006016、KY228987。

表 1 小丑鱼种类及采集信息
Table 1 Sampling and species of anemonefish under study

种类	拉丁名	亚属	采集位置
鞍背小丑鱼	<i>Amphiprion polymnus</i>	<i>Paramphiprion</i>	菲律宾海域
公子小丑鱼	<i>Amphiprion ocellaris</i>	<i>Actinicola</i>	菲律宾海域
黑边公子小丑鱼	<i>Amphiprion percula</i>	<i>Actinicola</i>	印尼巴东海域
黑红小丑鱼	<i>Amphiprion melanopus</i>	<i>Amphiprion</i>	菲律宾海域
印度红番茄小丑鱼	<i>Amphiprion ephippium</i>	<i>Amphiprion</i>	菲律宾海域
红小丑鱼	<i>Amphiprion frenatus</i>	<i>Amphiprion</i>	菲律宾海域
双带小丑鱼	<i>Amphiprion clarkii</i>	<i>Amphiprion</i>	菲律宾海域
宽带小丑鱼	<i>Amphiprion latezonatus</i>	<i>Paramphiprion</i>	菲律宾海域
银线小丑鱼	<i>Amphiprion akallopisos</i>	<i>Phalerebus</i>	菲律宾海域
金透红小丑鱼	<i>Premnas epigrammata</i> *	<i>premnas</i>	印尼巴东海域
透红小丑鱼	<i>Premnas Biaculeatus</i>	<i>premnas</i>	菲律宾海域

注：* 表示对学名说法不一，有人称之为 *The Gold Stripe Maroon Clownfish*。

1.2 DNA 提取、扩增和测序

采用基因组抽提试剂盒（TaKaRa 公司）提取 11 种小丑鱼鳍条组织的总 DNA。根据 NCBI 下载有关小丑鱼基因序列设计引物。扩增 16S rRNA 引物序列为 16S rRNA F: 5'-AAG GGG AGG CAA GTC GTA AC-3'和 R: 5'-TGT TTA AAG GGC TTA GGT CT-3'。PCR 反应条件为: 95℃ 预变性 5 min, 然后 95℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 1 min 40 s, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 min。扩增 COX1 引物序列为 COX1 F: 5'-ACT CAG CCA TCC TAC CTG TGG CAA T-3'和 R: 5'-GGT TCG AYT CCT CCC TTT CTC GTA G-3', 反应条件为: 95℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 1 min; 循环 35 次; 72℃ 终延伸 10 min。扩增 Cytb 引物序列为 Cytb F: 5'-CCA GGA CCA GTG ACT TGA AAA CC-3'和 R: 5'-GCA GTA GGA AGG AYT TTA ACC TTC G-3', 反应条件为: 95℃ 预变性 5 min, 然后 95℃ 变性 45 s, 58℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循

环,最后 72℃延伸 5 min。反应体系 25 μL, 包括: 2 μL DNA 模板, 正向和反向引物各 1 μL, 2 μL dNTPs, 2.5 μL 10× buffer (Mg²⁺) 及 0.2 μL Taq DNA 聚合酶(大连宝生物公司 TaKaRa), 灭菌超纯水补足剩余体系。1% 的琼脂糖电泳对 PCR 扩增产物进行检测。PCR 产物经鉴定后送英潍捷基(上海)贸易有限公司进行序列测定。

1.3 数据分析

测序所得线粒体 16S *rRNA*、*COX1* 和 *Cytb* 序列片段利用 DNASTar 进行拼接并辅以人工校对, 通过 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>) 检索来确定目的片段。运用 MEGA5.02^[18] 软件对基因序列进行比对分析。运用 PAUP4.0b10^[19] 软件对 16S *rRNA*、*COX1* 和 *Cytb* 基因进行同质性检验(Parition homogeneity test)。通过 DnaSP v5^[20] 软件确定多态位点数、转换与颠换的比值(transition /transversion, Ts /Tv)和碱基组成。根据 Kimura 2-parameter 模型, 用 MEGA5.02 邻接法(NJ 法)分析系统树状图和用遗传距离分析样本间的关系, 所用方法均运用 Bootstrap 检验重复, 抽样 1 000 次, 其余参数为默认; 以 PAUP 软件构建 ML 树, 以 1 000 次的 Bootstrap 重复抽样来检验系统树各分支的置信度; 用 MrBayes^[21] 软件构建贝叶斯树, 基于马可夫蒙特卡罗(MCMC)进行 100 万代运算, 每 1 000 代对系统树进行一次抽样, 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通过后验概率来检验。

2 结果与分析

2.1 序列特征

对 16S *rRNA*、*COX1* 和 *Cytb* 基因进行同质性检验, 结果为 $P=0.82$, 说明三者可以用于联合分析。对 11 种小丑鱼的 16S *rRNA*、*COX1* 和 *Cytb* 基因供分析的序列多重比对后, 共得到序列长度为 4 388 bp, 其中出现 17 个碱基的插入或缺失, 多态位点 1 028 个, 简约信息位点 616 个, 转换位点 289 个, 颠换位点 136 个, 转换与颠换比为 2.12。A、T、C 和 G 碱基的平均含量分别为 28.8%、26%、27.3%和 17.9%, 其中 A+T 平均含量为 54.7%, C+G 平均含量为 45.3%, A+T 平均含量大于 C+G 平均含量, 这与鱼类 mtDNA 富含 A、T 的结论一致。

2.2 遗传距离

基于 Kimura 双参数模型来计算遗传距离, 以确定类群间的遗传分化程度, 检测结果见表 2。由检测结果可知: 在所研究的 11 种小丑鱼中, 种间距离从 0.002 (黑边公子小丑鱼 *A. percula* 与公子小丑鱼 *A. ocellaris*) 到 0.101 (透红小丑鱼 *P. biaculeatus* 和宽带小丑鱼 *A. latezonatus*), 平均种间遗传距离为 0.068。

表 2 11 种小丑鱼间的遗传距离
Table 2 Genetic distances among 11 species of anemonefish according to kimura-2-parameters model

项目	银线小丑	双带小丑	印度红番茄小丑	红小丑	宽带小丑	黑红小丑	公子小丑	黑边公子小丑	鞍背小丑	透红小丑	金透红小丑
银线小丑											
双带小丑	0.046										
印度红番茄小丑	0.029	0.048									
红小丑	0.029	0.048	0.009								
宽带小丑	0.039	0.052	0.032	0.031							
黑红小丑	0.030	0.047	0.010	0.002	0.030						
公子小丑	0.098	0.100	0.094	0.094	0.098	0.094					
黑边公子小丑	0.098	0.099	0.093	0.093	0.098	0.093	0.002				
鞍背小丑	0.038	0.052	0.030	0.028	0.020	0.028	0.094	0.093			
透红小丑	0.096	0.098	0.096	0.095	0.101	0.094	0.093	0.093	0.098		
金透红小丑	0.093	0.097	0.093	0.091	0.098	0.091	0.091	0.091	0.095	0.010	

2.3 系统发育分析

3 个线粒体基因序列拼接构成长度总共 4 388 bp 用于重建系统发育。以条纹豆娘鱼 *A. vaigiensis* 和蓝点马鲛 *S. niiponius* 为外群, 采用

邻接法、最大似然法和贝叶斯法分别构建了 NJ 树、ML 树和贝叶斯树。

3 棵分子树的拓扑结构均支持: 双锯鱼亚科为单系发生, 透红小丑鱼是伴随双锯鱼属一起发生,

但双锯鱼属不为单系发生, *Actinicola* 亚属归为一支并位于该支的底端, 而 *Paramphiprion*, *Phalerebus* 和 *Amphiprion* 3 等个亚属归为一支。

贝叶斯法和邻接法、最大似然法的分析结果显示了不同之处。NJ 树和 ML 树(图 1~2)的拓扑结构显示黑边公子小丑鱼和公子小丑鱼聚为一支, 其他的小丑鱼聚为第二支系。第二支系被分为 2 个小支系, 其中透红小丑鱼和金透红小丑鱼聚为一支, 第二小支(置信度 100%)是由 *Paramphiprion* 亚属、*Phalerebus* 亚属和 *Amphiprion* 亚属聚为一支。贝叶斯树显示, 所有内群也形成 2 个支系, 各枝的支持率较高(图 3)。其中, *Paramphiprion* 亚属、*Phalerebus* 亚属和 *Amphiprion* 亚属聚为第一支系, 透红小丑鱼和金透红小丑鱼以及 *Actinicola* 亚属聚为第二支系。

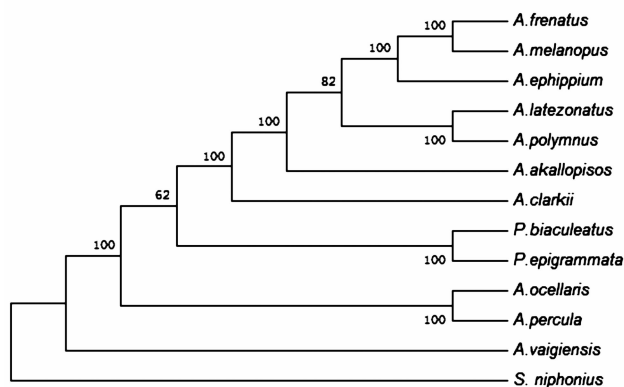


图 1 基于 16S rRNA、COX1 和 Cytb 基因序列构建的 NJ 树

Fig. 1 NJ phylogenetic tree of anemonefish based on mitochondrial 16S rRNA, COX1 and Cytb genes

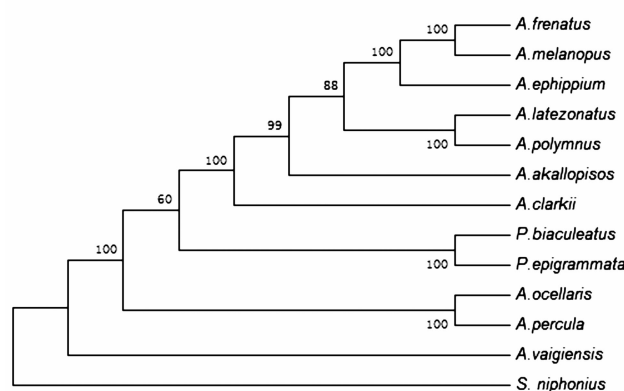


图 2 基于 16S rRNA、COX1 和 Cytb 基因序列构建的 ML 树

Fig. 2 ML phylogenetic tree of anemonefish based on mitochondrial 16S rRNA, COX1 and Cytb genes

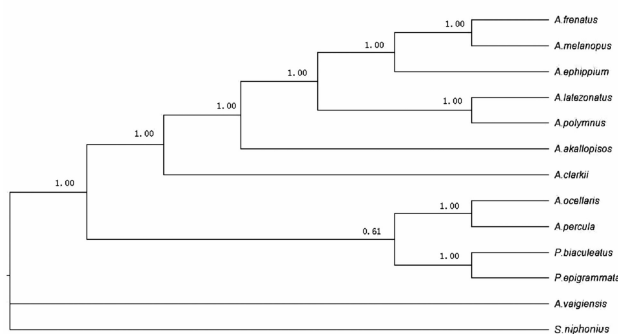


图 3 基于 16S rRNA、COX1 和 Cytb 基因序列构建的贝叶斯树

Fig. 3 Bayesian phylogenetic tree of anemonefish based on mitochondrial 16S rRNA, COX1 and Cytb genes

3 讨论

3.1 序列分析

Folmer 等^[22]认为碱基 A+T 含量高的线粒体基因在进化中更具优势, 11 种小丑鱼在 16S rRNA+COX1+Cytb 的联合基因序列中发现, 碱基 A+T 的平均含量高于 G+C 的平均含量, G 含量最低, 存在偏向性, 组成特征与其他鱼类线粒体 DNA 碱基组成的特点相似^[23-24]。另外, DNA 进化过程中, 碱基转换发生的频率要比颠换发生的频率高。利用转换和颠换的比值可以估计碱基序列的饱和度。一般情况下, 分歧时间越短、亲缘关系越近的分类单元之间, 其转换与颠换的比值越大。若转换与颠换的比值小于 2.0, 认为该基因序列发生的突变已经达到饱和。本研究中所分析的联合基因片段碱基转换/颠换比值为 2.12, 表明基因序列的位点未达到饱和, 序列中的碱基替代均具有系统发育意义^[25], 可以用来作为小丑鱼的遗传分析。

3.2 11 种小丑鱼的系统发育关系

代永东等^[26]研究发现多基因序列联合分析会使得基因树更能准确地推测物种, 特别是近缘物种的系统关系。通过联合的途径获得更多的序列位点信号, 让潜在的系统发育信号显现出来^[27], 所得的系统发育树也可能更接近真实值。

本研究所构建的系统树的拓扑结构表明双锯鱼属不为单系发生。在双锯鱼属中, 公子小丑鱼和黑边公子小丑鱼聚成一支, 除此之外的 *Paramphiprion*、*Phalerebus* 和 *Amphiprion* 等 3 个亚属聚为一支。公子小丑鱼和黑边公子小丑鱼与同属的其他小丑鱼分开并位于该支的底端, 所得的结果与 Glenn 等^[28]、Jang-Liaw 等^[12]和 Tang^[13]一

致。Glenn 等^[28]认为这主要与分布域形成史有关,这一支系种类的端始种在珊瑚三角区发生基因流中断,没有辐射到其他区域,分子钟可追溯到 1900 万年,形成双锯鱼亚科分子亲缘关系基础。在 *Paramphiprion*、*Phalerebus* 和 *Amphiprion* 等 3 个亚属这一小支中,黑红小丑鱼、红小丑鱼和印度红番茄小丑鱼亲缘关系最近,3 种同属于双锯鱼亚属 *Amphiprion* 里的大眼类种系,鞍背小丑鱼和宽带小丑鱼亲缘关系最近,此两种同属于 *Paramphiprion* 亚属的鞍背类种系,用分子的方法与形态学分类得到的结果相符。*Amphiprion* 亚属中的双带小丑鱼与此亚属中的其他小丑鱼不汇成一支,可能是双带小丑鱼分布广泛,游泳能力强,对海葵的依赖性较弱,能与较多海葵共生,较强的生活能力,在长期环境中产生一定的进化的结果。

Allen^[29]认为透红小丑鱼外形特殊,把透红小丑鱼从双锯鱼属中独立出来作为双锯鱼亚科中棘颊雀鲷属的单一一种,此形态学分类与 Quenouille 等^[30]用分子方法得到结果不一致。Quenouille 等^[30]利用 *ATP8*、*ATP6* 和 *Cytb* 基因对雀鲷科的 103 种鱼运用 Bayesian 法建树,得出双锯鱼亚科是单一系统发生的群体,建议将棘颊雀鲷属重新归类。本研究所建系统树再次证明了从分子数据的角度来看双锯鱼亚科为单系发生,透红小丑鱼是伴随双锯鱼属一起发生,建议对棘颊雀鲷属进行重新分类定位。

关于透红小丑鱼在双锯鱼属的具体定位,本研究所建的系统树没能取得一致的结果。NJ 树和 ML 树显示透红小丑鱼和除 *Actinicola* 亚属之外的其他小丑鱼汇聚成一支,却没能和公子小丑鱼和黑边公子小丑鱼聚为一支,而贝叶斯树却显示透红小丑鱼和公子小丑鱼、黑边公子小丑鱼聚为一支,并且此结果与 Jang-Liaw 等^[12]、Tang^[13] 和 Quenouille 等^[30]结果一致。3 棵树得到的结果有部分差别,推测可能是物种自身的特点对系统发育树构建产生的影响。Jeffroy 等^[31]认为基因组数据中核苷酸组成偏好会影响系统发育树的准确构建,所以采用不同的系统发育分析方法所得到的结果并不一致。小丑鱼历史进化不明缺少相关的化石信息,同一种存在多个近缘种或亚种且常因外界环境的变化而发生变化,从而推测物种自身进化可能对系统发育树构建产生影响。究竟应该是按照 Jang-Liaw 等^[12]、Tang^[13] 和 Quenouille 等^[30]的观点将透红小丑鱼和公子小丑鱼、黑边公子小丑鱼一起归入 *Actinicola* 亚属中,还是按本文 NJ 树和 ML 树得到的结果将透红小丑鱼和除 *Actinicola* 亚属外的

小丑鱼归为一支,仍然是一个值得探索的问题。

关于金透红小丑鱼和透红小丑鱼是否为同一种,不同的研究得出的结论不一致。金透红小丑鱼与透红小丑鱼形态上的区别是金透红小丑鱼身体上的白色条带呈金黄色。Allen^[32]认为颜色差异不能作为物种鉴定的诊断特征,Michael^[33]认为这两种小丑鱼颜色上的变化是由于营养等一系列因素引起的,白色条带和黄色条带只是两种不同的颜色模式;也有人认为金透红小丑鱼与透红小丑鱼是不同的种,Fowler^[34]在 1904 年把来自于苏门答腊岛的金透红小丑鱼作为一个独特的种,并把此学名命名为 *Premnas epigrammata*。本研究基于 Kimura 双参数模型计算遗传距离的研究显示,金透红小丑鱼与透红小丑鱼之间的遗传距离数值为 0.01,且小于种间的平均遗传距离 0.068。Shaklee 等^[35]提出鱼类在属、种和种群三级水平上的遗传距离分类判别标准分别为 0.9、0.3、0.05。Avisé^[36]认为同一种的个体间一般有 0.1%~5% 的差异水平,杜启艳等^[37]提出 DNA 序列间的遗传距离的差异如果小于 0.02,则小于种内的遗传差异。因此,笔者认为金透红小丑鱼与透红小丑鱼尚未达到种的分化标准,属于同一种。当然这结果可作为现代分类学研究的一个补充,需要更多的分类方法来确定其分类地位。

参考文献:

- [1] ZHANG T, CAI S L, JU C X. Effects of temperature and pH on activity of digestive enzymes in *Amphiprion ocellaris* juvenile[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2014, 41(3): 131-135.
- [2] YE L, HU J, WANG Y, et al. Effects of Light on Survival, Development and Growth of Larvae of *Amphiprion clarkii* [J]. *Journal of Qiongzhou University*, 2014, 21(5): 78-86.
- [3] TENG L P, YANG D G, LI X G, et al. The Artificial Breeding in *Amphiprion larkii* [J]. *Fisheries Science*, 2005, 24(2): 26-28.
- [4] BAO Y, ZHANG P, ZHU C Y, et al. Artificial breeding of the anemonefish *Amphiprion frenatus* [J]. *Marine Sciences*, 2009, 33(2): 26-28.
- [5] BAO Y, ZHANG P, ZHU C Y, et al. Artificial breeding of the anemonefish *Premnas biaculeatus* [J]. *Marine Sciences*, 2001, 35(3): 67-71.
- [6] MADHU K, MADHU R. Successful breeding of common clownfish *Amphiprion percula* under captive conditions in Andaman and Nicobar Island [J]. *Fish Chimes*, 2002, 22(9): 16-17.
- [7] SUKJAI R, PISUT M, AMARAT, et al. Embryonic development of saddleback anemone fish, *Amphiprion polymnus*, Linnaeus (1758) [J]. *Kasetsart Journal Natural Science*, 2005, 39(3): 455-463.
- [8] DHANEESH K V, KUMAR T T A, SHUNMUGARAJ T.

- Embryonic development of percula clownfish, *Amphiprion percula* (Lacepede, 1802) [J]. *Middle East Journal of Scientific Research*, 2009, 4 (2): 84–89.
- [9] JU C X, LI Y, LIU H, et al. Morphological observation on embryonic development of *Amphiprion ocellaris* [J]. *Marine Fisheries*, 2014, 36 (1): 8–15.
- [10] MA B H, SUN Z B, MA A J, et al. Effect of light color on growth and body color in tomato *Amphiprion frenatus* juvenile [J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2017, 48(1): 148–154.
- [11] TIMM J, KOCHZIUS M. Geological history and oceanography of the Indo-Malay Archipelago shape the genetic population structure in the false clown anemonefish (*Amphiprion ocellaris*) [J]. *Molecular Ecology*, 2008, 17(18): 3999–4014.
- [12] JANG-LIAW N H, TANG K L, HUI C F, et al. Molecular phylogeny of 48 species of Damsel fishes (Perciformes: Pomacentridae) using 12S mtDNA sequences [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2002, 25 (3): 445–454.
- [13] TANG K L. Phylogenetic relationships among damselfishes (Teleostei: Pomacentridae) as determined by mitochondrial DNA data [J]. *Copeia*, 2001, 2001 (3): 591–601.
- [14] LIU J, BERRY R E, BLOUIN M S, et al. Molecular differentiation and phylogeny of entomopathogenic nematodes (rhabditida: heterorhabditidae) based on ND4 gene sequences of mitochondrial DNA [J]. *Journal of Parasitology*, 1999, 85 (4): 709–715.
- [15] WANG J Y, LAN Z R, TIAN F L, et al. Genetic diversity of domestic yellow cattle breeds in Shandong Province [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2010, 33 (3): 115–118.
- [16] YU D B, LU Y L, XU H X, et al. Analysis of phylogenetic relationship based on mitochondrial CO I gene sequence in domestic duck [J]. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2011, 34 (6): 109–114.
- [17] ALLEN G R. Damsel fishes of the world [M]. Melle; Mergus, 1991: 33–56.
- [18] TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, et al. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28 (10): 2731–2739.
- [19] SWOFFORD D L. PAUP* Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods) [M]. Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland; Sinauer Associates, 2002.
- [20] LIBRADO P, ROZAS J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25 (11): 1451–1452.
- [21] HUELSENBECK J P, RONQUIST F. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees [J]. *Bioinformatics*, 2001, 17: 754–755.
- [22] FOLMER O, BLACK M, HOEH W, et al. DNA primer for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates [J]. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, 3 (5): 294–299.
- [23] ZHONG L Q, LIU P P, PAN J L, et al. Genetic variation analysis of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) from five lakes in the middle and lower reaches of the Yangtze River based on Mitochondrial DNA cytb [J]. *Journal of Lake Sciences*, 2013, 25 (2): 302–308.
- [24] LIU P P, ZHONG L Q, PAN J L, et al. Population genetics in mitochondrial DNA control region for five fresh-water yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* [J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2013, 44 (3): 728–733.
- [25] KOCHER T D, WILSON A C. Sequence Evolution of Mitochondrial DNA in Humans and Chimpanzees: Control Region and A Protein-coding Region [M]. New York: fossils, molecules and culture, Springer, 1991: 391–413.
- [26] DAI Y D, YU H, ZENG W B, et al. Multilocus phylogenetic analyses of the genus *Isaria* (Ascomycota, Cordycipitaceae) [J]. *Mycosystema*, 2016, 35 (2): 147–160.
- [27] BAKER R H, GATESY J. Is morphology still relevant? [C] // DeSalle R, Giribet G, Wheeler W, (eds). *Molecular Systematics and Evolution: Theory and Practice*. Basel: Birkhauser Verlag, 2002: 163–174.
- [28] GLENN L, PEARMAN P B, DEBORAH L, et al. The radiation of the clownfishes has two geographical replicates [J]. *Journal of Biogeography*, 2014, 41 (11): 2140–2149.
- [29] ALLEN G R. Damsel fishes of the South Seas [M]. New Jersey: Tropical fish hobbyist publications, 1975: 1–273.
- [30] QUENOUILLE B, BIRMINGHAM E, PLANES S. Molecular systematics of the damselfishes (Teleostei: Pomacentridae): Bayesian phylogenetic analyses of mitochondrial and nuclear DNA sequences [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2004, 31 (1): 66–88.
- [31] JEFFROY O, BRINKMANN H, DELSUC F, et al. Phylogenomics: the beginning of incongruence? [J]. *Trends Genet*, 2006, 22 (4): 225–231.
- [32] ALLEN G R, SWAINSTON R, RUSE J. Marine Fishes of Tropical Australia and South-East Asia [M]. Australia: Western Australian Museum, 1997.
- [33] MICHAEL S W. Damsel fishes & Anemonefishes: the Complete Illustrated Guide to Their Identification, Behaviors, and Captive Care [M]. New Jersey: TFH Publications, Microcosm, 2008.
- [34] FOWLER, HENRY W. A collection of fishes from Sumatra [M]. Second series. Philadelphia: the Academy of Natural Sciences of Philadelphia, 1904: 495–560.
- [35] SHAKLEE J B, TAMARU C S, WAPLES R S. Speciation and evolution of marine fishes studied by the electrophoretic analysis of proteins [J]. *Pacific Science*, 1982, 36 (2): 141–157.
- [36] AVISE J C. Molecular markers, natural history and evolution [M]. New York: Chapman and Hall, 1994.
- [37] 杜启艳, 常重杰. DNA 条形码在鉴别物种中的应用 [J]. *生物学教学*, 2010, 35 (12): 60–61.