

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00355

南海金线鱼属 *Nemipterus* 鱼类 CO I 和 Cyt b 基因片段的比较分析

董丽娜^{1,2}, 黄梓荣¹, 李永振¹, 陈国宝¹

1. 中国水产科学研究院 南海水产研究所, 广东 广州 510300;

2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要: 基于线粒体细胞色素 b (Cyt b) 和细胞色素氧化酶 I 基因(CO I) 片段, 运用 PCR 直接测序法, 对采自南海的金线鱼(*Nemipterus virgatus*)、日本金线鱼(*N. japonicus*)、深水金线鱼(*N. bathybius*)、红棘金线鱼 (*N. nemurus*) 和苏门答腊金线鱼(*N. mesoprion*) 及 GenBank 中的六齿金线鱼(*N. hexodon*)、裴氏金线鱼(*N. peronii*) 及红金线鱼(*N. furcosus*) 的序列进行了分析, 并比较分析了它们间的序列差异。Cyt b 基因序列片段(425 bp) 和 CO I 基因序列片段(507 bp) 的分析均显示日本金线鱼和红棘金线鱼之间序列差异和遗传距离均最小, CO I 基因片段中为分别 0.25% 和 0.003, Cyt b 基因片段中为 0 和 0, 两者亲缘关系非常近; 几种金线鱼之间尚未达到属的水平, 裴氏金线鱼仍属于金线鱼属; 两目的片段的 NJ 系统树均显示, 日本金线鱼和红棘金线鱼混杂在一起聚为一支, 而日本金线鱼和苏门答腊金线鱼属于不同的发育分支; 红棘金线鱼和日本金线鱼是最新分化种, 金线鱼则是最早分化种; 几种金线鱼类的分化时间大约在中更新世时期。比较属间的系统发育关系, 旨在为金线鱼属鱼类分类提供依据, 进而对鱼类资源的评估与保护措施提供基础参考。

关键词: 金线鱼属; 线粒体细胞色素氧化酶 I 基因; 细胞色素 b 基因; 序列差异; 南海

中图分类号: S93

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)02-0355-09

金线鱼属 *Nemipterus* 鱼类分布于北太平洋西部海域, 是印度-西太平洋热带地区重要的经济性鱼类。金线鱼属鱼类世界上共发现 26 种^[1-2], 中国南海常见的有金线鱼(*N. virgatus*)、日本金线鱼(*N. japonicus*)、深水金线鱼(*N. bathybius*)、六齿金线鱼(*N. hexodon*)、红棘金线鱼(*N. nemurus*) 和苏门答腊金线鱼(*N. mesoprion*) 等。金线鱼属鱼类是南海渔业生产中重要经济鱼类之一。目前, 国内有关金线鱼类在形态特征, 分类和资源分布等方面做过研究工作^[3-7], 并且也在南海逐渐发现新种^[8-9]。在有关金线鱼属鱼类的分辨中, 常以形态学上的区分点为标准。但是由于金线鱼属鱼类的外形极其酷似, 且近年来, 随着分子生物技术的发展, 越来越多同种异名现象被发现^[10-12]。因此有必要对

外形酷似的金线鱼属鱼类进行分子生物学方法的系统比较, 以便为金线鱼属鱼类的分类提供参考。

1 材料与方法

1.1 样本采集及鉴定

实验用金线鱼样品采自南海北部陆架区(2009 年 8 月)和北部湾海域(2010 年 3 月), 深水金线鱼样品于 2010 年 3 月采自于北部湾湾口海域, 日本金线鱼样品和红棘金线鱼样品于 2009 年 5 月采自于北部湾海域, 苏门答腊金线鱼样品于 2009 年 9 月采自北部湾海域南部, 并结合 GenBank 中六齿金线鱼、裴氏金线鱼、红金线鱼 CO I 的同源序列。在样品采集过程中, 根据鱼类的形态学特征进行初步鉴定^[2,8-9,13-14](表 1)。样品数量、种类、

收稿日期: 2011-06-17; 修订日期: 2011-12-20.

基金项目: 科技部社会公益研究专项资金资助项目(2004DIB3J098); 广东省科技计划项目(2010B030800008; 2005B31001005); 国家财政专项项目(2010-2011); 国家科技基础性工作重点项目(2003DEA6N042); 广东省科技计划项目(2010B030800008).

作者简介: 董丽娜(1985-), 女, 硕士研究生, 从事鱼类种群的分子分析研究. E-mail: donglina116@126.com

通信作者: 李永振, 研究员. E-mail: Y.Z.Li@qq.com

编号及来源见表 2。

1.2 DNA 提取

采集的标本取尾部肌肉组织约 0.1g 于 2.0 mL 离心管中,并用无水乙醇固定。实验前将肌肉从酒精中取出,充分晾干并剪碎,采用生工基因提取试剂盒(SK1252)提取基因组 DNA。取 3 μL 抽提的 DNA 用 1%的琼脂糖凝胶电泳检测,检验后放置在-20℃冰箱中保存备用。

1.3 PCR 扩增

用于扩增金线鱼属 CO I 基因片段的引物分别为:

FF2d 5'-TTCTCCACCAACCACAARGAYAT YGG-3';

FR1d 5'-CACCTCAGGGTGTCCGAARAA YCARAA-3'^[15]。

用于扩增 Cyt b 基因片段的引物为:

H15149 5'-AAACTGCAGCCCCCTCAGAATG ATATTTGTCTCA-3';

L14724 5'-CGAAGCTTGATATGAAAAACC ATCGTTG-3'。

PCR 反应总体积为 25 μL, 其中 10×Taq Buffer (Takara) 2.5 μL, Taq DNA 聚合酶(TaKaRa 5U/μL) 0.2 μL, dNTP(2.5 mmol/L each) 0.5 μL, 引物(20 μmol/L) (上海生工生物工程有限公司合成) 0.3 μL, 1μL 模板 DNA, 其余用双蒸水补充。反应条件为: 94℃ 预变性 3 min, 之后进行 35 个循环 (94℃ 30 s, 52℃ 45 s, 72℃ 50 s), 最后 72℃ 延伸 5 min。扩增产物经 1% TAE 琼脂糖凝胶检测, 溴化乙锭染色, 凝胶成像系统观察和拍照后送至上海生工生物工程技术服务有限公司进行双向序列

表 1 5 种金线鱼形态学主要区分点
Tab.1 Main differences of five *Nemipterus* species

种类 species	区分点 main differences
金线鱼 <i>N. virgatus</i>	臀鳍 III—8 anal fin III—8
苏门答腊金线鱼 <i>N. mesoprion</i>	尾鳍黄色条纹为 2 条 two yellow stripes in tail fin
日本金线鱼 <i>N. japonicus</i>	背鳍边缘为红色 red in edge of dorsal fin
深水金线鱼 <i>N. bathybius</i>	腹部下缘为黄色 yellow in the lower edge of abdomen
红棘金线鱼 <i>N. nemurus</i>	第一、二棘上有红色 red in first and second calthrops of dorsal fin

表 2 样品数量、种类、编号及来源
Tab. 2 Species, number and source of samples

种类 species	采样地点 sampling location	采样时间 sampling time	样品数量 sampling number	编号 number		来源 source
				CO I	Cyt b	
金线鱼 <i>N. virgatus</i>	南海北部陆架区 continental shelf of northern South China Sea	2009.8	3	N1,N2,N3	BN1,BN2, BN3	本研究 this study
	北部湾海域 Beibu Gulf	2010.3	1	—	BN4	本研究 this study
日本金线鱼 <i>N. japonicus</i>	北部湾海域 Beibu Gulf	2009.5	3	R1,R2,R3	BR1, BR2	本研究 this study
深水金线鱼 <i>N. bathybius</i>	北部湾湾口海域 The mouth of Beibu Gulf	2010.3	3	SH1,SH2,SH3	BSH1, BSH2	本研究 this study
红棘金线鱼 <i>N. nemurus</i>	北部湾海域 Beibu Gulf	2009.5	3	SD1,SD2,SD3	BSD1, BSD2, BSD3	本研究 this study
苏门答腊金线鱼 <i>N. mesoprion</i>	北部湾海域南部 Southern of Beibu Gulf	2009.9	3	S1,S2, S3	BS1, BS2, BS3	本研究 this study
六齿金线鱼 <i>N. hexodon</i>	—	—	—	L	—	GenBank(BW-A1328)
裴氏金线鱼 <i>N. peronii</i>	—	—	—	P	—	GenBank(BW-A1327)
红金线鱼 <i>N. furcosus</i>	—	—	—	H	—	GenBank(BW-A1319)

测定。ABI 3730 PRISM DNA 测序仪产生 ABI 文件。

1.4 序列数据分析

用 DNASTar 中的 SeqMan 软件进行同源序列的比对和排列。用 Bioedit 软件进行多重比对。用 DnaSP 4.10 软件查看序列的单倍型情况及计算多态位点。用 Mega4.0 软件对其进行碱基组成及碱基替代数、差异位点的统计分析, 并应用 Kimura 双参数法计算遗传距离, 相应的标准误差用 Bootstrap 方法(重复数=1 000)计算。使用邻接法(NJ)构建系统树, 并对所得系统树进行自展法检验(1 000 次重复)。

2 结果与分析

2.1 序列比较分析

经人工拼接比对后, 得到同源的 CO I 基因片段(507 bp)和 Cyt b 基因片段(25 bp)。8 种金线鱼间在 CO I 基因片段共检测到 13 个单倍型和 152 个多态位点。5 种金线鱼间在 Cyt b 基因片段检测出 8 个单倍型和 101 个多态位点。8 种金线鱼间在 CO I 基因片段中的转换/颠换比 $R=2.6$ 。5 种金线鱼间在 Cyt b 基因片段中转换颠换比

$R=2.977$ 。两段目的基因的转换均明显大于颠换。

CO I 基因片段中, 3 尾金线鱼共享 1 个单倍型; 3 尾日本金线鱼存在 3 个单倍型; 3 尾深水金线鱼存在 3 个单倍型; 3 尾红棘金线鱼存在 2 个单倍型, 其中 SD2 与 SD3 共享 1 个单倍型; 3 尾苏门答腊金线鱼存在 3 个单倍型; 六齿金线鱼, 裴氏金线鱼和红金线鱼分别为 1 个单倍型。Cyt b 基因片段中, 4 尾金线鱼有 2 个单倍型, 2 尾深水金线鱼各自 1 个单倍型, 3 尾苏门答腊金线鱼有 3 个单倍型, 2 尾日本金线鱼和 3 尾红棘金线鱼共享 1 个单倍型。

核苷酸组成分析结果表明: 两段基因片段中, G 碱基含量普遍偏低, A+T 含量大于 C+G 含量。8 种金线鱼 CO I 基因片段 T、C、A、G 碱基的平均含量分别为 31.7%、26.9%、23.6%和 17.9%。5 种金线鱼 Cyt b 基因片段的 4 种碱基平均含量分别为: A 为 25.1%, T 为 30.5%, C 为 28.2%, G 为 16.2%。

在对氨基酸密码子的检测中发现, CO I 基因和 Cyt b 基因 G 碱基在第三密码子位点上较低(11%和 5.9%)。CO I 基因在氨基酸水平上检测到 4 处氨基酸的替代(图 1), 分别在第 13、50、136

[	1	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556	6666666667	7777777778	8888888889	999999	
[		1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	123456	
#N1.seq		SLLIRAELSQ	PGALLGDDQI	YNVIVTAHAF	VMIFFNVMPI	MIGGFQNWLI	PLMIGAPDMA	FPRMNNMSFW	LLPPSFLLLL	ASSGIEAGAG	TGWTV
#SH1.seq											
#SH2.seq											
#SH3.seq											
#SD1.seq						V					
#SD2.seq						V					
#R1.seq						V					
#R2.seq						V					
#R3.seq						V					
#S1.seq	-	S									
#S2.seq	-	S									
#S3.seq	-	S									
#H											
#L						V					
#P						V					
[	111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111	1111111111]	
[	9999000000	0000111111	1111222222	2222333333	3333444444	4444555555	5555666666	6666777777	7777888888	]	
[	6789012345	6789012345	6789012345	6789012345	6789012345	6789012345	6789012345	6789012345	6789012345	]	
#N1.seq		YPPLAGNLAH	AGASVDLTIF	SLHLAIGISSI	LGAINFITTI	INMKPPAISQ	YQTPLFVWAV	LITAVLLLLL	LPVLAAGITM	LLTDRLNNTT	
#SH1.seq						F.....					
#SH2.seq						F.....					
#SH3.seq						F.....					
#SD1.seq											
#SD2.seq											
#R1.seq											
#R2.seq											
#R3.seq											
#S1.seq						H.....					
#S2.seq						H.....					
#S3.seq						H.....					
#H											
#L											
#P											

图 1 8 种金线鱼 CO I 编码的氨基酸序列比对

Fig.1 Amino acid of CO I sequences alignment of eight *Nemipterus* species

和 143 位点上。在 Cyt b 基因氨基酸密码子的检测中发现 5 处氨基酸替代位点, 分别为 1、4、26、32 和 125 位点, 如图 2 所示。

序列差异越大, 表明在两者之间变异分化程度最高。CO I 基因序列差异的百分比显示(表 5 对角线下), 8 种金线鱼中红金线鱼和深水金线鱼之间的序列差异最大, 为 49.70%, 日本金线鱼和红棘金线鱼之间序列差异最小, 仅为 0.25%。Cyt b 基因序列差异的百分比显示(表 6 对角线上), 日本金线鱼和红棘金线鱼之间的序列片段的差异为

表 3 8 种金线鱼 CO I 基因片段碱基组成
Tab.3 Nucleotide base composition of CO I gene fragment for eight *Nemipterus* species

种类 species	碱基含量 nucleotide composition						%
	T	C	A	G	A+T	C+G	
金线鱼 <i>N. virgatus</i>	30.5	27.0	24.2	18.3	54.7	45.3	
苏门答腊金线鱼 <i>N. mesoprion</i>	30.6	28.9	22.9	17.6	53.5	46.5	
日本金线鱼 <i>N. japonicus</i>	32.8	25.3	23.3	18.6	56.1	43.9	
深水金线鱼 <i>N. bathybius</i>	32.9	26.1	23.8	17.2	56.7	43.3	
红棘金线鱼 <i>N. nemurus</i>	32.6	26.0	23.2	18.2	55.8	44.2	
六齿金线鱼 <i>N. hexodon</i>	30.5	27.0	24.3	18.2	54.8	45.2	
裴氏金线鱼 <i>N. peronii</i>	30.5	27.2	24.7	17.6	55.2	44.8	
红金线鱼 <i>N. furcosus</i>	29.7	29.0	23.4	17.9	53.1	46.9	
平均 average	31.7	26.9	23.6	17.9	55.3	44.8	

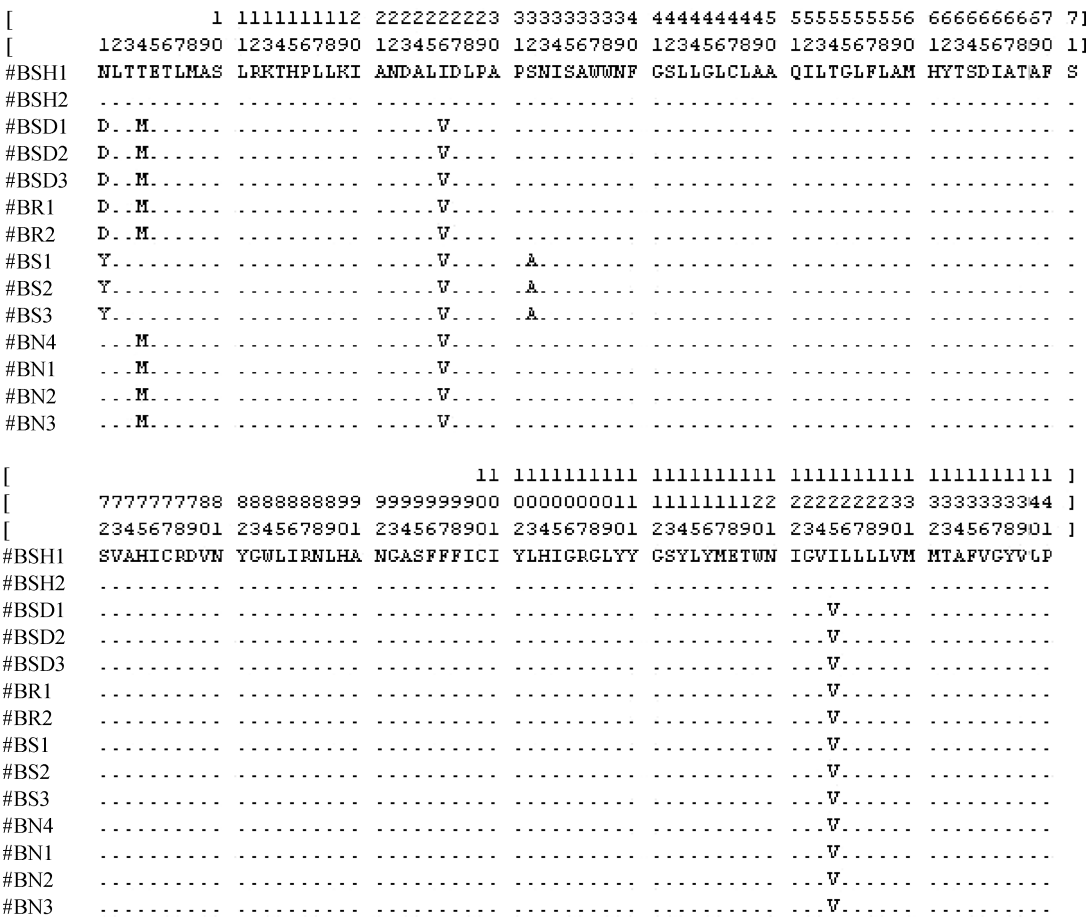


图 2 5 种金线鱼 Cyt b 编码氨基酸序列比对
Fig.2 Amino acid of Cyt b sequences alignment of five *Nemipterus* species

0, 深水金线鱼和苏门答腊金线鱼之间序列差异最大(15.80%)。

用 Kimura-2-parameter 模型分析种间遗传距离, 显示 8 种金线鱼 CO I 基因(表 5 对角线上)遗传距离在 0.003~0.224 之间, 其中苏门答腊金线鱼和六齿金线鱼之间的遗传距离最大, 为 0.224; 日本金线鱼和红棘金线鱼之间的遗传距离最小, 为 0.003。5 种金线鱼 Cyt b 基因(表 6 对角线下)遗传距离在 0.000~0.181 之间。日本金线鱼和红棘金线鱼之间的遗传距离为 0.000, 这和 CO I 基因所得的结果类似, 而遗传距离最大的是苏门答腊金线鱼和深水金线鱼之间, 为 0.181。

2.2 基于 Cyt b 基因推测金线鱼属鱼类分化的时间

科学家们把线粒体 DNA, 尤其是 Cyt b 基因, 当做一种走时准确的“分子钟”, 推算近缘物种的分化时间(divergence time)。一般用 2%每百万年的核苷酸分歧速率^[16-19]来进行分化时间的推算。将这个速率应用于 5 种金线鱼类的 Cyt b 基因片段上,得到分歧时间, 其中红棘金线鱼和日本金线鱼间无明显分化, 深水金线鱼和红棘金线鱼、日本金线鱼分化时间大约为 74.29 万年前, 深水金线鱼和苏门答腊金线鱼大约在 79.01 万年前, 深水金线鱼和金线鱼大约在 58.08 万年前, 红棘金线鱼、日本金线鱼和苏门答腊金线鱼大约在 84.6

万年前, 红棘金线鱼、日本金线鱼和金线鱼大约在 79.46 万年前, 苏门答腊金线鱼和金线鱼约为 88.445 万年前。从地质年代来看, 几种金线鱼的分化时间处于中更新世。

表 4 5 种金线鱼类群体 Cyt b 区碱基频率
Tab.4 The nucleotide base frequencies of Cyt b of 5 *Nemipterus* genus

种类 species	% T C A G			
	T	C	A	G
金线鱼 <i>N. virgatus</i>	30.8	27.6	25.4	16.3
日本金线鱼 <i>N. japonicus</i>	31.3	28.0	25.2	15.5
深水金线鱼 <i>N. bathybius</i>	28.8	29.0	25.5	16.7
红棘金线鱼 <i>N. nemurus</i>	31.3	28.0	25.2	15.5
苏门答腊金线鱼 <i>N. mesoprion</i>	30.1	28.6	24.5	16.7
平均 average	30.5	28.2	25.1	16.2

2.3 系统进化树

用金线鱼科眶棘鲈属条纹眶棘鲈(*Scolopsis taenioptera*)和鲭科马鲛属东太平洋马鲛(*Scomberomorus sierra*)做 CO I 基因序列系统树外群, 以金线鱼科齿颌眶棘鲈(*Scolopsis ciliatus*)和石首鱼科大西洋白姑鱼(*Argyrosomus regius*)做 Cyt b 基因序列系统树外群, 使用邻接法(NJ)构建系统树(图 3), 并对所得系统树进行自展法检验(1 000 次重复)。

表 5 8 种金线鱼 CO I 基因片段平均序列差异百分比(%) (对角线下)和 K2P 距离(对角线上)
Tab.5 Average percentage of divergence(%) (below diagonal) and K2P distance(above diagonal) for mtDNA CO I sequences of eight *Nemipterus* species

种类 species	金线鱼 <i>N. virgatus</i>	苏门答腊金线鱼 <i>N. mesoprion</i>	日本金线鱼 <i>N. japonicus</i>	深水金线鱼 <i>N. bathybius</i>	红棘金线鱼 <i>N. nemurus</i>	六齿金线鱼 <i>N. hexodon</i>	裴氏金线鱼 <i>N. peronii</i>	红金线鱼 <i>N. furcosus</i>
金线鱼 <i>N. virgatus</i>		0.179	0.171	0.120	0.171	0.131	0.188	0.173
苏门答腊金线鱼 <i>N. mesoprion</i>	13.80		0.129	0.185	0.129	0.224	0.197	0.179
日本金线鱼 <i>N. japonicus</i>	12.70	37.50		0.168	0.003	0.185	0.155	0.178
深水金线鱼 <i>N. bathybius</i>	21.90	46.20	3.60		0.030	0.132	0.195	0.194
红棘金线鱼 <i>N. nemurus</i>	12.50	37.30	0.25	3.00		0.185	0.157	0.180
六齿金线鱼 <i>N. hexodon</i>	5.60	22.50	30.80	48.10	30.90		0.210	0.204
裴氏金线鱼 <i>N. peronii</i>	4.50	29.90	15.80	31.10	16.30	4.20		0.092
红金线鱼 <i>N. furcosus</i>	6.90	5.50	35.70	49.70	35.60	6.70	15.00	

表 6 5 种金线鱼类 Cyt b 的 K2P 遗传距离(对角线下)和序列差异百分比(对角线上)拉丁名斜体
Tab.6 Average K₂P genetic distance (below diagonal)and percentage of divergence(%)(above diagonal) of Cyt b gene between 5 *Nemipterus* genus

种类 species	金线鱼 <i>N. virgatus</i>	日本金线鱼 <i>N. japonicus</i>	深水金线鱼 <i>N. bathybius</i>	红棘金线鱼 <i>N. nemurus</i>	苏门答腊金线鱼 <i>N. mesoprion</i>
金线鱼 <i>N. virgatus</i>		14.09	11.62	14.09	17.69
日本金线鱼 <i>N. japonicus</i>	0.160		14.86	0.00	10.69
深水金线鱼 <i>N. bathybius</i>	0.131	0.169		14.86	15.80
红棘金线鱼 <i>N. nemurus</i>	0.160	0.000	0.169		10.69
苏门答腊金线鱼 <i>N. mesoprion</i>	0.207	0.118	0.181	0.118	

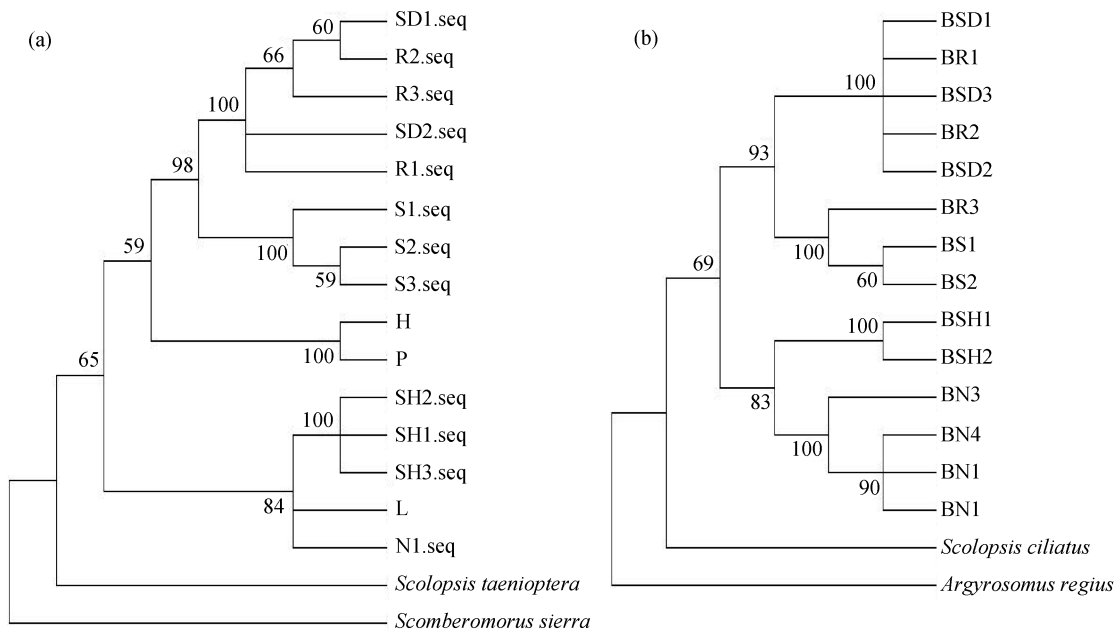


图 3 CO I (a)基因 NJ 系统进化树和 Cyt b(b)基因 NJ 系统进化树
节点旁数据为 1 000 次自展检验后置信度值(%)

Fig.3 Reconstruction of NJ phylogenetic trees of the *Nemipterus* based on CO I (a) and Cyt b(b) gene fragment
Numbers beside nodes represent bootstrap value (%) after 1 000 replicates.

3 讨论

线粒体基因组是细胞内独立于核基因存在的基因,其复制特性和遗传特性使得线粒体基因富含丰富的遗传进化分析线索。动物的细胞色素氧化酶有七个亚基,其中 3 个亚基由线粒体(mtDNA)编码,细胞色素氧化酶 I (cytochrome oxidase subunit I, CO I)基因就是由线粒体编码的一段基因。而且由于该段的分子结构简单,进化速率适中,且保守序列丰富而稳定,可作为种属系统进化研究的良好标记^[20]。细胞色素 b 基因(Cyt b)是线粒体自身编码的为数不多的蛋白质基因之一,且进化速度适中,包含的遗传进化信息量大,近

年来已被广泛的应用于鱼类系统发育和种类鉴别等相关领域^[21-26]。线粒体基因中,CO I 基因是方便快捷的鉴定“条码”,Cyt b 基因是研究的最清楚的一段基因,因此常用这两段基因对同属间的近缘鱼类做系统的研究,并且已有研究证明这两段基因的分析研究效果比较好^[27-28]。故借用分子手段利用 CO I 和 Cyt b 基因片段对我国南海金线鱼属鱼类进行系统发育研究是可行的,也是十分必要的,可以更好的为金线鱼属鱼类分类提供参考。

比较后发现,CO I 和 Cyt b 基因在不同种间的碱基含量相差不大,但是均表现为 G 含量偏低,且 A+T 含量大于 G+C 含量。这可能与密码子第

三位点的偏倚性和不均一性有关^[29]。在氨基酸水平上分别检测到了 4 处和 5 处的氨基酸的替代, 表明几种金线鱼在氨基酸水平上已经产生了一定的分化, 可能是由于密码子的兼并性, 从而氨基酸替代的位点不多。而在序列差异方面, 日本金线鱼和红棘金线鱼之间序列差异最小, CO I 基因中为 0.25%, Cyt b 基因中为 0。Avisé^[30]提出种内的平均序列差异在 1%~2%。由此可以看出, 日本金线鱼和红棘金线鱼远未达到种间的平均水平, 亲缘关系很近。

采用 Kimura-2-parameter 模型分析金线鱼不同种间遗传距离, 由 CO I 基因和 Cyt b 基因片段得到的遗传距离及系统树表现相同的趋势。CO I 基因中, 苏门答腊金线鱼和六齿金线鱼之间的遗传距离最大, 为 0.224; 日本金线鱼和红棘金线鱼之间的遗传距离最小, 为 0.003。而 Cyt b 基因中, 金线鱼和苏门答腊金线鱼的遗传距离最大, 为 0.207, 日本金线鱼和红棘金线鱼之间遗传距离最小, 为 0。Hebert 等^[31-32]认为物种间的遗传距离应在 0.02~0.03。Ward 等^[33]指出, 硬骨鱼类的遗传距离在 0.206 3~1.040 0 之间, 同种内的 K₂P 遗传距离应为 0.003 9。以此为判断, 由所得分子数据来看, 日本金线鱼同红棘金线鱼之间的遗传距离没有达到种的界限。同时, Kartavtsev 等^[34]认为 Cyt b 基因和 CO I 基因遗传距离在同种群间分别为(1.55±0.56)%和(0.55±0.19)%, 在有生殖隔离的近似种间分别为(5.52±1.34)%和(4.91±0.83)%, 在同属不同种间分别为(10.69±1.34)%和(9.66±0.72)%。由此可见, 几种金线鱼间的分化并没有达到属的水平。这与 Menezes^[35]曾利用等位酶标记的方法对日本金线鱼、六带金线鱼(*N. delagoae*)、朗氏金线鱼(*N. randalli*)和裴氏金线鱼(*N. peronii*)等 4 种金线鱼属鱼类亲缘关系做过研究, 并且由于裴氏金线鱼和其他金线鱼的平均遗传距离为 1.055, 从而将裴氏金线鱼划归为不同的属, 这一结果不同。

基于两个基因片的系统发育树结果可以看出, 日本金线鱼和红棘金线鱼混杂聚在一起, 其他种内个体聚在一起。由此可以看出, 日本金线

鱼和红棘金线鱼亲缘关系非常近。在进化上, 日本金线鱼和红棘金线鱼属于平行进化, 且这一混杂的支系位于进化树的顶端, 进化最晚, 是金线鱼的最新演化种的代表。而且, 日本金线鱼和苏门答腊金线鱼是两个不同的发育分支, 这与 Mohd 等^[36]利用形态学上的特征将日本金线鱼和苏门答腊金线鱼归为可能的一个系统发育分支的分析不一致。同时也证实了利用分子的手段在进行鱼类亲缘关系的探讨上有一定的优越性, 可以区分在形态上不能详细进行区分的不同种的鱼, 可为鱼类种群的区分鉴别提供理论依据。

本文对日本金线鱼和红棘金线鱼的线粒体 CO I 基因片段和 Cyt b 基因片段进行比较分析后发现, 日本金线鱼和红棘金线鱼亲缘关系很近。同样, 王中铎等^[12]也利用线粒体及 Cyt b 基因的 RFLP 的分子方法, 将原本认为的画眉笛鲷一个种, 区分为褐带画眉笛鲷和黄带画眉笛鲷两个种。再次为用分子的方法可以将种间差异, 或是同一基因型的表型区分开来提供了一次实验数据。

在形态上, 对金线鱼属鱼类可依据尾鳍有无丝状、腹缘有无黄带, 体侧纵带条数, 臀鳍软棘条数, 鳃盖后的红色斑点, 背鳍边缘的颜色, 背鳍第一、二鳍棘上有无红色, 侧线起点处下方有无红斑等来进行区分。本文的研究结果和吴仁协等^[9]从形态上认为红棘金线鱼与日本金线鱼完全有区别的观点不同, 认为日本金线鱼和红棘金线鱼的分子亲缘关系是非常近的, 故认为红棘金线鱼和日本金线鱼之间的形态上的区别可能是表型多样性的表现。关于此点, 可以在以后的研究中进一步通过其他的分子标记来进行讨论。

Hewitt^[37]提出物种形成过程主要发生在上新世和更新世。本研究采用 2%每百万年的核苷酸分歧速率来进行分化时间的推算, 经计算得出, 5 种金线鱼类的分化时间大概在中更新世时期, 符合 Hewitt 所提出的推断。在更新世冰川作用活跃, 海平面下降, 并且全球的气温较低, 在这样的环境下, 金线鱼开始出现分化, 以适应变化的气候条件。

通过本研究对几种金线鱼的 CO I 基因片段和 Cyt b 基因片段进行比较和分析, 可以得出以

下几个结论: (1) 日本金线鱼和红棘金线鱼亲缘关系很近。(2) 几种金线鱼之间尚未达到属的水平, 尤其是裴氏金线鱼仍是金线鱼属的鱼类, 但是日本金线鱼和苏门答腊金线鱼属于不同的发育分支。(3) 红棘金线鱼和日本金线鱼是最新分化种, 金线鱼则是最早分化种。(4) 几种金线鱼类的分化时间大约在中更新世时期。对几种金线鱼线粒体基因片段的探讨, 为研究金线鱼种群遗传学提供了基础, 同时也为金线鱼属鱼类种质资源的合理开发利用提供。

参考文献:

- [1] 伍汉霖, 邵广昭, 赖春福. 拉汉世界鱼类名典[M]. 基隆: 水产出版社, 1999: 362-363.
- [2] Russell B C. FAO species catalogue. Vol.12. Nemipterid fishes of the world[J]. FAO Fish Synop, 1990, 125(12): 1-49.
- [3] 贾晓平, 李永振, 李纯厚, 等. 南海专属经济区和大陆架渔业生态环境和渔业资源 [M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [4] Russell B C. A Review of the Threadfin Breams of the Genus *Nemipterus* (Nemipteridae) from Japan and Taiwan, with Description of a New Species[J]. Jpn J Ichthyol, 1993, 39(4): 295-310.
- [5] 李仲辉. 金线鱼(*Nemipterus virgatus* (HOU T TU YN)) 骨骼系统的研究[J]. 河南师范大学学报: 自然科学版, 2000, 28(3): 89-92.
- [6] 李忠炳, 卢伙胜, 凌文通, 等. 南海北部金线鱼和深水金线鱼的鳞片年轮特征比较研究[J]. 安徽农业科学: 自然科学版, 2008, 36(8): 3323-3326.
- [7] 王雪辉, 邱永松, 杜飞雁. 南海北部金线鱼生长、死亡和最适开捕体长研究[J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34(2): 224-230.
- [8] 黄梓荣, 王跃中. 北部湾出现苏门答腊金线鱼及其形态特征[J]. 台湾海峡, 2009, 28(4): 516-519.
- [9] 吴仁协, 刘静, 颜云榕. 中国金线鱼科鱼类一新纪录[J]. 动物分类学报, 2010, 35(2): 431-433.
- [10] 柳淑芳, 刘进贤, 庄志猛, 等. 舌鲷亚科鱼类单系起源和同种异名的线粒体 DNA 证据[J]. 生物多样性, 2010, 18(3): 275-282.
- [11] 苏天凤, 江世贵. 竹荚鱼属鱼类线粒体 DNA 控制区结构及其系统发育分析[J]. 南方水产科学, 2011, 7(1): 18-25.
- [12] 王中铎, 刘楚吾, 郭昱嵩. 5 种笛鲷 mtDNA 及 Cyt b 基因片段的 RFLP 比较[J]. 水产学报, 2005, 29(3): 327-332.
- [13] 成庆泰, 郑葆珊. 中国系统鱼类检索[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [14] FAO. Nemipteridae [EB/OL]. <http://www.fishbase.Org>. 2009
- [15] Ivanova N V, Zemlak T S, Hanner R H, et al. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding[J]. Molec Ecol Notes, 2007, 7(4): 544-548.
- [16] Meyer A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes[C]. Hochachka P W, Mommsen P(eds). Biochemistry and Molecular Biology of Fishes Vol.1.2. Amsterdam: Elsevier Press, 1993: 1-36.
- [17] Bermingham E, Mccafferty S S, Martin A P. Molecular systematics of fishes[M]. San Diego: Academic Press, 1997: 113-128.
- [18] Bowen B W, Bass A L, Rocha L A, et al. Phylogeography of the trumpet fish(*Aulostomus* spp.): ring species complex on a global scale[J]. Evolution, 2001, 55 (5): 1029-1039.
- [19] 毕潇潇, 高天翔, 肖永双, 等. 4 种鲳鱼线粒体 16S rRNA、COI 和 Cyt b 基因片段序列的比较研究[J]. 南方水产, 2009, 5(3): 46-52.
- [20] Martínez-Navarro E M, Galián J, Serrano J. Phylogeny and molecular evolution of the tribe Harpalini (Coleoptera, Carabidae) inferred from mitochondrial cytochrome-oxidase I[J]. Mol Phylogen Evol, 2005, 35: 127-146.
- [21] 田兰香, 梁冰, 张树义, 等. 细胞色素 b 基因序列与 7 种石首鱼类的系统进化[J]. 台湾海峡, 2004, 23(4): 437-443.
- [22] 高天翔, 陈省平, 韩志强, 等. 大银鱼和小齿日本银鱼线粒体细胞色素 b 和 16S rRNA 基因部分序列分析[J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34(5): 791-794.
- [23] 陈艺燕, 钱开诚, 任岗, 等. 大黄鱼与小黄鱼细胞色素 b 基因全序列的比较分析[J]. 生态科学, 2005, 24(2): 143-145.
- [24] 陈善元, 张仁东, 李维贤, 等. 六种鲷亚科鱼类线粒体细胞色素 b 基因序列分析[J]. 云南大学学报, 2003, 25(5): 453-457.
- [25] 朱世华, 杨迎春, 郑文娟, 等. 从细胞色素 b 部分序列探讨石斑鱼属的分子系统发育关系[J]. 水生生物学报, 2006, 34(4): 432-438.
- [26] 张岩, 肖永双, 高天翔, 等. 两种黄盖鲷线粒体 DNA 部分片段比较分析[J]. 水产学报, 2009, 33(2): 201-207.
- [27] 王中铎, 谭围, 郭昱嵩, 等. 笛鲷属线粒体基因组编码序列的系统进化分析能力评估[J]. 水产学报, 2010, 34(6): 836-844.
- [28] Luo Jiacong, Xiao Yongshuang, Song Lin, et al. Phylogenetic separation of lancelets in China revealed by mitochondrial CO I and Cyt b gene analysis[J]. South China Fisheries Science, 2007, 3(2): 8-14.

- [29] Meyer A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes [J]. Biochem Molec Biol Fishes, 1993, 2: 1–36.
- [30] Avise J C. Phylogeography. The history and formation of species. Cambridge[M]. MA: Harvard University Press, 2000.
- [31] Hebert P DN, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proc Roy Soc Lond Ser B, 2003, 270: 313–321.
- [32] Barrett R D H, Hebert P D N. Identifying spiders through DNA barcodes[J]. Can J Zool, 2005, 83: 481 – 491.
- [33] Ward R D, Tyler S Z, Bronwyn H I, et al. DNA barcoding Australia's fish species[J]. Philos Trans R Soc B, 2005, 360: 1847–1857.
- [34] Kartavtsev Y P, Lee J S. Analysis of nucleotide diversity at the cytochrome *b* and cytochrome oxidase I genes at the population, species, and genus levels[J]. Genetics, 2006, 42(4): 437–461.
- [35] Menezes M R., Arolkar U, Rathod V. Genetic relationships among five nemipterid fish species from the Indian coast using allozyme analysis[J]. J Fish Biol, 2002, 60(5): 1326–1330.
- [36] Mohd, Zaki Mohd, Said, et al. Colour pattern as an additional aid to the identification of *Nemipterus* species and their relationship[J]. Pertanika, 1990, 3(1): 17–26 .
- [37] Hewitt G M. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation[J]. Bid J Lirmean Soc, 1996, 58(3): 247–276.

Sequence analysis of mitochondrial CO I and Cyt b gene of *Nemipterus* species in South China Sea

DONG Lina^{1,2}, HUANG Zirong¹, LI Yongzhen¹, CHENG Guobao¹

1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: We sequenced and analyzed partial nucleotide sequences of Cyt b and CO I gene for *Nemipterus* species, including *Nemipterus virgatus*, *N. japonicus*, *N. bathybius*, *N. nemurus*, *N. mesoprion*, and the CO I gene of *N. hexodon*, *N. peronii* and *N. furcosus* from GenBank. The results show that there are little different in nucleotide base of Cyt b (425 bp) and CO I (507 bp). The divergence of sequences and genetic distances are tiny in *N. japonicus* and *N. nemurus* (CO I 0.25% and 0.003, Cyt b 0 and 0) which suggest they have very closed relationship. And the *Nemipterus* species belongs to one genus, including *N. peronii* since the *N. japonicus* and *N. mesoprion* are in different branches. From the NJ phylogenetic trees, *N. japonicus* and *N. nemurus* are the latest differentiation species, *N. virgatus* is the oldest one. Molecular evolution rate (2% every million year in Cyt b) showed the divergence of *Nemipterus* species occurred during the middle pleistocene epoch. It is a reference of the classification of *Nemipterus* species.

Key words: *Nemipterus* species; CO I gene; Cyt b gene; the divergence of sequence; the South China Sea

Corresponding author: LI Yongzhen. E-mail: Y.Z.Li@qq.com