

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00373

珠带鱼和带鱼未定种 *Trichiurus* sp.2 的分子系统进化关系

郭刘军¹, 吴仁协¹, 刘静²

1. 广东海洋大学 水产学院, 广东 湛江 524025;

2. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071

摘要: 针对南海大型带鱼新种——珠带鱼(*Trichiurus margarites* Li, 1992)与日本产带鱼未定种 *T. sp.2* (sensu Nakabo, 2002)之间的系统进化关系及分类地位不明确问题, 本研究通过测定采自海南岛西岸珠带鱼的线粒体 16S rRNA 基因部分序列, 结合已报道的 *T. sp.2* 及其近缘种的同源序列, 对其 16S rRNA 基因序列变异进行分析。基于 Kimura 双参数模型计算, 海南岛西岸珠带鱼与日本九州、海南岛东岸及印度洋 *T. sp.2* 间的净遗传距离(0.000 ~ 0.006)远低于属内其他种间的净遗传距离(0.037~0.061), 表明二者的遗传分化程度处于种内水平。邻接法(NJ)和最大似然法(ML)构建的分子系统树显示, 珠带鱼与 *T. sp.2* 以极高的置信度(NJ 100%, ML 96%)聚为一支单系, 并与其他带鱼形成姐妹群。根据所得分子数据并结合形态学研究资料, 可以确定日本产带鱼未定种即是珠带鱼, 它广泛分布于印度—西太平洋。综合 3 种带鱼属鱼类在西北太平洋的种间分化事件, 对珠带鱼的起源及演化进行了初步推测。

关键词: 珠带鱼; 带鱼未定种; 16S rRNA 序列; 系统进化; 分类地位

中图分类号: Q959

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)03-0373-08

带鱼属(*Trichiurus*)鱼类广泛分布于热带、亚热带和温带海域, 资源量大, 食用价值高, 为暖温性中下层重要经济鱼类^[1]。在 20 世纪 90 年代前, 通常认为中国沿海的带鱼属鱼类仅有 1 种, 即带鱼 [*T. haumela* (Forsskal, 1775)或(*T. lepturus* Linnaeus, 1758)]^[2-3], 它可分为若干种族或种群^[4-5]。Li(李春生)^[6]于 1992 年根据上枕骨骨瘤、背鳍黄色等形态学鉴别特征, 命名了采自中国南海的 1 个大型带鱼新种——珠带鱼(*T. margarites* Li, 1992)。随后, 日本学者 Yamada 等也观察到了采自琉球群岛和九州岛西岸(东海)黄色背鳍带鱼, 并邀请李春生对该型带鱼进行物种鉴定(与李春生的私人通信)。然而, 由于 Yamada 等所采集的标本数量极少(仅 4~5 尾)以及李春生在日本期间的研究时间有限(仅 1 个月), 因此, 难以对日本黄色

背鳍带鱼的分类地位做出确切的结论(与李春生的私人通信)。根据日本黄色背鳍带鱼与珠带鱼在上枕骨骨瘤大小的差异^[7], Nakabo^[8]将日本黄色背鳍带鱼暂定为带鱼未定种(*Trichiurus* sp.2, 简称 *T. sp.2*)。Chakraborty 等^[9]通过线粒体 16S rRNA 序列分析, 证实了采自日本九州宫崎和冲绳的 *T. sp.2* 与东带鱼(*T. japonicus* Temminck et Schlegel, 1844)、高鳍带鱼(*T. lepturus* Linnaeus, 1758)互为单系群, 彼此间遗传分化显著, 是 3 个独立的物种。然而, 迄今有关珠带鱼与日本产 *T. sp.2* (sensu Nakabo, 2002)之间的系统进化关系尚未见报道, 二者的分类学地位并未明确。

随着分子生物学技术的迅速发展和广泛应用, 基于 DNA 序列分析的分类研究方法克服了传统形态分类的某些局限, 有效实现了对物种的准确

收稿日期: 2011-12-27; 修订日期: 2012-03-07.

基金项目: 国家自然科学基金项目(41006084); 广东省高校优秀青年创新人才培养计划项目 (LYM10088); 海洋渔业科学与技术浙江省重中之重学科开放课题 (20100116); 广东海洋大学引进人才启动经费项目(1112259).

作者简介: 郭刘军(1984-), 男, 硕士研究生, 主要从事海洋鱼类分类与系统进化研究. E-mail: guoliujun85@sina.com

通信作者: 吴仁协(1981-), 博士, 讲师. E-mail: wurx@gdou.edu.cn

鉴定、分类地位确定及系统进化关系重建^[10-12], 成为系统分类学研究的新手段。鉴于线粒体 16S rRNA 基因序列在带鱼属鱼类分子系统学研究中的良好分辨能力^[9, 11, 13-14], 以及该基因序列在日本产 *T. sp.2* 中的可获得性^[9], 本研究以从珠带鱼的模式标本产地(海南岛白马井、莺歌海和三亚近岸)所采集的珠带鱼样品为实验材料, 在形态分类鉴定的基础上, 测定其线粒体 16S rRNA 基因序列, 结合已报道的 *T. sp.2* 及其近缘种的同源序列, 研究珠带鱼与 *T. sp.2* 的分子系统进化关系与分类学地位, 并对其起源及演化进行初步探讨。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用的 11 尾珠带鱼系 2009 年 12 月至 2010 年 5 月采自海南岛西岸(白马井、莺歌海和三亚近岸), 样品采集地点位于该物种的模式标本产地。鱼体的形态鉴定依据 Li^[6] 所描述的珠带鱼形态分类标准。取样品肌肉组织于 95% 乙醇中保存备用。

1.2 序列测定

按照《分子克隆实验指南》中的蛋白酶-酚/氯仿法^[15]提取珠带鱼的背部肌肉基因组 DNA。采用引物 AR(5'-GCCTGTTTATCAAAAACAT-3') 和 BR(5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3')^[16] 扩增 16S rRNA 基因部分序列。PCR 的反应体系及程序、扩增产物检测见吴仁协等^[17]报道的方法。纯化的 PCR 产物由北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序, 测序引物为 PCR 扩增引物。

1.3 数据分析

测定序列经 SeqMan II 软件^[18]拼接、校对, 之后采用 DnaSP4.10 软件^[19]定义单倍型。在 GenBank 中进行 BLAST 搜索比对, 选取 *T. sp.2*、东带鱼和高鳍带鱼的 16S rRNA 基因同源序列(表 1)进行合并分析。

在合并分析中, 本实验将海南岛西岸获得的 4 个珠带鱼 16S rRNA 单倍型(GenBank 序列登录号为 JN165226-JN165229)设为 Tm 组。来自日本九州宫崎、冲绳的 2 个 *T. sp.2* 16S rRNA 单倍型

(AB125746、AB20990)^[9] 设为 Tsp2-JP 组。来自印度-太平洋的 14 个黄色背鳍的高鳍带鱼^[13-14] 为物种鉴定错误, 应是 *T. sp.2*^[11, 17], 故将其 14 个 16S rRNA 单倍型(AB212875-AB212888) 设为 Tsp2-IP 组。来自大西洋西岸、非洲西岸和海南岛三亚外海的高鳍带鱼为同一物种的 3 个地理种群^[17], 将其 10 个 16S rRNA 单倍型(AB197147-AB197149、AB198977-AB198982、JN012087)^[14, 17] 设为 Tl 组。来自台湾岛西岸的 3 个高鳍带鱼 16S rRNA 单倍型(AM779561-AM779563)^[11] 设为 Tl-WT 组, 来自台湾岛南岸的 2 个高鳍带鱼 16S rRNA 单倍型(AM779564-AM779565)^[11] 设为 Tl-ST 组。来自日本和台湾海峡共计 14 个东带鱼 16S rRNA 单倍型(AB197142-AB197146、AM779552-AM779560)^[11, 14] 设为 Tj 组。上述 6 组 49 个带鱼属鱼类的 16S rRNA 单倍型的详细取样信息见表 1。

按照吴仁协等^[17]报道的高鳍带鱼 16S rRNA 基因序列分析方法, 采用 Clustal W 软件^[20] 对上述序列进行比对, 由 MEGA5.0 软件^[21] 计算序列碱基组成及进行变异分析, 基于 Kimura 双参数模型计算序列的遗传距离, 并以 16S rRNA 0.5%/百万年的核苷酸分歧速率^[17] 来推算带鱼属组间(种间)的分歧时间。采用 MEGA5.0 软件^[21] 进行系统进化分析, 以 Kimura 双参数进化模型来构建邻接法(Neighbor-joining, NJ) 和最大似然法(Maximum-likelihood, ML) 的分子系统树, 以自引导法重复检验(Bootstrap test) 1 000 次来检验分子系统树分支处的置信度。

2 结果与分析

2.1 序列特征

所获得的 11 个珠带鱼 16S rRNA 基因序列长度为 540 bp, 共定义了 4 个单倍型(JN165226-JN165229)(表 1)。将本实验获得序列与 GenBank 下载的同源序列比对, 保留共有序列 435 bp 用于合并分析。结果表明, 49 个 16S rRNA 单倍型序列的平均碱基组成分别为 T: 20.5%, C: 28.0%, A: 30.9%, G: 20.6%, A+T 含量(51.4%) 高于 C+G 含量(48.6%), 碱基组成表现出明显的偏倚性。

在 435 个位点中, 变异位点 63 个, 多态简约信息位点 48 个, 单突变位点 15 个。本研究的多态简约信息位点占整段序列的比例(11.03%)明显高于石首鱼科(Sciaenidae, 9.52%)^[22]、笛鲷属(*Lutjanus*, 7.84%)^[23]、六线鱼科(Hexagrammidae, 1.01%)^[24]等鱼类的 16S rRNA 基因同源序列, 表明带鱼属鱼类的 16S rRNA 基因序列多态性较高, 遗传变异信息含量丰富, 适合于种间的系统进化分析。序列存在插入缺失现象, 插入/缺失位点 37 个, 主要集中在 202~430 bp。总体上, 序列中的转换(42 处)明显比颠换(25 处)多, 其中 T-C 转换明显多于 A-G, A-C 和 A-T 颠换多于 C-G 和 T-G。

2.2 序列遗传分化

基于 Kimura 双参数模型的净遗传距离分析显示(表 2), 带鱼属鱼类组间净遗传距离为 0.000~0.061, 组内遗传距离为 0.000~0.011。Tm、Tsp2-JP 和 Tsp2-IP 这 3 个组间的净遗传距离仅为 0.000~0.005, 远低于属内其他种间(Tm、Tl、Tj)的净遗传距离(0.037~0.061), 也明显低于高鳍带鱼地理种群间的遗传距离(0.010~0.016)^[11, 17], 表明这 3 个组应属于同一物种不同地理种群间的变异水平, 即它们同为珠带鱼。Tl-ST 与 Tl-WT 的净遗传距离

高达 0.058, 但 Tl-ST 与 Tm、Tsp2-JP、Tsp2-IP 的净遗传距离仅为 0.002~0.006, 为种内分化水平, 表明 Tl-ST 应为珠带鱼。Tl-WT 与高鳍带鱼(Tl)的净遗传距离(0.013)明显低于属内其他种间的净遗传距离(0.037~0.061), 与高鳍带鱼地理种群间的遗传距离(0.010~0.016)^[11, 17]相当, 二者处于种内分化水平, 因此, Tl-WT 应为高鳍带鱼。珠带鱼(Tm、Tsp2-JP、Tsp2-IP、Tl-ST)与东带鱼(Tj)、高鳍带鱼(Tl、Tl-WT)的净遗传距离分别是 0.049、0.057。

表 2 列出了以 16S rRNA 0.5%/百万年的核苷酸分歧速率推算出的带鱼属鱼类分歧时间。结果表明, 珠带鱼与东带鱼、高鳍带鱼种间的分歧时间分别约为 980 万年、1 140 万年; Tm、Tsp2-JP、Tl-ST 的分歧时间为 0.0~60 万年, 它们与 Tsp2-IP 间的分歧时间为 80~120 万年, 表明珠带鱼的组间分化时间发生在更新世(Pleistocene)晚期。

2.3 分子系统进化关系

以小带鱼(*Eupleurogrammus muticus*)的 16S rRNA 基因同源序列(AY212325)^[25]作为外群, 采用 NJ 法和 ML 法构建了带鱼属鱼类的分子系统树(图 1), 两系统树的拓扑结构一致, 均具有较高的节点支持率。由图 1 可见, 所分析的带鱼属鱼类在属

表 1 本研究所用的带鱼属鱼类样品信息
Tab. 1 The information of *Trichiurus* fishes used in this study

种类 species	采样地点 sampling site	单倍型序列登录号 GenBank access. no.	组名 group	参考文献 reference
珠带鱼 <i>Trichiurus margarites</i>	海南岛西岸(白马井、莺歌海、三亚) Western Hainan Island (Baimajing, Yinggehai, Sanya), China	JN165226-JN165229	Tm	本研究 this study
带鱼未定种 <i>T. sp.2</i>	日本九州岛宫崎、冲绳 Miyazaki, Okinawa, Japan	AB125746, AB20990	Tsp2-JP	[9]
	海南岛东岸 Eastern Hainan Islands	AB212875-AB212878	Tsp2- IP	[13-14]
	印尼雅加达 Jakarta, Indonesia	AB212879-AB212880	Tsp2- IP	[13-14]
	阿曼马斯喀特 Muscat, Oman	AB212881-AB212884	Tsp2- IP	[13-14]
	巴基斯坦卡拉奇 Karachi, Pakistan	AB212885-AB212887	Tsp2- IP	[13-14]
	泰国普吉岛 Phuket Island, Thailand	AB212888	Tsp2- IP	[13-14]
高鳍带鱼 <i>T. lepturus</i>	大西洋西岸 Western Atlantic	AB197147-AB197149	Tl	[14]
	非洲西岸 West African	AB198977-AB198982	Tl	[14]
	海南岛三亚 Sanya, Hainan Island	JN012087	Tl	[17]
	台湾岛西岸 Western Taiwan	AM779561-AM779563	Tl-WT	[11]
	台湾岛南岸 Southern Taiwan	AM779564-AM779565	Tl-ST	[11]
东带鱼 <i>T. japonicus</i>	日本九州岛、本州岛 Kyushu, Honshu, Japan	AB197142-AB197146	Tj	[14]
	台湾海峡台湾岛近岸 Taiwan, Taiwan Strait	AM779552-AM779560	Tj	[11]

表 2 带鱼属不同组鱼类 16S rRNA 基因单倍型之间的净遗传距离(Kimura 双参数模型, 对角线以下)和组间分歧时间(对角线以上)

Tab. 2 Pairwise net genetic distance with the Kimura-2 parameter model (below diagonal) and the divergence times (above diagonal, Unit: 10^6 years before the present) among groups of *Trichiurus* fishes based on the haplotypes of 16S rRNA gene

组名 group	Tm	Tsp2-JP	Tsp2-IP	TI-ST	TI-WT	TI	Tj	组内遗传距离 genetic distance within group
Tm		0.0	0.8×10^6 a	0.4×10^6 a	12.2×10^6 a	12.2×10^6 a	9.8×10^6 a	0.003
Tsp2-JP	0.000		1.0×10^6 a	0.6×10^6 a	12.0×10^6 a	12.2×10^6 a	9.8×10^6 a	0.000
Tsp2-IP	0.004	0.005		1.2×10^6 a	12.0×10^6 a	12.0×10^6 a	10.2×10^6 a	0.009
TI-ST	0.002	0.003	0.006		11.6×10^6 a	12.2×10^6 a	9.2×10^6 a	0.003
TI-WT	0.061	0.060	0.060	0.058		2.6×10^6 av	7.0×10^6 a	0.000
TI	0.061	0.061	0.060	0.061	0.013		7.4×10^6 a	0.011
Tj	0.049	0.049	0.051	0.046	0.035	0.037		0.004

注: Tm、Tsp2-JP、Tsp2-IP、TI-ST、TI-WT、TI、Tj 分组情况见表 1。
Note: the grouping of Tm, Tsp2-JP, Tsp2-IP, TI-ST, TI-WT, TI, Tj is shown in table 1.

内显著构成 3 个独立的进化分支, 其中 Tm、Tsp2-JP、Tsp2-IP、TI-ST 的 16S rRNA 单倍型(表 1)以极高的置信度(NJ 100%, ML 99%)聚为一支单系(即珠带鱼), 该支与东带鱼(Tj)形成姐妹群; 不同地理来源的高鳍带鱼(TI)的 16S rRNA 单倍型(表 1)也以较高的置信度(NJ 97%, ML 86%)聚为一支单系。系统树的置信水平分析显示, 高鳍带鱼单系支中内部节点的支持率普遍较高, 而珠带鱼单系支中内部节点的支持率普遍较低(<70%, 未显示)。

3 讨论

3.1 珠带鱼与带鱼未定种 *T. sp.2* 的分类学地位

带鱼属鱼类分布广泛, 种间外部形态差异小; 其模式种——高鳍带鱼的最初计数特征数据因混有其他种类而非常不准确^[26]; 且后人缺少对不同带鱼模式标本的检视和比较, 以致过去众多学者都认为世界带鱼属仅有 1 种具有形态可变性的高鳍带鱼^[27-28]。

Li^[6]以头骨特征为主、鳍系数据为辅的形态分析思路, 将中国近海带鱼与世界 7 个带鱼命名种的地模标本进行系统的骨骼解剖和外部形态比较, 发现了南海大型带鱼 1 个新种——珠带鱼(*T. margarites* Li, 1992), 该新种以背鳍和胸鳍基部黄色、颅骨上枕骨具一块大而坚硬的骨瘤等特征而与其他带鱼明显区分。经过李春生在日本期间

的初步形态分析, 他认为尽管日本产 *T. sp.2*(sensu Nakabo, 2002)的外部形态与珠带鱼非常相似, 但 *T. sp.2* 的上枕骨骨瘤明显小于珠带鱼, 应视为与珠带鱼不同的物种^[7]。然而, Tokimura 等^[7]研究发现除骨瘤较小外, *T. sp.2* 与珠带鱼的外部形态测量指标数据完全交叉, 二者的栖息分布不重叠, 认为二者间很可能是种以下的分化水平。Nakabo^[8]将个体新鲜时背鳍呈浅黄绿色、口腔底部颜色明亮作为日本产 *T. sp.2* 的形态鉴定特征, 这与珠带鱼的形态鉴定特征大体一致^[6]。

在颅骨形态构造方面, 珠带鱼与琼带鱼(*T. minor* Li, 1992)、东带鱼差异较大, 如前者上枕骨有骨瘤, 后两者均无枕骨瘤; 前者侧筛骨与额骨相接处有骨刺、前部有骨片, 后两者侧筛骨与额骨相接处无骨刺、前部无骨片; 前者额骨骨化程度高(左右愈合), 后两者额骨骨化程度低(左右分开)^[6]。与上述 3 种带鱼颅骨多块骨骼存在显著的种间差异相比, 日本产 *T. sp.2* 与珠带鱼均具有上枕骨骨瘤, 二者仅在骨瘤形状和大小上的这种差异, 显然尚未达到种间差异程度。本研究的遗传距离分析表明, 不同地理来源的 *T. sp.2* 与珠带鱼的遗传距离处于种内水平; 构建的分子系统树也显示, *T. sp.2* 与珠带鱼以极高的置信度聚为单系群, 之后再与其他带鱼形成姐妹群。结合形态学研究资料和分子数据, 笔者认为日本的带鱼未定

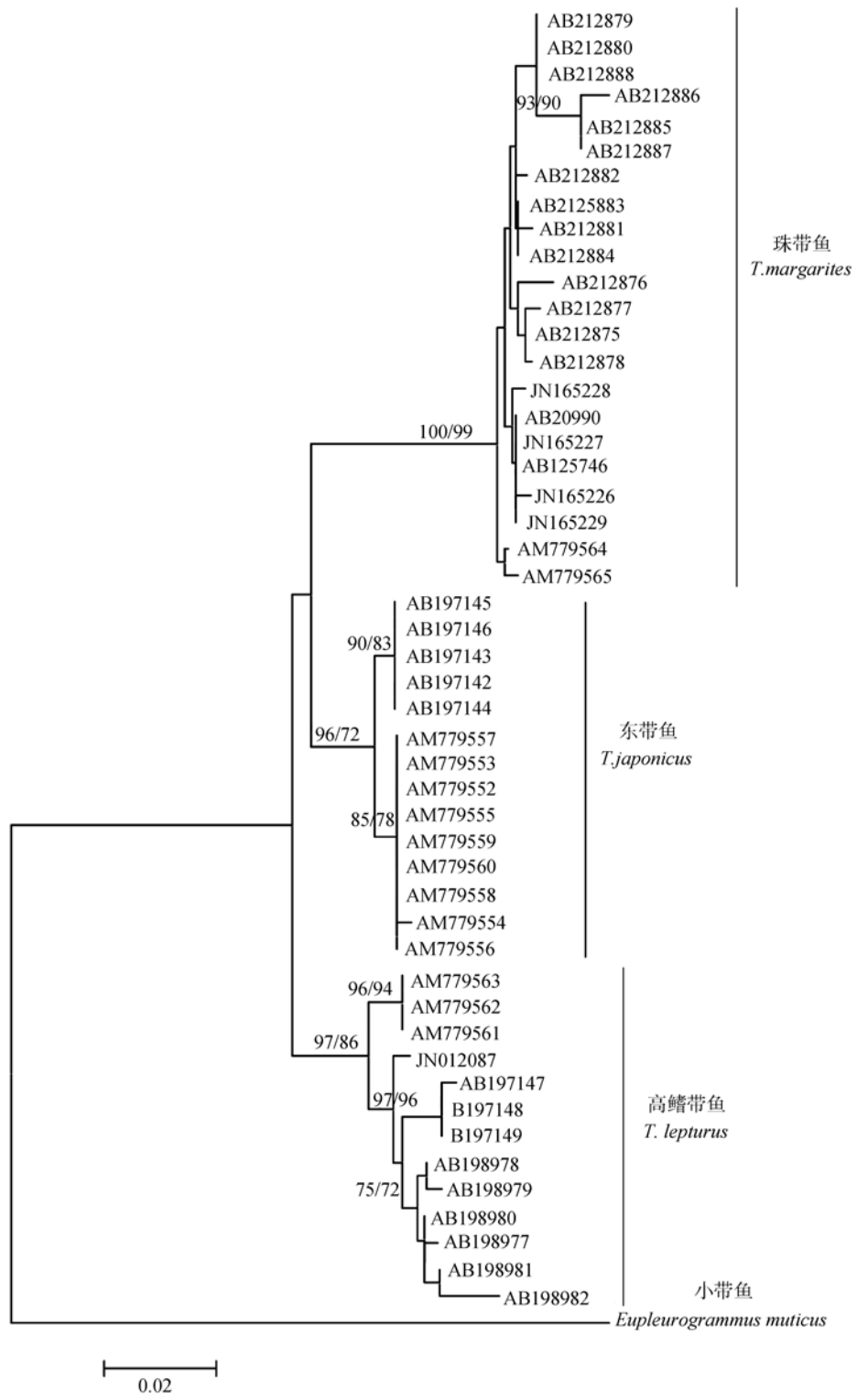


图 1 基于带鱼属鱼类 16S rRNA 基因单倍型序列构建的 NJ、ML 系统树
分支上的数字为 NJ/ML 重复检验 1000 次所得大于 70%的支持率。

Fig. 1 NJ and ML phylogenetic trees of *Trichiurus* fishes based on the haplotypes of 16S rRNA gene
Numbers above the branches indicate bootstrap values based on 1 000 replications for NJ/ML (only values over 70% are shown).

种 *T. sp.2* 与珠带鱼在遗传分化上处于种内分化水平, 在颅骨特征上的差异应属于种内骨骼特征的地理变异, 它们应是同一物种, 即日本产 *T. sp.2* (sensu Nakabo, 2002) 是珠带鱼 (*T. margarites* Li,

1992)。因此,本研究结果从基因水平上支持了 Tokimura等^[7]的观点。

在外部形态上,珠带鱼与高鳍带鱼、东带鱼均为个体长大型,上枕骨嵴顶端均位于眼后缘的后上方,它们同属于高鳍带鱼组合(*T. lepturus complex*)^[11, 26]。该组合带鱼种间形态和体色差异小,种间分布区域存在明显交叉^[11, 25],其种间分类鉴定较为复杂和困难。Hsu 等^[11]在GenBank中将台湾岛西岸和南岸的5个16S rRNA基因单倍型AM779561–AM779565记录为高鳍带鱼(表1)。但在其发表的论文中,则将AM779561–AM779562记录为*T. sp.2*, AM779563–AM779565记录为高鳍带鱼。然而,本研究的结果分析表明,台湾岛西岸的AM779561–AM779563(即Tl-WT)才是高鳍带鱼,而台湾岛南岸的AM779564–AM779565(即Tl-ST)应是珠带鱼。同样,Chakraborty 等^[13]、Chakraborty等^[14]也曾将印度–太平洋的14个黄色背鳍的*T. sp.2*误鉴定为高鳍带鱼^[11, 17]。因此,在采用外部形态特征区分珠带鱼与近缘种时应谨慎对待。

3.2 珠带鱼的地理分布及其起源与演化

Li^[6]报道了珠带鱼向北分布至福建南部崇武近岸,向东至台湾,向南可能达到泰国湾。Nakabo^[8]记录了*T. sp.2*在日本九州岛和冲绳岛西岸、四国岛高知县西部近岸、本州岛和歌山县南部近岸有分布。Chakraborty 等^[13]、Chakraborty 等^[14]在泰国普吉岛、印尼雅加达、巴基斯坦卡拉奇、阿曼马斯喀特近岸等印度洋海域采集到了*T. sp.2*。由此,笔者认为珠带鱼广泛分布于印度–西太平洋海域,而不仅限于Li^[6]所报道的中国南海和东海南部分布。此外,东带鱼分布于东亚大陆架海域(中国及日本沿海)^[6, 8],高鳍带鱼在中国近海分布于南海和东海南部(台湾近岸)^[17]。

本研究显示,上述3种在中国近海同域分布的带鱼在属内各自构成独立的进化分支,它们具有独立种地位,应为独立起源并存在生殖隔离。16S rRNA基因序列分歧计算表明珠带鱼与东带鱼、高鳍带鱼的分化时间分别约为980万年、1140万年前,种间分化发生在中新世(Miocene)中晚期,

这与可能导致种间发生分化的西北太平洋地质历史事件基本吻合。在中新世中期,西北太平洋的高纬度区域(日本周围)温暖化^[29],上述3种带鱼的祖先可能从热带南部水域向北方的日本周围温暖水域扩散,随后全球气候变冷^[29],带鱼祖先随着海流分布可能在大陆架的不同深水区中生存,产生了生殖隔离,从而导致珠带鱼与东带鱼、高鳍带鱼发生了物种分化。随着晚更新世(过去的100万年)一系列的冰期–间冰期变化,因海平面的剧烈波动而导致西北太平洋海洋鱼类普遍发生群体扩张^[30–32],珠带鱼可能从起源中心南海逐渐向外扩张,一支向东北的东海南部和日本西南部沿岸扩展,另一支向西南的印度洋扩散。这一起源和演化过程与珠带鱼的物种分化、组间分化时间以及地理分布现状相对应。

高鳍带鱼单系支中内部节点的支持率普遍较高,这与其地理种群间存在显著的遗传分化相对应^[17]。而珠带鱼单系支中内部节点普遍较低的支持率,则表明不同地理来源的珠带鱼彼此间的遗传分化程度不高,因而难以对其地理种群进行明确划分,这可能与16S rRNA基因本身较为保守、进化速率低等特性^[33]以及珠带鱼组间分化时间较晚(0.0~120万年)有关。因此,在今后的研究中,应采用分辨能力更高的其他分子标记如线粒体控制区、微卫星DNA、扩增片段长度多态性(AFLP)等综合分析珠带鱼的种群遗传结构。

参考文献:

- [1] Nakamura I, Parin N V. FAO species catalogue. Vol 15. Snake mackerels and cutlassfishes of the world (Families Gempylidae and Trichiuridae)[M]. Rome: FAO Fish Synop, 1993: 61–107.
- [2] 林新濯, 沈晓民. 东、黄海带鱼分种问题的初步研究[J]. 水产学报, 1986, 10(4): 339–350.
- [3] 成庆泰, 郑葆珊. 中国鱼类系统检索[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 415–416.
- [4] 林新濯, 王福刚, 潘家模, 等. 中国近海带鱼 *Trichiurus haumela* (Forsskal)种族的调查[J]. 水产学报, 1965, 2(4): 11–23.
- [5] 罗秉征, 卢继武, 黄颂芳. 中国近海带鱼耳石生长的地理变异与地理种群的初步探讨[C]//海洋与湖沼论文集, 北京: 科学出版社, 1981: 181–194.

- [6] Li C S. Hairtail fishes from Chinese coastal waters (Trichiuridae)[J]. Mar Sci, 1992, 4(3): 212–219.
- [7] Tokimura M, Yamada U, Trie T. Comments on taxonomy and distributions of the species of *Trichiurus* in the East China and Yellow Seas and adjacent waters[J]. Seikaiku Suisan Kenkyusho News, 1995, 80: 12–14.
- [8] Nakabo T. Fishes of Japan with pictorial keys to the species[M]. Tokyo: Tokai University Press, 2002: 1345.
- [9] Chakraborty A, Aranishi F, Iwantsuki Y. Genteic differences among three species of the genus *Trichiurus* (Perciformes: Trichiuridae) based on mitochondrial DNA analysis[J]. Ichthyol Res, 2006, 50(3): 270–275.
- [10] 丁少雄, 王颖汇, 王军, 等. 基于 16S rDNA 部分序列探讨中国近海 30 种石斑鱼类的分子系统进化关系[J]. 动物学报, 2006, 52(3): 504–513.
- [11] Hsu K C, Shih N T, Ni I H, et al. Speciation and population structure of three *Trichiurus* species based on mitochondrial DNA[J]. Zool Stud, 2009, 48(6): 851–865.
- [12] 柳淑芳, 陈亮亮, 戴芳群, 等. 基于线粒体 COI 基因的 DNA 条形码在石首鱼科(Sciaenidae)鱼类系统分类中的应用[J]. 海洋与湖沼, 2010, 4(2): 223–232.
- [13] Chakraborty A, Aranishi F, Iwantsuki Y. Genteic differentiation of *Trichiurus japonicus* and *T. lepturus* (Perciformes: Trichiuridae) based on mitochondrial DNA analysis[J]. Ichthyol Res, 2006, 45(3): 419–427.
- [14] Chakraborty A, Iwantsuki Y. Genteic variation at mitochondrial 16S rRNA gene among *Trichiurus lepturus* (Perciformes: Trichiuridae) from various localities: preliminary evidence of a new species from West coast of Africa[J]. Hydrobiologia, 2006, 563: 501–513.
- [15] Sambrook J, Russell D W. Molecular cloning: a laboratory manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 1–372.
- [16] Palumbi S. Nucleic acids II: the polymerase chain reaction[M]. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996: 205–247.
- [17] 吴仁协, 郭刘军, 刘静. 高鳍带鱼遗传变异及与近缘种间的系统进化关系[J]. 动物分类学报, 2011, 36(3): 648–655.
- [18] Burland T G. DNASTAR's lasergene sequence analysis software[J]. Methods Mol Biol, 2000, 132: 71–91.
- [19] Rozas J, Sanchez-Delbarrio J C, Messeguer X, et al. DnaSP, DNA polymorphism analysis by the coalescent and other methods[J]. Bioinformatics, 2003, 19(8): 2496–2497.
- [20] Thompson J D, Gibson T J, Plewnia F. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools[J]. Nucl Acid Res, 1997, 25(24): 4876–4882.
- [21] Tamura K, Peterson D, Peterson N, et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. Mole Biol Evol, 2011, 28(10): 2731–2739.
- [22] 蒙子宁, 庄志猛, 丁少雄, 等. 中国近海 8 种石首鱼类的线粒体 16S rRNA 基因序列变异及其分子系统进化[J]. 自然科学进展, 2004, 14(5): 514–521.
- [23] 刘楚吾, 徐田军, 刘丽, 等. 笛鲷属(*Lutjanus*)鱼类线粒体 16S rRNA 基因序列比较及系统学分析[J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(5): 563–571.
- [24] 任桂静, 刘奇, 高天翔, 等. 基于线粒体 DNA 序列探讨斑头鱼分类地位[J]. 动物分类学报, 2011, 36(2): 332–340.
- [25] Meng Z N, Zhuang Z M, Jin X S, et al. Analysis of RAPD and mitochondrial 16S rRNA gene sequences from *Trichiurus lepturus* and *Eupleurogrammus muticus* in the Yellow Sea[J]. Prog Nat Sci, 2004, 14(2): 125–131.
- [26] Burhanuddin A I, Iwatsuki Y, Yoshino T, et al. Small and valid species of *Trichiurus brevis* Wang and You, 1992 and *T. russelli* Dutt and Thankam, 1966, defined as the “*T. russelli* complex” (Perciformes: Trichiuridae)[J]. Ichthyol Res, 2002, 49: 211–223.
- [27] Tucker D W. Studies on the trichiroid fishes a preliminary revision of the family Trichiuridae[J]. Bull Brit Mus Nat Hist Zool, 1956, 4: 73–103.
- [28] James P S B R. The ribbon-Fishes of the family Trichiuridae of India[M]. Mandapam Camp India: Marine Biological Association of India, 1967: 1–226.
- [29] Ennyu A. Middle Miocene climate evolution in the Pacific realm[D]. Pennsylvania State Univ, University Park PA, 2003: 1–219.
- [30] Liu J X, Gao T X, Yokogawa K, et al. Differential population structuring and demographic history of two closely related fish species, Japanese sea bass (*Lateolabrax japonicus*) and spotted sea bass (*Lateolabrax maculatus*) in Northwestern Pacific[J]. Mol Phylogenet Evol, 2006, 39: 799–811.
- [31] Liu J X, Gao T X, Wu S F, et al. Pleistocene isolation in the marginal ocean basins and limited dispersal in a marine fish, *Chelon haematocheilus* (Temminck & Schlegel, 1845)[J]. Mol Ecol, 2007, 16: 275–288.
- [32] 吴仁协, 柳淑芳, 庄志猛, 等. 基于线粒体 Cyt b 基因的黄海、东海小黄鱼(*Larimichthys polyactis*)群体遗传结构[M]. 自然科学进展, 2009, 19(9): 924–930.
- [33] Orti G, Petry P, Porto J I R, et al. Patterns of nucleotide change in mitochondrial ribosomal RNA genes and the phylogeny of piranhas[J]. Mol Evol, 1996, 42: 169–182.

Molecular phylogenetic relationship between *Trichiurus margarites* Li, 1992 and *Trichiurus* sp.2 (sensu Nakabo, 2002) (Perciformes: Trichiuridae) based on mitochondrial 16S rRNA sequence analysis

GUO Liujun¹, WU Renxie¹, LIU Jing²

1. College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;

2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China

Abstract: The taxonomic identification of the genus *Trichiurus* (Trichiuridae) has historically been challenging because of the morphological similarities between the species. As a result, *Trichiurus lepturus* Linnaeus, 1758 was recognized as a monotypic cosmopolitan species of *Trichiurus* prior to 1990. In 1992, Li proposed the new species *T. margarites* Li, 1992, based on morphological differences in the skull patterns and dorsal fin coloration, i.e. supraoccipital bone with a hard knob and yellow dorsal fin respectively. Subsequently, Yamada et al. described a species of *Trichiurus* with a yellow dorsal fin from the Ryukyu Islands and East China Sea coast of Kyushu, Japan. This species is very similar to *T. margarites*, but shows some variation in the size of a pair of knobs on the supraoccipital crest. Accordingly, the yellow dorsal fin species of *Trichiurus* from Japan was provisionally called *Trichiurus* sp. 2 by Nakabo. There remains no molecular evidence that elucidates the genetic differences between *T. margarites* and *T. sp. 2* (sensu Nakabo, 2002). Thus, the phylogenetic relationship and taxonomic status of these two species remain unresolved.

In this study we examined the mitochondrial 16S rRNA gene sequence from 11 *T. margarites* individuals collected from the coast of western Hainan Island (Baimajing, Yinggehai and Sanya), South China Sea, China which is the type locality of *T. margarites*. The 16S rRNA genes were amplified using PCR techniques. Homologous sequences from *T. sp. 2* and closely-related species from previous studies were also included in the comparative analysis. Genetic information indexes, including base composition, sequence variation, and Kimura-2 parameter net genetic distance were examined. Phylogenetic analysis using neighbor-joining (NJ) and maximum-likelihood (ML) methods were conducted using *Eupleurogrammus muticus* as the outgroup.

There was evidence of insertion or deletion of base pairs in the 435 bp sequence alignment, with 63 variable sites, 48 parsimony informative sites, and 15 singleton sites. The net genetic distances between *T. margarites* (from western Hainan Island) and *T. sp. 2* (from Japan, eastern Hainan Island, and Indian Ocean) ranged from 0.000 to 0.006. These values were much lower than those found for interspecific 16S rRNA comparisons in some species of *Trichiurus* (0.037–0.061), and for intraspecific comparisons between populations of *T. lepturus* (0.010–0.016). Moreover, the haplotypes of *T. margarites* and *T. sp. 2* did not form reciprocal monophyletic clades in the phylogenetic trees (NJ, ML), and the close relationship of the haplotypes of these two species was supported by high confidence levels (NJ 100%, ML 99%). These results indicated that the genetic distance between *T. margarites* and *T. sp. 2* was at the intraspecific level, and the species *T. sp. 2* (sensu Nakabo, 2002) from Japan should be classified as *T. margarites* Li, 1992. It has been suggested that *T. margarites* is widely distributed from the Indian Ocean to the western Pacific, and not merely limited to the South China Sea, Taiwan Strait, and Taiwan coastal waters. Based on coalescent estimates of divergence times among species, the origin and evolution of *T. margarites* are primarily discussed in this study.

Key words: *Trichiurus margarites* Li, 1992; *Trichiurus* sp.2; 16S rRNA; molecular phylogeny; taxonomic status

Corresponding author: WU Renxie. E-mail: wurx@gdou.edu.cn