

DOI: 10.12264/JFSC2020-0558

基于 Cyt *b* 及 AFLP 标记探讨仿石鲈科及相关科属分子系统进化关系

陈铭^{1, 2, 3, 4}, 范蔓桦¹, 张癸新¹, 李子博¹, 李清清^{1, 2, 3, 4}, 李江涛^{1, 2, 3, 4}, 周萌^{1, 2, 3, 4}, 梁日深^{1, 2, 3, 4}, 林鑫^{1, 2, 3, 4}

1. 仲恺农业工程学院动物科技学院, 广东 广州 510225;
2. 广东省水环境与水产品安全工程技术研究中心, 广东 广州 510225;
3. 广东省水禽健康养殖重点实验室, 广东 广州 510225;
4. 广州市水产病害与水禽养殖重点实验室, 广东 广州 510225

摘要: 为从分子水平澄清我国仿石鲈科(Haemulidae)鱼类分类争议, 研究测定分析了仿石鲈科及其相关科属共 66 种鱼类的线粒体 DNA 细胞色素 *b* (Cyt *b*) 部分序列, 结合 AFLP 标记信息, 共同探讨仿石鲈科及相关争议科属系统分类关系。结果表明, 在 Cyt *b* 基因上, 66 种鱼类一致序列为 729 bp, 编码 243 个氨基酸; AFLP 图谱中, 6 对引物组合共得到 669 条清晰条带, 多态性条带 669 条, 多态性比率 100%。基于 Cyt *b* 基因利用最大似然法与 AFLP 标记基于 UPGMA 聚类法构建的系统进化树大致相同, 进化树上, (1)仿石鲈科鱼类主要形成石鲈亚科(Haemulinae)与胡椒鲷亚科(Plectorhynchinae)两大分支, 石鲈属(*Pomadasys*)、仿石鲈属(*Haemulon*)、异孔石鲈属(*Anisotremus*)等 7 个属聚为石鲈亚科分支, 胡椒鲷属(*Plectorhinchus*)、少棘胡椒鲷属(*Diagramma*)与矾鲈属(*Parapristipoma*) 3 个属聚为胡椒鲷亚科分支。(2)髭鲷属(*Haplogenyys*)与眶棘鲈属(*Scolopsis*)没有与仿石鲈科聚在一起, 髭鲷属独自形成一支, 眶棘鲈属与金线鱼科(*Nemipteridae*)聚为一支。(3)鲷科(*Teraponidae*)的种类也没有与仿石鲈科鱼类相聚, 鲷科与舵鱼科(*Kyphosidae*)、石鲷科(*Oplegnathidae*)存在更近的亲缘关系。对于仿石鲈科及相关科属的分类争议, 研究支持仿石鲈科分为石鲈亚科与胡椒鲷亚科两个亚科, 以及鲷科、眶棘鲈属、髭鲷属不应该归为仿石鲈科的观点。

关键词: 仿石鲈科; 系统分类; AFLP; 细胞色素 *b*

中图分类号: S917; Q953

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2021)07-0832-13

仿石鲈科(Haemulidae)隶属鲈形目(Perciformes), 鲈亚目(Percoidae), 广泛分布于热带、亚热带沿海及岛礁海域^[1], 是重要的海洋经济鱼类。形态上, 中国仿石鲈科记载有 4~7 属约 30 种^[2-7], 但其内部种属归类问题还存在明显争议。目前大部分资料认为我国仿石鲈科包含石鲈属(*Pomadasys*)、胡椒鲷属(*Plectorhinchus*)、矾鲈属(*Parapristipoma*)以及髭

鲷属(*Haplogenyys*)4 个属。有资料将眶棘鲈属(*Scolopsis*)也归为仿石鲈科^[2-3], 而眶棘鲈属在其他资料却隶属于眶棘鲈科(*Scolopsidae*)^[4, 6-7]或金线鱼科(*Nemipteridae*)^[1, 5, 8]。另外, 针对目前归类于仿石鲈科的髭鲷属, 有资料认为其与仿石鲈科关系较远, 应该从仿石鲈科里面独立出来, 或升级为髭鲷科(*Haplogenyidae*)^[9-10]。此外, 还有个别资料将鲷科(*Teraponidae*)的种类也归为仿石鲈

收稿日期: 2020-12-30; 修订日期: 2021-02-01.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31802300); 广东省自然科学基金项目(2018A0303130104); 广东省科技计划项目(2017A040403060); 广东省重点领域研发计划项目(2019B020215001).

作者简介: 陈铭(1998-), 硕士研究生, 研究方向为水产动物健康养殖. E-mail: 1095454329@qq.com

通信作者: 梁日深, 副教授, 研究方向为水产动物种质资源分析及系统分类. E-mail: cheetahliang@126.com

林鑫, 教授, 研究方向为水产动物种质分析与健康养殖. E-mail: linli@zhku.edu.cn

科, 因其拥有与仿石鲈科鱼类相似的条纹^[11]。至于上述归类是否正确, 基于形态分类方法还不足以清楚区分, 各种属分类争议悬而未决, 需进一步结合分子生物学技术, 利用合适的分子标记进行系统分类研究, 澄清相关分类争议问题。

线粒体 DNA 细胞色素 b (Cytochrome b, Cyt b) 基因结构简单, 进化速率适中, 严格母系遗传, 是可信度较高的分子标记, 广泛应用于鱼类种、属系统发育关系的研究^[12-14]。Chen 等^[12]利用 Cyt b 序列分析 20 种金线鲃属(*Sinocyclocheilus*)鱼类分子系统进化关系, 揭示旧城金线鲃(*Sinocyclocheilus juichengensis*)与邱北金线(*Sinocyclocheilus qiubeinsis*)聚为同一个分支, 认为两者应该是同种异名。赵桂研等^[13]基于 Cyt b 基因分析了我国 8 种高原鳅属(*Triplophysa*)鱼类种群遗传多样性与系统发育关系, 揭示 8 种高原鳅种间存在着高度遗传分化。扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)技术, 是 Vos 等^[15]开发的一种 DNA 指纹技术, 其综合了 RFLP 和 RAPD 两种标记技术的优点, 具有多态性强、重复性好的特点。AFLP 作为一种理想、有效的核 DNA 分子标记, 在物种分类、遗传多样性评估、遗传图谱构建、品种家系分析等研究方面广泛应用^[16-18]。Han 等^[17]利用 AFLP 技术对 *Lateolabrax maculatus* 和 *Lateolabrax japonicus* 进行物种遗传分歧度及种群遗传结构分析, 确定两种鲈鱼存在明显的遗传分化。安丹丹等^[18]基于 AFLP 技术分析了乌江四川裂腹鱼(*Schizothorax kolzovi*)种群遗传结构, 显示乌江四川裂腹鱼种群目前还具有较丰富的遗传多样性。本研究利用 Cyt b 基因结合 AFLP 标记技术, 对仿石鲈科及其相关争议科属进行分子系统进化关系分析, 旨在从分子水平揭示各种、属间系统分类关系, 澄清仿石鲈科鱼类分类争议问题。

1 材料与方法

1.1 材料来源

实验样品主要在中国广东、海南等沿海省份野外采集, 另有部分材料由国外研究单位提供, 主要采自于西印度洋、南太平洋、东太平洋等海区。

采集标本根据《中国鱼类系统检索》^[4]、《台湾鱼类志》^[5]、《Fishes of the World》^[1]、世界鱼类数据库 FishBase^[19]等分类资料 and 平台进行分类鉴定, 取肌肉或鳍条于 95%乙醇保存, 用于后续总基因组 DNA 的提取。最后共采集到仿石鲈科(Haemulidae)、金线鱼科(Nemipteridae)、眶棘鲈属(*Scolopsis*)、鲷科(Teraponidae)以及笛鲷科(Lutjanidae)、裸颊鲷科(Lethrinidae)、鲈科(Serranidae)等相关科属鱼类标本 64 种。另外从 GenBank 上下载了舵鱼科(Kyphosidae)的低鳍舵鱼(*Kyphosus vaigiensis*)、石鲷科(Oplegnathidae)的条石鲷(*Oplegnathus fasciatus*)两种鱼类以及作为外类群的鲤科(Cyprinidae)中鲤(*Cyprinus carpio*)和鲫(*Carassius auratus*)共同分析, 标本种类与来源见表 1。

1.2 基因组 DNA 的提取

取约 0.1 g 样品组织, 利用海洋动物总基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化), 根据说明书操作提取样品基因组 DNA, 80 μ L 灭菌水进行溶解。利用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量, -20°C 存放备用。

1.3 Cyt b 基因扩增及与测序

参考文献[20], 用于扩增 Cyt b 基因片段的上下游引物分别为: 5'-TGGCAAGCCTACGCAAAAC-3'及 5'-TATTCGCGCCGATTCAGGTAA-3'。PCR 反应总体积为 50 μ L, 其中 10 $\times$ buffer 缓冲液 5 μ L, dNTPs (各 2.5 mmol/L) 2 μ L, 上下游引物各 1 μ L, Ex Taq 酶(1 U/ μ L) 2 μ L。扩增条件为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 50~55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 再延伸 10 min。PCR 产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测, 选取扩增成功的样品用 PCR 产物纯化试剂盒(天根生化)纯化回收, 送至天一辉远生物技术有限公司进行序列测定。

1.4 AFLP 反应

AFLP 实验分析选择仿石鲈科(石鲈亚科及胡椒鲷亚科)、鲷科、金线鱼科、髭鲷属、眶棘鲈属等存在分类争议科属 50 个代表性种类进行分析, 其中石鲈亚科 19 种, 胡椒鲷亚科 13 种, 鲷科 5 种, 金线鱼科 8 种, 眶棘鲈属 2 种, 髭鲷属 3 种。

表 1 实验材料的种类和来源
Tab. 1 Species and sources of experimental samples

科/属 families/genera	物种 species	拉丁名 Latin name	样品来源 source of samples
仿石鲈科 Haemulidae			
髯鲷属 <i>Hapalogenys</i>	斜带髯鲷	<i>Hapalogenys nitens</i>	中国广东
	横带髯鲷	<i>Hapalogenys mucronatus</i>	中国广东
	纵带髯鲷	<i>Hapalogenys kishinouyei</i>	中国广东
少棘胡椒鲷属 <i>Diagramma</i>	南非少棘胡椒鲷	<i>Diagramma centurio</i>	塞舌尔马埃岛
	少棘胡椒鲷	<i>Diagramma pictum</i>	中国广东
胡椒鲷属 <i>Plectorhinchus</i>	斑胡椒鲷	<i>Plectorhinchus chaetodonoides</i>	中国海南
	花尾胡椒鲷	<i>Plectorhinchus cinctus</i>	中国广东
	四带胡椒鲷	<i>Plectorhinchus diagrammus</i>	中国海南
	密点胡椒鲷	<i>Plectorhinchus gaterinus</i>	坦桑尼亚马普托
	黑胡椒鲷	<i>Plectorhinchus gibbosus</i>	塞舌尔马埃岛
	斜纹胡椒鲷	<i>Plectorhinchus lineatus</i>	中国海南
	东方胡椒鲷	<i>Plectorhinchus orientalis</i>	中国海南
	暗点胡椒鲷	<i>Plectorhinchus picus</i>	中国海南
	肖氏胡椒鲷	<i>Plectorhinchus schotaf</i>	莫桑比克马普托
	红唇胡椒鲷	<i>Plectorhinchus sordidus</i>	肯尼亚迪亚尼海滩
	条纹胡椒鲷	<i>Plectorhinchus vittatus</i>	塞舌尔马埃岛
	三线矶鲈	<i>Parapristipoma trilineatum</i>	中国广东
石鲈属 <i>Pomadasys</i>	银石鲈	<i>Pomadasys argenteus</i>	新喀里多尼亚努美阿
	赤笔石鲈	<i>Pomadasys furcatus</i>	莫桑比克马普托
	断斑石鲈	<i>Pomadasys hasta</i>	中国广东
	大棘石鲈	<i>Pomadasys macracanthus</i>	萨尔瓦多拉乌尼翁
	大斑石鲈	<i>Pomadasys maculates</i>	中国广东
	黄鳍石鲈	<i>Pomadasys olivaceus</i>	南非东开普省
	佩氏石鲈	<i>Pomadasys peroteti</i>	安哥拉
	纵带石鲈	<i>Pomadasys striatum</i>	南非夸祖鲁纳塔尔
	黄仿石鲈	<i>Haemulon flavolineatum</i>	百慕大圣乔治斯岛
	大口仿石鲈	<i>Haemulon macrostomum</i>	伯利兹 Carrie Bow Cay
仿石鲈属 <i>Haemulon</i>	普氏仿石鲈	<i>Haemulon plumieri</i>	伯利兹 Carrie Bow Cay
	蓝仿石鲈	<i>Haemulon sciurus</i>	伯利兹 Carrie Bow Cay
	小仿石鲈属 <i>Haemulopsis</i>	<i>Haemulopsis leuciscus</i>	萨尔瓦多拉乌尼翁
异孔石鲈属 <i>Anisotremus</i>	黑异孔石鲈	<i>Anisotremus surinamensis</i>	波多黎各 Playa Sardiner
	枝异孔石鲈	<i>Anisotremus virginicus</i>	伯利兹 Carrie Bow Cay
	八带石鲈	<i>Conodon nobilis</i>	美国得克萨斯州
纹谐鱼属 <i>Inermia</i>	纹谐鱼	<i>Inermia vittata</i>	伯利兹 Carrie Bow Cay
锯鳃石鲈属 <i>Orthopristis</i>	金鳍锯鳃石鲈	<i>Orthopristis chrysoptera</i>	美国南卡罗来纳州
异石鲈属 <i>Xenistius</i>	北美异石鲈	<i>Xenistius californiensis</i>	美国加利福尼亚州
眶棘鲈科 Scolopsidae			
眶棘鲈属 <i>Scolopsis</i>	二线眶棘鲈	<i>Scolopsis bilineatus</i>	中国海南
	带尾眶棘鲈	<i>Scolopsis frenatus</i>	塞舌尔马埃岛
	伏氏眶棘鲈	<i>Scolopsis vosmeri</i>	中国广东
金线鱼科 Nemipteridae			
金线鱼属 <i>Nemipterus</i>	印度洋金线鱼	<i>Nemipterus bipunctatus</i>	莫桑比克
	红金线鱼	<i>Nemipterus furcosus</i>	新喀里多尼亚努美阿

(待续 to be continued)

(续表 1 Tab. 1 continued)			
科/属 families/genera	物种 species	拉丁名 Latin name	样品来源 source of samples
锥齿鲷属 <i>Pentapodus</i>	苏门答腊金线鱼	<i>Nemipterus mesoprion</i>	中国海南
	姬金线鱼	<i>Nemipterus zysron</i>	中国海南
	日本金线鱼	<i>Nemipterus japonicus</i>	中国广东
	黄带锥齿鲷	<i>Pentapodus aureofasciatus</i>	新喀里多尼亚努美阿
	长崎锥齿鲷	<i>Pentapodus nagasakiensis</i>	新喀里多尼亚努美阿
副眶棘鲈属 <i>Parascolopsis</i>	宽带副眶棘鲈	<i>Parascolopsis eriomma</i>	莫桑比克马普托
鲷科 Teraponidae			
鲷属 <i>Terapon</i>	鲷	<i>Terapon theraps</i>	中国广东
	细鳞鲷	<i>Terapon jarbua</i>	中国广东
尖吻鲷属 <i>Rhynchopelates</i>	尖吻鲷	<i>Rhynchopelates oxyrhynchus</i>	中国广东
列牙鲷属 <i>Pelates</i>	四线列牙鲷	<i>Pelates quadrilineatus</i>	中国广东
叉牙鲷属 <i>Helotes</i>	叉牙鲷	<i>Helotes sexlineatus</i>	中国广东
鲈科 Carangidae	丽叶鲈	<i>Alepes kleinii</i>	中国广东
	金带细鲈	<i>Selaroides leptolepis</i>	中国广东
裸颊鲷科 Lethrinidae	红鳍裸颊鲷	<i>Lethrinus haematopterus</i>	中国广东
	星斑裸颊鲷	<i>Lethrinus nebulosus</i>	中国广东
笛鲷科 Lutjanidae	紫红笛鲷	<i>Lutjanus argentimaculatus</i>	中国广东
	勒氏笛鲷	<i>Lutjanus russellii</i>	中国广东
石首鱼科 Sciaenidae	黄姑鱼	<i>Nibea albiflora</i>	中国广东
	白姑鱼	<i>Pennahia argentata</i>	中国广东
鲷科 Serranidae	横纹九棘鲈	<i>Cephalopholis boenak</i>	中国广东
	尾纹九棘鲈	<i>Cephalopholis urodeta</i>	中国海南
	青石斑鱼	<i>Epinephelus awoara</i>	中国广东
	斜带石斑鱼	<i>Epinephelus coioides</i>	中国广东
舵鱼科 Kyphosidae	低鳍舵鱼	<i>Kyphosus vaigiensis</i>	GenBank
石鲷科 Oplegnathidae	条石鲷	<i>Oplegnathus fasciatus</i>	GenBank
外类群 outgroup			
鲤科 Cyprinidae	鲫	<i>Carassius auratus</i>	GenBank
	鲤	<i>Cyprinus carpio</i>	GenBank

AFLP 实验流程参照 Vos 等^[15]方法操作, 稍加变动, 主要包括基因组 DNA 双酶切(*EcoR* I 和 *Mse* I), 接头连接, 连接产物预扩增及选择性扩增。通过前期引物筛选实验, 从 15 对引物中选择 6 对多态性效果较丰富的选择性扩增引物组合:

EcoR I-TCC/*Mse* I-CTG、*EcoR* I-TCT/*Mse* I-CTG、*EcoR* I-TCC/*Mse* I-TCC、*EcoR* I-TCG/*Mse* I-CTG、*EcoR* I-TCT/*Mse* I-TCC、*EcoR* I-TCT/*Mse* I-CCT 用于 AFLP 图谱分析。具体的接头和引物序列见表 2。

表 2 AFLP 标记引物和接头序列

Tab. 2 Sequences of adaptors and primers for AFLP marker

接头与引物 adaptors and primers	序列(5'-3') sequences (5'-3')	选择性引物 selective primers	序列(5'-3') sequences (5'-3')
<i>EcoR</i> I 接头	CTCGTAGACTGCGTACC	E-TCC	GACTGCGTACCAATTCTCC
	AATTGGTACGCAGTCTAC	E-TCG	GACTGCGTACCAATTCTCG
<i>Mse</i> I 接头	GACGATGAGTCCTGAG	E-TCT	GACTGCGTACCAATTCTCT
	TACTCAGGACTCAT	M-CCT	GATGAGTCCTGAGTAACCT
E-primer	GACTGCGTACCAATTC	M-CTG	GATGAGTCCTGAGTAACCTG
M-primer	GATGAGTCCTGAGTAA	M-TCC	GATGAGTCCTGAGTAATCC

1.4.1 酶切反应及接头连接 酶切反应体积为 20 μL , 包括 10 $\times$ 酶切反应缓冲液 4 μL , *EcoR* I (10 U/ μL)与 *Mse* I (10 U/ μL)各 0.4 μL , 模板 DNA 约 200 ng, 补 ddH₂O 至 20 μL 。37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 3 h, 再 65 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 3 h, 酶切产物直接用于后续连接反应。连接体系包括: 10 $\times$ T4 Buffer 2 μL ; *EcoR* I 接头 (50 $\mu\text{mol/L}$)1 μL ; *Mse* I 接头(50 $\mu\text{mol/L}$) 1 μL , T4 连接酶 0.4 μL , 酶切产物 10 μL , 补 ddH₂O 至 20 μL , 20 $^{\circ}\text{C}$ 连接过夜。

1.4.2 预扩增 预扩增反应体积为 20 μL , 包括 10 $\times$ Buffer 缓冲液 2 μL , dNTPs (各 2.5 mmol/L) 1 μL , Taq 酶(5 U/ μL) 0.5 μL , 上下游引物各 0.5 μL , 连接模板 2 μL 。反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 26 个循环。预扩增产物稀释 20 倍作为后续选择性扩增模板。

1.4.3 选择性扩增 选择性扩增反应总体积 20 μL , 包括 10 $\times$ Buffer 缓冲液 2 μL , dNTPs (各 2.5 mmol/L) 1 μL , 5 U/ μL Taq 酶 0.5 μL , 上下游引物各 1 μL , 预扩增产物模板 2 μL 。反应程序为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 35 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 退火 35 s (每次循环降低 0.7 $^{\circ}\text{C}$), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 12 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 23 个循环。扩增产物于 5%变性聚丙烯酰胺凝胶进行分离和检测。

1.5 数据分析

1.5.1 Cyt b 序列分析 测序所得 Cyt b 序列采用 NCBI 的 Blast 工具进行相似性检索, 验证序列的正确性。与 GenBank 下载的序列一起利用 Clustal W 排列比对, 去掉两端冗余, 得到 729 bp 一致序列。利用 MEGA 7.0 分析序列碱基组成, 位点数目, 遗传距离等数据。以鲤(*C. carpio*)和鲫(*C. auratus*)作为外类群, 利用 ModelTest 2.1.5 进行最佳进化模型预测, RAxML 8.0 基于最大似然法 (maximum likelihood, ML)构建分子系统进化树。进化树分支置信度采用 1000 次重复抽样分析 (bootstrap analysis)进行检验。

1.5.2 AFLP 图谱分析 选取聚丙烯酰胺凝胶电泳平板上清晰可辨的电泳条带, 以“1”和“0”分别记录条带的有无。在相同片段位置, 有条带的记为“1”, 无带记为“0”。制作 0/1 矩阵, 将 0/1 矩阵

输入 POPGENE 软件分析图谱遗传多态性, 并用 NTSYSpc2.10 进行 UPGMA 聚类分析。

2 结果与分析

2.1 Cyt b 基因序列特征

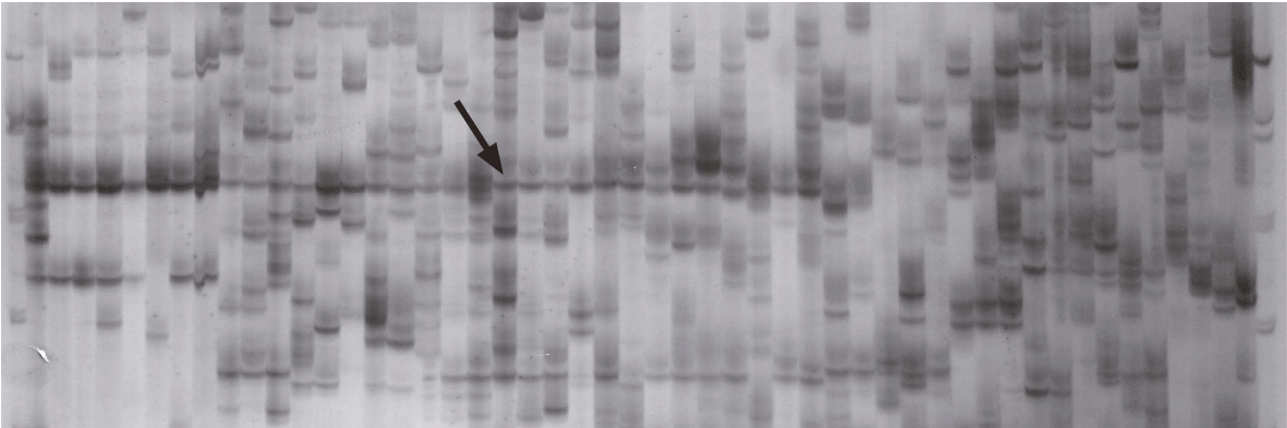
Cyt b 序列经排列比对, 去掉两端冗余得到一致序列 729 bp, 编码 243 个氨基酸。序列中 T、C、A、G 碱基平均含量分别为 29.0%、31.8%、23.3%、15.9%, A+T(52.3%)含量显著高于 G+C(47.7%)。序列密码子第一位中, 4 种碱基含量差异不大, 分布比较平均; 密码子第二位, T-2 含量明显高于其他 3 种, 占 40.0%, G-2 含量最低, 为 14.2%; 密码子第三位 C-3 含量最高, 占 46.6%, G-3 含量最低, 为 5.3%, 表现出明显反 G 偏倚。此外, 在长度为 729 bp 序列中, 除去外类群, 共有保守位点 360 个, 变异位点 369 个, 简约信息位点为 339 个。

2.2 AFLP 的多态性分析结果

利用筛选的 6 对引物组合, 从仿石鲈科及其相关科属 50 个代表性样品中, 在 100~700 bp 范围内, 检出 669 条清晰条带 (图 1)。经统计分析, 多态性条带 669 条, 多态性比率为 100%, 显示该类群不同物种分子水平信息差异较大。其中 E-TCT/M-TCC 引物组合产生的带最多, 为 128 条, E-TCC/M-CTG 引物组合产生的带最少, 为 99 条, 平均每对引物产生 111 条带, 多态性比率均为 100%(表 3)。不同物种所得的条带信息差异显著, 可依此相互区分。而隶属于同一科、属的种类也存在共同的条带信息, 如 E-TCT/M-CTG 引物组合扩增结果, 在

表 3 6 对引物组合在仿石鲈科及相关科属种类 AFLP 图谱中多态性比较
Tab. 3 Polymorphisms comparison of the AFLP fingerprint of species from Haemulidae and related families/genera based on 6 pairs of primer combinations

序号 number	引物组合 primer combinations	检测条带数 detected bands	多态性条带数 polymorphic bands	多态性比率/% polymorphic ratio
1	E-TCC / M-CTG	99	99	100
2	E-TCT / M-CTG	110	110	100
3	E-TCC / M-TCC	109	109	100
4	E-TCG / M-CTG	117	117	100
5	E-TCT / M-TCC	128	128	100
6	E-TCT / M-CCT	106	106	100



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 M

图 1 引物组合 E-TCT/M-CTG 对 50 种仿石鲈科及相关科属种类 AFLP 扩增结果
M: Marker; 1~50 为样品编号; 1~13: 胡椒鲷亚科; 14~32: 石鲈亚科; 33~35: 髯鲷属;
36~43: 金线鱼科; 44~45: 眶棘鲈属; 46~50: 鲷科.

Fig. 1 Results of AFLP amplification of species from Haemulidae and related families/genera based on primer combinations E-TCT/M-CTG

M: Marker; 1–50 represent sample numbers. 1–13: Plectorhynchinae; 14–32: Haemulinae; 33–35: Hapalogenys; 36–43: Nemipteridae; 44–45: Scolopsis; 46–50: Theraponidae.

400 bp 左右位置存在仿石鲈科(石鲈亚科+胡椒鲷亚科)物种共有的条带信息,而在髯鲷属、眶棘鲈属、鲷科并无此条带,可作为区分仿石鲈科与其他科属种类的特异性条带。

2.3 属间遗传距离

基于 Kimura-2-Parameter 模型利用 MEGA7.0 计算出各物种 *Cyt b* 遗传距离(由于样品较多,表格数据较大,无法在同一页面显示,故表格不列

出),遗传距离范围为 0.024~0.303,平均遗传距离 0.218。根据物种遗传距离数据汇总出各科、属之间的遗传距离范围(表 4)。通过比较仿石鲈科(胡椒鲷亚科+石鲈亚科)、鲷科、眶棘鲈属、髯鲷属等有分类争议科属间遗传距离范围可知,仿石鲈科内部(石鲈亚科与胡椒鲷亚科)遗传距离范围为 0.024~0.243,而鲷科与仿石鲈科遗传距离范围(0.191~0.275)大于仿石鲈科内部的各种属遗传距

表 4 基于 *Cyt b* 基因的仿石鲈科、鲷科、金线鱼科、眶棘鲈属、髯鲷属及其他科属间遗传距离
Tab. 4 Genetic distances among Haemulidae, Theraponidae, Nemipteridae, Scolopsis, Hapalogenys and other families/genera based on *Cyt b* gene sequences

	胡椒鲷亚科 Plectorhynchinae	石鲈亚科 Haemulinae	鲷科 Theraponidae	金线鱼科 Nemipteridae	眶棘鲈属 Scolopsis	髯鲷属 Hapalogenys
胡椒鲷亚科 Plectorhynchinae	0.024–0.205					
石鲈亚科 Haemulinae	0.156–0.243	0.064–0.225				
鲷科 Theraponidae	0.208–0.275	0.191–0.272	0.139–0.182			
金线鱼科 Nemipteridae	0.185–0.269	0.188–0.293	0.197–0.290	0.032–0.247		
眶棘鲈属 Scolopsis	0.208–0.283	0.225–0.290	0.232–0.284	0.174–0.265	0.184–0.230	
髯鲷属 Hapalogenys	0.180–0.270	0.187–0.291	0.219–0.299	0.188–0.293	0.213–0.274	0.185–0.204
舵鱼科 Kyphosidae	0.158–0.217	0.183–0.232	0.168–0.211	0.198–0.250	0.216–0.232	0.197–0.252
石鲷科 Oplegnathidae	0.189–0.251	0.183–0.240	0.180–0.218	0.211–0.303	0.250–0.257	0.235–0.272
石首鱼科 Sciaenidae	0.188–0.242	0.178–0.251	0.202–0.263	0.197–0.288	0.230–0.295	0.235–0.275
笛鲷科 Lutjanidae	0.172–0.246	0.162–0.233	0.197–0.255	0.208–0.263	0.227–0.245	0.186–0.241
裸颊鲷科 Lethrinidae	0.178–0.230	0.164–0.241	0.227–0.276	0.212–0.279	0.233–0.260	0.214–0.294
鲹科 Carangidae	0.219–0.269	0.197–0.289	0.225–0.271	0.216–0.289	0.265–0.298	0.220–0.299
鲈科 Serranidae	0.186–0.268	0.169–0.265	0.218–0.272	0.207–0.270	0.226–0.283	0.213–0.261

离范围,且比其与舵鱼科(0.168~0.211)、石鲮科(0.180~0.218)、笛鲷科(0.197~0.255)等其他科的遗传距离范围均要大,显示鲷科与仿石鲮科分子水平差异甚远。对于眶棘鲈属,其与仿石鲮科之间的遗传距离范围(0.208~0.290)也大于仿石鲮科内部各种属遗传距离范围。反之,眶棘鲈属与金线鱼科的遗传距离范围则相对较小(0.174~0.265),甚至小于其与仿石鲮科之间的遗传距离范围(0.208~0.290)。对于传统分类上隶属于仿石鲮科的髭鲷属,其与仿石鲮科的遗传距离范围也相对较大(0.180~0.291),且比其与笛鲷科(0.186~0.241),舵鱼科(0.197~0.252)等其他科的遗传距离范围要大,

显示髭鲷属与仿石鲮科的亲缘关系较远。

根据 AFLP 结果计算的 50 种代表性物种遗传距离,汇总出仿石鲮科,金线鱼科,鲷科,眶棘鲈属,髭鲷属等各科属间的遗传距离范围(表 5)。其中仿石鲮科内部(石鲮亚科与胡椒鲷亚科)AFLP 遗传距离范围为 0.690~1.362。鲷科、眶棘鲈属、髭鲷属与仿石鲮科(石鲮亚科与胡椒鲷亚科)之间的遗传距离范围均比较大:分别为 1.268~1.683、1.097~1.553、1.225~1.556,大于仿石鲮科内部遗传距离范围,与 Cyt *b* 结果相似,揭示在 AFLP 遗传图谱上,鲷科、眶棘鲈属、髭鲷属与仿石鲮科的亲缘关系均相对较远。

表 5 基于 AFLP 数据的仿石鲮科、鲷科、金线鱼科、眶棘鲈科各属间遗传距离
Tab. 5 Genetic distances among Haemulidae, Theraponidae, Nemipteridae, Scolopsis and Hapalogenys based on AFLP data

	胡椒鲷亚科 Plectorhynchinae	石鲮亚科 Haemulinae	鲷科 Theraponidae	金线鱼科 Nemipteridae	眶棘鲈属 Scolopsis	髭鲷属 Hapalogeny
胡椒鲷亚科 Plectorhynchinae	0.690-1.144					
石鲮亚科 Haemulinae	0.970-1.361	0.522-1.362				
鲷科 Theraponidae	1.268-1.618	1.307-1.683	0.939-1.206			
金线鱼科 Nemipteridae	1.053-1.501	0.944-1.683	1.112-1.593	0.741-1.303		
眶棘鲈属 Scolopsis	1.134-1.492	1.097-1.553	1.092-1.728	0.947-1.388	0.831	
髭鲷属 Hapalogeny	1.225-1.556	1.289-1.545	1.233-1.891	1.097-1.501	1.281-1.326	0.804-0.993

2.4 分子系统进化分析结果

基于仿石鲮科及其相关科属种类 Cyt *b* 序列,以鲫和鲤作为外类群,利用最大似然法构建系统进化树如图 2 所示,树上各节点数值为 ML 树采用 1000 次 Bootstrap 统计后的支持率。进化树上,仿石鲮科中胡椒鲷属、矾鲈属、石鲮属等 11 属 34 种鱼类共同聚成仿石鲮科最大的单系群,该族群又可清晰分为两个主要分支,其中石鲮属、仿石鲮属、异孔石鲮属等 7 个属形成石鲮亚科(Haemulinae)分支;胡椒鲷属、少棘胡椒鲷属、矾鲈属形成胡椒鲷亚科(Plectorhynchinae)分支。对于鲷科及眶棘鲈属,进化树一致表明,两者均没有与仿石鲮科类群相聚。鲷科与舵鱼科、石鲮科聚为一支,眶棘鲈属与金线鱼科聚在一起,位于金线鱼科内部。此外,传统分类隶属于仿石鲮科的髭鲷属,在进化树上也没有与仿石鲮科聚为单系,而是单独形成一支,独立于仿石鲮科之外。结果显示,仿石鲮科类群由石鲮亚科及胡椒鲷亚科

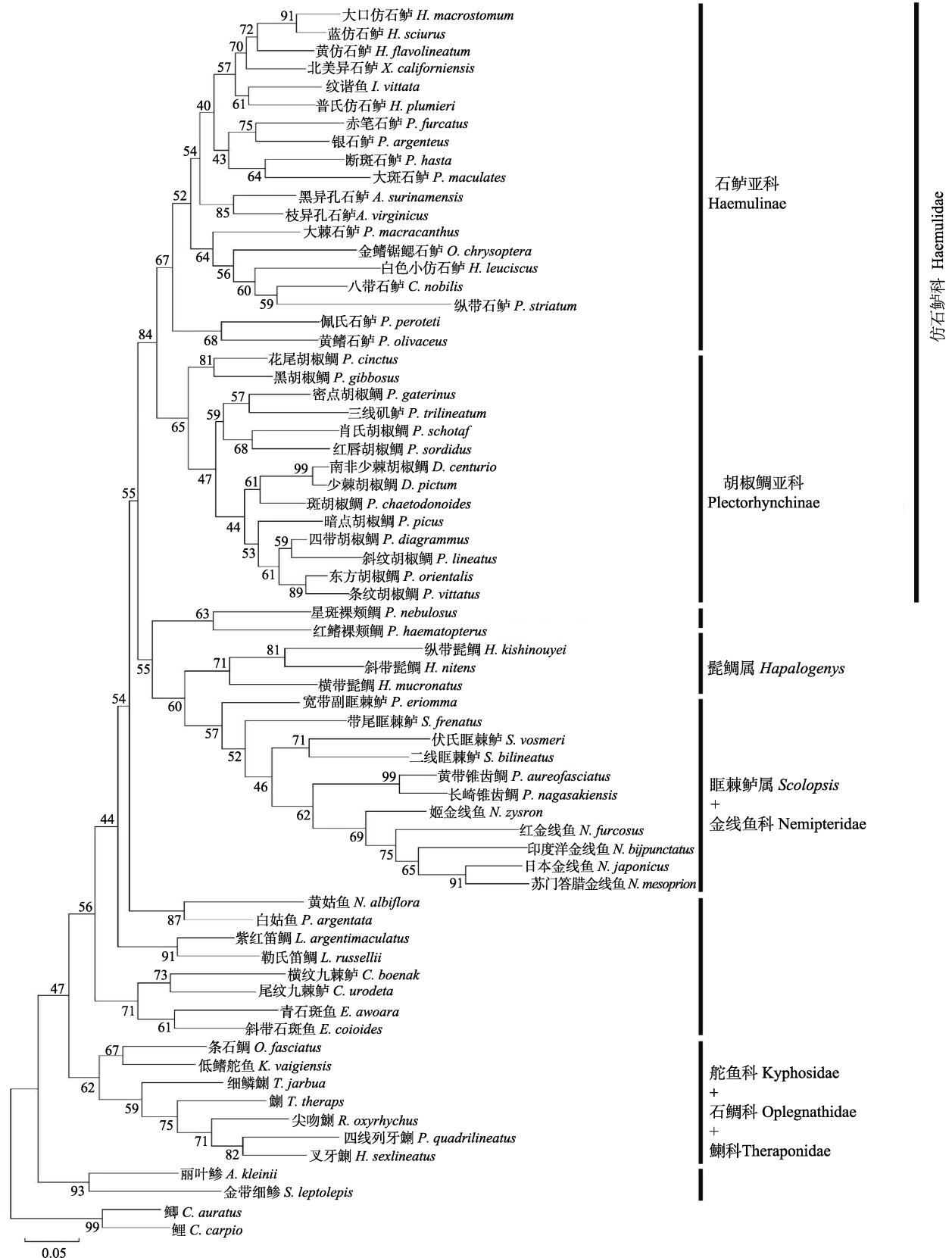
两个亚科组成,鲷科、眶棘鲈属、髭鲷属与仿石鲮科亲缘关系较远。

基于 AFLP 遗传图谱,根据各样本间遗传距离,用 UPGMA 聚类法对筛选的 50 种鱼类进行聚类分析,得到系统进化树分支图如图 3 所示。进化树上,50 种鱼类可划分为 3 大类群:第一类群为胡椒鲷亚科与石鲮亚科聚成的仿石鲮科单系群;第二类群包括髭鲷属,金线鱼科与眶棘鲈属,其中眶棘鲈属与金线鱼科聚在一起;第三类群为鲷科 5 种鱼类聚成的单系分支。各科属种类聚类关系与 Cyt *b* 序列构建的进化树大致相同。

3 讨论

3.1 AFLP 分子标记在系统发育中的适用性

AFLP 分子标记技术自 1993 年提出以来,已被广泛应用于动植物遗传结构、基因定位、DNA 指纹图谱等不同领域研究,在鱼类上也常用于群体遗传多样性、分子标记育种、家系选育等群体

图 2 仿石鲈科及其相关种类基于 Cyt *b* 序列利用最大似然法构建的分子系统进化树Fig. 2 Molecular phylogenetic trees of Haemulidae and related species constructed using maximum likelihood method based on Cyt *b* gene sequences

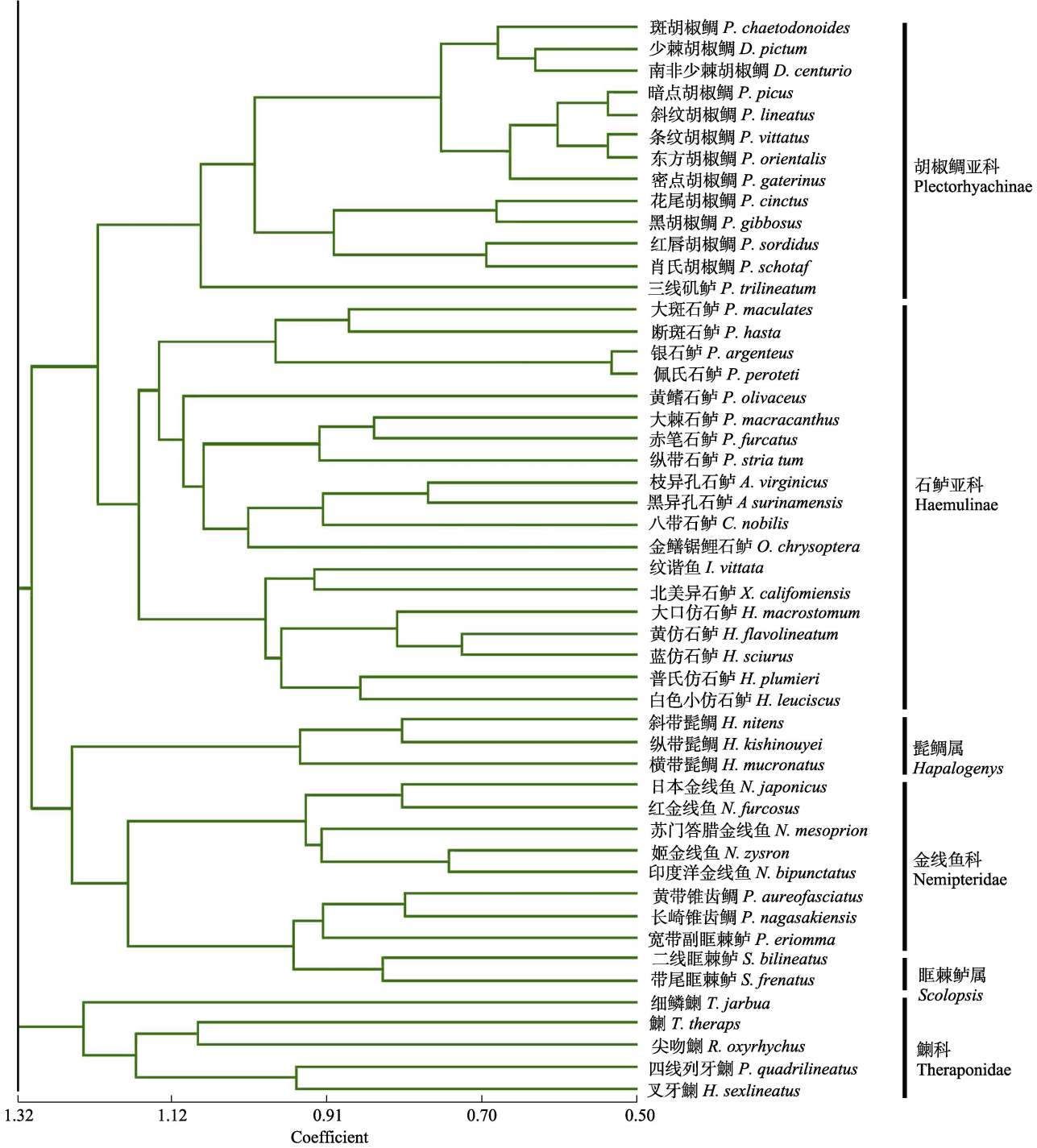


图 3 仿石鲈科及其相关种类基于 AFLP 图谱利用 UPGMA 法构建分子系统进化树

Fig. 3 Molecular phylogenetic trees of Haemulidae and related species constructed using UPGMA method based on AFLP markers

分析^[16-18]，而用于不同物种亲缘关系、系统分类研究相对较少^[21-22]。本研究将 AFLP 技术与 Cyt b 标记结合，共同应用于仿石鲈科及相关争议科属的系统进化分析。本研究 AFLP 标记图谱中，筛选的 6 对引物组合从 50 种鱼类中共检出 669 条清

晰条带，其中多态性条带 669 条，多态性比率为 100%，拥有足够多的差异区分不同种属。根据 AFLP 图谱计算的遗传距离及构建系统进化树也能有效区分不同物种亲缘关系。进化树上，仿石鲈科、鲷科、金线鱼科、眶棘鲈属、髭鲷属等科、

属均能清晰聚类, 拓扑结构与 Cyt *b* 基因构建进化树结构基本一致, 表明 AFLP 标记可有效用于仿石鲈科不同种属分类关系研究。

3.2 仿石鲈科中石鲈亚科和胡椒鲷亚科分类问题

形态分类上, Johnson^[23]曾把仿石鲈科划分为石鲈亚科(Haemulinae)和胡椒鲷亚科(Plectorhynchinae)两个亚科。其中石鲈亚科包括石鲈属、仿石鲈属、异石鲈属等 14 个属, 胡椒鲷亚科包括少棘胡椒鲷属、胡椒鲷属与矾鲈属 3 个属。本研究采集获得石鲈亚科及胡椒鲷亚科鱼类 33 种, 隶属于 11 个属, 样品来源于印度-西太平洋、东太平洋、东大西洋等世界不同海区, 具有一定的代表性。基于 Cyt *b* 及 AFLP 标记构建的系统进化树, 33 种鱼类均聚成两个分支, 其中石鲈属、仿石鲈属、异孔石鲈属等 7 个属聚为石鲈亚科的分支, 胡椒鲷属、少棘胡椒鲷属、矾鲈属 3 个属聚成胡椒鲷亚科分支, 与 Johnson^[23]将仿石鲈科划分 2 个亚科的观点一致。

3.3 眶棘鲈属系统分类问题

眶棘鲈属在传统分类资料中分类地位争议较大, 部分资料将眶棘鲈属归为仿石鲈科^[2-3], 另有资料却将其归为眶棘鲈科(Scolopsidae)^[4,6-7], 或金线鱼科(Nemipteridae)^[1,5,8]; 此外, 还有资料将眶棘鲈科(Scolopsidae) [连同眶棘鲈属(*Scolopsis*)] 并入仿石鲈科[原为石鲈科(Pomadasyidae)], 并在其下设立眶棘鲈亚科(Scolopsinae)^[24]等。根据本研究分子标记构建的系统进化树, 不管 Cyt *b* 还是 AFLP 标记, 进化树一致表明, 眶棘鲈属均以高支持率优先与金线鱼科聚在一起, 位于金线鱼科内部, 并与仿石鲈科分类地位相距较远。此外, 基于 Cyt *b* 及 AFLP 标记遗传距离分析, 眶棘鲈属与仿石鲈科的遗传距离(Cyt *b*: 0.208~0.290; AFLP: 1.097~1.553), 比其与金线鱼科之间的遗传距离(Cyt *b*: 0.174~0.265; AFLP: 0.947~1.388)均要大。可知, 与仿石鲈科相比, 在分子水平上, 眶棘鲈属与金线鱼科存在更近的亲缘关系, 这与目前部分系统分类学研究结果一致。Carpenter 等^[25]测定了金线鱼科、裸颊鲷科、鲷科、棘臀鱼科骨骼和鳞片等形态特征数据并进行系统进化分析, 发现眶棘鲈属与金线鱼科聚为紧密单系。Orrell 等^[26]以及 Miller 等^[27]分别利用分子标记构建笛鲷

科(Lutajnidae)以及鲷科(Sparidae)分子系统进化关系也揭示眶棘鲈属与金线鱼科聚在一起, 与仿石鲈科分类位置相对较远。本研究前期利用 RAG2 标记分析仿石鲈科鱼类系统分类问题也揭示眶棘鲈属与金线鱼科关系更近, 支持眶棘鲈属隶属于金线鱼科观点^[28], 这也与目前大部分形态分类资料归类结果一致^[1,5,8,19,29]。

3.4 髭鲷属系统分类问题

我国分布的髭鲷属种类记载有 3 种: 斜带髭鲷、横带髭鲷与纵带髭鲷^[2-7], 本研究把 3 种髭鲷样品完全采集。对于这 3 种髭鲷的分类关系, 一般根据背鳍鳍棘第 3 鳍棘是否长于第 4 鳍棘的标准首先把横带髭鲷与另外 2 种髭鲷区分开来, 横带髭鲷背鳍第 3 鳍棘比第 4 鳍棘要长, 而斜带髭鲷与纵带髭鲷第 3 鳍棘比第 4 鳍棘要短。本研究分子水平的分类结果中, 不管是 Cyt *b* 还是 AFLP 分析的进化树, 斜带髭鲷与纵带髭鲷都优先聚成一支, 然后再与横带髭鲷相聚, 聚类结果与形态分类结果一致。

对于髭鲷属在仿石鲈科中的分类地位, 大多数分类资料把髭鲷属归类于仿石鲈科, 但也有研究认为髭鲷属在仿石鲈科中的分类地位存在争议。Johnson^[23]把仿石鲈科划分为石鲈亚科和胡椒鲷亚科, 对于髭鲷属, 认为其在鲈亚目中的分类地位并不明确。近期不少分子水平研究均指出髭鲷属与仿石鲈科亲缘关系较远, 应从仿石鲈科中独立出来, 或提升为髭鲷科(Hapalogenyidae)。徐田军等^[30]基于 Cyt *b* 全长序列分析了斜带髭鲷、横带髭鲷与鲈总科 6 科 29 种鱼类的分子系统进化关系, 表明髭鲷属与石鲈科其他属的遗传距离已超出了科间水平。魏涛^[31]测定了斜带髭鲷线粒体基因组全序列, 基于全序列与 62 种鲈亚目进行系统进化分析, 显示斜带髭鲷单独形成一支, 独立于仿石鲈科之外。任岗等^[9]利用 16S rRNA 对石鲈科 5 个属的鱼类系统发育分析也认为髭鲷属跟仿石鲈科关系较远, 建议将髭鲷属提升为髭鲷科。在世界鱼类数据库(FishBase)上, 髭鲷属已经从仿石鲈科中分离出来, 隶属于髭鲷科, 收录了全球 7 种髭鲷属鱼类^[19]。本研究系统进化树上, 不管是 Cyt *b* 还是 AFLP 标记, 髭鲷属均没有与仿石鲈科聚为一支, 3 种髭鲷聚成髭鲷属的单系分支,

独立于仿石鲈科类群之外。基于遗传距离也显示, 髯鲷属与仿石鲈科的遗传距离(Cyt *b*: 0.180~0.297; AFLP: 1.225~1.556)超出了仿石鲈科内部属间遗传距离(Cyt *b*: 0.024~0.243; AFLP: 0.690~1.362), 显示髯鲷属在分子水平上与仿石鲈科亲缘关系较远, 支持髯鲷属从仿石鲈科中分离出来, 或提升到髯鲷科的分类观点。

3.5 鲷科系统分类问题

鲷科在我国大致分为 3~4 属 4~8 种^[2-5,7,32], 本研究共采集了鲷科 4 属(鲷属、尖吻鲷属、列牙鲷属、叉牙鲷属) 5 种鱼类, 具有一定代表性。进化树上, 5 种鲷科鱼类聚成单系分支, 独立于仿石鲈科类群之外。在 Cyt *b* 进化树上, 鲷科优先与舵鱼科、石鲷科鱼类聚在一起, 位于进化树的基部, 与仿石鲈科相距较远。在 AFLP 标记进化树上, 鲷科种类也单独形成一支, 位于进化树的底部。根据遗传距离分析, 不管是 Cyt *b* 基因还是 AFLP 标记, 鲷科与仿石鲈科的遗传距离(Cyt *b*: 0.191~0.275; AFLP: 1.268~1.683)均远大于仿石鲈科内部属间遗传距离(Cyt *b*: 0.024~0.243; AFLP: 0.690~1.362)。可知, 鲷科与仿石鲈科亲缘关系较远, 不支持鲷科归入仿石鲈科, 该结果与当今大多数形态资料分类观点一致^[2-5,7,33]。相对于仿石鲈科, 本研究进化树上, 鲷科与舵鱼科存在更近的亲缘关系, 这也与当前部分系统分类研究结果相似。Greenwood 等^[34]揭示鲷科与舵鱼科在形态上均拥有一种特定的 RLA (ramus lateralis accessories)10 型的特征, 该特征仅在个别科、属存在, 认为是该类群物种的共源性状。Yagishita 等^[35]基于线粒体 DNA 标记分析也验证鲷科与舵鱼科关系较近, 与仿石鲈科关系较远。对于鲷科内部各种属间的分类关系, 进化树上, 四线列牙鲷与叉牙鲷优先聚为姐妹分支, 鲷与尖吻鲷位于鲷科分支内部, 细鳞鲷最先分化, 位于鲷科分支基部, 这与陈璐等^[36]、苏国茂等^[37]对鲷科分子系统进化研究结果相似, 可为鲷科内部各种属间系统分类关系提供一定依据。

4 结论

本研究基于线粒体 DNA Cyt *b* 基因及 AFLP 标记图谱, 对仿石鲈科及其相关争议科属进行分

子系统进化关系研究, 从分子水平深入揭示各种、属系统分类关系, 有效澄清仿石鲈科及相关科属分类争议问题。结果表明, 分子水平上, 仿石鲈科聚为石鲈亚科与胡椒鲷亚科两个主要分支, 鲷科、眶棘鲈属、髯鲷属等争议科属与仿石鲈科亲缘关系较远, 不应该归为仿石鲈科, 与当今主要形态分类资料观点一致, 研究结果为仿石鲈科及相关科属的系统分类提供分子水平依据。

参考文献:

- [1] Nelson J S. Fishes of the World[M]. New York: John Wiley & Sons, 2006: 368-369.
- [2] Zhu Y D, Zhang C L, Cheng Q T. Fishes of the South China Sea[M]. Beijing: Science Press, 1962: 506-509, 518-544. [朱元鼎, 张春霖, 成庆泰. 南海鱼类志[M]. 北京: 科学出版社, 1962: 506-509, 518-544.]
- [3] South China Sea Fisheries Research Institute, State Fisheries Administration. The Fishes of the Islands in the South China Sea[M]. Beijing: Science Press, 1979: 207-218. [国家水产总局南海水产研究所. 南海诸岛海域鱼类志[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 207-218.]
- [4] Cheng Q T, Zheng B S. Systematic Synopsis of Chinese Fishes[M]. Beijing: Science Press, 1987: 99-108, 747-757. [成庆泰, 郑葆珊. 中国鱼类系统检索[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 99-108, 747-757.]
- [5] Shen S J. Fishes of Taiwan[M]. Taipei: Department of Zoology, Taiwan University Press, 1993: 360-363. [沈世杰. 台湾鱼类志[M]. 台北: 台湾大学动物学系出版社, 1993: 360-363.]
- [6] Huang Z G. Marine Species and Their Distributions in China's Seas[M]. Beijing: China Ocean Press. 1994: 708-709. [黄宗国. 中国海洋生物种类与分布[M]. 北京: 海洋出版社, 1994: 708-709.]
- [7] Zhu Q. A List of Marine Fish Species in Chinese Sea[M]. Beijing: The Academic Press, 1998: 48-51. [祝茜. 中国海洋鱼类种类名录[M]. 北京: 学苑出版社, 1998: 48-51.]
- [8] Shao K T, Ho H C, Lin P L, et al. A checklist of the fishes of southern Taiwan, northern South China Sea[J]. The Raffles Bulletin of Zoology, 2008, 19: 233-271.
- [9] Ren G, Zhang Q. Phylogeny of Haemulid with discussion on systematic position of the genus Hapalogenys[J]. Acta Zootaxonomica Sinica, 2007, 32(4): 835-841. [任岗, 章群. 石鲈科鱼类的系统发育分析兼论髯鲷属的分类地位[J]. 动物分类学报, 2007, 32(4): 835-841.]
- [10] Springer V G, Raasch M S. Fishes angling and finfish fisheries on stamps of the world[M]//Fishes on Stamps Handbook. American Topical Association, 1995, 129: 1-110.
- [11] Froese R, Pauly D. FishBase. World Wide Web electronic publication[DB/OL]. <http://www.fishbase.org>.
- [12] Chen Y Y, Li R, Li C Q, et al. Testing the validity of two putative sympatric species from Sinocyclocheilus (Cyprin-

- formes: Cyprinidae) based on mitochondrial cytochrome *b* sequences[J]. *Zootaxa*, 2018, 4476(1): 130-140.
- [13] Zhao G Y, Quan J Q, Li L L, et al. Genetic diversity and phylogenetic relationships among eight populations of triphops based on mtDNA Cyt *b* gene sequences[J/OL]. *Genomics and Applied Biology*. (2020-06-10). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1369.Q.20200609.1746.004.html>. [赵桂研, 权金强, 李兰兰, 等. 基于线粒体 Cyt *b* 基因分析高原鳅种群遗传多样性与系统发育关系[J/OL]. *基因组学与应用生物学*. (2020-06-10). <https://kns.cnki.net/kcms/detail/45.1369.Q.20200609.1746.004.html>.]
- [14] Wei J J, You H Z, Xia S D, et al. Analysis of the mitochondrial Cyt *b* gene of *Trachidermus fasciatus* and its application in germplasm identification[J]. *Hebei Fisheries*, 2019(8): 21-25, 61. [魏建军, 尤宏争, 夏苏东, 等. 松江鲈鱼线粒体 Cyt *b* 基因分析及其在种质鉴定中的应用[J]. *河北渔业*, 2019(8): 21-25, 61.]
- [15] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23(21): 4407-4414.
- [16] Ferreira D G, Galindo B A, Frantini-Silva W, et al. Genetic structure of a Neotropical sedentary fish revealed by AFLP, microsatellite and mtDNA markers: A case study[J]. *Conservation Genetics*, 2015, 16(1): 151-166.
- [17] Han Z Q, Han G, Wang Z Y, et al. The genetic divergence and genetic structure of two closely related fish species *Lateolabrax maculatus* and *Lateolabrax japonicus* in the Northwestern Pacific inferred from AFLP markers[J]. *Genes & Genomics*, 2015, 37(5): 471-477.
- [18] An D D, Dai Y G, Zou X J. AFLP analysis of genetic structure and diversity in population of *Schizothorax kolzovi* from the Wujiang River[J]. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(4): 39-45. [安丹丹, 代应贵, 邹习俊. 基于 AFLP 分析的乌江四川裂腹鱼种群遗传结构及多样性研究[J]. *渔业科学进展*, 2021, 42(4): 39-45.]
- [19] Froese R, Pauly D. FishBase. World Wide Web electronic publication[DB/OL]. <http://www.fishbase.org>.
- [20] Marko P B, Lee S C, Rice A M, et al. Mislabeling of a depleted reef fish[J]. *Nature*, 2004, 430(6997): 309-310.
- [21] Zhang J B, Huang L M, Chen Z R. Studies on the larval identification and taxonomy of *Lutjanus* by AFLP technology[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2005, 27(2): 165-171. [张俊彬, 黄良民, 陈真然. AFLP 技术在笛鲷的仔鱼鉴定及其分类学上的研究[J]. *海洋学报*, 2005, 27(2): 165-171.]
- [22] Zhang J B, Liu X. Molecular phylogenetic comparison of family Lutjanidae based on genomic AFLP analysis and 12S rRNA sequence variation[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2006, 51(S2): 120-124. [张俊彬, 刘昕. 基因组 AFLP 分析及线粒体 12S rRNA 序列变异在笛鲷科系统发育上的比较[J]. *科学通报*, 2006, 51(S2): 120-124.]
- [23] Johnson G D. The Limits and Relationships of the Lutjanidae and Associated Families[M]. University of California Press, 1992.
- [24] Lindberg G U. Fishes of the World: A Key to Families and a Checklist[M]. New York: John Wiley and Sons, 1974: 1-545.
- [25] Carpenter K E, Johnson G D. A phylogeny of sparoid fishes (Perciformes, Percoidei) based on morphology[J]. *Ichthyological Research*, 2002, 49(2): 114-127.
- [26] Orrell T M, Carpenter K E. A phylogeny of the fish family Sparidae (porgies) inferred from mitochondrial sequence data[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2004, 32(2): 425-434.
- [27] Miller T L, Cribb T H. Phylogenetic relationships of some common Indo-Pacific snappers (Perciformes: Lutjanidae) based on mitochondrial DNA sequences, with comments on the taxonomic position of the Caesioninae[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, 44(1): 450-460.
- [28] Liang R S, Zhou A G, Chen J T, et al. Molecular phylogenetic relationships of Haemulidae and the related species based on partial sequence of RAG2 gene[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2013, 37(5): 651-660. [梁日深, 周爱国, 陈金涛, 等. 基于 RAG2 基因序列分析仿石鲈科鱼类及其相关种类系统进化关系[J]. *水产学报*, 2013, 37(5): 651-660.]
- [29] FAO-FIES. Aquatic sciences and fisheries information system (ASFIS) species list[DB/OL]. <http://www.fao.org/fishery/collection/asfis/en>.
- [30] Xu T J, Wang J X, Sun Y N, et al. Phylogeny of Haplogeny with discussion on its systematic position in percoidea using cytochrome *b* gene sequences[J]. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 2010, 35(3): 530-536. [徐田军, 王健鑫, 孙悦娜, 等. 基于髭鲷属鱼类 Cyt *b* 基因全序列探讨髭鲷属在鲈总科的分类地位[J]. *动物分类学报*, 2010, 35(3): 530-536.]
- [31] Wei T. Taxonomic status research of *Haplogeny* and divergence time estimates for Perciformes[D]. Zhoushan: Zhejiang Ocean University, 2014. [魏涛. 髭鲷属鱼类分类地位研究以及鲈形目分化时间估算[D]. 舟山: 浙江海洋学院, 2014.]
- [32] Li M D, Luo Y, Ma R Y. A catalogue of Chinese fishes IX: Sphraenoidei, Polynemoidei and Percoidei (in part)[J]. *Marine Science Bulletin*, 2003, 22(2): 69-75. [李明德, 罗阳, 马若燕. 中国鱼类名录 IX——鲈亚目、马鲛亚目、鲈亚目(部分)[J]. *海洋通报*, 2003, 22(2): 69-75.]
- [33] Larson H K, Williams R S, Hammer M P. An annotated checklist of the fishes of the northern territory, Australia[J]. *Zootaxa*, 2013, 3696: 1-293.
- [34] Greenwood P H, Freihofer W C. Patterns of the ramus *Lateralis accessorius* and their systematic significance in teleostean fishes[J]. *Copeia*, 1964, 1964(1): 248.
- [35] Yagishita N, Miya M, Yamanoue Y, et al. Mitogenomic evaluation of the unique facial nerve pattern as a phylogenetic marker within the perciform fishes (Teleostei: Percomorpha)[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2009, 53(1): 258-266.
- [36] Chen L, Huang B Y, Xue D, et al. DNA barcoding of Terapontidae and taxonomic status of a new record of *Terapon puta* in coastal waters of China[J]. *Marine Fisheries*, 2017, 39(2): 121-130. [陈璐, 黄伯炎, 薛丹, 等. 中国沿海鲷科鱼类 DNA 条形码研究及新记录种三线鲷分类地位探讨[J]. *海洋渔业*, 2017, 39(2): 121-130.]

[37] Su G M, Lin C Z, Lin Z W, et al. Molecular phylogenetic analysis of fishes in Teraponidae from China sea based on mitochondrial CO I and nuclear RAG2 gene sequences[J].

Fisheries Science, 2017, 36(5): 652-657. [苏国茂, 林聪左, 林贞武, 等. 基于 CO I 及 RAG2 基因序列的我国科鱼类分子系统研究[J]. 水产科学, 2017, 36(5): 652-657.]

Molecular phylogenetic relationships of Haemulidae species and related families/genera based on Cyt *b* and AFLP markers

CHEN Ming^{1, 2, 3, 4}, FAN Manhua¹, ZHANG Guixin¹, LI Zibo¹, LI Qingqing^{1, 2, 3, 4}, LI Jiangtao^{1, 2, 3, 4}, ZHOU Meng^{1, 2, 3, 4}, LIANG Rishen^{1, 2, 3, 4}, LIN Li^{1, 2, 3, 4}

1. College of Animal Science and Technology, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou 510225, China;
2. Guangdong Provincial Water Environment and Aquatic Products Security Engineering Technology Research Center, Guangzhou 510225, China;
3. Guangdong Province Key Laboratory of Waterfowl Healthy Breeding, Guangzhou 510225, China;
4. Guangzhou Key Laboratory of Aquatic Animal Diseases and Waterfowl Breeding, Guangzhou 510225, China

Abstract: Haemulidae fish, belonging to the suborder Percoidae of the order Perciformes, are important commercial marine fish species in China. Morphologically, classification controversies still exist among the genera and species of this family. To clarify such controversies, in this study, partial mitochondrial cytochrome *b* sequences of 66 Haemulidae species and their related families/genera were determined and analyzed. Combining this with AFLP marker information, the molecular phylogenetic relationships of Haemulidae and related species were then constructed and investigated. The phylogenetic trees were constructed based on the Cyt *b* gene sequences using the maximum likelihood method and based on AFLP markers using the UPGMA method. The results showed that in the Cyt *b* gene, 739 bp homologous sequences from 66 species were obtained, with 243 amino acids encoded; in the AFLP fingerprints, based on six primer pairs, a total of 669 clear polymorphic bands were obtained, with a polymorphic ratio of 100%. Genetic distances among Haemulidae and related families/genera (Terapontidae, *Scolopsis*, *Hapalogenys*) calculated by MEGA 7.0 revealed that the distance values between Haemulidae and Terapontidae (Cyt *b*: 0.191–0.275; AFLP: 1.268–1.683), Haemulidae and *Hapalogenys* (Cyt *b*: 0.180–0.297; AFLP: 1.225–1.556), and Haemulidae and *Scolopsis* (Cyt *b*: 0.208–0.290; AFLP: 1.097–1.553) were all larger than the Haemulidae intra-genera genetic distance values (Cyt *b*: 0.024–0.243; AFLP: 0.690–1.362), indicating their distant relationship with Haemulidae. The phylogenetic trees constructed by Cyt *b* genes and AFLP marker information revealed similar topologies. In the phylogenetic tree the following was found: 1) Haemulidae species were divided into two major groups, seven genera (including *Pomadourus*, *Haemulon*, and *Anisotremus*) were clustered into the Haemulinae group and three genera (namely, *Plectorhynchus*, *Diagramma*, and *Parapristipoma*) were clustered into the Plectorhynchinae group; 2) the genera *Hapalogenys* and *Scolopsis* were not clustered together with the Haemulidae group. *Hapalogenys* formed a separate branch and *Scolopsis* was clustered together with family Nemipteridae; and 3) species of family Terapontidae were not clustered with Haemulidae. Terapontidae showed a close relationship with the families Kyphosidae and Oplegnathidae. Our study supported the view that Haemulidae comprised two subfamilies, Haemulinae and Plectorhynchinae; and Terapontidae. *Hapalogenys* and *Scolopsis* may not be classified into Haemulidae. The present study revealed the phylogenetic relationships within Haemulidae and related families/genera, which provide molecular evidences for analyzing and clarifying the controversies regarding their morphological classifications.

Key words: Haemulidae; phylogeny; AFLP; cytochrome *b*

Corresponding author: LIANG Rishen. E-mail: cheetahliang@126.com

LIN Li. E-mail: linli@zhku.edu.cn