

3 种鲷属鱼类线粒体 COI 基因序列变异及系统进化

张凤英^{1,2}, 马凌波¹, 施兆鸿¹, 马春艳¹

(1. 中国水产科学研究院 东海水产研究所, 农业部海洋与河口渔业重点开放实验室, 上海 200090; 2. 华东师范大学 生命科学学院, 上海 200063)

摘要: 对采自东海的银鲷 (*Pampus argenteus*)、翎鲷 (*P. punctatissimus*) 和中国鲷 (*P. chinensis*) 3 种鲷属鱼类的线粒体 COI 基因序列片段进行扩增和序列测定, 得到 603 bp 的基因片段, 编码 201 个氨基酸, 碱基 T、C、A、G 平均含量分别为 34.2%、22.3%、25.9% 和 17.6%。所得序列共定义 12 个单倍型, 中国鲷只有 1 个单倍型, 银鲷 3 个单倍型, 翎鲷 8 个单倍型, 在这 12 个单倍型中共检测到 109 个变异位点。3 种鲷密码子的使用均存在明显的偏向性, 且同义密码子使用偏向性高度一致。银鲷和中国鲷的遗传距离最大 (0.165~0.168), 与翎鲷的遗传距离次之 (0.151~0.162), 翎鲷和中国鲷的遗传距离最小 (0.058~0.065)。由进化树可知, 翎鲷和中国鲷的进化关系最近, 它们与银鲷的进化关系较远, 银鲷是最早形成的种。分子水平自然选择的检验结果表明, 自然选择在银鲷和翎鲷线粒体 COI 基因差异形成过程中起一定的作用。本研究从分子水平研究中国东海海域鲷属鱼类的分类、遗传关系和系统进化, 以了解鲷属鱼类以及与鲷科之间的亲缘关系, 又为鲷属鱼类保护生物学和系统进化提供分子生物学依据。[中国水产科学, 2008, 15(3): 392~399]

关键词: 鲷属; 线粒体 COI 基因; 序列变异; 系统进化; 自然选择

中图分类号: Q959.483

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)03-0392-08

鲷属 (*Pampus*) 鱼类属于硬骨鱼纲 (Osteichthyes), 鲈形目 (Perciformes), 鲷亚目 (Stromateoidei), 鲷科 (Stromateidae), 具有很高的营养价值和经济价值, 是东海区重要经济鱼类之一。近 20 年来, 虽然东海区鲷的年海洋捕捞产量呈连续上升趋势, 但其平均体质量、优势又长组成及年龄组成均出现明显下降趋势, 资源状况不容乐观^[1]。自从 Gill^[2] 把鲷属分为 2 个亚属以来, 鲷属鱼类的分类问题一直成为分类学家争论的焦点^[3-9], 尤其在银鲷 (*Pampus argenteus*)、灰鲷 (*P. cinereus*) 和翎鲷 (*P. punctatissimus*) 的命名上存在很大争议, Haedrich^[3] 认为灰鲷是银鲷的同物异名, 伍汉霖^[5] 把翎鲷视为银鲷, 成庆泰^[6-7] 将翎鲷视为灰鲷。Liu 等^[8-9] 对翎鲷做了重新描述, 认为翎鲷是区别于银鲷的有效种, 它和灰鲷在形态上非常相似, 是一对姐妹种。故有很多文献把翎鲷误认为是灰鲷。

随着分子生物学的发展, 基于基因序列测定的分子数据已被广泛应用在鱼类分类学、系统学和种

群遗传学方面, 分子数据与传统形态学分类方法相结合使得原来难以界定的物种分类得到较好的解决^[10-11]。以往学者们已从鳃耙、幽门盲囊、耳石、侧线管、头颅、脊椎骨等形态特征的比较分析对鲷属鱼类分类进行了较为系统的研究^[12], 但未见有从分子生物学角度对其研究的报道。DNA 分子作为遗传信息的载体, 是进化历史的忠实记录者。线粒体 DNA (mitochondrial DNA, 简称 mtDNA) 结构简单, 呈母性遗传, 进化速度快且不发生重组, 是一种应用较广的分子标记, 其中一些基因已经被广泛用于系统进化研究^[13-16]。细胞色素氧化酶 I 亚基 (cytochrome oxidase subunit I, COI) 基因具有进化速率适中的特点, 可作为种属系统进化研究的良好标记^[15-16]。本研究对分布于东海海域的银鲷、翎鲷和中国鲷 (*P. chinensis*) mtDNA COI 基因序列片段进行了扩增和测序, 初步分析了它们之间的系统进化关系, 并从 GenBank 中下载了鲷科的中间低鳍鲷 (*Peprilus medius*) 和星斑真鲷 (*Stromateus stellatus*) 以及长鲷科的刺鲷 (*Psenopsis anomala*)

收稿日期: 2007-07-24; 修订日期: 2007-11-16.

基金项目: 国家科技基础条件平台建设子项目课题 (2006DKA30470_004); 上海市科技兴农重点攻关项目 [沪农科攻字 (2004) 第 8-3 号]; 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (2007M22).

作者简介: 张凤英 (1976-), 女, 助理研究员, 硕士, 主要从事水产动物遗传学研究. E-mail: zhangfy76@126.com

通讯作者: 马凌波. Tel: 021-65688139; E-mail: malingbo@vip.sina.com

相关序列进行比较研究,以期了解鲳属鱼类以及与鲳科之间的亲缘关系,为鲳属鱼类保护生物学和系统进化提供分子生物学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验用银鲳、翎鲳和中国鲳采自浙江舟山群岛海域,另有部分翎鲳样品采自东海近海和远海,冰鲜运回实验室后 -75°C 冰箱保存备用。

1.2 总DNA的提取

取约200 mg尾部肌肉放入1.5 mL的离心管中,加入500 μL 的TE缓冲液,剪碎,再加入终质量分数为0.5%的SDS和200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的蛋白酶K,于 55°C 消化2~3 h,消化物经酚/氯仿、氯仿抽提,2倍体积无水乙醇沉淀,70%无水乙醇洗涤,室温干燥后溶于 ddH_2O 中, 4°C 冰箱保存备用。

1.3 PCR扩增和测序

采用通用引物扩增COI基因,引物为COIa: AGTATAAGCGTCTGGGTTAGTC和COIf: CCTGCAGGAGGAGGAGAYCC^[17],由上海生工生物工程有限公司合成。PCR反应在PTC-200 PCR仪上进行,反应总体积是50 μL ,反应体系为:10 $\times$ buffer 5.0 μL , Mg^{2+} 终浓度为2.0 mmol/L,引物(10 $\mu\text{mol/L}$)为2 μL ,dNTP(各2.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$)4 μL ,Taq酶(TaKaRa,5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$)0.4 μL ,模板2.0 μL ,用 ddH_2O 补足体积。反应程序为: 94°C 预变性5 min, 94°C 变性30 s, 55°C 退火30 s, 72°C 延伸60 s,35个循环。最后 72°C 延伸10 min。PCR扩增产物用1.5%含EB的琼脂糖凝胶电泳分离,凝胶成像系统观察并照相。

1.4 数据分析

用Mega3.0^[18]对所测序列进行对位排列,并结合人工核查,利用“Statistics”程序对所得序列的碱基组成、核苷酸位点替换数和密码子使用频率进行统计,计算个体之间遗传距离。在系统进化树构建之前,采用Modeltest软件^[19]确定序列最适合的进化模式。采用NJ法(Neighbor-Joining method)和ML法(Maximum Likelihood method)两种建树方法对序列进行分析。NJ法利用PAUP*4.0软件包^[20],经启发式搜索(Heuristic search),重建系统发生树,Bootstrap置信值^[21]估算重复次数1 000次;ML法采用TREEFINDER软件^[22]进行分析,Bootstrap分析^[21]重复100次,两种方法均

采用Modeltest获得的参数构建系统进化树。分子水平自然选择作用的检测采用 K_a/K_s (Nei-Gojobori method)检验^[23]和MK检验(McDonald-Kreitman test)^[24]。

2 结果与分析

研究中用于测定线粒体COI序列的银鲳和中国鲳各5个,翎鲳14个样本,分别得到单倍型数为3个、1个和8个。所得序列长603 bp,编码201个氨基酸。基因序列已提交到GenBank,登录号为EU119289~119300。

2.1 mtDNA COI基因片段序列分析

通过获得的12个单倍型与GenBank中序列进行Blast比较,核苷酸序列与已知的翎鲳COI序列相似性为86.2%~100%,其中,所测翎鲳的1条序列和已提交序列完全相同。比较这3种鲳属鱼类COI序列显示,在603个核苷酸位点中,没有插入、缺失及终止密码子出现,共有109个变异位点,85个简约信息位点。在获得的银鲳3个单倍型存在5个变异位点,8个翎鲳单倍型存在11个变异位点。在碱基组成上,T、C、A、G平均含量分别为34.2%、22.3%、25.9%和17.6%,A+T含量较高,为60.1%。

2.2 密码子使用偏向性

603 bp的核苷酸序列共编码201个氨基酸,其中有12个发生了变异。在12个单倍型中,所有的转换和颠换比值是4.0。第1密码子只存在4个转换位点,第2密码子只有1个颠换位点,而第3密码子的变异位点很多,存在22个转换位点和5个颠换位点。

密码子中,A、T、G、C在1、2、3位点的平均含量差别很大,其中G的平均含量变化最大,第1、2、3位点G的平均含量分别是31.3%、15.4%和6.1%,这表明密码子的碱基使用频率存在明显的偏向性。

银鲳的3个单倍型编码的氨基酸序列存在1个变异位点,翎鲳的8个单倍型有4个氨基酸变异位点。本研究结果测定的序列中,UUC(苯丙氨酸,F)和AUU(异亮氨酸,I)的平均使用频率最高,均达到10.0次以上,CGC(精氨酸,R)只出现1.0次,还有几种密码子没有被使用,其他使用次数一般在3~7次之间。3种鱼类同义密码子使用偏向性高度一致,比如在中国鲳/翎鲳/银鲳序列中UUC(F)、AUU(I)、GUA(V)的平均使用次数分别是13.0/12.6/15.0、14.0/15.2/14.0、10.0/10.4/9.0。

2.4 系统进化分析

把鲳科的中间低鳍鲳 (*Peprius medius*) (AB205449)、星斑真鲳 (*Stromateus stellatus*) (AB205450) 和已提交到 GenBank 中的翎鲳 (AB205448) COI 序列与研究中的 3 种鲳属鱼类, 并以长鲳科的刺鲳 (*Psenopsis anomala*) (AB205441) 作为外群重建系统进化树。重建的 NJ 树和 ML 树拓扑结构图基本一致 (图 2)。

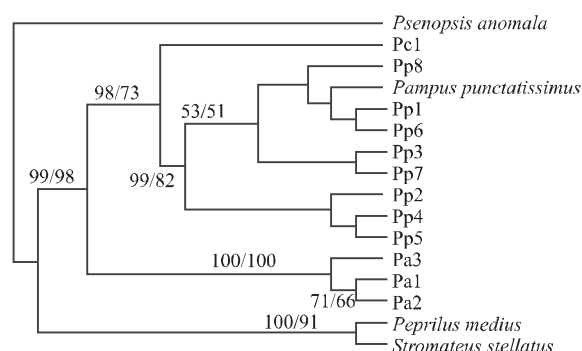


图2 基于线粒体 COI 序列重建的鲳属鱼类系统进化树 (图中数字分别表示 NJ 和 ML 的置信度, 小于 50 的未显示)

Pa- 银鲳, Pc- 中国鲳, Pp- 翎鲳。

Fig.2 Reconstruction of phylogenetic tree in the *Pampus* genus based on mitochondrial COI gene fragment (numbers indicate bootstrap confidence values of NJ and ML, and the values less than 50 were not shown)

Pa *P. argenteus*, Pc *P. chinensis*, Pp *P. punctatissimus*.

从系统进化树可以看出, 本研究所得的翎鲳 COI 序列 8 个单倍型与 GenBank 中下载的翎鲳 COI 序列聚为 1 支, 尔后与中国鲳聚在一起, 3 个银鲳单倍型聚为另 1 支, 最后 3 种鲳属鱼类聚在一起, 置信度均在 90% 以上。在这 3 种鲳属鱼类中, 银鲳是最早分化出来的种, 中国鲳和翎鲳是较晚分化的种。

2.5 中性检验

由于中国鲳只定义了 1 个单倍型, 故只对银鲳和翎鲳 2 个物种进行种间差异度检验, 采用 K_a/K_s (Nei-Gojobori method) 和 MK (McDonald-Kreitman test) 检验进行。

通过 K_a/K_s (Nei-Gojobori method) 检验, 结果表明 K_a/K_s 均小于 1 (表 2), 提示在该基因位点上可能存在负选择 (Negative selection) 也叫纯化选择

(Purifying selection)。

采用 McDonald 和 Kreitman 的检验方法进行检验, 结果显示, 种间错义突变 (Nonsynonymous) 和同义突变 (Synonymous) 位点数分别是 5 和 55, 而种内则是 4 和 6。中立指数 (Neutrality Index, 缩写为 NI) 为 7.333, G 值为 5.832, P 值为 0.015 74 ($0.01 < P < 0.05$), 差异较显著。该结果提示, 物种间的错义突变数目大于基于种内多态性估计得到的期望值, 说明线粒体 COI 基因在两物种进化过程中受到了选择作用。

3 讨论

3.1 3种鲳属鱼类线粒体COI基因片段比较

本研究所测 COI 基因序列片段与 GenBank 中翎鲳相关序列相似性达到 86% 以上。在所测的 COI 基因序列中有一翎鲳序列 (Pp1) 与 GenBank 中序列完全相同, 所编码氨基酸序列未出现终止子, 这说明本研究所得序列是 mtDNA COI 序列而非核假基因。通过对 3 种鲳属鱼类线粒体 COI 序列片段的比较, 发现每个种均有区别于其他种的特异位点, 因而可以考虑作为鉴别该种的分子标记。

从原核生物到真核生物, 其基因组中密码子使用偏向性的现象广泛存在。这一现象的产生与诸多因素有关, 如基因的表达水平、翻译起始效应、基因的碱基组成^[25]、基因的长度、以及密码子反密码子间结合能力的大小^[26]。在碱基组成上, 本研究基因片段 T 含量最高, UUC 和 AUU 的高使用频率可能与之有关。3 种鱼类线粒体 COI 编码同义密码子使用偏向性高度一致, 这说明亲缘关系较近的物种具有相近的密码子用法。

3.2 东海鲳属鱼类分类归属问题

从 20 世纪以来, 国内外鱼类分类学家对鲳属鱼类种类划分和命名说法不一。刘静等^[12]在总结前人研究结果的基础上, 从形态和地理分布对中国沿海鲳属鱼类进行了重新划分, 认为鲳属在中国沿海分布有 5 个种: 银鲳 (*P. argenteus*)、灰鲳 (*P. cinereus*)、中国鲳 (*P. chinensis*)、翎鲳 (*P. punctatissimus*)、珍鲳 (*P. minor*)。笔者曾从浙江舟山海域采集到大量鲳属鱼类, 经形态特征鉴定有 3 种: 银鲳、翎鲳和中国鲳 (鉴定结果未显示), 其中翎鲳数量最多, 未发现灰鲳和珍鲳样品, 同时对其线粒体 COI 基因的研究结果也证实只有这 3 种鲳属鱼类。因许多文献有采自东海灰鲳的报道^[1,27]。

为进一步验证东海广泛分布的究竟是何种鲳属鱼类,笔者在东海近海和外海又采集到大量鲳鱼,经形态和分子生物学鉴定也是翎鲳,未发现灰鲳,这说明翎鲳可能广泛分布于东海,一些文献中提到的东海灰鲳实际上很可能就是分类学上的翎鲳^[1,27]。

本实验曾在浙江舟山采集到中国鲳样品,这说明东海亦有中国鲳分布,而刘静等^[9]认为中国鲳分布于台湾海峡中南部及南海北部沿海。此观点有待于商榷。

表 2 银鲳和翎鲳的同义替换和非同义替换
Tab.2 Synonymous(K_s) and nonsynonymous(K_a) substitution of *P. argenteus* and *P. punctatissimus*

两两比对 Pairwise	K_s	K_a	K_a/K_s	两两比对 Pairwise	K_s	K_a	K_a/K_s
Pa1-Pa2	0.0089	0	0.0000	Pa3-Pp8	0.824	0.0184	0.0223
Pa1-Pa3	0	0.0028	—	Pp1-Pp2	0.0178	0	0.0000
Pa1-Pp1	0.8196	0.0213	0.0260	Pp1-Pp3	0.0088	0	0.0000
Pa1-Pp2	0.8196	0.0213	0.0260	Pp1-Pp4	0.0267	0.0028	0.1049
Pa1-Pp3	0.7937	0.0213	0.0268	Pp1-Pp5	0.0268	0.0028	0.1045
Pa1-Pp4	0.7896	0.0242	0.0306	Pp1-Pp6	0	0.0028	--
Pa1-Pp5	0.8463	0.0241	0.0285	Pp1-Pp7	0.0088	0.0028	0.3182
Pa1-Pp6	0.8196	0.0241	0.0294	Pp1-Pp8	0	0	--
Pa1-Pp7	0.7896	0.0242	0.0306	Pp2-Pp3	0.0268	0	0.0000
Pa1-Pp8	0.8196	0.0213	0.0260	Pp2-Pp4	0.0088	0.0028	0.3182
Pa2-Pa3	0.0090	0.0028	0.3111	Pp2-Pp5	0.0088	0.0028	0.3182
Pa2-Pp1	0.8196	0.0213	0.0260	Pp2-Pp6	0.0178	0.0028	0.1573
Pa2-Pp2	0.8196	0.0213	0.0260	Pp2-Pp7	0.0267	0.0028	0.1049
Pa2-Pp3	0.7937	0.0213	0.0268	Pp2-Pp8	0.0178	0	0.0000
Pa2-Pp4	0.7896	0.0242	0.0306	Pp3-Pp4	0.0358	0.0028	0.0782
Pa2-Pp5	0.8463	0.0241	0.0285	Pp3-Pp5	0.0359	0.0028	0.0780
Pa2-Pp6	0.8196	0.0241	0.0294	Pp3-Pp6	0.0088	0.0028	0.3182
Pa2-Pp7	0.7896	0.0242	0.0306	Pp3-Pp7	0	0.0028	--
Pa2-Pp8	0.8196	0.0213	0.0260	Pp3-Pp8	0.0088	0	0.0000
Pa3-Pp1	0.8240	0.0184	0.0223	Pp4-Pp5	0.0177	0	0.0000
Pa3-Pp2	0.8240	0.0184	0.0223	Pp4-Pp6	0.0267	0.0056	0.2097
Pa3-Pp3	0.7979	0.0184	0.0231	Pp4-Pp7	0.0357	0.0056	0.1569
Pa3-Pp4	0.7937	0.0213	0.0268	Pp4-Pp8	0.0267	0.0028	0.1049
Pa3-Pp5	0.8510	0.0212	0.0249	Pp5-Pp6	0.0268	0.0056	0.2090
Pa3-Pp6	0.8240	0.0212	0.0257	Pp5-Pp7	0.0358	0.0056	0.1564
Pa3-Pp7	0.7937	0.0213	0.0268	Pp5-Pp8	0.0268	0.0028	0.1045

注: Pa- 银鲳, Pc 中国鲳, Pp 翎鲳。
Note: Pa-*P. argenteus*, Pc *P. chinensis*, Pp *P. punctatissimus*.

3.3 3种鲳属鱼类系统进化分析

线粒体基因组具有丰富的遗传进化分析线索。在 mtDNA 的基因序列中,由于受到的选择压力不同导致各个区域进化速率不同。研究者可以根据研究对象的系统分类关系选择待测分析序列,例如, D-Loop 由于进化速度较快比较适于群体遗传

学及近缘种间的分析研究^[28], 12S rRNA、16S rRNA 及 CO 氧化酶亚单位等适于种属间至科级以下分类阶元的探讨^[29-30]。由于材料限制,本研究只对鲳属 3 个种进行了分析,从遗传距离分析来看,银鲳和中国鲳的遗传距离最远 (0.165~0.168),和翎鲳的遗传距离次之 (0.151~0.162),翎鲳和中国鲳的遗传距离

最近 (0.058~0.065)。从分子进化树可以看出, 翎鲷和中国鲷的进化关系最近, 它们聚为 1 支, 而后再与银鲷聚在一起, 这说明银鲷是较早分化出来的一个种。刘静等^[12] 利用形态学对鲷属鱼类的研究认为, 银鲷具有鳃耙数目多、下颌牙齿少等近祖特征, 是较原始、分化较早的种; 中国鲷具有背鳍和臀鳍无鳍棘、鳍条数目较多、鳃耙数少且短等特征, 是较特化的种; 翎鲷是较晚形成的种。可见, 基于线粒体 COI 基因片段的鲷属鱼类分类和系统进化研究结果与形态学研究结果一致。

3.4 中性检验

自 1983 年 DNA 测序技术用于群体遗传研究以来, 在 DNA 水平上寻找自然选择作用成了进化生物学界的一个热点问题^[31-32], 在很多基因中都检测到了自然选择的存在^[33-34]。目前基于种间差异数据自然选择作用检验的方法有 K_a/K_s 和 MK 检验。这 2 种方法都是基于中性假说为零假设, 通过统计学的检验方法分析 DNA 数据的, 该假说认为种内 DNA 多态性和种间 DNA 分歧度的进化速率应该一致, 即种内多态性与种间分歧度在中性模型下应当成比例, 若通过检验, 种内多态性与种间分歧度存在显著的偏差, 则暗示选择作用的存在。在 K_a/K_s 检验中, K_a/K_s 大于 1, 提示可能存在正选择; K_a/K_s 小于 1, 表明存在负选择 (Negative selection) 或者叫纯化选择 (Purifying selection); K_a/K_s 等于 1 则表明该位点没有选择, 是中性进化的 (Neutral site)^[23]。若突变发生在第 1、2 位点, 极易引起错义突变, 一旦有害的错义突变发生, 由于负选择的作用而被淘汰, 因而检测到的突变大多发生在第 3 位点。一般情况下, DNA 序列的 K_a/K_s 值由于负选择的作用小于 1。本研究除了 4 对 K_s 为零无法计算外, K_a/K_s 均小于 1, 这暗示着负选择的存在。MK 检验的结果显示: 5/55 (种间差异) 和 4/6 (种内多态) 差异较显著 ($G=5.832$, $P=0.015\ 74$), 说明该基因受到了自然选择的作用。这两种检验结果均支持自然选择在银鲷和翎鲷线粒体 COI 基因序列差异形成过程中起了一定的作用。

致谢: 东海水产研究所林龙山博士帮助采样, 程起群博士、何利军博士在数据处理时给予指导, 特别是邓思明研究员协助鉴定样品, 谨致谢忱。

参考文献:

- [1] 柳卫海, 詹秉义. 东海区鲷鱼资源利用现状分析 [J]. 湛江海洋大学学报, 1999, 19 (1): 30-34.
- [2] Gill T N. Notes on the Stromateidae [J]. Proc Amer Soc, 1884, 21 (116): 664-672.
- [3] Haedrich R L. The Stromateoid fishes: Systematics and a classification [J]. Bull Mus Comp Zool, 1967, 135 (2): 31-39.
- [4] Fowler H L. A Synopsis of the Fishes of China [A]. Netherlands: Antiquariaat Junk, 1972: 296-305.
- [5] 伍汉霖. 鲷科, 福建鱼类志 [M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1985: 430-436.
- [6] 成庆泰, 杨文华. 鲷科, 东海鱼类志 [M]. 北京: 科学出版社, 1963: 406-411.
- [7] 成庆泰. 鲷科, 南海鱼类志 [M]. 北京: 科学出版社, 1962: 759-766.
- [8] Liu J, Li C S. Redescription of a stromateoid fish, *Pampus punctatissimus* (T. et S., 1845) and comparison with *Pampus argenteus* (Euphrasen, 1788) [J]. Chin Oceanol Limnol, 1998, 16 (2): 161-166.
- [9] 刘静, 李春生, 李显森. 中国鲷属鱼类系统发育和动物地理学研究 [C]. 海洋科学集刊, 2002, 44: 235-239.
- [10] 王义权, 许群山, 彭宣宪, 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 [J]. 动物学报, 2004, 50 (2): 202-208.
- [11] Doiuchi R, Nakabo T. Molecular phylogeny of the stromateoid fishes (Teleostei: Perciformes) inferred from mitochondrial DNA sequences and compared with morphology-based hypotheses [J]. Mol Phylogen Evolut, 2006, 39: 111-123.
- [12] 刘静, 李春生, 李显森. 中国鲷属鱼类的分类研究 [C]. 海洋科学集刊, 2002, 44: 240-252.
- [13] Sparks J S. Molecular phylogeny and biogeography of the Malagasy and South Asian cichlids (Teleostei: Perciformes: Cichlidae) [J]. Molec Phylogen Evol, 2004, 30: 599-614.
- [14] Sparks J S, Smith W L. Phylogeny and biogeography of the Malagasy and Australasian rainbowfishes (Teleostei: Melanotaenioidei): Gondwanan vicariance and evolution in freshwater [J]. Molec Phylogen Evol, 2004, 33: 719-734.
- [15] 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]. Molec Phylogen Evol, 2005, 35: 127-146.
- [16] 付景, 张迎春. 27 种瓢虫 mtDNA-COI 基因序列分析及系

- 统发育研究(鞘翅目:瓢虫科)[J]. 昆虫分类学报, 2006, 28(3): 179-186.
- [17] Palumbi S R, Kessing B D. Population biology of the Trans-arctic exchange: mtDNA sequence similarity between Pacific and Atlantic sea urchins[J]. *Evolution*, 1991, 45(8): 1790-1805.
- [18] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5(2): 150-163.
- [19] Posada D, Crandall K A. Modeltest: testing the model of DNA substitution[J]. *Bioinformatics*, 1998, 14(9): 817-818.
- [20] Swofford D L. PAUP: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and Other Methods) Version 4[Z]. Sunderland: Sinauer Associates, 1998.
- [21] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap[J]. *Evolution*, 1985, 39: 783-791.
- [22] Jobb G. TREEFINDER version of May 2007[Z]. Munich: Distributed by the author at www.treefinder.de. 2007.
- [23] Nei M, Gojobori T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions[J]. *Mol Biol Evol*, 1986, 3: 418-426.
- [24] McDonald J, Kreitman M. Adaptive protein evolution at the Adh locus in *Drosophila*[J]. *Nature*, 1991, 6328(351): 652-654.
- [25] Fedorov A, Saxonov S, Gilbert W. Regularities of context-dependent codon bias in eukaryotic genes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(5): 1192-1197.
- [26] 石秀凡, 黄京飞, 梁宠荣, 等. 人类基因中同义密码子的偏好与密码子反密码子间的结合强度密切相关吗?[J]. *科学通报*, 2000, 45(23): 2520-2525.
- [27] 汤建华, 吴磊, 高银生, 等. 吕泗渔场灰鲳 *Pampus cinereus* (Bloch) 产卵群体生物学及利用状况[J]. *现代渔业信息*, 2006, 21(12): 10-13.
- [28] 胡文草, 段子渊, 王金富, 等. 新疆3种雅罗鱼线粒体DNA控制区序列的差异和系统进化关系[J]. *遗传学报*, 2004, 31(9): 970-975.
- [29] Apostolidis A P, Mamuris Z, Triantaphyllidis C. Phylogenetic relationships among four species of Mullidae (Perciformes) inferred from DNA sequences of mitochondrial cytochrome *b* and 16S rRNA genes[J]. *Biochem System Ecol*, 2001, 29: 901-909.
- [30] Thacker C E. Molecular phylogeny of the gobioid fishes (Teleostei: Perciformes: Gobioidae) [J]. *Molec Phylogen Evol*, 2003, 26: 354-368.
- [31] Kreitman M. Nucleotide polymorphism at the alcohol dehydrogenase locus of *Drosophila melanogaster* [J]. *Nature*, 1983, 304(5925): 412-417.
- [32] 周琦, 王文. DNA水平自然选择作用的检验[J]. *动物学研究*, 2004, 25(1): 73-80.
- [33] Long M, Langley C H. Natural selection and the origin of *jingwei*, a chimeric processed functional gene in *Drosophila* [J]. *Science*, 1993, 260: 91-95.
- [34] 程起群, 韩金娣, 王云龙, 等. 凤鲚两群体线粒体细胞色素 *b* 基因片段多态性及进化特征[J]. *中国水产科学*, 2006, 13(3): 337-343.

Sequence variation and molecular phylogeny of mitochondrial COI gene segments from three pomfret species

ZHANG Feng-ying^{1,2}, MA Ling-bo¹, SHI Zhao-hong¹, MA Chun-yan¹

(1. East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Key and Open Laboratory of Marine and Estuarine Fisheries, Ministry of Agriculture, Shanghai 200090, China; 2. East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: Pomfret species, affiliated to the Perciformes order, Stromateoidei suborder, Stromateidae family, has high nutritional and economic value. There has been much controversy in their taxonomy ever since 1960's and phylogenetic relationship are still obscure. The researches on the taxonomy were reported only by morphological characters, such as gill raker, pyloric caeca, otolith, head and vertebra, but few by molecular phylogenetic data. Phylogenetic relationships of 3 pomfret species, *Pampus argenteus*, *P. punctatissimus* and *P. chinensis*, collected from the East China Sea, were analyzed by sequence variations of mitochondrial COI gene fragments in this study. PCR amplification products of 603 bp COI gene fragments were obtained and sequenced, and 109 variable sites were detected in 3 pomfret species. The average contents of T, C, A and G were 34.2%, 22.3%, 25.9% and 17.6 %, respectively. Twelve different haplotypes were defined, including one haplotype in *P. chinensis*, three haplotypes in *P. argenteus*, and eight haplotypes in *P. punctatissimus*. Obvious codon usage bias was found in three species. The genetic distances were from 0.165 to 0.168 between *P. argenteus* and *P. chinensis*, from 0.151 to 0.162 between *P. argenteus* and *P. punctatissimus*, and from 0.058 to 0.065 between *P. punctatissimus* and *P. chinensis*. The computer program Modeltest was used to determine the optimal model of nucleotide evolution. Molecular phylogenetic trees were constructed with *Psenopsis anomala* as the outgroup using neighbor-joining and maximum likelihood methods. The two methods resulted in well-resolved trees with most nodes being supported by moderate to high support values. Phylogenetic relationship showed that 3 pomfret species were clustered in one clade, in which *P. punctatissimus* and *P. chinensis* clustered as sister species, and *P. argenteus* was the earliest species diverged. Neutrality test of K_a/K_s (Nei-Gojobori method) and MK (McDonald-Kreitman test) suggested that natural selection at DNA level occurred in mitochondrial COI genes during the evolution history of *Pampus* genus. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (3): 392–399]

Key words: *Pampus*; mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) gene; sequence variation; molecular phylogeny; natural selection

Corresponding author: MA Ling-bo. E-mail: malingbo@vip.sina.com