

基于形态特征和线粒体 16S rRNA 基因序列探讨棱鳀属的系统进化

马春艳^{1,2}, 马凌波², 倪勇², 沈盎绿², 张永², 张凤英², 赵云龙¹

(1. 华东师范大学 生命科学学院, 上海 200062; 2. 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资源及生态重点开放实验室, 上海 200090)

摘要: 对6种棱鳀属 (*Thryssa* Cuvier 1829) 鱼类共21个个体的16S rRNA基因进行PCR扩增, 经比对校正得到572 bp的基因片段, 共检测到8个单倍型, 棱鳀属6个种所有单倍型之间共存在8个插入/缺失; 此外有99个变异位点, 其中简约信息位点87个; 多态位点比例为17.3%; 序列中转换多于颠换, 转换/颠换之比为1.6; A+T含量(53.6%)明显高于C+G含量(46.4%), 序列表现出明显的T偏倚。基于Kimura双参数法, 计算的种间遗传距离介于0.4% [黄吻棱鳀 (*T. vitirostris*) 与中颌棱鳀 (*T. mystax*)] 到11.33% [黄吻棱鳀与赤鼻棱鳀 (*T. kammalensis*)] 之间。以日本鳀 (*Engraulis japonicus*) 和欧洲鳀 (*Engraulis encrasicolus*) 为外群构建的NJ树和ML树中, 赤鼻棱鳀位于进化树的基部, 是最早分化出来的种; 进化树显示, 黄吻棱鳀和中颌棱鳀关系最近。本研究结果支持形态学得出的赤鼻棱鳀最先分化的结论, 认为中颌棱鳀和黄吻棱鳀可能为同一个种, 至于汉氏棱鳀 (*T. hamiltonii*) 和杜氏棱鳀 (*T. dussumieri*) 的分类地位有待进一步确认。[中国水产科学, 2010, 17(3): 471–477]

关键词: 线粒体DNA; 16S rRNA; 棱鳀属; 系统进化

中图分类号: Q959

文献标识码: A

文章编号: 1005–8737–(2010)03–0471–07

棱鳀属 (*Thryssa* Cuvier 1829) 隶属于鲱形目 (Clupeiformes), 鳀科 (Engraulidae), 分布于印度–太平洋。据报道, 中国棱鳀属有6个种, 即杜氏棱鳀 (*T. dussumieri*)、汉氏棱鳀 (*T. hamiltonii*)、赤鼻棱鳀 (*T. kammalensis*)、中颌棱鳀 (*T. mystax*)、长颌棱鳀 (*T. setirostris*) 和黄吻棱鳀 (*T. vitirostris*)^[1–3]。棱鳀属是1类近海小型中上层鱼类, 在食物网的能量与转换中起着承上启下的作用。前人对棱鳀属鱼类的研究偏重于形态比较和分类方面^[1–4]。由于形态特征容易受环境的影响, 不同鱼类长期生活在相似的环境中可能会使得它们在外形及骨骼形态上表现出较高的相似性, 因此, 仅根据形态特征来对这些外形相似物种进行分类和亲缘关系分析, 会有一定的偏差。

近年来分子系统学及DNA分子技术的快速发展, 使得从分子水平研究鱼类物种间的亲缘关系及进行物种鉴定成为可能。线粒体DNA由于具有结构简单、无重组、多数呈母性遗传等特点, 已成为群体遗传分化和系统进化研究的重要研究对象^[5–8]。通过聚合酶链式反应 (PCR) 技术和测序技术相结合来对线粒体特定基因进行序列分析, 已经成功地用于鱼类系统进化研究^[9–12]。本研究以棱鳀属鱼类为研究对象, 对其16S rRNA基因片段序列进行分析, 结合形态学鉴定, 对中国棱鳀属鱼类的亲缘关系进行分析, 以期从分子生物学角度为其分类提供证据, 并探索棱鳀属鱼类的分子系统进化关系。

收稿日期: 2009–08–14; 修订日期: 2009–11–10。

基金项目: 国家科技基础条件平台建设子项目课题 (2004DKA30470–004); 中央级公益性科研院所基本科研业务费项目 (2007Z01, 2008M08)。

作者简介: 马春艳 (1978–), 女, 助理研究员, 硕士, 主要从事水产动物遗传学研究。E-mail: mc0527@yahoo.com.cn

通讯作者: 马凌波, 研究员, 研究方向为生物技术和遗传育种。Tel: 021–65688139; E-mail: malingbo@vip.sina.com

赵云龙, 教授。Tel: 021–62232153; E-mail: ylzhaobio@ecnu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料

本研究以中国棱鳀属6个种作为实验材料,采集地点、时间及样本数量如表1所示。

1.2 方法

1.2.1 形态学鉴定 对体质量、体长、各鳍的鳍条数、鳃耙数等进行定量测定。

1.2.2 DNA提取 基因组DNA提取参照文献[13]

的方法进行。具体而言,取鱼尾部肌肉100 mg,加600 μ L抽提缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 100 mmol/L EDTA, pH 8.0),剪碎组织,加入SDS和蛋白酶K(终浓度分别为1%和200 μ g/mL),55 $^{\circ}$ C水浴消化至溶液透明。待冷却后,分别加入等体积酚、酚:氯仿:异戊醇(25:24:1),氯仿各抽提1次。2倍体积预冷的无水乙醇沉淀DNA,70%乙醇洗涤,自然干燥后溶于TE(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 1 mmol/L EDTA, pH 8.0)溶液中,4 $^{\circ}$ C保存。

表1 6种棱鳀属鱼类实验材料来源信息
Tab. 1 Origins of six *Thryssa* fish samples

种类 Species	种名缩写 Abbreviation	采样地点 Collection sites	采样时间 Collection time	样本量 Sample size
杜氏棱鳀 <i>T. dussumieri</i>	DS	福清兴化湾	2008-9-4	5
汉氏棱鳀 <i>T. hamiltonii</i>	HS	福清兴化湾	2008-9-6	5
赤鼻棱鳀 <i>T. kammalensis</i>	CB	温州洞头	2008-11-7	3
中颌棱鳀 <i>T. mystax</i>	ZH	温州洞头	2008-11-6	2
长颌棱鳀 <i>T. setirostris</i>	CH	福清兴化湾	2008-9-5	1
黄吻棱鳀 <i>T. vitirostris</i>	HW	温州洞头	2008-9-5	5
欧洲鳀 <i>Engraulis encrasicolus</i>	OT	GenBank	—	1
日本鳀 <i>E. japonius</i>	RT	GenBank	—	1

1.2.3 线粒体16S rRNA基因片段扩增 所用引物序列为16SAR: 5' - GCC TGT TTA TCA AAA ACA T -3', 16SBR: 5' - CCG GTC TGA ACT CAG ATC ACG T -3' (上海生工合成)。PCR反应体系总体积为25 μ L, 包括2.0 mmol/L $MgCl_2$, 0.2 mmol/L dNTP, 0.2 μ mol/L每种引物, 1 U *Taq* plus DNA聚合酶(上海生工), 1 $\times$ *Taq*聚合酶缓冲液以及30 ng基因组DNA。反应条件为94 $^{\circ}$ C预变性2 min后经过30个循环, 每个循环包括94 $^{\circ}$ C 45 s, 50 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 最后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。

PCR产物用含EB的1.5%琼脂糖凝胶(1 $\times$ TAE配制)电泳检测, 复日FR980型凝胶成像系统拍照记录; 所用的分子量标准为DL2000(TaKaRa产品)。PCR产物用UNIQ-10(上海生工)柱式纯化试剂盒纯化, 纯化产物在ABI3130型自动测序仪上进行测序。

1.2.4 数据处理 结合从GenBank中下载的序列, 利用Clustal X (1.83)^[14]对序列进行对位排列, 并结合人工校正, 确定单倍型。通过MEGA3.0软件^[15]分析序列的碱基组成、变异位点, 同时基于Kimura双参数法计算种间的遗传距离^[16]。设置日本鳀(*Engraulis japonius*) (AB040676)和欧洲鳀(*Engraulis encrasicolus*) (AP009137)为外群, 分别采用NJ法(Neighbor-joining)以及最大似然法(Maximum Likelihood)对序列数据进行分析, 采用Modeltest软件确定序列最适合的进化模式, 采用Modeltest分析得到的最大似然距离参数进行分析和系统重建。其中NJ法使用MEGA3.0软件^[15], Bootstrap置信值估算重复次数1 000次; ML法通过数据分组策略, 利用Treefinder对Modeltest获得的参数构建树, Bootstrap分析重复1 000次。

2 结果与分析

2.1 形态特征

作者对从浙江和福建沿海采集到的6种棱鳀鱼类进行了测定(表2)。赤鼻棱鳀吻突出,吻长等于眼径,上颌骨最短(为头长0.69~0.75倍),鳃耙数最多(23~25+29~31,总数为52~56),臀鳍条较少(28~31)。在吻短(其长小于眼径)的5个种中,汉氏棱鳀以上颌骨短(为头长0.81~0.90倍),鳃耙数较少(9+13~14,总数为22~23),不同于其他种

类。在上颌骨长的2种中,杜氏棱鳀以其上颌骨几伸达腹鳍(其长为头长1.46~1.55倍)和鳃耙数较多(13~14+18~19,总数为31~32),而与长颌棱鳀有明显的区别,后者上颌骨几伸达肛门(为头长2.29倍),鳃耙数少(6+9,总数为15)。中颌棱鳀与黄吻棱鳀上颌骨均伸达胸鳍基部(其长分别为头长的1.02~1.17倍和1.13~1.20倍),鳃耙分别为11~13+16~18(总数为27~31)和11~13+20~21(总数为31~34),背鳍条数有些分别为14和11~12。

表2 6种棱鳀属鱼类形态特征
Tab. 2 Morphological characteristics of six *Thryssa* species

种类 Species	背鳍 D	臀鳍 A	鳃耙数 Rake	腹棱数 VS	上颌骨伸达(为头长倍数) Maxillary extends to (Multiple of head length)	体长/mm SL	吻长: 眼径 SnL: DE
杜氏棱鳀 <i>T. dussumieri</i>	I, 13	34-36	13-14+18-19	15-16+8-9	几达腹鳍(1.46-1.55) Almost ventral fin	77-100	<
汉氏棱鳀 <i>T. hamiltonii</i>	I, 14	39-40	9+13-14	17-18+10-11	鳃孔(0.81-0.90) Gill hole	85.5-105	<
赤鼻棱鳀 <i>T. kammalensis</i>	I, 12	28-31	23-25+29-31	16+9-10	鳃盖(0.69-0.75) Gill cover	93-105	1
中颌棱鳀 <i>T. mystax</i>	I, 14	41	11-13+16-18	16-17+9	胸鳍基部(1.02-1.17) Basal pectoral fin	225-330	<
长颌棱鳀 <i>T. setirostris</i>	I, 14	41	6+9	16+9	肛门(2.29) Anus	64	<
黄吻棱鳀 <i>T. vitirostris</i>	I, 11-12	40	11-13-20-21	16-17+9+11	胸鳍基部(1.13-1.20) Basal pectoral fin	96-112	<

Note: SL=standard length; SnL=length of Snout; DE=diameter of eye; D=dorsal fin; A=anal fin; VS=ventral skull spine.

2.2 序列及变异

经PCR扩增,分别得到了6种棱鳀清晰的16S rRNA基因片段扩增产物,经测定得到的序列为572 bp(除去引物以及不能确定排序的序列区)。在所测得的21个序列中,共检测到8个单倍型(表3)。其中,杜氏棱鳀1个单倍型(DS1);汉氏棱鳀3个单倍型(HS1, HS4, HS5);赤鼻棱鳀1个单倍型(CB1);长颌棱鳀1个单倍型(CH1);黄吻棱鳀1个单倍型(HW1);中颌棱鳀2个单倍型(ZH1, HW1),其中1个单倍型与黄吻棱鳀完全相同。棱鳀属6个种所有单倍型之间共存在8个插入/缺失,此外有99个变异位点,其中简约信息位点87个,多态位点比例为17.3%。总体上看,序列中转换多于颠换,转换/颠换之比为1.6,说明序列突变还未达到饱和,各单倍型之间变异位点如表4所示。可见,

HW1和ZH1 2种单倍型之间仅2个碱基的差异(A-G, T-C)。在所有单倍型中,T、C、G、A的平均含量分别为31.4%、22.0%、22.2%和24.4%,其中A+T含量(55.8%)明显高于C+G含量(44.2%),序列表现出明显的T偏倚。碱基含量和单倍型编号见表3。基于Kimura双参数法,以转换+颠换/转换+颠换计算单倍型间的相对遗传距离(表5)。种间遗传距离介于0.4%(黄吻棱鳀与中颌棱鳀)到11.3%(黄吻棱鳀与赤鼻棱鳀)之间。

2.3 系统发育分析

以日本鳀和欧洲鳀为外群,采用MEGA3.0软件构建了NJ树,通过Modeltest 3.7软件采用标准的AIC方法分析56种进化模式,发现GTR+I+G模式为最佳模式,构建ML树,结果见图1。2种类型的系统进化树获得基本一致的拓扑结构,而且均强烈支持黄

表3 6种棱鯉线粒体16S rRNA片段碱基组成及单倍型
Tab. 3 Base composition of mitochondrial 16S rRNA gene segment and definition of haplotypes in six *Thyrssa* species

种类 Species	碱基含量/% Base composition				单倍型 Haplotype
	T(U)	C	A	G	
杜氏棱鯉 <i>T. dussumieri</i>	30.8	21.7	24.5	23.1	DS1
汉氏棱鯉 <i>T. hamiltonii</i>	31.2	22.1	22.2	24.5	HS1, HS4, HS5
赤鼻棱鯉 <i>T. kammalensis</i>	32.3	21.4	21.6	24.6	CB1
中颌棱鯉 <i>T. mystax</i>	30.5	22.6	20.6	26.3	ZH1, HW1
长颌棱鯉 <i>T. setirostris</i>	31.4	22.2	21.9	24.5	CH1
黄吻棱鯉 <i>T. vitirostris</i>	31.3	22.3	21.8	24.6	HW1
平均 Average	31.4	22.0	22.2	24.4	

表4 6种棱鯉属鱼类线粒体16S rRNA基因的变异位点
Tab. 4 Variable sites of mitochondrial 16S rRNA gene segment sequences in the six *Thyrssa* species

单倍型 Haplotype	变异类型和发生位点* Sequence variations and corresponding sites															
	11111	1111111111	1111111111	1111122222	2222222222	2222222222	2222222222	2222222222	2333333333	3333333344	5555555555	55	167711122	2333334445	5677788888	9999900012
	3642456813	9013454687	8628901579	4567812300	1025724571	3456901234	6789034567	9245785680	1233694003	6345678901	23					
CB1	CCTAGGGTTA	CTAGG-AT-A	AAAAACTGTT	TTTATCTTCG	TTTAGTTTCT	TTAGACTCGA	TAAGTAAGCC	CATGAAAAAA	TTAGATACTA	AACAATGATG	GG					
HS1	...TA....	.CG.-.-.-	TG.....C	G..TCTGG.T	.C..TGCCTG	..TAGTGAT.	.GT-CGG.T	TCCAGG.GG.	.A.A..G..T	...TTAT.GT	..					
HS2	...TA....	.G.-.-.-	TG.....C	G..TCTGG.T	.C..TGCCTG	..TAGTGAT.	.GT-CGG.T	TCCAGG.GG.	.A.A..G..T	...TTAT.GT	..					
HS3	G..TA....	.CG.-.-.-	TG.....C	G..TCTGG.T	.C..TGCCTG	..TAGTGAT.	.GT-CGG.T	TCCAGG.GG.	.A.A..G..T	...TTAT.GT	..					
DS1	...T.T....	.GTAAGG-G	T.G.GTC..	G..GCTGATC	...TACCTG	.GT.GTATTT	..T-CGG.TT	TCAGG.G..	AA...GTCT	G..TT..T.T	T.					
CH1	.TCT...CCG	T.G.-.-.-	T..G....C	GG.TCTGG..	.CCGT.CCTG	C.T.GTGT.T	A.-C.G.T.	TCAGGG.GG	.GT..CGT.T	GG.T.GT.GT	..					
HW1	...T..TC.G	T.G.A-.-.-	T.....A.	A.AGCTGA.T	CCA.T.CCTG	..T.GTAT.T	GG-CG.ATT	.CCAGGGGG.	GGG.C.G..T	G.TTT.C..T	.T					
ZH1	...T..TC.G	T.G.A-.-.-	T.....A.	A.AGCTGA.T	CCA.T.CCTG	..T.G.AT.T	GG-CG.ATT	.CCAGGGGG.	GGG.C.G..T	G.TTT.C..T	.T					

注: *表示变异发生位点的数字需竖读;“-”代表该位点缺失;“.”代表该位点与代表序列CB1相同。
Note: * Figures representing sequence variation sites need to be read vertically;“-” represents gaps;“.” represents identical nucleotides with the representative haplotype of CB1.

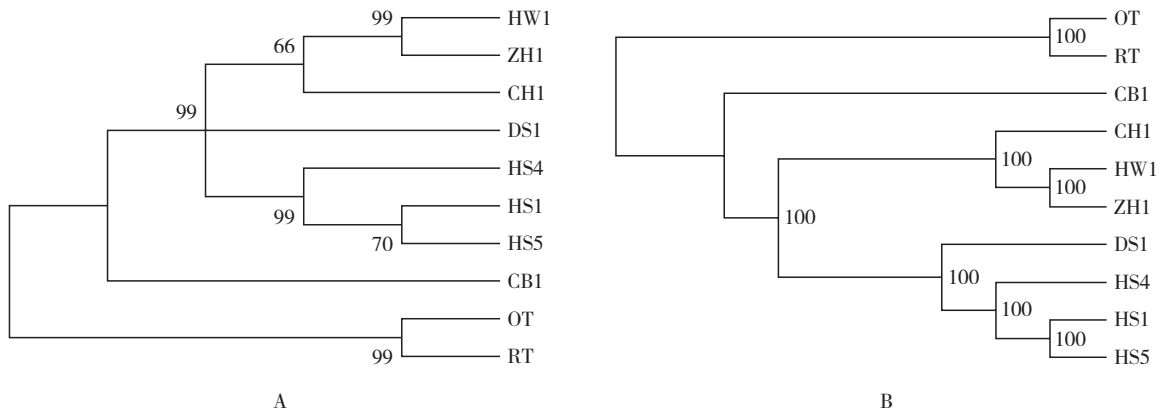


图1 基于6种棱鯉属鱼类线粒体16S rRNA基因序列的NJ(A)、ML(B)系统树
图中数字分别表示NJ和ML的置信度,小于50的未显示. HW1、ZH1、CH1、DS1、HS4、HS1、HS5、CB1 分别表示棱鯉属鱼类的8种单倍型, RT表示日本鯉, OT表示欧洲鯉.

Fig. 1 Construction of NJ(A) and ML(B) phylogenetic trees in the six *Thyrssa* species based on 16S rRNA gene sequences
Numbers indicate bootstrap confidence values of NJ and ML, and the values less than 50 were not shown. HW1, ZH1, CH1, DS1, HS4, HS1, HS5, CB1 donate eight haplotypes of six *Thyrssa* species. RT represents *Engraulis japonicus*. OT represents *Engraulis encrasicolus*.

表5 6种棱鯮属鱼类单倍型间的Kimura双参数法遗传距离
Tab. 5 Kimura-2 parameter genetic distance between the haplotypes of six *Thryssa* species

单倍型 Haplotype	CB1	HS1	HS4	HS5	DS1	CH1	HW1
CB1							
HS1	0.097						
HS4	0.099	0.002					
HS5	0.099	0.002	0.004				
DS1	0.113	0.071	0.069	0.073			
CH1	0.112	0.068	0.066	0.070	0.091		
HW1	0.116	0.067	0.065	0.069	0.079	0.075	
ZH1	0.113	0.067	0.065	0.069	0.079	0.075	0.004

吻棱鯮和中颌棱鯮亲缘关系最近,然后和长颌棱鯮聚为一支,赤鼻棱鯮位于进化树的基部,是6种棱鯮中最早分化出来的种;NJ树显示杜氏棱鯮和汉氏棱鯮平行进化,而ML树显示杜氏棱鯮和汉氏棱鯮聚在一起,两者均有很高的支持率。

3 讨论

棱鯮属鱼类主要形态特征是体长,侧扁。腹缘自鳃孔至肛门间有很发达的棱鳞。吻短或突出,上颌骨长,有时伸达臀鳍。口斜裂,两颌、颞骨颌舌上均具细齿。根据前人著作的分类检索可知,在中国棱鯮属鱼类的形态分类中,主要依据是上颌骨的长度^[1-3]。本研究中,中颌棱鯮与黄吻棱鯮这2个种的

主要特征很接近,唯有背鳍条数有些差别(前者为14,后者为11~12)。而张世义^[3]的数据表明,中颌棱鯮鳃耙为9~10+14~16(总数23~26),黄吻棱鯮为14~15+21~22(总数35~37);中颌棱鯮背鳍条为I,14~15,黄吻棱鯮为I,12~13,也表明这2种的区别特征不太明显。赤鼻棱鯮以吻突出、吻长等于眼径、上颌骨最短、鳃耙数最多和臀鳍条较少等特征显著区别于其他种。汉氏棱鯮以上颌骨短、鳃耙数较少区别于其他吻短的种类。杜氏棱鯮上颌骨几伸达腹鳍,而长颌棱鯮上颌骨几伸达肛门,明显区别于其他种。为了更好地探讨中国近海棱鯮属的系统进化,根据形态特征的分类检索,构建了本属鱼类的形态分类树(图2)。

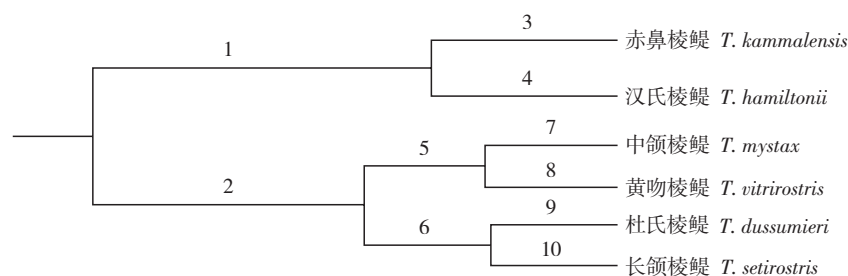


图2 6种棱鯮形态分类树

1-10代表分化顺序。

Fig. 2 Faxonomic tree of six *Thryssa* species based on morphological characters
Numbers 1-10 indicate the order of evolution.

将本研究得出的分子系统树与以上形态分类树进行比较,结合遗传距离等遗传信息来探讨棱鯮属鱼类的进化关系。

(1) 分子系统树将赤鼻棱鯮置于进化树的最基部,另外,赤鼻棱鯮与其他5种棱鯮的种间存在显著的核苷酸差异,与其他5种棱鯮间的遗传距离

(0.096 7 ~ 0.113 3) 大于其他种两两间的遗传距离 (0.004 ~ 0.095), 因此本研究结果支持形态学上的赤鼻棱鲷最先分化的结论。

(2) 从分子水平看, 本研究得到的NJ和ML树中, 依据文献[1-3]鉴定的黄吻棱鲷和中颌棱鲷亲缘关系最近, 二者具有很高的支持率(NJ-BP=99, ML-BP=100); 而且中颌棱鲷的1个单倍型与黄吻棱鲷完全一致, 另1个单倍型与黄吻棱鲷仅差2个碱基, 二者之间的遗传距离仅为0.004。从本研究形态鉴定结果和文献检索结果可以看出, 两者的外形特征相似, 可数性状重叠, 差异也不太明显。因此, 本研究认为中颌棱鲷和黄吻棱鲷差异小, 可能为同1个种。

(3) 在2种分子系统树中, 杜氏棱鲷和汉氏棱鲷的关系也有所差别, NJ树显示二者平行进化, 而ML树显示二者互为姊妹种, 且有较高的支持率, 因此二者的进化关系和分类地位有待进一步的探讨。

随着分子生物学技术的进步, 测定线粒体DNA序列可以直接反映碱基的置换、插入、缺失等实际情况, 比较不同物种或个体碱基序列的差异, 从而探讨进化关系, 比其他分析方法具有更大的优点。但在进行物种系统进化研究时, 由于一些变异不能及时积累, 导致较保守的基因不适用于分析一些进化年龄较短、分化快速的物种间的亲缘关系^[11, 17], 而且单个基因能提供的信息往往较为有限^[18]。因此, 若要确定中颌棱鲷和黄吻棱鲷是否应该归于同一个种, 还需在中国海域大范围地采集中颌棱鲷和黄吻棱鲷的样本进行进一步验证; 同时应采用进化速率不同的多个基因(包括线粒体和核基因)对棱鲷属进行研究, 以更好地阐明中国棱鲷属鱼类系统进化问题。

参考文献:

- [1] 邱书院. 鲷科棱鲷属[M]// 朱元鼎. 福建鱼类志. 上卷. 福州: 福建科学技术出版社, 1984: 137-146.
- [2] 贾文奎. 鲷形目, 鲷科[M]// 成庆泰, 郑葆珊. 中国鱼类系统检索. 上册. 北京: 科学出版社, 1987, 59-61.
- [3] 张世义. 中国动物志. 硬骨鱼纲 鲷形目、海鲢目、鲷形目、鼠鲭目[M]. 北京: 科学出版社, 2001, 137-147.
- [4] 李忠义, 金显仕, 庄志猛, 等. 南黄海春季鲷和赤鼻棱鲷的食物竞争[J]. 中国水产科学, 2007, 14(4): 630-636.
- [5] Avise J C, Arnold J, Ball R M, et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial bridge between population genetics and systematics [J]. Annu Rev Ecol Syst, 1987, 18: 489-522.
- [6] Brown W M. Evolution of animal mitochondrial DNA [M]// Nei M, Koehn R K. Evolution of genes and proteins. Sunderland, Mass: Sinauer Associates, 1983: 62-68.
- [7] Wilson A C, Cann R L, Carr S M, et al. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics [J]. Biol J Linn Soc, 1985, 26: 375-400.
- [8] Harrison R G. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology [J]. Trends Ecol Evol, 1989, 4: 6-11.
- [9] Miya M, Nishida M. Molecular phylogenetic perspective on the evolution of the deep-sea fish genus *Cyclothone* (Stomiiformes: Gonostomatidae) [J]. Ichthyol Res, 1996, 43: 375-398.
- [10] Morita T. Molecular phylogenetic relationships of the deep-sea fish genus *Coryphaenoides* (Gadiformes: Macrouridae) based on mitochondrial DNA [J]. Mol Phylogenet Evol, 1999, 13: 447-454.
- [11] Wang H Y, Tsai M P, Dean J, et al. Molecular phylogeny of Gobioid fishes (Perciformes: Gobioidae) based on mitochondrial 12S rRNA sequences [J]. Mol Phylogenet Evol, 2001, 20(3): 390-408.
- [12] Waters J M, Wallis G P. Mitochondrial DNA phylogenetics of the *Galaxias vulgaris* complex from South Island, New Zealand: rapid radiation of a species flock [J]. J Fish Biol, 2000, 58: 1166-1180.
- [13] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual [M]. 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [14] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools [J]. Nucl Acids Res, 1997, 25: 4876-4882.
- [15] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. Brief Bioinform, 2004, 5: 150-163.
- [16] Kimura M A. simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences [J]. J Mol Evol, 1980, 16: 111-120.
- [17] Summerer M, Hanel R, Sturmbauer C. Mitochondrial phylogeny and biogeographic affinities of sea breams of the genus *Diplodus* (Sparidae) [J]. J Fish Biol, 2001, 59: 1638-1652.
- [18] Cao Y, Sorenson M D, Kumazawa Y, et al. Phylogenetic position of turtles among amniotes: Evidence from mitochondrial and nuclear genes [J]. Gene, 2000, 259: 139-148.

Phylogenetic relationship of *Thryssa* inferred from morphologic characteristic and mitochondrial 16S rRNA gene sequences

MA Chunyan^{1,2}, MA Lingbo², NI Yong², SHEN Anglv², ZHANG Yong², ZHANG Fengying², ZHAO Yunlong¹

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

Abstract: To evaluate the phylogenetic relationship of 6 *Thryssa* species in China, the mitochondrial 16S rRNA genes of 21 individuals were amplified by using PCR techniques. About 600 bp fragments were obtained and sequenced. After alignment, a fragment of 572 bp nucleotide sequence which could be used for sequence analysis was obtained. The genetic information indices, including Kimura-2 parameter genetic distance and base composition were generated by using MEGA3.1 software and phylogenetic trees were constructed by Treefinder software. Among the 572 aligned base pairs, eight insertions/deletions and 99 variable sites were detected. The mutation types were mainly transitions and transversions. Transitions were found to be more common than transversions which suggested that the sequence mutation had not saturated. The average base compositions of all sequences were as follows: 31.4% T, 22.0% C, 22.2% A, and 24.4% G. We defined 8 haplotypes based on the 21 sequences. The genetic distances between haplotypes ranged from 0.004 to 0.113 3. Molecular phylogenetic tree was constructed by ML methods based on the 572 bp 16S rRNA gene sequences, with *Engraulis japonius* and *Engraulis encrasicolus* as the designated outgroup. The tree indicates a closer relationship between *T. mystax* and *T. vitrirostris*. *T. kammalensis* is basal in the ML tree. The result is consistent with the conclusion of morphological analysis and suggests that *T. mystax* and *T. vitrirostris* might be one species. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(3): 471–477]

Key words: mitochondrial DNA; 16S rRNA; *Thryssa*; phylogenetic relationship

Corresponding author: MA Lingbo. Tel: 021–65688139; E-mail: malingbo@vip.sina.com

ZHAO Yunlong. Tel: 021–62232153; E-mail: ylzhaobio@ecnu.edu.cn