

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2011.00508

北部湾 3 种金线鱼属鱼类 COI 基因序列的比较分析

董丽娜^{1,2}, 黄梓荣¹, 艾红¹, 卢伟华³, 李希国³, 李娜娜^{1,4}, 李夏¹, 李永振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;
3. 东莞市海洋与渔业环境监测站, 广东 东莞 523079;
4. 大连海洋大学 海洋工程学院, 辽宁 大连 116023

摘要: 运用直接测序法对产自北部湾的日本金线鱼(*Nemipterus japonicus*)、红棘金线鱼(*N. nemurus*)和苏门答腊金线鱼(*N. mesoprion*) 3种金线鱼属鱼类的线粒体 DNA 细胞色素氧化酶 I(COI)基因序列进行了测序分析, 并探讨了 3 种金线鱼之间的亲缘关系。在所分析的 48 条 COI 同源序列片段(696 bp)中共检测到 29 个单倍型和 104 个核苷酸多态位点。单倍型分析结果显示, 日本金线鱼和红棘金线鱼之间有明显的基因交流。序列差异分析和遗传距离比较结果显示, 日本金线鱼与红棘金线鱼之间亲缘关系较近, 无明显遗传分化。利用最大简约法(MP)和邻接法(NJ)构建的系统发育树显示, 日本金线鱼和红棘金线鱼混杂聚为一支, 而苏门答腊金线鱼单独聚为一支。研究结果表明, 日本金线鱼与红棘金线鱼的亲缘关系较近, 二者可能为同种, 而苏门答腊金线鱼则与日本金线鱼、红棘金线鱼亲缘关系较远。本研究为证实红棘金线鱼和苏门答腊金线鱼是 2 个不同的种提供了分子生物学的证据。

关键词: 金线鱼属; mtDNA; COI; 亲缘关系; 序列分析; 北部湾

中图分类号: S917 文献标志码: A 文章编号: 1005-8737-(2011)03-0508-07

金线鱼属(*Nemipterus*)鱼类分布于北太平洋西部海域, 中国主要分布在南海, 黄海和东海也有少量分布^[1-2]。该属鱼类食用价值高, 是南海重要经济鱼类^[3-7], 为底拖网、刺网和钓业的主要捕捞对象。日本金线鱼(*N. japonicus*)、红棘金线鱼(*N. nemurus*)和苏门答腊金线鱼(*N. mesoprion*)均隶属金线鱼科(Nemipteridae)、金线鱼属。目前对日本金线鱼、红棘金线鱼和苏门答腊金线鱼的鉴别仅依靠个别形态特征进行较粗略、简单的判别, 而国内外对金线鱼属鱼类的研究大部分也是从形态学、生态学和生化标记方面对其进行区分^[8-21], 用分子生物学的方法对金线鱼属鱼类的研究未见报道。近年来, 随着海洋渔业资源的开发利用, 特

别是由于近海生态环境遭到破坏和近海传统渔场的滥捕, 捕捞的金线鱼属鱼类个体小型化、低龄化现象日益凸显。有必要对金线鱼属鱼类自然群体的种间变异程度及亲缘关系进行分析和探讨, 以为渔业资源的保护和多国间鱼类捕捞配额的界定提供理论依据。

随着分子生物测序技术的发展, 基于基因序列测定的分子数据已被广泛应用在鱼类种群分析的各个方面。线粒体 DNA(mtDNA)是真核生物的核外遗传物质, 具有基因组结构简单、分子小、编码效率高、进化速率快、无组织特异性和母系遗传等特性。基于以上特性, 应用线粒体 DNA 及其片段的测序分析技术对鱼类种群进行分析更为

收稿日期: 2010-01-05; 修订日期: 2010-08-16.

基金项目: 国家科技基础性工作重点项目(2003DEA6N042); 科技部社会公益研究专项资金项目(2004DIB3J098); 广东省科技计划项目(2005B31001005, 2010B03080008); 国家财政专项项目(1999-2001).

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

客观。细胞色素氧化酶 (Cytochrome Oxidase subunit, COI) 基因是线粒体基因中的一段, 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^[22-23], 而且在物种鉴别应用上, 由于 COI 基因的便利快捷更是被称为“鉴别条码”^[24]。

北部湾海域是中越两国共有的优良渔场, 其鱼类繁殖周期长, 部分种类可全年繁殖, 怀卵量多, 幼鱼生长快, 性成熟年龄比较早, 鱼类资源恢复快^[25-26]。本研究对分布于北部湾海域的日本金线鱼、红棘金线鱼和苏门答腊金线鱼的 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亲缘关系和系统进化关系, 为金线鱼属鱼类保护生物学和系统进化提供分子生物学依据, 为金线鱼属鱼类的充分利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用鱼样于 2009 年 6 月和 9 月在北部湾海域东北部(日本金线鱼 11 尾, 红棘金线鱼 18 尾)和南部(苏门答腊金线鱼 19 尾)海域采集。取个体尾部肌肉少许, 置于 95% 的酒精中保存, 运回实验室后放置在 -20°C 冰箱中保存备用。

1.2 总 DNA 的提取

用购自上海生工生物工程技术服务有限公司的基因提取试剂盒进行 DNA 提取。取保存样品少许移入 1.5 mL EP 管中剪碎, 加 TE 缓冲液 200 μL , 加入 400 μL Cell Lysis Solution 混匀, 再加入 6 μL 蛋白酶 K 置于 55°C 水浴中 1 h, 其间上下混匀几次。再加入 600 μL 氯仿进行抽提, 100 μL 1.2 mol/L NaCl 和无水乙醇进行沉淀, 室温干燥后溶于双蒸水中, -20°C 冰箱保存备用。

1.3 PCR 扩增及电泳检测和测序

COI 基因序列的引物是根据其他鱼类相应序列设计的通用引物^[27], 由上海生工生物工程有限公司合成, 引物序列为: FF2d 5'-TTCTCCACC AACCACAARGAYATYGG-3'; FR1d 5'-CACCTCA GGGTGTCCGAARAAYCARAA-3'。PCR 反应总体积为 25 μL , 其中 $10\times\text{Taq Buffer}$ (Takara) 2.5 μL ,

Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa 5 U/ μL) 0.2 μL , dNTP (2.5 mmol/L) 各 0.5 μL , 引物 (20 mmol/L) 0.3 μL , 1 μL 模板 DNA, 其余用双蒸水补充。扩增条件为: 94°C 预变性 3 min, 之后进行 35 个循环 (94°C 30 s, 52°C 45 s, 72°C 50 s), 最后 72°C 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序列测定。ABI 3730 PRISM DNA 测序仪产生 ABI 文件, 通过软件 Chromos 分析。

1.4 数据分析

测序完成后用 Bioedit 软件进行多重比对。用 Mega 4.0 软件进行序列的分析, 包括序列长度、碱基组成及亲缘关系树的构建; 用 DnaSP 4.10 软件计算多态位点、种群内的核苷酸多样性 (nucleotide diversity, π)、单倍型多样性 (haplotype diversity, h) 及种群间的核苷酸歧异度 (nucleotide divergence, D_{xy}), 同时进行变异位点的中性检验。并用金线鱼科眶棘鲈属条纹眶棘鲈 (*Scolopsis taenioptera*) 和钻嘴鱼科柯氏缩口银鲈 (*Eucinostomus currani*) 做外群, 使用最大简约法 (MP) 和邻接法 (NJ) 构建系统树分析 3 种金线鱼属鱼类的亲缘关系, 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 扩增结果及 mtDNA COI 基因片段序列分析

本实验对 3 种金线鱼的 mtDNA COI 基因片段进行测序、比对, 结果得到 696 bp 的同源片段。实验共测得 48 个线粒体的 COI 序列, 其中日本金线鱼 11 个, 红棘金线鱼 18 个, 苏门答腊金线鱼 19 个。日本金线鱼平均碱基含量: A 为 23.2%, T 为 32.7%, C 为 26.3%, G 为 17.9%; 红棘金线鱼平均碱基含量: A 为 23.2%, T 为 32.7%, C 为 26.2%, G 为 17.9%; 苏门答腊金线鱼平均碱基含量: A 为 22.2%, T 为 31.1%, C 为 28.3%, G 为 18.4%。3 种鱼的 4 种碱基平均含量: A 为 22.8%, T 为 32.1%, C 为 27.0%, G 为 18.1%, 平均 G+C 的含量为 45.1%, 低于 A+T 的含量, 这与其他鱼类 mtDNA COI 基因同源序列的碱基特点相似^[28-30]。在 48 个个体

中共检测到核苷酸多态位点 104 个, 包括 22 个单一突变位点(singleton variable sites), 82 个简约信息位点(parsimony informative sites)。48 个序列测得 29 个单倍型, 单倍型比例为 60.42%。3 种金线鱼中日本金线鱼单倍型比例最高(82.8%), 苏门答腊金线鱼单倍型比例最低(42.1%)(表 1)。与单倍型比例相似, 日本金线鱼和红棘金线鱼单倍型多样性较高, 分别为 $0.963\ 64 \pm 0.051$ 和 $0.934\ 64 \pm 0.028$, 苏门答腊金线鱼单倍型多样性最低, 为 $0.614\ 04 \pm 0.042$ 。3 种金线鱼的核苷酸多样性均较低, 其中日本金线鱼的核苷酸多样性最高, 为 0.004 75, 红棘金线鱼的核苷酸多样性最低, 仅有 0.003 69。平均核苷酸差异仍是日本金线鱼最高, 为 3.309 09。

个体序列分析的结果表明, 日本金线鱼的遗传多样性最高, 红棘金线鱼的遗传多样性次之。并且日本金线鱼和红棘金线鱼有共同的单倍型(hap2, hap7), 这表明两者之间有基因交流。从变异位点、突变率、单倍型归属上分析, 日本金线鱼和红棘金线鱼 2 个种均比较接近, 说明日本金

线鱼和红棘金线鱼有着较近的亲缘关系。

2.2 群体间序列变异情况及遗传距离

经过 BLAST 分析比较, 证实所得序列为 COI 基因片段。将单倍型 2 与 GenBank 上提供的日本金线鱼 COI 基因进行同源序列比对, 结果显示, 两序列一致性高达 97.92%。

群体间的序列差异反映了其亲缘关系远近。表 2 列出了 3 种金线鱼序列差异的百分比, 日本金线鱼和红棘金线鱼之间的序列差异百分比最小, 仅为 0.445%, 表明两者之间同源性高, 变异程度小; 日本金线鱼和苏门答腊金线鱼之间序列差异百分比最大, 达 10.969%, 变异程度也最大。

由 MEGA 软件计算得出, 3 种金线鱼遗传距离为 0 ~ 0.370 7。经卡方检验显示 3 个种群间的遗传距离差异显著($P < 0.05$), 其中, 苏门答腊金线鱼与日本金线鱼遗传距离为 0.112 ~ 0.139, 苏门答腊金线鱼和红棘金线鱼的遗传距离为 0.112 ~ 0.135, 日本金线鱼和红棘金线鱼的遗传距离较小, 为 0 ~ 0.014 6(表 3)。

表 1 3 种金线鱼线粒体 COI 基因序列分析的统计参数

Tab.1 Statistical parameters of mtDNA COI gene in the three species of *Nemipterus* genus

群体 population	样本量 number of samples	单倍型数 number of haplotype	单倍型序号 serial number of haplotype	单倍型比例/% percentage of haplotype	单倍型多样性 haplotype diversity, H $\bar{x} \pm SD$	核苷酸多样性 nucleotide diversity, P	平均核苷酸差异 difference between haplotypes, K
日本金线鱼 <i>N. japonicus</i>	11	9	Hap1-Hap9	82.8	0.96364 ± 0.051	0.00475	3.30909
红棘金线鱼 <i>N. nemurus</i>	18	14	Hap2, Hap7, Hap10-Hap21	77.8	0.93464 ± 0.028	0.00369	2.56863
苏门答腊金线鱼 <i>N. mesoprion</i>	19	8	Hap22-Hap29	42.1	0.61404 ± 0.042	0.00457	3.18129

表 2 3 种金线鱼线粒体 COI 序列差异的百分比

Tab.2 Percentage of divergence for mtDNA COI sequences between the three species of *Nemipterus* genus %

群体 population	日本金线鱼 <i>N. japonicus</i>	红棘金线鱼 <i>N. nemurus</i>	苏门答腊金线鱼 <i>N. mesoprion</i>
日本金线鱼 <i>N. japonicus</i>	-	-	-
红棘金线鱼 <i>N. nemurus</i>	0.445	-	-
苏门答腊金线鱼 <i>N. mesoprion</i>	10.969	10.748	-

表 3 3 种金线鱼线粒体 COI 基因序列最小/最大遗传距离

Tab.3 Minimum/maximum genetic distance of mtDNA COI sequences between the three species of *Nemipterus* genus

群体 population	日本金线鱼 <i>N. japonicus</i>	红棘金线鱼 <i>N. nemurus</i>	苏门答腊金线鱼 <i>N. mesoprion</i>
日本金线鱼 <i>N. japonicus</i>	-	-	-
红棘金线鱼 <i>N. nemurus</i>	0/0.0146	-	-
苏门答腊金线鱼 <i>N. mesoprion</i>	0.112/0.139	0.112/0.135	-

2.3 系统进化聚类分析

以条纹眶棘鲈、柯氏缩口银鲈做外群, 构建 MP 系统树(图 1a)和 NJ 系统树(图 1b)。构建的 MP 树和 NJ 树均显示 3 个种形成 2 个大的支系, 1 个支系是由日本金线鱼和红棘金线鱼组成, 另 1 个支系是由苏门答腊金线鱼组成。

2.4 中性检验

根据等位基因变异频率检测 3 种金线鱼群体是否偏离中性进化。中性检验结果为 3 种金线鱼的 Tajima's D 值均为负(表 4), 表明 3 种金线鱼群

体内均存在大量的低频等位基因位点, 原因可能是存在净化选择(purifying selection), 也可能是群体中有轻微分离的有害突变, 或是由群体扩张引起的。但是日本金线鱼和红棘金线鱼检验结果不显著($P>0.05$), 符合中性检验的假设; 而苏门答腊金线鱼的检验结果显著($P<0.05$), 不符合中性进化假设。

3 讨论

北部湾渔场是优质渔场, 其特殊的地理位置

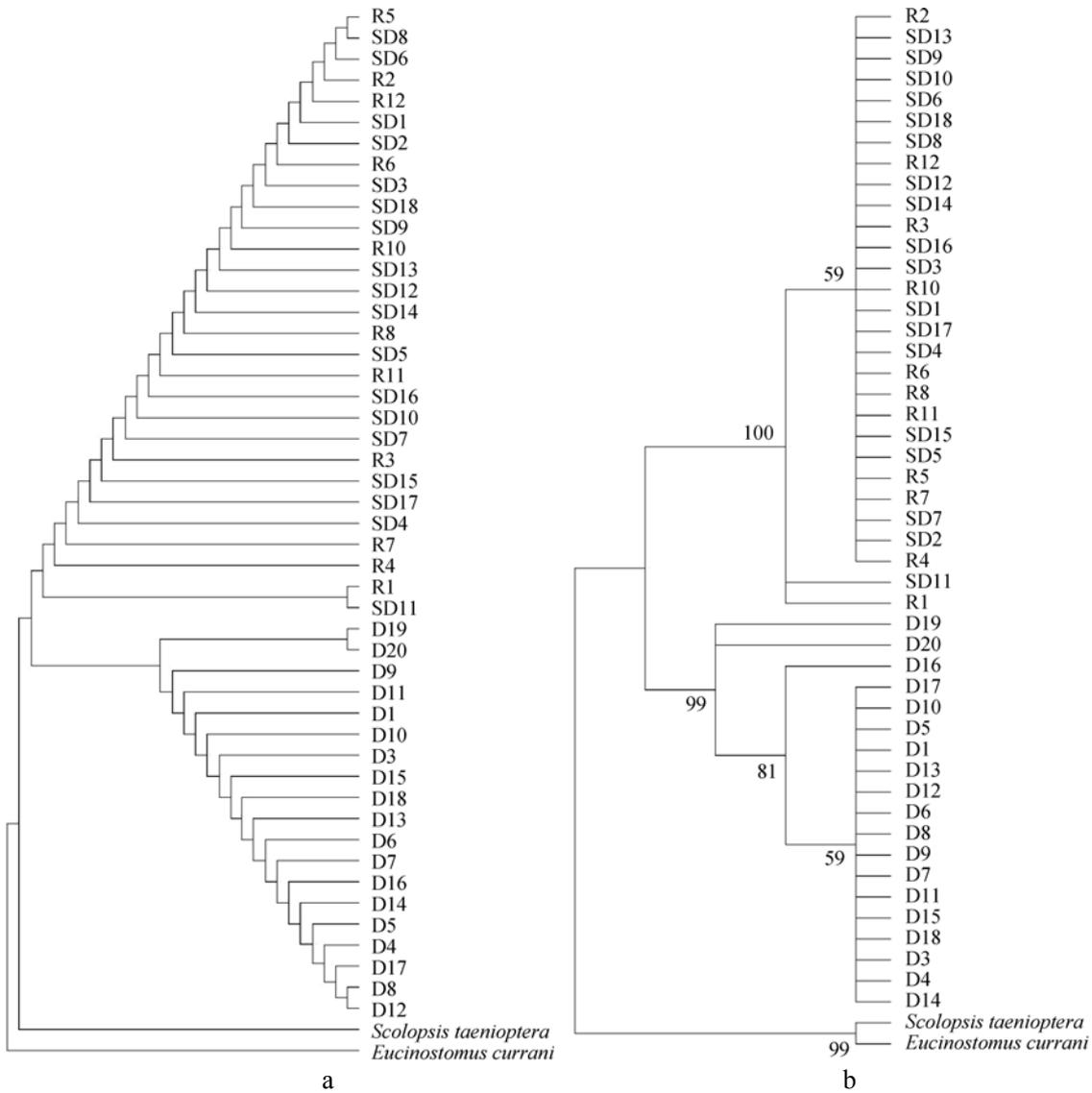


图 1 根据 3 种金线鱼之间遗传距离构建的 MP(a)和 NJ(b)系统进化树

R-日本金线鱼; SD-红棘金线鱼; D-苏门答腊金线鱼。NJ 树节点旁数据为 1 000 次自展检验后置信度值(%)。

Fig.1 Reconstruction of MP(a) and NJ(b) phylogenetic trees of the three *Nemipterus* spp. based on mitochondrial COI gene fragment R-*Nemipterus japonicus*; SD-*N. nemurus*; D-*N. mesoprion*. Numbers beside nodes represent bootstrap value (%) after 1 000 replicates.

表 4 3 种金线鱼 mtDNA COI 基因序列的中性检验结果
Tab. 4 Neutrality tests of the three species of *Nemipterus* genus

群体 population	Tajima <i>D</i> 值 Tajima's <i>D</i> statistic	<i>P</i>
日本金线鱼 <i>N. japonicus</i>	-0.89199	<i>P</i> > 0.10
红棘金线鱼 <i>N. nemurus</i>	-1.77006	0.05 > <i>P</i> > 0.10
苏门答腊金线鱼 <i>N. mesoprion</i>	-1.91970*	<i>P</i> < 0.05

注: *表示中性检验结果显著($P < 0.05$).

Note: Asterisk stands for significant in neutrality test($P < 0.05$).

导致中国与邻国间的鱼类资源争夺。该渔场的金线鱼科鱼类,尤其是金线鱼属鱼类是重要的经济鱼类。探明几种金线鱼属鱼类之间的亲缘关系,有助于掌握其资源量状况,同时也可争取北部湾海洋渔业权益提供理论依据。

脊椎动物的线粒体基因组中含 13 个蛋白质编码基因、2 个核糖体 RNA 基因、22 个转运 RNA 基因以及非编码区基因^[31]。研究发现,线粒体基因组含有多个标志性的遗传标记位点。而且根据线粒体不同部位的进化速率不同,可结合研究的具体情况,选择适当的部位进行分析。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^[32], 12S rRNA、16S rRNA 及细胞色素氧化酶亚单位等适于种属间至科级以下分类阶元的探讨^[33-34]。因此本实验选用 COI 基因用于 3 种金线鱼属鱼类的鉴别。

Cronin^[35]根据对鹿线粒体的研究提出线粒体 DNA 的属间序列差异在 14%~21%之间, Billington 等^[36]报道海水鱼类中,群体内线粒体 DNA 全序列的差异在 0.2%~4.4%之间。以此为参照,本实验所得出的日本金线鱼和红棘金线鱼序列差异为 0.445%,日本金线鱼和苏门答腊金线鱼之间的序列差异为 10.969%,红棘金线鱼和苏门答腊金线鱼之间序列差异为 10.748%,均不存在属间的差别,而且日本金线鱼和红棘金线鱼序列差异在种群范围内。由此可认为日本金线鱼和红棘金线鱼之间亲缘关系很近,甚至可能为同种,这与 Mohd 等^[37]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一个组群,而将红棘金线鱼归为另一组的分析结果不一致。

从遗传距离上来讲,本研究中 3 种金线鱼种间遗传距离在 0~0.3707 之间,而根据 Kartavtsev 等^[38]认为同属不同种间 COI 基因遗传距离应在

0.0894~0.1032%之间,可见 3 种金线鱼间的遗传距离远未达到属间区别。其中,日本金线鱼和红棘金线鱼之间最大遗传距离为 0.0146,最小的遗传距离为 0,而遗传距离低正表明日本金线鱼和红棘金线鱼间遗传分化不明显。基于遗传距离构建的 MP 系统树和 NJ 系统树均明显分为 2 支,日本金线鱼和红棘金线鱼聚在一起构成一支,苏门答腊金线鱼独自构成另一支。对 3 种金线鱼属鱼类线粒体 COI 基因片段序列差异、单倍型归属、核苷酸多样性及遗传距离等多项参数进行比较分析,结果显示,日本金线鱼同红棘金线鱼间的亲缘关系更近,并且两者间有明显的基因交流,二者可能为同种;而苏门答腊金线鱼与日本金线鱼、红棘金线鱼之间的亲缘关系较远,但其差异没有达到不同属的水平。该结果同时为证实红棘金线鱼和苏门答腊金线鱼是不同的两个种提供了分子证据。

已有研究证明 mtDNA 遗传关系相近的鱼类在地理分布上常常是连续的,并且种间的差异容易区分^[39-40]。本研究中,日本金线鱼和红棘金线鱼是在北部湾东北部渔区渔获,而苏门答腊金线鱼则是在北部湾南部渔区渔获。因此从渔获区的分布可以得出,3 种金线鱼的遗传关系是接近的。另外由于金线鱼属鱼类仅做生殖性洄游,故也可推测日本金线鱼和红棘金线鱼有更多的基因交流的机会,因而两者间的亲缘关系也更近。

本研究通过对 3 种金线鱼的 COI 基因片段进行比较和分析,为今后对金线鱼属鱼类的分子研究奠定了基础,同时也为金线鱼属鱼类种质资源的合理开发利用提供依据。

参考文献:

- [1] Russell B C. Nemipterid fishes of the world (threadfin

- breams, whiptail breams, monocle breams, dwarf monocle breams, and coral breams). Family Nemipteridae. An annotated and illustrated catalogue of nemipterid species known to date[R]. FAO Fisheries Synopsis no. 125, 12. FAO, Rome. 1990.
- [2] 卢贤瑶, 施秀贴, 李慈梅. 南海北部大陆架外海主要经济鱼类的生物学特性及分布移动[R]. 广州: 中国水产科学院南海水产研究所, 1979.
- [3] 陈绍勋. 南海北部的金线鱼[J]. 海洋渔业, 1986, 8(5): 212-214.
- [4] 农牧渔业部水产局, 农牧渔业部南海区渔业指挥部. 南海区渔业资源调查和区划[M]. 广东科技出版社, 1989.
- [5] 陈再超, 刘继兴. 南海经济鱼类[M]. 广东: 广东科技出版社, 1982.
- [6] Nazeer R A, Kumar N S, Naqash, S Y, et al. Lipid profiles of Threadfin bream (*Nemipterus japonicus*) organs[J]. Indian J Mar Sci, 2009, 38(4): 461-463.
- [7] Mukundan M K, Mathew S, Gopakumar K. Nutrients and nutritional quality of pink perch (*Nemipterus japonicus*) mince and their fate on surimi manufacture[J]. Society Fish Technol (India), 1994: 215-221.
- [8] Eggleston D. Patterns of biology in the Nemipteridae[J]. Biol Ass India, 1972, 14: 357-364.
- [9] Young P C, Martin R B. Sex ratios and hermaphroditism in nemipterid fish from northern Australia[J]. Fish Biol, 1985, 26: 273-287.
- [10] Lau P P F, Sadovy Y. Gonad structure and sexual pattern in two threadfin breams and possible function of the dorsal accessory duct[J]. Fish Biol, 2001, 58: 1438-1453.
- [11] 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.
- [12] Takahashi H, Kobayashi K, Suzuki K. Gonadal morphology of threadfin breams, *Nemipterus bathybius* and *N. virgatus*: Evidence of rudimentary hermaphroditism[J]. Jpn J Ichthyol, 1989, 36(1): 82-89.
- [13] 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.
- [14] John S T, Hameed M S. Biochemical composition of *Nemipterus japonicus* and *Nemipterus mesoprion* in relation to maturity cycle[J]. Fish Technol Soc Fish Technol (India), 1995, 32(2): 102-107.
- [15] John S, Hameed M S. Age and growth of two nemipterid fishes (*Nemipterus japonicus* and *N. mesoprion*) from Cochin coast[J]. J Zool Soc Kerala, 1992, 2(2): 34-38.
- [16] 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.
- [17] 李忠炉, 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.
- [18] 费鸿年, 何宝全. 广东大陆架鱼类生态学参数和生活史类型[C]//水产科技文集(第二集). 北京: 农业出版社, 1984: 6-16.
- [19] 袁蔚文. 南海北部主要经济鱼类的生长方程和临界年龄[C]//南海水产研究文集. No.1. 广州: 广东科技出版社, 1989: 61-74.
- [20] 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.
- [21] 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] Hebert P D N, Ratnasingham S, deWaard J R. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit I divergences among closely related species [J]. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 2003, 270: 96-99.
- [25] 贾晓平, 李纯厚, 邱永松, 等. 北部湾渔业生态环境与渔业资源[M]. 北京: 科学出版社, 2003.
- [26] 李冠军, 邱永松, 王跃中. 自然环境变动对北部湾渔业资源的影响[J]. 南方水产, 2007, 3(1): 7-13.
- [27] Ivanova N V, Zemlak T S, Hanner R H, et al. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding[J]. Mol Ecol Notes, 2007, 7(4): 544-548.
- [28] 彭士明, 施兆鸿, 侯俊利, 等. 银鲳 3 个野生群体线粒体 CO I 基因的序列差异分析[J]. 上海海洋大学学报, 2009, 18(4): 398-402.
- [29] 张凤英, 马凌波, 施兆鸿, 等. 两种鲷属鱼类线粒体 COI 基因片段序列的比较[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(4): 403-408.

- [30] 毕潇潇, 高天翔, 肖永双, 等. 4 种鳙鱼线粒体 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.
- [31] Hochachka P W, Mommsen T P. 鱼类的生物化学与分子生物学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 2–3 .
- [32] 胡文革, 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.
- [33] Apostolidisa A P, Mamurisb Z, Triantaphyllidisa 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.
- [34] Thacker C E. Molecular phylogeny of the gobioid fishes(Teleostei: Perciformes: Gobioidi) [J]. Mol Phylogen Evol, 2003, 26: 354–368.
- [35] Cronin A M. Mitochondrial DNA phylogeny of deer (Cervidae) [J]. J Mamm, 1991, 72: 553–566.
- [36] Billington N, Hebert P D N. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions[J]. Can J Fish Aquat Sci, 1991, 48(1): 80–94.
- [37] Mohd Z M S, Mohd A A, Abu K M M. Colour pattern as an additional aid to the identification of *Nemipterus* species and their relationship[J]. Pertanika, 1990, 3(1): 17–26 .
- [38] 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]. Genetika, 2006, 42(4): 437–461.
- [39] Bermingham E, Avise J C. Molecular zoogeography of freshwater fishes in the Southeastern United States[J]. Genetics, 1986, 113: 939–965
- [40] Malecot G . Identical loci and relationship[C]// Proc 5th Berkeley Symp Math Statist Probab. Berkeley: University of California Press, 1967: 317–332 .

Sequence analysis of mitochondrial COI gene in three *Nemipterus* species from Beibu Gulf

DONG Lina^{1,2}, HUANG Zirong¹, AI Hong¹, LU Weihua³, LI Xiguo³, LI Nana^{1,4}, LI Xia¹, LI Yongzhen¹

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;
3. Dongguan Ocean and Fishery Environment Monitoring Station, Dongguan 523079, China;
4. Ocean Engineering College, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

Abstract: In order to identify the phylogenetic relationship among three *Nemipterus* species (*N. japonicus*, *N. nemurus* and *N. mesoprion*) caught from Beibu Gulf, we amplified their mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) gene fragments by PCR, and examined 696 base-pair nucleotide sequences of COI. The results show that all 48 sequences are grouped into 29 haplotypes and there are 104 variable nucleotide positions in COI gene fragments. Haplotypes analysis indicates that *N. japonicus* and *N. nemurus* have obvious gene flow and closer relationship and have no significant genetic difference based on sequence divergences and genetic distances analysis. Molecular phylogenetic trees are constructed with *Scolopsis taenioptera* and *Eucinostomus currani* as outgroups using maximum-parsimony and neighbor-joining, which suggests that the three *Nemipterus* species cluster into two clades. Specifically, *N. japonicus* and *N. nemurus* cluster into one clade, while *N. mesoprion* into another. Thus, it could be concluded that the relationship between *N. japonicus* and *N. nemurus* is so close that they may be the same species, while the relationship between *N. mesoprion* and *N. japonicus* and that between *N. mesoprion* and *N. nemurus* in pairwise is far, which provides molecular biology evidence that *N. nemurus* and *N. mesoprion* are two different species.

Key words: *Nemipterus*; mtDNA; COI gene; phylogenetic relationship; sequence analysis; Beibu Gulf

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