

基于 *RAG1* 基因的中国近海 13 种石首鱼科鱼类系统进化关系

马春艳, 马凌波*, 倪勇, 沈盎绿, 张永

(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: 为探讨中国近海石首鱼类的系统进化关系, 通过 PCR 扩增和序列测定, 获得了石首鱼类 9 属 13 个种类的 *RAG1* 基因序列。对序列变异进行分析, 基于 Kimura 双参数法计算属间和种间的遗传距离, 并结合 GenBank 中的同源序列, 以攀鲈为外群构建分子系统进化树。将所得的分子数据与形态学分类进行比较, 推论如下: (1) 中国近海石首鱼类分为两个类群。(2) 叫姑鱼亚科与石首鱼亚科以极高的置信度(90%)聚类, 并处于系统进化树的基部, 支持了形态学上二者是原始种类的分类观点。(3) 分子系统树显示黄姑鱼属比银姑鱼属更为原始, 但二者在形态分类上归为一个亚科的观点有待进一步商榷。(4) 支持尖头黄鳍牙鲷与银牙鲷置于同一牙鲷亚科的不同属的观点。(5) 支持了形态学上黄鱼亚科分化最晚的结论。

关键词: 石首鱼科; *RAG1* 基因; 系统进化

中图分类号: Q 951⁺.3; S 917

文献标志码: A

石首鱼类隶属于鲈形目(Perciformes), 鲈亚目(Percoidei), 石首鱼科(Sciaenidae), 是暖水性鱼类, 其游泳能力不强, 少数种类广泛分布于大西洋的东西两岸、太平洋西部中国沿岸海域和印度洋的东非南部及印度近海, 大多数属、种的地理分布局限性极为显著^[1]。全世界共有石首鱼类 70 属 270 种^[2], 中国沿海是石首鱼类的重要分布区之一, 有 17 属 30 种^[3]。石首鱼类是中国首要海洋经济鱼类^[4], 如银姑鱼(*Pennahia argentatus*) 和小黄鱼(*Larimichthys polyactis*) 是长江口及其邻近海域的重要渔业资源^[5]。其中许多种类已经形成成熟的人工繁育技术, 如大黄鱼(*Larimichthys crocea*) 和鲞(*Miichthys miiuy*) 等^[6]。很多还被列为名贵鱼类, 如鲞肉质鲜嫩, 其鳔可制成名贵海珍品“鱼肚”^[7]。但由于酷渔滥捕和生态环境变化, 与一些重要海洋经济鱼类一样, 在其遗传背景仍不明了的情况下, 有些种类已成为易危物种^[8]。

石首鱼的分类通常是通过形态和解剖特征

来进行研究^[9-12]。但由于石首鱼类很多种间的形态非常相近, 以致难以确定种、属, 甚至亚科的界限, 例如, 朱元鼎等^[13]根据鳔和耳石的形态及其式型分化情况, 认为牙鲷亚科只有一属[牙鲷属(*Otolithes*)] 2 种[银牙鲷(*O. argenteus*) 和红牙鲷(*O. ruber*)], 将尖头黄姑鱼(*Nibea acuta* Tang) [尖头黄鳍牙鲷(*Chrysochir aureus*)] 归入白姑鱼亚科黄姑鱼属。而 1987 年, 将牙鲷分为 2 属[黄鳍牙鲷属(*Chrysochir*) 与牙鲷属(*Otolithes*)], 将尖头黄姑鱼[尖头黄鳍牙鲷] 归入黄鳍牙鲷属^[8]。

通过 DNA 分子标记技术研究鱼类亲缘关系和进化地位, 对鱼类资源的科学评估和保护及开发利用都有重要意义^[14]。近年来, 利用线粒体序列变异对石首鱼的分子系统进化研究已有一些报道^[15-18]。但是还未有核内基因标记应用于石首鱼科报道。DNA 重组激活基因(recombination activating genes, RAGs) 作为脊椎动物特异性免疫反应的关键基因, 已经应用于两栖类^[19], 鸟

收稿日期: 2011-06-20

修回日期: 2011-09-09

资助项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费项目(2008M04)

通讯作者: 马凌波, E-mail: malingbo@vip.sina.com

类^[20],鱼类^[21-23]等多个物种 DNA 水平上的序列分析。RAGs,尤其是 RAG1,具有进化缓慢,第3位密码子变化最小,不同物种之间的碱基组成近乎恒定等一些适于用来研究系统发育的特点^[24]。本实验旨在通过测定和比较分析中国沿海石首鱼科9属13个种的 RAG1 序列,构建分子系统进化树,探讨中国近海石首鱼类分子系统进化关系。

1 材料与方法

1.1 材料

以中国沿海13种石首鱼作为实验材料,依照《中国分类系统检索》^[8]进行形态学鉴定,采集地点、时间如表1所示。

表1 实验材料以及 DNA 序列来源
Tab.1 Origins of fish samples and DNA sequence data

属 genus	种 species	种名缩写 abbreviation	采样地点 collection sites	采样日期 collection date	样本量 sample number
叫姑鱼属 <i>Johnius</i>	皮氏叫姑鱼 <i>J. belengeri</i>	PJ	浙江洞头 Dongtou, Zhejiang	2008-11-09	3
	鳞鳍叫姑鱼 <i>J. distinctus</i>	LQ	福建兴化湾 Xinghua Gulf, Fujian	2008-09-05	6
短须石首鱼属 <i>Umbriina</i>	勒氏短须石首鱼 <i>U. russelli</i>	LS	广西北海 Beihai, Guangxi	2009-08-24	2
牙鲷属 <i>Otolithes</i>	银牙鲷 <i>O. argenteus</i>	YYH	广西北海 Beihai, Guangxi	2009-08-24	3
黄鳍牙鲷属 <i>Chrysochir</i>	尖头黄鳍牙鲷 <i>C. aureus</i>	JT	瑞安外海 Ruian, Zhejiang	2008-11-08	5
黄姑鱼属 <i>Nibea</i>	黄姑鱼 <i>N. albiflora</i>	HG	福建闽江口 Minjiang, Fujian	2008-09-09	5
	半花黄姑鱼 <i>N. semifasciata</i>	BHHG	广西北海 Beihai, Guangxi	2009-08-24	3
银姑鱼属 <i>Pennahia</i>	大头银姑鱼 <i>P. macrocephalus</i>	DTBG	广西北海 Beihai, Guangxi	2009-08-25	3
	银姑鱼 <i>P. argentatus</i>	YG	福建兴化湾 Xinghua Gulf, Fujian	2008-09-04	4
鲩属 <i>Miichthys</i>	鲩 <i>M. miiuy</i>	M	浙江洞头 Dongtou, Zhejiang	2008-11-09	5
黄鱼属 <i>Larimichthys</i>	大黄鱼 <i>L. crocea</i>	DH	象山养殖场 Xiangshan, Zhejiang	2008-11-07	5
	小黄鱼 <i>L. polyactis</i>	XH	浙江洞头 Dongtou, Zhejiang	2008-11-09	4
梅童鱼属 <i>Collichthys</i>	棘头梅童鱼 <i>C. lucidus</i>	JM	瑞安外海 Ruian, Zhejiang	2008-11-07	3
外群 outgroup	攀鲈 <i>Anabas testudineus</i>	PL	GenBank (AY763773)	-	-

1.2 方法

DNA 提取 基因组 DNA 提取参照文献^[25]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)、氯仿各抽提一次。两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。

PCR 扩增 采用巢式 PCR 进行,反应示意图见图 1,引物序列见表 2。RAG1 基因序列反应一扩体积为 25 μ L,其中 10 \times 缓冲液(包含 Mg^{2+})2.5 μ L,2.5 mol/L dNTP 1 μ L,上下游引物各 1 μ L, *Taq* 酶 0.2 μ L,模板 DNA 1 μ L,加灭

菌蒸馏水至 25 μ L。扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,然后 17 个循环(94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,52 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 55 s),然后 17 个循环(94 $^{\circ}$ C 45 s,51 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 55 s),72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

二扩反应体积为 50 μ L,其中 10 \times 缓冲液(包含 Mg^{2+})5 μ L,2.5 mol/L dNTP 2 μ L,上下游引物各 2 μ L, *Taq* 酶 0.5 μ L,将一扩产物稀释 5 倍后取 2 μ L 作为模板,加灭菌蒸馏水至 50 μ L。扩增程序为同上,使用 Eppendorf proS PCR 仪扩增。

PCR 产物的克隆测序 对 PCR 二扩产物进行纯化、克隆,挑选克隆进行摇培过夜后,然后用 M13(-47)和 M13(-48)进行检测。将菌液在 ABI310 型自动测序仪上进行正反双向测序。

数据分析 用利用 Clustal X(1.83)^[28]和 MEGA 3.0 软件^[29]对所测序列进行同源序列比对、排序并去掉两端少许测序不稳定序列。通过 MEGA 3.0 软件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^[30]。从 GenBank 中下载同科的攀鲈 (*Anabas testudineus*) 的 RAG1 同源序列 (AY763773) 进行比较,分别采用邻位相连法 (Neighbor-Joining, NJ) 以及最大似然法 (maximum likelihood, ML) 等不同的建树方法对序列数据进行分析,比较不同建树方法得到结果的相似和差异。其中 NJ 法

使用 MEGA 进行系统重建,ML 法采用 TREEFINDER 进行分析。Bootstrap 置信值估算重复次数 1 000 次。采用 MODELTEST 软件确定序列最适合的进化模式。基于等级似然比检验 (hierarchical likelihood ratio tests, LRTs) 和标准的 AIC 方法从 56 种不同的核苷酸进化模型中判断出所要采用的模型。

表 2 PCR 反应所用引物和测序引物名称及序列
Tab. 2 Sequences of primers used for amplifying and sequencing

目的基因 target gene	引物名称 primer	引物序列 sequence of primer	文献 reference
RAG1	RAG1-2510Fa	5'-TGG CCA TCC GGG TMA ACA C-3'	[26]
	RAG1-4090Ra	5'-CTG AGT CCT TGT GAG CTT CCA TRA AYT T-3'	[27]
	RAG1-2533Fb	5'-CTG AGC TGC AGT CAG TAC CAT AAG ATG T-3'	
	RAG1-4078Rb	5'-TGA GCC TCC ATG AAC TTC TGA AGR TAY TT-3'	
测序引物 seq primer	M13(-47)	5'-CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3'	
	M13(-48)	5'-AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA-3'	

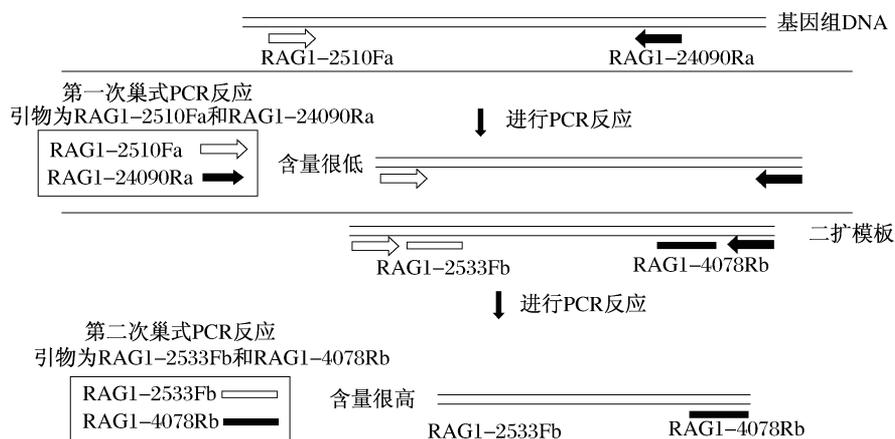


图 1 巢式 PCR 原理

Fig. 1 Principle of nested PCR

2 结果

2.1 序列分析

经克隆、测序,测得的 51 条 RAG1 基因序列,序列经排序比对后,共获得 13 种石首鱼类 1 498 bp 的碱基序列,序列无插入/缺失现象,所得序列共含 230 个变异位点 (variable sites),其中简约信息位点 (parsimony informative sites) 183 个,占整段序列的 15.4%,共定义 39 个单倍型 (haplotypes),图 2 为各单倍型的变异位点。

2.2 碱基组成与遗传距离

T、C、A 和 G 的平均含量分别为 22%、24.7%、25.3% 和 28.0%。其中 G 的含量最高;A + T 含量 (47.3%) 低于 C + G 含量 (52.7%)。基于 Kimura 双参数法,以转换加颠换,转换比颠换计算属间 (表 3) 和种间 (表 4) 的相对遗传距离。从属间的遗传距离来看,鳊属与黄鱼属间的遗传距离最小 (0.017),梅童鱼属与叫姑鱼属间的遗传距离最大 (0.051)。从种间的遗传距离来看,大黄鱼和小黄鱼间的遗传距离最小 (0.012),皮氏叫姑鱼和棘头梅童鱼间的遗传距离最大 (0.058)。

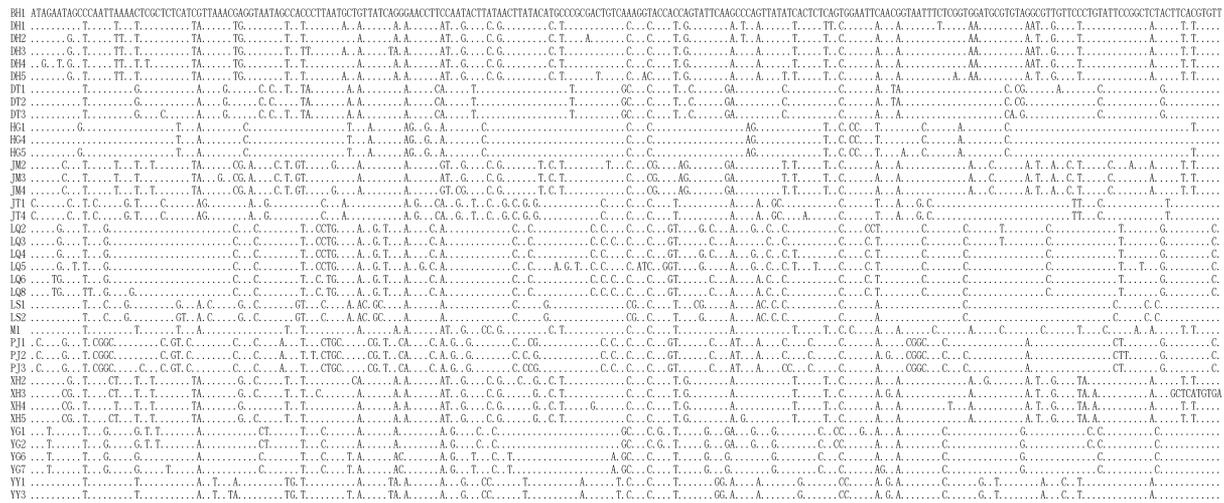


图 2 13 种石首鱼单倍型 RAG1 序列变异位点图

Fig. 2 Sequence alignment of the partial mitochondrial RAG1 gene from different haplotypes of Sciaenidae

表 3 石首鱼 9 属属间的 Kumura 双参数法遗传距离

Tab. 3 Genetic distance among nine genera of Sciaenidae

属名 genus	叫姑鱼属 <i>Johnius</i>	短须石首鱼属 <i>Umbrinna</i>	牙鲷属 <i>Otolithes</i>	黄鳍牙鲷属 <i>Chrysochir</i>	黄姑鱼属 <i>Nibea</i>	银姑鱼属 <i>Pennahia</i>	鲩 <i>Miichthys</i>	黄鱼属 <i>Larimichthys</i>
叫姑鱼属 <i>Johnius</i>								
短须石首鱼属 <i>Umbrinna</i>	0.033							
牙鲷属 <i>Otolithes</i>	0.044	0.035						
黄鳍牙鲷属 <i>Chrysochir</i>	0.042	0.035	0.035					
黄姑鱼属 <i>Nibea</i>	0.037	0.030	0.031	0.033				
银姑鱼属 <i>Pennahia</i>	0.040	0.030	0.031	0.033	0.028			
鲩 <i>Miichthys</i>	0.043	0.034	0.023	0.035	0.026	0.030		
黄鱼属 <i>Larimichthys</i>	0.047	0.038	0.030	0.039	0.035	0.036	0.017	
梅童鱼属 <i>Collichthys</i>	0.051	0.042	0.037	0.045	0.038	0.040	0.023	0.018

表 4 13 种石首鱼种间的 Kumura 双参数法遗传距离

Tab. 4 Genetic distance among thirteen Sciaenidae

	皮氏叫姑鱼 <i>J. belengeri</i>	鳞鳍叫姑鱼 <i>J. distinctus</i>	勒氏短须石首鱼 <i>U. russelli</i>	银牙鲷 <i>O. argenteus</i>	尖头黄鳍牙鲷 <i>C. aureus</i>	黄姑鱼 <i>N. albiflora</i>	半花黄姑鱼 <i>N. semifasciata</i>	大头银姑鱼 <i>P. macrocephalus</i>	银姑鱼 <i>P. argentatus</i>	鲩 <i>M. miyu</i>	大黄鱼 <i>L. crocea</i>	小黄鱼 <i>L. polyactis</i>
鳞鳍叫姑鱼 <i>J. distinctus</i>	0.028											
勒氏短须石首鱼 <i>U. russelli</i>	0.040	0.030										
银牙鲷 <i>O. argenteus</i>	0.050	0.041	0.035									
尖头黄鳍牙鲷 <i>C. aureus</i>	0.045	0.041	0.035	0.035								
黄姑鱼 <i>N. albiflora</i>	0.045	0.034	0.031	0.033	0.035							
半花黄姑鱼 <i>N. semifasciata</i>	0.040	0.028	0.025	0.027	0.028	0.016						
大头银姑鱼 <i>P. macrocephalus</i>	0.046	0.034	0.029	0.030	0.031	0.028	0.022					

续表 4

	皮氏叫 姑鱼 <i>J.</i> <i>belengeri</i>	鳞鳍叫 姑鱼 <i>J.</i> <i>distinctus</i>	勒氏短须 石首鱼 <i>U.</i> <i>russelli</i>	银牙鲷 <i>O.</i> <i>argenteus</i>	尖头黄 鳍牙鲷 <i>C.</i> <i>aureus</i>	黄姑鱼 <i>N.</i> <i>albiflora</i>	半花黄 姑鱼 <i>N.</i> <i>semifasciata</i>	大头银 姑鱼 <i>P.</i> <i>macrocephalus</i>	银姑鱼 <i>P.</i> <i>argentatus</i>	鳁 <i>M.</i> <i>miuy</i>	大黄鱼 <i>L.</i> <i>crocea</i>	小黄鱼 <i>L.</i> <i>polyactis</i>
银姑鱼 <i>P. argentatus</i>	0.046	0.038	0.031	0.032	0.035	0.032	0.024	0.022				
鳁 <i>M. miuy</i>	0.051	0.039	0.034	0.023	0.035	0.026	0.025	0.028	0.032			
大黄鱼 <i>L. crocea</i>	0.054	0.043	0.037	0.028	0.038	0.036	0.031	0.034	0.037	0.016		
小黄鱼 <i>L. polyactis</i>	0.053	0.044	0.039	0.032	0.040	0.037	0.032	0.035	0.039	0.018	0.012	
棘头梅童鱼 <i>C. lucidus</i>	0.058	0.047	0.042	0.037	0.045	0.040	0.034	0.037	0.043	0.023	0.018	0.019

2.3 聚类分析

以攀鲈为外群,依据 RAG1 基因序列重建系统发育树,构建 NJ 和 MP 树(未列出)。用 Modeltest 进行核苷酸替代模型检验,利用最佳模型进行最大似然法(ML)分析,在 Treefinder 中设置重复为 1 000。本研究得到的 3 种分子系统树的拓扑结构基本一致,系统进化树以较高的置信度分为明显的两个类群(图 3)。第一类群有 6 属 9 种,即叫姑鱼属(鳞鳍叫姑鱼和皮氏叫姑鱼)先与短须石首鱼属(勒氏短须石首鱼)聚类,然后与黄姑鱼属(黄姑鱼

和半花黄姑鱼)聚类,再与银姑鱼属(银姑鱼和大头银姑鱼)聚类,然后再与黄鳍牙鲷(尖头黄鳍牙鲷)聚类,最后与牙鲷属(银牙鲷)聚类。也就是说第一类群包括叫姑鱼亚科(Johninae)2 种,石首鱼亚科(Sciaeninae)1 种,白姑鱼亚科(Argyrosominae)4 种和牙鲷亚科(Otolithinae)2 种;第二类群有 3 属 4 种,小黄鱼先与棘头梅童鱼聚类,再与大黄鱼聚类,最后与鳁聚类,即黄鱼亚科(Larimichthyinae)形成一个单系群。

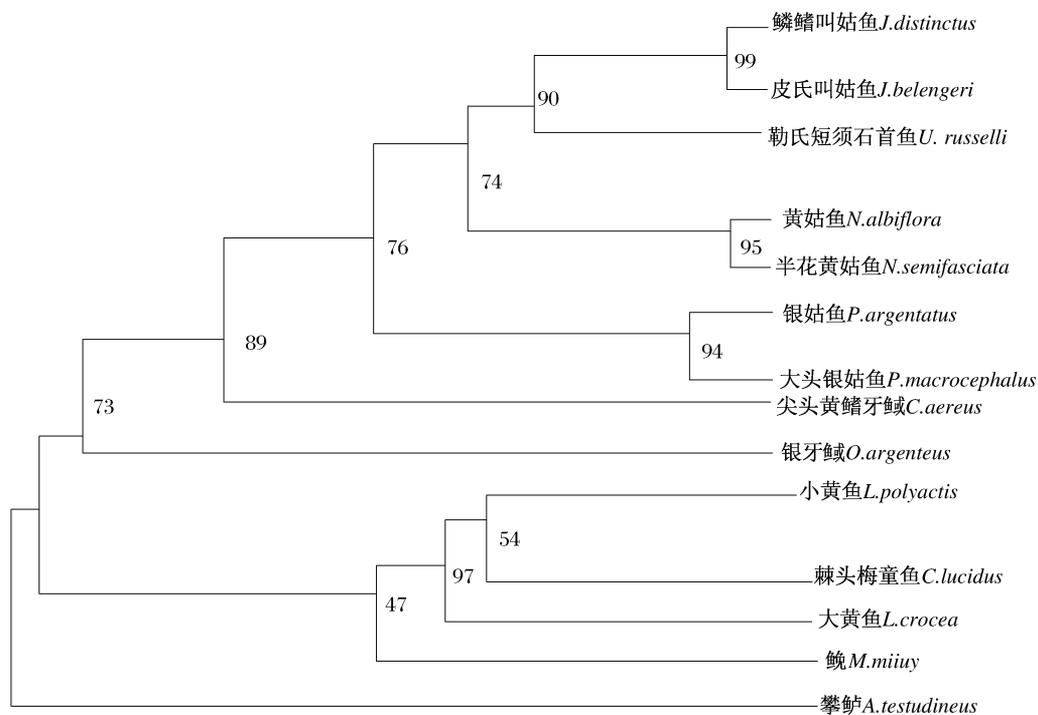


图 3 基于石首鱼科鱼类 RAG1 部分序列通过 ML 构建的分子系统树

Fig. 3 Molecular phylogenetic tree on partial RAG1 sequences of Sciaenidae fishes constructed by ML method with Bootstrap Test

3 讨论

朱元鼎等^[13]认为,石首鱼亚科的鳔和耳石均可称之为“标准原始型”,是石首鱼科系统发育的躯干,其他亚科皆有此辐射地分支出来。他们将石首鱼类分两类:第一类鳔有侧囊或侧管,依次是叫姑鱼亚科(*Johninae*)、毛鲮鱼亚科(*Megalonibinae*)

和黄唇鱼亚科(*Bahabinae*) (其中后两个亚科因没采到标本而未做实验),第二类鳔无侧囊或侧管,依次有石首鱼亚科(*Sciaeninae*)、牙鲷亚科(*Otolithinae*)、白姑鱼亚科(*Argyrosominae*)和黄鱼亚科(*Larimichthyinae*)。根据朱元鼎等^[13]将供试的石首鱼5亚科9属13种鱼类的形态分类树构建如下(图4)。

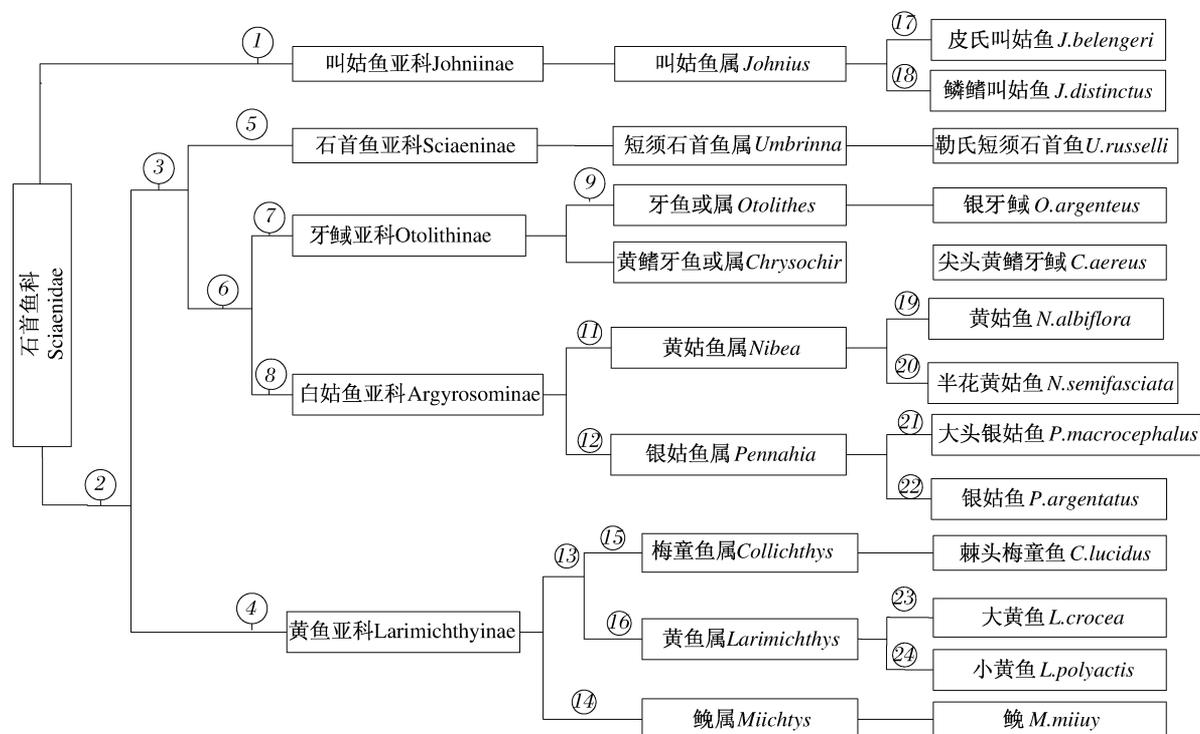


图4 9属13种石首鱼类的形态分类树

Fig. 4 Taxonomic tree of 13 Sciaenidae species within 9 genera based on morphology

将13种石首鱼类的分子系统树(图3)与形态分类系统树(图4)进行比较,结果表明,两个系统树的相同之处是中国5亚科13种石首鱼类都可分为两个类群。但两个系统树中的两个类群的组成亚科、属、种的差别很大。在分子系统树中,叫姑鱼亚科(*Johninae*),石首鱼亚科(*Sciaeninae*),白姑鱼亚科(*Argyrosominae*)和牙鲷亚科(*Otolithinae*)形成第一类群;黄鱼亚科(*Larimichthyinae*)形成第二类群。

分子系统树表明,勒氏短须石首鱼(石首鱼亚科)处于分子进化树的基部,与形态学上所认同的石首鱼亚科是石首鱼科中“标准原始型”相一致。叫姑鱼亚科的两个代表种(鳞鳍叫姑鱼和皮氏叫姑鱼)与石首鱼亚科的代表种勒氏短须石首鱼以极高的置信度(90%)聚类,因此,支持了形态学上叫姑鱼亚科是原始种类的分类观点。蒙

子宁等^[15]和田兰香等^[16]分别通过线粒体16S rRNA和*Cyrb*基因序列分析得出相同结论。

黄姑鱼属与叫姑鱼属的遗传距离为0.037,而银姑鱼属与叫姑鱼属的遗传距离为0.040,显示黄姑鱼属与叫姑鱼属的亲缘关系较近;分子系统树聚类结果显示,黄姑鱼属的两个代表种(黄姑鱼和半花黄姑鱼)以及银姑鱼属的两个代表种(银姑鱼和大头银姑鱼)都以超过90%的置信度各自聚为一支,ML树也显示黄姑鱼属比银姑鱼属更为原始。蒙子宁等^[15]也得出黄姑鱼比白姑鱼分化更早的结论。

本研究中,黄姑鱼属未能先和银姑鱼属聚类,而是先与石首鱼亚科和叫姑鱼亚科的支系聚类后再与银姑鱼属聚类。除了ML树置信度较高(76%),NJ树和MP树支持率都很低(MP35%,NJ39%)。因此,黄姑鱼属和银姑鱼属在形态分

类上归为一个亚科的观点有待进一步商榷。

分子系统树表明,尖头黄鳍牙鲷以较高的置信度(89%)先与白姑鱼亚科、石首鱼亚科和叫姑鱼亚科的 7 个代表种聚为一支,而后与银牙鲷聚类。因此认为尖头黄鳍牙鲷与银牙鲷置于可能为同一牙鲷亚科的不同属^[8]是合理的。

从遗传距离看,小黄鱼和大黄鱼间的遗传距离(0.012)比小黄鱼和棘头梅童鱼间的遗传距离(0.019)小,显示小黄鱼和大黄鱼亲缘关系最近,与形态分类一致。从分子系统进化树来看,黄鱼亚科的 4 个种单独聚类,形成一个单系群。但黄鱼属的大黄鱼和小黄鱼未能聚在一起,而是小黄鱼先和棘头梅童鱼聚类,但支持率较低,然后再与大黄鱼聚类。这可能是由于 *RAG1* 基因自身保守,进化速率缓慢,因此,在对亲缘关系较近,分化较晚的种类进行分析时会出现一定的偏差。

本研究所获得的种类及数量有限,希望以后能采集到尽可能多的种类及样品,利用多种分子标记,从属间、种间及种内不同水平开展中国石首鱼类的系统发育研究,进一步理清中国石首鱼科鱼类的物种多样性及其进化关系,为中国石首鱼鱼类的保护提供科学依据,从而加强对鲈形目鱼类进化和中国近海海洋鱼类区系的认识 and 了解。

参考文献:

- [1] 苏锦祥. 鱼类学与海水鱼类养殖[M]. 2 版. 北京: 中国农业出版社, 2000: 212 - 213.
- [2] 孟庆闻, 苏锦祥, 缪学祖. 鱼类分类学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 713 - 725.
- [3] 刘效舜. 黄渤海区渔业资源调查与区划[M]. 北京: 海洋出版社, 1990: 191 - 200.
- [4] 李建生, 李圣法, 任一平, 等. 长江口渔场渔业生物群落结构的季节变化[J]. 中国水产科学, 2004, 11(3): 432 - 439.
- [5] 张其永, 洪万树. 九十年代我国海水鱼类人工繁殖和育苗技术的现状和展望[J]. 现代渔业信息, 2000, 15(3): 3 - 6.
- [6] 苏锦祥. 鱼类学与海水鱼类养殖[M]. 1 版. 北京: 中国农业出版社, 1993: 214 - 215.
- [7] 汪松, 解炎. 中国物种红色名录(第一卷)[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004: 179 - 181.
- [8] 朱元鼎. 中国分类系统检索(上册)[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 317 - 324.
- [9] 孟庆闻. 石首鱼科, 鱼类学(形态·分类)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1989: 269 - 272.
- [10] Taniguchi N. Comparative osteology of the sciaenid fishes from Japan and its adjacent waters. III. Premaxillary and dentary [J]. Japanese Journal of Ichthyology, 1970, 17(4): 135 - 140.
- [11] Mohan R S L. An illustrated synopsis of the fishes of the family Sciaenidae in India [J]. Indian Journals of Fisheries, 1981, 28(1 - 2): 1 - 24.
- [12] Jordan D S. A classification of fishes, including families and genera as far as known [J]. Biological Sciences, 1923, 3(2): 201 - 202.
- [13] 朱元鼎, 罗云林, 伍汉霖. 中国石首鱼分类系统的研究和新属新种的叙述[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1963.
- [14] 刘萍. DNA 标记技术在海洋生物种质资源开发和保护的应用[J]. 中国水产科学, 2000, 7(2): 86 - 89.
- [15] 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.
- [16] 田兰香, 梁冰, 张树义, 等. 细胞色素 b 基因序列与 7 种石首鱼类的系统进化[J]. 台湾海峡, 2004, 23(4): 436 - 443.
- [17] 陈泉梅. 中国石首鱼科鱼类分子系统学研究[D]. 广州: 暨南大学, 2007.
- [18] 张永, 马春艳, 马凌波, 等. 基于 16S rRNA 部分序列探讨中国近海十三种石首鱼类的分子系统进化关系[J]. 海洋渔业, 2010, 32(3): 276 - 282.
- [19] Hoegg S, Vences M, Brinkmann H, et al. Phylogeny and comparative substitution rates of frogs inferred from sequences of three nuclear genes [J]. Molecular Biology and Evolution, 2004, 21(7): 1188 - 1200.
- [20] 罗旭, 屈延华, 尹祚华, 等. 画眉科鸟类系统发育及分类地位商榷[J]. 动物分类学报, 2009, 34(3): 485 - 498.
- [21] 范嗣刚, 张琼宇, 罗琛. 鲫鱼 *Rag* 基因的克隆及表达分析 [J]. 水生生物学报, 2009, 33(4): 603 - 612.
- [22] 王先磊. 牙鲆 *RAG* 基因的克隆及表达研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2006.
- [23] 汤恩埔. 基于 *RAG* 基因序列分析的南海海域 14 种笛鲷属鱼类的分子分类学研究[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2008.
- [24] Willett C E, Cherry J J, Steiner L A. Characterization and expression of the recombination activating genes (*rag1* and *rag2*) of zebrafish [J]. Immunogenetics, 1997, 45(6): 394 - 404.
- [25] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. 2nd ed. New

- York; Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [26] Li C, Ortí G. Molecular phylogeny of Clupeiformes (Actinopterygii) inferred from nuclear and mitochondrial DNA sequences [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, 44: 386–398.
- [27] Lopez A J, Chen W J, Ortí G. Esociform phylogeny [J]. *Copeia*, 2004: 449–464.
- [28] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 4876–4882.
- [29] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Briefings Bioinformatics*, 2004, 5: 150–163.
- [30] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1980, 16: 111–120.

Molecular phylogenetic relationships of 13 Sciaenidae species in the China Sea based on *RAG1* gene sequences

MA Chun-yan, MA Ling-bo*, NI Yong, SHEN Ang-lü, ZHANG Yong

(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: The family Sciaenidae, commonly known as drums or croakers, are distributed in the Atlantic, Indian and Pacific Oceans. This family comprises of fresh, brackish and marine species and about 270 species in 70 genera. The classification and evolutionary relationships of Sciaenidae have always been hindered by the overwhelming number of species, wild distribution and lack of morphological specializations traditionally used in ichthyological classification. The confusion and debates have brought much trouble to the study of the phylogenetic relationships among Sciaenidae. In this study, to evaluate the phylogenetic relationship of Sciaenidae in the China Sea, the *RAG1* genes sequences of 13 species within 9 genera were amplified and sequenced. After alignment, about 1 498 bp length fragments which could be used for sequence analysis were obtained. The genetic information indexes were generated using MEGA3.1 software and phylogenetic trees were reconstructed by Treefinder software. Of the 1 498 bp aligned base pairs, 230 sites were variable, accounting for 15.4% of the total base pairs. Molecular phylogenetic tree was constructed based on the maximum-likelihood (ML), neighbor-joining (NJ) and maximum-parsimony (MP) methods, with *Anabas testudineus* as the designated outgroup. Conclusions were drawn as follows: (1) The tree indicated the 13 Sciaenidae species in China were grouped in two clusters. (2) Johninae and Sciaeninae were clustered together in the basal position, suggesting they are most primitive groups among the family Sciaenidae, which supported the previous conclusions based on morphology. (3) The phylogenetic trees showed that *Nibea* derived from Sciaenidae earlier than *Pennahia*. However, the morphologic view regarding these two genera as the same subfamily was not well supported yet and further analysis using multiple genes with different evolutionary rates was recommended. (4) *O. argenteus* and *C. aureus* might be grouped in two different genera of one subfamily. (5) Larimichthyinae was the latest derived clade, which supported the previous conclusions based on morphology. Due to the lack of high bootstrap values support, the species-level within this clade was not highly consistent with that based on morphology.

Key words: Sciaenidae; *RAG1* genes; phylogenetic relationships

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