

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

梁日深^{1,2}, 周爱国^{1,2}, 陈金涛¹, 邹青¹, 邹记兴^{1*}

(1. 华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642;

2. 清远市北江水产科学研究所, 广东 清远 511500)

摘要: 为探讨仿石鲈科鱼类目前存在的分类争议问题, 测定了仿石鲈科 (*Haemulidae*), 金线鱼科 (*Nemipteridae*), 眶棘鲈属 (*Scolopsis*) 等相关科属共 33 种鱼类 *RAG2* 基因部分序列, 利用最大简约法 (MP 法) 和贝叶斯分析法 (BI 法), 并以黄鹦嘴鱼作为外类群构建分子系统进化树。结果显示, 33 种鱼类共形成三大类群, 其中仿石鲈科 8 个属聚成一类群, 金线鱼属和眶棘鲈属的种类聚成另一类群, 眶棘鲈属未能与仿石鲈科形成单系。同时, 基于属间遗传距离比较, 眶棘鲈属与金线鱼科的遗传距离比其与仿石鲈科各属的遗传距离要小得多, 表明眶棘鲈属与金线鱼科有更近的亲缘关系, 支持眶棘鲈属隶属于金线鱼科的观点。此外, 传统分类资料中归类于仿石鲈科的髯鲷属 (*Hapalogenys*) 也没有与仿石鲈科聚成单系, 而是独自形成一支, 位于进化树基部, 显示出髯鲷属与仿石鲈科关系较远, 与近年来认为髯鲷属应该从仿石鲈科中划分出去的结果一致。在仿石鲈科内部, 少棘胡椒鲷属 (*Diagramma*) 中的少棘胡椒鲷与胡椒鲷属 (*Plectorhinchus*) 的种类关系很近。在进化树上, 少棘胡椒鲷位于胡椒鲷属的内部, 花尾胡椒鲷最先分化出来, 位于该分支基部, 支持少棘胡椒鲷归为胡椒鲷属, 名称沿用原来的学名胡椒鲷的观点。

关键词: 仿石鲈科; 眶棘鲈属; 髯鲷属; 少棘胡椒鲷属; 系统发育; 重组激活基因

中图分类号: Q 178.1; S 917.4

文献标志码: A

仿石鲈科 (*Haemulidae*) 鱼类隶属鲈形目 (*Perciformes*) 鲈亚目 (*Percoidei*) 鲈总科 (*Percoidae*), 为世界性温带及热带近海鱼类, 世界上已报道的石鲈科鱼类大致可分为 17 属约 150 种, 归于石鲈亚科 (*Haemulinae*) 与胡椒鲷亚科 (*Plectorhynchinae*) 两个亚科^[1]。在我国, 有 4~7 属 20~32 种^[2-5]。其中许多种类是世界上重要经济食用及观赏鱼类。

基于形态学研究方法, 仿石鲈科一些种, 属的分类还存在争议, 皆因仿石鲈科许多近缘物种形态相似, 且同一种鱼在个体发育过程中, 体色和斑纹常发生巨大变化, 幼鱼与成鱼形态截然不同, 给传统的形态分类鉴定带来很大的困难。我国仿石

鲈科鱼类目前大致分为 6 个属: 石鲈属 (*Pomadasys*), 矾鲈属 (*Parapristipoma*), 髯鲷属 (*Hapalogenys*), 胡椒鲷属 (*Plectorhinchus*), 少棘胡椒鲷属 (*Diagramma*) 和眶棘鲈属 (*Scolopsis*)。其中少棘胡椒鲷属, 眶棘鲈属, 髯鲷属的分类存在争议, 国内外不同学者对于其在仿石鲈科中的归类地位意见不一^[2,4,6-10]。尤其是眶棘鲈属的分类, 至今还没见分子水平的研究报道。利用合适分子标记对仿石鲈科鱼类进行系统进化构建, 是解决其分类问题的关键。

重组激活基因 (recombination activating genes, RAGs) 是脊椎动物特异性免疫反应的关键基因, 它由 *RAG1* 和 *RAG2* 两个基因组成, 其编码的蛋白特

收稿日期: 2012-08-12 修回日期: 2013-01-25

资助项目: 国家自然科学基金项目 (30972258; 30771652)

通信作者: 邹记兴, E-mail: zouxixing@scau.edu.cn

异性识别免疫球蛋白 immune globulin, Ig 和 T 细胞表面受体 TCR 的 V、DH、J 基因片段两侧的重组合信号序列 (recombination signal sequence, RSS), 引起 V(D)J 重排, 是 Ig 和 TCR 库多样性的形成的主要原因^[11-13]。此外, RAGs 在进化过程中非常保守, 不同物种之间其碱基组成差异很小, 是比较可靠的核基因分子标记。而 RAG2 基因分子大小适中, 不含内含子, 序列容易获得, 在国外已经广泛运用于硬骨鱼类系统进化分析的研究^[14-17]。

本实验通过研究 RAG2 基因片段序列, 在分子水平上对仿石鲈科和金线鱼科共 33 种鱼类系统发育进行分析, 初步揭示仿石鲈科鱼类及其争议种类之间的亲缘关系, 解决其分类混乱的问题, 并为今后其它鱼类的分子系统发育研究提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料来源

实验样品于 2008 年 11 月—2010 年 6 月分别

在广东, 海南等沿海省份进行野外采集, 此外部分材料采自于西印度洋海区, 大洋洲新喀里多尼亚及北美部分海域。西印度洋非洲沿海的样品由南非生物多样性研究院 (South African Institute for Aquatic Biodiversity, SAIAB) 标本管理员 Bernard Makenzie 教授提供; 北美海域的样品由美国堪萨斯大学 Andrew Bentley 教授提供; 大洋洲的样品由岛国新喀里多尼亚努美阿泻湖水族馆 (Aquarium des Lagons) Jean-Lou Justine 教授提供。共采集到仿石鲈科, 金线鱼科 (Nemipteridae), 眶棘鲈科 (Scolopsidae) 以及部分鲷科 (Sparidae), 裸颊鲷科 (Lethrinidae), 鲹科 (Carangidae) 等鱼类标本 31 种。此外, 从 GenBank 上下载了鲈科 (Serranidae), 舵鱼科 (Kyphosidae) 和作为外类群的隆头鱼亚目 (Labroidei) 鹦嘴鱼科 (Scaridae) 黄鹦嘴鱼 (*Scarus frenatus*) 一起进行系统进化分析。取所采材料的肌肉或尾鳍固定于 95% 的乙醇中。标本种类与来源见表 1。

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

| 科 family | 属 genus | 种 species | 标本来源 source |
|------------------------|----------------------------|--------------------------------|-----------------------|
| 内类群 | | | |
| 鲈亚目 Percoidei | | | |
| 仿石鲈科 Haemulidae | 髯鲷属 <i>Hapalogenys</i> | 斜带髯鲷 <i>H. nitens</i> | 广东, 深圳 |
| 胡椒鲷亚科 Plectorhynchinae | 少棘胡椒鲷属 <i>Diagramma</i> | 少棘胡椒鲷 <i>D. pictum</i> | 广东, 深圳 |
| | 胡椒鲷属 <i>Plectorhinchus</i> | 花尾胡椒鲷 <i>P. cinctus</i> | 广东, 深圳 |
| | | 东方胡椒鲷 <i>P. orientalis</i> | 海南, 三亚 |
| | | 斜纹胡椒鲷 <i>P. lineatus</i> | 海南, 三亚 |
| | | 四带胡椒鲷 <i>P. diagrammus</i> | 海南, 三亚 |
| | | 斑胡椒鲷 <i>P. chaetodonoides</i> | 海南, 三亚 |
| 石鲈亚科 Haemulinae | 矾鲈属 <i>Parapristipoma</i> | 三线矾鲈 <i>P. trilineatum</i> | 广东, 阳江 |
| | 石鲈属 <i>Pomadasys</i> | 大斑石鲈 <i>P. maculatus</i> | 广东, 深圳 |
| | | 断斑石鲈 <i>P. hasta</i> | 广东, 阳江 |
| | | 银石鲈 <i>P. argenteus</i> | 新喀里多尼亚, 努美阿 |
| | 仿石鲈属 <i>Haemulon</i> | 西仿石鲈 <i>H. aurolineatum</i> | 伯利兹, Carrie Bow Cay |
| | | 普氏仿石鲈 <i>H. plumieri</i> | 百慕大, 圣乔治斯岛 |
| | 异孔石鲈 <i>Anisotremus</i> | 黑异孔石鲈 <i>A. surinamensis</i> | 波多黎各, Playa Sardinera |
| | | 枝异孔石鲈 <i>A. virginicus</i> | 伯利兹, Carrie Bow Cay |
| | 八带石鲈 <i>Conodon</i> | 八带石鲈 <i>C. nobilis</i> | 美国, 得克萨斯州 |
| 眶棘鲈科 Scolopsidae | 金鳍锯鳃石鲈 <i>Orthopristis</i> | 金鳍锯鳃石鲈 <i>O. chrysoptera</i> | 美国, 南卡罗来纳州 |
| | 眶棘鲈属 <i>Scolopsis</i> | 伏氏眶棘鲈 <i>S. vosmeri</i> | 广东, 阳江 |
| | | 二线眶棘鲈 <i>S. bilineatus</i> | 海南, 三亚 |
| | | 带尾眶棘鲈 <i>S. frenatus</i> | 塞舌尔, 马埃岛 |
| 金线鱼科 Nemipteridae | 金线鱼属 <i>Nemipterus</i> | 金线鱼 <i>N. virgatus</i> | 广东, 深圳 |
| | | 日本金线鱼 <i>N. japonicus</i> | 广东, 深圳 |
| | | 深水金线鱼 <i>N. bathybius</i> | 广东, 阳江 |
| | 锥齿鲷属 <i>Pentapus</i> | 黄带锥齿鲷 <i>P. aureofasciatus</i> | 新喀里多尼亚, 努美阿 |
| | | 长崎锥齿鲷 <i>P. 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>P. eriomma</i> | 莫桑比克, 马普托 |

续表 1

| 科 family | 属 genus | 种 species | 标本来源 source |
|------------------|--------------------------|-------------------------------|------------------|
| 鲷科 Sparidae | 鲷属 <i>Sparus</i> | 黄锡鲷 <i>S. sarba</i> | 广东,阳江 |
| | 黑鲷属 <i>Acanthopagrus</i> | 澳洲黑鲷 <i>A. australis</i> | 广东,阳江 |
| 裸颊鲷科 Lethrinidae | 裸颊鲷属 <i>Lethrinus</i> | 星斑裸颊鲷 <i>L. nebulosus</i> | 广东,阳江 |
| | | 红鳍裸颊鲷 <i>L. haematopterus</i> | 广东,阳江 |
| 鲈科 Carangidae | 木叶鲈属 <i>Selaroides</i> | 木叶鲈 <i>S. leptolepis</i> | 广东,阳江 |
| 鲷科 Serranidae | 石斑鱼属 <i>Epinephelus</i> | 清水石斑鱼 <i>E. polyphkadion</i> | GenBank:AY279869 |
| 舵鱼科 Kyphosidae | 舵鱼属 <i>Kyphosus</i> | 低鳍舵鱼 <i>K. vaigiensis</i> | GenBank:AY279870 |
| 外类群 | | | |
| 隆头鱼亚目 Labroidei | | | |
| 鹦嘴鱼科 Scaridae | 鹦嘴鱼属 <i>Scarus</i> | 黄鹦嘴鱼 <i>S. frenatus</i> | GenBank:AY279952 |

1.2 总基因组 DNA 的提取

取 0.1 g 肌肉样品,加入 500 μ L 抽提液(0.3 mol/L NaCl、10 mmol/L EDTA、10 mmol/L Tris-Cl, pH 8.0)以及 20 μ L 10 mg/mL 蛋白酶 K, 55 $^{\circ}$ C 消化完全。消化产物经饱和酚-氯仿抽提, 2 倍体积无水乙醇沉淀, 70% 乙醇洗涤, 最后溶解于 50 μ L 灭菌水中, 电泳检测, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3 PCR 扩增和测序

参考国外相关文献,选择扩增 RAG2 基因片段的引物为 RAG2-f1: 5'-GAGGGCCATCTCC-TTCTCCAA-3' 和 RAG2-r3: 5'-GATGGCCTTCC-CTCTGTGGGTAC-3'^[17-18]。PCR 反应体系总体积为 50 μ L, 其中包括 10 \times buffer 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。PCR 反应条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 30 s, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分离, 切取特异性片段, 用凝胶纯化试剂盒(上海赛百盛)纯化回收, 纯化产物送上海英骏公司, 在 ABI3730 自动测序仪上用 RAG2 正向引物进行单向测序。

1.4 数据分析

测序所得序列, 与 GenBank 下载的序列一起利用 Clustal W^[19] 进行排序, 排序后去除两端冗余序列, 保留一致序列进行系统发育分析。利用 MEGA 4.0^[20] 软件对序列的碱基组成、变异位点、简约信息位点数、转换/颠换值、遗传距离进行统计分析; 利用 PAUP Version 4.0b 10^[21] 软件包对样品进行分子系统进化分析, 系统进化树利用最大简约法(MP 法)和贝叶斯分析法(BI 法)进行构建。最大简约法使用启发式搜寻, 参数设置为 1 000 random step-wise addition sequence replicates, 构树方法采用 tree-bisection-

reconnection(TBR), 所有数据未加权。贝叶斯法分析应用 MrBayes 3.1.2 软件^[22-23], 随即选取起始树, 计算 1 000 000 代, 取样代数 100, 系统进化树节点置信度由后验概率(posterior probabilities)提供。

2 结果与分析

2.1 序列分析

测序得到这 31 种鱼的 RAG2 部分序列长度在 797 ~ 824 bp 之间, 与 GenBank 下载的鲷科, 舵鱼科和作为外类群的黄鹦嘴鱼共 34 种鱼类进行序列比对, 比对后去除两端冗余得到一致序列为 729 bp。利用 MEGA 4.0 软件对基因序列间保守位点, 变异位点, 碱基 A, T, G 和 C 的平均含量, 转换与颠换的比值、遗传距离进行统计分析可知, 在一致的 729 bp 的 DNA 序列中, 去除外类群, 33 种鱼类共有保守位点 422 个, 约占 64.7%; 变异位点 307 个, 约占 35.3%; 简约性信息位点 217 个, 约 26.1%。T, C, A 和 G 碱基平均含量分别为 23.9%, 28.2%, 21.6% 和 26.3%, 显示 A 碱基相对缺乏, 其中 A + T 的含量(45.5%)明显低于 G + C 含量(54.5%)。序列中转换与颠换之比值为 2.53(Kimura 2-Parameter 模型), 转换明显大于颠换, 显示这些位点没有突变饱和, 可将序列所有转换与颠换信息应用于系统发育树的构建。

基于 Kimura 2-Parameter 模型利用 MEGA 4.0 计算出各种之间的遗传距离(表 2)。除去外类群, 33 种鱼类遗传距离范围为 0.006 ~ 0.228。本实验只列出仿石鲈科, 金线鱼科, 眶棘鲈科等存在争议的共 26 个种类的遗传距离(表 2)。在这 26 种鱼类中, 遗传距离最小的是斜纹胡椒鲷与四带胡椒鲷, 为 0.006, 其次是斑胡椒鲷与四带胡椒鲷, 黑异孔石鲈与枝异孔石鲈, 都为

表 2 基于 Kimura-2-Parameter 模型计算仿石鲷科, 金线鱼科, 眶棘鲷科 26 种鱼类 RAG2 序列遗传距离
 Tab. 2 Pairwise distances among 22 species of Haemulidae, Nemipteridae, Scolopsidae for RAG2 sequences based on Kimura-2-Parameter model

| 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 | |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|----|--|
| 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 0.014 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | 0.013 | 0.015 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 0.013 | 0.015 | 0.006 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 0.014 | 0.017 | 0.010 | 0.010 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 0.035 | 0.035 | 0.031 | 0.031 | 0.033 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 0.064 | 0.061 | 0.059 | 0.056 | 0.061 | 0.062 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 0.082 | 0.079 | 0.077 | 0.074 | 0.076 | 0.081 | 0.077 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | 0.071 | 0.068 | 0.067 | 0.067 | 0.065 | 0.073 | 0.079 | 0.024 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | 0.087 | 0.085 | 0.082 | 0.079 | 0.079 | 0.089 | 0.081 | 0.049 | 0.040 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 11 | 0.072 | 0.070 | 0.067 | 0.064 | 0.065 | 0.073 | 0.065 | 0.041 | 0.040 | 0.041 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 0.069 | 0.067 | 0.064 | 0.061 | 0.062 | 0.073 | 0.062 | 0.044 | 0.040 | 0.041 | 0.014 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 13 | 0.073 | 0.071 | 0.068 | 0.068 | 0.067 | 0.075 | 0.070 | 0.047 | 0.043 | 0.050 | 0.022 | 0.022 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 14 | 0.072 | 0.068 | 0.067 | 0.067 | 0.065 | 0.073 | 0.068 | 0.032 | 0.031 | 0.044 | 0.034 | 0.034 | 0.034 | | | | | | | | | | | | | | |
| 15 | 0.073 | 0.070 | 0.068 | 0.068 | 0.067 | 0.072 | 0.070 | 0.031 | 0.032 | 0.046 | 0.033 | 0.035 | 0.035 | 0.010 | | | | | | | | | | | | | |
| 16 | 0.073 | 0.069 | 0.069 | 0.065 | 0.070 | 0.075 | 0.069 | 0.044 | 0.040 | 0.047 | 0.034 | 0.031 | 0.034 | 0.028 | 0.030 | | | | | | | | | | | | |
| 17 | 0.141 | 0.141 | 0.136 | 0.134 | 0.132 | 0.143 | 0.134 | 0.125 | 0.134 | 0.125 | 0.125 | 0.126 | 0.125 | 0.120 | 0.122 | 0.127 | | | | | | | | | | | |
| 18 | 0.171 | 0.164 | 0.159 | 0.162 | 0.160 | 0.164 | 0.179 | 0.174 | 0.169 | 0.173 | 0.167 | 0.168 | 0.169 | 0.162 | 0.167 | 0.171 | 0.204 | | | | | | | | | | |
| 19 | 0.164 | 0.161 | 0.154 | 0.155 | 0.157 | 0.159 | 0.168 | 0.165 | 0.158 | 0.166 | 0.166 | 0.161 | 0.162 | 0.153 | 0.160 | 0.162 | 0.201 | 0.035 | | | | | | | | | |
| 20 | 0.165 | 0.158 | 0.154 | 0.156 | 0.158 | 0.158 | 0.165 | 0.164 | 0.157 | 0.162 | 0.156 | 0.156 | 0.161 | 0.156 | 0.157 | 0.161 | 0.200 | 0.041 | 0.037 | | | | | | | | |
| 21 | 0.181 | 0.170 | 0.172 | 0.174 | 0.174 | 0.174 | 0.171 | 0.162 | 0.161 | 0.173 | 0.161 | 0.163 | 0.168 | 0.161 | 0.163 | 0.167 | 0.196 | 0.073 | 0.074 | 0.068 | | | | | | | |
| 22 | 0.178 | 0.169 | 0.169 | 0.169 | 0.170 | 0.170 | 0.176 | 0.171 | 0.166 | 0.175 | 0.163 | 0.165 | 0.173 | 0.168 | 0.166 | 0.167 | 0.200 | 0.076 | 0.077 | 0.065 | 0.015 | | | | | | |
| 23 | 0.139 | 0.136 | 0.137 | 0.137 | 0.139 | 0.134 | 0.143 | 0.158 | 0.144 | 0.148 | 0.137 | 0.136 | 0.134 | 0.139 | 0.141 | 0.136 | 0.184 | 0.087 | 0.082 | 0.074 | 0.071 | 0.067 | | | | | |
| 24 | 0.150 | 0.143 | 0.145 | 0.145 | 0.146 | 0.138 | 0.140 | 0.151 | 0.147 | 0.153 | 0.141 | 0.139 | 0.141 | 0.139 | 0.141 | 0.143 | 0.177 | 0.096 | 0.091 | 0.080 | 0.073 | 0.081 | 0.035 | | | | |
| 25 | 0.146 | 0.139 | 0.141 | 0.141 | 0.143 | 0.136 | 0.143 | 0.154 | 0.147 | 0.153 | 0.137 | 0.136 | 0.137 | 0.136 | 0.137 | 0.139 | 0.179 | 0.090 | 0.088 | 0.077 | 0.070 | 0.074 | 0.033 | 0.020 | | | |
| 26 | 0.150 | 0.144 | 0.146 | 0.146 | 0.148 | 0.143 | 0.145 | 0.154 | 0.144 | 0.153 | 0.137 | 0.136 | 0.137 | 0.136 | 0.137 | 0.139 | 0.188 | 0.096 | 0.091 | 0.083 | 0.076 | 0.080 | 0.034 | 0.025 | 0.025 | | |

注: 1. 少棘胡椒鲷, 2. 东方胡椒鲷, 3. 斜纹胡椒鲷, 4. 四带胡椒鲷, 5. 斑胡椒鲷, 6. 花尾胡椒鲷, 7. 三线胡椒鲷, 8. 普氏仿石鲷, 9. 西仿石鲷, 10. 金鳍锯鳃石鲷, 11. 银石鲷, 12. 断斑石鲷, 13. 大斑石鲷, 14. 黑异孔石鲷, 15. 枝异孔石鲷, 16. 八带石鲷, 17. 斜带髯鲷, 18. 金线鱼, 19. 深水金线鱼, 20. 日本金线鱼, 21. 黄带锥齿鲷, 22. 长崎锥齿鲷, 23. 宽带副眶棘鲷, 24. 伏氏眶棘鲷, 25. 二线眶棘鲷, 26. 带尾眶棘鲷。
 Notes: 1. *D. pictum*, 2. *P. orientalis*, 3. *P. lineatus*, 4. *P. diagrammus*, 5. *P. chaetodonoides*, 6. *P. cinctus*, 7. *P. trilineatum*, 8. *H. plumieri*, 9. *H. aurolineatum*, 10. *O. chrysoptera*, 11. *P. argenteus*, 12. *P. hasta*, 13. *P. maculatus*, 14. *A. surinamensis*, 15. *A. virginicus*, 16. *C. nobilis*, 17. *H. nitens*, 18. *N. virgatus*, 19. *N. bathybius*, 20. *N. japonicus*, 21. *P. aureofasciatus*, 22. *P. nagasakiensis*, 23. *P. eriomma*, 24. *S. vosmeri*, 25. *S. bilineatus*, 26. *S. frenatus*.

0.010,序列中仅有几个碱基的差异。而金线鱼与斜带髯鲷遗传距离最大,为 0.204,其次是深水金线鱼与斜带髯鲷,为 0.201。同时,汇总出这 26 种鱼类所归类的科属之间的遗传距离(表 3),其中胡椒鲷属与少棘胡椒鲷属的遗传距离最小,其范围是 0.013 ~ 0.035,髯鲷属与金线鱼科的种类遗传距离最大,为 0.184 ~ 0.204。基于属间的遗传距离,眶棘鲈科与金线鱼科之间的遗传距离较小(0.070 ~ 0.096),而与仿石鲈科内部各属之间的遗传距离都比较大(0.136 ~ 0.154),显示出眶棘鲈科与金线鱼科有更近的亲缘关系。髯鲷属与仿

石鲈科各属的遗传距离范围也比较大(0.120 ~ 0.134),且远大于仿石鲈科内部石鲈亚科与胡椒鲷亚科各属之间的遗传距离(0.013 ~ 0.089)。此外,少棘胡椒鲷属中的少棘胡椒鲷与胡椒鲷属的种类遗传距离非常小(0.013 ~ 0.035),在胡椒鲷属内部,花尾胡椒鲷与其他 4 种胡椒鲷的遗传距离(0.031 ~ 0.035)比少棘胡椒鲷与其他 4 种胡椒鲷种类的遗传距离(0.013 ~ 0.015)要大得多,与花尾胡椒鲷相比,少棘胡椒鲷与胡椒鲷属的种类有更近的亲缘关系。

表 3 基于 Kimura-2-Parameter 仿石鲈科,金线鱼科,眶棘鲈科各科属间 RAG2 遗传距离
Tab.3 Pairwise distances among families or genera of Haemulidae, Nemipteridae and Scolopsidae for RAG2 sequences based on Kimura-2-Parameter model

| | 少棘胡椒鲷属 <i>Diagramma</i> | 胡椒鲷属 <i>Plectorhinchus</i> | 矾鲈属 <i>Parapristipoma</i> | 石鲈亚科 <i>Haemulinae</i> | 髯鲷属 <i>Hapalogenys</i> | 金线鱼科 <i>Nemipteridae</i> | 眶棘鲈科 <i>Scolopsidae</i> |
|--------|----------------------------|-------------------------------|------------------------------|---------------------------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| 少棘胡椒鲷属 | | | | | | | |
| 胡椒鲷属 | 0.013 ~ 0.035 | 0.010 ~ 0.035 | | | | | |
| 矾鲈属 | 0.064 | 0.056 ~ 0.064 | | | | | |
| 石鲈亚科 | 0.069 ~ 0.087 | 0.061 ~ 0.089 | 0.062 ~ 0.081 | 0.024 ~ 0.049 | | | |
| 髯鲷属 | 0.141 | 0.132 ~ 0.143 | 0.134 | 0.120 ~ 0.134 | | | |
| 金线鱼科 | 0.139 ~ 0.181 | 0.134 ~ 0.179 | 0.143 ~ 0.179 | 0.134 ~ 0.175 | 0.184 ~ 0.204 | 0.015 ~ 0.087 | |
| 眶棘鲈科 | 0.146 ~ 0.150 | 0.136 ~ 0.150 | 0.140 ~ 0.145 | 0.136 ~ 0.154 | 0.177 ~ 0.188 | 0.070 ~ 0.096 | 0.020 ~ 0.025 |

2.2 分子系统进化树的构建

基于所得的 RAG2 部分序列,以黄鹦嘴鱼作为外类群进行系统进化分析。利用最大简约法和贝叶斯分析法构建的分子系统进化树如图 1,2 所示,其中最大简约树树长(tree length, TL)为 772,一致性指数(consistency index, CI)为 0.560 9,保留指数(retention index, RI)为 0.761 1,同源性指数(homoplasy index, HI)为 0.439 1。树上各分支的数字用 1 000 次 Bootstrap 表示统计分析后对该支的支持率。

构建出 MP 和 BI 树,其拓扑结构基本一致(图 1,图 2)。在进化树上,除去外类群,33 种鱼类大致形成三大类群。其中仿石鲈科 8 个属形成一大类群(类群 I),金线鱼属与眶棘鲈属的种类聚在另一类群(类群 II)。髯鲷属位于类群 III。在类群 I 中,仿石鲈科 8 个属的种类又形成 2 大类群,其中石鲈属,仿石鲈属,异孔石鲈属,八带石鲈属与锯鳃石鲈属的种类聚成一类群(石鲈亚科 Haemulinae),少棘胡椒鲷属,胡椒鲷属与矾鲈属聚成另一类群(胡椒鲷亚科)。系统进化树各节点的 Bootstrap 支持率与后验概率都很高。

3 讨论

3.1 眶棘鲈属的分类问题

传统的分类资料中,眶棘鲈属的分类有很大的争议。其中有文献将眶棘鲈属隶于仿石鲈科^[6,24],也有将其隶于眶棘鲈科^[2,4,25-26]或金线鱼科^[1,27-29];此外,还有资料将眶棘鲈科(连同眶棘鲈属)并入仿石鲈科,并在其下设立眶棘鲈亚科 Scolopsinae^[30]等。基于本研究 RAG2 部分序列构建的 MP, BI 树中可看出,仿石鲈科,金线鱼科,眶棘鲈科 26 个种类共形成两大类群,其中仿石鲈科 8 个属的种类形成一类群,眶棘鲈科与金线鱼科的种类聚成另一类群。在进化树上,眶棘鲈科的种类优先与金线鱼科聚成一支,与仿石鲈科位于不同的类群中,节点有很高的支持率。此外,基于属间遗传距离比较,与仿石鲈科各属相比,眶棘鲈属与金线鱼科之间的遗传距离要小得多,序列中碱基差异很小。与仿石鲈科鱼类相比,在分子水平上,眶棘鲈属与金线鱼科有更近的进化关系。这与当今许多分类资料结论一致^[27-28,31-32],眶棘鲈属的种类并没有归类于仿石鲈科。对于它是否

能独立成为眶棘鲈科还是作为眶棘鲈属归类于金线鱼科,本研究的结果还不足以给予确定判断,需要进一步的研究,而当今许多资料都偏向于眶棘鲈属应该归为金线鱼科^[3,5,27-28,31-33]。

3.2 仿石鲈科鱼类属间关系问题

Johnson^[7]根据软鳍条数目曾把仿石鲈科划分为石鲈亚科(Haemulinae)和胡椒鲷亚科(Plectorhynchinae),石鲈亚科鳍条数为13~16,包括石鲈属(*Pomadasys*),仿石鲈属(*Haemulon*),异石鲈属(*Xenistius*),异孔石鲈属(*Anisotremus*)

等14个属;胡椒鲷亚科鳍条数为17~26,包括少棘胡椒鲷属(*Diagramma*),胡椒鲷属(*Plectorhynchus*)与矾鲈属(*Parapristipoma*)3个属。本研究的进化树上,仿石鲈科8个属的种类以高支持率聚成两大类群。其中少棘胡椒鲷属,胡椒鲷属和矾鲈属聚成一类群(胡椒鲷亚科),石鲈属,仿石鲈属,异孔石鲈属,八带石鲈属与锯鳃石鲈属聚成另一类群(石鲈亚科),该聚类与Johnson^[7]根据鳍条数把仿石鲈科划分为石鲈亚科和胡椒鲷亚科两个亚科的观点一致。

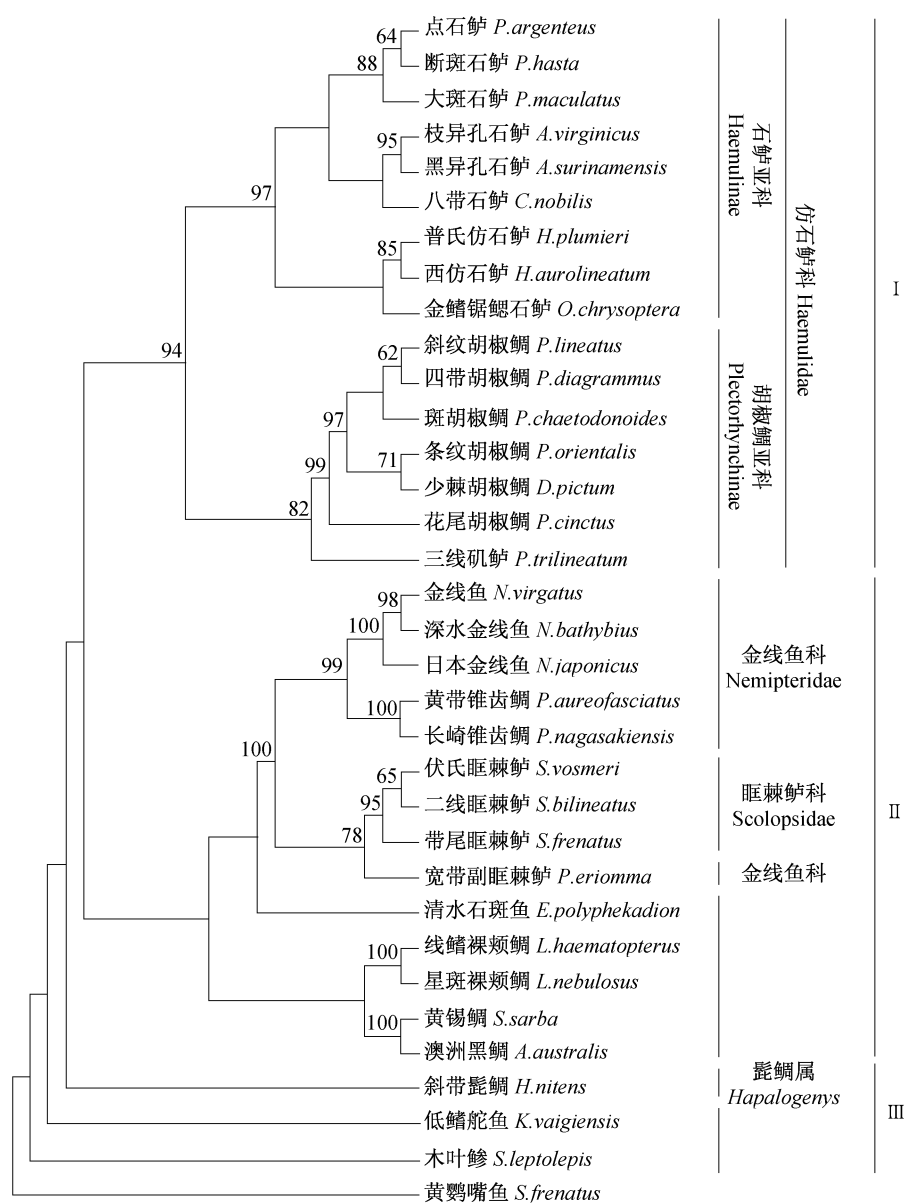


图1 33种鱼类RAG2基因部分序列利用最大简约法构建的分子系统树
Fig. 1 Molecular phylogenetic tree of 33 species based on partial RAG2 gene sequences constructed by maximum parsimony method

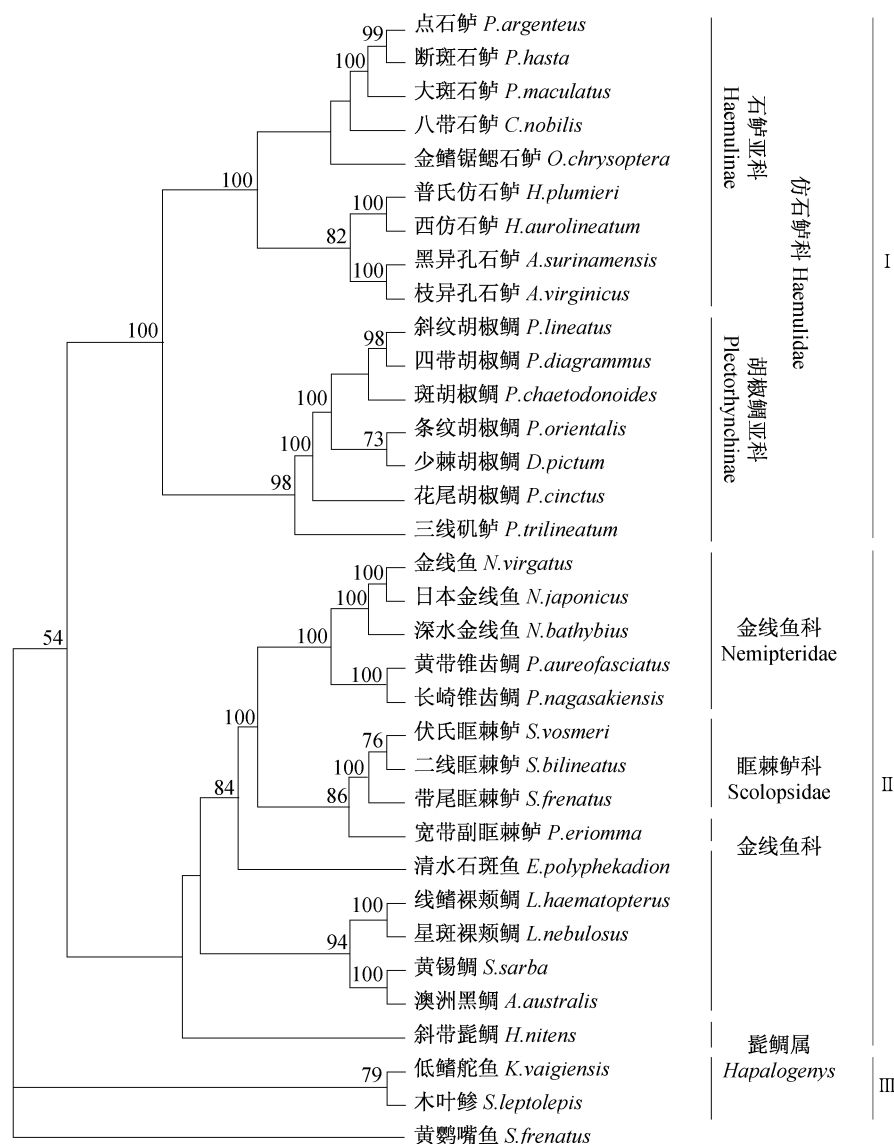


图 2 33 种鱼类 RAG2 基因部分序列利用贝叶斯法构建的分子系统树

Fig. 2 Molecular phylogenetic tree of 33 species based on partial RAG2 gene sequences constructed by Bayesian inference method

大多数传统分类资料中,髯鲷属归类于仿石鲈科,但近期许多研究认为髯鲷属在仿石鲈科中的分类存在争议^[10,34],Johnson^[7]根据鳍条数把仿石鲈科分为石鲈亚科和胡椒鲷亚科,对于髯鲷属,Johnson认为其在鲈亚目中的分类地位并不明确^[8]。近期部分研究结果表明髯鲷属与仿石鲈科关系较远,建议髯鲷属从仿石鲈科里面划分出去,或成立髯鲷科(Hapalogenyidae)^[35-37]。任岗等^[36-37]利用16S rRNA分析石鲈科5个属的系统进化关系,表明髯鲷属与仿石鲈科距离较远,支持把髯鲷属从仿石鲈科分离出来的观点。Sanciangco等^[38]结合多个分子标记分析北美仿

石鲈科种类系统进化研究也表明,髯鲷属不属于仿石鲈科的一员。Leis等^[34]发现髯鲷属鱼类与松鲷科中Lobotes和Datnioides两个属的幼鱼发育相似,认为髯鲷属与松鲷科(Lobotidae)有一定的亲缘关系。本研究中,髯鲷属的斜带髯鲷在MP和BI树上都没有与仿石鲈科的石鲈亚科与胡椒鲷亚科聚在一起,而是单独形成一支,位于进化树的基部。研究结果与文献[35-37]的报道一致,认为髯鲷属在进化上与仿石鲈科存在较远的亲缘关系。但该结果与作者之前利用S7基因内含子1研究的髯鲷属分类结果有些不同^[39],可能不同的分子标记提供的发育信息不同以及样品

数量的不同对确定髯鲷属的分类结果有一定的差异。要正确探讨髯鲷属的分类地位,需要采集更多仿石鲈科以外的鲈亚目的代表种类,结合多个有效的分子标记共同进行进化分析,才能最终确定髯鲷属在鲈亚目中的位置。

少棘胡椒鲷在国内绝大部分形态分类资料都被称为胡椒鲷(*Plectorhinchus pictus*),归为胡椒鲷属^[2,3,40-41],而许多国外的资料却根据背鳍棘条数而把它归入到少棘胡椒鲷属中,主要是它背鳍棘数只有 9~10,而其他的胡椒鲷背鳍棘都是 12~14^[9-10,27-29]。实验中,基于 RAG2 部分序列分析,少棘胡椒鲷与胡椒鲷属的亲缘关系非常接近。在种间遗传距离中,少棘胡椒鲷与胡椒鲷属种类的遗传距离甚至小于胡椒鲷属内部部分种类的种间遗传距离。在进化树上,少棘胡椒鲷位于胡椒鲷属内部,并且与条纹胡椒鲷紧密聚在一起,而花尾胡椒鲷位于胡椒鲷属分支的基部。可知,在分子水平上,少棘胡椒鲷与胡椒鲷属的种类亲缘关系很近。任岗等^[36-37]利用 16S rRNA 部分序列构建的 12 种石鲈科鱼类系统进化树也显示胡椒鲷位于胡椒鲷属内部,其研究的 4 种胡椒鲷中,花尾胡椒鲷最先分化,胡椒鲷与四带胡椒鲷,条纹胡椒鲷聚在一起。在形态上,少棘胡椒鲷与胡椒鲷属部分种类一样,身体斑纹会随着个体发育逐渐变化。把胡椒鲷归为少棘胡椒鲷属,可能是因为它比一般胡椒鲷属的种类鳍棘数少。但也有资料显示少棘胡椒鲷属除了鳍棘数与胡椒鲷属不一样之外,软鳍条数目以及侧线上鳞数也与胡椒鲷属的不一致^[9-10]。基于 RAG2 序列的系统发育研究结果,在分子水平上,它与胡椒鲷属还是有很近的亲缘关系,因此我们支持我国传统的分类资料,把少棘胡椒鲷归为胡椒鲷属,名称沿用原来的学名胡椒鲷(*Plectorhinchus pictus*)。

本研究通过利用核 DNA 分子标记 RAG2 部分序列对仿石鲈科鱼类进行了系统进化研究,初步阐明有争议的科属如眶棘鲈属,髯鲷属,少棘胡椒鲷属之间的分类关系,并为今后仿石鲈科鱼类的系统进化研究提供新的分子信息。

参考文献:

- [1] Nelson J S. Fishes of the world [M]. New York: John Wiley and Sons Inc, 2006: 368 - 369.
- [2] 成庆泰, 郑葆珊. 中国鱼类系统检索 [M]. 北京: 科学出版社, 1987: 339 - 341.

- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] 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: 636 - 640, 696 - 700, 711 - 713.
- [6] Fowler H W. A synopsis of the fishes of China. Part Vii, Continued [M]. The Perch-Like fishes; Family Pomadasyidae, the Grunts. The Academy of Natural Sciences of Philadelphia, U. S. A, 1939: 141 - 164.
- [7] Johnson G D. The limits and relationships of the Lutjanidae and associated families [J]. Bulletin of Scripps Institution of Oceanography, 1980, 24: 1 - 111.
- [8] Johnson G D. Percoidei: development and relationships [M] // Moser H G, Richards W J, Cohen D M, et al. Ontogeny and systematics of fishes. American Society of Ichthyologists and Herpetologists, Special Publication, 1984: 464 - 498.
- [9] McKay R J. Haemulidae [M] // Fischer W, Bianchi G, eds. FAO species identification sheets for fishery purposes. Western Indian Ocean (Fishing Area 51). Vol. 2. Rome: Food and Agriculture Organization, 1984: 1 - 11.
- [10] Carpenter K E, Niem V H. FAO Species identification guide for fishery purposes [M] // The Living Marine Resources of the Western Central Pacific. Volume 5: Bony fishes part 3 (Menidae to Pomacentridae). Rome: Food and Agriculture Organization, 2001: 2961 - 2989.
- [11] Van G D, McBlane J F, Ramsden D A, et al. Initiation of V(D)J recombination in a cell-free system [J]. Cell, 1995, 81: 925 - 934.
- [12] Market E, Papavasiliou F N. V(D)J recombination and the evolution of the adaptive immune system [J]. PLoS Biology, 2003, 1(1): e16.
- [13] Schatz D G, Oettinger M A, Baltimore D. The V(D)J recombination activation gene, RAG1 [J]. Cell, 1989, 59: 1035 - 1048.
- [14] Mark W W, Michael E A. Phylogenetic relationships and evolutionary history of the reef fish family Labridae [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2005, 36: 370 - 390.
- [15] Sullivan J P, Lundberg J G, Hardman M A. Phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using rag1 and rag2 nuclear gene sequences [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2006, 41: 636 - 662.

- [16] Wang X Z, Li J B, He S P. Molecular evidence for the monophyly of East Asian groups of Cyprinidae (Teleostei: Cypriniformes) derived from the nuclear recombination activating gene 2 sequences [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, 42: 157 – 170.
- [17] Rocha L A, Lindeman K C, Rocha C R, *et al.* Historical biogeography and speciation in the reef fish genus *Haemulon* (Teleostei: Haemulidae) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2008, 48: 918 – 928.
- [18] Lovejoy N R. Reinterpreting recapitulation: Systematics of needlefishes and their allies (Teleostei: Belontiidae) [J]. *International Journal of Organic Evolution*, 2000, 54(4): 1349 – 1362.
- [19] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice [J]. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(22): 4673 – 4680.
- [20] Tamura K, Dudley J, Nei M, *et al.* MEGA4: Molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0 [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 1596 – 1599.
- [21] Swofford D P. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods) Version 10 [J]. Sinauer, Sunderland, MA, 2003.
- [22] Huelsenbeck J P, Ronquist F. MrBayes: Bayesian inference of phylogeny [J]. *Bioinformatics*, 2001, 17: 754 – 755.
- [23] Ronquist F, Huelsenbeck J P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. *Bioinformatics*, 2003, 19: 1572 – 1574.
- [24] 中国科学院动物研究所, 海洋研究所, 上海水产学院. 南海鱼类志 [M]. 北京: 科学出版社, 1962: 506 – 509, 518 – 544.
- [25] Rass T S, Lindberg G U. Modern concepts of the natural system of recent fishes: Problem of Ichthyology [J]. *Academy of Sciences of the USSR*, Tom. 11, 1971, 3(68): 380 – 407.
- [26] 祝茜. 中国海海洋鱼类种类名录 [M]. 北京: 学苑出版社, 1998: 119 – 123.
- [27] Randall J E, Lim K K P. A checklist of the fishes of the South China Sea [J]. *Raffles Bulletin of Zoology Supplement*, 2000(8): 569 – 667.
- [28] Ramesh R, Nammalwar P. Database on coastal information of Tamilnadu [J]. Institute for Ocean Management Anna University Chennai-600 025. 2008: 1 – 132.
- [29] 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 (S19): 233 – 271.
- [30] Lindberg G U. Fishes of the world: A key to families and a checklist [R]. Israel program for scientific translations, London, 1974.
- [31] Yearsley G K, Last P R, Hoese D F. Standard names of Australian fishes [R]. CSIRO Marine Scientific Translations, London, 1974.
- [32] Froese R, Pauly D, (Eds). FishBase. World Wide Web Electronic Publication [EB/OL]. www.fishbase.org, version(03/2012). 2012.
- [33] FAO-FIES. Aquatic Sciences and Fisheries Information System (ASFIS) species list [EB/OL]. http://www.fao.org/fishery/collection/asfis/en, March 2010.
- [34] Leis J M, Carson-Ewart B M. The larvae of Indo-Pacific coastal fishes: An identification guide to marine fish larvae [M] // Brill E J. Fauna Malesiana Handbooks 2. Leiden: The Netherlands, 2000.
- [35] Springer V G, Raasch M S. Fishes, angling, and finfish fisheries on stamps of the world [M]. American Topical Association, Fishes on Stamps Handbook, 1995(129): 1 – 110.
- [36] 任岗, 章群, 钱开诚, 等. 12 种石鲈科鱼类线粒体 16SrRNA 基因的部分序列分析 [J]. *热带海洋学报*, 2007, 26(3): 48 – 52.
- [37] 任岗, 章群. 石鲈科鱼类的系统发育分析兼论髭鲷属的分类地位 [J]. *动物分类学报*, 2007, 32(4): 835 – 841.
- [38] Sanciangco M D, Rocha L A, Carpenter K E. A molecular phylogeny of the Grunts (Perciformes: Haemulidae) inferred using mitochondrial and nuclear genes [J]. *Zootaxa*, 2011, 2966: 37 – 50.
- [39] 梁日深, 杨国华, 罗大极, 等. 基于 S7 核糖体蛋白基因部分序列的 10 种石鲈科鱼类的系统发育关系 [J]. *热带海洋学报*, 2010: 29(5): 98 – 102.
- [40] Kawamura T. Seasonal occurrence of fishes at inshore rocky reefs in Shirahana, southern Japan [J]. *Japanese Journal of Ichthyology*, 1980, 27(3): 243 – 246.
- [41] Kyushin K, Amaoka K, Nakaya K, *et al.* Fishes of the South China Sea [M]. Japan Marine Fishery Resource Research Center, Tokyo: Nori Otsuru, 1982.

Molecular phylogenetic relationships of Haemulidae and the related species based on partial sequence of *RAG2* gene

LIANG Rishen^{1,2}, ZHOU Aiguo^{1,2}, CHEN Jintao¹, ZOU Qing¹, ZOU Jixing^{1*}

(1. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2. Qingyuan North River Fishery Science Institute, Qingyuan 511500, China)

Abstract: To reveal the current classification problems (that) existed in Haemulidae species, partial sequences of nuclear DNA marker *RAG2* of 33 species from Haemulidae, Nemipteridae and *Scolopsis* were determined in this study. Molecular phylogenetic trees were constructed using maximum parsimony (MP) and Bayesian inference (BI) methods and *Scarus frenatus* as outgroup. The result showed that three big clades were formed in the trees. 8 genera of Haemulidae were grouped in one clade, Nemipteridae and *Scolopsis* were grouped in another clade. Species of *Scolopsis* and Haemulidae could not form a monophyletic group in the trees. Based on the genetic distance data, the distance values between *Scolopsis* and Nemipteridae were much smaller than the values between *Scolopsis* and Haemulidae, indicating that *Scolopsis* had a closer relationship with Nemipteridae than Haemulidae. This result supported the view that *Scolopsis* might be included in the family Nemipteridae. In addition, the traditionally Haemulidae-classified genus *Hapalogenys* was not grouped within Haemulidae either. Three *Hapalogenys* species formed an independent branch and were located at the base of the phylogenetic tree, suggesting a distant relationship between *Hapalogenys* and Haemulidae. This result was consistent with the current view that *Hapalogenys* should be removed from Haemulidae. Within the inner species relationships of Haemulidae, *Diagramma pictum* was revealed to be located in the internal position of the *Plectorhinchus* group and sister to *Plectorhinchus orientalis*, and the specie *Plectorhinchus cinctus* was found to be first separated and positioned at the base of this group. The result suggested a very close relationship between *D. pictum* and *Plectorhinchus* and supported the view that *D. pictum* was classified to *Plectorhinchus* with the name changed into its original name *Plectorhinchus pictus*.

Key words: Haemulidae; *Scolopsis*; *Hapalogenys*; *Diagramma*; phylogeny; recombination activating genes (RAGs)

Corresponding author: ZOU Jixing. E-mail: zouxixing@scau.edu.cn