

DOI: 10.3724/SP.J.1035.2011.00229

军曹鱼线粒体 DNA 全序列与鲹鱼宗系的系统进化

王中铎¹ 郭昱嵩¹ 刘楚吾^{1,2} 刘 筠²

(1. 广东海洋大学水产学院, 南海水产经济动物增殖广东普通高校重点实验室, 湛江 524025;

2. 湖南师范大学生命科学学院, 长沙 410081)

摘要: 通过长距 PCR 法测得军曹鱼(*Rachycentron canadum*)全长 16758 bp 的 mtDNA 基因组全序列(GenBank 登录号: FJ154956 和 NC_011219), 结构组成与其他硬骨鱼类基本一致。Blast 获取 GenBank 数据库的高相似度(score=10055—30213)全序列数据, 运用最大简约法、邻位连接法、最大似然法和贝叶斯法重建了军曹鱼与其他鱼类的系统发育关系, 并采样用松散分子钟(Uncorrected relaxed lognormal clock)对军曹鱼的起源时间进行了估算, 结果表明: (1)军曹鱼与鲹科的亲缘关系较参与分析的其他鱼类更为密切(后验概率为 0.997), 推测军曹鱼大约起源于 56 百万年(Million years ago, Ma)前的古新世塔内特阶(Thanetian)时期; (2)军曹鱼科、鲹科和印鱼科聚为一支, 但其置信度较低(后验概率为 0.593), 且丝帆鱼科、鲹科分别与鲳科和鲷科鱼类聚为不同分支, 因此不支持鲹鱼宗系(Carangoid lineage)为单系群。

关键词: 军曹鱼; 线粒体 DNA; 系统进化; 鲹鱼宗系

中图分类号: Q349 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2011)02-0229-09

鲈形目(Perciforms)是脊椎动物中物种数最多的目, Nelson 报道有 160 科, 约 1539 属 10033 种, 其中 23 个物种为单科单属的单型种(Monotype)^[1]。俗称海鲷或海龙的军曹鱼(*Rachycentron canadum* Linnaeus)为隶属该目的单型种之一, 广泛分布于大西洋、印度洋与西太平洋沿岸海域, 背鳍为其体表特征之一, 鳍式 VII-IX+31, 前方棘短且完全分隔, 后方为长条软鳍^[2]。因其生长等经济性状十分优良、全人工养殖技术逐步成熟^[3], 已成为最具潜力的国际性养殖鱼类^[4]。相应的营养饵料^[5]、病害免疫^[6]和群体选育^[7]等应用性研究发展快速, 而系统进化相关基础研究相对滞后。

Freihofer 注意到印鱼科鱼类(Echeneidae)管状成骨包围的前鼻管向前延长, 军曹鱼科(Rachycentridae)、丝帆鱼科(Nematistiidae)、鲹科(Carangidae)和鲹科(Coryphaenidae)也具有这一特点, 只是延长程度有所差异^[8]。Johnson 和 Smith-Vaniz 将此 5 科归为单

系群(Monophyletic group)^[9, 10]。Johnson 提议将以上 5 科定义为鲹亚目(suborder: Carangoidei)^[11]。Nelson 对于以上研究给予高度关注, 认为暂隶属于鲈总科(Superfamily Percoidea)的鲹鱼宗系(Carangoid lineage)在其单系性得到进一步证明后很可能成为新的总科^[1]。

另外, Smith-Vaniz 还依据 6 个共同特征—背前骨(Predorsal bones)缺失, 第一背鳍支鳍骨(Dorsal pterygiophore)前移, 许多前臀鳍支鳍骨出现于第一血管棘(Hemal spine)前, 角舌软骨金眼鲷目孔缺失, 具包围两鼻孔前管的管状成骨, 背鳍发育完全时幼鱼都十分细长—将军曹鱼科、印鱼科和鲹科归为单系群, 与鲹科(Carangidae)互为姐妹群^[10]。Johnson 提议将军曹鱼科、印鱼科和鲹科从鲈总科(Superfamily Percoidea)独立出来, 归为印鱼总科(Superfamily Echeneoidea)^[9]。尽管军曹鱼科、印鱼科和鲹科的单系性已得到形态学数据的广泛证据

收稿日期: 2010-02-02; 修订日期: 2010-11-25

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2007BAD29B03); 国家自然科学基金项目(30972253); 湛江市科技计划项目(湛科[2008]56 号)资助

作者简介: 王中铎(1980—), 男, 湖南岳阳人; 博士; 主要从事鱼类分子遗传方面的研究。E-mail: aduofa@gmail.com

通讯作者: 刘楚吾, E-mail: swyjs@gdou.edu.cn

表 1 线粒体 DNA 基因组序列测定引物
Tab. 1 List of PCR primers for mtDNA complete genome

编号 No.	上游引物 Upper prime (5'-3')	下游引物 Lower primer (5'-3')
Long PCR primers:		
LA1	L2508-16S CTCGGCAAACATAAGCCTCGCCTGTTACCAAAAAC	H1065-12S GGCATAGTGGGTATCTAATCCCAGTTTGT
LA2	L12321-Leu GGTCTTAGGAACCAAAAACCTCTTGGTGCAA	S-LA-16SH TGCACCATTRGGATGTCCTGATCCAACATC
PCR and sequencing primers:		
1	12SL ACAAAGCATAGCACTGAAGATG	12SH TTTGCATGGATGTCTTCTCG
2	L1085-12S CAAACTAGGATTAGATACCC	H1478-12S GAGAGTGACGGGCGATGTGT
3	L1340-12S ACGTCAGGTCGAGGTGTAGC	H1999-16S CAACCAGCTATAACTAGGCTCGGT
4	L1854-16S AAACCTCGTACCTTTTGCAT	H2933-16S GGATTGCGCTGTTATCCC
5	L2510-16S CGCCTGTTTACCAAAAACAT	H3084-16S AGATAGAAAAGTACCTGGAT
6	L3074-16S CCTACGTGATCTGAGTTCAG	H3718-ND1 ACTTCGTATGAAATWGTTTG
7	L3483-ND1 GAYGGTGTAATAATTSTTTATTAARGAA	H3976-ND1 ATGTTGGCGTATTCKGCKAGGAA
8	L3737-ND1 CAAACWATTTCTSTATGAAGT	H4432-Met TTTAACCGWCATGTTCCGGGGTATG
9	L4166-ND1 CGATATGATCAACTMATKCA	H4866-ND2 AAKGGKGCKAGTTTTTGTCA
10	L4633-ND2 CACCACCCWCGAGCAGTTGA	H5334-ND2M CGKAGRTAGAAGTAKAGGCT
11	L5260-ND2 CTGGSTTTATGCCMAARTG	H5934-CO1 GGGTGCCAATGTCTTTGTGGTT
12	L5644-Ala GCAAMTCAGACACTTTAATTAA	H6371-CO1 TTGATTGCCCKAGGATWGA
13	L6199-CO1 GCCTTCCCWCGAATAAATAA	H6855-CO1 AGTCAGCTGAAKACTTTTAC
14	L6730-CO1 TATATAGGAATRGTMGTAGC	H7480-Ser ATGTGGYTGGCTTGAAA
15	L7255-CO1 GATGCCTACACMCTGTGAAA	H8168-CO2 CCGCAGATTTWAGCATTG
16	L7863-CO2 ATAGACGAAATTAATGACCC	H8589-ATP AAGCTTAKTGTCATGGTCAGT
17	L8343-Lys AGCGTTGGCCTTTTAAGCTAAWGATWGGTG	H9076-ATP GGGCGGATAAAKAGGCTAAT
18	Lut-ATP-Lb CTAGGACTGCTTCCCTACAC	H9639-CO3 CTGTGGTGAGCYCAKGT
19	L9514-CO3 TTCTGAGCCTTCTAYCA	H10035-Gly CTTTCCTTGGGKTTTAACCAAG
20	L9916-CO3 CACCATTTTGGCTTTGAAGC	H10433-Arg AACCACAATTTTTTGAGCCGAAAT
21	L10267-ND3 TTTGAYCTAGAAATYGC	H10970-ND4 GATTATWAGKGGGAGWAGTCA
22	L10681-ND4M GCKTTTTCKGCKTGTGAAGC	H11618-ND4 TGGCTGACKGAKGAGTAGGC
23	L11424-ND4 TGACTTCCWAAAGCCCATGTAGA	H12293-Leu TTGCACCAAGAGTTTTTGGTTCCTAAGACC
24	L11895-ND4 CCTAACCTWATGGGRGAAC	H12632-ND5 GATCAGGTTACGTAKAGKGC
25	L12321-Leu GGTCTTAGGAACCAAAAACCTCTTGGTGCAA	H13069-ND5 GTGCTGGAGTGKAGTAGGGC
26	L12936-ND5 AACTCMTGGGAGATTCAACAA	H13727-ND5 GCGATKATGCTTCTCAGGC
27	L13553-ND5 AACACMTCTTAYCTWAACGC	H14080-ND5 AGGTAKGTTTTGATTAKKCC
28	L13940-ND5 TTCTTTCCKACTATTATWCACCG	H15149-CYB GGTGGCKCCTCAGAAGGACATTGKCCTCA
29	L14504-ND6 GCCAAWGCTGCWGAATAMGCAAA	H15560-CYB TAGGCRAATAGGAARTATCA
30	L14734-Glu AACCACCGTTGTTATTCAACT	H15915-Thr ACCTCCGATCTYCGGATTACAAGAC
31	L15369-CYB ACAGGMTCAAAYAACCC C	H16498-CR CCTGAAGTAGGAACCAGATG
32	L15777-CYB TGA ATT GGC GGC ATA CCW GTA GA	H690-12S GCG GAG GCT TGC ATG TGT A

注: 兼并位点按照 IUB 标准: R 代表 A 或 G, Y 代表 C 或 T, K 代表 G 或 T, M 代表 A 或 C, S 代表 G 或 C, W 代表 A 或 T

Note: Positions with mixed bases are labeled with their IUB codes: R indicates A or G; Y, C or T; K, G or T; M, A or C; S, G or C; W, A or T

鱼分化时间的 ND2 基因序列数据集, 序列来源包括: 下载自 GenBank 的鲱鳅科(Coryphaenidae)、丝帆鱼科(Nematistiidae)和印鱼科(Echeneidae)鱼类代表物

种, 全序列数据集所构建的系统进化树中军曹鱼一支各物种和高置信度分支中各代表物种, 有化石记录用于标定分子钟的鲉科鱼类(*Takifugu rubripes* 和

Tetraodon nigroviridis)、鲤形目斑马鱼(*Danio rerio*)、
 鲮形目青鲮鱼(*Oryzias latipes*)等(图 4)。

利用 Mobyle 在线分析平台(<http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py>)的 MUSCLE 和 CLUSTALW 程序^[23]完成多序列比对。比对序列导入 MEGA 4.0 程序用最大简约法(Maximum parsimonious, MP)和邻位连接法(Neighbor-Joining, NJ)重建系统进化树; 导入 PALM 在线服务器 (Phylogenetic reconstruction by Automatic Likelihood Model selector, <http://palm.iis.sinica.edu.tw/>)^[24]经 ModelTest3.7 分析获取相应序列的最优置换模型, 再用最大似然法(PhyML 程序)构建系统发生树。自举法(bootstrap, BS)检验 MP 树、NJ 树和 ML 树节点置信度的重复次数分别为 1000、1000 和 100 次。利用 BEAST v1.5.4 程序包^[25]运用 Bayesian 法重建系统进化树, 并采用松散分子钟(Uncorrected relaxed lognormal clock)推断分化时间。标定点 C1 为鲀科分化时间上下限(32.25—56.0 Ma), C2 为鲀总目出现时间上下限(96.9—150.9 Ma)^[26]。

2 结果

2.1 军曹鱼 mtDNA 全序列的 PCR 扩增、序列测定与分析

以军曹鱼的总 DNA 为模板扩增, 长距引物扩增得到特异目的条带, 分别为 LA1(约 15000 bp)和 LA2(约 9000 bp)。长距扩增产物 LA1 和 LA2 的稀释液为模板进行常规 PCR 扩增得到了 400—1200 bp 不等的特异性扩增条带(图 2)。

常规扩增片段测定所得序列经拼接校准得到军曹鱼全序列数据长为 16758 bp, BLASTn 表明绝大部分区段与 GenBank 中现有序列有较高的同源性。经 Sequin 整理发布到 GenBank 数据库, 登

录号为 FJ154956 或 NC_011219。与其他的海水鱼类的研究结果^[9]相近, 军曹鱼线粒体 DNA 基因组包括 13 蛋白编码基因, 22 个 tRNA 基因, 2 个 rRNA 基因和 1 个控制区。基因分布呈不均一性, 其中轻链(L-strand)仅编码 8 个 tRNA 基因(Pro、Glu、Ser、Tyr、Cys、Asn、Ala、Gln)及 ND6 基因, 其余 29 个基因皆由重链(H-strand)编码。

2.2 基于 mtDNA 全序列的分子系统进化分析

全序列数据集 A、C、G 和 T 碱基频率分别为 0.2822、0.2956、0.1633 和 0.2589, Modeltest 3.7 程序依 AIC 选择的 ML 法最佳置换模型为 GTR+I+G ($\alpha=0.0060$ Pinvar=0.3620)。利用 mtDNA 全序列数据集以最大简约法(MP)、邻位连接法(NJ)和最大似然法(ML)构建的进化树(图 3)。其中的 MP 树大量节点置信度低(bootstrap, BS<50), 无法确定军曹鱼(*Rachycentron canadum*)与其他鱼类的分化关系。而 NJ 树和 ML 树除个别节点外都表现为二分枝, 且置信度普遍较高(BS>70), 明确支持军曹鱼与同为鲀亚目的 鲹科(Carangidae: 长鳍鲹 *Carangoides armatus*、竹筴鱼 *Trachurus japonicus*、大西洋竹鱼 *Trachurus trachurus*)以及 鲭亚目的 旗鱼科(Istiophoridae: 印度枪鱼 *Makaira indica*、平鳍旗鱼 *Istiophorus platypterus*)和 剑鱼科(Xiphiidae: 剑鱼 *Xiphias gladius*)组成一支(BS=78 和 97)。在 NJ 和 ML 树中, 除圆鲳科(Nomeidae)琉璃玉鲳(*Psenes cyanophrys*)外的 鲈形目物种均聚于另一支(BS=96 和 77)。

2.3 基于 mtDNA 的 ND2 基因序列的贝叶斯分析

以斑马鱼和青鲮为外群, ND2 基因序列数据集的贝叶斯分析(GTR+G+I+relaxed, MCMC=800000, burn in=1000)结果(图 4)。图中 C1 和 C2 两标定点所标定的 鲀科(*Takifugu rubripes* 和 *Tetraodon nigro-*

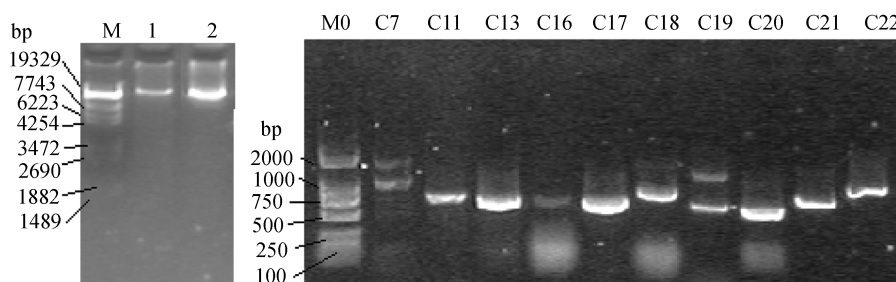


图 2 军曹鱼线粒体 DNA 长距和常规 PCR 产物电泳结果

Fig. 2 Long-PCR and PCR products of the complete mitochondrial genome

M, λ DNA/HindIII markers; 1, 2. 长距扩增产物 1 和 2 Long-PCR products; M0, 2000 bp marker; C7-C22. 常规扩增产物 PCR products

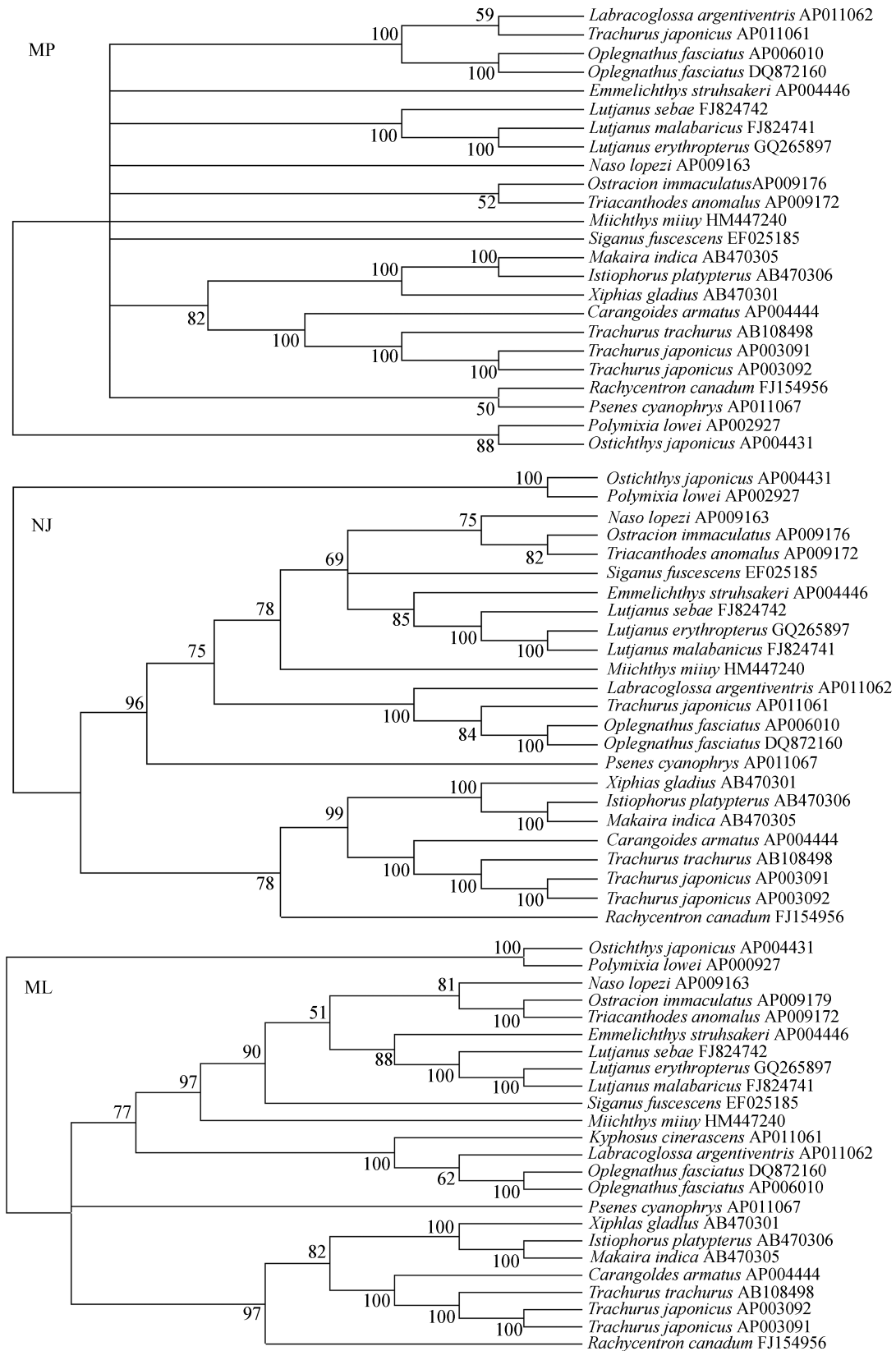


图 3 基于线粒体 DNA 全序列的系统进化树

Fig. 3 The phylogenetic tree derived from mitogenomic data

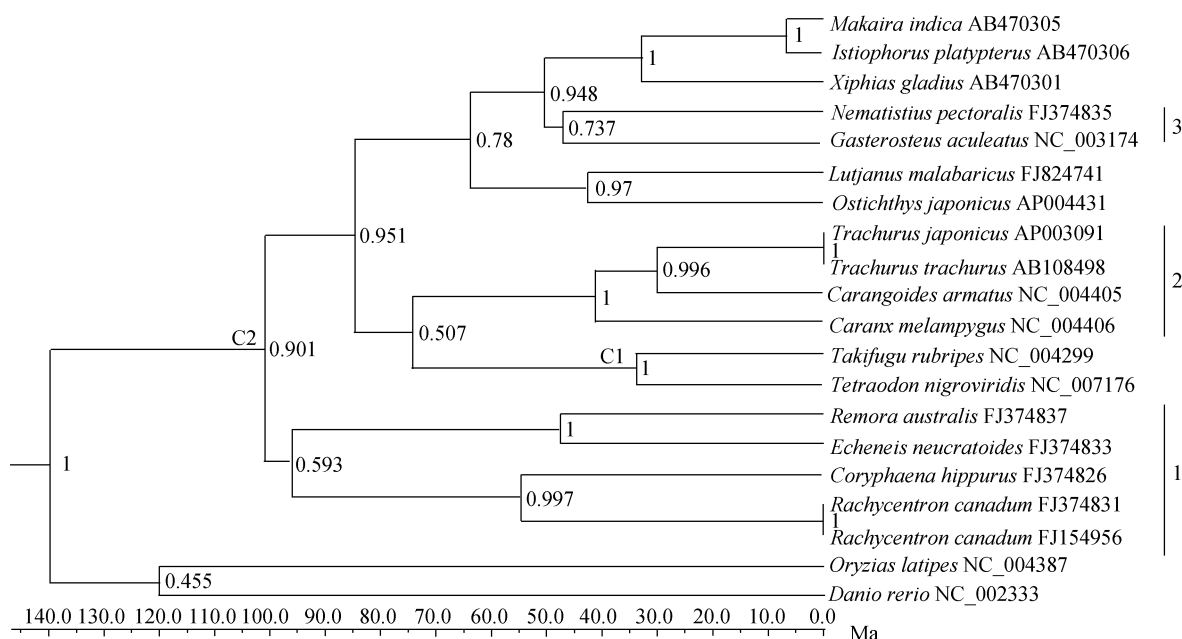


图 4 基于 ND2 基因的贝叶斯分析

Fig. 4 The bayesian analysis based on the ND2 gene

后验概率标于节点右侧; C1 和 C2 代表两个指定共同祖先化石年代的标定点

Posterior probabilities are indicated on the right of each node. The nodes used as calibrating point with fossil records

viridis)和鲈总目分歧年代均落在化石记录范围内, 鲈鱼宗系的 5 个科鱼类分属 3 支: (1)印鱼总科 (*Echeneoidea*)的 3 个科—印鱼科(包括 *Remora australis* 和 *Echeneis neucratoides*)、鲈科 (*Coryphaenidae*)和军曹鱼科(*Rachycentridae*)为单系支(后验概率为 0.593), 该群鱼类分化较早(95 Ma); 军曹鱼与鲈科鬼头刀(*Coryphaena hippurus*)亲缘关系最近(后验概率 0.997), 两者分化于 56 Ma 塔内特阶时期(Thanetian); (2)鲈科鱼类(后验概率为 1)与 鲈科聚为一支; (3)丝帆鱼科(*Nematistidae*)丝帆鱼 (*Nematistius pectoralis*)与 鲈亚目鱼类聚为一支 (0.948)。综上, ND2 基因序列分析结果不支持丝帆鱼 科、鲈科和印鱼总科共同构成的鲈鱼宗系(*Carangoid lineage*)为单系群。

3 讨论

本研究基于军曹鱼(*Rachycentron canadum*)线粒 体 DNA 全序列的测定和系统进化分析, 构建起了 通用性好的 mtDNA 全序列获取体系(图 1、2 和表 1), 获取了军曹鱼与其他鱼类的系统进化关系, 表明 鲈鱼宗系(*Carangoid lineage*)不是单系群(图 3 和 4)。

3.1 通用全序列测定体系

快速高效的获取 mtDNA 全序列是充分解析和

利用全序列数据前必须解决的问题。本研究室在测 定勒氏笛鲷(*Lutjanus russellii*)线粒体全序列(序列号: NC_010963)时采取了长距 PCR 产物直接克隆测序 的方法^[16]。结果表明长距 PCR 能纯化线粒体 DNA, 无需线粒体 DNA 提取, 避免诸如假基因等的干扰, 并保证了总 DNA 很少时模板足够使用。但是, 勒氏 笛鲷的线粒体 DNA 全基因组序列的测定是建立在 Cyt b 和 *cox2* 基因全序列的测定和分析基础上, 且 经实验发现特异性强, 不能普遍适用于其他鱼类, 甚至同属的物种。另外, 需要将多个长距 PCR 产物 克隆进载体也存在一定难度。在后续研究中, 我们 尝试采取了利用通用引物进行长距 PCR 与常规 PCR 的方法获取笛鲷属其他物种的序列, 取得了良好效 果^[27]。本实验将该方法成功用于军曹鱼, 表明具有 很好的通用性。

3.2 序列分析方法

首先, 本研究利用了 Blastn 在线分析从 GenBank 数据库筛选相似性较高的序列, 避免了盲目地依赖 形态学分类选取序列, 缩小了分析的范围, 保证系 统进化分析中各分支具有相对较高的置信度(图 3)。

其次, 本研究充分利用了 PALM 网络服务器实 现了线粒体 DNA 全序列的比对和最大似然树构建。 距离矩阵邻接法(NJ)、最大简约法(MP)和最大似然

法(ML)是重建生物系统关系的 3 种主要方法。普遍认为 ML 法在原理上优于前二种方法,但其计算复杂费时^[28]。由于本研究所获取的 mtDNA 全序列生物信息学数据运算量较大,在普通 PC 进行比对或 ML 法建树等难以实现。而 PALM 服务器集成了 CLUSTALW 比对、Modeltest 和 PhyML 三个程序,只需要导入 FASTA 格式的序列文件的完成模型选择、ML 法构建系统进化树以及相应的 bootstrap 检验分析,十分高效。从本研究图 3 的三个一致树中的置信度和二分歧支数量比较可见,在利用全序列重建系统进化关系时,MP 法的准确率明显低于 NJ 法和 ML 法,NJ 法与 ML 法没有明显差别。

另外,本研究运用 BEAST 软件对 20 个分类单元的 ND2 数据集进行了贝叶斯分析,并采用松散分子钟(Uncorrected relaxed lognormal clock)模型推断分歧的发生时间^[25]。与 MrBayes 相比^[29],BEAST 软件拥有图形化的界面,操作直观,而且配套有 Tracer 和 Figtree 程序,数据分析参数可进行及时调整,生成的进化树和进化年代可进行方便地编辑和标记。

3.3 军曹鱼与鲈形目鱼类的分子系统学关系

如果将硬骨鱼类(Teleost)等同于棘形类(Acanthomorpha)它包括隶属 20 目 296 科 2615 属的约 14650 个物种(Miya 按 Nelson 1994 统计得到)^[30]。硬骨鱼类各类群间的分类关系十分复杂、难有定论,以致 Nelson 描述为杂乱“灌木丛”^[1]。分子系统学的发展为梳理硬骨鱼类的分类提供了新工具。Miya, *et al.* 利用线粒体 DNA 全序列数据界定鲈总目(Percomorpha),表明鲈形目不是单系群^[30]。与之对应,本文图 3 中 mtDNA 全序列分析结果将多种鲈形目鱼类分为了两大支,军曹鱼与鲈科和鲷科关系密切聚为一支,另一支包括了其他鲈形目鱼类和鲷形目鱼类。

O'Toole 提出印鱼总科行为学特征进化路线的两种假设^[12]:(1)若军曹鱼科与印鱼科亲缘关系较与鲷科紧密,则行为进化先后顺序为:鲷科与漂浮物体嬉戏,军曹鱼科追随鳐或鲨等鱼,印鱼科吸附鲨鱼等其他鱼类;(2)若军曹鱼科与鲷科亲缘关系较印鱼科紧密:军曹鱼科追随行为和印鱼吸附行为是趋同进化,或者鲷科进化中失去追逐行为。与 Johnson, *et al.* 和 Gray, *et al.* 分子证据得到结论一致^[9, 13],本研究通过贝叶斯法分析 ND2 基因序列表明军曹鱼与鲷科(Coryphaenidae)鬼头刀(*Coryphaena*

hippurus)具有最紧密的亲缘关系(图 4,后验概率=0.997),支持第二种假设。

另外,图 4 表明军曹鱼科、鲷科和印鱼科组成的印鱼总科可能为单系群(后验概率=0.593),但印鱼总科、鲈科和丝帆鱼科(Nematistiidae)分属不同分支,因此它们共同构成的鲈鱼宗系(Carangoid lineage)不是单系群。

参考文献:

- [1] Nelson J S. Fishes of the world [M]. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc. 2006, 5
- [2] Cheng Q T, Zheng B S. Systematic Synopsis of Chinese Fishes [M]. Beijing: Science Press. 1987, 316 [成庆泰, 郑葆珊. 中国鱼类系统检索. 北京: 科学出版社. 1987, 316]
- [3] Luo J, Liu C W, Luo W L. Studies on breeding parent fish of *Rachycentron canadum* in netting tank and artificial seed breeding [J]. *Marine Fisheries Research*, 2005, 26(2): 18—25 [罗杰, 刘楚吾, 罗伟林. 网箱培育军曹鱼亲鱼及人工育苗研究. 海洋水产研究, 2005, 26(2): 18—25]
- [4] Joan H G, Faulk C K, Schwarz M H. A review of the larviculture of cobia *Rachycentron canadum*, a warm water marine fish [J]. *Aquaculture*, 2007, 268: 181—187
- [5] Han T, Wang J T, Wang Y, *et al.* Effect of Different Fish Protein Hydrolysate (FPH) level of dietary supplements on growth and body composition of larvae of cobia (*Rachycentron Canadum*) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, 34(1): 94—100 [韩涛, 王骥腾, 王勇, 等. 饲料中不同水平鱼蛋白水解物对军曹鱼稚鱼生长及体组成的影响. 水生生物学报, 2010, 34(1): 94—100]
- [6] Mclean E, Salze G, Craig S R. Parasites, diseases and deformities of cobia [J]. *Ribbarstvo*, 2008, 66: 1—16
- [7] Liu L, Liu C W, Liang N. Population genetic analysis for Cobia, *Rachycentron canadum* in Zhanjiang area of the south China sea with microsatellite [J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2008, 27: 57—61 [刘丽, 刘楚吾, 梁宁. 利用微卫星 DNA 标记对南海湛江海域军曹鱼群体遗传多样性的分析. 热带海洋学报, 2008, 27: 57—61]
- [8] Freihofer W C. Cranial nerves of a percoid fish, *Polycentrus schomburgkii* (family Nandidae), a contribution to the morphology and classification of the order Perciformes [J]. *Occasional papers in California Academy of Sciences*. 1978, 128: 1—78
- [9] Johnson, G. D. Percoidei: development and relationships [A]. In: H G Moser, W J Richards, D M Cohen, *et al.* (Eds.), Ontogeny and Systematics of Fishes [C]. Special Publication No. 1, American Society of Ichthyologists and Herpetologists. 1984, 464—498
- [10] Smith-Vaniz, W. F. Percoidei: development and relationships [A]. In: H G Moser, W J Richards, D M Cohen, *et al.*

- (Eds.), *Ontogeny and Systematics of Fishes* [C]. Special Publication No. 1, American Society of Ichthyologists and Herpetologists. 1984, 522—530
- [11] Johnson J D. Percomorph phylogeny: progress and problems [J]. *Bulletin of Marine Science*, 1993, **52**: 3—28
- [12] O'Toole B. Phylogeny of the species of the superfamily Echeneoidea (Perciformes: Carangoidei: Echeneidae, Rachycentridae, and Coryphaenidae), with an interpretation of echeneid hitchhiking behaviour [J]. *Canadian Journal of Zoology*, 2002, **80**: 596—623
- [13] Gray K N, McDowell J R, Collette B B, *et al.* A Molecular Phylogeny of the Remoras and their Relatives [J]. *Bulletin of Marine Science*, 2009, **84**: 183—197
- [14] Reed D L, Carpenter K E, Degraeve M J. Molecular systematics of the Jacks (Perciformes: Carangidae) based on mitochondrial cytochrome b sequences using parsimony, likelihood, and Bayesian approaches [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2002, **23**: 513—524
- [15] Miya M, Takeshima H, Endo H, *et al.* Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2003, **26**: 121—138
- [16] Guo Y S, Wang Z D, Liu C W, *et al.* Sequencing and analysis of the complete mitochondrial DNA of Russell's snapper (*L. russellii*) [J]. *Progress in Natural Science*, 2008, **18**: 1233—1238
- [17] Wang Z D, Guo Y S, Chen R L, *et al.* CO I barcoding sequences of teleosts in the south china sea [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2009, **40**: 608—614 [王中铎, 郭昱嵩, 陈荣玲, 等. 南海常见硬骨鱼类 CO I 条码序列. 海洋与湖沼, 2009, **40**: 608—614]
- [18] Lu S D. Current Protocols for Molecular Biology [M]. Beijing: China Union Medical College Press. 1999, 61 [卢圣栋. 现代分子生物学实验技术. 北京: 中国协和医科大学出版社. 1999, 61]
- [19] Kawahara R, Miya M, Mabuchi K, *et al.* Interrelationships of the 11 gasterosteiform families (sticklebacks, pipefishes, and their relatives): A new perspective based on whole mitogenome sequences from 75 higher teleosts [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2008, **46**: 224—236
- [20] Guo X H, Liu S J, Yan J P, *et al.* The analysis of genetic variability of mtDNA 12S rRNA Genes in the allotetraploid, triploid crucian carp and their parents [J]. *Hereditas*, 2004, **26**: 875—880 [郭新红, 刘少军, 颜金鹏, 等. 异源四倍体鲫鱼、三倍体湘云鲫和它们父母本线粒体 DNA 12S rRNA 基因遗传变异的分析. 遗传, 2004, **26**: 875—880]
- [21] 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
- [22] Lowe T M, Eddy S R. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25**: 955—964
- [23] J D Thompson D G H T. 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**: 4673—4680
- [24] Chen S, Su S, Lo C, *et al.* PALM: A Paralleled and Integrated Framework for Phylogenetic Inference with Automatic Likelihood Model Selectors [J]. *PLoS One*, 2009, **4**: e8116
- [25] Drummond A J, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2007, **7**: 214
- [26] Benton M J, Donoghue P C J. Paleontological evidence to date the tree of life [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, **24**: 26—53
- [27] Tan W, Wang Z D, Guo Y S, *et al.* Structure and evolution of complete mitochondrial genome of *Lutjanus bengalensis* [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2009, **25**: 82—86 [谭围, 王中铎, 郭昱嵩, 等. 孟加拉笛鲷线粒体基因组序列结构及其进化. 中国生物化学与分子生物学报, 2009, **25**: 82—86]
- [28] Leache A D, Reeder T W. Molecular systematics of the Eastern Fence Lizard (*Sceloporus undulatus*): a comparison of Parsimony, Likelihood, and Bayesian approaches [J]. *Systematic Biology*, 2002, **51**: 44—68
- [29] Ronquist F, Huelsenbeck J P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. *Bioinformatics*, 2003, **19**: 1572—1574
- [30] Miya M, Kawaguchi A, Nishida M. Mitogenomic exploration of higher teleostean phylogenies: a case study for moderate-scale evolutionary genomics with 38 newly determined complete mitochondrial DNA sequences [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2001, **18**: 1993—2009

THE COMPLETE MITOCHONDRIAL DNA OF COBIA (*RACHYCENTRON CANADUM*) AND PHYLOGENETICS OF CARANGOID

WANG Zhong-Duo¹, GUO Yu-Song¹, LIU Chu-Wu^{1,2} and LIU Yun²

(1. Key Laboratory of Aquaculture in South China Sea for Aquatic Economic Animal of Guangdong Higher Education Institutes, Fisheries College, Zhanjiang Ocean University, Zhanjiang 524025; 2. College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081)

Abstract: *Cobia Rachycentron canadum* is the only species of Rachycentridae distributing widely in subtropical and tropical oceans and seasonally in temperate waters. *Cobia* has the qualities that define an excellent candidate and emerging global potential for mariculture. Numerous comparative studies have been conducted in attempt to resolve the relationship (to be monophyletic) between Rachycentridae and the other teleosts using anatomical and behavioral methods. The Coryphaenidae and the Rachycentridae and Echeineidae were thought to form a monophyletic group, with Coryphaenidae being the sister group to the clade of Rachycentridae and Echeineidae. Nematistiidae and Carangidae were also hypothesized to be part of a clade with these three families, perhaps forming a trichotomy. However, molecular research regarding the evolutionary relationship of these families remained scarce. Adequate resolution of relationships in any organisms required longer DNA sequences. In this study, the whole mitogenome sequence was determined for cobia, using an approach that employs a long polymerase chain reaction technique and primer walking. It was the first complete mtDNA sequence of cobia (Accession No. FJ154956 and NC_011219, 16758 bp) in GenBank. The mitochondrial genomic sequence contained the same 37 mitochondrial structural genes (two ribosomal RNA, 22 transfer RNA, and 13 protein-coding genes) as found in other vertebrates, with the gene order identical to that in typical vertebrates. All following analyses were based on two datasets. Dataset 1 consisted of highly similar DNA sequences of mitogenomes (score=10055-30213) from GenBank; and dataset 2 included the 20 *ND2* gene complete sequences of the representative species within Coryphaenidae, Nematistiidae, Echeineidae and all branches with high support values in the trees based on dataset 1. The phylogenetic relationship among cobia and other teleost were reconstructed using maximum parsimony (MP), neighbor-joining (NJ), and maximum likelihood (ML) with dataset 1. MP bootstrap scores were much lower than those of NJ or ML, and the MP resolution among higher-level classification were also the lowest. While the NJ and ML analyses provided strong support for a sister group relationship between two clades of Perciformes, in which one clade contained cobia, Carangidae (*Carangoides armatus*, *Trachurus japonicas*, and *T. trachurus*), Istiophoridae (*Makaira indica*, *Istiophorus platypterus*) and Xiphiidae (*Xiphias gladius*) (bootstrap=78 and 97). Unexpectedly, another clade was composed of the other taxa of order Perciformes and two typical species (*Ostracion immaculatus* and *triacanthodes anomalus*) of order Tetraodontiformes. The origin time of cobia was estimated by Bayesian analysis of the dataset 2 under the GTR+G+I+relaxed model for 8.0×10^6 generations resulted in a posterior probability distribution containing 1000 samples per analysis. The results support that: (1) the relative between cobia and dolphinfish is the closest (posterior probability=0.997), and identical with the period of first occurrence of cobia fossil, their most recent common ancestor (MRCA) lived in 56 million years ago (Ma), i.e. Thanetian. (2) Rachycentridae, Coryphaenidae and Echeineidae of the superfamily Echeineoidea proposed by Johnson (1984) cluster in a monophyletic group with low posterior probability(0.593). However, Nematistiidae and Carangidae are placed in clusters of scombridae and Tetraodontidae, respectively. Conclusively, Carangoid lineage is not a monophyly.

Key words: Cobia; Mitochondrial DNA; Phylogenetics; Carangoid