

线粒体 D-loop 序列变异与东方鲀属鱼类系统发育

张玉波^{1,2} 甘小妮¹ 何舜平¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 东方鲀属的红鳍东方鲀 (*Takifugu rubripes*) 是后基因组时代的一种重要模式生物。本研究中, 利用东方鲀属 11 种鱼类 (18 尾) 的 D-loop 基因序列, 对东方鲀属鱼类的系统发育关系进行研究。经序列比对排定后, 分析中 D-loop 序列有 841 个位点, 其中 395 个位点为可变位点, 267 个位点为系统发育信息位点。分别采用邻接法 (NJ)、最大简约法 (MP)、最大似然法 (ML) 和贝叶斯方法构建了分子系统树。研究结果表明: (1) 东方鲀属鱼类为一单系类群; (2) 由横纹东方鲀 (*T. oblongus*) 和铅点东方鲀 (*T. alboblunus*) 构成的姊妹群位于这个类群的基部。此外, 本属鱼类物种分类现状还需要进一步的澄清。

关键词: 系统发育; D-loop; 东方鲀属

中图分类号: Q349+.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)04-0656-08

东方鲀属 (*Takifugu* Abe) 是鲀形目中的一个区域性分布的类群, 主要分布区域从日本岛西部到中国沿海, 极少数可以分布到印度洋^[1-4] (图 1)。据中国动物志记载, 我国分布有 22 种东方鲀属鱼类 (其中包括两个新种, 而 fishbase-<http://www.fishbase.org> 数据库中记载的有效种为 23 个), 分布在一些大的河口区域 (如珠江、长江等河口) 和渤海、黄海、东海和南海等海域^[4]。从 20 世纪 90 年代开始, 拥有“简约”基因组的红鳍东方鲀 (*T. rubripes*), 成为后基因组时代一个新的研究热点, 全基因组草图已经完成^[5]。东方鲀属鱼类在未来基因查询、注释和功能研究过程中, 将发挥非常重要的作用^[4, 6, 7]。

一直以来, 鲀形目鱼类的分子系统发育研究主要集中在属间及属以上分类单元^[8, 9], 有关该类群种间或种内分化的研究还相对缺乏^[10]。有关属内系统发育关系的研究主要集中在形态学层面^[11-16]。Abe^[12]、成庆泰等^[15]、王可玲等^[16]和 Miyaki 等^[17]分别利用形态学和细胞学特征, 对东方鲀属内物种间的相互关系进行了研究。

近年来, 分子系统学方法开始被应用到东方鲀属鱼类的系统发育研究中。陈超等^[18]、宋林生等^[4, 19]和宋林生等^[20]分别利用 RAPD (Random am-

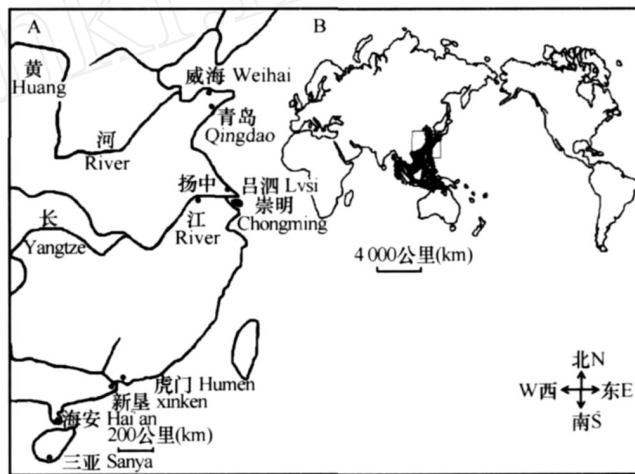


图 1 东方鲀属鱼类的采样 (A) 及分布 (B, 阴影部分)

Fig. 1 The sampling localities of the pufferfishes used in this study (A). The distribution of the *Takifugu* Abe (B, shaded)

plified polymorphic DNA) 和 16S rRNA (572bp) 研究了假睛东方鲀 (*T. pseudomus*)、红鳍东方鲀、虫纹东方鲀 (*T. vermicularis*)、黄鳍东方鲀 (*T. xanthopterus*) 和星点东方鲀 (*T. niphobles*) 等少数几种东方鲀属鱼类的系统发育关系和群体遗传结构。最近, 我们利用细胞色素 *b* 和 12S rRNA 基因, 较为系统地研究了东方鲀属鱼类内部系统发育关系^[21]。由于东

收稿日期: 2007-11-30; 修订日期: 2009-02-02

基金项目: 国家自然科学基金 (30225008) 资助

作者简介: 张玉波 (1978—), 男, 汉族, 湖北武汉人; 博士; 主要从事鱼类系统发育与分子进化的研究。E-mail: ribonchang@gmail.com

通讯作者: 何舜平, E-mail: clad@ihb.ac.cn

方鲀属鱼类各物种间的遗传距离较小,且它们的可能分化模式较为复杂,上述研究并没有完全解决东方鲀属内系统发育关系^[21]。

线粒体基因是研究近缘物种系统发育关系常用的分子标记。线粒体控制区(D-loop)的序列变异速率较快,它是在亲缘关系较近类群间系统发育关系研究中广泛使用的主要分子标记之一^[22]。同时,根据 Holmroff^[8,9]和我们以前的研究结果^[21],选取了鲀科中几个不同物种作为本研究的外类群(表1),以提高系统发育分析的准确性。本研究的主要目的是探讨东方鲀属鱼类的单系性,并进一步讨论该属鱼类的分类学现状。

表 1 研究中东方鲀属鱼类代表种类及相关信息
Tab. 1 Listing of species examined in this study, following classification of Su and Li (2002) with GenBank accession numbers

种名 Taxon and samples	采样编号 Voucher No.	采集地点 Collection locality	序列号 GenBank accession No.
<i>Canthigaster rivulatus</i>			AP006744
<i>Sphoeroides pachygaster</i>			AP006745
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	HB0400161	广东广州	EU302604
<i>Lagocephalus gloveri</i>	HB0411227	江苏吕泗	EU302605
<i>T. snyderi</i>			AY599626
<i>T. porphyreus</i>			AY599625
<i>T. pardalis</i>			AY599624
<i>T. fasciatus</i>			AY952463
<i>T. stictonotus</i>			AY599627
<i>T. exascurus</i>			AY599623
<i>T. oblongus</i>	HB0411188	海南三亚	EU302602
<i>T. albulumbeus</i>	HB0411176	海南三亚	EU302601
<i>T. orbimaculatus</i>	HB0411199	广东虎门	EU302603
<i>T. orbimaculatus</i>	HB0411202	广东虎门	EU302599
<i>T. fasciatus</i>	HB0411212	上海崇明	EU302597
<i>T. fasciatus</i>	HB0411203	广东新垦	EU302598
<i>T. rubripes</i>	HB0411226	江苏吕泗	EU302600
<i>T. stictonotus</i>	HB0507172	山东威海	EU302596

1 材料与方法

1.1 标本采集与鉴定 本研究中包括了 11 种东方鲀属鱼类,具体的种类及采集地信息(表1)。相关的物种鉴定均依照中国动物志^[23]种的分类标准进行。采集的标本用 95%的酒精进行固定,保存于中国科学院水生生物研究所淡水鱼类博物馆。

1.2 DNA 提取、扩增和测序 以 95%乙醇保存的

鳍条样本为试验材料,采用标准的苯酚/氯仿抽提法提取基因组 DNA^[24],用于 PCR 扩增。引物设计参考 Liu^[25],并根据已经发表的红鳍东方鲀的线粒体基因组序列^[7]进行了比对修正。D-loop 基因的 PCR 扩增和测序引物分别为同一引物,引物序列为 F (5'-ACCACTGGCTCCCAAAGC-3')、R (5'-ATCT-TAGCATCTTCA GTA-3')。60μL PCR 反应体系含有约 50ng 的模板 DNA, 10×缓冲液 5μL, 2.5mmol/L 的 dNTP 各 2μL,引物 (10 pmol/L)各 2.5 μL, Taq 聚合酶 2.0U,最后补足灭菌双蒸水至终体积。PCR 反应条件为: 94℃预变性 4min; 94℃变性 45min, 52℃退火 45s, 72℃延伸 1min, 35 个循环; 72℃延伸 8min。每次反应设立不含 DNA 模板的空白对照组。扩增产物经 0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测后,利用 glass milk 纯化试剂盒 (BioStar)回收并进行测序(序列 GenBank 登录号见表 1)。

1.3 序列与系统发育分析 序列拼接过程中使用了 DNA star 中 Editseq 模块 (<http://www.dnastar.com/web/index.php>)。分别采用 Clustal_X^[26]和 SEAVIEW^[27]软件进行序列排序和序列分析。外类群 *Tetraodon nigroviridis* 和 *Lagocephalus gloveri* 的基因序列也一起被用于系统发育研究中(表1)。此外,据 Wiens^[28]的建议,从 Genebank 中获得的部分东方鲀属鱼类和其他外类群的 D-loop 序列同时被包括在随后系统发育分析中(表1)。

利用 DAMBE^[29]软件分析 D-loop 序列的饱和性(不包括外类群),进化模型为 F84^[30]。遗传距离计算(p-distance)和转换、颠换比的计算在 MEGA3^[31]软件中完成。利用 PAUP * 4.0b10^[32]分析碱基频率、碱基偏倚(Compositional bias)。系统发育分析在 PAUP * 4.0b10^[32]软件包和 MBayes 3.04b^[33]中进行,分别采用了邻接法(Neighbor-joining, NJ)、最大简约法(Maximum parsimony, MP)、最大似然法(Maximum likelihood, ML)和贝叶斯法(Bayesian)来构建系统发育树,其中贝叶斯分析在 MBayes 3.04b^[33]完成。ML、MP 和 NJ 分析中采用自展值分析(Bootstrap, BS)对分支树的可靠性进行检验,分别对应 250、1000 和 1000 随机重复抽样;贝叶斯法中节点支持率为后验概率(Posterior probabilities, PP)。ML 和 NJ 分析中,使用 Modtest 3.06^[34]程序来选择序列的最佳替代模型。利用 PAUP 中的 Shimodaira-Hasegawa (SH)检验^[35],检验不同构树方法所得到的系统发育树之间是否收敛,来帮助选择最优的系统发育树。

2 结 果

2.1 序列分析

用于分析的序列共包括了 15种 18个体 (包括外类群),序列长度为 841个碱基 (bp),其中可变位点为 395个,简约信息位点为 267个。序列矩阵中各序列的碱基频率和用于分析的位点数目信息 (表 2)。分析结果表明,D-loop序列显示出较明显的碱基偏倚,其中 G的含量较低,全序列中仅占有 14.9%,而第三位点仅为 6.8%,这也是线粒体基因的一个显著特征,同以前报道的辐鳍亚纲 (Acti-

nopterygii)鱼类线粒体序列类似^[36]。碱基组成的同质性检验结果: $\chi^2 = 45.74, df = 51, p = 0.68$ 。序列饱和性分析结果表明,序列不同位点间突变没有达到饱和,可用于系统发育分析 (图 2)。表 3给出了东方鲀属鱼类物种及个体间的遗传距离 (p-distance)矩阵。东方鲀属鱼类的遗传距离在 0.028 (*T. snyderi*和 *T. stictonotus*)到 0.083 (*T. oblongus*分别与 *T. alboplum beus*和 *T. blongus*)之间,内类群同外类群之间的遗传距离在 0.227 (*Lagocephalus gloveri*和 *T. blongus*)到 0.269 (*Sphoeroides pachygaster*和 *T. fasciatus*)之间。

表 2 18个个体序列的碱基频率
Tab. 2 Nucleotide frequencies of D-loop sequences in 18 individuals

Taxon	A	C	G	T	# Sites
<i>T. stictonotus</i>	0.333	0.187	0.167	0.312	616
<i>T. stictonotus</i>	0.325	0.175	0.174	0.325	793
<i>T. snyderi</i>	0.332	0.193	0.167	0.308	617
<i>T. fasciatus</i>	0.355	0.191	0.132	0.321	816
<i>T. fasciatus</i>	0.359	0.191	0.129	0.322	817
<i>T. orbim aculatus</i>	0.358	0.190	0.129	0.323	815
<i>T. fasciatus</i>	0.356	0.186	0.131	0.327	817
<i>T. alboplum beus</i>	0.349	0.191	0.132	0.327	816
<i>T. oblongus</i>	0.346	0.191	0.139	0.324	815
<i>T. rubripes</i>	0.353	0.188	0.133	0.326	819
<i>T. orbim aculatus</i>	0.357	0.183	0.134	0.327	816
<i>T. pardalis</i>	0.333	0.189	0.160	0.318	613
<i>T. exascurus</i>	0.330	0.196	0.166	0.308	616
<i>T. porphyreus</i>	0.338	0.200	0.162	0.300	616
<i>Canthigaster rivulatus</i>	0.319	0.212	0.160	0.308	805
<i>Sphoeroides pachygaster</i>	0.322	0.206	0.155	0.317	795
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	0.307	0.212	0.176	0.305	802
<i>Lagocephalus gloveri</i>	0.327	0.208	0.149	0.316	804
Mean	0.339	0.194	0.149	0.318	756

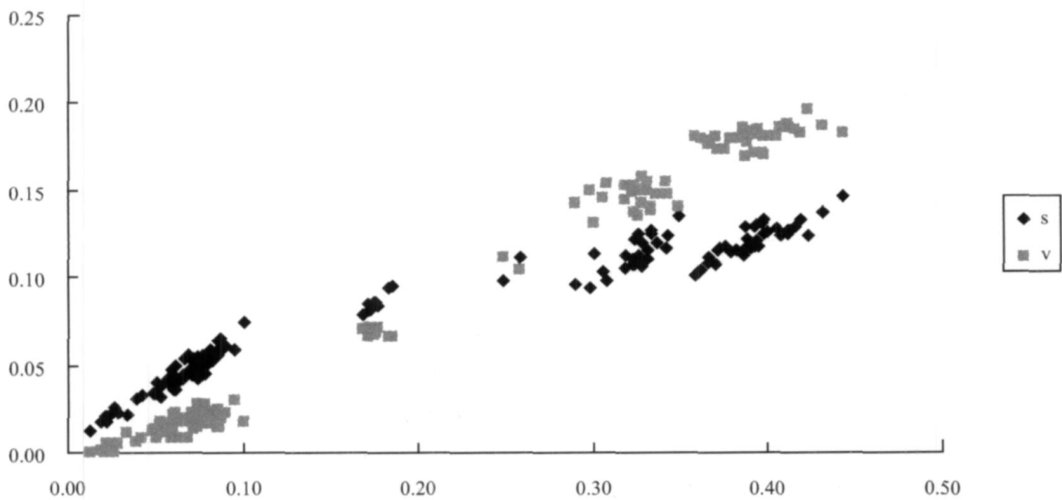


图 2 饱和性检验结果

Fig. 2 Numbers of transition and transversion substitutions
采用 F84距离,含 18个条序列;s表示转换,v表示颠换
vs. the F84 distances in pairwise comparisons of 18 sequences (included outgroups) for D-loop gene; s meant transition; v meant transversion

表 3 基于 D-loop 序列的 18 个个体间的遗传距离 (p-distance) 矩阵

Tab. 3 Pairwise p-distance of the D-loop sequences of 18 individuals

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<i>T. stictonotus</i>																	
<i>T. stictonotus</i>	0.03																
<i>T. snyderi</i>	0.028	0.055															
<i>T. fasciatus</i>	0.071	0.081	0.06														
<i>T. fasciatus</i>	0.065	0.073	0.055	0.012													
<i>T. orbimaculatus</i>	0.064	0.074	0.053	0.021	0.016												
<i>T. fasciatus</i>	0.071	0.081	0.06	0.03	0.021	0.016											
<i>T. alboplumbeus</i>	0.067	0.071	0.064	0.067	0.065	0.06	0.065										
<i>T. blongus</i>	0.064	0.071	0.06	0.064	0.062	0.053	0.058	0.021									
<i>T. nubripes</i>	0.062	0.081	0.044	0.046	0.037	0.035	0.037	0.062	0.06								
<i>T. alboplumbeus</i>	0.069	0.071	0.069	0.078	0.065	0.067	0.073	0.062	0.076	0.06							
<i>T. pardalis</i>	0.067	0.076	0.053	0.064	0.055	0.053	0.058	0.065	0.069	0.039	0.046						
<i>T. exasculus</i>	0.067	0.08	0.048	0.076	0.067	0.065	0.073	0.083	0.083	0.053	0.074	0.057					
<i>T. porphyreus</i>	0.051	0.081	0.037	0.064	0.058	0.06	0.06	0.076	0.069	0.051	0.081	0.065	0.067				
<i>Canthigaster</i>	0.251	0.25	0.262	0.25	0.248	0.25	0.248	0.246	0.251	0.246	0.234	0.248	0.248	0.251			
<i>Sphoeroides pachygaster</i>	0.246	0.241	0.25	0.264	0.262	0.262	0.269	0.246	0.25	0.264	0.25	0.25	0.257	0.257	0.188		
<i>Tetraodon nigroviridis</i>	0.255	0.25	0.253	0.26	0.255	0.251	0.262	0.246	0.248	0.25	0.246	0.244	0.253	0.262	0.212	0.23	
<i>Lagocephalus gloveri</i>	0.241	0.241	0.241	0.246	0.242	0.239	0.246	0.227	0.235	0.232	0.228	0.234	0.248	0.237	0.232	0.225	0.26

2.2 系统发育关系

本研究中,各种分析方法所得的结果均表明东方鲀属鱼类系一单系类群, Bayesian、ML、MP和 NJ 树中所获得的节点支持率均为为 100。图 3 给出了 Bayesian、ML (-ln L = 6627.22)和 MP 树。因为 NJ 法在建树过程和不同的遗传距离进行建树分析过程中所得的拓扑结构间存在着一定的差异,所以研究结果中没有加以展示。

Bayesian 树中,由铅点东方鲀 (*T. alboplumbeus*) 和横纹东方鲀 (*T. oblongus*) 组成的一个姊妹群位于东方鲀属鱼类系统发育的基部位置;余下的物种构成了一个单系群 (PP = 99),其中包括两支。*T. exasculus* 位于其中一个单系群 (PP = 92) 的基部,由 *T. snyderi* 和密点东方鲀 (*T. stictonotus*) 构成的姊妹群 (PP = 52) 和紫色东方鲀 (*T. porphyreus*) 构成了一个单系 (PP = 100)。另一支中,暗纹东方鲀 (*T. fasciatus*) 和圆斑东方鲀 (*T. orbimaculatus*) 构成一个姊妹群 (PP = 100),另外一圆斑东方鲀个体则同豹纹东方鲀 (*T. pardalis*) 聚成姊妹群 (PP = 98)。Bayesian 树同 ML 树较为一致,但同 MP 树的拓扑结构间

存在着差异。我们推测这可能是由于 D-loop 序列的可变区内存在着较多的插入或缺失位点,从而影响了 MP 分析的准确性所致。

Buckley, *et al.*^[37] 认为在有关不同拓扑结构是否存在差异的检验方法中, Shimodaira-Hasegawa (SH) 检验^[35] 有两种相对优势,我们依此选定 SH 检验作为选择最优系统发育树的检验方法。SH 检验的结果表明,本研究中的不同系统发育树间不存在显著差异 (表 4); 同时,我们依据 SH 检验的结果,选定 Bayesian 树作为本研究的最优系统发育树。

表 4 利用 SH 统计检验对 MP、NJ、ML 和 Bayesian 树检验结果
Tab. 4 Statistical comparison of alternative topologies including MP, NJ, ML and Bayesian trees using and Shimodaira and Hasegawa (1999) tests

Tree	Shimodaira-Hasegawa test		
	-ln L	Diff -ln L	p
MP tree	5029.880	8.845	0.140
Bayesian tree	5021.035	Best	
ML tree	5021.525	0.490	0.693

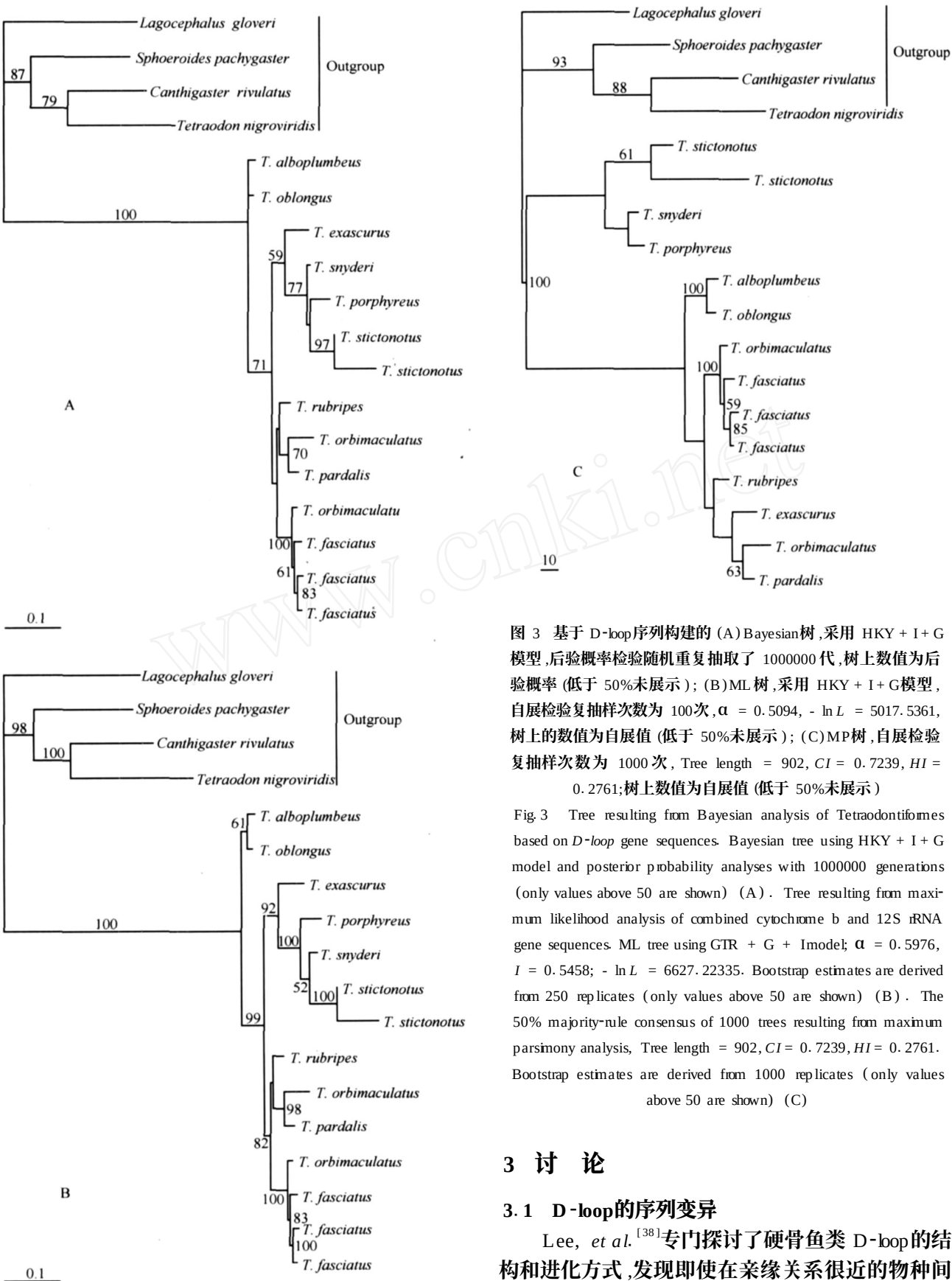


图 3 基于 D-loop 序列构建的 (A) Bayesian 树, 采用 HKY + I + G 模型, 后验概率检验随机重复抽取了 1000000 代, 树上数值为后验概率 (低于 50% 未展示); (B) ML 树, 采用 HKY + I + G 模型, 自展检验复抽样次数为 100 次, $\alpha = 0.5094$, $-\ln L = 5017.5361$, 树上的数值为自展值 (低于 50% 未展示); (C) MP 树, 自展检验复抽样次数为 1000 次, Tree length = 902, CI = 0.7239, HI = 0.2761; 树上数值为自展值 (低于 50% 未展示)

Fig. 3 Tree resulting from Bayesian analysis of Tetraodontiformes based on D-loop gene sequences. Bayesian tree using HKY + I + G model and posterior probability analyses with 1000000 generations (only values above 50 are shown) (A). Tree resulting from maximum likelihood analysis of combined cytochrome b and 12S rRNA gene sequences. ML tree using GTR + G + I model; $\alpha = 0.5976$, $I = 0.5458$; $-\ln L = 6627.22335$. Bootstrap estimates are derived from 250 replicates (only values above 50 are shown) (B). The 50% majority-rule consensus of 1000 trees resulting from maximum parsimony analysis, Tree length = 902, CI = 0.7239, HI = 0.2761. Bootstrap estimates are derived from 1000 replicates (only values above 50 are shown) (C)

3 讨论

3.1 D-loop 的序列变异

Lee, et al.^[38] 专门探讨了硬骨鱼类 D-loop 的结构和进化方式, 发现即使在亲缘关系很近的物种间也存在高度的长度变异。对于探讨一些快速形成的物种, D-loop 提供的信息可能更有价值。本研究中,

基于 D-loop 序列的东方鲀属各物种间的遗传距离明显较以前的研究结果^[21]高。同时,由于 D-loop 序列间插入和缺失的比例较高,所以在分析过程中,需要对这部分序列进行更为精细的分析。

3.2 东方鲀属鱼类的单系性及属内系统发育关系

长期来,有关东方鲀属鱼类的分类及系统发育关系比较混乱,相关的分子系统学研究相对缺乏^[3,13,15,16]。成庆泰等^[15]、王可玲等^[16]和我们最近的研究结果^[21]均表明,东方鲀属鱼类为一个单系类群,本研究结果也再次印证了这一结果。本研究中,东方鲀属中铅点东方鲀和横纹东方鲀所构成的姊妹群关系与我们以前的研究结果^[21]一致。本研究结果进一步显示,铅点东方鲀和横纹东方鲀位于东方鲀属鱼类系统发育树的基部,这支持了苏锦祥和李春生^[23]有关东方鲀属鱼类起源的解释。他们提出,东方鲀属鱼类起源于印澳热带海域(东印度洋和西太平洋海域),如横纹东方鲀和铅点东方鲀,从南方海域逐渐向北扩散,并向咸淡水水域环境移进,获得了种分布的扩散和不同环境的适应性,并以此进行种的分化和演变,由此推动了东方鲀属物种多样化的历史进程。

本研究中,暗纹东方鲀和圆斑东方鲀直接的关系比较接近,这同我们以前的研究结果^[21]是一致的。然而,在比较暗纹东方鲀和圆斑东方鲀的形态学特征之后,我们发现暗纹东方鲀的体表花纹变化较大,所以它同邻近种的分类特征往往容易混淆,而且暗纹东方鲀和晕环东方鲀之间可能存在着同种异名的现象^[21]。因此,对暗纹东方鲀的分类学研究需要进一步深入进行。研究中我们还发现,我们选取的两尾圆斑东方鲀中花纹变异较大的一尾同豹纹东方鲀之间关系密切,这可能是由于豹纹东方鲀的序列不完整和 D-loop 基因序列间插入和缺失位点较多共同导致的分析结果中的“噪音”所致。另外,本研究中,我们发现密点东方鲀和日本文献记载中的 *T. snyderi* 形态特征非常接近,而两者外部形态特征的差别主要体现在臀鳍和背鳍的颜色变化:密点东方鲀的鳍条颜色较淡, *T. snyderi* 为淡黄色。因此,这两个物种的命名可能是同种异名。

3.3 有关未来研究工作的展望

通过不同研究结果的比较^[4,20,21],我们发现东方鲀属鱼类相互间的关系非常密切,不同物种间的遗传距离较为接近。研究中我们还发现,圆斑东方鲀同暗纹东方鲀的关系密切(PP=100)。

东方鲀属是硬骨鱼类中最特化的类群^[23]之一,

它们是区域分布的类群,分布区域限于太平洋西海岸沿岸;游泳能力一般;形态上主要是通过体色花纹、体形、气囊和体表的皮刺分布与其他类群的鱼类相区别。就形态学特征而言,东方鲀属鱼类的体表花纹变化多样^[23],有些物种非常相似,相互间不容易区别,很容易混淆。Kadereit^[39]指出,适应性特征会随着基因突变的增加而呈递增趋势,这明显同在该属鱼类中观察到的结果不一致。同时,东方鲀属鱼类中存在的不同物种间的中间型个体^[4,21,23],我们以前研究中发现的与该类群物种分化可能相关的、独特的物种分化方式等问题也一直吸引着我们。在东方鲀属作为模式生物扮演着越来越重要的功能基因组的时代,上述研究工作对物种形成及进化机制的描述,将为不同生物物种内部分化关系的研究带来更多的启示。

参考文献:

- [1] Santini F, Tyler J C. A phylogeny of the families of fossil and extant tetraodontiform fishes (Acanthomorpha, Tetraodontiformes), Upper Cretaceous to Recent [J]. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 2003, 139: 565—617
- [2] Masuda Y, Shinohara N, Takahashi Y, et al. Occurrence of natural hybrid between pufferfishes, *Takifugu xanthopterus* and *T. vermicularis*, in Ariake Bay, Kyushu, Japan [J]. *Nippon Suisan Gakkaishi*, 1991, 57: 1247—1255
- [3] Masuda H, Amaoka K, Araga C, et al. The fishes of the Japanese Archipelago [M]. Tokyo: Tokai Univ Press 1984, 363—364
- [4] Song L, Liu B, Xiang J, et al. Molecular phylogeny and species identification of pufferfish of the genus *Takifugu* (Tetraodontiformes, Tetraodontidae) [J]. *Marine Biotechnology* (NY), 2001, 3: 398—406
- [5] Aparicio S, Chapman J, Stupka E, et al. Whole-genome shotgun assembly and analysis of the genome of *Fugu rubripes* [J]. *Science*, 2002, 297: 1301—1310
- [6] Brenner S, Elgar G, Sandford R, et al. Characterization of the pufferfish (*Fugu*) genome as a compact model vertebrate genome [J]. *Nature*, 1993, 366: 265—268
- [7] Elnenot C, Amason U, Gojobori T, et al. The mitochondrial genome of the pufferfish, *Fugu rubripes*, and ordinal teleostean relationships [J]. *Gene*, 2002, 295: 163—172
- [8] Holcroft N I. A molecular test of alternative hypotheses of tetraodontiform (Acanthomorpha: Tetraodontiformes) sister group relationships using data from the RAG1 gene [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2004, 32: 749—760
- [9] Holcroft N I. A molecular analysis of the interrelationships of tetraodontiform fishes (Acanthomorpha: Tetraodontiformes) [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2005, 34: 525—544
- [10] Chen W J, Orti G, Meyer A. Novel evolutionary relationship

- among four fish model systems [J]. *Trends in Genetics*, 2004, **20**: 424—431
- [11] Fraser-Brunner A. Notes on the plectognath fishes —VIII The classification of the suborder Tetraodontidea, with a synopsis of the genera [J]. *Annals and Magazine of Natural History*, 1943, **10**: 1—18
- [12] Abe T. Taxonomic studies on the puffers (Tetraodontidae, Teleostei) from Japan and adjacent regions, V: Synopsis of the puffers from and adjacent regions [J]. *Bulletin of the Biogeographical Society of Japan*, 1949, **14** (1, 13): 1—15, 89—140, 141—142
- [13] Abe T. Taxonomic studies on the puffers (Tetraodontidae, Teleostei) from Japan and adjacent regions, VII: concluding remarks, with the introduction of two new genera, *Fugu* and *Boesemanichthys* [J]. *Japanese Journal of Ichthyology*, 1952, **2** (1, 2, 3): 35—44, 31—33, 93—97, 117—127
- [14] Whitley G P. Studies in ichthyology [M]. publishing company, 1953, 60—112
- [15] Cheng Q T, Wang C X, Tian M C, *et al*. Studies on the Chinese Tetraodonoid fishes of the genus *Fugu* [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1975, **21** (4): 359—378 戚庆泰, 王存信, 田明诚, 等. 中国东方鲀属鱼类分类研究. *动物学报*, 1975, **21** (4): 359—378]
- [16] Wang K L, Zhang P J, Yin Q. Studies on the interspecific differences of myogen and cluster of the genus *Fugu* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1984, **15** (5): 493—500 [王可玲, 张培军, 尹青. 东方鲀属鱼类肌浆蛋白的种间差异及其聚类分析. *海洋与湖沼*, 1984, **15** (5): 493—500]
- [17] Miyaki K, Tebeta O, Kayano H. Karyotypes in six species of pufferfishes genus *Takifugu* (Tetraodontidae, Tetraodontiformes) [J]. *Fisheries Sciences*, 1995, **61**: 594—598
- [18] Chen C, Shi T, Sun S G, *et al*. Identification and phylogenetic relationships among four species of puffer fish in *Fugu* as determined by RAPD [J]. *Marine Fisheries Research*, 2001, **22** (3): 32—36 [陈超, 石拓, 孙曙光, 等. 应用 RAPD 标记对东方鲀属进行种类鉴别及其聚类分析. *海洋水产研究*, 2001, **22** (3): 32—36]
- [19] Song L S, Liu B, Wang Z, *et al*. Phylogenetic relationships among pufferfish of genus *Takifugu* by RAPD analysis [J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2001, **19**: 128—134
- [20] Song L, Li H, Cui Z, *et al*. Population genetic structure and genetic differentiation of the pufferfish *Takifugu rubripes* and *Takifugu pseudonmmus* revealed by RAPD Analysis [J]. *High Technology Letters*, 2003, **9**: 22—25
- [21] Zhang Y B, He S P. Phylogenetic relationships among the *Takifugu* Abe and Cytochrome *b* and 12S rRNA variations [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2007, **50** (21): 2507—2516 [张玉波, 何舜平. 细胞色素 *b* 和 12S rRNA 基因序列变异与东方鲀属鱼类系统发育. *科学通报*, 2007, **50** (21): 2507—2516]
- [22] Zhao K, Yang G S, Li J B, *et al*. Phylogenetic structure of *schizopygopsis pylzovi* populations from mitochondrial cytochrome *b* gene sequence variations [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30** (2): 129—133 [赵凯, 杨公社, 李俊兵, 等. 黄河裸裂尻鱼群体遗传结构和 Cyt *b* 序列变异. *水生生物学报*, 2006, **30** (2): 129—133]
- [23] Su J X, Li C S. Fauna Sinica, Class Teleostei, Tetraodontiformes [M]. Beijing: Science Press 2002 [苏锦祥, 李春生. *中国动物志*. 北京: 科学出版社. 2002]
- [24] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual-2nd [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989
- [25] Liu H Z. Phylogenetic relationships of the cypriiniformes tested by mtDNA 12S rRNA sequence variations [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2004, **31**: 137—142
- [26] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al*. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25**: 4876—4882
- [27] Galtier N, Gouy M, Gautier C. SEAVIEW and PHYLO_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny [J]. *Computer Applications in the Biosciences*, 1996, **12**: 543—548
- [28] Wiens J J. Combining data sets with different phylogenetic histories [J]. *System Biology*, 1998, **47**: 568—581
- [29] Xia X, Xie Z. DAMBE: software package for data analysis in molecular biology and evolution [J]. *Journal of Heredity*, 2001, **92**: 371—373
- [30] Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1993, **10**: 512—526
- [31] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment [J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, **5**: 150—163
- [32] Swofford D L. PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (and other methods) [M]. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2002
- [33] Huelsenbeck J P, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees [J]. *Bioinformatics*, 2001, **17**: 754—755
- [34] Posada D, Crandall K A. MODELTEST: testing the model of DNA substitution [J]. *Bioinformatics*, 1998, **14**: 817—818
- [35] Shimodaira H, Hasegawa M. Multiple comparisons of loglikelihoods with applications to phylogenetic inference [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1999, **16**: 1114—1116
- [36] Cantatore P, Roberti M, Pesole G, *et al*. Evolutionary analysis of cytochrome *b* sequences in some Perciformes: evidence for a slower rate of evolution than in mammals [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1994, **39**: 589—597
- [37] Buckley T R, Simon C, Shimodaira H, *et al*. Evaluating hypotheses on the origin and evolution of the New Zealand alpine cicadas (Maoricicada) using multiple-comparison tests of tree topology [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2001, **18**: 223—234
- [38] Lee W J, Conroy J, Howell W H, *et al*. Structure and evolution

of teleost mitochondrial control regions [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1995, **41**: 54—66

[39] Kadereit J W. Molecules and morphology, phylogenetics and genetics [J]. *Botanica Acta*, 1994, **107**: 369—373

**PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS OF THE GENUS
TAKIFUGU (TETRAODONTIFORMES, TETRAODONTIDAE)
TESTED BY mtDNA D-LOOP REGION SEQUENCE VARIATIONS**

ZHANG Yu-Bo^{1, 2}, GAN Xiao-Ni¹ and HE Shun-Ping¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

Abstract: The pufferfishes of the genus *Takifugu* are East Asian fish, mainly distribute along the coastal region in western part of the Sea of Japan and the East China. This genus is attached more and more importance to researchers, for *Takifugu rubripes*, which is one species in it, has been a new model fish in the post-genomic era. The details of the phylogenetic relationships within the genus remain unresolved. In the present paper, mitochondrial D-loop sequences of 11 species of the genus *Takifugu* were determined and analyzed to test the present phylogenetic hypotheses. The sequence saturation analysis was inferred from the shape of the trend line, which indicated that the sequence was unsaturated and could be used in the following phylogenetic analysis. After alignment, the sequence compositions and variations were analyzed by using MEGA 3 software. There were 841 sites, among which 395 sites were variable, and 267 were informative. There was significant difference in base compositional bias between the ingroup and the outgroup species. The uncorrected p-distance matrix obtained from the analysis of the alignment of all D-loop sequences showed that the relationships among the different species were closely. Neighbor-joining, Maximum Parsimony, Maximum Likelihood and Bayesian methods were employed for phylogenetics analysis, respectively. Due to the SH test about the phylogeny hypothesis, we chose the Bayesian tree as our best tree in this paper. The Bayesian tree has described a more clearly phylogeny and the analysis also has pointed out the basal species in the genus. The results indicate that the genus form a monophyletic groups, with the sister group consisted by *T. oblongus* and *T. alboplumbus* is the basal group of the genus. Our results also show some confusion about the taxonomy in the genus, according to the data and combined analysis with the morphological characters, we suppose some species are in fact synonymous in this genus, which suggest that the taxonomy should be clarified based on both molecular and morphological data in the future.

Key words: Phylogeny; D-loop; *Takifugu*