

# 通过 Cyt b 基因同源序列比较评估厦门文昌鱼的分类学地位\*

王义权\*\* 许群山 彭宣宪 周涵韬

厦门大学生命科学学院, 厦门 361005

**摘要** 白氏文昌鱼 *Branchiostoma belcheri* (Gray) 在我国和日本沿海均有分布, 由于南、北方文昌鱼形态学上有一定差异, 且二者间存在一些过渡类型, 其分类地位问题仍有待进一步澄清。本文测定了厦门欧厝海域产的文昌鱼 mtDNA Cyt b 基因序列, 并与日本产的文昌鱼以及另外产于大西洋的两种文昌鱼 Cyt b 基因序列比较。分子系统学分析结果表明: 厦门欧厝海域产的文昌鱼与日本产的文昌鱼平均遗传距离为 21.12%, 达到了种间分化的水平; 经过对已有文献和文昌鱼地理分布的综合分析, 作者建议将原来的白氏文昌鱼青岛亚种 *B. belcheri tsingtauense* 提升为种, 南、北方所产文昌鱼分别作为两个独立的种存在, 即南方的 *B. belcheri* (Gray) 和北方的 *B. tsingtauense* Tchang et Koo [动物学报 50 (2): 202-208, 2004]。

**关键词** 文昌鱼 Cyt b 基因 DNA 序列 分子系统学 分类地位

## Taxonomic status of amphioxus *Branchiostoma belcheri* in Xiamen Beach estimated by homologous sequence of Cyt b gene\*

WANG Yi-Quan\*\*, XU Qun-Shan, PENG Xuan-Xian, ZHOU Han-Tao

School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China

**Abstract** *Branchiostoma belcheri* (Gray) is distributed along the east coast of Asiatic mainland from South China Sea to Bohai Sea and Japanese waters. Scientists noticed morphological divergence between the animals from south to north area, and identified amphioxus in both Bohai Sea and Japanese waters as a new subspecies, *B. belcheri tsingtauense*. Nevertheless, intermediate forms between the southern and northern animals indicate their classification needs clarification. In the present research, we sequenced Cyt b gene of amphioxus sampled from Xiamen (Amoy) and compared the data with homologous sequences of Japanese amphioxus and two species living in the Atlantic Ocean. The results from molecular phylogenetic analysis showed that genetic distance between Xiamen amphioxus and Japanese amphioxus averages 21.12% with variation much above a normal species' divergence observed in other taxa. Considering the geographic, morphological and taxonomic records in the literature, we suggested that amphioxus in south and north areas might belong to different species and the original subspecies *B. belcheri tsingtauense* should be renamed as a separate species and its new scientific name should be *B. tsingtauense* Tchang et Koo, which includes animals both in Bohai Sea and in Japanese waters. Accordingly, amphioxus in Xiamen, including the animal distributed all south area, should keep the name of *Branchiostoma belcheri* (Gray) [Acta Zoologica Sinica 50 (2): 202-208, 2004].

**Key words** Amphioxus, *Branchiostoma belcheri* (Gray), Cyt b gene, DNA sequence, Molecular phylogenetics, Taxonomic status

文昌鱼隶属脊索动物门头索动物亚门, 是全世界现存动物中与脊椎动物关系最近的一类非脊椎动物, 已知这一亚门动物现存仅 29 种左右。厦门海域产的文昌鱼目前在学术界广为接受的学名为

*Branchiostoma belcheri* (Gray), 中文译名为白氏文昌鱼或白氏鳃口鱼, 最早由当时在厦门大学系担任动物学教授的美国学者 S. F. Light (1923) 首次发表, 后经 Boring and Li (1932) 研

2003-08-22 收稿, 2003-12-04 接受

\* 教育部留学回国人员启动基金和教育部高等学校骨干教师资助计划项目 (No. GG180-21002403-1740) [This research was funded by Foundation for University Key Teacher from State Education Ministry (No. GG180-21002403-1740) and SRF for ROCS, SEM]

\*\* 通讯作者 (Corresponding author). E-mail: wangyqnj@jlonline.com

© 2004 动物学报 Acta Zoologica Sinica

究厦门的文昌鱼分类学特征后，正式鉴定种名，一直沿用至今。据记载（朱元鼎，1984），该物种分布西自印度洋非洲东岸，东至印度尼西亚，北至日本和菲律宾，我国产于台湾海峡、东海和黄海，分布海域十分广阔。

虽然文昌鱼在动物进化中的地位极为重要，由于它们是一类营钻沙生活的小型动物，除中国厦门历史上曾形成过渔场，有一定的产量外，一般认为没有多少经济价值，因此关于这类动物的分类学研究并不多。文昌鱼 *B. belcheri* 这一物种最初由 Gray 于 1847 年根据采自 Borneo（婆罗洲，加里曼丹的旧称）海域的标本定名，此后的动物分类学家研究认为分布于厦门、青岛、台湾、日本等地的文昌鱼均为 *B. belcheri*。在如此广阔的范围内存文昌鱼有无种或亚种的分化？Tchang and Koo (1936) 比较了采自胶州湾的文昌鱼标本和 *B. belcheri* 的肌节、鳍条数等形态学特征后，认为产自该海域的文昌鱼为一新亚种，将其订名为白氏文昌鱼青岛亚种 *B. belcheri tsingtauense*，习惯上又称之为青岛文昌鱼。周才武 (1958) 研究了产自海南、厦门、青岛和烟台的文昌鱼标本后，认为青岛和烟台两地产的文昌鱼与厦门和海南产的文昌鱼有较显著的差异，前二者同属白氏文昌鱼青岛亚种，此后，学术界将产自胶州湾及其邻近海域的文昌鱼作为青岛亚种，而其他产区的文昌鱼仍被称为 *B. belcheri*。直到 2001 年，曹玉萍等详细地比较了产自厦门、青岛和秦皇岛的文昌鱼体形、肌节数、背腹鳍条和生殖腺数，三地所产的文昌鱼在形态上虽有一定差异，但各地标本的数量性状特征又互有交错，初步认为它们均为白氏文昌鱼 *B. belcheri*，其中秦皇的岛文昌鱼与青岛的文昌鱼亲缘关系较近，但准确的分类地位尚待进一步研究（曹玉萍等，2001）。国外关于白氏文昌鱼的研究中，以 Nishikawa (1981) 的研究最为详细。作者在比较了大量的文昌鱼标本后认为，产自日本的文昌鱼主要是 *B. belcheri tsingtauense*，但产自日本有明海（Ariake）和天草群岛（Amakusa Islands）的文昌鱼是介于 *B. belcheri tsingtauense* 和 *B. belcheri*（实际上是指名亚种）之间的一个中间类型。Henmi and Yamaguchi (2003) 的研究也认为日本有明海产的文昌鱼属于二者间的一个中间类型。

全世界文昌鱼的种类虽然并不多，却广泛分布于大西洋、太平洋、印度洋的热带和温带海岸，这类体形不大的动物都有着相似的生活方式，均生活

在浅海沙滩，成体潜入海底沙中，营滤食生活，进化的趋同性致使这类动物在外部形态特征上也十分相似。常用的分类学特征如口笠触须数目、肌节数、鳍条数等由于变异范围大，不同产地标本的间界线模糊，给分类学研究带来困难。随着分子生物学的发展，多种分子标记技术在动物分类学、动物系统学、种群遗传学的研究中得到应用，一些用传统的分类学方法很难界定的物种，通过分子系统学的方法得到解决（周材权等，2003；曹丽荣等，2003），在动物类群的系统发育研究也得到越来越多的应用（杨学干等，2001；周继亮等 2001；曹祥荣等，2002）。虽然近年关于文昌鱼的 EST、某些基因和基因家族进化在脊椎动物起源方面的研究，以及文昌鱼线粒体基因组等均有过一些报道（Spruyt et al. , 1998；Boore et al. , 1999；Mou et al. , 2002；Minguillon et al. , 2003；Panopoulou et al. , 2003），但却未见用分子系统学方法研究分布于太平洋西岸的文昌鱼分类学问题的报道。我们在研究厦门的文昌鱼线粒体基因组过程中发现，厦门产文昌鱼 Cyt *b* 基因的 DNA 序列与已报道的 *B. belcheri* 有很大差别，这一现象引起我们对厦门的文昌鱼与我国北方沿海产的文昌鱼间分类学关系的重新思考。

## 1 材料和方法

### 1.1 样品与 DNA 提取

文昌鱼样品于 2003 年 2 月采自厦门欧厝南侧海域，样品采回后实验室暂养数日，取体长约 40 mm 的成体 2 条，用于 DNA 提取，编号分别为 XM4.1 和 XM4.2。每一样品截取体后段，重约 0.1 g，用常规的 SDS/蛋白酶 K 消化、酚-氯仿抽提、乙醇沉淀总 DNA，得到的 DNA 再用适量无菌 ddH<sub>2</sub>O 溶解，取 3 - 5 μl 经琼脂糖凝胶电泳检测，并估计 DNA 浓度。DNA 样品于 4℃ 保存备用，余下的文昌鱼样品于 -20℃ 冻存，以备进一步研究之需。

### 1.2 PCR 引物设计及 Cyt *b* 基因片段扩增

本研究开始时，我们已得到日本学者测得日本产 *B. belcheri* 的 mtDNA 序列资料，最初根据这一资料设计合成了一对引物（序列为：Amph-ND5-F: 5-GTTGGTGAAAA TATACATT GC-3 和 Amph-ND6-R: 5-TAAACGTGA TCTTCCCA GC-3），用于扩增厦门文昌鱼的 DNA 模版，但 PCR 效果很差，而且不稳定，由此我们推测厦门产的文

昌鱼虽然目前采用的种名与日本产的文昌鱼相同,但两地所产文昌鱼可能已有一定程度的分化,在DNA序列上发生了变异,导致单纯按产自日本的文昌鱼 mtDNA 序列设计引物扩增失败。为此我们又将搜索到的全部文昌鱼 mtDNA 序列数据,与本实验室在其它动物 mtDNA 序列分析研究中积累的数据合并分析,重新设计了一对引物,结果这对新设计的引物能很好地扩增厦门产文昌鱼 Cyt *b* 基因约 540 bp 的片段,引物序列和名称为: Amplr-Cytb-F: 5-TAAATTATGGGTGGCTATTGCGTA-3 和 Amplr-Cytb-R: 5-GCGTAACTAAAGGATTAGCAGGG3。PCR 反应体积为 30  $\mu$ l,其中含 10  $\times$  Buffer 3  $\mu$ l; dNTPs (各 2.5 mmol) 2  $\mu$ l; Mg<sup>2+</sup> (25 mmol) 2  $\mu$ l; 10 pmol 的上、下游引物各 1.0  $\mu$ l; Taq 酶 (Promega) 1.0 U; 模板 DNA 约 5 ng。PCR 循环参数为: 95 预变性 3 min; 然后 94 40 s, 57 45 s, 72 40 s, 30 个循环; 最后 72 2 min; 停止在 4 。扩增产物用 PCR Clean-up Kit (Vitagene 公司) 试剂盒纯化,纯化后的产物经琼脂糖凝胶电泳检测,调节其浓度至 4 ng/ $\mu$ l。双向测序,引物分别为 PCR 扩增时的上、下游引物,测序试剂盒为 BECKMAN 公司产 CEQ<sup>TM</sup> Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS),反应体积为 10  $\mu$ l,反应循环参数为: 96 20 s, 50 20 s, 60 4 min。循环结束后用反应终止液 (NaAc 3 mmol, pH 5.2, 1  $\mu$ l; EDTA 100 mmol, pH 8.0, 1  $\mu$ l; Glycogen 20 mg/ml, 0.5  $\mu$ l) 终止反应,然后加入 -20 预冷的 95%乙醇 30  $\mu$ l, 4 12 000 r/min 离心 20 min; 弃上清后,再用 -20 预冷的 70%乙醇 200  $\mu$ l 洗涤沉淀, 4 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清,重复洗涤沉淀 1 次。沉淀物经真空抽干后用 30  $\mu$ l 甲酰胺溶解。测序电泳和读序在 BECKMAN 公司 CEQ 8000 遗传自动分析仪上完成。

### 1.3 序列比对和分析

双向测序后得到的结果用 DNASTAR 软件包拼接、核对序列,获得 XM4.1 和 XM4.2 两样品的 Cyt *b* 基因 521 bp 的一致序列 (Consensus sequence), 并从 GenBank 中下载所有文昌鱼类动物的同源序列,这些序列包括: *B. belcheri* Akashi-1 (登录号: AB083384; 本文中代码: Ak-1, 下同), *B. belcheri* Akashi-2 (AB083385; Ak-2), *B. belcheri* Genkai-2 (AB083383; Ge-2) 和

*B. belcheri* (NC. 004537; Jp-b)、佛罗里达文昌鱼 *B. floridae* (NC000834; Flor)、大西洋文昌鱼 *B. lanceolatum* (NC. 001912; Lar-1 和 Y09849; Lar-2), 其中登录号为 Y09849 的数据与本研究中得到的 Cyt *b* 基因片段只有 232 bp 同源序列。

脊索动物门共有三个亚门,除文昌鱼类隶属的头索动物亚门外,另外两个亚门是脊椎动物亚门和尾索动物亚门,其中尾索动物是另一类较原始的类群,脊椎动物亚门是本门动物中最高等的一个类群。因此我们以尾索动物亚门的 2 种海鞘 *Ciona intestinalis* (NC. 004447; Cin) 和 *Ciona savignyi* (NC. 004570; Csa) 作为外群,用 CLUSTAL X 1.8 软件进行同源序列比对 (Thompson et al., 1997), 去除 3 和 5 端不对称的部分,不参加随后的数据分析。DNA 序列间的差异用 MEGA (Ver. 2.1) 软件计算,并分别用 NJ (邻接) 法、UPGMA (非加权组平均值) 法、ME (最小进化路径法) 和 MP (最大简约) 法重建各物种的系统发生关系,系统树中各结点的置信度用自引导值 (Bootstrap value) 估计,分别采用碱基差异百分数 (P-distance)、Tajima-Nei 和 Kimura 双参数等三种距离参数。

## 2 结 果

两条厦门文昌鱼 Cyt *b* 基因的双向测序,除去两端不准确的部分,得到有效序列长度为 521 bp,序列中 T、C、A、G 的含量分别为 40.9%、15.7% - 15.9%、22.6% - 22.8% 和 20.5%, 比对结果发现 2 种单倍型,单倍型 在 467 位为 A,单型 此处为 C,一定程度上反映了文昌鱼种群的遗传多样性 (图 1)。将这两个 Cyt *b* 基因片段序列与从 GenBank 中下载的佛罗里达文昌鱼、大西洋文昌鱼和 4 个日本产的白氏文昌鱼 *B. belcheri* 一起,共 9 个同源序列比对,在这 521 bp 中,共有 172 个变异位点,其中简约信息位点 164 个,无插入或缺失。合并作为外群的 2 种海鞘的同源序列,比对和统计序列碱基的差异百分比和碱基替代情况 (表 1)。2 个厦门产的文昌鱼间序列差异百分比仅为 0.19%; 4 个日本产的文昌鱼间序列差异百分比为 0.77% - 1.34%, 平均为 1.09%; 2 个大西洋文昌鱼间的差异为 6.47%, 而佛罗里达文昌鱼与这 2 个大西洋文昌鱼间的差异分别为 3.07% 和 6.03%; 厦门和日本产的文昌鱼与产自大西洋的文

TTTTATATTT ATTTGTTTAT ATTTTCATAT TGGGCGTGGC ATATATTATG GTTCCTACTT TTATATTGAG  
 ACGTGAAATA TTGGGGTGGT GCTTCTAATT CTAACATGG CAACTGCGTT CCTGGGGTAT GTTTACCTT  
 GGGGCAGAT ATCATTTTGA GGGGCTACGG TAATTACCAA TTTAGCTTCT GCTATCCCTT ATTTAGGGGG  
 GGATTTAGTG CAGTGGTTAT GGGGAGGTTT TTCTGTAGAT AATGCAACAT TGACTCGCTT TTTTGCCTTT  
 CATTCTTCT TACCTTTTGC AATTGCTGGA TTGGCAGTTG TACATTTGTT ATTTTACAT CAAACAGGAG  
 CCAATAACCC TACTGGGTTA GCTGGGACG TAGATAAAGT CCCTTTTCAT GCATACTTTT CTATAAAGA  
 TGTTATTGGC TTCATTTTAT TATTAACGGG GTTAGTGT TTGCTATAT TTTACACCAA TTTATTAACA  
 GATCCTGAAA ATCACATCCC TGCTAATTCT T

图 1 文昌鱼 (XM4.1) Cyt b 基因片段序列 (521 bp)

图中的序列为单倍型 I, 有下划线的碱基表示 2 种单倍型间有差异的位点。

Fig. 1 DNA sequence of amphioxus Cyt b gene

The above sequence is haplotype I and the letter with underline indicates variable site between two haplotypes.

表 1 文昌鱼 Cyt b 基因序列差异百分比 (下三角) 以及序列间的转换/颠换数 (上三角)

Table 1 Percentage difference between pair wise sequences of amphioxus Cyt b gene (below diagonal) and number of transition/transversion (above diagonal)

OUT	XM4.1*	XM4.2	Ak-1	Ak-2	Ge-2	Jp-b	Flor	Lar-1	Lar-2	Cin	Csa
XM4.1		0/1	67/44	67/43	69/42	65/43	73/52	75/49	37/20	87/127	75/128
XM4.2	0.0019		68/43	68/42	70/41	66/42	73/51	75/48	37/19	87/128	74/129
Ak-1	0.2131	0.2131		5/1	3/2	6/1	80/46	82/43	34/17	83/127	73/130
Ak-2	0.2111	0.2111	0.0115		4/1	7/0	80/45	84/42	36/16	85/126	73/131
Ge-2	0.2131	0.2131	0.0096	0.0096		3/1	80/46	83/43	36/17	84/127	71/132
Jp-b	0.2073	0.2073	0.0134	0.0134	0.0077		77/45	81/42	36/16	83/126	71/131
Flor	0.2399	0.238	0.2418	0.2399	0.2418	0.2342		13/3	12/2	95/133	100/126
Lar-1	0.238	0.2361	0.2399	0.2418	0.2418	0.2361	0.0307		14/1	98/132	100/125
Lar-2	0.2457	0.2414	0.2198	0.2241	0.2284	0.2241	0.0603	0.0647		32/73	45/70
Cin	0.4107	0.4127	0.4031	0.405	0.405	0.4012	0.4376	0.4415	0.4526		54/71
Csa	0.3896	0.3896	0.3896	0.3916	0.3896	0.3877	0.4338	0.4319	0.4957	0.2399	

\*: 代码见正文。Codes indicated in the text.

文昌鱼间序列差异在 21.98% - 24.57% 之间, 平均为 23.63%。

用不同的聚类方法和遗传距离参数得到聚类树, 其中 UPGMA 树显示, 厦门产的 2 个文昌鱼与日本产的 4 个样品首先聚类, 而在 NJ 树和 ME 树中产于日本的文昌鱼先与大西洋的两种文昌鱼聚类, 但自引导值均不高。用不同方法得到的聚类树均强烈支持厦门、日本和大西洋产的文昌鱼分别属于不同分支, 而且相互间的距离较远。图 2 是依据碱基差异百分数, 分别用非加权的组平均值法 (UPGMA) 和邻接法 (NJ) 构建的 2 个分子系统树。

### 3 讨论

#### 3.1 不同地区文昌鱼 Cyt b 基因的序列差异

实践证明 DNA 分子标记技术在物种鉴定方面

有其独特的优势, 近年来这一手段在海洋生物的鉴定方面, 也得到越来越多的应用 (Bucklin et al., 1998; Song et al., 2001; Klinbunga et al., 2003), 在一些海洋生物中常遇到的物种复合体 (Species complex) 内, 鉴定所包含的物种方面, 也是十分有效的手段 (Medina et al., 1999)。Cyt b 是线粒体 DNA 编码基因, 由于其为母系遗传, 没有内含子, 很少发生插入/缺失突变, 进化速度适中, 是物种鉴定和种内、种间系统发生研究中非常好的分子标记 (王义权等, 1998, 1999a, 1999b)。从表 1 可见, 本研究得到的 2 个产自厦门欧厝的文昌鱼样品, 在 521 bp 的 Cyt b 基因序列中差异为 0.19%, 日本产的文昌鱼 4 个个体的同源序列, 平均差异为 1.09%。其它一些动物的 Cyt b 基因序列分析表明, 种内个体间的序列差异一般

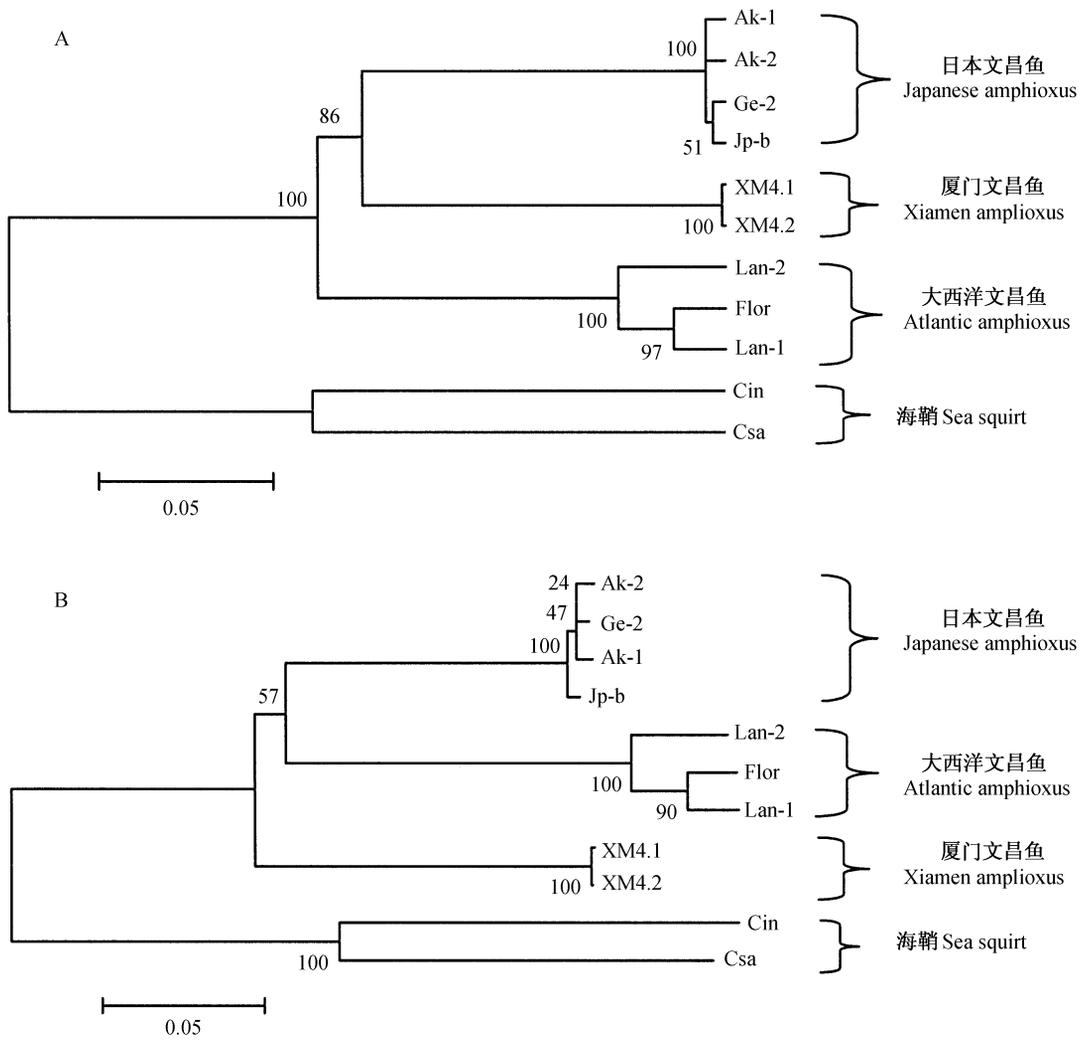


图 2 基于 Cyt b 基因片段重建的文昌鱼分子系统发生树 (代码见正文)

A. 用 P 距离构建的 UPGMA 树。B. 用 P 距离构建的 NJ 树。

Fig. 2 Reconstructed phylogenetic trees based on the sequence of amphioxus Cyt b gene (codes indicated in the text)

A. UPGMA tree constructed with p-distance. B. NJ tree constructed with p-distance.

在 0% - 4.06% 之间, 差异超过 6% 的个体间已有明显的亚种或种的分化 (王义权等, 1999b; 杨学干等, 2001; 曹祥荣等, 2002; Yang et al., 2002)。由此可见, 厦门 2 个和日本 4 个文昌鱼的 Cyt b 基因的 DNA 序列差异各自均在种内个体间的变异范围内, 它们很可能分别属同一物种, 种内变异在一定程度上反映了物种的遗传多样性。

比较文昌鱼种间的序列差异可见, 日本产的文昌鱼与佛罗里达文昌鱼和大西洋文昌鱼的序列差异分别为 23.94% 和 23.2%; 厦门欧厝的文昌鱼与这两个物种间的差异分别为 23.9% 和 24.03%; 这种序列差异水平符合种间 Cyt b 基因序列差异在 10% 以上的观察结果 (杨学干等, 2001), 表 1 结果中还有两个值得注意的地方: 1) 厦门欧厝产的文昌

鱼与日本产的文昌鱼这一基因片段间差异的平均值高达 21.12%, 已远远高出一般种内和亚种间的变异范围; Nishikawa (1981) 和 Henmi and yagaguchi (2003) 的研究均认为日本产的文昌鱼除有明海和天草群岛的外, 均为文昌鱼青岛亚种 *B. belcheri tsingtauense*, 表 1 的计算结果, 依据的序列为产自明石海峡 (Akashi) 和玄海 (Genkai) 的文昌鱼 Cyt b 同源序列, 应属于青岛亚种, 因此, 推测厦门欧厝产的文昌鱼与 *B. belcheri tsingtauense* 间的遗传分化可能已达到种间水平; 2) 佛罗里达文昌鱼和大西洋文昌鱼目前分别隶属不同的种名之下, 但从 Cyt b 序列的差异情况来看, 二者仅相差 3.07% - 6.03%, 差异非常小, 因此这两个分布于大西洋海域的文昌鱼可否作为两个独立的

种存在，尚待进一步的研究。

### 3.2 文昌鱼的系统发生关系

本研究中，采用不同距离参数和聚类方法得到的多个系统发生树，有较高的一致性，表明用 Cyt b 基因序列得到的聚类树能较客观地反映这些物种系统发生关系。从图 2 可见，尾索动物亚门的两种海鞘聚在一起，而头索动物的文昌鱼形成另一分枝，分别代表的脊索动物门中两个亚门的分歧情况。

在以 9 个文昌鱼为代表的头索动物亚门这一支中，图 2A 的聚类结果得到 3 个主要分支：第一支为佛罗里达文昌鱼——大西洋文昌鱼，第二支为厦门欧厝的文昌鱼，第三支为日本的文昌鱼，这三支的自引导值均达到 100%，提示厦门欧厝的文昌鱼与日本的文昌鱼间已有明显分化。虽然在图 2B 中，厦门欧厝的文昌鱼与日本的文昌鱼分开，而佛罗里达——大西洋文昌鱼这支与日本的文昌鱼聚类到一起，不过自引导值却很低，因此相比之下，图 2A 中反映的三支间关系可信度较高一些。日本文昌鱼虽因产地不同，相互间略有分歧，但从产地看相互交错，自引导值也不高，因此这种分歧属种内的遗传变异。但佛罗里达文昌鱼和大西洋文昌鱼间的情况就略显复杂，二者间不仅交错在一起，而且相互间的分歧程度也较日本文昌鱼这一支内部的分歧为大，这是由于其中的 Y09848 样品同源序列只有 232 bp，还是由于这两个物种目前的分化还没达到种级水平，尚不得而知。图 2B 是用同样的距离参数和 NJ 法构建的系统发生树，可见它与图 2A 几乎完全相同，其它不同方法构建的树也有同样的拓扑结构，说明依据 Cyt b 的 DNA 序列构建的系统树较可靠地反映了这些物种间的演化关系。

### 3.3 厦门文昌鱼分类地位的建议

鉴于以形态学为基础的研究结论认为日本产的文昌鱼除有明海和天草群岛产区外，均为白氏文昌鱼青岛亚种 *B. belcheri tsingtauense*，而本研究的结果清楚地表明日本产的文昌鱼青岛亚种与厦门欧厝的文昌鱼 *B. belcheri* 间的遗传分化可能已达到种间水平，建议将该亚种提升为种，即 *B. tsingtauense* Tchang et Koo 和 *B. belcheri* (Gray)；关于中国青岛产的文昌鱼与日本产的文昌鱼间是否有显著的遗传分化，有待进一步研究，但在目前情况下，建议将两地产的原文昌鱼青岛亚种暂时一同提升为种；至于 Nishikawa (1981) 和 Henmi et al. (2003) 所说的过渡类型的遗传分化

情况也需进一步研究；厦门欧厝产的文昌鱼与当年 Gray 命名产自婆罗洲的文昌鱼目前用的是同一种名，因缺少其模式产地的样品，现无法研究，因而在缺少这两地文昌鱼间是否出现分化的证据前，根据动物命名的优先权原则，仍以 *B. belcheri* (Gray) 作为其有效种名较为合适。

### 参考文献 (References)

- Boore JL, Daehler LL, Brown WM, 1999. Complete sequence, gene arrangement, and genetic code of mitochondrial DNA of the cephalochordate *Branchiostoma floridae* (Amphioxus), Mol. Biol. Evol. 16 (3): 410-418.
- Boring AM, Li HL, 1932. Is the Chinese amphioxus a separate species? Peking Nat. Hist. Bull. 6 (3): 9-18.
- Bucklin A, Bentley AM, Franzen SP, 1998. Distribution and relative abundance of *Poecilocalanus moultoni* and *P. newmani* (Copepoda: Calanoida) on Georges Bank using molecular identification of sibling species. Mar. Biol. 132: 79-106.
- Cao LR, Wang XM, Fang SG, 2003. A molecular phylogeny of Bharal and dwarf blue sheep based on mitochondrial cytochrome b gene sequences. Acta Zool. Sin. 49 (2): 198-204 (In Chinese).
- Cao XR, Shu FJ, Zhang XR, Bi CM, Li CJ, Hu J, Fang JY, 2002. Phylogenetic relationships of *Elaphodus cephalophus* and three *Muntiacus* species revealed by mitochondrial cytochrome b nucleotides sequence. Acta Zool. Sin. 48 (1): 44-49 (In Chinese).
- Cao YP, Yan LN, Song S, Liu Z, 2001. Preliminary investigation of amphioxus in Changli. Chin. J. Zool. 36 (3): 10-13 (In Chinese).
- Henmi Y, Yamaguchi T, 2003. Biology of the amphioxus *Branchiostoma belcheri* in the Ariake Sea, Japan. : Population structure and growth. Zoological Science 20: 887-906.
- Klinbunga S, Khamnamtong N, Tassanakajon A, Puanglarp N, Jarayabhand P, Yoosukh W, 2003. Molecular genetic identification tools for three commercially cultured oysters *Crassostrea belcheri*, *Crassostrea iredalei*, and *Saccostrea cucullata* in Thailand. Mar. Biotechnol. 5: 27-36.
- Light SF, 1923. Amphioxus fisheries near the University of Amoy, China. Science 58: 67-70.
- Medina M, Weil E, Szmant AM, 1999. Examination of the *Montastraea nnularis* species complex (Cnidaria: Scleractinia) using ITS and COI sequences. Mar. Biotechnol. 1: 89-97.
- Minguillon C, Jimenez-Delgado S, Panopoulou G, Garcia-Fernandez J, 2003. The amphioxus Hairy family: differential fate after duplication. Development 130: 5 903-5 914.
- Mou CY, Zhang SC, Lin JH, Yang WL, Wu WY, Wei JW, Wu XK, Du JC, Fu ZY, Ye LT, Lu Y, Xie XJ, Wang YL, Xu AL, 2002. EST analysis of mRNAs expressed in neurula of Chinese amphioxus. Biochem. Biophys. Res. Commun. 299 (1): 74-84.
- Nishikawa T, 1981. Consideration on the taxonomic status of the lancelets of the genus *Branchiostoma* from the Japanese waters. Publ. Steo. Mar. Biol. Lab. 26: 135-156.
- Panopoulou G, Hennig S, Groth D, Krause A, Poustka AJ, Herwig R, Vingron M, Lehrach H, 2003. New evidence for genome-wide duplications at the origin of vertebrates using an amphioxus gene set and completed animal genomes. Genome Res. 13 (6A): 1 056-1 066.
- Song LH, Liu BZ, Xiang JH, Qian PY, 2001 Molecular phylogeny and species identification of pufferfish of the genus *Takifugu* (Tetraodontiformes, Tetraodontidae). Mar. Biotechnol. 3: 398-406.
- Spruyt N, Delarbre C, Gachelin G, Laudet V, 1998. Complete sequence of the amphioxus *Branchiostoma lanceolatum* mitochondrial

- genome: relations to vertebrates. *Nucleic Acids Res.* 26 (13): 3 279 - 3 285.
- Tchang S., Koo KC., 1936. Description of a new variety of *Branchiostoma belcheri* (Gray) from Kiaochow Bay, Shantung, China. *Contr. Inst. Zool. Hat. Acad. Peping* 3 (4): 77 - 114.
- Thompson TD., Gibson TJ., Plewniak F., Jeanmougin F., Higgins DG., 1997. Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 2 730 - 2 739.
- Wang YQ., Zhou KY., Xu LS., Xu G., 1998. Sequencing of Cyt *b* gene fragments and PCR identification of "Jinqian Baihuashe" *Bungarus parvus* and its adulterants. *Acta Pharmaceutica Sinica* 33 (12): 941 - 947 (In Chinese).
- Wang YQ., Zhou KY., Xu LS., Yang G., Xu G., 1999a. The evolutionary relationships of several colubrid snakes suggested by sequences analysis of Cyt *b* gene fragment. *Acta Zool. Sin.* 45 (3): 332 - 338 (In Chinese).
- Wang YQ., Zhou KY., Xu LS., Xu G., 1999b. Authentication of the Chinese crude drugs "Wuhaoshe" *Zaocys dhumnades* and its substitutes by DNA sequence analysis. *Acta Pharmaceutica Sinica* 34 (1): 67 - 71 (In Chinese).
- Yang XG., Wang YQ., Zhou KY., Liu ZQ., 2001. Phylogenetic relationships of Chinese brown frogs *Rana* based on sequence of mitochondrial cytochrome *b* gene. *Zool. Research.* 22 (5): 345 - 350 (In Chinese).
- Yang XG., Wang YQ., Zhou KY., Liu ZQ., 2002. The authentication of Oviductus *Ranae* and their original animals by using molecular marker. *Bio. Pharm. Bull.* 25 (8): 1 035 - 1 039.
- Zhou CW., 1958. A comparative study on Chinese amphioxus. *Journal of Shandong University* (1): 162 - 204 (In Chinese).
- Zhou CQ., Zhou KY., Hu JC., 2003. The validity of the dwarf bharal *Pseudois schaeferi* species status inferred from mitochondrial Cyt *b* gene. *Acta Zool. Sin.* 49 (5): 578 - 584 (In Chinese).
- Zhou JL., Zhang YP., Huang MH., Chen YJ., Chen XQ., Yao GD., 2001. Phylogenetic relationships among crotalinae based on mitochondrial cytochrome *b* gene sequence variations. *Acta Zool. Sin.* 47 (4): 361 - 366 (In Chinese).
- Zhu YD., 1984. The Fishes of Fujian Province (Part ). Fuzhou: Fujian Science and Technology Press, 10 - 11 (In Chinese).
- 曹丽荣, 王小明, 方盛国, 2003. 从细胞色素 *b* 基因全序列差异分析岩羊和矮岩羊的系统进化关系. *动物学报* 49 (2): 198 - 204.
- 曹玉萍, 闫路娜, 谢松, 刘震, 2001. 昌黎海区文昌鱼初步调查. *动物学杂志* 36 (3): 10 - 13.
- 曹祥荣, 束峰珏, 张锡然, 毕春明, 李朝军, 胡均, 方笈阳, 2002. 毛冠鹿与 3 种鹿属动物的线粒体细胞色素 *b* 的系统进化分析. *动物学报* 48 (1): 44 - 49.
- 王义权, 周开亚, 徐璐珊, 徐国钧, 1998. 金钱白花蛇及其伪品的 Cyt *b* 基因片段序列分析和 PCR 鉴别研究. *药科学报* 33 (12): 941 - 947.]
- 王义权, 周开亚, 徐璐珊, 杨光, 徐国均, 1999a. 几种游蛇的 Cyt *b* 基因片段序列分析及其演化关系. *动物学报* 45 (3): 332 - 338.
- 王义权, 周开亚, 徐璐珊, 徐国钧, 1999b. 中药材乌梢蛇及其混淆品的 DNA 序列分析鉴别研究. *药科学报* 34 (1): 67 - 71.
- 杨学干, 王义权, 周开亚, 刘中权, 2001. 从细胞色素 *b* 基因序列探讨我国林蛙属动物的系统发生关系. *动物学研究* 22 (5): 345 - 350.
- 周材权, 周开亚, 胡锦涛, 2003. 从线粒体细胞色素 *b* 基因探讨矮岩羊物种地位的有效性. *动物学报* 49 (5): 578 - 584.
- 周才武, 1958. 中国文昌鱼的比较研究. *山东大学学报* (1): 162 - 204.
- 周继亮, 张亚平, 黄美华, 陈永久, 陈小青, 姚耿东, 2001. 蝮亚科蛇线粒体细胞色素 *b* 基因序列分析及其系统发育. *动物学报* 47 (4): 361 - 366.
- 朱元鼎, 1984. 《福建鱼类志》(上). 福州: 福建科技出版社, 10 - 11.