

笛鲷属线粒体基因组编码序列的系统进化分析能力评估

王中铨^{1,2,3}, 谭 围^{1,3}, 郭昱嵩^{1,3}, 刘 丽^{1,3}, 刘楚吾^{1,2,3*}, 刘 筠²

(1. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524066;

2. 湖南师范大学生命科学学院, 湖南 长沙 410081;

3. 南海水产经济动物增殖广东普通高校重点实验室, 广东 湛江 524006)

摘要: 运用通用引物长距 PCR (Long-PCR) 和常规 PCR 相结合的方法测定了鲈形目笛鲷科的 4 种笛鲷属鱼类 (孟加拉笛鲷、四带笛鲷、千年笛鲷和马拉巴笛鲷) 和军曹鱼科的军曹鱼线粒体 DNA 基因组全序列 (GenBank 序列号分别为 FJ171339, FJ416614, FJ824741, FJ824742 和 NC_011219), 得出所用全序列测定体系的方法通用性较强, 操作简单。线粒体基因组的比对分析表明, 测定的 mtDNA 基因组的绝大部分区段与 GenBank 中现有的脊椎动物的序列有较高的同源性。以军曹鱼外群结合 GenBank 中近缘笛鲷鱼类 (勒氏笛鲷、蓝点笛鲷和黑带鳞鳍梅鲷) 进行的聚类分析中, 勒氏笛鲷与黑带鳞鳍梅鲷的聚类关系近于同属物种, 与形态学分类存在矛盾。通过单个基因和基因拼接序列比较, 综合考虑邻位连接法构建系统进化树的置信度和序列的信息量, 对 13 种蛋白质编码基因在属内种间的系统进化分析能力进行了评估, 将基因分成不同的 4 等: 很好的为 *ATPase6* 和 *cox2*; 好的序列为 *ND2* 和 *cox1*; 差的为 *ND6*、*ND3* 和 *ATPase8*; 包括 *Cyt b* 在内的其余 6 种基因为中等。分析还揭示出序列长度的增加可以提高系统进化树的置信度, 且属内物种间比较时序列长度的影响小于高级阶元。

关键词: 笛鲷属; 线粒体基因组; 分子系统进化

中图分类号: S 917

文献标识码: A

自 Anderson 等^[1] 1981 年测定了人的 mtDNA 全序列并分析其基因组成、结构和功能特点后, mtDNA 序列的测定和分析便逐渐成为脊椎动物分子遗传学和进化遗传学研究的主要课题之一。1994 年 Avise^[2] 便已经对 mtDNA 对进化分析以及群体分析的优点进行了充分的阐述。目前, 从线粒体 DNA 分离纯化、通用引物设计、长距 PCR (Long-PCR)、鸟枪法测序、序列拼接、基因预测、RNA 二级结构预测、基因组数据提交和 Internet 公用数据库的建立到基因组进化分析和基因组特征分析, 一整套线粒体基因组研究方法已基本确立, 线粒体基因组在分子系统进化研究中的使用频率大大提高。Nagase 等^[3] 运用 60 对引物, 通过直接测序得到了日本飞鱼 (*Cypselurus hiraii*) 的 mtDNA 全序列 (16 528 bp), Manchado 等^[4] 运

用 Long-PCR 技术扩增 mtDNA 片段, 测定并分析了大西洋金枪鱼 (*Thunnus thynnus*) 的 mtDNA 全序列 (16 526 bp), Hurst 等^[5] 测定并分析了大西洋鲑 (*Salmo salar*) 的 mtDNA 全序列 (16 665 bp)。至 2009 年 11 月 29 日^[6], 日本东京 MitoFish 鱼类线粒体 DNA 全序列库已收集 622 种鱼类的 mtDNA 基因组全序列。本研究室已掌握了相关技术, 于 2006 年测定了勒氏笛鲷 (*Lutjanus russellii*) 的 mtDNA 全序列 (GenBank 序列号: EF514208)。

大量线粒体 DNA 基因组全序列测定必然为系统进化分析提供更多可供使用的数据, 但为了评估已有的研究, 保证现有分析可信度、节约成本, 探索如何正确高效地依分类阶元高低选择不同基因, 以及序列组合长度等问题仍然必要。Zardoya 等^[7]、Miya 等^[8]、陈姝君等^[9] 和郭昱嵩

收稿日期: 2010-01-13 修回日期: 2010-03-29

资助项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目 (2007BAD29B03); 国家自然科学基金项目 (30972253)

通讯作者: 刘楚吾, E-mail: liucw@gdou.edu.cn

等^[10]先后基于脊椎动物、硬骨鱼纲或鲈形目对属以上高级分类阶元进行了系统进化树构建时的信息量的评估。然而,对于动物 mtDNA 至今仍然缺乏属一级的探讨。陈姝君等^[9]指出:要想研究各个基因在种间和种内群体间系统分化的表现情况,必须获得同一个属的多个种、同一个种的不同亚种和不同地理种群的大量基因序列。

本文利用本研究室在笛鲷属线粒体 DNA 系统进化研究方面的良好基础^[10-13],通过系统测定笛鲷属及近缘种的多个线粒体 DNA 基因组全序列,在深入揭示笛鲷及其近缘种系统进化史的同时,对线粒体基因组序列在属内种间分类阶元的系统进化分析的适用性进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 实验材料和总 DNA 的提取

采用文献[14-15]中形态与 DNA 条码结合的方法鉴定实验对象,即鲈形目笛鲷科的 4 种笛鲷属鱼类[孟加拉笛鲷(*Lutjanus bengalensis*)、四带笛鲷(*L. kasmira*)、千年笛鲷(*L. sebae*)和马拉巴笛鲷(*L. malabaricus*)]和军曹鱼科的军曹鱼(*Rachycentron canadum*)。参照卢圣栋^[16]的方法从肌肉或鳍条中提取样本 DNA,4 °C 保存备用。

1.2 长距 PCR

测序策略参考 Kawaguchi 等^[17]和郭新红等^[18],引物由上海 Sangon 生物技术公司合成。采用长距 PCR 引物 LA1 和 LA2 扩增得到覆盖整个线粒体 DNA 序列的大片段作为模板,PCR 反应体系:总体积 25 μL,含 1 × PCR LA Buffer, dNTPs 15 nmol,引物各 20 pmol,LA Taq DNA 聚合酶(TaKaRa)2.5 U,总 DNA 约 20 ng。

扩增条件 94 °C 预变性 1 min;98 °C 变性 10 s,68 °C 退火、延伸共 16 min,循环 30 次;最后 72 °C 延伸 10 min。0.7% 的琼脂糖电泳对扩增产物进行检测。

1.3 常规 PCR 扩增

以稀释 20 倍的长距 PCR 产物后为模板,扩增获取长度 400 ~ 900 bp 的相互重叠的小片段。反应体系为:总体积 50 μL,含 1 × PCR Buffer, dNTPs 10 nmol,引物各 20 pmol,rTaq DNA 聚合酶(TaKaRa)2.5 U,DNA 约 20 ng。

PCR 反应的循环参数为 94 °C 预变性 3 min,94 °C 变性 42 s,50 ~ 55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸

55 s,共 30 个循环,最后 72 °C 延伸 5 min,用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,凝胶成像仪扫描记录结果。PCR 扩增产物委托上海 Sangon 生物技术公司进行序列测定。

1.4 序列拼接及全序列的分析

用 DNASTAR 软件包中的 SeqMan 进行序列拼接,人工辅助校对得到线粒体基因组全序列。tRNA Scan-SE1.21^[19](<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE>)识别 tRNA 基因位置。MEGA 4.1^[20]中通过与勒氏笛鲷、蓝点笛鲷线粒体基因组比较定位蛋白编码基因、rRNA 基因和 D-loop 区,并计算线粒体 DNA 组合数据的变异位点、简约信息位点和相对碱基频率等。Sequin 整理序列并提交到 GenBank。

1.5 系统进化分析和评估的方法

13 种基因的核苷酸和相应的预测氨基酸序列都分别通过 MEGA 4.1 内含有的 CLUSTALW 分析方法^[21]进行比对,末端的难于排列的区域由人工去除,DAMBE 软件^[22]中完成基因序列(fasta 格式)的拼接。用 MEGA 中邻接法(Neighbor-Joining method,NJ 法)构建系统发生树,自举法(Bootstrap)重复 1 000 次检验可信度。

具体评估各基因序列系统进化分析能力方法为以 Bootstraps 获取的置信度高低作为 NJ 系统树可靠性的直观反映,假设 13 种蛋白编码基因的拼接序列最大程度上地反映种系进化关系。给予构建系统发生树的分支置信度之和高的单一序列较高权重,同时考虑单位碱基信息量(置信度和/序列长度)。

2 结果与分析

2.1 长距 PCR 扩增结果

以各实验对象的总 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 15 000 bp)和 LA2(约 9 000 bp)(图 1)。

2.2 常规 PCR 扩增结果

将各物种长距扩增产物 LA1 和 LA2 的稀释液为模板进行常规 PCR 扩增得到了 400 ~ 1 200 bp 不等的特异性扩增条带(图 2)。

2.3 序列拼接和初步分析结果

孟加拉笛鲷、四带笛鲷、马拉巴笛鲷、千年笛鲷和军曹鱼测序结果经拼接校准的全序列数据已发布到 GenBank 数据库,登录号分别为 FJ171339、

FJ416614、FJ824741、FJ824742 和 NC_011219。在碱基组成分析中补充了勒氏笛鲷 (*L. russellii*, GenBank 登录号:NC_010963) 以及同为笛鲷科的黑带鳞鳍梅鲷 (*Pterocaesio tile*, GenBank 登录号:NC_004408)。

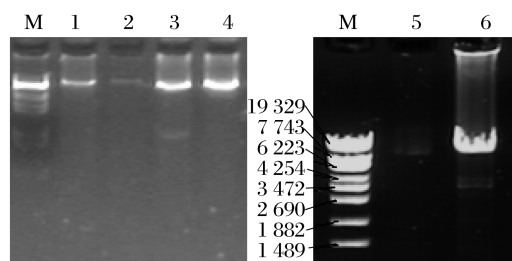


图 1 长距 PCR 产物电泳结果

M: λ -EcoT14 marker, 1: 千年笛鲷 LA1, 2: 军曹鱼 LA1, 3: 千年笛鲷 LA2, 4: 军曹鱼 LA2, 5: 孟加拉笛鲷 LA2, 6: 孟加拉笛鲷 LA1。

Fig. 1 Long-PCR products of the complete mitochondrial genome

M: λ -EcoT14, 1: LA1 for *Lutjanus sebae*, 2: LA1 for cobia, 3: LA2 for *Lutjanus sebae*, 4: LA2 for cobia, 5: LA2 for *L. bengalensis*, 6: LA1 for *L. bengalensis*.

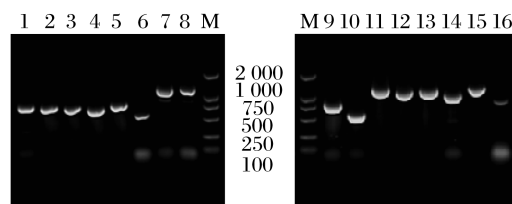


图 2 常规 PCR 部分扩增产物电泳检测结果

M: Marker DL 2000, 1~8: 孟加拉笛鲷, 9~16: 四带笛鲷

Fig. 2 Part of PCR products covering the complete mitochondrial genome

M: Marker DL 2000, 1~8: *L. bengalensis*, 9~16: *L. kasmira*.

碱基组成 以 L 链分析,与一般脊椎动物线粒体基因组的碱基组成类似,所有 8 种鱼在碱基组成上都出现明显的反 G 偏倚,A + T 含量高于 G + C 含量。笛鲷属与同科的黑带鳞鳍梅鲷的组成十分接近,与军曹鱼科则有一定差异。

基因组与定位 8 种鱼类的 mtDNA 基因组全序列均由 37 个基因和非编码区组成,包括 13 个蛋白质编码基因,2 个 rRNA 基因,22 个 tRNA 基因 (其中 tRNA-Ser 和 tRNA-Leu 各有两个),D-loop 非编码区。除存在 10 处合计约 65 bp 的间隔序列和 10 个基因重叠区段,多数地方紧密排列,无基因间隔和重叠现象。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,且各区段长度基本一致。除 D-loop 外,其余区域长度基本一致。

2.4 系统进化树

以同科异属的黑带鳞鳍梅鲷、同目异科的军曹鱼 (*Rachycentron canadum*, NC_011219) 作为外群,构建了基于 6 种笛鲷 (本实验室测定的勒氏笛鲷、孟加拉笛鲷、四带笛鲷、千年笛鲷和马拉巴笛鲷,以及日本研究者测定的蓝点笛鲷 (*L. rivulatus*) mtDNA 基因组全序列、13 种蛋白编码基因的单一序列和合并序列以及 *cox1* 条码序列的分子系统进化树。

mtDNA 基因组及 13 种蛋白编码基因合并序列的 NJ 树 由图 3 和图 4 可见,13 个蛋白编码基因拼接序列所构建的 NJ 树除置信度有微小降低外,在聚类关系等方面与线粒体 DNA 基因组全序列 DNA 的 NJ 树基本一致。同目异科的军曹鱼处于树根位置。千年笛鲷和马拉巴笛鲷 (*L. malabaricus*) 聚为一支,另外的 4 种笛鲷属鱼类和黑带鳞鳍梅鲷聚为一支。

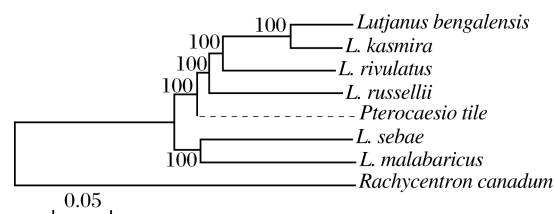


图 3 线粒体 DNA 基因组全序列的 NJ 树

Fig. 3 NJ tree of mitochondrial genomes

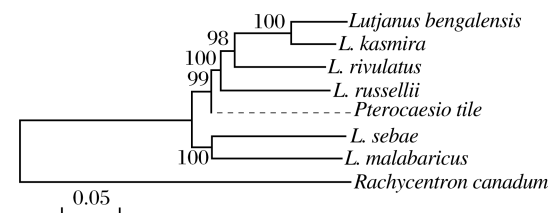
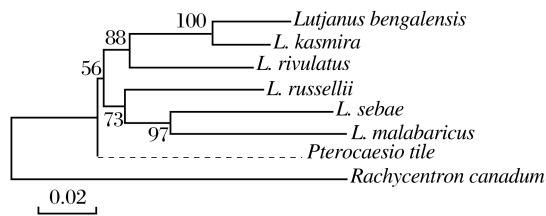
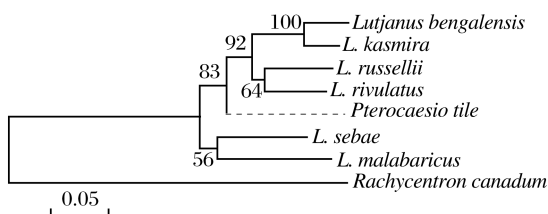


图 4 蛋白编码基因拼接序列的 NJ 树

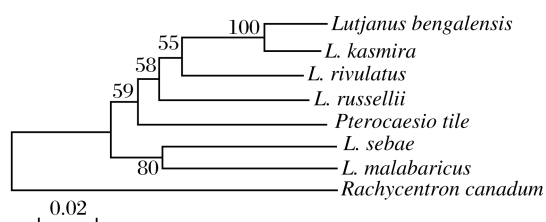
Fig. 4 NJ tree of coding regions

基于单一蛋白编码基因的分子系统进化树 *cox1* (1 560 bp) 和 *cox2* (690 bp) 基因全序列建立的 NJ 树见图 5 和图 6,与 13 个基因拼接序列构建的标准树 (图 4) 比较,笛鲷属物种聚类关系基本一致。但图 5 中黑带鳞鳍梅鲷处于笛鲷属一支的根部 (置信度为 56),除四带笛鲷和孟加拉笛鲷一支外的其余各支的置信度都有所下降。

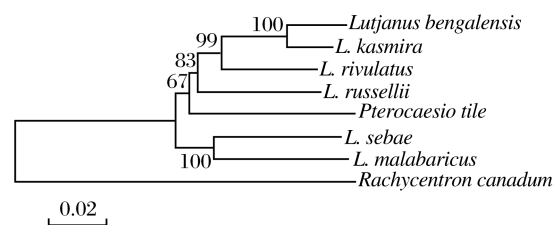
图5 基于 *cox1* 基因的 NJ 树Fig. 5 NJ tree by *cox1* gene图6 基于 *cox2* 基因的 NJ 树Fig. 6 NJ tree by *cox2* gene

其余 11 个基因全序列建立的 NJ 树反映出的笛鲷属聚类关系基本一致。四带笛鲷和孟加拉笛鲷一支的置信度在 *ATPase8* 基因的 NJ 树中下降为 82,其余基因都为 99 或 100。黑带鳞鳍梅鲷的位置出现了 5 种情况,分别为(1) *ND2*、*Cyt b*、*ND4*、*cox2* 和 *ND4L* 与标准树一致支持其作为千年笛鲷和马拉巴笛鲷外的其他 4 种笛鲷一支的根;(2) *cox1*、*ND3* 和 *ND5* 支持其作为笛鲷属的根;(3) *ATPase6* 和 *ATPase8* 支持其与蓝点笛鲷一支;(4) *ND6* 支持其与马拉巴笛鲷一支;(5) *ND1* 支持其与千年笛鲷一支。

基于 *cox1* 条码(barcode)区段的分子系统进化树 与 *cox1* 基因全序列(1 560 bp)构建的 NJ 树(图 5)比较,截取自 *cox1* 全序列的 *cox1* 条码序列(661 bp)^[14]的 NJ 树(图 7)的物种聚类关系变化较大。黑带鳞鳍梅鲷与标准树一致,为千年笛鲷和马拉巴笛鲷外的其他 4 种笛鲷一支的根(置信度为 59)。整体的置信度明显下降。

图7 基于 *cox1* 条码序列的 NJ 树Fig. 7 NJ tree by *cox1* barcodes

基于 *Cyt b*、*cox1* 和 *cox2* 拼接序列的分子系统进化树 3 个基因拼接序列长度为 3 384 bp,所得的 NJ 树见图 8。黑带鳞鳍梅鲷的位置处于笛鲷属内支(置信度为 67)。比较可见,该树的整体聚类结果与 13 个基因拼接序列构建的标准树(图 4)以及 *Cyt b* 和 *cox2* 单基因构建的 NJ 树基本一致。但不同于 *cox1* 基因构建的进化树(图 5)。该树的整体置信度低于标准树但高于单基因树。

图8 基于 *Cyt b*、*cox1* 和 *cox2* 基因拼接序列的 NJ 树Fig. 8 NJ tree by the combined sequences of *Cyt b*、*cox1* and *cox2* genes

2.5 各基因系统进化分析适用性整体评价的结果

线粒体 DNA 全序列、13 个基因拼接序列、*cox1* 条码序列以及单独的基因序列构建的 NJ 系统发生树经 1 000 次 Bootstraps 检验获取的置信度数值和每个碱基的平均信息量统计如表 1 所示。

全部 13 个基因拼接序列的置信度明显高于单基因序列,每个碱基的信息量也依然显著低于所有单基因序列。另外,*Cyt b*、*cox1* 和 *cox2* 3 个基因的拼接序列(3 384 bp)的置信度($N = 449$)也明显高于单基因。

而 *cox1* 条码序列的置信度($N = 352$)处于单基因置信度的中下水平,远低于 *cox1* 全序列的置信度($N = 414$)。但 *cox1* 条码序列的信息量($N/L = 0.53$)较 *cox1* 全序列($N/L = 0.27$)有显著提高。

单基因由上到下按照置信度 N 由高到低排列。*ND2*(1 047 bp)的系统树置信度累加值最高($N = 419$),其次是 *cox1*(1 560 bp, $N = 414$)、*ATPase6*(683 bp, $N = 404$)和 *cox2*(691 bp, $N = 395$)。*ATPase6* 和 *cox2* 的 DNA 序列长度明显短于前两者,相应的信息量(N/L)分别为 0.59 和 0.57,显著大于前两者。因此,作者认为对于属内阶元的系统进化分析,利用 *ND2*、*cox1*、*ATPase6*

和 *cox2* 能构建高置信度进化树。*ND6*、*ND3* 和 *ATPase8* 尽管信息量存在明显优势,但是置信度明显低于其他基因。*ATPase8* 反映得尤为明显:

其 $N/L = 1.20$ 远大于其他基因,然而 N 值远低于其他基因,难以构建高置信度的系统树。其他基因,如 *Cyt b* 等的表现较为一般。

表 1 mtDNA 邻位连接树置信度分析
Tab. 1 Analysis of bootstrap values of mtDNA NJ-tree

整体评价 overall performance	mtDNA 序列 mtDNA sequence	比对碱基数 (L) length	置信度和(N) bootstrap value sum(N)	单碱基信息量 (N/L) N per nucleotide	>50 的置信度和(M) bootstrap value (>50) sum(M)	单碱基信息量 (M/L) M per nucleotide
	mtDNA 全序列 mtDNA complete sequence	16 340	500	0.04	500	0.04
	线粒体蛋白质编码序列 mtDNA CDS	11 440	497	0.04	497	0.04
	<i>Cyt b + cox1 + cox2</i>	3 384	449	0.13	449	0.13
	<i>cox1</i> 条码 <i>cox1</i> barcoding	661	352	0.53	352	0.53
好 good	<i>ND2</i>	1 047	419	0.40	375	0.36
好 good	<i>cox1</i>	1 560	414	0.27	414	0.27
很好 very good	<i>ATPase6</i>	683	404	0.59	404	0.59
很好 very good	<i>cox2</i>	691	395	0.57	395	0.57
中 medium	<i>Cyt b</i>	1 140	382	0.34	757	0.66
中 medium	<i>ND5</i>	1 840	375	0.20	375	0.20
中 medium	<i>ND4</i>	1 381	361	0.26	315	0.23
中 medium	<i>ND1</i>	975	359	0.37	359	0.37
中 medium	<i>ND4L</i>	297	358	1.21	358	1.21
中 medium	<i>cox3</i>	787	329	0.42	252	0.32
差 poor	<i>ND6</i>	522	311	0.60	189	0.36
差 poor	<i>ND3</i>	350	277	0.79	207	0.59
差 poor	<i>ATPase8</i>	167	200	1.20	82	0.49

综合考虑置信度和信息量将各基因全序列进行系统进化分析的适用性水平分为 4 个等级:很好的为 *ATPase6* 和 *cox2*; 好的序列为 *ND2* 和 *cox1*; *ND6*、*ND3* 和 *ATPase8* 差;包括 *Cyt b* 在内的其余 6 种基因为中等。

3 讨论

3.1 笛鲷属的系统进化

近来技术的进步和对基因组认识的加深使研究者在进行系统进化分析时有了更多选择。一方面,可以依靠生物信息学分析揭示出来的序列不同区段的特征选取合适的区段;另一方面可以借助先进的测序技术快捷的获得更多的序列数据。本研究首先通过测定 mtDNA 基因全序列获取的进化树进一步确认了笛鲷属鱼类种系发生过程中 Allen 的形态学系统强调的体色、体表条带等与进化关系的高度相关性^[23]。以外型十分相似,且都拥有 4 条亮蓝色纵带、黄体色的外海岩礁种类孟加拉笛鲷和四带笛鲷为例,它们最显著的区别在

于前者的腹部拥有亮蓝色的纵细纹,而后者完全没有。在本文的各系统进化树都证明他们为亲缘关系十分接近的两个种。这两个笛鲷属物种的加入也进一步强化了我们对于笛鲷属形态学特征中体表条纹对于分类乃至进化重要性的认识^[15]。

3.2 黑带鳞鳍梅鲷的分类地位有待确认

黑带鳞鳍梅鲷属于梅鲷亚科(Caesioninae),该亚科曾属于笛鲷科(Lutjanidae),现普遍将其独立成梅鲷科(Caesionidae)^[24],这主要由于梅鲷科鱼类具食浮游生物的许多特征,例如体呈长纺锤型,嘴小,尾鳍分叉深等形态特征^[25-26]。世界上最大的鱼类分类学数据库 Fishbase ([http:// fishbase.fishinfo.cn/search.php](http://fishbase.fishinfo.cn/search.php))中笛鲷科包括 4 个亚科,分别为滨鲷亚科(Etrlinae)、笛鲷亚科(Lutjaniane)、曳丝笛鲷亚科(Paradicichthyinae)及拟乌尾亚科(Apsilinae),共计 17 属约 105 种。梅鲷科已被独立出来。然而,郭昱嵩等^[10]通过勒氏笛鲷 mtDNA 全序列分析认为笛鲷亚科(Lutjaniane)与梅鲷亚科分歧小。Miller 等^[27]运用线粒体 16S rRNA 和

Cyt b 基因序列分析的结果表明梅鲷亚科与笛鲷亚科的关系十分密切,不支持梅鲷亚科从笛鲷科中独立出去。本文的结果表明黑带鳞鳍梅鲷与笛鲷属鱼类分子系统进化关系十分密切。可见有必要对黑带鳞鳍梅鲷和梅鲷科的形态学分类地位进行更深入的评估。

3.3 系统进化分析的 mtDNA 序列选择

Zardoya 等^[7]对脊椎动物门下各纲的系统进化进行分析,Miya 等^[8]及陈姝君等^[9]对 8 种硬骨鱼进行的研究都得到了纲下各目的比较结果(表 2)。他们的研究在目一阶元出现一些结论上的不一致,陈姝君等^[9]认为 *ND6* 的系统发育信息属于好的类型,而 Miya 等^[8]的研究结果中,它属于非常差的类型;陈姝君等认为 *Cyt b*、*cox3* 和 *ND1*

是中等类型,而 Miya 等^[8]将它们依次归为好、非常好、差的类型;陈姝君等^[9]认为 *cox1* 是差的类型,但 Miya 等^[8]认为它是非常好的类型。在郭昱嵩等^[10]进一步对鲈形目下各科的系统进化为主体并与其他研究者结论比较可见:对 *ATPase8*、*ND4L*、*ND4*、*ND5* 等基因的评价一致,但对 *ND6* 基因的评价差异较大。这一方面可能源于数据取样、分析方法等原因,但考虑到不同阶元的确需要不同基因已成为一般性规律,因此分类阶元不同所产生的影响应该是一个重要的原因。这充分显示出探讨分子系统学中基因适用性问题的复杂性,因此本文通过鲈形目笛鲷属的深入揭示 mtDNA 不同基因进化的规律,对于实际应用中根据分类阶元选择合适基因将有一定指导。

表 2 线粒体 DNA 蛋白编码基因适用性
Tab. 2 Phylogenetic performance of mtDNA protein-coding genes

基因 gene	基于脊椎动物 vertebrate ^[7]	陈姝君等基于硬骨鱼类 Chen S J, et al. for teleostean ^[9]	Miya 等基于硬骨鱼类 Miya, et al. for teleostean ^[8]	郭昱嵩等基于鲈形目 ^[10] Guo Y S, et al. for Perciformes ^[10]	本研究基于笛鲷属 this study for <i>lutjanus</i>
<i>ND1</i>	中等 medium	中等 medium	差 poor	中 medium	中 medium
<i>ND2</i>	好 good	好 good	中等 medium	中 medium	好 good
<i>cox1</i>	好 good	中等 medium	很好 very good	中 medium	好 good
<i>cox2</i>	中等 medium	中等 medium	好 good	很好 very good	很好 very good
<i>ATPase8</i>	差 poor	差 poor	非常差 very poor	差 poor	差 poor
<i>ATPase6</i>	差 poor	差 poor	差 poor	中 medium	很好 very good
<i>cox3</i>	中等 medium	中等 medium	很好 very good	中 medium	中 medium
<i>ND3</i>	差 poor	差 poor	中等 medium	差 poor	差 poor
<i>ND4L</i>	差 poor	差 poor	非常差 very poor	差 poor	中 medium
<i>ND4</i>	好 good	好 good	很好 very good	好 good	中 medium
<i>ND5</i>	好 good	好 good	很好 very good	好 good	中 medium
<i>ND6</i>	中等 medium	好 good	非常差 very poor	很好 very good	差 poor
<i>Cyt b</i>	好 good	中等 medium	好 good	中 medium	中 medium

考虑到信息位点在 mtDNA 基因组以及各基因中分布的不均匀性,我们还难以获知长度与进化分析可信度的直接关系。本部分通过笛鲷属的

全序列与单个基因序列、*cox1* 基因全序列和 *cox1* 条码序列或者 *Cyt b*、*cox1* 和 *cox2* 3 个基因的拼接序列和对应单基因的比较,清晰的揭示出笛鲷

属的序列长度对于系统进化树的置信度有明显的影响以及长度的决定性意义不适用于不同基因间。但从系统进化树聚类关系的稳定性可以看出,属内物种间比较时不同序列以及序列长度的影响小于高级阶元。

3.4 线粒体 DNA 全序列测定方法探讨

快速高效地获取 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。目前,从低等的无脊椎到高等的哺乳动物,已有 1 000 多种动物的线粒体全序列被测定出来,就采用的方法而言,一般包括 4 种:① Long-PCR,将线粒体基因组拆分为 2 个或几个相互重叠的 DNA 大片段进行扩增,为研究人员所广泛采用的一种方法,是一种理想的线粒体基因组分离策略^[28];② 参照已测定出的近源物种 mtDNA 全序列进行设计引物,采用常规 PCR 技术直接由总 DNA 中对线粒体基因组进行扩增,形成一系列长度短于 5 kb 的 DNA 片段,并将其克隆进质粒载体进行测序^[29]。③ 采用酶切或超声波打断 mtDNA,构建 DNA 文库,鸟枪法测序拼接^[30]。④ 酶切建文库载体测序拼接^[31]。本研究室在测定第一条笛鯛属鱼类,即勒氏笛鯛的线粒体全序列时采取了长距 PCR 产物直接克隆测序的方法^[11]。长距 PCR 的确保了总 DNA 很少时模板足够使用,也保证了模板的质量,避免了诸如假基因等的干扰。但是,勒氏笛鯛的线粒体 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。通过 *Cyt b* 和 *cox2* 基因全序列的 BLAST 分析,搜索出最优的扩增引物设计的参照——军曹鱼的线粒体 DNA 全序列,然后设计了 7 对长距扩增引物。这些引物的设计需要有一定的前期试验,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 7 个长距 PCR 产物克隆进载体也存在一定难度。本研究采取了长距 PCR 与常规 PCR 相结合的方法获取序列。使用的长距引物通用性强,扩增片段仅需稀释作为进一步常规 PCR 的模板。实验结果表明常规 PCR 的引物和扩增程序通用于笛鯛属多个物种以及军曹鱼等鲈形目鱼类,因此本研究采取的方法具有更好的可操作性。

参考文献:

[1] Anderson S, Bankier A T, Barrell B G, et al. Sequence and organization of the human

mitochondrial genome [J]. *Nature*, 1981, 290 (5806):457-465.

- [2] Avise J C. Molecular markers, natural history and evolution [J]. *Systematic Biology*, 1995, 44 (1): 117-120.
- [3] Nagase M, Aimi T, Suginaka K, et al. Complete mitochondrial DNA sequence of the Japanese flying fish *Cypselurus hiraii* [J]. *Fisheries Science*, 2005, 71 (4):914-923.
- [4] Manchado M, Catanese G, Infante C. Complete mitochondrial DNA sequence of the Atlantic bluefin tuna *Thunnus thynnus* [J]. *Fisheries Science*, 2004, 70 (1):68-73.
- [5] Hurst C D, Bartlett S E, Davidson W S, et al. The complete mitochondrial DNA sequence of the Atlantic salmon, *Salmo salar* [J]. *Gene*, 1999, 239 (2):237-242.
- [6] Nishida M. MitoFish; fish mitochondrial genome database, version 2.45 [OL]. <http://mitofish.ori.u-tokyo.ac.jp> [2010-03-29]
- [7] Zardoya R, Meyer A. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving genes in resolving relationships among vertebrates [J]. *Mol Biol Evol*, 1996, 13(7):933-942.
- [8] Miya M, Nishida M. Use of mitogenomic information in teleostean molecular phylogenetics: a tree-based exploration under the maximum-parsimony optimality criterion [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2000, 17(3):437-455.
- [9] 陈姝君,赫崇波,木云雷,等.硬骨鱼类线粒体基因系统发育信息效率分析 [J]. *中国水产科学*, 2008, 15(1):12-21.
- [10] 郭昱嵩,王中铎,焦阳,等.鲈形目线粒体 DNA 蛋白编码基因的适用性分析 [J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(16):7355-7358.
- [11] 郭昱嵩,王中铎,刘楚吾,等.勒氏笛鯛 (*Lutjanus russellii*) 线粒体 DNA 全序列的测定与分析 [J]. *自然科学进展*, 2008, 18(9):1064-1069.
- [12] 肖翔,刘楚吾.4 种笛鯛属鱼类 mtDNA 的 RFLP 研究 [J]. *热带海洋学报*, 2005, 24(6):22-30.
- [13] 谭围,王中铎,郭昱嵩,等.孟加拉笛鯛线粒体基因组序列结构及其进化 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2009, 25(3):82-86.
- [14] 王中铎,郭昱嵩,陈荣玲,等.南海常见硬骨鱼类 CO I 条码序列 [J]. *海洋与湖沼*, 2009, 40 (5):608-614.
- [15] Guo Y, Wang Z, Liu C, et al. Phylogenetic relationships of South China sea snappers (Genus

- Lutjanus*; Family Lutjanidae) based on mitochondrial DNA sequences [J]. *Mar Biotechnol* (NY), 2007, 9 (6): 682–688.
- [16] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 第二版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999: 61.
- [17] 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(1): 224–236.
- [18] 郭新红, 刘少军, 颜金鹏, 等. 异源四倍体鲫鲤、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 [J]. *遗传*, 2004, 26 (6): 875–880.
- [19] Lowe T M, Eddy S R. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence [J]. *Nucl Acids Res*, 1997, 25 (5): 955–964.
- [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(8): 1596–1599.
- [21] 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 Res*, 1994, 22(22): 4673–4680.
- [22] Xia X, Xie Z. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution [J]. *Heredity*, 2001, 92: 371–373.
- [23] Allen G R. FAO species catalogue vol. 6. Snappers of the world. An annotated and illustrated catalogue Lutjanid species known to date [J]. *FAO Fisheries Synopsis*, 1985, 6(125): 208.
- [24] 成庆泰, 郑葆珊. 中国鱼类系统检索[Z]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [25] Carpenter K E. Revision of the Indo-Pacific fish family Caesionidae (Lutjanoidea), with descriptions of five new species [M]. Honolulu: Bishop Museum Press, 1987.
- [26] Carpenter K E. A Phylogenetic Analysis of the Caesionidae (Perciformes: Lutjanoidea) [J]. *Copeia*, 1990, 1990(3): 692–717.
- [27] Miller T L, Cribb T H. Phylogenetic relationships of some common indo-pacific snappers (Perciformes: Lutjanoidea) based on mitochondrial DNA sequences, with comments on the taxonomic position of the Caesioninae [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, 44(1): 450–460.
- [28] 韩德民, 周开亚. 大壁虎线粒体基因组全序列及其结构 [J]. *动物学研究*, 2005, 26(2): 123–128.
- [29] 施燕峰, 单祥年, 李健, 等. 赤麂线粒体全基因组的序列和结构 [J]. *动物学报*, 2003, 49(5): 629–636.
- [30] 张晓梅, 单祥年, 施燕峰, 等. 小鹿线粒体基因组全序列的测定和分析 [J]. *遗传*, 2004, 26(6): 849–853.
- [31] 吴孝兵, 王义权, 周开亚, 等. 扬子鳄的线粒体全基因组与鳄类系统发生 [J]. *科学通报*, 2003, 48 (18): 1954–1958.

Performance of mitogenomic coding regions within genus *Lutjanus* molecular phylogenetics

WANG Zhong-duo^{1,2,3}, TAN Wei^{1,3}, GUO Yu-song^{1,3}, LIU Li^{1,3}, LIU Chu-wu^{1,2,3*}, LIU Yun²

(1. Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524066, China;

2. College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China;

3. Key Laboratory of Agriculture in South China Sea for Aquatic Economic Animal of Guangdong Higher Education Institutes, Zhanjiang 524066, China)

Abstract: The entire mitochondrial DNA sequence (mitogenome) of five species, *Lutjanus bengalensis*, *Lutjanus malabaricus*, *Lutjanus sebae*, *Lutjanus kasmira* and cobia (*Rachycentridae*: *Rachycentron canadum*) were determined using long PCR and primer-walking methodology with universal primers, and their GenBank Accession numbers are FJ171339, FJ416614, FJ824741, FJ824742 and NC_011219, respectively. The mitochondrial genomic sequence in snappers and cobia are similar to other vertebrate mitochondrial genomes with respect to gene order and genomic organization. Phylogenetic relationships derived from mtDNA sequences of *Lutjanus russellii*, *Lutjanus rivulatus*, *Lutjanus bengalensis*, *L. malabaricus*, *L. sebae*, *L. kasmira*, cobia and dark banded fusilier (*Caesioninae*: *Pterocaesio tile*) were incongruent with those derived from morphological taxonomic analyses. Beyond expected, high homogeneities were observed between some lutjanids and fusilier, belonging to Lutjaninae and Caesioninae. Further efforts may clarify the phylogenetic relationships among these snappers. Moreover, we investigated the performance of all thirteen mitochondrial protein-coding genes to recover the phylogenies. According to these tests, mitochondrial protein-coding genes can be roughly classified into four groups at the level of genus: of very good (*ATPase 6* and *cox2*), good (*cox1* and *ND2*), medium (*cox3*, *ND1*, *ND4*, *ND4L* and *ND5*), and poor (*ND3*, *ND6*, and *ATPase 8*). And we inform that simple length differences and rate differences between these genes cannot account for their different phylogenetic performance. We advice the careful selected genes and their combinations should be helpful for high resolved phylogenetic analysis for different level taxon.

Key words: *Lutjanus*; mitogenome; phylogenetics

Corresponding author: LIU Chu-wu. E-mail: liucw@gdou.edu.cn