

文章编号: 1000-0615(2018)04-0465-11

DOI: 10.11964/jfc.20170610883

5科11种鱼类ITS1特征分析及其在系统分类研究中的适用性

武宝生^{1,2}, 司李真^{1,2}, 孔晓瑜^{1*}, 时伟^{1*}, 杨敏^{1,2}

(1. 中国科学院南海海洋研究所, 热带海洋生物资源与生态重点实验室,
广东省应用海洋生物学重点实验室, 广东广州 510301;

2. 中国科学院大学, 北京 100049)

摘要: 为了探讨ITS1作为分子标记用于鱼类系统演化的适用性, 实验选取鲈形目5科11种鱼类为研究对象, 包括尖吻鲈科、射水鱼科、军曹鱼科、剑鱼科和鲹科。通过克隆和测序等技术共获得了348条ITS1序列, 长度范围为442~661 bp; 通过对所有序列的长度、变异位点数量、GC含量、核苷酸多样性及单倍型多样性指数等遗传特征比较分析发现, 11种鱼类ITS1序列无论是在种内还是在种间, 长度和序列都表现出较为明显的多态性。特别是在军曹鱼中, 70条克隆的长度范围为648~661 bp, 但有一条序列存在55 bp缺失, 结合该序列的GC含量, 二级结构和最小自由能, 推断该序列为假基因。以鲷为外类群, 基于核糖体ITS1序列构建的邻接树显示在物种种类水平上, 不同个体的克隆都按种类聚支, ITS1可以用于该类群物种的区分; 在属级水平上, ITS1将11属鱼类完全区分开, 能够用于属级水平的区分; 在科级水平上, 虽然鲹科分为2支的分子结果和形态分类存在差异, 但ITS1构建的系统关系与线粒体分子标记构建的系统进化树相似。研究表明, 核糖体ITS1可以作为一种有效的分子标记用于研究鱼类的系统分类研究, 并且不同的分类阶元其解析能力不同, 这将为鱼类核糖体的研究提供科学依据。

关键词: 鲈形目; 鲹科; ITS1序列多态性; 系统演化; 假基因

中图分类号: Q 346; S 917.4

文献标志码: A

核糖体ITS1(internal transcribed spacer 1)位于十分保守的编码基因18S与5.8S之间。由于其在基因组中高度串联重复, 具有引物设计简单、长度适中、易于扩增、在属或种水平进化速率快、多态性高、信息量丰富等优点, 被广泛地应用于物种水平以及属水平, 甚至在科水平上的系统演化分析^[1-6]。不少研究者分别在动物中^[7-12]证实ITS1作为分子标记可以很好地运用于低级阶元(属或种以及亚种水平)的物种鉴定和系统演化推断。例如, 在物种鉴定中, Huyse等^[11]的研究表明, ITS1在鰕虎鱼物种鉴定上能将这2个属(*Pomatoschistus*, *Gobiusculus*)的不同鱼类区分开, 且其结果与线粒体的12S和16S的分类结果一致; Harris等^[10]的研究认为ITS1虽然在物种水平具有

一定的鉴别能力, 但不适用于原螯虾属(*Procam-bams*)和叉肢螯虾属(*Orconectes*)的系统演化推断。在系统演化推断中, 郭奕惠等^[12]借助于ITS1全序列以及大约50 bp的5.8S和150 bp的18S对罗非鱼属(*Oreochromis*)5种鱼类的研究表明, 尼罗罗非鱼(*O. niloticus*)和尼奥罗非鱼(*O. niloticus* ♀×*O. aureus* ♂)亲缘关系较近, 奥利亚罗非鱼(*O. aureus*)与莫桑比克罗非鱼(*O. mossambicus*)亲缘关系较近; 龚理等^[13]研究鲷科4属5种鱼类[蛾眉条鲷(*Zebrias quagga*), 带纹条鲷(*Z. zebrinus*), 卵鲷(*Solea ovata*), 东方箸鲷(*Brachirus orientalis*), 眼斑豹鲷(*Pardachirus pavoninus*)]时发现, ITS1不仅可以将这些鱼类在物种和属级水平区分开, 还能反映各鱼类之间的亲缘关系。

收稿日期: 2017-06-21 修回日期: 2017-08-16

资助项目: 国家自然科学基金(31272273, 41276166)

通信作者: 孔晓瑜, E-mail: xykong@scsio.ac.cn; 时伟, E-mail: shiwei@scsio.ac.cn

然而不同研究者认为, ITS1由于变异速率过快, 序列难以比对, 构建的系统进化树紊乱, 不能有效地揭示物种之间的真实演化关系, 因而认为ITS1作为分子标记不适用于系统演化探究^[14-16]。例如, Chow等^[14]在对599个海洋动物(包括无脊椎动物以及硬骨鱼类在内的脊椎动物) ITS1的长度及其在系统发育分析中的适用性进行了研究, 发现同一个科的不同属之间, 甚至同一个属的不同种之间的序列由于长度差异大, 变异位点多, 以至于序列间难以比对, 难以构建系统进化树, 从而认为ITS1作为系统发育重建的分子标记具有一定的局限性; Redmond等^[15]在研究6种海绵动物的ITS时, 发现*Haliclona cinerea*的个体A的序列变异很大, 以至于不能与其他个体B、C、D进行多重比对, 导致无法使用该基因构建有效的系统进化树, 从而否定了ITS作为分子标记在海绵动物系统演化研究中的适用性。因而对于ITS1的特征以及其作为分子标记用于物种鉴定和系统演化的适用性需要进一步的研究。

假基因是一类在序列上与功能基因高度相似, 却丧失功能的DNA序列。自第一例核糖体假基因被报道后^[17], 关于假基因的研究一直以来都是热点, 特别是近年来, 随着核糖体基因多态性报道的不断出现^[9-10, 18-19], 核糖体基因被认为不完全遵循协同进化, 同时还存在非协同进化的现象, 而使得对核糖体基因的研究从单一克隆转变到不同个体的多个克隆中, 这使得相关假基因的报道日趋增多, 然而关于鱼类核糖体假基因的报道却十分少见^[13, 20-21]。目前, 虽然还没有明确的判断核糖体假基因的标准, 但是基于前期的研究表明假基因一般具有序列较短、GC含量较低、最小自由能较低和二级结构不稳定以及保守区域变异大的特点^[20, 22]。假基因虽然失去了功能, 但并不会在短时间内从基因组消失, 并以不同于功能基因的进化速率发生着独立的变化, 保留了数百万年前祖先功能基因的分子记录, 是基因组DNA进化的“遗迹”, 也是基因组的“分子化石”, 从分子水平上记录了基因组序列数百万年的进化路线^[23-24]。Razafimandimbison等^[25]在研究茜草科(Rubiaceae)植物的系统关系时认为假基因可以用以系统分析, 特别是当没有足够多的功能基因时, 假基因就起着重要作用。龚理等^[13]在利用ITS1研究

5种鲷科鱼类的亲缘关系时发现, 眼斑豹鲷的37个克隆中有1个假基因克隆与东方箬鲷的序列相似度高达96.2%, 并在聚类分析中该假基因与东方箬鲷聚支, 并不与眼斑豹鲷聚支, 从假基因的角度推测了眼斑豹鲷与东方箬鲷具有更近的亲缘关系。因而, 对于假基因的研究提供了十分重要的依据。

目前有关鱼类核糖体的研究报道较少, 特别是有关鱼类核糖体假基因的研究报道十分罕见。本研究选取5科11种鱼类为研究对象, 分析了这些鱼类核糖体ITS1基因的遗传特征。一方面探讨了ITS1作为分子标记运用于种类鉴定和系统演化上的适用性; 另一方面, 明确了军曹鱼假基因对5科11种鱼类构建的分子系统进化树的影响。以期为进一步的鱼类核糖体ITS1及其假基因的研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究选取了5科11种鱼类, 样品种类、数量及采集地等详细信息见表1。从所获得的样品中分别取肌肉放入95%的酒精中保存待用。

1.2 DNA提取、PCR扩增和测序

取约30 mg样品肌肉组织, 切碎置于1.5 mL的离心管中, 加入200 μ L匀浆缓冲液和20 μ L蛋白酶K, 至肌肉组织完全裂解, 然后用海洋动物组织基因组提取试剂盒(天根生化, 北京)提取DNA; 加双蒸水溶解后保存于-20 $^{\circ}$ C冰箱中。根据已有近缘物种^[20]的核糖体基因片段序列, 设计ITS1扩增引物, 其中正向引物Z-18S-1720: 5'-TCGCTACTACCGATTGGATGGTTTA-3', 反向引物F-5.8S-150: 5'-AAGCGACCCT-CAGACAGGCGTAG-3'。其中5'端包括大约150 bp的18S, 3'端包括大约160 bp的5.8S。

PCR反应总体积为25 μ L, 包括2.5 μ L 10 \times 缓冲液, 2 μ L MgCl₂(25 mmol/L), 2 μ L dNTP(分别为2.5 mmol/L), 双向引物各1 μ L(10 μ mol/L), 1单位rTaq酶, 1 μ L模板DNA(50 ng/ μ L), 灭菌双蒸水补足至25 μ L。使用ABI-9700型PCR仪进行扩增, 反应程序: 94 $^{\circ}$ C预变性3 min, 94 $^{\circ}$ C变性1 min, 50 $^{\circ}$ C退火50 s, 72 $^{\circ}$ C延伸50 s, 进行35个循环后72 $^{\circ}$ C延伸10 min。扩增产物使用1%琼脂糖凝胶

表 1 本研究中11种鱼类及ITS1片段的相关信息

Tab. 1 The relative information of 11 species in five families and numbers of ITS1 used in present study

分类阶元 taxonomic category	个体编号 individual number	克隆数/个 no.	采集地点 collecting locations
鲽科 Carangidae			
副叶鲽属 <i>Alepes</i>			
吉打副叶鲽 <i>Alepes djedaba</i>	1	18	厦门第八市场 eighth fish market, Xiamen
	2	59	厦门第八市场 eighth fish market, Xiamen
	3	22	厦门第八市场 eighth fish market, Xiamen
圆鲽属 <i>Decapterus</i>			
蓝圆鲽 <i>Decapterus maruadsi</i>	1	12	北海桥港鱼市 fish market, Beihai
	2	10	厦门第八市场 eighth fish market, Xiamen
大甲鲽属 <i>Megalaspis</i>			
大甲鲽 <i>Megalaspis cordyla</i>	1	19	北海桥港鱼市 fish market, Beihai
	2	11	北海桥港鱼市 fish market, Beihai
	3	12	北海桥港鱼市 fish market, Beihai
似鲽属 <i>Scomberoides</i>			
泰拉鲽 <i>Scomberoides tala</i>	1	12	北海桥港鱼市 fish market, Beihai
细鲽属 <i>Selaroides</i>			
金带细鲽 <i>Selaroides leptolepis</i>	1	22	北海桥港鱼市 fish market, Beihai
	2	24	北海桥港鱼市 fish market, Beihai
	3	36	北海桥港鱼市 fish market, Beihai
鲳鲽属 <i>Trachinotus</i>			
布氏鲳鲽 <i>Trachinotus blochii</i>	1	11	厦门第八市场 eighth fish market, Xiamen
	2	12	厦门第八市场 eighth fish market, Xiamen
竹筴鱼属 <i>Trachurus</i>			
日本竹筴鱼 <i>Trachurus japonicas</i>	1	36	北海桥港鱼市 fish market, Beihai
	2	36	北海桥港鱼市 fish market, Beihai
尖吻鲈科 Latidae			
尖吻鲈属 <i>Lates</i>			
尖吻鲈 <i>Lates calcarifer</i>	1	11	湛江鱼市 fish market, Zhanjiang
	2	13	湛江鱼市 fish market, Zhanjiang
射水鱼科 Toxotidae			
射水鱼属 <i>Toxotes</i>			
射水鱼 <i>Toxotes chatareus</i>	1	12	广州花地湾 fish market of Huadiwan, Guangzhou
	2	12	广州花地湾 fish market of Huadiwan, Guangzhou
剑鱼科 Xiphiidae			
剑鱼属 <i>Xiphias</i>			
剑鱼 <i>Xiphias gladius</i>	1	11	澳大利亚 fish market, Australia
	2	13	美国密苏里 fish market of Missouri, America
军曹鱼科 Rachycentridae			
军曹鱼属 <i>Rachycentron</i>			
军曹鱼 <i>Rachycentron canadum</i>	1	12	温岭鱼市 fish market, Wenling
	2	8	温岭鱼市 fish market, Wenling

电泳检测, PCR产物用GenClean柱式琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒纯化回收, 并用pMD 18T载体连接, 转化至大肠杆菌DH5 α , 每个个体的扩增片段分别挑选10~40个克隆子进行测序, 选择峰图准确清晰的序列用于分析。

1.3 数据分析

首先, 将测定的11种鱼类的ITS1序列利用BLAST网站进行检索(<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>), 判定是否为目的片段。然后, 用ClustalX 2.1^[26]将各种鱼的片段进行比对, 并切去ITS1 5'端的18S和3'端的5.8S序列, 获得完整的ITS1序列。将获得的比对序列通过MEGA 5.0^[27]统计各种类ITS1的保守位点、变异位点、简约信息位点和保守位点比例; 计算出每一条序列的GC含量, 然后计算同一种鱼的GC含量范围、最大值与最小值的差值、种间的两两差值及种间最小和最大差值。使用DnaSP 5.10.1^[28]分别计算每种鱼序列的单倍型数量、单倍型多样性指数和核苷酸多样性。微卫星序列用Tandem Repeats Finder在线软件识别(<http://tandem.bu.edu/trf/trf.basic.submit.html>)。采用Kimura双参数

(K2P)模型计算军曹鱼不同序列间的遗传距离。用MEGA 5.0构建5科11种鱼类的ITS1序列的邻接树(Neighbor-joining tree, NJ)。从NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载了5科10种鱼类的线粒体基因组, 使用MrBayes 3.1.2^[29]构建除了ND6以外的12个蛋白质基因、12S、16S和22个tRNA基因序列的贝叶斯树(Bayesian Inference tree, BI)。

2 结果

2.1 长度多态性

5科11种鱼类24个体共获得了348个克隆, 除吉打副叶鲔个体2获得9个克隆以外, 其他每个个体都获得了10个以上的克隆, 这些克隆长度分布于442~661 bp, 可以看出各种类间的长度差异比较明显(表2)。比较种内各克隆间长度发现, 不同种类的长度变化存在一定的差异, 泰拉鳍鲔、射水鱼、日本竹筴鱼、尖吻鲈和布氏鲳鲈的种内序列间长度差异较小(1~5 bp), 特别是泰拉鳍鲔和射水鱼的长度极其保守, 泰拉鳍鲔仅有3个克隆序列在160 bp位点处有一个碱基T的缺

表2 11种鱼类ITS1序列多样性特征比较

Tab. 2 The comparison for polymorphic feature of ITS1 sequence among 11 species

种名 scientific name	GenBank 编号 GenBank accession number	克隆数/个 no.	长度/bp length	GC含量/% GC content	C/个	V/个	Pi/个	H/个	P	π	Hd	R
吉打副叶鲔 <i>A. djedaba</i>	MG026872~MG026913	44	526~537	61.59	470	63	11	40	0.864	0.010 18	0.995 0	2.39
蓝圆鲔 <i>D. maruadsi</i>	MG026914~MG026935	22	563~573	62.53	530	44	12	21	0.920	0.013 40	0.995 7	2.69
大甲鲔 <i>M. corayla</i>	MG026962~MG026995	34	578~605	66.15	564	44	9	33	0.920	0.006 82	0.998 2	10.72
泰拉鳍鲔 <i>S. tala</i>	MG027068~MG027077	11	598~599	67.46	580	21	1	10	0.965	0.006 81	0.981 8	4.60
金带细鲔 <i>S. leptolepis</i>	MG027078~MG027120	46	489~514	64.82	437	82	17	37	0.815	0.012 82	0.971 0	2.56
布氏鲳鲈 <i>T. blochii</i>	MG027143~MG027167	25	566~571	70.88	540	32	2	20	0.941	0.004 42	0.950 0	32.33
日本竹筴鱼 <i>T. japonicus</i>	MG027168~MG027190	23	653~655	65.80	612	43	10	23	0.932	0.008 68	1.000 0	3.49
尖吻鲈 <i>L. calcarifer</i>	MG026936~MG026961	26	652~655	68.70	604	50	5	25	0.921	0.006 80	0.996 9	9.59
射水鱼 <i>T. chatareus</i>	MG027121~MG027142	22	508~509	71.40	491	17	2	14	0.963	0.003 91	0.874 5	2.40
剑鱼 <i>X. gladius</i>	MG027191~MG027214	24	442~454	70.46	405	53	20	22	0.882	0.018 48	0.992 8	1.55
军曹鱼-F <i>R. canadum-F</i>	MG026996~MG027039	70	648~661	67.95	536	129	18	58	0.808	0.006 53	0.972 0	2.19
军曹鱼-P <i>R. canadum-P</i>	MG027041~MG027066 MG027040	1	606	66.67								

注: F. 真基因; P. 假基因; C. 保守位点数; V. 变异位点数; Pi. 简约信息位点数; H. 单倍型数; P. 保守位点比例; π . 核苷酸多样性; Hd. 单倍型多样性指数; R. 转换/颠换

Notes: F. functional gene; P. pseudogene; C. number of conserved site; V. number of variable site; Pi. number of parsimony informative site; H. number of haplotype; P. sequence conservation; π . nucleotide diversity; Hd. haplotype diversity; R. transition/transversion

失, 射水鱼仅有2个克隆分别存在碱基C和A的插入。日本竹筴鱼、尖吻鲈和布氏鲷种内的长度差异虽然都在5 bp之内, 但是其插入或缺失位点分布较为分散(表1)。蓝圆鲹、吉打副叶鲹、剑鱼、金带细鲹和大甲鲹5种鱼类种内各克隆间的序列长度差异较大(10~27 bp)。值得注意的是, 军曹鱼71个克隆的长度为606~661 bp, 最大长度与最小长度之差高达55 bp, 这是11种鱼类种内中长度差异最大的鱼类。相对于种内的长度变异, 11种鱼类种间序列长度差异变化范围较大。日本竹筴鱼和尖吻鲈的长度比较相近(相差1 bp), 蓝圆鲹和布氏鲷的长度比较相近(相差3 bp); 其他7种鱼类的序列长度差异十分明显, 最大长度差在剑鱼和大甲鲹之间, 高达163 bp(442~605 bp)。

2.2 序列多态性

为了进一步了解11种鱼类ITS1序列的多态性特点, 分别对所有序列的多态性特征进行了详细分析(表2)。11种鱼类的GC含量分布于61.59%~71.40%, 在种内, GC含量差值最小的为泰拉鳍鲹的0.84%, 最大的为大甲鲹的1.87%; 种间差值最小的为大甲鲹与日本竹筴鱼的0.35%, 最大的为射水鱼与吉打副叶鲹的9.81%。所有鱼的保守位点数(C)都明显高于400, 变异位点(V)分布于17~129, 简约信息位点(Pi)为1~20, 明显存在着简约信息位点数远小于变异位点数的现象, 其中简约信息位点数最少的泰拉鳍鲹仅为1个, 最多的剑鱼有20个。保守位点比例(P)能反映该序列的平均变异程度, 军曹鱼的序列保守位点比例为0.808(除去短序列), 其平均变异程度最高; 而泰拉鳍鲹和射水鱼的保守位点比例为0.965和0.963, 其平均变异程度最低, 这和它们长度的保守性是一致的。单倍型多样性指数(Hd)分析发现除射水鱼的Hd值为0.874 5外, 其余10种鱼类的Hd值均高于0.95, 这意味着除射水鱼以外的10个物种的所有克隆序列中很少或者不存在2条完全一致的序列, 特别是日本竹筴鱼的Hd值高达1.0, 该物种内的所有克隆序列都不相同。核苷酸多样性(π)分析显示, 剑鱼的核苷酸丰富度最高, 约为0.018 48, 其次是金带细鲹, 而射水鱼的核苷酸丰富度最低, 仅有0.003 91, 约为剑鱼的1/6, 由此可见, 不同物种内的核苷酸多样性存在着明显的差异。从转换与颠换比

值(R)中可以看出, 除剑鱼的转换与颠换比值小于2.0以外, 其他鱼类的转换与颠换比值均高于2.0。综上, 各种鱼类的多样性参数变化不一, 11种鱼类ITS1中存在着明显的序列多态性。

2.3 军曹鱼特异序列多态性分析

由于在军曹鱼中发现了1条55 bp缺失的克隆, 因此又增加了该鱼的扩增克隆数, 2个个体分别达到了35和36个克隆。对这些克隆分析比较发现存在2种长度显著差异的序列类型, 其中70个克隆的长度为648~661 bp, 仅有1个克隆为606 bp, 分别将长序列类型命名为Type A (70/71)和短序列类型命名为Type B (1/70), 造成2种类型差异的原因是Type B在位点284~333 bp存在50 bp的片段缺失(图1)以及在其他位点的5 bp缺失。比对所有序列发现, 在位点137~179 bp以及191~249 bp分别存在(GGA)₈₋₁₁和(CT)₁₉₋₂₆2种微卫星序列; GC含量分析显示, Type A为67.95%, Type B为66.67%, Type A的GC含量略高于Type B (1.28%)。2种序列的二级结构和最小自由能比较发现, Type A序列的最小自由能-327.5 kcal/mol大于Type B序列的-307.6 kcal/mol。此外, 遗传距离分析显示, 军曹鱼2个体之间以及2种Type之间的遗传距离并没有明显的差异。个体1内Type A的平均遗传距离为0.005 6, 个体2内Type A的平均遗传距离为0.007 6, Type A与Type B的平均遗传距离为0.007 3。很明显, 在个体2中, 不仅存在着2种类型, 其Type A序列之间的差异也略高于个体1中的Type A。

2.4 系统发育分析

为了探讨ITS1在系统分类中的适用性, 本研究以2种鲷科鱼类[澳洲短鲷(*Remora australis*), 长鲷(*Echeneis naucrates*)]为外类群构建了5科11种鱼类348条序列的NJ树(图2)。对系统树分析发现, 每种鱼类的序列都是单独聚支, 11种鱼类聚为11大支, 且具有很高的置信度, 除日本竹筴鱼的置信度为89%, 其他都为100%。在种内的个体水平上, 单个个体的多克隆都不单独聚支, 而是分散聚支, 不构成个体的单系群。在军曹鱼的所有序列中, 2个个体的Type A不单独聚支, Type B的序列和Type A聚支, 并没有聚支到其他种类中。除了鲹科7种鱼分为2支外, 其余科的种类均按科聚类, 鲹科的日本竹筴鱼、蓝圆鲹、大甲鲹、金带细鲹、吉打副叶鲹聚为一支, 泰

R.can1_26	TACCGTTTCG GAGCCGCCCG GCCCCCTCGG GGCTCGGAGT CGGTTTCCGC ACAGTCTCCG GATTGCTTAG	[70]
R.can1_6 G	[70]
R.can1_11	[70]
R.can2_16	[70]
R.can2_2 C C	[70]
R.can2_10	[70]
R.can1_26	AGTCTCCCGT CTCGGGTCCC CGTCCCAGGC GGATGGGTTC CCGTGCGTGT CTCCC-GAGG CCGGGAGGGA	[140]
R.can1_6	G	[140]
R.can1_11	G	[140]
R.can2_16	G	[140]
R.can2_2	G	[140]
R.can2_10	G	[140]
R.can1_26	GGAGTAGGAG GAGGAGTAGG AGGAGGAGGA GTGGTAGGAG TAGTCGTCTG ACTCTCTCAC TCTCTCTTTT	[210]
R.can1_6	[210]
R.can1_11 A	[210]
R.can2_16 A	[210]
R.can2_2	[210]
R.can2_10 T G	[210]
R.can1_26	TCTCTCTCTC TCTCTCTCTC -----CC TCCTTTTCTC CACCGCTGCC AGTCGGGGCC TCGTCCCCGC	[280]
R.can1_6	[280]
R.can1_11	[280]
R.can2_16	[280]
R.can2_2 TCTC----- C	[280]
R.can2_10	[280]
R.can1_26	CGGACGCACC CAACGGCCTC CCCGCCTCCC GCCACCGCGA CGCGTCCCGC CGGCCTGCTC CGAGGGCCAA	[350]
R.can1_6	[350]
R.can1_11	[350]
R.can2_16	[350]
R.can2_2	[350]
R.can2_10	[350]
R.can1_26	GACGGGCTTG ACGTCGGGCG CGCTCGCACA GGCAGGGGA GGAGGCCGAT GTCCGGGCAC TCACGGGCC	[420]
R.can1_6	[420]
R.can1_11	[420]
R.can2_16	[420]
R.can2_2	[420]
R.can2_10	. G	[420]
R.can1_26	GGTCCACAG CTTCGGAACC GCCAAACCC AGCGCGGCGC GGCGGCTTCG CCCTGGCCGC CTGCCGTGCC	[490]
R.can1_6	[490]
R.can1_11	[490]
R.can2_16	[490]
R.can2_2	[490]
R.can2_10	[490]
R.can1_26	CCCGGGGCA CCAACTCTC CTCTCTCCCT CGGAGGGAGG CGGGGGGTTT AATGTCTCCC CAACCCGCC	[560]
R.can1_6 C	[560]
R.can1_11	[560]
R.can2_16	[560]
R.can2_2	[560]
R.can2_10	[560]
R.can1_26	CGGC GGGGA CGGGAGCGC TCGCGGGTTT CGGAAGTCTC ACGAGTCAA CCTCTCCAG AACCTTTTCT	[630]
R.can1_6 G	[630]
R.can1_11	[630]
R.can2_16 GT	[630]
R.can2_2	[630]
R.can2_10 T	[630]
R.can1_26	TTTTGGCCGG AAACCAACAG AAAAATCAA ACCTT	[665]
R.can1_6	[665]
R.can1_11	[665]
R.can2_16 G	[665]
R.can2_2	[665]
R.can2_10	[665]

图 1 军曹鱼2种序列类型对比

“R.can”为军曹鱼的缩写，字母后面的第一位数字代表个体编号，下划线后面的数字代表克隆序号。“R.can2_10”为Type B类型，其余克隆为Type A类型的代表序列。下划线上的序列代表微卫星重复序列；方框内的位点为Type B缺失序列

Fig. 1 The comparison between ITS1 sequences of two types in *R. canadum*

“R.can” is the abbreviation of *R. canadum*, the first digit following letter denotes individual’s number, the digit behind the underline denotes monoclone’s number. “R.can2_10” is the sequence of Type B, five others are representatives for Type A sequence. The underlined sequences represent microsatellite tandem repeats; the missing sites are indicated by box

拉鳍鲈和布氏鲷聚为另一支。

对于ITS1在鲈科聚类中存在的分歧，究竟是该分子标记的解析能力问题还是鲈科鱼类本

身就存在着分类问题值得探讨；在本研究中只有鲈科包含多个属，其他4科中有些科仅为单属，很难从其他科的角度上予以确认，因此，

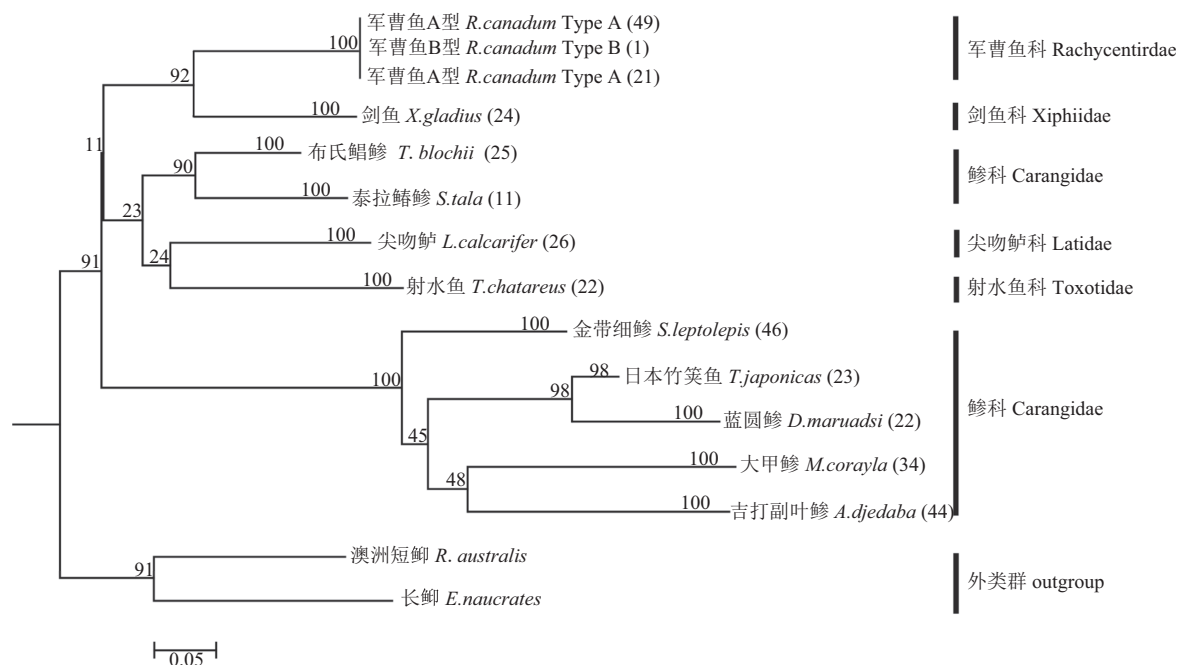


图 2 基于ITS1构建的11种鱼类的邻接树

括号内数字代表克隆数量

Fig. 2 The NJ phylogenetic tree reconstructed based on ITS1 sequences of 11 species from five families numbers in the bracket indicate the amount of clones

本研究选取了相应的5科9属的10种鱼类的线粒体基因(除圆鲹属和似鲹属外), 构建了贝叶斯进化树进行比较(图3)。结果显示线粒体基因的结果与ITS1聚支相似, 鲹科鱼类仍然分为2支, 其中竹筴鱼属、大甲鲹属、细鲹属和副叶鲹属先分化出来聚为1支, 鲳鲹属后分化出来, 并与尖吻鲈属、剑鱼属、射水鱼属聚为1支。

3 讨论

3.1 11种鱼类序列多态性

5科11种鱼类ITS1的长度存在差异(442~661 bp), 这与司李真等^[30]统计的硬骨鱼类该片段的长度范围(272~918 bp)相吻合。另外, 其计算的10个目的硬骨鱼类ITS1种内的保守位点点比例为89.51%~

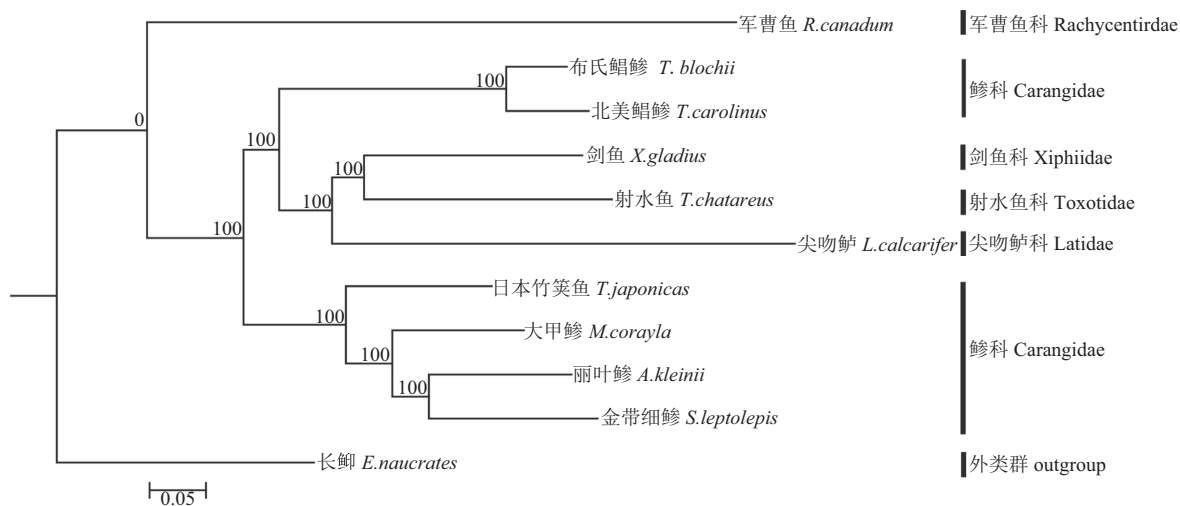


图 3 基于线粒体基因序列构建的10种鱼类的贝叶斯树

Fig. 3 The Bayesian inference tree reconstructed based on the mitochondrial sequences from 10 species

100%，种间的为61.53%~81.36%；与本研究结果相比，11种鱼类中有7种鱼类的种内保守位点比例和硬骨鱼类的一致，只有4种鱼类是低于其最低值89.51%，包括吉打副叶鲮(86.40%)、金带细鲮(81.50%)、剑鱼(88.20%)、军曹鱼(80.80%)，但这4种的数值却大于或基本接近于种间序列保守位点比例的最大值(81.36%)。11种鱼类ITS1的GC含量分布于61.59%~71.40%，明显高于硬骨鱼类基因组内的GC含量(30%~50%)^[31]。Knight等^[32]认为转换与颠换的比值小于2.0时，基因的突变可能已经达到饱和状态，系统进化分析时需要加权分析，而本研究中的11种鱼类中有10种鱼的转换与颠换比例大于2.0，因而推断这些鱼类核糖体ITS1基因在进化的过程中可能尚处于突变不饱和状态，可以用作这些鱼类的系统进化分析。

3.2 ITS1在分类和系统演化中的适用性

本研究中利用ITS1作为分子标记，构建了5科11种鱼的348条序列的NJ系统树。虽然军曹鱼的克隆序列中存在2个类型，其他10种鱼类尽管采集地不同，但相同种类的克隆序列都单独聚支，11种鱼类聚为11大支，并且各属内的种类也是单独聚支，表明核糖体ITS1基因序列能够有效地适用于这些鱼类在属级水平上的区分，这与许多研究者在鱼类ITS1上的研究结果相一致^[7-11, 13]。郭奕惠等^[12]对5种罗非鱼间亲缘关系的探讨，龚理等^[13]对5种鲷科鱼类属级关系、种间关系及其亲缘关系的研究都表明ITS1可以用于鱼类低级分类阶元系统演化的推断，这与本研究的结果一致。但是与Chow等^[14]和Redmond等^[15]使用ITS1对系统关系的研究有所不同，Chow等^[14]之所以得出序列难以比对的现象可能是其所研究的海洋动物在分类阶元上的跨度太大或者存在显著的序列差异，序列间的保守性低而难以进行序列比对；同样的现象也出现在Redmond等^[15]的研究中。但是在本研究的348条ITS1序列中，只有军曹鱼Type B序列有一段较为明显的缺失，该片段的其他位点和Type A的序列基本一致，并没有出现Chow等^[14]和Redmond等^[15]研究中序列难以比对的现象。

目前在鱼类的研究中很少涉及到ITS1对高阶元的系统关系探讨，本研究对ITS1在科级水平上的适用性进行了初步研究。虽然在鲽科内属间出现了不聚支现象，但是这与应用线粒体基因组进行的系统分析结果一致，与形态分为一

个鲽科的结果有所差异。鉴于以上2种分子标记结果的比较，认为ITS1分子标记在科级水平上有一定的解析能力。对于这种鲽科分为2支的分子结果和形态分类差异，一个可能的原因是分子的进化速率远远快于形态的变化，以至于分子的分化能够检测出来而形态的变化却达不到能观察到的程度，另一个原因可能是分类学者对形态分类特征的加权选择而忽略了分歧特征的存在，从而导致了与形态分类结果和分子分类的不同。

3.3 军曹鱼假基因及对物种鉴定的影响

目前，虽然对于ITS假基因的判别并没有具体的标准，然而，已有的研究成果显示，核糖体假基因通常具有长度相对较短、GC含量低、序列变异较大、最小自由能较低和二级结构不稳定的特点^[20, 22]。在本研究中军曹鱼的Type B序列比Type A序列少大约50 bp，其GC含量也低于Type A约1.3%，最小自由能要低约20 kcal/mol(绝对值)，因而，初步推断军曹鱼Type B序列为假基因。

学者们对于假基因的作用有着不同的看法，有学者认为它的存在会影响种类的分子鉴定并造成系统进化树的紊乱，不能正确反映真实的系统演化关系，但也有学者认为假基因保留了基因组进化的“遗迹”，为基因组序列的进化路线和种类间亲缘关系的研究提供了不可多得的信息。在本研究中，军曹鱼的假基因没有对种类的分子鉴定产生影响，在构建系统进化树时，也没有造成系统进化树的紊乱现象；但是也没有能够提供该片段的进化及种类间亲缘关系信息，这与龚理等^[13]的研究结果有所区别，眼斑豹鲷假基因的存在虽然对种类鉴定产生了一定的干扰，但同时该假基因也提供了种类间亲缘关系的推断信息。

感谢中国科学院海洋研究所刘静研究员提供的样品以及在样品鉴定方面给予的帮助。

参考文献:

- [1] Calonje M, Martín-Bravo S, Dobeš C, *et al.* Non-coding nuclear DNA markers in phylogenetic reconstruction[J]. *Plant Systematics and Evolution*, 2009, 282(3-4): 257-280.

- [2] Poczai P, Hyvönen J. Nuclear ribosomal spacer regions in plant phylogenetics: problems and prospects[J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37(4): 1897-1912.
- [3] Choudhary K, Verma A K, Swaroop S, *et al.* A review on the molecular characterization of digenean parasites using molecular markers with special reference to ITS region[J]. *Helminthologia*, 2015, 52(3): 167-187.
- [4] Insua A, López-Piñón M J, Freire R, *et al.* Sequence analysis of the ribosomal DNA internal transcribed spacer region in some scallop species (Mollusca: Bivalvia: Pectinidae)[J]. *Genome*, 2003, 46(4): 595-604.
- [5] Kuriwa K, Hanzawa N, Yoshino T, *et al.* Phylogenetic relationships and natural hybridization in rabbitfishes (Teleostei: Siganidae) inferred from mitochondrial and nuclear DNA analyses[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, 45(1): 69-80.
- [6] Coleman A W. Analysis of mammalian rDNA internal transcribed spacers[J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79122.
- [7] 孙玉华, 谢从新, 刘思阳. 亚口鱼科鱼类核DNA 18S-ITS1-5.8S序列比较分析[J]. *水生生物学报*, 2006, 30(3): 367-370.
Sun Y H, Xie C X, Liu S Y. The genetic variation of 18S-ITS1-5.8S sequences of 7 catostomids[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, 30(3): 367-370(in Chinese).
- [8] 张源真, 王伟, 姜志强. 基于ITS-1序列的部分鳎亚目鱼类的分子系统进化关系研究[J]. *现代农业科技*, 2012(8): 318-320.
Zhang Y Z, Wang W, Jiang Z Q. Research on molecular phylogenetic relationship of partial Blennioidei based on ITS-1 sequences[J]. *Modern Agricultural Sciences and Technology*, 2012(8): 318-320(in Chinese).
- [9] Freire R, Arias A, Méndez J, *et al.* Sequence variation of the internal transcribed spacer (ITS) region of ribosomal DNA in *Cerastoderma* species (Bivalvia: Cardiidae)[J]. *Journal of Molluscan Studies*, 2010, 76(1): 77-86.
- [10] Harris D J, Crandall K A. Intra-genomic variation within ITS1 and ITS2 of freshwater crayfishes (Decapoda: Cambaridae): Implications for phylogenetic and microsatellite studies[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2000, 17(2): 284-291.
- [11] Huysse T, Van Houdt J, Volckaert F A M. Paleoclimatic history and vicariant speciation in the "sand goby" group (Gobiidae, Teleostei)[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2004, 32(1): 324-336.
- [12] 郭奕惠, 喻达辉, 黄桂菊, 等. 细胞核rDNA序列分析5种罗非鱼的亲缘关系[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(8): 3444-3447.
Guo Y H, Yu D H, Huang G J, *et al.* Phylogenetic relationship of five species *Oreochromis tilapia*s on nuclear rDNA sequence[J]. *Journal of Anhui Agriculture Sciences*, 2009, 37(8): 3444-3447(in Chinese).
- [13] 龚理, 时伟, 杨敏, 等. 5种鳎科鱼类核糖体ITS1序列比较[J]. *水产学报*, 2017, 41(3): 321-329.
Gong L, Shi W, Yang M, *et al.* Comparative analysis of the first internal transcribed spacer of ribosomal DNA in five Soleidae species[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2017, 41(3): 321-329(in Chinese).
- [14] Chow S, Ueno Y, Toyokawa M, *et al.* Preliminary analysis of length and GC content variation in the ribosomal first internal transcribed spacer (ITS1) of marine animals[J]. *Marine Biotechnology*, 2009, 11(3): 301-306.
- [15] Redmond N E, McCormack G P. Ribosomal internal transcribed spacer regions are not suitable for intra- or inter-specific phylogeny reconstruction in haplosclerid sponges (Porifera: Demospongiae)[J]. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 2009, 89(6): 1251-1256.
- [16] Liu J, Yan H F, Newmaster S G, *et al.* The use of DNA barcoding as a tool for the conservation biogeography of subtropical forests in China[J]. *Diversity and Distributions*, 2015, 21(2): 188-199.
- [17] Jacq C, Miller J R, Brownlee G G. A pseudogene structure in 5S DNA of *Xenopus laevis*[J]. *Cell*, 1977, 12(1): 109-120.
- [18] Li Y, Jiao L, Yao Y J. Non-concerted ITS evolution in fungi, as revealed from the important medicinal fungus *Ophiocordyceps sinensis*[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2013, 68(2): 373-379.
- [19] Álvarez I, Wendel J F. Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2003, 29(3): 417-434.
- [20] Xu J P, Zhang Q Q, Xu X F, *et al.* Intra-genomic variability and pseudogenes of ribosomal DNA in stone flounder *Kareius bicoloratus*[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2009, 52(1): 157-166.
- [21] Gong L, Shi W, Yang M, *et al.* Long duplication of 18S ribosomal DNA in *Cynoglossus lineolatus* (Pleuronecti-

- formes: Cynoglossidae): novel molecular evidence for unequal crossing over model[J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2016, 35(12): 38-50.
- [22] Harpke D, Peterson A. 5.8S motifs for the identification of pseudogenetic ITS regions[J]. *Botany*, 2008, 86(3): 300-305.
- [23] Bailey C D, Carr T G, Harris S A, *et al.* Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2003, 29(3): 435-455.
- [24] Bayly M J, Udovicic F, Gibbs A K, *et al.* Ribosomal DNA pseudogenes are widespread in the eucalypt group (Myrtaceae): implications for phylogenetic analysis[J]. *Cladistics*, 2008, 24(2): 131-146.
- [25] Razafimandimbison S G, Kellogg E A, Bremer B. Recent origin and phylogenetic utility of divergent ITS putative pseudogenes: a case study from Naucleaeae (Rubiaceae)[J]. *Systematic Biology*, 2004, 53(2): 177-192.
- [26] Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, *et al.* Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. *Bioinformatics*, 2007, 23(21): 2947-2948.
- [27] Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods[J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10): 2731-2739.
- [28] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(11): 1451-1452.
- [29] Huelsenbeck J P, Ronquist F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees[J]. *Bioinformatics*, 2001, 17(8): 754-755.
- [30] 司李真, 时伟, 杨敏, 等. 硬骨鱼类核糖体基因间隔区的序列特征分析[J]. *热带海洋学报*, 2016, 35(6): 74-81.
- Si L Z, Shi W, Yang M, *et al.* Feature analysis of the internal transcribed spacers in teleost ribosomal DNA[J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2016, 35(6): 74-81 (in Chinese).
- [31] Tarallo A, Angelini C, Sanges R, *et al.* On the genome base composition of teleosts: the effect of environment and lifestyle[J]. *BMC Genomics*, 2016, 17: 173.
- [32] Knight A, Mindell D P. Substitution bias, weighting of DNA sequence evolution, and the phylogenetic position of Fea's viper[J]. *Systematic Biology*, 1993, 42(1): 18-31.

The analysis of ITS1 characteristics of 11 species from 5 families and its application in phylogenetic research

WU Baosheng^{1,2}, SI Lizhen^{1,2}, KONG Xiaoyu^{1*}, SHI Wei^{1*}, YANG Min^{1,2}

(1. Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Marine Biology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: In recent years, the study on ribosomal genes has always been a hot spot. However, only a few reports on ribosomal genes of fish were reported, especially about the ITS1 (internal transcribed spacer 1) pseudogene. In order to investigate the applicability of ITS1 as a molecular marker in species identification and the phylogenetic analysis in fishes, 11 species from five families, belonging to Perciformes, were selected as the representatives, including Latidae, Toxotidae, Rachycentridae, Xiphiidae and Carangidae. A total of 348 ITS1 sequences were obtained, and the length of these sequences ranged from 442 to 661 bp. Compared with the genetic characteristics, such as the length differences, number of variable sites, GC content, nucleotide diversity and haplotype diversity, the ITS1 sequences of 11 species showed obvious polymorphism within intra-species and inter-species. The unusual case was that a shorter sequence with 55 bp deletion was detected among the 71 clones of *Rachycentron canadum*. Based on the data of GC content, secondary structure and minimum free energy of the shorter sequence, this sequence was inferred as pseudogene. The neighbor joining tree was constructed based on ITS1 sequences of 11 species from five families with *Remora australis* and *Echeneis naucrates* as outgroup. The result showed that the ITS1 sequences of different individuals from each species gathered together, and the species from each genus also grouped to one clade. These indicated the ITS1 could be used as the molecular marker for phylogenetic analysis at the genus level. At the family level, the Carangidae was divided into two clades, which was similar to the result of phylogenetic analysis based on the mitochondrial marker, but both were contradictory with the classification based on morphological characteristics. To a certain extent, the ITS1 plays a role of molecular marker for phylogenetic analysis at the family level. These results provide useful scientific information for further studies on ITS1 in fishes and contribute to polymorphism analyses of ribosomal RNA genes in teleostean fishes.

Key words: Perciformes; Carangidae; ITS1 sequence polymorphism; phylogeny; pseudogene

Corresponding author: KONG Xiaoyu. E-mail: xykong@scsio.ac.cn;

SHI Wei. E-mail: shiwei@scsio.ac.cn

Funding projects: National Natural Science Foundation of China (31272273, 41276166)