

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2018.17442

## 11种鲈形目鱼类 ITS2 特征及系统应用

武宝生<sup>1,2,4</sup>, 司李真<sup>1,2</sup>, 孔晓瑜<sup>1</sup>, 时伟<sup>1</sup>, 龚理<sup>1,2</sup>, 杨敏<sup>1,2</sup>, 刘静<sup>3</sup>

1. 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广东 广州 510301;
2. 中国科学院大学, 北京 100049;
3. 中国科学院海洋研究所, 海洋生物分类与系统演化实验室, 山东 青岛 266071;
4. 广东省应用海洋生物学重点实验室, 广东 广州 510301

**摘要:** ITS2 (Internal transcribed spacer 2) 是位于核糖体 5.8S 和 28S 基因之间的非编码序列。为了探讨该片段的多样性特征以及进化模式, 本研究选取了鲈形目(Perciformes) 5 科 11 种鱼类为研究对象, 共获得了 444 条 ITS2 克隆序列, 其长度范围为 332~515 bp。比较种内不同序列的长度发现, 金带细鲈(*Selaroides leptolepis*) 在种内存在 24 bp 的差异, 剑鱼(*Xiphias gladius*) 在种内存在 32 bp 的差异, 这 2 种鱼类的差异较为明显; 其余 9 种鱼类的长度相对比较保守, 长度差异小于 14 bp。依据 11 种鱼类的保守位点数、变异位点数、简约信息位点数、单倍型数、保守位点比例、单倍型多样性指数、核苷酸多样性等特征分析发现, 种内存在着不同程度差异, 特别是金带细鲈的 ITS2 序列存在着 Type A、Type B 和 Type C 3 种类型, 各类型间差异较大。根据序列的多样性特征推断, 金带细鲈和剑鱼的进化方式为非协同进化; 蓝圆鲈(*Decapterus maruadsi*)、大甲鲈(*Megalaspis cordyla*)、吉打副叶鲈(*Alepes djedaba*) 和日本竹筴鱼(*Trachurus japonicus*) 的长度和变异位点均存在着一定程度的差异, 但差异并不明显, 视为不严格的协同进化; 泰拉鳍鲈(*Scomberoides tala*)、布氏鲳鲈(*Trachinotus blochii*)、尖吻鲈(*Lates calcarifer*)、射水鱼(*Toxotes chatareus*) 和军曹鱼(*Rachycentron canadum*) 5 种鱼类为协同进化; 另外, 协同和非协同进化状态与分类系统没有相关性。序列比对发现, 大甲鲈种内存在着由协同进化方式演变为非严格的协同进化方式的过度序列; 在金带细鲈的 3 个不同个体中, 序列间存在着从协同进化、非严格的协同进化演变为非协同进化的 3 种进化方式。基于 ITS2 序列构建的 11 种鱼类的邻接系统树显示, 每种鱼类的克隆都分别按种单独聚为一支, 鲈科 7 属鱼类各属也是单独聚支, 表明 ITS2 不仅可以用于种类的分子鉴定, 同时也可以作为分子标记应用于鲈科和属级水平的系统关系研究。

**关键词:** 多态性; 协同进化; 非协同进化; 系统关系; ITS2; 鲈形目

中图分类号: S917; Q96

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2018)06-1151-10

核糖体基因广泛地存在于真核生物基因组中, 包含核糖体 RNA 编码基因的 18S、5.8S 和 28S 以及 ITS1 和 ITS2 两个位于编码基因之间的内转录间隔区(internal transcribed spacer), 其中 ITS2 (Internal transcribed spacer 2) 位于 5.8S 和 28S 基因之间, 是一种非编码基因的间隔区。其作为分子标记, 较单拷贝基因和线粒体基因具有两方面明显的优势: 一方面, 单拷贝基因只能反映基因进

化的起始点和终点, 而 ITS2 作为多拷贝基因可以通过不同拷贝间的差异反映出基因在进化过程中可能发生的历史事件, 能够在不同的时间尺度上提供更为准确的分辨率, 构建更为准确的进化树<sup>[1]</sup>; 另一方面, 线粒体的基因只包含单亲的遗传特征, 不能为系统进化树提供足够多的双亲遗传信息<sup>[2]</sup>, 而 ITS2 具有双亲的遗传特征, 其构建的进化树较线粒体基因更能够全面地反映出物种间的真实系

收稿日期: 2017-12-15; 修订日期: 2018-04-08.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31272273).

作者简介: 武宝生(1991-), 男, 硕士, 从事鱼类分类及系统进化研究. E-mail: wubaosheng15@mails.ucas.ac.cn

通信作者: 孔晓瑜, 研究员, 从事鱼类分类及系统演化研究. E-mail: xykong@scsio.ac.cn

统关系。另外, ITS2 在进化的过程中相对于编码基因而言, 受到的选择压力小, 进化方向自由; 在属或种水平上具有进化速率快、信息量丰富和多态性高的优点, 所以在植物和动物的分类研究中被广泛应用<sup>[1, 3-8]</sup>。例如, 在 Yao 等<sup>[7]</sup>在动物(腔肠动物门、环节动物门等 11 分类大群)ITS2 的研究中, 使用了 12221 条 ITS2 序列分析了该基因在物种鉴定上的适用性, 分析发现, 在其研究的 25 科 28 属中, 在同一科下同属物种间的鉴定成功率为 73.3%~100%(平均为 91.7%), 在属级水平上的鉴定成功率为 99.7%, 并认为 ITS2 在动物物种鉴定中可以作为 COI 基因的补充。

迄今, 将 ITS2 作为分子标记运用于硬骨鱼类的研究较少, NCBI 数据库中仅有 1039 条(截止到 2017 年 9 月 1 日)硬骨鱼类 ITS2 的记录, 并且只有部分序列为全序列, 因此有关硬骨鱼类 ITS2 的研究有待进一步的开展。从以往有关硬骨鱼类的报道中可以看出, ITS2 作为分子标记在硬骨鱼类研究中取得了较好的效果<sup>[9-11]</sup>。例如, 袁万安<sup>[10]</sup>在鱼类种属的鉴定中, 借助于 ITS2 长度在种属间的差异, 仅仅通过电泳图谱就能将 5 属 5 种的胭脂鱼(*Myxocyprinus asicvticus*)、重口裂腹鱼(*Schizothorax davidi*)、岩原鲤(*Procypris rabaudi*)、华鲮(*Sinilabeo rendahli*)、四川白甲鱼(*Varicorhinus angustistomatus*)从 27 属 29 种鱼类中区分开; Kumar 等<sup>[11]</sup>在 5 种鲤形目鱼类[结鱼(*Tor tor*)、黄鳍结鱼(*Tor putitora*)、似龟结鱼(*Tor chelynooides*)、珠结鱼(*Tor progeneius*)、墨脱四须鲃(*Neolissochilus hexagonolepis*)]的研究中, 使用 ITS2 所得到的系统关系在属水平和物种水平都能成功地将这些鱼类区分开。

在核糖体基因的早期研究中, 其进化方式被认为严格遵循协同进化, 但是伴随着研究的深入, 发现当有大量核糖体基因多态性出现时, 其进化方式并非单纯的协同进化。对于某一个体或具体的物种而言, 其进化方式取决于同质化速率和突变速率, 当同质化速率大于突变速率时, 则表现为协同进化; 反之, 则表现为非协同进化<sup>[4, 12-13]</sup>。近年来有关硬骨鱼类核糖体基因的协同进化(concerted evolution)和非协同进化(non-concerted

evolution)研究<sup>[4, 6, 13-15]</sup>均有报道。例如, 龚理等<sup>[16]</sup>在其所研究的 11 种鲷科鱼类中, 有 7 种鱼类为协同进化, 塞内加尔鲷(*Solea senegalensis*)、缨鳞条鲷(*Zebrias crosssolepis*)、眼斑豹鲷(*Pardachirus pavoninus*)和卡氏大鼻鲷(*Dagetichthys cadenati*) 4 种鱼类为非协同进化; Gong 等<sup>[4]</sup>在桑给巴尔舌鲷(*Cynoglossus zanzibarensis*)的研究中发现, ITS2 有 Type A、Type B、Type C 3 种类型共同存在, 并且 Type C 为 Type A 和 Type B 的重组子, 这是一种典型的非协同进化, 这种进化方式反映了桑给巴尔舌鲷基因组内 ITS2 序列的高度多态性。对于协同进化, 通常会使得 ITS2 序列在物种内保持完全一致或接近一致<sup>[14-15]</sup>, 而在物种间或更高阶元上却有较大的差异, 因而借助于协同进化的特点, ITS2 被用于物种鉴定或低阶元上的系统演化推断<sup>[3]</sup>; 而非协同进化则在一定程度上能够反映基因组内序列的多态性程度, 但缺少有关非协同进化方式运用的报道。

为了探讨 ITS2 序列在鲈形目鱼类基因组内的多态性以及可能的进化方式, 本文选取了鲈形目 5 科 11 种鱼类为样本, 详细分析了这些鱼类 ITS2 序列的遗传特征, 初步推断了其可能的进化模式, 同时探讨了 ITS2 作为分子标记在这些鱼类的种类鉴定以及鲈科鱼类属级水平上系统关系研究的适用性。希望本研究结果能够丰富硬骨鱼类 ITS2 的研究并为今后系统关系应用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料、DNA 提取、PCR 扩增和测序

本研究选取了 5 科 11 种鱼类, 其样品种类、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 75%的酒精中保存待用。取约 30 mg 的肌肉组织, 切碎置于 1.5 mL 的离心管中, 加入 200  $\mu$ L 匀浆缓冲液和 20  $\mu$ 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 $-20^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。根据已有近缘物种<sup>[17]</sup>的核糖体基因片段序列, 设计 ITS2 扩增引物, 其正向引物 Z-5.8S-10 为: 5'-CAACTCTTAG-CGGTGGATCA-3', 反向引物 F-28S-100 为: 5'-

表 1 本研究中 5 科 11 种鱼类及 ITS2 片段的相关信息  
 Tab. 1 The relative information of 11 species in 5 families and ITS2 used in this study

分类阶元 taxonomic category	个体编号 individual number	克隆数/个 number	采集地点 collecting location
鲈科 Carangidae			
副叶鲈属 <i>Alepes</i>			
吉打副叶鲈 <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
圆鲈属 <i>Decapterus</i>			
蓝圆鲈 <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
大甲鲈属 <i>Megalaspis</i>			
大甲鲈 <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
似鲈属 <i>Scomberoides</i>			
泰拉鲈 <i>Scomberoides tala</i>	1	12	北海桥港鱼市 fish market, Beihai
细鲈属 <i>Selaroides</i>			
金带细鲈 <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
鲳鲈属 <i>Trachinotus</i>			
布氏鲳鲈 <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	广东湛江鱼市 fish market of Zhanjiang
	2	13	广东湛江鱼市 fish market of 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	浙江温岭 fish market of Wenling
	2	8	浙江温岭 fish market of Wenling

GCTCTTCCCTCTTCACTCG-3'。其中 5'端包括大约 150 bp 的 5.8S, 3'端包括大约 100 bp 的 28S。

PCR 反应总体积为 25  $\mu$ L, 包括 2.5  $\mu$ L 10 $\times$ 缓冲液, 2  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L), 2  $\mu$ L dNTP(分别为

2.5 mmol/L), 双向引物各 1  $\mu$ L (10  $\mu$ mol/L), 1 单位 rTaq 酶, 1  $\mu$ L 模板 DNA (50 ng/ $\mu$ L), 灭菌双蒸水补足至 25  $\mu$ L。使用 ABI-9700 型 PCR 仪进行扩增, 反应程序为: 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与 pMD 18-T 载体连接, 转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 每个个体的扩增片段分别挑选 10~60 个单克隆子进行测序, 选择峰图准确清晰的序列用于分析。

## 1.2 数据分析

将测定的 11 种鱼类的 ITS2 序列利用 BLAST 网站(<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>)进行检索, 判定是否为目的片段。然后, 用 ClustalX 2.1<sup>[18]</sup> 将各种鱼类的片段进行比对, 并切去 ITS2 5'端的 5.8S 和 3'端的 28S 序列, 获得完整的 ITS2 序列。将获得的比对序列利用 MEGA 7.0<sup>[19]</sup> 统计各种类的 ITS2 的 GC 含量、保守位点、变异位点、简约信息位点及保守位点比例。使用 DnaSP 5.10.1<sup>[20]</sup> 计算每种鱼类所有克隆序列的单倍型数量、核苷酸多样性及单倍型多样性指数。采用 MEGA 7.0 构建邻接树(neighbor joining tree, NJ), 和最大似然树(maximum likelihood tree, ML)。

## 2 结果与分析

### 2.1 ITS2 序列特征

本研究共获得 5 科 11 种鱼类的 444 条 ITS2 单克隆序列, 每种鱼类分别获得了 12~99 条序列。所有单克隆序列的长度为 332~515 bp, 长度存在着种内及种间的明显多态性(表 2, 图 1)。种内比较可以发现个体间的变化不同, 除了金带细鲈(24 bp)和剑鱼(32 bp)的明显长度差异外, 其余 9 种鱼类的种内长度差异小于 14 bp, 相对比较保守。在金带细鲈的 82 个克隆中, 331~363 bp 位点处存在着明显的差异, 将其划分为 Type A(13 条序列)、Type B(38 条序列)、Type C(31 条序列) 3 种类型(图 1)。在该区域 3 种类型存在不同长度的缺失, 分别为 0~6 bp、23 bp 以及 25 bp, 然而其他 10 种鱼类的序列并无明显的分型及缺失。种间比较显示, 11 种鱼类种间序列的长度差异也较为明显, 其变化范围在 0~183 bp 之间。例如, 日本竹筴鱼和军曹鱼, 蓝圆鲈与大甲鲈两两之间具有相似的长度, 只相差 4 bp; 射水鱼的最小长度(401 bp)与蓝圆鲈(402 bp)和大甲鲈(403 bp)的最小长度十分相似。其他 6 种鱼类的种间长度差异十分显著, 特别是鲈科的吉打副叶鲈和布氏鲳鲈两种鱼类的长度差异值为 183 bp, 在 11 种鱼种间最大, 明显高于其他鱼类种间的差值(表 2, 图 1)。

表 2 11 种鱼类 ITS2 克隆序列多态信息

Tab. 2 The polymorphism information of ITS2 clonal sequence from 11 species

种名 species	拉丁名 scientific name	GenBank 编号 GenBank accession	长度/bp length	GC 含量/% GC content	C/个	V/个	P <sub>i</sub> /个	H/个	P	$\pi$	H <sub>d</sub>
吉打副叶鲈	<i>Alepes djedaba</i>	MG681517~MG681615	332~341	62.4~63.8	285	56	15	62	0.836	0.00822	0.9736
蓝圆鲈	<i>Decapterus maruadsi</i>	MG681616~MG681637	402~414	65.7~66.5	388	25	3	18	0.940	0.00695	0.9697
大甲鲈	<i>Megalaspis cordyla</i>	MG681662~MG681703	403~417	72.5~73.6	389	30	7	33	0.929	0.00407	0.9744
泰拉鳍鲈	<i>Scomberoides tala</i>	MG681724~MG681735	365~369	73.2~74.0	359	10	0	10	0.973	0.00460	0.9545
金带细鲈	<i>Selaroides leptolepis</i>	MG681736~MG681817	361~388	69.0~72.0	307	80	16	59	0.793	0.00776	0.9669
布氏鲳鲈	<i>Trachinotus blochii</i>	MG681842~MG681864	514~515	73.0~74.1	489	26	2	16	0.950	0.00543	0.8893
日本竹筴鱼	<i>Trachurus japonicas</i>	MG681865~MG681936	395~403	65.7~68.2	332	72	13	52	0.822	0.01304	0.9785
尖吻鲈	<i>Lates calcarifer</i>	MG681638~MG681661	494~495	71.3~72.5	479	16	3	14	0.968	0.00412	0.9058
射水鱼	<i>Toxotes chatareus</i>	MG681818~MG681841	401~405	74.1~74.9	386	19	3	17	0.953	0.00507	0.9420
军曹鱼	<i>Rachycentron canadum</i>	MG681704~MG681723	395~399	72.7~74.0	380	19	2	15	0.952	0.00455	0.9526
剑鱼	<i>Xiphias gladius</i>	MG681937~MG681960	481~513	74.7~76.2	425	80	25	24	0.842	0.02175	1.0000

注: C 为保守位点数; V 为变异位点数; P<sub>i</sub> 为简约信息位点数; H 为单倍型数; P 为保守位点比例;  $\pi$  为核苷酸多样性; H<sub>d</sub> 为单倍型多样性指数。  
Note: C indicates number of conserved site; V indicates number of variable site; P<sub>i</sub> indicates number of parsimony informative site; H indicates number of haplotype; P indicates sequence conservation;  $\pi$  indicates nucleotide diversity; H<sub>d</sub> indicates haplotype diversity.

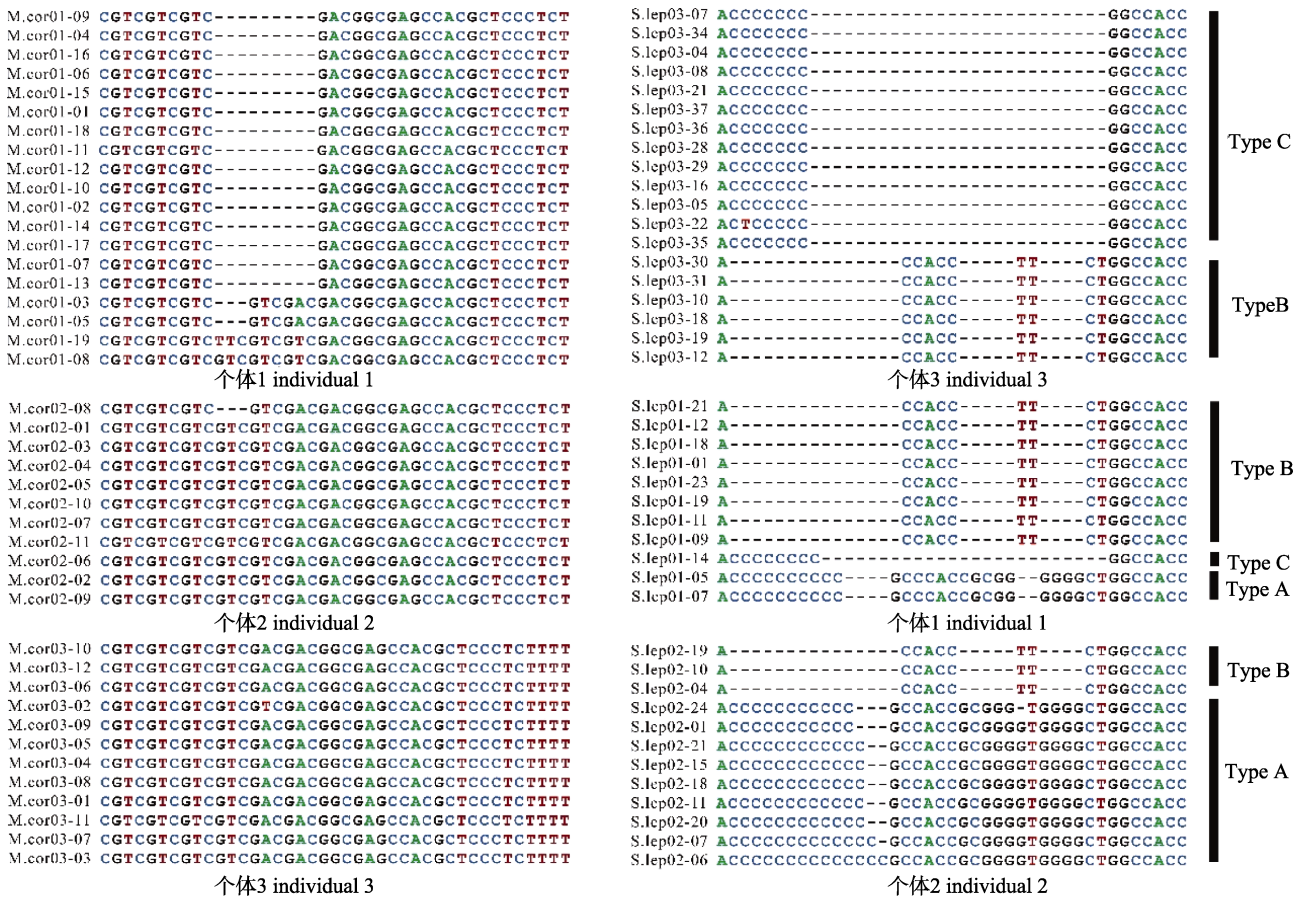


图 1 大甲鲈 370–410 bp 区域间和金带细鲈 330–370 区域间 ITS2 序列差异比对图

“M. cor”为大甲鲈种名的缩写, “S. lep”为金带细鲈种名的缩写, 字母后边的第一位数字代表个体编号, 第二个的数字代表克隆序号。

Fig. 1 Alignment of ITS2 sequence of 370–410 bp region of *Megalaspis cordyla* and 330–370 region of *Selaroides leptolepis* “M. cor” is the abbreviation of *Megalaspis cordyla*; “S. lep” is the abbreviation of *Selaroides leptolepis*; the first digit indicates individual’s number; the second was monoclone’s number.

为了探讨 11 种鱼类在序列上的差异以及各种内序列的多态性, 本研究对序列的遗传特征进行了详细的分析(表 2)。11 种鱼类的 GC 含量范围为 62.4%~76.2%, 其中金带细鲈的 GC 含量在种内变化最大, 约为 3%, 泰拉鳍鲈、射水鱼和蓝圆鲈 3 种鱼类的 GC 含量在种内的差值相似(均为 0.8%), 且为种内变化的最小值。所有鱼类的保守位点数(C)在 285~489 之间, 变异位点数(V)分布于 10~80 之间, 简约信息位点数为 0~25, 明显存在着简约信息位点数少于变异位点数的现象, 特别是鲈科的泰拉鳍鲈的简约信息位点数为 0, 这是 11 种鱼类中唯一一种不存在简约信息位点的鱼类。除了保守位点数和变异位点数以外, 保守位点比例(P)能反映该序列的平均变异程度, 金带细

鲈的该值最小(0.793), 泰拉鳍鲈最大(0.973)。由此可以看出, 在所研究的这些鱼类中泰拉鳍鲈的平均变异程度最低, 金带细鲈的平均变异程度最高。在核苷酸多样性( $\pi$ )的比较中发现, 除日本竹筴鱼(0.01304)外, 其余 10 种鱼类的该值均小于 0.01。单倍型多样性指数( $H_d$ )分析显示, 除布氏鲷鲈(0.8893)、尖吻鲈(0.9058)和射水鱼(0.9420)以外, 其他鱼类的  $H_d$  值均高于 0.95, 特别是剑鱼的  $H_d$  值为 1, 这说明剑鱼的 24 个克隆中不存在完全一样的两个单克隆序列, 由此可见, 序列多态性分布于剑鱼的所有克隆中, 而其他 10 种鱼类的序列多态性仅仅存在于相应物种的部分克隆中。

### 2.2 不同种类 ITS2 的进化方式及演化方式的转换

通过对 11 种序列的长度和序列多态性的比

较可以发现,除了金带细鲈和剑鱼存在明显的长度多态(27~32 bp)外,其他 9 种鱼类的长度差异分布于 0~14 bp 之间,并且蓝圆鲈(12 bp)和大甲鲈(14 bp)的长度变异主要是由于微卫星和多聚碱基的缺失引起的。序列的保守位点比例分析显示,7 种鱼类的保守位点比例都在 0.9 以上,其余 4 种鱼类,吉打副叶鲈(0.836)、日本竹筴鱼(0.822)、金带细鲈(0.793)和剑鱼(0.842)的保守位点比例均低于 0.9 以下。吉打副叶鲈和日本竹筴鱼的保守位点比例虽然较低,但这两种鱼类的长度却没有大的差异,分别是 9 bp 和 8 bp 的差异。因此,对吉打副叶鲈和日本竹筴鱼保守位点比例进行了进一步的分析,结果发现这两个种类的克隆数量都比较多,由于克隆数量的多少对保守位点比例有直接影响,因此,对于这两个种克隆数较多鱼类,为了和其他种类的克隆数有可比性,本研究以大甲鲈 33 个单倍型数量为参考,对这两个种进行了 33 个单倍型的统计,结果显示,吉打副叶鲈保守比例为 0.906,日本竹筴鱼为 0.868。综合上述序列长度和保守位点比例的特征比较结果,推断金带细鲈和剑鱼的进化方式为非协同进化,蓝圆鲈、大甲鲈、吉打副叶鲈和日本竹筴鱼的长度和变异位点均存在着一定程度的差异但并不是很明显,视为不严格的协同进化,其他 5 种鱼类的进化方式则为协同进化。

进一步的分析比较可以发现,除了特别保守的布氏鲳鲈和尖吻鲈外,不管是协同进化还是非协同进化的种类,都可以观察到碱基的增加或删除现象。例如,在大甲鲈 3 个个体的 382~384 bp 位点之中,个体 3 没有差异,个体 2 存在 3 bp 的差异,个体 1 则存在 3 和 9 bp 的差异。金带细鲈 3 个个体在 338~363 bp 位点之间,个体 2 分别存在 1 bp、2 bp、3 bp 和 24 bp 的差异,个体 1 分别存在着 6 bp、24 bp 和 25 bp 的差异,个体 3 则存在 24 bp 和 26 bp 的差异(图 1)。

### 2.3 系统发育分析

为了探讨 ITS2 作为分子标记在鱼类系统演化中的适用性,本研究以石斑鱼(*Epinephelus adscensionis*)作为外类群,构建了 5 科 11 种鱼类 444 条克隆序列的 NJ 和 ML 进化树(图 2),两种方法得出的系统发育树的拓扑结构一致,因此只以 NJ 为代表进行系统发育分析。系统分析结果发现,11 种鱼类的克隆序列都是分别以种类聚支,支持率均为 100。从系统树上主要可以看出,射水鱼、泰拉鲳鲈和剑鱼聚为一支,并与军曹鱼和布氏鲳鲈的聚支形成了一个大大支,尖吻鲈与金带细鲈形成的分支和上边 5 种鱼类形成的大支构成了姐妹关系。从形态分类的角度来看,鲈科 7 属的代表鱼类并非完全聚为一支,而是被其他 4 科鱼类分散开,并与其他非鲈科鱼类混合聚支。

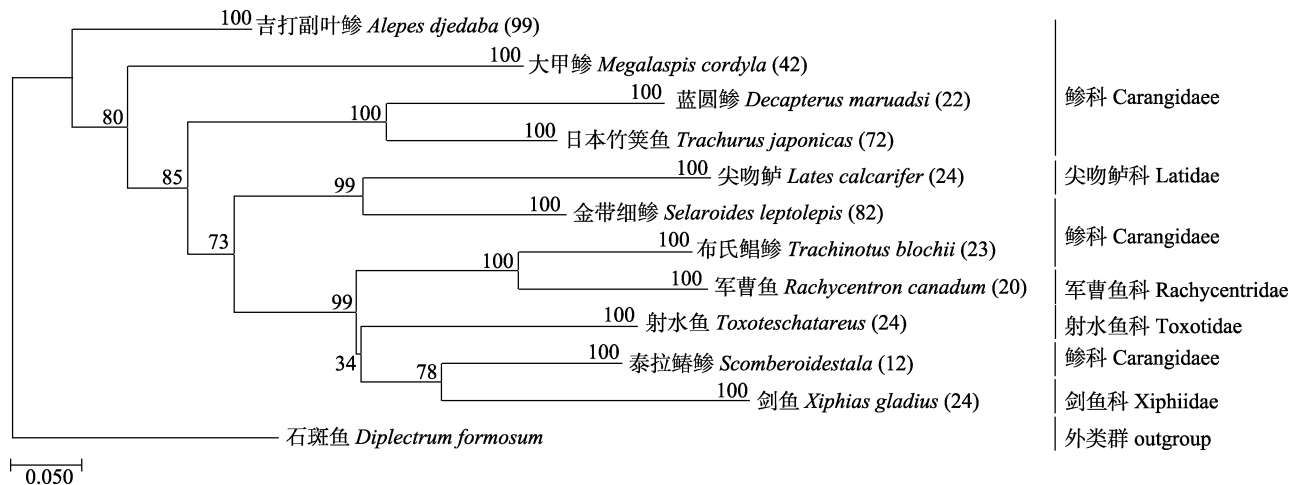


图 2 基于 ITS2 构建的 5 科 11 种鱼类的 NJ 系统树  
括号内数字代表克隆数。

Fig. 2 The NJ phylogenetic tree was reconstructed based on ITS2 sequences of 11 species from five families  
Numbers in the bracket indicate the amount of clones.



### 3 讨论

#### 3.1 5 科 11 种鱼类的 ITS2 与硬骨鱼类 ITS2 的特征比较

本研究中 5 科 11 种鱼类的 ITS2 长度范围为 332~515 bp, 与司李真等<sup>[21]</sup>对硬骨鱼类 ITS2 长度统计(128~630 bp)的结果相似。然而在种内的保守位点比例水平上, 本研究为 0.793~0.973, 其最低值与已有的硬骨鱼类的数据 0.975~1.000 之间差异较大。分析认为造成这种不一致结果的原因可能有 2 个, 一方面是司李真等的研究中具有种内保守位点比例分析的种类本身就是协同进化的类型, 因而相对变异较小, 如本研究中的 5 种具有协同进化状态的种类的保守位点比例变异也在比较高的水平上(0.950~0.973); 另一方面是已有的硬骨鱼类种内具有的单克隆数量太少(4~7 个), 而没有完全包含存在差异的克隆序列, 因而导致不能真实反映物种的该片段特征。正如在本研究中, 在非协同进化的种类中, 也存在着一些相同单倍型的克隆序列, 如金带细鲈的 82 条序列, 13 条克隆具有同一单倍型; 吉打副叶鲈的 99 条序列中, 12 条克隆序列具有同一单倍型。仅依据种内少量的克隆序列来计算物种内的序列保守位点比例, 尤其是当选择到单倍型差异较小的多个克隆时, 这种结果往往不可能反映出存在的真实差异, 会得出不够准确的结论, 因而由于 ITS2 的序列变异的特点, 在用于研究的过程中建议要多扩增克隆数量, 避免由于序列数量不足而造成的误差。

#### 3.2 ITS2 序列进化方式及相互之间的转换

本研究的 11 种鱼类中, 金带细鲈和剑鱼两种类的长度及序列位点变异均较大, 推断为非协同进化的状态; 尖吻鲈、布氏鲷鲈、射水鱼、泰拉鳍鲈和军曹鱼, 5 种鱼类的长度基本没有差异并且变异位点较少, 属于协同进化方式; 蓝圆鲈、大甲鲈、吉打副叶鲈和日本竹筴鱼都存在着较少的长度及多态位点的变异, 但这种变异并没有达到非协同的程度, 因此属于不严格的协同进化状态。最初, 在硬骨鱼类核糖体基因进化方式的研究中, 认为只存在协同进化, 但是随着研究的范围的扩大和深入, 发现硬骨鱼类的进化中既存在协同进

化又存在着非协同状态的现象。目前, 物种研究中关于这两种状态的特征及应用的研究已有报道<sup>[16]</sup>, 但对于这两种状态之间关系的研究则鲜有报道。在本研究中涉及的 5 科 11 种鱼类中, 种类的协同和非协同进化状态都有存在, 并且没有发现和种类分类系统的相关性。例如, 在本研究中, 鲈科的 7 种代表鱼类, 有 2 种鱼类为协同进化, 1 种鱼类为非协同进化, 其余 4 种鱼类为非严格的协同进化。同样的现象也可以在种内的个体中观察到, 如大甲鲈的序列中从部分序列的协同进化到不同序列间演变为非严格的协同进化关系, 以及在金带细鲈中, 不同序列间从协同进化方式、非严格的协同进化方式到非协同的进化关系都可以观察到。在某种程度上, 有些序列的差异没有达到从协同到非协同的改变(如大甲鲈序列), 但如果不同克隆的碱基变化不断积累, 造成了序列的长度和碱基差异, 最终导致了种内序列间由协同到非协同的转换(如金带细鲈序列)。

从金带细鲈的 3 个不同类型之间的关系看来, 非协同进化除了具有反映序列间的多态性外, 非协同进化与协同进化相比, 对多拷贝基因的演化历史可能具有推导作用。在金带细鲈长时间的进化过程中, 协同状态和非协同状态并不是独立存在, 每个个体中都同时存在着 2 种或 3 种序列类型(图 1)。Type A 中存在着 1 bp、2 bp、3 bp 和 6 bp 的差异, 且这些位点的差异是一种渐变的演化过程, 作者推断, 伴随着这种渐变过程的不断积累, 最终演变为 Type B 或 Type C。金带细鲈 ITS2 多拷贝基因之间的多态性差异在一定程度上反映了该基因组内的动态变化过程, 相对于只能反映进化中的终点和起点的线粒体基因而言, 这种动态过程显得更加有意义。这是首次通过非协同进化探讨 ITS2 序列在基因组内可能的演化历史, 正如 Wiemers 等<sup>[1]</sup>的观点一样, 与单拷贝基因分子标记相比, 单拷贝基因只能反映基因进化的起始点和终点, 而多拷贝基因分子标记可以通过不同拷贝间的差异反映出整个基因在进化过程中可能发生的历史事件, 能够在不同的时间尺度上提供更准确的分辨率, 构建更为准确的进化树, 本研究中借助于多拷贝基因间的差异, 推断出金带细

鲮 ITS2 序列间存在着从协同进化、非严格的协同进化和非协同进化 3 种进化方式可能的演变方式, 显示了种类序列的动态进化过程。

### 3.3 ITS2 在分类研究中的适用性

本研究中, 每个种类都获得了 12~99 条 ITS2 克隆序列, 从系统树的分析可以看出每个种类的克隆序列都是按种类聚支的, 说明 ITS2 在这些鱼类种内中具有很好的保守性。虽然在 11 种鱼类中金带细鲮和剑鱼变异较大, 但并没有出现在关于其他核基因片段研究中种类克隆分散聚支的现象, 例如, 龚理<sup>[16]</sup>在研究 11 种鲮科鱼类的 18S-ITS1-5.8S 片段时发现, 塞内加尔鲮和卡式大鼻鲮的 18S 出现了种内单克隆没有完全聚支的现象。本研究中的 444 条序列中, 与已有报道的鲮形目鱼类<sup>[16, 22]</sup>的核糖体片段相比较, 没有发现变异很大的序列, 从而也说明了这个基因在种内的相对保守性, 因此可以作为种类鉴定的分子标记。

武宝生等<sup>[23]</sup>在利用 ITS1 研究鲮科 7 属之间的系统关系时, 发现鲮科的不同属明显分为 2 支, 其中金带细鲮、日本竹筴鱼、蓝圆鲮, 大甲鲮、吉打副叶鲮聚为一支, 布氏鲮和泰拉鲮聚为一支; 本研究利用 ITS2 作为分子标记的系统研究中也同样发现了鲮科 7 属不聚支的结果, 与 ITS1 的研究结果一致, 但这与形态学上的分类关系不一致, 因此鲮科的分类问题还需进一步的研究。本文所探讨的鲮科 7 属鱼类各自都单独聚支, 在属级水平上的鉴定成功率高达 100%, 这表明 ITS2 不仅可以用于种类的分子鉴定, 同时也可以考虑作为分子标记运用于鲮科属级水平的区分。从本研究中的结果可以看出, ITS2 的片段是多拷贝序列, 存在有多态性, 由于该片段协同进化方式的存在, 相较其他的核糖体基因片段具有保守且序列长度短扩增方便等优势, 因而可将其作为分子标记用于种类的分类鉴定, 甚至用于低阶元的系统演化关系探讨都是一种很好的选择。

### 参考文献:

- [1] Wiemers M, Keller A, Wolf M. ITS2 secondary structure improves phylogeny estimation in a radiation of blue butterflies of the subgenus *Agrodiaetus* (Lepidoptera: Lycaenidae: *Polyommatus*) [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2009, 9: 300.
- [2] Chase M W, Salamin N, Wilkinson M, et al. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 2005, 360(1462): 1889-1895.
- [3] Yuan W A, Yang F. Research progress in identification of fish species and genera [J]. *Fisheries Science & Technology Information*, 2009, 36(5): 212-216. [袁万安, 杨凡. 鱼类种属鉴别的研究进展 [J]. *水产科技情报*, 2009, 36(5): 212-216.]
- [4] Gong L, Shi W, Yang M, et al. Non-concerted evolution in ribosomal ITS2 sequence in *Cynoglossus zanzibarensis* (Pleuronectiformes: Cynoglossidae) [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2016, 66: 181-187.
- [5] Zhou Y, Du X L, Zheng X, et al. ITS2 barcode for identifying the officinal rhubarb source plants from its adulterants [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2017, 70: 177-185.
- [6] Kovarik A, Pires J C, Leitch A R, et al. Rapid concerted evolution of nuclear ribosomal DNA in two *Tragopogon* allopolyploids of recent and recurrent origin [J]. *Genetics*, 2005, 169(2): 931-944.
- [7] Yao H, Song J, Liu C, et al. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals [J]. *PLoS ONE*, 2010, 5(10): e13102.
- [8] Quiroga M A, Monje L D, Arrabal J P, et al. New molecular data on subcutaneous *Philornis* (Diptera: Muscidae) from southern South America suggests the existence of a species complex [J]. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 2016, 87(4): 1383-1386.
- [9] Yuan W A. The evolution research on four species from siluriformes using nuclear gene ITS2 [J]. *Freshwater Fishery*, 2008, 38(5): 15-21. [袁万安. 通过核基因 ITS2 片段研究四种鲮形目鱼类进化 [J]. *淡水渔业*, 2008, 38(5): 15-21.]
- [10] Yuan W A. Identification of fish species based on ribosomal DNA ITS2 locus [J]. *Hereditas*, 2010, 32(4): 369-374. [袁万安. 核糖体转录间隔子 2 应用于鱼类种属的鉴别 [J]. *遗传*, 2010, 32(4): 369-374.]
- [11] Kumar R, Singh M, Kushwaha B, et al. Molecular characterization of major and minor rDNA repeats and genetic variability assessment in different species of mahseer found in North India [J]. *Gene*, 2013, 527(1): 248-258.
- [12] Zheng X, Cai D, Yao L, et al. Non-concerted ITS evolution, early origin and phylogenetic utility of ITS pseudogenes in *Pyrus* [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2008,



- 48(3): 892-903.
- [13] Xu B, Zeng X M, Gao X F, et al. ITS non-concerted evolution and rampant hybridization in the legume genus *Lespedeza* (Fabaceae)[J]. Scientific Reports, 2017, 7: 40057.
- [14] Liao D Q. Concerted evolution: Molecular mechanism and biological implications[J]. American Journal of Human Genetics, 1999, 64(1): 24-30.
- [15] Naidoo K, Steenkamp E T, Coetzee M P, et al. Concerted evolution in the ribosomal RNA cistron[J]. PLoS ONE, 2013, 8(3): e59355.
- [16] Gong L. Sequence analyses of the ribosomal RNA gene in Soleoidei and its application in phylogenetic inference[D]. Guangzhou: South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2016: 1-118. [龚理. 鲷亚目 (Soleoidei) 鱼类核糖体 RNA 基因序列特征分析及其在系统研究中的适用性[D]. 广州: 中国科学院南海海洋研究所, 2016: 1-118.]
- [17] Xu J, Zhang Q, Xu X, et al. Intragenomic variability and pseudogenes of ribosomal DNA in stone flounder *Kareius bicoloratus*[J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2009, 52(1): 157-166.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] Librado P, Rozas J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data[J]. Bioinformatics, 2009, 25(11): 1451-1452.
- [21] 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. [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.]
- [22] Gong L, Shi W, Yang M, et al. Non-concerted evolution in ribosomal ITS2 sequence in *Cynoglossus zanzibarensis* (Pleuronectiformes: Cynoglossidae)[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2016, 66: 181-187.
- [23] Wu B S, Si L Z, Kong X Y, et al. The analysis of ITS1 characteristics of 11 species from 5 families and its application in phylogenetic research[J]. Journal of Fisheries of China, 2018, 42(4): 465-475. [武宝生, 司李真, 孔晓瑜, 等. 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[J]. 水产学报, 2018, 42(4): 465-475.]

## Study on feature of ITS2 in 11 Perciformes species and the application on phylogenetic relationship

WU Baosheng<sup>1,2,4</sup>, SI Lizhen<sup>1,2</sup>, KONG Xiaoyu<sup>1</sup>, SHI Wei<sup>1</sup>, GONG Li<sup>1,2</sup>, YANG Min<sup>1,2</sup>, LIU Jing<sup>3</sup>

1. Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China;
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;
3. Laboratory of Marine Organism Taxonomy and Phylogeny, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China;
4. Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Marine Biology, Guangzhou 510301, China

**Abstract:** The nuclear ribosomal RNA (nrRNA) genes of eukaryotes are organized in clusters of tandem repeat units, including three genes (18S, 5.8S, and 28S) and two internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2). The ITS2 is located between the 5.8S and 28S genes. Because multiple copies of ITS2 have different intra- and inter-species evolution rates, ITS2 is often used as the molecular marker to identify species or to infer the phylogenetic relationship at the rank of species or genera. In this study, 11 species from five families of Perciformes were selected as the representatives to investigate the characteristics and the evolutionary pattern of the ITS2 in fishes. A total of 444 cloning sequences of ITS2 were obtained from 24 samples through PCR and cloning methods. The length of these sequences ranged between 332–515 bp. A comparison of sequences within species found that the length of *Selaroides leptolepis* (24 bp) and *Xiphias gladius* (32 bp) were extremely varied, and that of others, less than 14 bp, were relatively conservative. The evolutionary pattern of ITS2 of 11 species within species were conjectured based on the difference in several polymorphism characteristics, including the difference in length, conserved and variable sites, parsimony-informative site, the number of haploid type, proportion of conserved and variable sites, haploid type diversity index, nucleotide diversity and genetic diversity. The two out of 11 species (*S. leptolepis* and *X. gladius*) had obvious differences, especially the three different sequence types (Type A, Type B and Type C) detected in three individuals, suggesting a non-concerted evolution. Although, to a certain extent, length and variable sites were observed in four other species (*Decapterus maruadsi*, *Megalaspis cordyla*, *Alepes djedaba*, and *Trachurus japonicas*), those differences were not as obvious as those in *S. leptolepis* and *X. gladius*, therefore, the four species were not subjected to strict concerted evolution (no-strict concerted evolution). The five other species (*Scomberoides tala*, *Trachinotus blochii*, *Lates calcarifer*, *Toxotes chatareus*, and *Rachycentron canadum*) almost had no intraspecific variations, suggesting a concerted evolution process. Meanwhile, there was no correlation between the evolution pattern of 11 species and the taxonomic system. In addition, sequence comparison revealed that transitive sequences between concerted evolution and non-concerted evolution were observed in *M. cordyla*. In *S. leptolepis*, all three evolutionary patterns (concerted evolution, no-strict concerted evolution and non-concerted evolution) were detected in three individuals. Based on 444 cloning sequences of ITS2 from 11 species with *Epinephelus adscensionis* as the outgroup, two phylogenetic trees were constructed using the neighbor-joining and maximum likelihood methods. The results showed that both trees were largely congruent with each other. The topology showed that sequences from the same species clustered together and sequences from each genus of seven genera in Carangidae claded together. These results supported that the ITS2 is applicable as a molecular marker for species identification, but also useful for phylogenetic relation analysis at the rank of genus in Carangidae.

**Key words:** polymorphism; concerted evolution; non-concerted evolution; phylogenetic relationship; ITS2; Perciformes

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