

6种笛鲷属鱼类线粒体 16S rRNA 基因片段的序列比较

周发林, 江世贵, 苏天凤, 吕俊霖

(中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东广州 510300)

摘要:对笛鲷属(*Lutjanus*)的紫红笛鲷(*Lutjanus argentimaculatus*)、白星笛鲷(*Lutjanus stellatus*)、千年笛鲷(*Lutjanus sebae*)、勒氏笛鲷(*Lutjanus russellii*)、红鳍笛鲷(*Lutjanus erythropterus*)线粒体 DNA 16S rRNA 基因片段进行了 PCR 扩增和测序, 得到长度约 418 bp 的序列。结合 GenBank 中斜带笛鲷(*Lutjanus decussatus*)该区段的 16S rRNA 序列, 用 Clustal_X 排序软件进行 16S rRNA 序列的对位排列。通过 Mega 2.1 软件对所得线粒体 16S rRNA 片段序列进行比较, 共检测 53 个碱基存在变异, 其中包括 21 个简约信息位点, 并用“Pairwise distance”计算了各属间的相对遗传距离, 结果表明, 其序列差异(转换+颠换)在 0.027~0.083, 其中勒氏笛鲷与斜带笛鲷的序列差异最小, 红鳍笛鲷与勒氏笛鲷的序列差异最大。以高体四长棘鲷(*Argyrops spinifer*)为外类群, 采用 Mega 2.1 软件中的“Neighbor-Joining”法得到唯一 1 个分子系统树, 系统树各分支的置信度由“Bootstrap”1000 循环检验。结果表明, 6 种笛鲷鱼类聚成明显的 3 个分支, 第 1 个分支, 包括勒氏笛鲷、斜带笛鲷和白星笛鲷; 第 2 个分支, 包括紫红笛鲷; 第 3 个分支, 包括红鳍笛鲷和千年笛鲷。

关键词:笛鲷属; 线粒体 DNA; 16S rRNA; 序列比较

中图分类号:Q959.483 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2004)02-0099-05

分子系统学工作开始主要集中于 DNA 序列分析。DNA 序列分析主要是对 mtDNA 基因序列的分析, 由于线粒体 DNA 具有分子量小、结构简单、表现为母系遗传以及进化速度快等特点, 已成为研究动物起源进化及群体遗传多样性分析的理想研究对象^[1-4]。有关鱼类的 mtDNA 序列研究中已有较多报道^[5-7], 但在笛鲷属鱼类中研究较少。

笛鲷属(*Lutjanus*)隶属鲈形目(Perciformes)、笛鲷科(Lutjanidae), 在我国主要分布于南海^[8]。本研究通过测定笛鲷属 5 种常见种类——紫红笛鲷(*L. argentimaculatus*)、白星笛鲷(*L. stellatus*)、千年笛鲷(*L. sebae*)、勒氏笛鲷(*L. russellii*)、红鳍笛鲷(*L. erythropterus*)的 16S rRNA 基因部分序列, 以及结合 GenBank 中斜带笛鲷(*L. decussatus*)和外群高体四长棘鲷(*Argyrops spinifer*)的 16S rRNA 基因部分序列, 进行序列比较分析, 旨在笛鲷属鱼类从分子水平的系统进化研究及种群遗传多样性分析提供良好的开端。

1 材料与方法

收稿日期:2003-07-04; 修订日期:2003-11-21。

基金项目:广东科技兴海重大项目(A200099A01)。

作者简介:周发林(1975-), 男, 硕士, 从事海洋生物技术研究。

通讯作者:江世贵, E-mail:jiangsg@21cn.com

1.1 实验材料

紫红笛鲷、白星笛鲷、千年笛鲷、勒氏笛鲷及红鳍笛鲷通过 PCR 产物测序获得序列; 斜带笛鲷以及外群高体四长棘鲷的 mtDNA 16S rRNA 基因序列来自 GenBank。具体材料来源详见表 1。

表 1 研究动物材料或 DNA 序列数据来源

Table 1 Origins of fish samples and DNA sequence data

种名 Species	形态分类 Morphological taxonomy	材料采集地或序列来源 Origin of fishes or sequence
紫红笛鲷 <i>L. argentimaculatus</i>	笛鲷属 <i>Lutjanus</i>	深圳南澳 NanAao, Shenzhen
白星笛鲷 <i>L. stellatus</i>	笛鲷属 <i>Lutjanus</i>	深圳南澳 NanAao, Shenzhen
红鳍笛鲷 <i>L. erythropterus</i>	笛鲷属 <i>Lutjanus</i>	深圳南澳 NanAao, Shenzhen
千年笛鲷 <i>L. sebae</i>	笛鲷属 <i>Lutjanus</i>	广州黄沙水产品市场 Guangzhou
勒氏笛鲷 <i>L. russellii</i>	笛鲷属 <i>Lutjanus</i>	深圳盐田 Yantian, Shenzhen
斜带笛鲷 <i>L. decussatus</i>	笛鲷属 <i>Lutjanus</i>	GenBank (AF247445)
高体四长棘鲷 <i>A. spinifer</i>	四长棘鲷属 <i>Argyrops</i>	GenBank (AF247415)

1.2 实验方法

1.2.1 DNA的提取 每尾取约100 mg用75%乙醇浸泡的肌肉剪碎,使其乙醇完全挥发后,加入500 μ L TEN9 细胞裂解缓冲液(Tris HCl 50 mmol/L, pH 9.0; EDTA 100 mmol/L; NaCl 200 mmol/L),终浓度为2%的SDS和1 mg/mL的ProteinK,混匀后,56 $^{\circ}$ C消化过夜,分别用等体积的酚+氯仿+异戊醇混合液(体积比25:24:1)和氯仿抽提(除去蛋白质等杂质作用),直至无蛋白质中间相,再用2体积无水乙醇和1/10体积NaAc(3 mol/L, pH 9.5)沉淀,70%乙醇洗涤后,用无离子超纯水溶解,−20 $^{\circ}$ C存放。

1.2.2 引物设计 利用GenBank的Blast对斜带笛鲷的线粒体DNA 16S rRNA与鲈形目(Perciformes)其他科鱼的线粒体DNA 16S rRNA进行同源性比较及引物设计,设计的引物为:F: 5′-GGTAGGGCAATCACTTCTCT-3′和R: 5′-TAGCGGCTGGACCATTAGGA-3′。

1.2.3 线粒体DNA 16S rRNA基因片段的PCR扩增及序列测定 PCR扩增的反应总体积60 μ L,其中10 $\times$ Ex Taq Buffer (Takara) 6 μ L, Ex Taq polymerase (Takara 5 U/ μ L) 0.3 μ L, dNTP (Takara 2.5 mmol/L) 4 μ L, 10 pmol/ μ L引物2 μ L, 1 μ L模板DNA,补足灭菌双蒸水至60 μ L。扩增条件为:94 $^{\circ}$ C预变性2 min,之后进行35个循环(94 $^{\circ}$ C 45 s, 56 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s),最后72 $^{\circ}$ C延伸7 min。扩增产物经1.5%琼脂糖凝胶电泳,胶回收纯化。

纯化后的产物送至博亚公司测序,测序引物为F: 5′-CGTAGGGCAATCACTTCTCT-3′。

1.2.4 数据处理 使用Clustal X^[9] (Ver. 5.0)进行16S rRNA基因序列的对位排列,并经人工核查。在此基础上,用MEGA2.1^[10]计算这6种笛鲷属鱼类16S rRNA基因片段的碱基组成以及它们的相对遗传距离。本研究采用Mega 2.1中的“Neighbor-Joining”软件对所得DNA一级序列数据构建分子系统树,系统树各分支的置信度由“Bootstrap”^[11] 1000循环检验,以高体四长棘鲷为外群。

2 实验结果与讨论

2.1 5种笛鲷属鱼类线粒体DNA 16S rRNA的PCR结果

5个样品都扩增出1条420 bp左右的片段,而同样条件下的空白对照在对应的位置未观察到有带,见图1。说明本研究利用动物线粒体DNA同源

性,所设计的引物能在笛鲷属中扩增出线粒体16S rRNA基因片段,此引物应该有一定的通用性。

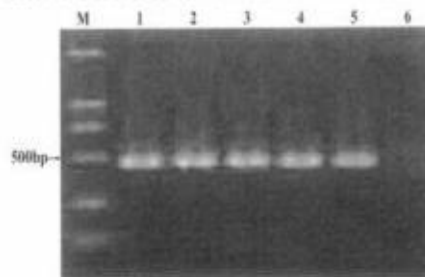


图1 16S rRNA基因片段PCR扩增结果

Fig. 1 PCR amplification result of mtDNA 16S rRNA gene

1~6分别为紫红笛鲷、红鳍笛鲷、白星笛鲷、千年笛鲷、勒氏笛鲷、空白

M: DL2000; 1: *L. argentimaculatus*; 2: *L. erythropterus*; 3: *L. stellatus*; 4: *L. sebae*; 5: *L. russellii*; 6: Blank

2.2 6种笛鲷属鱼类线粒体DNA 16S rRNA基因片段序列碱基组成

经过Clustal程序对测定5个笛鲷属鱼类的序列并已提交GenBank(紫红笛鲷,序列号AY292659;白星笛鲷,序列号AY292662;红鳍笛鲷,序列号AY292660;千年笛鲷,序列号AY292658;勒氏笛鲷,序列号AY292661),与GenBank下载的斜带笛鲷序列(序列号AF247445)进行同源性比较。采用Mega2.1中的统计软件计算它们的长度及碱基组成见表2,它们平均碱基组成为:T:19%; C:27.9%; A:30.5%; G:22.7%。

表2 6种笛鲷线粒体16S rRNA片段碱基组成及长度

Table 2 Nucleotide percentage composition and length of 16S rRNA of six *Lujanus* fishes

物种 Species	碱基/% Nucleotide				Total/bp
	T	C	A	G	
紫红笛鲷 <i>L. argentimaculatus</i>	19.3	27.7	29.8	23.2	419
白星笛鲷 <i>L. stellatus</i>	18.4	27.8	31.3	22.5	418
红鳍笛鲷 <i>L. erythropterus</i>	18.8	28.1	30.0	23.1	415
千年笛鲷 <i>L. sebae</i>	19.1	28.2	29.9	22.7	418
勒氏笛鲷 <i>L. russellii</i>	19.1	27.7	31.0	22.2	419
斜带笛鲷 <i>L. decussatus</i>	19.1	27.8	30.6	22.5	418

2.3 6种笛鲷属鱼类线粒体DNA 16S rRNA基因片段序列

6种笛鲷属鱼类线粒体DNA 16S rRNA基因部分同源序列经过MEGA2.1软件输出见图2。

#L. argenteimaculatus	AATGGCATAA CGAGGGCTTA ACTGTCTCCT CTTTCAAGTC AATGAAATG ATCTCCCGT GCAGAAGCGG GGATAAGCAC
#L. stellatus	 G..... T.....
#L. erythropterus	 G..... CC.C
#L. sebae	 G..... CCTC
#L. russellii	 G..... A...C..... C...
#L. decussatus	 G..... C..... C.T.
#L. argenteimaculatus	ATAAGACGAG AAGACCCAT GGAGCTTTAG ACACCAAGC AGACCATGT AMGACTCC TAAACAGGG ATTAACCAA
#L. stellatus	 G..... A..... A..... CC.....
#L. erythropterus	 G..... A..... T..... CCG...G
#L. sebae	 A..... GA..... G.T.A..... CCG...G
#L. russellii	 T..... A..... A.A.CC.....
#L. decussatus	 A..... A..... CC.....
#L. argenteimaculatus	ATGATCCCTG CCTAATGTC TTGGTTGGG GCGACCGGG GGAACACAA AACCCACG TGGACGAGG GCACCCCTC
#L. stellatus	...C..... A.A...T...
#L. erythropterus	...A..... C..... T...A.....
#L. sebae	...G..... T.C..... T..... A.....
#L. russellii	...T..... T..... A.A...T...
#L. decussatus	...T..... A.A...T...
#L. argenteimaculatus	TCACAGCAA GAGCTCCGC TCTAGTAAAC AGAAATCTG ACCATCTAGA TCGGCA-AA GCCGATCAC GGACCGAGTT
#L. stellatus	...A..... ATA..... G
#L. erythropterus	...AT..... T..... AC..... CA..... G.....
#L. sebae	...A..... A..... C..... AT.....
#L. russellii	...A..... ATC..... C.....
#L. decussatus	...A..... C.G..... ATC..... T.....
#L. argenteimaculatus	ACCCTAGGGA TAACAGGCA ATCCCTTT AGAGGCCATA TEGACAAGGG GGTTCAGAC CTCGATGTTG GATCAGGACA
#L. stellatus	 A..... A.....
#L. erythropterus	 T..... A..... A.....
#L. sebae	 A.....
#L. russellii	
#L. decussatus	
#L. argenteimaculatus	TCCTAATGAT CCAGCCGCTA
#L. stellatus	
#L. erythropterus	
#L. sebae	
#L. russellii	
#L. decussatus	 G.....

图2 6种笛鲷鱼类16S rRNA 基因部分序列(“.”表示核苷酸序列与紫红笛鲷相同;“-”代表核苷酸/插入/缺失)

Fig. 2 Partial sequence of 16S rRNA of six *Lutjanus* fishes (dots denote nucleotides identical to the sequence from *L. argenteimaculatus*; dashes represent insertions/deletions of the nucleotide)

从图2可知,这6个序列共有53个碱基存在变异,其中包括21个简约信息位点。有2/3之多的碱基变异为转换(A↔G和T↔C),其中A↔G和T↔C之间的转换数差不多;颠换(A↔T,G↔C,T↔G和A↔C)还不到1/3,其中以A↔C颠换为主,另外还有5个缺失或插入位点。

2.4 6种笛鲷的相对遗传距离

利用MEGA2.1软件中的双参数法,以转换加颠换,转换比颠换分别计算6种笛鲷的相对遗传距离,见表3。

从表3可知,这6种笛鲷属鱼之间的序列差异(转换+颠换)在0.027~0.082,其中勒氏笛鲷与斜带笛鲷的序列差异最小只有0.027,勒氏笛鲷与红鳍笛鲷的序列差异最大为0.082。它们的转换比颠换值在9.415~1.421,白星笛鲷与斜带笛鲷转换比颠换值最小只有1.421。

2.5 6种笛鲷进化树的建立 用MEGA软件中的“Neighbor-Joining”构建的分子进化树,结果见图3。

表3 相对遗传距离(对角线以下是转换加颠换,对角线以上是转换比颠换)

Table 3 Pairwise distance matrix (below diagonal, transition + transversion ratios; above diagonal, transition/transversion)

物种 Species	1	2	3	4	5	6	7
紫红笛鲷 <i>L. argentimaculatus</i>		5.188	2.351	3.504	2.896	2.413	0.950
白星笛鲷 <i>L. stellatus</i>	0.045		2.211	2.375	2.298	1.421	0.994
红鳍笛鲷 <i>L. erythropterus</i>	0.066	0.071		9.415	2.706	2.099	1.053
千年笛鲷 <i>L. sebae</i>	0.066	0.058	0.050		2.687	2.214	1.146
勒氏笛鲷 <i>L. russellii</i>	0.048	0.032	0.082	0.063		3.065	1.002
斜带笛鲷 <i>L. decussatus</i>	0.050	0.029	0.077	0.063	0.027		0.853
高体四长棘鲷 <i>A. spinifer</i>	0.114	0.111	0.132	0.125	0.122	0.108	

注:1~7 分别为紫红笛鲷、白星笛鲷、红鳍笛鲷、千年笛鲷、勒氏笛鲷、斜带笛鲷、高体四长棘鲷

Note: 1, *L. argentimaculatus* 2, *L. stellatus* 3, *L. erythropterus* 4, *L. sebae* 5, *L. russellii* 6, *L. decussatus* 7, *A. spinifer*

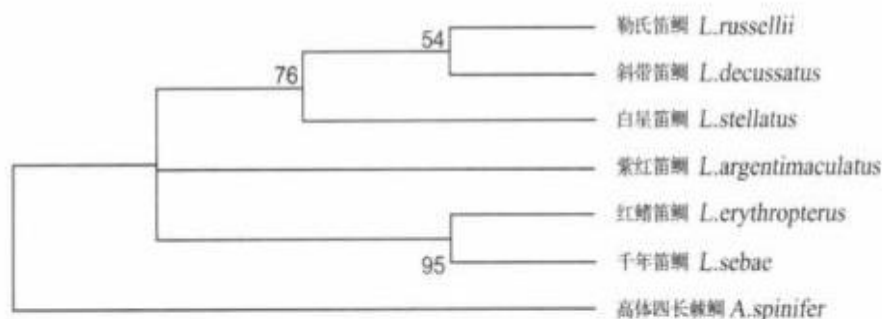


图3 NJ法构建笛鲷属鱼类的分子进化树

Fig. 3 Molecular phylogenetic tree of *Lutjanus* fishes constructed by NJ method of MEGA

注:数字表示 Bootstrap 1 000 个循环的置信度

Note: The numbers show the confident values of Bootstrap 1 000

从图3可知,6种笛鲷鱼类聚成3个明显的分支,第1个分支,包括勒氏笛鲷、斜带笛鲷和白星笛鲷;第2个分支,包括紫红笛鲷;第3个分支,包括红鳍笛鲷和千年笛鲷。这说明,勒氏笛鲷、斜带笛鲷和白星笛鲷的相对其他3种笛鲷,它们亲缘关系较近。同样,红鳍笛鲷与千年笛鲷相对其他4种笛鲷,它们的亲缘关系最近。

线粒体DNA的16S rRNA基因是线粒体基因组中研究较多的基因,适合于分子系统学及种群遗传分析研究,这方面的工作报道很多^[7,12-14],但有关笛鲷类报道很少。本研究通过用实验者自行设计的引物对其16S rRNA进行PCR扩增并对扩增的序列进行比较研究表明,设计的这对引物在笛鲷鱼类中具有普遍的适应性,所扩增的序列除了白星笛鲷与斜带笛鲷转换比颠换值小于2外(如果比值小于2时则此基因序列的突变已经达到饱和状态,受进化噪音的影响可能性较大,构建系统进化树时可能会受影响^[15]),其余的比值都在2以上且序列差异也

不大。所以,本研究所得的16S rRNA序列应当适合笛鲷鱼类的分子进化和遗传多样性分析。本研究通过对6种笛鲷鱼类的16S rRNA基因部分序列的比较研究,以其为整个笛鲷属鱼类分子水平的系统发生和进化研究以及遗传多样性研究提供依据。

参考文献:

- [1] Kitaura J, Yamamoto G, Nishida M. Genetic variation in populations of the diamond-shaped squid *Thysanoteuthis rhombus* as examined by mitochondrial DNA sequence analysis[J]. *Fisheries Science*, 1998, 64(4):538-542.
- [2] Mulvey M, Liu H P, Kandl K. Application of molecular genetic markers to conservation of freshwater bivalves[J]. *J Shell Res*, 1998, 17(5):1395-1405.
- [3] Palumbi S R, Benzie J. Large mitochondrial DNA differences between morphologically similar penaeid shrimp[J]. *Mol Mar Biol Biotech*, 1991, 1(1):27-34.
- [4] Wilbur A, Orbach E A, Wakefield J R, et al. Mitochondrial genotype variation in a siberian population of the Japanese scallop, *Patinopecten yessoensis* (Jay)[J]. *J Shell Res*, 1997, 16

- (2);541-545.
- [5] Brown W M. Evolution of animal mitochondrial DNAs[A]. Evolution of genes and proteins[M]. New York: Sinauer Association Inc Press, 1983. 62-88.
- [6] 吕国庆, 李思发. 鱼类线粒体 DNA 动态研究和应用发展[J]. 中国水产科学, 1998, 5(3): 94-103.
- [7] Dbermiller L E, Fleiler E. Phylogenetic relationships of elopomorph fishes inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences[J]. Mol Phylogenet Evol, 2003, 26(2): 202-214.
- [8] 成泰庆, 郑葆珊. 中国鱼类系统检索[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [9] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal_X windows interface: flexible strategies ed for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools[J]. Evolution, 1985, 39: 783-791.
- [10] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA: Molecular evolutionary genetics analysis [CP/DK]. Ver. 11. 02. University Park, the Pennsylvania State University, 1994.
- [11] Felsenstein J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap[J]. Evolution, 1985, 39: 783-791.
- [12] Sullivan J P, Lavoue D, Hopkins C C. Molecular systematics of the African electric fishes (*Mormyroidea teleostei*) and a model for the evolution of their electric organs[J]. J Exp Biol, 2000, 4: 665-683.
- [13] Farias I P, Orti G. Mitochondrial DNA phylogeny of the family cichlidae: Monophyly and fast molecular evolution of the neotropical assemblage[J]. J Mol Evol, 1999, 48: 703-711.
- [14] 高天翔, 李健, 王清印, 等. 中国对虾线粒体 16S rRNA 基因序列分析[J]. 中国水产科学, 2003, 10(5): 359-364.
- [15] Vidal N, Lecointre G. Weighting and congruence: a case study based on three mitochondrial genes in pitvipers [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 1998, 9(3): 366-374.

Comparative study of mtDNA 16S rRNA gene fragments among six *Lutjanus* fishes

ZHOU Fa-lin, JIANG Shi-gui, SU Tian-feng, LU Jun-lin

(South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

Abstract: The *Lutjanus* fishes found in China are mainly distributed in the south China Sea, and the common species are *Lutjanus argentimaculatus*, *Lutjanus stellatus*, *Lutjanus sebae*, *Lutjanus russellii* and *Lutjanus erythropterus*. The purpose of this study is to initiate a phylogenic research and biodiversity analysis of this five populations in South China Sea on molecular level. The samples were all collected from the sea area near Shenzhen, Guangdong Province. The 16S rRNA gene fragments of mtDNA of the five species were amplified with the designed primers which were F: 5'-GGTAGGGCAATCACTTCTCT-3' and R: 5'-TAGCGCTGGACCATTAGGA-3'. And the 16S rRNA gene fragments of *L. decussatus* and *A. spinifer* were both got from the GeneBank. A 16S rRNA fragment was sequenced at about 420 bp for each species. The five sequences were compiled with *L. decussatus* sequence using Clustal_X. Then using Mega 2.1 software to compare the 16S rRNA gene fragments with each other, 53 sites were variable among all the partial mitochondrial 16S rRNA sequences, in which there were 21 phylogenetically informative sites. The Pairwise distances were calculated by MAGE 2.1. The results indicated that the differentiation of the six sequences ranged from 0.027 to 0.082; the differentiation of *L. russellii*'s and *L. decussatus*'s sequences is the least (0.027); the differentiation of *L. russellii*'s and *L. erythropterus*'s sequences is the biggest (0.082). The *Argyrops spinifer* was designated as out-group. Only one molecular phylogenetic tree was obtained using Neighore-Joining of Mega 2.1. The bootstrap analyses (1 000 replications) were performed to test the confidence of nodes. According to the results, the six *Lutjanus* fishes were recorded to three clades: *L. russellii* + *L. decussatus* + *L. stellatus* clade, *L. argentimaculatus* clade, and *L. erythropterus* + *L. sebae* clade.

Key words: *Lutjanus*; mt DNA; 16S rRNA; sequence comparison

Corresponding author: JIANG Shi-gui. E-mail: jiangsg@21.cn.com

* This study is supported by Marine Science and Technology Programme of Guangdong Province (No. A200099A01).