

紫红笛鲷线粒体全序列与笛鲷属鱼类分化年代的贝叶斯分析

廖杰, 王中铎, 郭昱嵩, 刘楚吾

(广东海洋大学 水产学院 南海水产经济动物增养殖广东普通高校重点实验室, 广东 湛江 524025)

摘要: 利用常规 PCR 未纯化产物直接测序的方法, 获得紫红笛鲷(*Lutjanus argentimaculatus*)全长为 16 543 bp 线粒体 DNA 全序列, GenBank 登录号为 JN182927。结合 GenBank 中的已有数据比较分析表明: 紫红笛鲷与笛鲷属(*Lutjanus*)线粒体基因组基本一致, 符合脊椎动物的特征, 各基因间进化速率差异显著; 13 个蛋白编码基因拼接序列贝叶斯建树的后验率显著高于单基因或全序列, 更适用于笛鲷属的贝叶斯法系统分化分析和年代推断; 13 个蛋白编码基因及其拼接序列进行的系统进化分析均支持紫红笛鲷与勒氏笛鲷(*Lutjanus russellii*)及海鸡母笛鲷(*Lutjanus rivulatus*)亲缘关系较近; 基于 13 个蛋白编码基因拼接序列的贝叶斯松散分子钟推算出笛鲷属鱼类两个主要支系大约在 61.5Ma 前古新世的达宁阶与蒙蒂阶交界时期发生分化。

关键词: 紫红笛鲷(*Lutjanus argentimaculatus*); 线粒体全序列; 贝叶斯分析; 松散分子钟; 笛鲷属鱼类
中图分类号: Q349 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)01-0062-08

紫红笛鲷(*Lutjanus argentimaculatus*)隶属硬骨鱼纲(Osteichthyes), 鲈形目(Perciformes), 笛鲷科(Lutjanidae), 笛鲷属(*Lutjanus*)。主要分布于印度洋和太平洋中部及西部, 包括中国的南海和东海南部, 是一种优质的食用鱼类。有关紫红笛鲷的研究很多, 涉及人工养殖、种群遗传多样性以及它在笛鲷属中的关系等多个方面。邢玉娜等^[1]、区又君等^[2]分别研究了紫红笛鲷育苗和幼鱼养殖密度与摄食关系; 张俊彬等^[3]研究了中国南海部分地区紫红笛鲷养殖和野生群体的遗传多样性。Russell 等^[4]综述了澳大利亚紫红笛鲷生态特征、群体遗传结构以及养殖技术, 并记录紫红笛鲷存在独特的生活史: 幼鱼和早期成鱼都可以生活在淡水溪流中。Guo 等^[5]基于线粒体基因(*COX 2* 和 *Cyt b*)的系统进化表明紫红笛鲷与红鳍笛鲷(*Lutjanus erythropterus*)关系密切; 王中铎等^[6]综合利用 3 个线粒体基因(*COX 1*、*COX 2* 和 *Cyt b*)和 2 个核基因(*RAG 1* 和 *RAG 2*)构建了笛鲷属鱼类的系统进化树, 揭示出紫红笛鲷在进化上最早与大体型、红体色、近岸底栖的红鳍笛鲷和千年笛鲷(*Lutjanus sebae*)一支分化, 独立于其他笛鲷属鱼类, 自成一支。

近年来发展起来的贝叶斯模型参数可直接进行量化, 并以后验概率来表示各分支的可信度而不需用自引导法(Bootstrap)进行检验, 而且在计算速度和可靠性上明显优于其他算法, 十分利于线粒

体全序列等较大数据集的分析^[7-8]。另外, 贝叶斯松散分子钟利用化石标定点计算分化时间, 推测出实验对象出现或发生年代已经引起鱼类进化研究者的广泛重视^[9-11]。随着测序技术的进步使线粒体全序列的获得变得越来越容易, 用线粒体全序列作为遗传进化分析的材料, 将会获得更加全面的信息进而得到更合理的结论, 这一技术在鱼类进化研究中的应用越来越广泛^[12-14]。一直以来对笛鲷属鱼类的分类学地位和形态分类学标准都存在争议^[6,11,13]。Guo 等^[5-6]利用线粒体基因(*COX 2* 和 *Cyt b*)和核基因重建了笛鲷属的系统进化历程, 并且先后获取了多种笛鲷属鱼类的线粒体 DNA(mtDNA)全序列。

本研究通过测定紫红笛鲷全序列进而确定该物种在笛鲷属的分类地位, 并通过贝叶斯分析推断笛鲷属各支系的分化年代同时分析比较线粒体全序列及其各编码区段贝叶斯建树的优劣性, 为揭示鱼类演化研究积累基础资料。

收稿日期: 2011-12-30; 修回日期: 2012-04-06

基金项目: 国家自然科学基金项目(31101904, 31201996); 广东省自然科学基金项目(10452408801004224)

作者简介: 廖杰(1986-), 男, 湖南湘潭人, 硕士, 主要从事海洋生物研究工作, 电话: 13809887920, E-mail: liaojie05102@163.com; 王中铎, 通信作者, 电话: 13659795480, E-mail: aduofa@gmail.com

1 材料与amp;方法

1.1 实验材料和总 DNA 的提取

紫红笛鲷 0.8 kg, 性腺发育未成熟, 购自湛江市霞山区水产品交易市场。采用形态与 DNA 条码结合的方法鉴定实验对象^[14], 参照卢圣栋等^[15]的方法从肌肉或鳍条中提取样本 DNA, 4℃保存备用。

1.2 LA-PCR 纯化线粒体 DNA

引物参考王中锋等^[10](表 1), 均由上海 Sangon 生物技术公司合成。采用长距 PCR(LA-PCR)引物 LA1 和 LA2 扩增得到覆盖整个线粒体 DNA 序列的大片段, PCR 反应体系为: 总体积 25 μL, 含 1×PCR LA Buffer, dNTPs 15 nmol, 引物各 20 pmol, LA TaqDNA 聚合酶(TaKaRa) 2.5U, 总 DNA 约 20 ng。扩增条件: 94℃预变性 1 min; 98℃变性 10 s, 68℃退火 16 min, 循环 30 次; 最后 72℃延伸 10 min。1%的琼脂糖电泳对扩增产物进行检测。

1.3 常规 PCR 扩增获取线粒体 DNA 片段

以稀释 20 倍的 LA-PCR 产物为模板, 使用表 1 所列常规 PCR 引物扩增获取长度 600~1 000 bp 左右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, rTaqDNA 聚合酶(TaKaRa) 2.5 U, DNA 约 20 ng。PCR 反应的循环参数为: 94℃预变性 3 min, 94℃变性 42 s, 50~55℃退火 30 s, 72℃延伸 55 s, 共 30 个循环, 最终 72℃延伸 10 min, 用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物, 凝胶成像仪拍照。PCR 扩增产物委托广州华大基因公司进行序列双向测定。

1.4 全序列拼接与分析

用 Invitrogen 软件包的 ContigExpress 进行序列拼接, 利用 Editseq 程序(<http://www.dnastar.com/>)查找序列进行开放阅读框, 获得序列互补链以及统计各密码子所占比例; 利用 MEGA 4.0 软件完成蛋白编码序列的翻译和氨基酸编码情况的调查^[16]; 在线查找 tRNA (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>)^[17]; 用 Sequin 软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Sequin/index.html>)递交序列至 GenBank。从 GenBank 下载的其余 7 种笛鲷的线粒体全序列(6 种为本研究室测定)。分别利用 *ATPase6*、*Cyt b*、*COX 1*、*COX 2*、*ND 1*、*ND 2*、*ND 4*、*ND 5* 等基因以及 D-loop 区进行遗传距离分析。

1.5 基于线粒体全序列和编码基因及其拼接序列的贝叶斯分析

参考 Drummond 等^[18]的方法利用 Beast 1.6.1 软件包(<http://beast.bio.ed.ac.uk/>)构建贝叶斯树, 并利用贝叶斯松散分子钟(uncorrected relaxed lognormal clock)推断分化年代^[19]。软件运行设置如下: (GTR+G+I+relaxed, MCMC=1000000, burn in=1000) 利用 FigTree v1.3.1(<http://tree.bio.ed.ac.uk/>)生成树图。所选的外群物种为斑马鱼(*Danio rerio*)和青鳉(*Oryzias latipes*), 化石标定点则为鲇科(Tetraodontidae)鱼类红鳍东方豚(*Takifugu rubripes*)和凹鼻鲀(*Tetraodon nigroviridis*), 它们的分化上下限为 56.0~32.25 Ma^[20]。

1.6 不同基因贝叶斯后验概率分析

分别建立全序列、13 个蛋白编码基因及其拼接序列的贝叶斯分析树, 以笛鲷主分支, 紫红笛鲷所在支以及所有分支平均贝叶斯后验概率最为判断各基因和拼接序列贝叶斯建树的优劣性。

2 实验结果

2.1 片段扩增、序列拼接及分析

LA-PCR 获得的长距产物(图 1)为模板进行常规 PCR(图 2), 扩增产物直接测序后拼接获得 16 543 bp 的紫红笛鲷线粒体全序列。序列中(A、T、C、G)4 种碱基分别占 28.25%, 24.68%, 30.95%, 16.12%, A+T>G+C。用 Sequin 上传至 Gene Bank, 登录号为 JN182927。紫红笛鲷 mtDNA 基因组包括 13 个蛋白编码基因, 22 个 tRNA 基因, 2 个 rRNA 基因和 1 个控制区。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, 其余基因皆由重链(H-strand)编码。

2.2 与已有笛鲷线粒体全序列的比较分析

分析得到紫红笛鲷与 7 种笛鲷的 *ATPase6*、*Cyt b*、*COX 1*、*COX 2*、*ND 1*、*ND 2*、*ND 4*、*ND 5*、*D-loop* 和线粒体全序列的遗传距离(表 2)。从表中可见, 单基因的物种间遗传距离平均值为线粒体全序列间的 1.4~1.9 倍。基于基因片段所得的 K2P 遗传距离平均值比较可以看出: 紫红笛鲷与马拉巴笛鲷(*Lutjanus malabarius*)、红鳍笛鲷和千年笛鲷的距离较远(0.239), 而与其他笛鲷相对较近(0.195); 其中在

表 1 线粒体 DNA 基因组序列测定引物
Tab. 1 PCR primers for mtDNA complete genome

上游引物 (5'-3')		下游引物(5'-3')
长距扩增引物:		
LA1	L2508-16s	H1065-12S
CTCGCAAACATAAGCCTCGCCTGTTTACCAAAAAAC		GGCATAGTGGGGTATCTAATCCCAGTTTGT
LA2	L12321-Leu	S-LA-16SH
GGTCTTAGGAACCAAAAACTCTTGGTGCAA		TGCACCATTRGGATGTCCTGATCCAACATC
扩增和测序引物:		
1	12SL ACAAAGCATAGCACTGAAGATG	12SH TTTGCATGGATGTCTTCTCG
2	L1085-12S CAAACTAGGATTAGATACCC	H1478-12S GAGAGTGACGGGCGATGTGT
3	L1340-12S ACGTCAGGTCGAGGTGTAGC	H1999-16S CAACCAGCTATAACTAGGCTCGGT
4	L1854-16S AAACCTCGTACCTTTTGCAT	H2933-16S GGATTGCGCTGTTATCCC
5	L2510-16S CGCCTGTTACCAAAAACAT	H3084-16S AGATAGAACTGACCTGGAT
6	L3074-16S CCTACGTGATCTGAGTTCAG	H3718-ND1 ACTTCGTATGAAATWGTTTG
7	L3483-ND1 GAYGGTGTAAAATTSTTTATTAARGAA	H3976-ND1 ATGTTGGCGTATTCKGCKAGGAA
8	L3737-ND1 CAAACWATTCSTATGAAGT	H4432-Met TTTAACCGWCATGTTCCGGGGTATG
9	L4166-ND1 CGATATGATCAACTMATKCA	H4866-ND2 AAKGGKCKAGTTTTTGTCA
10	L4633-ND2 CACCACCCWCGAGCAGTTGA	H5334-ND2M CGKAGRTAGAAGTAKAGGCT
11	L5260-ND2 CTGGSTTTATGCCMAARTG	H5934-CO1 GGGTGCCAATGTCTTTGTGGTT
12	L5644-Ala GCAAMTCAGACACTTTAATTA	H6371-CO1 TTGATTGCCCKAGGATWGA
13	L6199-CO1 GCCTCCWCGAATAAATAA	H6855-CO1 AGTCAGCTGAAKACTTTTAC
14	L6730-CO1 TATATAGGAATRGTMGTAGC	H7480-Ser ATGTGGYTTGGCTTGAAA
15	L7255-CO1 GATGCCTACACMCTGTGAAA	H8168-CO2 CCGCAGATTTTCWGAGCATTG
16	L7863-CO2 ATAGACGAAATTAATGACCC	H8589-ATP AAGCTTAKGTTCATGGTCAGT
17	8343-LysAGCGTTGGCCTTTTAAGCTAAWGATWGGTG	H9076-ATP GGGCGGATAAAKAGGCTAAT
18	Lut-ATP-Lb CTAGGACTGCTTCCCTACAC	H9639-CO3 CTGTGGTGAGCYCAKGT
19	L9514-CO3 TTCTGAGCCTTCTAYCA	H10035-Gly CTTTCCTTGGGKTTTAACCAAG
20	L9916-CO3 CACCATTTTGGCTTTGAAGC	H10433-Arg AACCACAATTTTTGAGCCGAAAT
21	L10267-ND3 TTTGAYCTAGAAAATYGC	H10970-ND4 GATTATWAGKGGGAGWAGTCA
22	L10681-ND4M GCKTTTTCKGCKTGTGAAGC	H11618-ND4 TGGCTGACKGAKGAGTAGGC
23	L11424-ND4	H12293-Leu
TGACTTCCWAAAGCCCATGTAGA		TTGCACCAAGAGTTTTTGGTTCCTAAGACC
24	L11895-ND4 CCTAACCTWATGGGRGAACT	H12632-ND5 GATCAGGTTACGTAKAGKGC
25	L12321-Leu	H13069-ND5
GGTCTTAGGAACCAAAAACTCTTGGTGCAA		GTGCTGGAGTGKAGTAGGGC
26	L12936-ND5 AACTCMTGGGAGATTCAACAA	H13727-ND5 GCGATKATGCTTCCTCAGGC
27	L13553-ND5 AACACMTCTTAYCTWAACGC	H14080-ND5 AGGTAKGTTTTGATTAKKCC
28	L13940-ND5	H15149 CYB
TTCTTTCCKACTATTATWCACCG		GGTGGCKCCTCAGAAGGACATTTGKCTCA
29	L14504-ND6 GCCAAWGTCTGCWGAATAMGCAAA	H15560-CYB TAGGCRAATAGGAARTATCA
30	L14734-Glu AACACCGTTGTTATTCAACT	H15915-Thr ACCTCCGATCTYCGGATTACAAGAC
31	L15369-CYBACAGGMTCAAAAACCCC	H16498-CR CCTGAAGTAGGAACCAGATG
32	L15777-CYBTGAATTGGCGGCATACCWGTA	H690-12S GCGGAGGCTTGCATGTGTA

注: 兼并位点按照 IUB 标准: R 代表 A 或 G, Y 代表 C 或 T, K 代表 G 或 T, M 代表 A 或 C, S 代表 G 或 C, W 代表 A 或 T

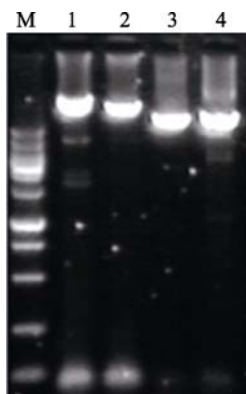


图 1 LA-PCR 电泳检测图

Fig. 1 Electrophoresis of LA-PCR

M. 6000 bp 标准分子量 DNA Marker; 1,2. LA1; 3,4. LA2
M. 6000 bp DNA standard molecular weight Marker; 1,2. LA1; 3,4. LA2

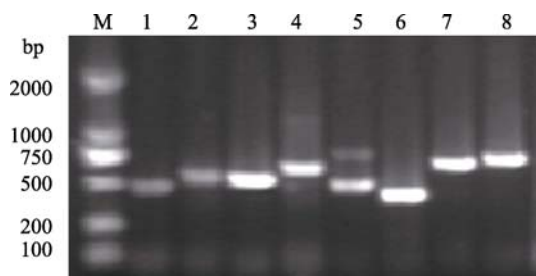


图 2 部分常规 PCR 电泳检测图

Fig. 2 Electrophoresis of common PCR

M. 2000 bp 标准分子量 Marker; 1-8. 常规 PCR 检测
M. 2000 bp Standard molecular weight Marker; 1-8. product of PCR

ATPase6 间的遗传距离比较中紫红笛鲷与其他 4 种

笛鲷的遗传距离值比其他基因片段的大, 而线粒体全序列间遗传距离比较的结果与 12 个基因片段的相似, 均为马拉巴笛鲷、红鳍笛鲷和千年笛鲷的遗传距离较远。所有基因中海鸡母笛鲷(*L. rivulatus*)的距离都最小, 它相对其他笛鲷与紫红笛鲷的关系更为密切。

2.3 基于贝叶斯松散分子钟的笛鲷分化年代推断分析

分别建立 8 种笛鲷线粒体全序列、线粒体各个编码基因以及线粒体 *COX 1* 基因的贝叶斯分析树, 得到多个贝叶斯推断图(图 3~图 5)。3 图中标定化石鲷科(Tetraodontidae)种都落在化石记录范围的中心。基于线粒体全序列的推断结果显示笛鲷属的分化年代处于 40.86Ma, 而基于 13 个蛋白编码基因拼接序列的分析则显示分化发生在 61.49Ma, 两者推断的主分支年代差异很大。图 3 中各个小分支发生都位于 32.7~8.2Ma 这个相对较短的时间, 而图 4 中各小分支的出现年代跨度则小得多(57.8~48.7Ma)。两个系统进化树中 8 种笛鲷都可以明确的划分成两个支系。进化树和遗传距离各自的比较结果相吻合。遗传距离较远的红鳍笛鲷, 马拉巴笛鲷和千年笛鲷聚为一支, 紫红笛鲷所在一支的另五种笛鲷聚为另一支。

在 3 个图中紫红笛鲷所处的位置存在差异, 基于线粒体全序列的贝叶斯进化树笛鲷分支不够细致, 而另外两个图中各个小支明显分开。图 3 和图 5 中紫红笛鲷和海鸡母笛鲷(*Lutjanus rivulatus*)关系较紧

表 2 K2P 紫红笛鲷与 7 种笛鲷各基因区段遗传距离比较

Tab. 2 K2P Genetic distances between *Lutjanus argentimaculatus* and other snappers

区段名称	马拉巴笛鲷	四带笛鲷 (<i>L. kasmira</i>)	海鸡母笛鲷	红鳍笛鲷	千年笛鲷	勒氏笛鲷 (<i>L. russellii</i>)	孟加拉笛鲷 (<i>L. bengalensis</i>)
<i>ND 1</i>	0.141	0.182	0.006	0.036	0.604	0.040	0.148
<i>COX 1</i>	0.148	0.108	0.102	0.145	0.148	0.124	0.123
<i>COX 2</i>	0.128	0.085	0.065	0.128	0.120	0.075	0.087
<i>ND 2</i>	0.139	0.105	0.102	0.138	0.162	0.104	0.104
<i>ND 5</i>	0.189	0.158	0.138	0.190	0.197	0.153	0.162
<i>Cyt b</i>	0.175	0.144	0.114	0.175	0.174	0.146	0.150
<i>D-loop</i>	0.238	0.180	0.201	0.241	0.230	0.173	0.168
<i>ND 3</i>	0.048	0.041	0.031	0.049	0.045	0.031	0.039
<i>ND 4</i>	0.228	0.167	0.165	0.230	0.251	0.197	0.197
<i>ND 6</i>	0.299	0.200	0.172	0.295	0.230	0.173	0.209
<i>ATPase6</i>	1.133	0.874	0.697	1.138	1.126	0.616	0.796
<i>COX 3</i>	0.107	0.090	0.073	0.107	0.131	0.087	0.101
平均	0.248	0.195	0.156	0.239	0.285	0.160	0.190
全序列	0.151	0.113	0.105	0.166	0.153	0.114	0.119
平均/全序列	1.641	1.721	1.481	1.442	1.862	1.403	1.599

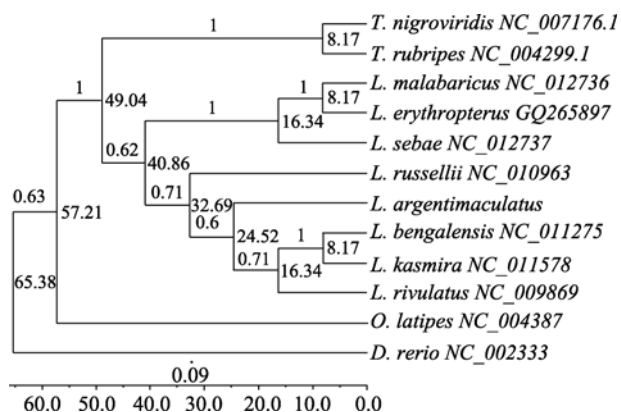


图 3 笛鲷线粒体全序列贝叶斯树图

Fig. 3 Bayesian evolutionary tree of Mitochondrial complete sequence
分支内侧为分化年代, 分支外侧为后验率
The branch's inside is differentiation years, the outer side is posterior rate

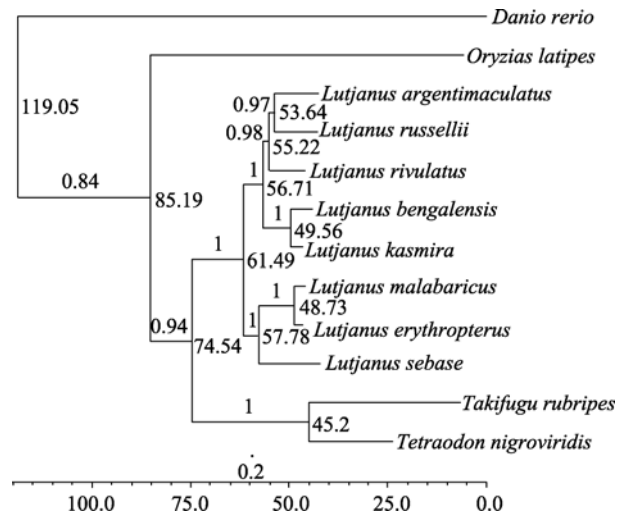


图 4 线粒体蛋白编码序列基因贝叶斯树

Fig. 4 Bayesian evolutionary tree of Mitochondrial protein coding gene
分支内侧为分化年代, 分支外侧为后验率
The branch's inside is differentiation years, the outer side is posterior rate

密, 图 4 中紫红笛鲷和勒氏笛鲷(*Lutjanus russellii*)先聚为一支再和海鸡母笛鲷并列。

线粒体 DNA 全序列、13 个基因拼接序列以及单独的基因序列建立贝叶斯分析树, 笛鲷主分支、紫红笛鲷分支以及平均后验概率统计如表 3 所示。基于 mtDNA 蛋白编码基因拼接序列的贝叶斯分析, 无论是各支还是总后验概率上都是最高点, 而基于线粒体全序列贝叶斯分析树的各支后验概率都很低。不同 mtDNA 蛋白编码基因得出的后验概率差别很大, *COX 1*、*ND2*、*ATPase6* 总后验概率最高, *ND 3*、*ND*

4、*ND 4L*、*COX 3* 中等, *ND 1*、*ND 5*、*ND 6*、*COX 2*、*Cyt b*、*ATPase8* 较差, *COX 1*、*ND 2*、*ATPase6* 3 个基因的拼接序列后验概率也相对较高。紫红笛鲷所在支的后验概率在 0.9 以上的有 *ND 2*、*ND 3*、*ND 4L* 树图均显示紫红笛鲷和勒氏笛鲷聚为一小支, 这和 13 个 mtDNA 蛋白编码基因拼接序列聚类一致。

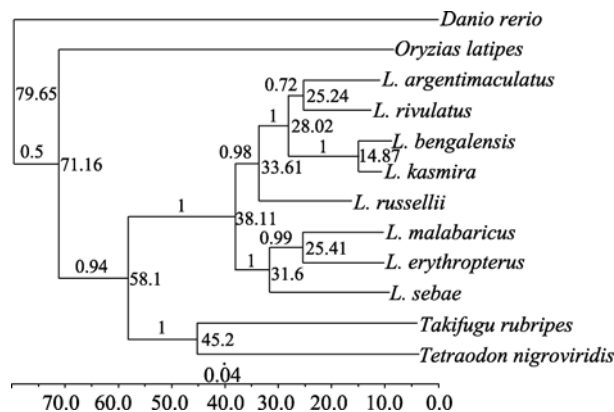


图 5 笛鲷属鱼类 *COX 1* 基因全序列贝叶斯树

Fig. 5 Bayesian evolutionary tree of *COX 1* complete sequences of snappers
分支内侧为分化年代, 分支外侧为后验率
The branch's inside is differentiation years, the outer side is posterior rate

表 3 线粒体 DNA 部分区段贝叶斯后验概率
Tab. 3 Bayesian posterior probability of mtDNA partial genes region

mtDNA 序列	碱基数目(bp)	紫红所在支后验率	平均后验概率	整体评价
线粒体蛋白编码序列	11434	0.97	0.97	很好
<i>ATPase6</i> + <i>COX 1</i> + <i>ND2</i>	3296	0.86	0.92	好
<i>COX 1</i>	1566	0.72	0.91	好
<i>ND 2</i>	1046	0.97	0.91	好
<i>ATPase6</i>	684	0.74	0.9	好
<i>ND 3</i>	349	0.9	0.87	中
<i>COX 3</i>	779	0.48	0.86	中
全序列	16543	0.6	0.83	中
<i>ND 4</i>	1379	0.73	0.82	中
<i>ND 4L</i>	297	0.91	0.82	中
<i>ND 5</i>	1839	1	0.81	中
<i>COX 2</i>	693	0.86	0.77	差
<i>ND 1</i>	975	0.43	0.75	差
<i>Cyt b</i>	1137	0.45	0.74	差
<i>ND 6</i>	522	0.76	0.63	差
<i>ATPase8</i>	168	0.78	0.59	差

3 分析与讨论

本研究基于获取的紫红笛鲷 mtDNA 全序列和已存在的笛鲷 mtDNA 全序列,探讨了适用于贝叶斯系统进化分析的最佳序列,明确了紫红笛鲷与其他 7 种笛鲷的进化关系,并推断了笛鲷两大支系的分化年代。

3.1 线粒体 DNA 全序列的高效获取与分析

相比以直接提取获得的总 DNA 为模板,运用长距 PCR 的方法获得紫红笛鲷线粒体 DNA 长距片段,保证了总 DNA 很少量时模板量足够使用,同时提高了模板质量,采用常规 PCR 产物直接送测,测序结果分析简便,整个周期短^[10,12]。此方法可方便、快速获得高质量的线粒体全序列。之前对笛鲷鱼类研究一般常用 MEGA 进行建树分析^[6,24],这种方式只能获得物种间的进化关系,不能获得分化年代方面的结果。本研究尝试运用 BEAST 软件对笛鲷全序列、mtDNA 编码区基因、mtDNA 编码区基因拼接数据集进行了贝叶斯分析,并采用松散分子钟模型推断分歧的发生时间^[21],与 MrBayes 相比^[22],BEAST 操作直观,而且配有 Figtree 程序,数据分析参数可进行及时调整,生成的进化树和进化年代可进行方便地编辑和标记。

3.2 基于贝叶斯法的最佳 mtDNA 区段选择

对进化关系研究时线粒体基因组 DNA 及其 13 个编码基因的适用性,以往研究者已经进行了一系列基于 NJ 等传统方法的分析。Zardoya 等^[23]比较了不同基因区分脊椎动物门下的各纲的能力,认为 *COX 1*、*Cyt b*、*ND 2*、*ND 4*、*ND 5* 都非常适合纲之间进化研究;陈姝君等^[24]比较了硬骨鱼类目间不同基因的适应性,认为 *COX 1*、*COX 3*、*ND 4*、*ND 5* 最为出色;郭昱嵩^[25]则认为 *COX 2*、*ND 6* 最为适合鲈形目各属间进化分析。王中铎^[6]对笛鲷属的研究揭示出 *Cyt b*、*COX 1*、*COX 2* 是最适合系统进化分析的单基因,13 个蛋白编码基因拼接得到组合片段建立的 NJ 树的置信度比单个基因有显著提高,但低于线粒体全序列。可见,基于分类阶元不同,区段的适用性存在差异。

本研究运用贝叶斯法分析了笛鲷属系统发生,平均后验概率的高低次序为:13 个蛋白编码基因拼接序列(0.97) > *COX 1* + *ND 2* + *ATPase6*(0.92) > *COX*

1、*ND 2*、*ATPase6*、*ND 3* 和 *COX 3*(0.91~0.86) > 全序列(0.83) > 余下 8 个单基因(0.82~0.59)。这与王中铎等 NJ 法进行系统进化分析时的最佳线粒体区段存在差异,同时他的研究的结果表明全序列会优于任一编码区。全序列的贝叶斯后验率明显低于 13 个蛋白编码基因拼接序列,甚至低于 *COX 1*、*ND 2*、*ATPase6* 等基因,以 13 个蛋白编码基因拼接序列进行贝叶斯法年代推断比全序列更可信。

3.3 笛鲷属分化年代的贝叶斯法推断

本研究通过紫红笛鲷和各种笛鲷遗传距离比较分析及贝叶斯进化树分析表明,虽然紫红笛鲷在形态上属于大型笛鲷种,但是其生活史表现出特殊性^[4]。表 2 中 K2P 遗传距离统计显示紫红笛鲷和另外 3 种大型笛鲷(马拉巴笛鲷、千年笛鲷、红鳍笛鲷)遗传距离较远,而与勒氏笛鲷、海鸡母笛鲷较近。贝叶斯树图更直观地表明这种关系。

Bruno 等^[26]研究发现贝叶斯法推断系统发育往往会高估节点的后验概率,认为只有后验概率大于 95% 的节点才是可信的。基于全序列和不同基因的分析中各支的后验概率都未达到这一标准,基于 13 个蛋白编码基因拼接的贝叶斯分析中各个节点的后验率均大于 95%,支持紫红笛鲷与勒氏笛鲷聚类。基于 mtDNA 的 13 个编码区拼接序列,贝叶斯松散分子钟推测笛鲷属两大类群的分化年代距今约在 61.5Ma 年左右,根据世界地质年代代表记录这一时期处于古新世期间(65~53 Ma)的达宁阶与蒙蒂阶交界时期。

参考文献:

- [1] 邢玉娜,尹绍武,陈国华,等. 紫红笛鲷 *Lutjanus argentimaculatus*(Forsska)繁殖和池塘育苗研究[J]. 现代渔业信息, 2005, 8: 25-27.
- [2] 区又君,勾效伟,廖锐,等. 紫红笛鲷幼鱼对集群密度和投饵定额的摄食反应[J]. 动物学杂志, 2008, 43(3): 34-38.
- [3] 张俊彬,黄良民,陈真然. 紫红笛鲷遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 海洋学报. 2005, 3, 27(2): 165-171.
- [4] Russell D J, McDougall A J, Fletcher A S, et al. Biology, management and genetic stock structure of mangrove jack (*Lutjanus argentimaculatus*) in Australia[J]. FRDC, 2003, 18(9): 1456-1563.
- [5] Guo Y S, Wang Z D, Liu C W, et al. Sequencing and

- analysis of the complete mitochondrial DNA of Russell's snapper (*L. russellii*) [J]. *Natural Science*, 2008, 18: 1233-1238.
- [6] 王中铎, 谭围, 郭昱嵩, 等. 笛鲷属线粒体基因组编码序列的系统进化分析能力评估[J]. *水产学报*, 2010, 34(6): 656-663.
- [7] 张艳春. 大口鲈 *Psettodes erumei* 线粒体全序列的研究和鲷形目鱼类系统进化分析[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009.
- [8] 郑楠, 张原, 敖滨, 等. 贝叶斯推论重建乳头瘤病毒的进化系统[J]. *病毒学报*, 2002, 19(4): 293-300.
- [9] 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: 224-236.
- [10] 王中铎, 郭昱嵩, 刘楚吾, 等. 军曹鱼线粒体 DNA 全序列与鲷鱼宗系的系统进化[J]. *水生物学报*, 2011, 35(2): 1-9.
- [11] 李志强, 郭宝成, 李俊兵, 等. 贝叶斯联合模型与中国洞穴鱼类分化时间的估算[J]. *科学通报*, 2008, 53(13): 1560-1569.
- [12] 谭围, 王中铎, 郭昱嵩, 等. 孟加拉笛鲷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): 287-291.
- [13] 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.
- [14] 王中铎, 郭昱嵩, 刘楚吾, 等. 笛鲷属鱼类 DNA 分子条码、系统进化和成种机制[J]. *中国科学*, 2010, 6: 516-521.
- [15] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999: 6.
- [16] Kumar S, Nei M, Dudley J, et al. MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences[J]. *Brief Bioinform*, 2008, 9(4): 299-306.
- [17] Lowe T M, Eddy S R. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(5): 955-964.
- [18] Drummond A J, Rambaut A. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees[J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2007, 7: 214.
- [19] Drummond A J, Ho S Y, Phillips M J, et al. Relaxed phylogenetics and dating with confidence[J]. *PLoS Biology*, 2006, 214(7):699-710.
- [20] Benton M J, Donoghue P C J. Paleontological evidence to date the tree of life [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2007, 24: 26-53.
- [21] Leache A D, Reeder T W. Molecular systematics of the Eastern Fence Lizard (*Sceloporus undulatus*): a comparison of parsimony, likelihood, and bayesian approaches[J]. *Systematic Biology*, 2002, 51: 44-68.
- [22] Ronquist F, Huelsenbeck J P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models[J]. *Bioinformatics*, 2003, 19: 1572-1574.
- [23] Zardoya R, Meyer A. Phylogenetic performance of mitochondrial protein-coding genes in resolving genes in resolving relationships among vertebrates[J]. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 2000, 17(3): 437-455.
- [24] 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.
- [25] 郭昱嵩, 王中铎, 焦阳, 等. 鲷形目线粒体 DNA 蛋白编码基因的适应性分析[J]. *自然科学进展*, 2008, 18(9): 7355-7358.
- [26] Bruno W J. Weighted neighbor joining, a likelihood-based approach to distancebased phylogeny reconstruction[J]. *Mol Biol*, 2000, 17(4): 189-197.

Complete mitochondria sequence of *Lutjanus argentimaculatus* and Bayesian analysis

LIAO Jie, WANG Zhong-duo, GUO Yu-song, LIU Chu-wu

(Fisheries College, Key Laboratory of Aquaculture in South China Sea for Aquatic Economic Animal of Guangdong Higher Education Institutes, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China)

Received: Dec.,30,2011

Key words: *Lutjanus argentimaculatus*; mitochondrion genome; bayesian analysis; uncorrected relaxed lognormal clock; snapper fish

Abstract: We got 16 543 bp Red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) complete mitochondrial DNA sequence through common PCR, with the GenBank registration number being JN182927. Our sequence and the data in GenBank, red snapper's mitochondrion gene composition were consistent with other snappers, according to the characteristics of vertebrates. Bayesian tree of complete sequence and 13 protein-coding genes and their splicing sequence indicated that: red snapper was close to *L. russellii* and *L. rivulatus*. The evolution rate differences of different mitochondrial sections were obvious. *COX 1*, *ND 2* and *ATPase6* Bayesian posterior rates were significantly higher than the other ten in 13 protein-coding mitochondrial genes of. The 13 protein-coding gene splicing sequences Bayesian posterior rates were significantly higher than completed sequence, and were more suitable for Bayesian uncorrected relaxed lognormal clock analysis. Thirteen protein coding gene splicing sequence's Bayesian uncorrected relaxed lognormal clock work out snappers' two main branches broke out in 61.5 Ma before, which was the junction point of Danian and Selandian in Paleocene.

(本文编辑: 谭雪静)