

5 种石斑鱼核糖体 DNA ITS1 序列及其分子系统进化关系

周爱国^{1,2}, 谢少林^{1,2}, 陈金涛^{1,2}, 陈言峰³, 邹记兴¹

(1. 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642; 2. 清远市北江水产科学研究所, 广东 清远 511510; 3. 佛山科学技术学院 生命科学学院, 广东 佛山 528231)

摘要: 为了明确分布于中国海域点带石斑鱼(*Epinephelus malabaricus*)、青石斑鱼(*E. awoara*)、巨石斑鱼(*E. tauvina*)、六带石斑鱼(*E. sexfasciatus*)和宝石石斑鱼(*E. areolatus*)等石斑鱼属(*Epinephelus*)鱼类的系统发育关系, 作者采用 PCR 和 DNA 测序技术, 测定了 5 种石斑鱼属鱼类的核糖体 DNA ITS1 序列, 获得其 ITS 片段长度分别为 537、536、535、528、532 bp。研究表明: 5 种石斑鱼 rDNA ITS1 序列的碱基组成趋势相似, A+T 含量皆低于 C+G 含量, A+T 含量最低为宝石石斑鱼(37.6%), 最高为六带石斑鱼(41.5%); 基于 Kimura-2 双参数模型计算得到上述石斑鱼种间遗传距离在 0.0000~0.3002。基于 MP 法、ML 法和 NJ 法构建的 3 种分子系统树表明, rDNA ITS1 序列与形态呈同步进化关系, 宝石石斑鱼与其他 4 种石斑鱼的亲缘关系较远, 表明在所研究的物种中最早分化而出, 而点带石斑鱼与青石斑鱼的亲缘关系最近, 分化的时间最晚。

关键词: 石斑鱼(*Epinephelus*); 核糖体 DNA; ITS1; 分子系统进化

中图分类号: Q 347; S 917.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2015)08-0007-09

doi: 10.11759/hyxx20131126002

核糖体 DNA ITS1(The first internal transcribed spacer of ribosomal DNA, rDNA)基因是位于 18S 与 5.8S rDNA 的间隔区, 进化速率中等, 是研究近源种、复合种及种内生物型间亲缘关系和系统发育的良好分子标记, 对于种间分化时间短, 亲缘关系较近的石斑鱼物种, 该标记可以很好揭示其物种间的亲缘关系^[1]。然而, 目前关于 ITS1 序列的研究主要集中在无脊椎动物和植物^[2-6]。在鱼类研究上也有相应的报道, Pleyte 等^[7]采用 ITS1 标记对鲑属鱼类 7 个种研究, 发现其系统进化关系分析结果与形态学、同工酶等研究结果一致。而邱凡等^[8]利用 ITS1 部分序列研究鲭科(Scombrida)鱼类时发现其系统进化关系与形态学上的分类结果存在分歧, 并对鲭科鱼类分类关系进行了澄清; 国外学者也将 ITS1 部分序列成功应用到鱼类系统发育和进化分析中, 解决了一些物种长期存在争议的分类问题^[9-10]。张源真等^[11]利用 ITS-1 序列分析部分鳎亚目鱼类的分子系统进化关系时发现研究结果与形态学分类一致, 种间具有高度变异性, 可以作为物种分类及鉴别的分子依据。而利用 ITS1 序列作为分子遗传标记对石斑鱼进行系统发育关系的研究相对较少。Guo 等^[12]研究云纹石斑鱼(*Epinephelus moara*)和褐石斑鱼(*E. bruneus*)的亲缘关系时发现核糖体 DNA ITS1 序列是一种稳

定可靠的分子标记。

本研究旨在利用 rDNA ITS1 序列作为分子鉴定手段以区别形态上较为相似的 5 种石斑鱼(青石斑鱼(*E. awoara*)、点带石斑鱼(*E. malabaricus*)、六带石斑鱼(*E. sexfasciatus*)、宝石石斑鱼(*E. areolatus*)、巨石斑鱼(*E. tauvina*)种类, 并以丽鱼科(Cichlidae)、罗非鱼属(*Oreochromis*)的尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)为外群, 构建 3 种分子系统树, 以期从分子水平获得这 5 种石斑鱼的系统进化关系, 为生产上的良种选育和杂交选配提供分子生物学方面的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料的种类及来源见表 1, 其中外群尼罗罗非鱼的序列来自 GenBank。

收稿日期: 2013-11-26; 修回日期: 2015-02-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30972258; 30771652); 国家 863 计划青年基金资助项目(863-819-Q-04)

作者简介: 周爱国(1987-), 男, 湖北大冶人, 博士, 主要从事水产经济动物遗传育种, 电话: 13560464768, E-mail: scauzhouaiguo@163.com; 邹记兴, 通信作者, 教授, E-mail: zoujixing@scau.edu.cn

表 1 研究材料种类及其来源

Tab. 1 The species and sources of materials

样本类型	来源		分布	样本(条)	采样时间		
实测	鲷科 Serranidae	石斑鱼属	青石斑鱼	福建东山岛	太平洋西北部(南海、东海等)	12	2012 年
			点带石斑鱼	福建东山岛	太平洋西部、印度洋北部(南海、东海等)	13	2011 年
			六带石斑鱼	广西北海	太平洋西部广泛海域(南海等)	10	2010 年
			宝石石斑鱼	广西北海	太平洋西部、印度洋西北部(南海、东海等)	11	2010 年
			巨石斑鱼	广西北海	太平洋西部、印度洋北部(南海等)	10	2012 年
参考	丽鱼科	罗非鱼属	尼罗罗非鱼	GenBank (No.U67340)	外群	12	2012 年

1.2 试验方法

1.2.1 总 DNA 提取

取适量尾鳍或肌肉组织, STE 洗涤 3 次, 离心条件为 3 000 r/min, 每次离心 10 min; 倒去上清, 将组织转移到灭菌的匀浆器中, 加入 1 mL STE, 匀浆; 将匀浆后的组织悬液转移至 5 mL EP 管, 加入 3 mL 细胞裂解液, 摇匀直至出现黏状物; 加入质量浓度为 10 mg/mL 的 RNase A 至终质量浓度 20 μ g/mL, 于 37 $^{\circ}$ C 消化 3 h; 加入质量浓度为 20 mg/mL 的蛋白酶 K 至终质量浓度 100 μ g/mL, 50 $^{\circ}$ C 消化过夜; 次日以酚/酚-氯仿/异戊醇-氯仿/异戊醇各抽提 1 次; 冰乙醇沉淀, 用吸头挑出 DNA 沉淀, -20 $^{\circ}$ C 70%乙醇洗 1 次, 置 4 $^{\circ}$ C 冰箱中使之缓慢干燥; 干燥后溶于适量 TE 中, 用紫外分光光度计测定其纯度及浓度。

1.2.2 PCR 扩增

PCR 扩增所用引物为自行设计: 正向引物: 5'-GTTCCCCTTGAACGAGGA ATTC-3 反向引物: 5'-CGCATTTTCGCTGCGTTCTTC-3', 它们分别为 18SrDNA 的 5'端和 5.8SrDNA 的 3'端的保守序列, 由上海生物工程公司合成。PCR 扩增反应参照 Williams 等^[13]、Welsh^[14]的方法。每一样品的反应总体积 50 μ L, 其中包括 6 μ L PCR 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, pH9.0, 50 mmol/L KCl, 22.5 mmol/L MgCl₂, 0.01%的明胶), 2 μ L dNTP 混合液(每种 dNTP 0.1 mmol/L), 4 μ L 的引物(0.2 μ mol/L), 4 μ L 基因组 DNA(50 ng/ μ L), 2 μ L Taq 酶(2 单位), 32 μ L 的蒸馏水。扩增反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 60 s, 50 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 共计 40 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.3 DNA 序列测定

扩增产物经 2.0%的低熔点琼脂糖回收纯化, 克

隆于 M13 噬菌体载体, 具体方法参见金冬雁等^[15]。样品委托上海联合基因公司进行双向测序, 序列测定仪器为 3700 型 Bigdye-Terminator 全自动序列分析仪。

1.2.4 DNA 序列的数据处理

用 BioEdit 软件^[16]对测序结果进行编辑, 然后用 CLUSTL X 软件^[17]对尼罗罗非鱼(*O. niloticus*)与本文所得 5 种石斑鱼序列进行序列重排和同源比较。手工校正后, 通过 PAUP 4.0 软件^[18]对序列结果进行统计分析, 分别用最大简约法(Maximum parsimony method, MP 法)和邻接法(Neighbor-Joining method, NJ 法)构建分子系统树; 通过 Pullze 软件^[19]用最大似然法(Maximum Likelihood method, ML 法)构建分子系统树。用“Bootstrap”1000 次检验各系统树分支的置信度。用 Phylip 5.72 软件^[20]中的 DNAdist.exe 程序分别计算基于 Kimura-2 双参数模型和 Jukes-Cantor 单参数模型的遗传距离。

2 结果

2.1 PCR 结果

5 种石斑鱼样品(青石斑鱼、点带石斑鱼、六带石斑鱼、宝石石斑鱼、巨石斑鱼)经 PCR 扩增都分别得到约 800 bp(包括引物)的目的条带(图 1), 测序获得的序列于 NCBI 进行在线比对分析, 证明是 rDNA ITS1 区序列。

2.2 序列组成分析和遗传距离

测出的 5 种石斑鱼 ITS1 区序列长度范围为 805~814 bp, 其中 18S rDNA 长度为 214 bp, 5.8S rDNA 长度为 63 bp, 这两类 rDNA 序列在被测的 5 种石斑鱼上完全一致, 产生序列变异的 ITS1 长度分

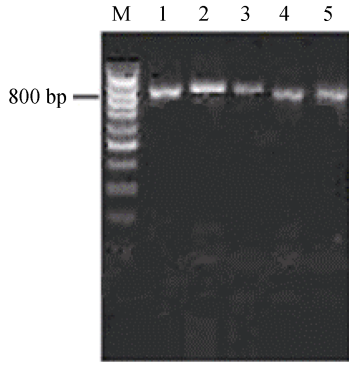


图1 5种石斑鱼样品 rDNA ITS1 区序列 PCR 扩增检测结果
Fig. 1 PCR results of rDNA ITS1 regions of 5 kinds of groupers

M. Marker; 1. 青石斑鱼; 2. 点带石斑鱼; 3. 巨石斑鱼; 4. 六带石斑鱼; 5. 宝石石斑鱼
M. MBI, GeneRuler™, 100bp DNA Ladder; 1. *Epinephelus awoara*; 2. *E. malabaricus*; 3. *E. tauvina*; 4. *E. sexfasciatus*; 5. *E. areolatus*

别为: 青石斑鱼 536 bp、点带石斑鱼 537 bp、六带石斑鱼 528 bp、宝石石斑鱼 532 bp、巨石斑鱼 535 bp。

所分析的 5 个石斑鱼样品 rDNA ITS1 序列的碱基组成比较接近(表 2), 整个碱基组成中 A+T 的含量低于 C+G 的含量, 其中, A+T 含量最低为宝石石斑鱼(37.6%), 最高为六带石斑鱼 41.5%; 单个碱基组成中, A 的含量较低, C 的含量较高, A 含量最低为宝石石斑鱼(17.3%), C 含量最高为点带石斑鱼和青石斑鱼, 均为 33%。

利用 Kimura-2 双参数模型计算的 5 种石斑鱼之间的遗传距离在 0.0000~0.3002, 其中, 宝石石斑鱼与青石斑鱼的遗传距离最大(0.3002), 而点带石斑鱼与青石斑鱼的遗传距离几乎为 0.0000; 用 Jukes-Cantor 单参数模型计算的 5 种石斑鱼的遗传距离在 0.0000~0.2970, 也是宝石石斑鱼与青石斑鱼的遗传

表 2 5 种石斑鱼 rDNA ITS1 序列的碱基组成
Tab. 2 Base composition of rDNA ITS1 sequences of 5 Kinds of groupers

种类	碱基组成(%)				
	A	T	C	G	A+T
点带石斑鱼	18.6	19.6	33	28.9	38.18
青石斑鱼	18.5	19.6	33	28.9	38.06
巨石斑鱼	18.3	20.4	32.7	28.6	38.7
六带石斑鱼	19.9	21.6	31.6	26.9	41.5
宝石石斑鱼	17.3	20.3	32.3	30.1	37.6
尼罗罗非鱼	15.3	16.8	38.4	29.6	32.1

距离最大(0.2970), 而点带石斑鱼与青石斑鱼的遗传距离几乎为 0.0000。从表 3 可以看出 2 种遗传模型计算的结果基本一致, 说明这 5 种石斑鱼 rDNA ITS1 序列的碱基平均转换数与颠换数之比约为 1.5。

2.3 分子系统进化分析

所测定的 5 种石斑鱼 rDNA ITS1 序列经 CLUSTL X 软件^[12]进行序列重排后, 总位点 593 个, 其中可变位点 324 个, 信息位点 45 个, 缺失位点 56~65 个(图 2)。运用 PAUP 4.0 软件以丽鱼科(Cichlidae)、罗非鱼属的尼罗罗非鱼作外群, 基于 MP 法构建 rDNA ITS1 序列的分子系统树(图 3)。5 种石斑鱼逐级聚类: 点带石斑鱼与形态最为相似的青石斑鱼首先聚到一起, 然后与形态相似的巨石斑鱼和六带石斑鱼分别先后聚到一起, 最后与形态差异稍大的宝石石斑鱼聚到一起, 置信度为 76%~100%, 而这 5 种石斑鱼与外群尼罗罗非鱼聚合的置信率不到 5%, 所以在树上不显示; 根据上述位点信息, 设定 rDNA ITS1 序列不同位点的进化是独立事件, 生成数据矩阵, 用 ML 法, 似然步数为 1000, 构建 rDNA ITS1

表 3 基于两种参数模型 5 种石斑鱼各种间 rDNA ITS1 序列的遗传距离
Tab. 3 Genetic distances of rDNA ITS1 sequences among 5 kinds of groupers based on two parameter models.

	点带石斑鱼	青石斑鱼	巨石斑鱼	六带石斑鱼	宝石石斑鱼
点带石斑鱼		0.0000	0.0085*	0.0971	0.3002
青石斑鱼	0.0000		0.0085**	0.0969	0.2970
巨石斑鱼	0.0085	0.0085		0.0972	0.2999
六带石斑鱼	0.0971	0.0971	0.0972		0.2837
宝石石斑鱼	0.3002	0.3002	0.2999	0.2837	
	0.2970	0.2970	0.2970	0.2815	

注: *. 格上一行的数字为基于 Kimura-2 双参数模型(假设碱基转换数为颠换数的 2 倍)计算的两两间遗传距离; **. 格下一行为基于 Jukes-Cantor 单参数模型(假设碱基转换数等于颠换数)计算的两两间遗传距离

Epinephelus malabaricus TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGTTCTGCCTGCCTGTCTGGTCTGGT
E. awoara TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGTTCTGCCTGCCTGTCTGGTCTGGT
E. tauvina TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGTTCTGCCTGCCTGTCTGGTCTGGT
E. sexfasciatus TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGTTCTGCCTGCCTGCCTGC-CTGCC
E. areolatus TTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACCGTTTGTCTGGCCAGCCAGCCCTGCA
Oreochromis niloticus CTGGCTACACCGAGCGGCCCGCTGCGCACCCGGTGTCTCCCTCTTTGCCGCCGAGGGT
 * * ** * * * ** *** * * * *

E. malabaricus CGGCCAGCCAGCAGCAGCAG**CAG**CTGTCGCTCGGACCAAGCCAGGG-GCCCGTCCGCG
E. awoara CGGCCAGCCAGCAGCAGCAG**CAG**CTGTCGCTCGGACCAAGCCAGGG-GCCCGTCCGCG
E. tauvina CGTCCAGCCAGCAGCAGCAG---CTGTCGCTCGGACCAAGCCAGGG-GCCCGTCCGCG
E. sexfasciatus TGTCCAG--CAGCAGCAGCAGCAGCTGTCGCTCGGAGCAAGCCAGGG-GTCCGTCCGCG
E. areolatus CGGGTTGACAGCCAGCGTTGTCCCCCTCGGAGGCTGAGGTTGGAGGG-GTC--TCCCA
O. niloticus CTCCCGCCACCGTACCCGGTGGGGTCTCCCGAGGTTGTCGGCTCGCGCGTCCCCACCG
 * ** * * * * * * * *

E. malabaricus GGCCCCGAAGCACTCAAACCTAGCCGCGCTGTCGTCGCACTCCCTCGCGCCGGTGCCT
E. awoara GGCCCCGAAGCACTCAAACCTAGCCGCGCTGTCGTCGCACTCCCTCGCGCCGGTGCCT
E. tauvina GGCCCCGAAGCACTCAAACCTAGCCGCGCTGTCGTCGCACTCCCTCGCGCCGGTGCCT
E. sexfasciatus GGCCCCGAAGCACTCTAA-----GCCGCGCTGTCATCCGATTCCC-CT-----
E. areolatus TCAGCCGAGGCGC-----CTGGCCGCGC-GTCGTCGCTGTCCTCCTCCGGCCTGA--
O. niloticus GA-GCTCGAGCCTT--AGTCTGGGCTGGTACCCGCGGACGACCCGACGCCCCGCC
 * ** *** * * *** *

E. malabaricus CGCAAGACTGCCGGTGGCGGTGGGTT---TGTGGGTGATGCGTGGCTTTTTTTTT--GC
E. awoara CGCAAGACTGCCGGTGGCGGTGGGTT---TGTGGGTGATGCGTGGCTTTTTTTTT--GC
E. tauvina CGCAAGACTGCCGGTGGCGGTGGGTT---TGTGGGCGATGCGTGGCTTTTTTTTT**TTGC**
E. sexfasciatus -----CTGTGGGTT---TGCGGTGCTGCGTGGCTTTTTTTTT--GC
E. areolatus CG-----G---CTGGAGGTGGG-----CGCGGGCGCGCGTGGCTTTTTTTTTCTTC
O. niloticus -GCCTCTACGCCAAAGCGAGCCCGCTGCCCCGACCGGTTCTCCGAGGGCCGACGGAGG
 * * * * * * *

E. malabaricus A-CTCCTAGCCTGGGCTCCTCCCGATCGGACGCGTCCCTCCGTCCGGTGC--ACCGGA
E. awoara A-CTCCTAGCCTGGGCTCCTCCCGATCGGACGCGTCCCTCCGTCCGGTGC--ACCGGA
E. tauvina A-CTCCTAGCCTGGGCTCCTCTCGATCGGACGCGTCCCTCCGTCCGGTGC--ACCGGA
E. sexfasciatus A-CTCCTAGTCTGGGCTCCTCCCGATCGGACGCGTCCCTCCGTCCGGTGC--ACCGGA
E. areolatus AACTCCTAGTCTGGGCTCCTCCCGATCGGACGCGTCCCTCCGTCCGGTGC--ACCGGA
O. niloticus AGAGTCAGGACTGTGGCTCGTTGGAGGCGGGCGGGTCCCCGTCCGGCAACTACCGGTA
 * * * *** * *** * *** ** * ***** ***** *

E. malabaricus GAGGCCAAAA**ACACAC**-TCTCGGAACCTTACACGTCAACGCGGCCGT-----
E. awoara GAGGCCAAAA-CACAC-TCTCGGAACCTTACACGTCAACGCGGCCGT-----
E. tauvina GAGGCCAAAA-CACAC-TCTCGGAACCTTACACGTCAACGCGGTCTG-----
E. sexfasciatus GAGGCCGCAA-AACAC-TCTCGGAAC---ATAACTGTCAACGCGGTGCGCCC-----
E. areolatus GAGGCCGCAAAAAACATCTCGGAACCT--CTACTGTCAACGCGGT**TGCGGGGGGGTCC**
O. niloticus CCGGCCCGCCACGAAAA-CCTCG--ACCGAAAGCGGGACTGGCGGTTTCGCC-----
 ***** * * * ***** ** * *****

```

E.malabaricus -----GGCCGCGTGCCCCGGGTACCCAAC--TCTCTCCCCTCCTCCGGAGAG
E.awoara -----GGCCGCGTGCCCCGGGTACCCAAC--TCTCTCCCCTCCTCCGGAGAG
E.tauvina -----GGCCGCGTGCCCCGGGTACCCAAC--TCTCTCCCCTCCTCCGGAGAG
E.sexfasciatus -----CTCAGCGCGCGTGCCCCGGGTACCCAACACTCTCTCCCCTCCTACGGAGAG
E.areolatus TCCAACCCCTCCTTCCGCGTGCCCCGGGTACCCAAC--TCTCTCCCCTCCTCCGGAGGG
O.niloticus ----TGACCGCTGCCCGCGCGCTCCGGGTACCCAAC--TCTCCTCCTCCTGCGGAGGA
                ***** ** ***** ***** ** * ***** *****

E.malabaricus GAGAGGGGGTTCAATGTCTCCAGTAGTGTCTGGCCCCTGTGCGTGACGGT-----
E.awoara GAGAGGGGGTTCAATGTCTCCAGTAGTGTCTGGCCCCTGTGCGTGACGGT-----
E.tauvina GAGAGGGGGTTCAATGTCTCCAGTAGTGTCTGGCCCCTGTGCGTGACGGT-----
E.sexfasciatus GAGAGGGGGTTCAATGTCTCCAGTATGCACTGGCCCCTGTGCGTGATGATAATGATGA
E.areolatus GAGAGGGGGTTCAATGTCTCCAGTAGCGTCTGGCCTCCAGGGGCTGTGAC-----
O.niloticus GCACGGGGGGTTCAATGTCTCC-----TCTCCCCTGCCGCTCGG---AGGA-----
* ***** ***** * * * *

```

```

E.malabaricus -----GCGGAGCGCCCGGT-GGGTCCTGTGTCCCATCTAAAAAACCCTCATGTC
E.awoara -----GCGGAGCGCCCGGT-GGGTCCTGTGTCCCATCTAAAAAACCCTCATGTC
E.tauvina -----GCGGAGCGCCCGGT-GGGTCCTGTGTCCCATCTAAAAAACCCTCATGTC
E.sexfasciatus TGATGATGATGTGGAGCGCCCGGT-GGGTCCTGTGTCCCACTAAAAAACCCTCATGTC
E.areolatus -----GGTGCGGAGCGCCCGG--GGGTTCTGTGTCTCCTCCAAAAA--CGCTCATGTC
O.niloticus -----A--GGAGCGCCCGG--GGGTTTTTCCCTTCCTTTAAA--CCCCTATC-C
                ***** ***** * * * * * * * * * * * * * * * *

E.malabaricus TGAGAAAACACAACACTGTGGTTGGCCAAAAAGAAAAA-ACAAACCAAAACAAA-T
E.awoara TGAGAAAACACAACACTGTGGTTGGCCAAAAAGAAAAA-ACAAACCAAAACAAA-T
E.tauvina TGAGAAAACACAACACTGTGGTTGGCCAAAAAGAAAAA-ACAAACCAAAACAAA-T
E.sexfasciatus TGAGAAAACACAATGTGGTTGGCCTATTACAAAATGAAAAACCAAAACAAAAT
E.areolatus CAGAGAAAACAAAATGGCCTAAACCAGAAAGAGAAACAAAAAATGT-----
O.niloticus CGTCTA----CGAATGTGGCAACCCACGGTAAAAACAAAAAACAATA-----
                * * * * * * * * * * * * * * * *

```

图 2 排序后的 5 种石斑鱼与外群尼罗罗非鱼 rDNA ITS1 序列(黑体为特征序列或碱基)

Fig. 2 rDNA ITS1 sequences of 5 species of grouper and the outgroup *O. niloticus* after alignment(The black words denote the characteristic regions or bases)

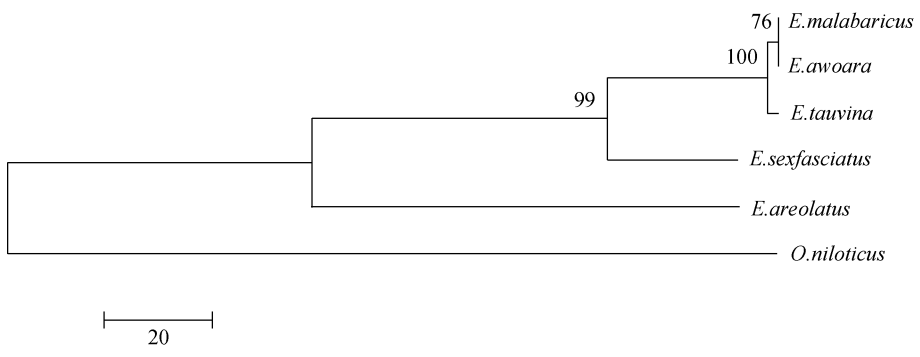


图 3 基于 rDNA ITS1 序列利用 MP 法构建 5 种石斑鱼的分子系统树

Fig. 3 The molecular phylogenetic tree of 5 kinds of groupers based on rDNA ITS1 sequences constructed using MP method

序列的分子系统树(图 4), 与依据 Kimura 2-parameter model 估算遗传距离, 用 NJ 法构建的分子系统树(图 5)分支结构完全一致, 而且这两种树与用 MP 法构建的分子系统树也一致, 同样, 外群无法显示, 说明它

与这 5 种石斑鱼明显不是一类, 结果是可靠的。MP 法、ML 法和 NJ 法构建的 3 种分子系统树 5 种石斑鱼聚类结果一致, 充分地反映了 5 种石斑鱼种间分子系统进化关系。

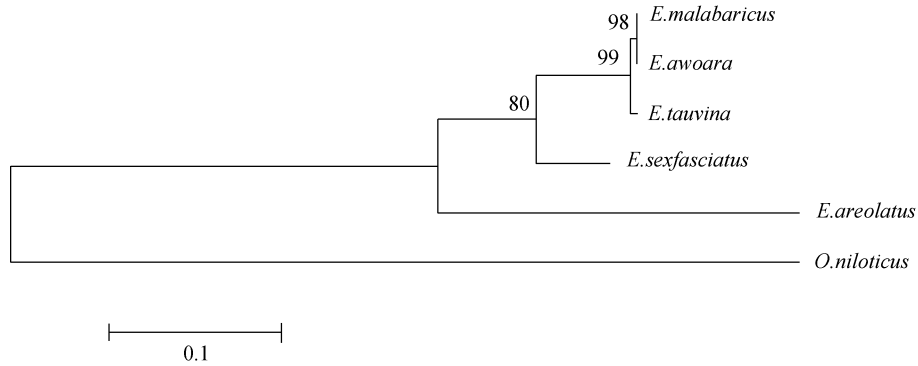


图 4 基于 rDNA ITS1 序列利用 ML 法构建 5 种石斑鱼的分子系统树

Fig.4 The molecular phylogenetic tree of 5 kinds of groupers based on rDNA ITS1 sequence constructed using ML method

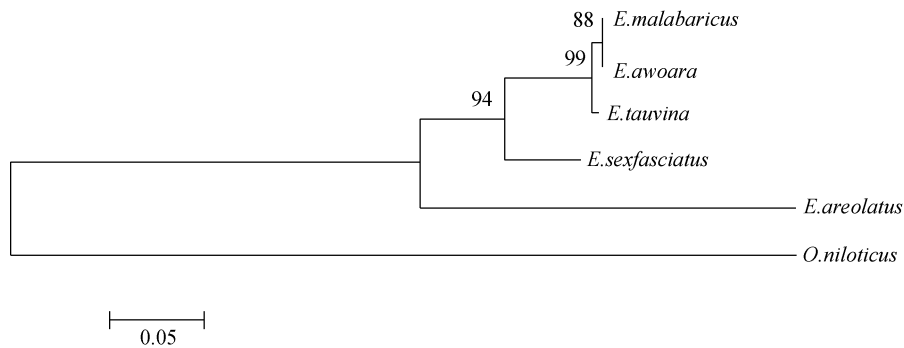


图 5 基于 rDNA ITS1 序列利用 NJ 法构建 5 种石斑鱼的分子系统树

Fig. 5 The molecular phylogenetic tree of 5 kinds of groupers based on rDNA ITS1 sequences constructed using NJ method

3 讨论与结论

3.1 rDNA ITS 区序列特点及 5 种石斑鱼的 ITS1 序列及其遗传距离比较

核糖体转录间隔区(rDNA ITS)序列是国际上公认的种属以下的分类、种质鉴别与系统关系分析上是比较稳定和理想的分子遗传标记^[3, 21]。ITS 区序列包括 ITS1、ITS2, 由于 ITS 区序列不加入成熟核糖体, 所以受到的选择压力较小, 进化速率较快, 可从较短的序列中获得较多的系统发育信息, 对鱼类种间、亚种和种群水平上的区分鉴定比较实用^[22]。已有研究表明 ITS1 是 rDNA 中变异较大的区域^[23], 在无脊椎动物的系统分类和分子系统进化分析上得到广泛应用^[21, 24-26]。在鱼类研究方面, 徐晖等^[27]在分析 6 种舌鲷亚科鱼类 ITS1 序列长度多态性及其系统发

育分析时发现舌鲷亚科鱼类 ITS1 区具有明显的长度多态性。孙玉华等^[28]在亚口鱼科鱼类核 DNA 18S-ITS1-5.8 S 序列比较分析中也得到了这一结论。郭奕惠等^[29]对 5 种罗非鱼的 ITS1 及其两侧的 18sRNA 和 5.8sRNA 部分序列特征进行了分析, 结果发现罗非鱼 ITS1 序列多态性较高。Sajdak 等^[30]利用 ITS-1 序列构建了较大范围的白鲑种类的系统发育树。钟立强等^[31]利用 ITS-1 序列有效的分析了 4 个鲤鱼种群的遗传变异。尽管 ITS1 做为分子系统进化具有很多优点, 但在鱼类研究相对比较局限。

5 种石斑鱼 ITS1 序列的长度在 528 bp ~537 bp, 点带石斑鱼只比青石斑鱼多了一个碱基 A, 青石斑鱼比巨石斑鱼多 1 个碱基, 是由于青石斑鱼存在 CAG3 个碱基, 巨石斑鱼在相应的地方缺失, 巨石斑鱼存在 TT 两个碱基而青石斑鱼相应的地方缺失所造成。六

带石斑鱼的 ITS1 序列(528bp)和宝石石斑鱼的 ITS1 序列(532 bp)相对较短,但可以找到相应的特征性序列以区别于其他种石斑鱼。六带石斑鱼的特征性序列为: 5'-ATAATGATGATGATGATGATGT-3', 22bp; 宝石石斑鱼的特征性序列为: 5'-TTGCGGCGG-GGTCCTCCAACCCCTCCTT-3', 28 bp。5 种石斑鱼这一序列特征可在其遗传距离上得到反映: 点带石斑鱼与青石斑鱼只有 1 个碱基的差别,两种鱼的遗传距离趋近于 0.0000; 巨石斑鱼与青石斑鱼和点带石斑鱼分别只有 1 和 2 个碱基的差别,与这两种鱼的遗传距离都只有 0.0085。六带石斑鱼与上述 3 种石斑鱼的遗传距离都小于 0.1000,而宝石石斑鱼与其他 4 种石斑鱼的遗传距离都大于 0.2800。由此可将 5 种石

斑鱼分成 3 类: 形态与点带石斑鱼很相似的有青石斑鱼、巨石斑鱼; 形态与点带石斑鱼相似的有六带石斑鱼; 形态与点带石斑鱼有些相似的为宝石石斑鱼。对于形态难以区分的种类可用其特征序列进行识别。

3.2 5 种石斑鱼的分子系统进化关系

依据体色、花纹等形态特征对石斑鱼进行分类的难度是从所周知的事实。本研究选择的 5 种石斑鱼,除宝石石斑鱼成鱼阶段可依据形态鉴别外,其他 4 种形态均十分相似(表 4),尤其是俗称“青斑”的 3 种,虽序列上可以看出它们的区别,但苗种生产需要了解石斑鱼间的系统关系,即遗传背景,以便为良种选配和遗传保护提供依据。

表 4 5 种石斑鱼的主要形态特征

Tab. 4 Major morphological characters of five species of groupers

种类	花纹	胸鳍 (条)	尾鳍	背鳍(条)	鳃耙数 (枚)	臀鳍 (条)	侧线有孔鳞 (枚)
点带石斑鱼	体侧有 5 条棕黑色带,带上的花纹时有间断,身体有棕黑色花斑,间有黯淡的小白点	18~21	微圆	鳍棘 11 鳍条 14~16	23~27	鳍棘 3 鳍条 8	54~64
青石斑鱼	体侧有 5 条棕黑色带纹,第 3~4 带纹最宽,体侧有棕黄色小斑点和黯淡的小白点	17~19	微圆	鳍棘 11 鳍条 15~16	22~26	鳍棘 3 鳍条 8	45~49
巨石斑鱼	身体有 5 条较黯淡的黑色带纹,具橙红色至棕黑色斑点,间有黯淡的小白点	18~19	微圆	鳍棘 11 鳍条 13~16	25~30	鳍棘 3 鳍条 8	63~73
六带石斑鱼	体侧有 6 条棕黑色带,第 2~3 带的间隔模糊,体侧杂有灰棕色或橙色斑点	17~19	微圆	鳍棘 11 鳍条 14~16	20~23	鳍棘 3 鳍条 8	46~51
宝石石斑鱼	体侧无带纹,全身覆盖褐色、黄褐色斑点	17~19	幼鱼截形, 成鱼微凹	鳍棘 11 鳍条 15~17	23~25	鳍棘 3 鳍条 8	49~53

研究的 5 种石斑鱼主要分布于太平洋西部和印度洋北部的广泛海域,在中国主要分布于南海(表 1)。利用 MP、ML、NJ 3 种方法构建的分子系统树与遗传距离和形态分析的结果高度一致,这说明系统树聚类的正确性,同时表明点带石斑鱼在进化上与青石斑鱼分化较晚,而宝石石斑鱼在进化上与点带石斑鱼和青石斑鱼的分化相对较早。在遗传育种研究及良种培育生产上,应避免点带石斑鱼与形态相似的青石斑鱼和巨石斑鱼间进行交配,由此导致遗传多样性的丢失,影响物种的生存力。研究的 5 种石斑鱼 rDNA ITS1 序列分别与它们的形态呈同步进化的关系,而在石斑鱼 mtDNA Cytb 序列的研究发现,mtDNA Cytb 序列的进化与形态有些不一致的现象^[32-33],说明 mtDNA Cytb 序列的进化与 rDNA ITS1 序列的进化,可能采取的是两种不同的进化轨迹。比

较而言,rDNA ITS1 序列作为研究石斑鱼分子系统进化的遗传标记,比 mtDNA Cytb 序列更为理想,遗憾的是没有更多的序列可供比较。但就 5 种石斑鱼而言,俗称“青斑”的 3 种石斑鱼分化时间较晚,在系统进化上具有高度的一致性,应避免它们之间的彼此混交,而这正是我们生产中所要注意到的问题。

参考文献:

[1] Ding S X, Zhuang X, Guo F, et al. Molecular phylogenetic relationships of China seas groupers based on cytochrome b gene fragment sequences[J]. Science in China: (Series C), 2006, 49(3): 235-242.
 [2] 唐伯平,周开亚,宋大祥.核 rDNA ITS 区序列在无脊椎动物分子系统学研究中的应用[J]. 动物学杂志, 2002, 37(4): 67-73.

- [3] 缪炜, 张锡元, 余育和, 等. 利用三种分子标记研究缘毛类纤毛虫的系统发育地位[J]. 动物学研究, 2003, 1: 1-10.
- [4] 王薇. 虫草 ITS 序列分子进化分析及其复合营养液的体外细胞作用研究[D]. 成都: 西南交通大学, 2012: 94.
- [5] 林子杰. 三种绿藻的 ITS 和 18SrDNA 序列及系统发育分析[D]. 苏州: 苏州大学, 2011: 53.
- [6] 王赞, 漆一鸣. 两种眼蚤 rDNA ITS1 序列的克隆与分析[J]. 贵州科学, 2011, 4: 29-32.
- [7] Pleyte K A, Duncan S D, Phillips R B. Evolutionary relationships of the salmonid fish genus *Salvelinus* inferred from DNA sequences of the first internal transcribed spacer (ITS 1) of ribosomal DNA[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1992, 1(3): 223-230.
- [8] 邱凡, 苏永全, 傅蒙娜, 等. 基于线粒体 Cytb 和 ITS1 部分序列分析鲭科鱼类分子系统进化关系[J]. 中国水产科学, 2010, 2: 201-211.
- [9] Presa P, Pardo B G, Martínez P, et al. Phylogeographic congruence between mtDNA and rDNA ITS markers in brown trout [J]. *Mol Biol Evol*, 2002, 9: 2161- 2175.
- [10] Chow S, Nakagawa T, Suzuki N, et al. Phylogenetic relationships among *Thunnus* species inferred from rDNA ITS1 sequence [J]. *J Fish Biol*, 2006, 68: 24-35.
- [11] 张源真, 王伟, 姜志强. 基于 ITS-1 序列的部分鳊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.
- [12] Guo M L, Su Y Q, Zhang Z W, et al. Differentiation of *Epinephelus moara* from *E. bruneus* by improved nest-tetra-primer-specific PCR[J]. *Progress in Natural Science*, 2009, 19: 1221-1226.
- [13] Williams J G K, Kubilik A R, Liavk K J. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers is useful as genetic markers[J]. *Nacl Acids Res*, 1990, 18: 6531-6535.
- [14] Welsh J K. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. *Nacl Acids Res*, 1990, 18: 7213-7218.
- [15] 金冬雁, 黎孟枫. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1992: 15-66.
- [16] Hall T. BIOEDIT: Biological sequence alignment editor for windows[D]. North Carolina, USA: Carolina State University, 1998.
- [17] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25: 4876-4882.
- [18] Swofford D L. PAUP: Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), version 4.0[M]. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2001: 128.
- [19] Strimmer K, von Haeseler A. Quartet puzzling: a quartet maximum-likelihood method for reconstructing tree topologies[J]. *Mol Biol Evol*, 1996, 13: 964-969 .
- [20] Felsenstein J. Phylogeny inference package (PHYLIP). Version 3.5[R]. Washington, Seattle: Department of Genetics, University of Washington, Seattle, 1993.
- [21] 缪炜, 余育和, 沈韞芬, 等. 6 种累枝虫(*Epistylis*) rRNA 基因 18S-ITS1 序列及其分子系统发育关系[J]. 中国科学 C 辑, 2002, 45(3): 280-288.
- [22] 魏晓华. 栉孔扇贝和海湾扇贝的遗传多样性研究及扇贝科几种贝类的分子系统学研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2004.
- [23] Jousson O, Bartoli P, Zaninetti L, et al. Use of the ITS rDNA for elucidation of some life cycles of Mesometridae (Trematoda, Digenea)[J]. *International Journal for Parasitology*, 1988, 28: 1403-1411.
- [24] Schilthuizen M, Gittenberger E, Gultyaev A P. Phylogenetic relationships inferred from the sequence and secondary structure of ITS1 rRNA in *Albinaria* and putative *Isabellaria* species (Gastropoda, Pulmonata, Clausiliidae) [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 1995, 4(4): 457-462.
- [25] Lindsay D S, Upton S J, Owens D S, et al. *Cryptosporidium andersoni* n.sp. (Apicomplexa: Cryptosporiidae) from Cattle, *Bostaurus*[J]. *J Eukaryot Microbiol*, 2000, 47(1): 91-95.
- [26] Dover G A. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution[J]. *Nature*, 1982, 299: 111-117.
- [27] 徐晖, 李军, 孔晓喻, 等. 6 种舌鳎亚科鱼类 ITS1 序列长度多态性及系统分析[J]. 海洋与湖沼, 2008,

- 39(1): 35-41.
- [28] 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, 3: 367-370.
- [29] 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.
- [30] Sajdak S L, Phillips R B. Phylogenetic relationships among *Coregonus* species inferred from the DNA sequence of the first internal transcribed spacer (ITS1) of ribosomal DNA[J]. Can J Fish Aquat Sci, 2003, 54 (7): 1494-1503.
- [31] 钟立强, 张成锋, 周凯, 等. 四个鲤鱼种群 ITS-1 序列的遗传变异分析[J]. 湖泊科学, 2011, 2: 271-276.
- [32] 朱世华, 杨迎春, 郑文娟, 等. 从细胞色素 b 部分序列探讨石斑鱼属的分子系统发育关系[J]. 水生生物学报, 2006, 30(4): 432-438.
- [33] 陈芝燕, 章群, 任岗, 等. 10 种石斑鱼系统发育的线粒体细胞色素 b 基因序列分析[J]. 海洋科学, 2006, 30(6): 12-15.

Molecular phylogenetic relationships of five species of *Epinephelus* based on sequences of rDNA ITS1

ZHOU Ai-guo^{1, 2}, XIE Shao-lin^{1, 2}, CHEN Jin-tao^{1, 2}, CHEN Yan-feng³, ZOU Ji-xing¹

(1. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou, Guangdong 510642, China; 2. Qingyuan North River Fishery Science Institute, Qingyuan, Guangdong 511510, China; 3. College of Life Science, Foshan University, Foshan, Guangdong 528231, China)

Received: Nov., 26, 2013

Key words: *Epinephelus*; rDNA; ITS1; molecular phylogenetic relationship

Abstract: In order to explore the phylogenetic relationship among 5 endemic species of groupers, *Epinephelus malabaricus*, *E. awoara*, *E. tauvina*, *E. sexfasciatus*, and *E. areolatus* in China Sea. The sequences of rDNA ITS1 were analyzed and their lengths were determined to be 537, 536, 535, 528 and 532 bp respectively. The results were as follows: The basic composition of rDNA ITS1 sequences of 5 kinds of groupers was close to each other. The A+T component was lower than C+G component. A+T was the lowest (37.6%) in *E. areolatus* and the highest (41.5%) in *E. sexfasciatus*. The genetic distance measured using the kimura-two parameter model was from 0.0000 to 0.3002 in 5 kinds of groupers. The cluster result of 5 kinds of groupers in molecular phylogenetic trees constructed using MP, ML and NJ method were identical, suggesting that rDNA ITS1 sequences and morphological evolution might be synchronous. In 5 kinds of groupers, *E. areolatus* showed far away from other 4 species, suggesting that the *E. areolatus* might differentiated early from other species. While *E. malabaricus* showed nearest to *E. awoara*, suggesting that this species could be differentiated later.

(本文编辑: 谭雪静)