

基于线粒体基因的石珊瑚分子系统学研究*

刘 丽 李晓娜 陈育盛 刘楚吾

(广东海洋大学水产学院 南海水产经济动物增殖广东省普通高校重点实验室 湛江 524025)

提要 以广东徐闻地区常见的 6 科 10 属 17 种石珊瑚的 21 个样本为研究对象,对线粒体 CO₁、16S rRNA 和 mtSSU 三基因片段数据进行了联合分析,并计算了属间和科间遗传距离;利用邻接法、最大简约法和最大似然法分别构建了分子系统树。序列分析结果显示,石珊瑚线粒体基因碱基构成同样具有 AT 偏倚特征;石珊瑚属间的遗传距离显著大于属内遗传距离,而所有石珊瑚与两个外类群的距离均大于石珊瑚之间的遗传距离;在系统发育树中,分子系统分类结果与形态学分类阐述的遗传进化关系略有差别,暗示传统形态学分类可能受珊瑚骨骼生长可塑性限制。

关键词 石珊瑚,联合分析,分子系统分类,遗传进化关系

中图分类号 Q959.133

如何构建完整准确的珊瑚分类体系,是长期以来困扰分类学研究人员的问题。在过去的研究中,珊瑚的颜色、括约肌解剖结构(Lwowsky, 1913)、触手数目(Hebert, 1972)、触手类型和分泌的刺丝囊种类(Ryland *et al.*, 2004)等都曾作过分类依据,然而由于描述标准不统一,同种异名和同名异种经常发生。自 20 世纪末起,由 Wells(1956)建立、并由 Veron(1995)修订的依据骨骼的形态特征对六射珊瑚进行分类的方法,是目前为止应用最为广泛的形态学研究手段。然而,随着显微技术的长足进步,在对石珊瑚的研究中发现珊瑚骨骼及其微结构的发育具有一定的可塑性(Forsman *et al.*, 2009),使得鉴定石珊瑚物种的标准显现不足。另外许多珊瑚分类群存在亚目水平的并系类群(齐文同等, 2008; Huang *et al.*, 2009)的问题,也给珊瑚的分类带来困扰。

DNA 分子标记的出现为解决分类问题提供了全新思路,通过分析核苷酸序列揭示出内在的系统发生关系,可以准确标明物种之间的区别与联系。目前通过分子标记手段,人类不仅发现了更多的隐存种(cryptic species),揭示了更加丰富的生物多样性,而且为研究物种的进化规律和遗传变异提供了大量数

据;另外,基于不同算法模型建立的系统树也为研究生物进化过程提供了新的思路。mtDNA 因具有较核基因快的进化速度和一级结构歧化的特点,成为主要遗传标记(张秀梅等, 2002)。本研究采用联合分析的方法,运用线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基(Cytochrome Oxidase subunit, CO₁)、线粒体核糖体大亚基 16S rRNA 和小亚基 mtSSU,对中国大陆架上唯一的一片大面积珊瑚岸礁——徐闻珊瑚礁礁区的常见石珊瑚进行了分子系统分析,以期为该地区珊瑚的进一步研究提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 样品的获得

本研究涵盖了石珊瑚目的 6 科、10 属、17 种,共 21 个珊瑚样本。所分析物种均采集于广东省徐闻珊瑚礁国家级自然保护区(109°50'12"—109°56'24"E, 20°10'36"—20°27'00"N),样本名录见表 1。选用保护区内软珊瑚目的花环肉质软珊瑚(*Sarcophyton trocheliophorum*)和直立柔荑软珊瑚(*Nephthea erecta*)作为外类种。采样时先拍摄珊瑚群体生活时照片,然后取 3cm²左右珊瑚样本加冰包装,运回实验室-20℃保

* 国家海洋公益性行业科研专项, 201105012 号; 广东省自然科学基金项目, S2011010000269 号; 广东省海洋渔业科技推广专项, A200908F01 号; 刘 丽, 副教授, E-mail: zjoulili@163.com

通讯作者: 刘楚吾, 教授, E-mail: liucw5206@163.com

收稿日期: 2011-02-26, 收修改稿日期: 2011-05-15

存。样本的存放和鉴定(朱弘复等, 1997; 戴昌凤等, 2009)工作都在南海水产经济动物增养殖广东省普通高校重点实验室进行。

1.2 基因组 DNA 提取、PCR 扩增

用苯酚/氯仿抽提法(卢圣栋, 1999)提取总 DNA, 4℃保存备用。PCR 扩增目的片段分别是靠近 5'端的长度为 530bp 左右的 COI 基因序列、约 650bp 的 16S rRNA 基因片段和 850bp 左右的 mtSSU 基因片段。其扩增和测序引物详见表 2。

使用 Primer 5 软件以 *Favites* sp. 部分 COI 序列为模板设计得到引物 PCO。

PCR 反应体系: 10×Buffer (含 Mg^{2+}) 2.5μl, dNTPs 2μl, 上下游引物(5μmol/L)各 1μl, *rTaq* DNA 聚合酶 0.2μl, 总 DNA 约 50ng, 补超纯水至 25μl。

PCR 反应程序: 94℃变性 3min; 94℃变性 45s, 退火 60s, 72℃延伸 60s 共 30 个循环; 72℃总延伸 10

min。PCR 产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测后直接送生工生物工程(上海)有限公司测序。

1.3 主要仪器及试剂

高速冷冻离心机: SIGMA3K30、PCR 扩增仪: Bio-Rad S1000。

Taq DNA 聚合酶、dNTP、蛋白酶 K 为宝生物工程(大连)有限公司产品, 引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.4 序列校正与比对

测序结果输入 Chromos 软件检验其测序峰图质量, 并进行人工校正。将得到的序列通过 Contigexpress 软件(Vector NTI Advance11)进行拼接后在 NCBI 上运行 BLAST 程序进行序列同源性比较, 以确保所获得的序列是目标序列。将同一物种的三个基因片段按照 COI、16S rRNA、mtSSU 的顺序连接后, 使用 MEGA5.0 计算所得序列的碱基组成和遗传距离。分

表 1 研究所用珊瑚样本
Tab.1 Coral samples in this study

科	属	种	数量
滨珊瑚科 Poritidae	滨珊瑚属 <i>Porites</i>	滨珊瑚 <i>Porites</i> sp.	6
		二异角孔珊瑚 <i>Goniopora duofaciata</i>	1
	角孔珊瑚属 <i>Goniopora</i>	柱形角孔珊瑚 <i>Goniopora columna</i>	1
蜂巢珊瑚科 Faviidae	扁脑珊瑚属 <i>Platygyra</i>	精巧扁脑珊瑚 <i>Platygyra daedalea</i>	1
		角蜂巢珊瑚属 <i>Favites</i>	角蜂巢珊瑚 <i>Favites</i> sp.
	同星珊瑚属 <i>Plesiastrea</i>	同星珊瑚 <i>Plesiastrea</i> sp.	1
		鹿角珊瑚科 Acroporidae	鹿角珊瑚属 <i>Acropora</i>
	鹿角珊瑚 <i>Acropora</i> sp.		1
蔷薇珊瑚属 <i>Montipora</i>	蔷薇珊瑚 <i>Montipora</i> sp.		2
裸肋珊瑚科 Merulinidae	刺柄珊瑚属 <i>Hydnophora</i>	邻基刺柄珊瑚 <i>Hydnophora contignatio</i>	1
菌珊瑚科 Agariciidae	牡丹珊瑚属 <i>Pavona</i>	十字牡丹珊瑚 <i>Pavona frondifera</i>	1
		丛生盔形珊瑚 <i>Galaxea fasciculari</i>	1
枇杷珊瑚科 Oculinidae	盔形珊瑚属 <i>Galaxea</i>	稀杯盔形珊瑚 <i>Galaxea astreata</i>	1
		盔形珊瑚 <i>Galaxea</i> sp.	1
		外类种群 Out group	肉质珊瑚属 <i>Sarcophyton</i>
柔荑珊瑚属 <i>Nephtea</i>	直立柔荑软珊瑚 <i>Nephtea erecta</i>		1

表 2 本研究引物列表
Tab.2 List of primers used in this study

名称	引物序列	T_m (°C)	产物大小(bp)	引物出处
PCO	f-TGC TCG GTA CAG CCT TCA GT	56	487—533	本研究
	r-GC TAA TAC GGG CAA AGA CAA			
Z16S	f-CCT CGG CTG TTT ACC AAA AA	50	503—688	Forsman <i>et al.</i> , 2008
	r-AAC ATC GAG GTC GCA AAC AT			
mtSSU	f-AGC CAC ACT TTC ACT GAA ACA AGG	50 56*	703—887	Chen <i>et al.</i> , 2000
	r-GTT CCC YYW CYC TYA CYA TGT TAC GAC			

注: *表示采用升温 PCR 扩增, 先以 50℃退火 5 个循环接 56℃退火的 30 个循环

子系统树的构建采用邻位连接(Neighbor- Joining, NJ)、最大似然(Maximum-Likelihood, ML)和最大简约(Maximum-Parsimony)三种方法。使用自展分析(Bootstrap)方法,进行 1000 次重复,估计支持率。

2 结果与分析

2.1 序列分析

2.1.1 碱基组成及变异 通过扩增测序,分别获得 21 个石珊瑚(17 种)和 2 个软珊瑚样本的 CO I、16S rRNA、mtSSU 基因相应的序列片段。本研究中将三基因组成串联片段,经比对序列间的同源性在 81.21%—100%之间。据 MAGE5.0 软件统计,在 2274 个排列位点中有 1078 个可变位点,约占 47%;其中简约信息位点 896 个,约占可变异位点的 80%。由表 3 可知序列中 A、T、C、G 碱基的分布情况,其中 A+T 含量达 60.10%明显高于 G+C 的含量(39.90%),两个作为外类种群的软珊瑚的 G+C 含量显著高于其它珊瑚,石珊瑚中盔形珊瑚属(*Galaxea*)的三个样本 G+C

含量都达到 40%以上,而蜂巢珊瑚科的精巧扁脑珊瑚(*Platygyra daedalea*)和同星珊瑚(*Plesiastrea* sp.) G+C 含量则仅有约 38%。

2.1.2 遗传距离 序列比对结果显示,所有石珊瑚序列的同源性介于 81.21%—100%之间。通过计算表明,石珊瑚与外类种群的距离都明显大于石珊瑚间的距离。如表 4 所示,在滨珊瑚和鹿角珊瑚科中,属内遗传距离显著小于属间遗传距离,其中滨珊瑚属内的遗传距离更小;角蜂巢珊瑚属和同星珊瑚属与其它石珊瑚的距离较远,仅次于外类种群;裸肋珊瑚科的邻基刺柄珊瑚与菌珊瑚科的十字牡丹珊瑚的距离仅为 0.0212。

2.2 系统发生分析

利用本研究获得的三基因串联序列,构建了石珊瑚的分子系统发育树。基于 P-distance 遗传距离法进行 1000 次自展检验构建的 50%多数一致性 NJ 树见图 1。三种进化树的拓扑结构相似,其节点支持率及支展长度略有差别,支持率差异在 NJ 树上标明。

表 3 本研究中珊瑚 CO I 部分序列中各碱基平均分布频率(%)
Tab.3 Average nucleotide frequencies of CO I partial sequences of corals in this study (%)

物种	T(U)	C	A	G	G+C
<i>Porites</i> sp.1	31.28	15.47	28.98	24.28	39.75
<i>Porites</i> sp.2	31.50	15.44	28.98	24.08	39.52
<i>Porites</i> sp.3	31.55	15.29	29.20	23.96	39.25
<i>Porites</i> sp.4	31.97	15.38	28.78	23.87	39.25
<i>Porites</i> sp.5	31.66	15.12	29.15	24.08	39.20
<i>Porites</i> sp.6	31.80	15.41	28.69	24.10	39.51
<i>Goniopora duofaciata</i>	31.28	15.66	29.00	24.05	39.71
<i>Goniopora columna</i>	31.96	15.56	28.72	23.76	39.32
<i>Goniopora</i> sp.	31.80	15.24	28.79	24.17	39.41
<i>Acropora robusta</i>	30.59	15.69	29.07	24.66	40.35
<i>Acropora</i> sp.	30.98	15.52	29.03	24.47	39.99
<i>Montipora</i> sp.1	31.11	15.39	29.23	24.26	39.65
<i>Montipora</i> sp.2	31.03	15.39	29.14	24.44	39.83
<i>Galaxea fascicularis</i>	30.13	16.13	29.28	24.46	40.59
<i>Galaxea astreata</i>	29.38	16.04	29.58	25.00	41.04
<i>Galaxea</i> sp.	30.54	17.24	29.13	23.09	40.51
<i>Favites</i> sp.	31.47	16.15	28.09	24.28	40.43
<i>Platygyra daedalea</i>	32.45	14.82	29.75	22.98	37.80
<i>Plesiastrea</i> sp.	33.01	15.06	30.17	21.77	36.83
<i>Hydnophora contignatio</i>	30.77	15.60	28.89	24.73	40.33
<i>Pavona frondifera</i>	30.25	15.90	29.34	24.52	40.42
<i>Sarcophyton trocheliophorum</i>	30.04	18.58	27.74	23.64	42.22
<i>Nephtea erecta</i>	29.75	18.48	27.75	24.01	42.49
平均值	31.13	15.85	28.97	24.05	39.63

表 4 研究所用各珊瑚物种两两比对的遗传距离
Tab.4 Genetic distance pairwise-species in studied coral species

物种	Por.1	Por.2	Por.3	Por.4	Por.5	Por.6	Gon.1	Gon.2	Gon.3	Acr.1	Acr.2	Mon.1	Mon.2	Gal.1	Gal.2	Gal.3	Fav.1	Pla.	Ple.	Hyd	Pav	Sar	Nep	
<i>Porites</i> sp.1																								
<i>Porites</i> sp.2	0.0032																							
<i>Porites</i> sp.3	0.0000	0.0032																						
<i>Porites</i> sp.4	0.0006	0.0039	0.0006																					
<i>Porites</i> sp.5	0.0000	0.0032	0.0000	0.0006																				
<i>Porites</i> sp.6	0.0019	0.0051	0.0019	0.0026	0.0019																			
<i>Goniopora duofaciata</i>	0.0193	0.0225	0.0193	0.0199	0.0193	0.0199																		
<i>Goniopora columna</i>	0.0206	0.0238	0.0206	0.0212	0.0206	0.0199	0.0039																	
<i>Goniopora</i> sp.	0.0187	0.0219	0.0187	0.0193	0.0187	0.0193	0.0019	0.0032																
<i>Acropora robusta</i>	0.1036	0.1068	0.1036	0.1042	0.1036	0.1036	0.0991	0.1017	0.0997															
<i>Acropora</i> sp.	0.0714	0.0714	0.0714	0.0721	0.0714	0.0721	0.0644	0.0669	0.0650	0.0547														
<i>Montipora</i> sp.1	0.0618	0.0650	0.0618	0.0624	0.0618	0.0624	0.0515	0.0528	0.0521	0.0753	0.0335													
<i>Montipora</i> sp.2	0.0560	0.0592	0.0560	0.0553	0.0560	0.0566	0.0450	0.0470	0.0457	0.0721	0.0283	0.0090												
<i>Galaxea fascicularis</i>	0.0907	0.0940	0.0907	0.0914	0.0907	0.0914	0.0862	0.0888	0.0869	0.0772	0.0721	0.0901	0.0837											
<i>Galaxea astreata</i>	0.0894	0.0927	0.0894	0.0901	0.0894	0.0901	0.0849	0.0875	0.0856	0.0792	0.0734	0.0901	0.0837	0.0116										
<i>Galaxea</i> sp.	0.1390	0.1422	0.1390	0.1396	0.1390	0.1396	0.1345	0.1371	0.1351	0.1017	0.1178	0.1313	0.1287	0.0882	0.0779									
<i>Favites</i> sp.	0.1461	0.1493	0.1461	0.1467	0.1461	0.1461	0.1364	0.1377	0.1371	0.1480	0.1396	0.1287	0.1255	0.1564	0.1589	0.1680								
<i>Platygyra daedalea</i>	0.1017	0.1049	0.1017	0.1023	0.1017	0.1030	0.0997	0.1023	0.1004	0.1583	0.1326	0.1145	0.1126	0.1461	0.1422	0.1737	0.1795							
<i>Plesiastrea</i> sp.	0.1480	0.1512	0.1480	0.1486	0.1480	0.1493	0.1429	0.1454	0.1435	0.1879	0.1622	0.1448	0.1435	0.1834	0.1789	0.2098	0.1396	0.0566						
<i>Hydnophora contignatio</i>	0.0817	0.0849	0.0817	0.0824	0.0817	0.0817	0.0753	0.0785	0.0766	0.0965	0.0772	0.0869	0.0837	0.0856	0.0849	0.1319	0.1628	0.1422	0.1705					
<i>Pavona frondifera</i>	0.0740	0.0772	0.0740	0.0746	0.0740	0.0740	0.0650	0.0669	0.0663	0.0997	0.0779	0.0766	0.0734	0.0914	0.0901	0.1377	0.1486	0.1319	0.1602	0.0212				
<i>Sar. trocheliophorum</i>	0.2555	0.2587	0.2555	0.2561	0.2555	0.2561	0.2452	0.2465	0.2458	0.2780	0.2619	0.2445	0.2445	0.2671	0.2677	0.2909	0.2690	0.2516	0.2645	0.2748	0.2645			
<i>Nephthea erecta</i>	0.2658	0.2690	0.2658	0.2664	0.2658	0.2658	0.2619	0.2632	0.2613	0.2529	0.2484	0.2619	0.2606	0.2413	0.2420	0.2690	0.2954	0.2709	0.2857	0.2580	0.2658	0.0856		

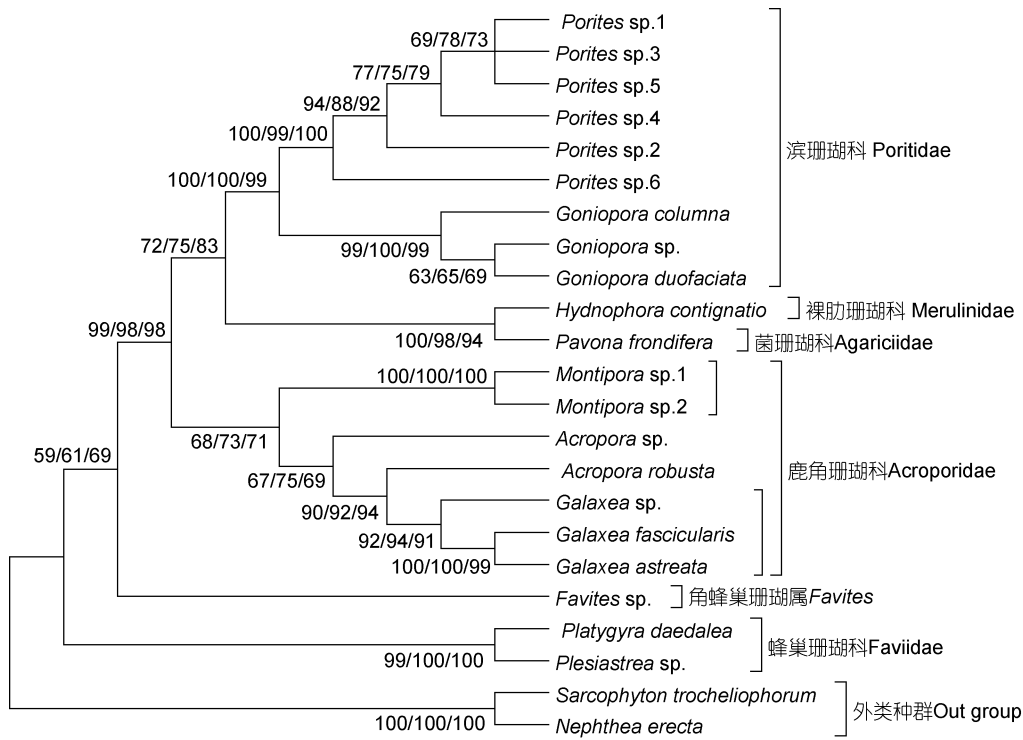


图 1 利用串联序列基于 P-distance 构建的 50%多数一致性 NJ 树

Fig.1 50% majority-rule consensus of the 1000 bootstrap NJ tree resulting from analysis of the jointed sequences data using the P-distance model

除外类种群单独形成的一支,蜂巢珊瑚整体处于树的基部。进化树主体分为两个大支,其中滨珊瑚属和角孔珊瑚属分别聚类后组成一个大支,节点支持率 100%;强壮鹿角珊瑚与盔形珊瑚属聚为姐妹群后再与其它鹿角珊瑚组成另一大支,置信度稍低。进化树也反映了某些与传统分类的差异,邻基刺柄珊瑚与十字牡丹珊瑚以极高的支持率聚在一起后,位列两个主体大分支之间。

3 讨论

3.1 序列碱基组成

通过拼接三个基因片段并对碱基进行分析发现,串联序列明显表现出 AT 偏倚特征。核苷酸碱基构成偏倚的情况在其它运用线粒体基因分析珊瑚的研究中也报道,例如在运用线粒体 CO (李晓娜等, 2012)、细胞色素 *b*(Cyt *b*)(刘丽等, 2011)等研究徐闻地区石珊瑚的论述中都提到 A+T 的含量明显大于 G+C

的含量。类似情况也在昆虫(陈振鹏等, 2007)、鱼类(彭居俐等, 2009)、爬行动物(蒲友光, 2006)¹⁾以及哺乳动物(马英, 2010)²⁾等的相关研究中出现过,说明 AT 碱基偏倚是绝大多数动物线粒体基因组组成的显著特征。

3.2 遗传距离

Hebert 等(2003)提出,利用序列有效地进行物种鉴别的关键点是种间的遗传距离必须大于种内的遗传距离,并且距离差异大约为 10 倍,最小种间距离不大于 0.020,种内的遗传距离一般应小于 0.010。在本研究中, *Porites* sp.1、sp.3、sp.4、sp.5 的三基因联合序列间最大遗传距离仅为 0.0006,均显著小于推荐值,暗示这四个样本可能是同一种,但也不排除该片段在这几个珊瑚样本中恰是其保守区的可能性。*Porites* sp.2 及 *Porites* sp.5 与其它几个滨珊瑚样本的距离介于 0.0019—0.0051 之间,但是与种内遗传距离差异并未达到 10 倍。由于 Hebert 等(2003)采用单一的 CO 做分子标记,而本文中联合了 16S rRNA、mtSSU 两个基因片段,后两者的种间最小遗传距离目前尚不明确,有待后续研究。整个珊瑚纲的种内和种间距离都比较小(Huang *et al.*, 2008; Sinniger *et al.*, 2005),在石珊瑚中,属内、属间、科间遗传距离基本呈递增趋势,从数量级上反映了关系的亲疏。所有石珊瑚中滨珊瑚属间距离差异最小,与之相反的是蜂巢珊瑚与其它石珊瑚的距离仅次于两个外类种群,且在形态上蜂巢珊瑚也发生了较明显的变化而滨珊瑚在形态上差异微小(朱弘复等, 1997; 戴昌凤等, 2009),暗示滨珊瑚在进化过程

1) 蒲友光, 2006. 乌龟和金头闭壳龟线粒体基因组全序列分析研究. 芜湖: 安徽师范大学硕士学位论文, 19—25

2) 马英, 2010. DNA 条形码技术在青海小型兽类及寄生蚤鉴定中的应用研究. 北京: 中国疾病预防控制中心预防控制中心硕士学位论文, 24—36

中基因发生的变化少于蜂巢珊瑚。另外邻基刺柄珊瑚与十字牡丹珊瑚的距离仅为 0.0212, 说明两者的亲缘关系较近, 在形态上邻基刺柄珊瑚的脊状突起也颇似牡丹珊瑚的小型板叶。

3.3 系统发育关系

三种方法构建系统发育树得到了相似的拓扑结构, 虽然三种方法基于不同的基本假设也各具其优缺点, 但是三种方法的结果相似且支持率也普遍较高, 说明研究结果是比较可信的。

从进化树可以发现, 滨珊瑚科的所有物种聚为一个大支, 且滨珊瑚属与角孔珊瑚属分别聚类, 而单独利用线粒体其它基因的研究中, 曾出现过角孔珊瑚与滨珊瑚属间聚类的情况(李晓娜等, 2012; 刘丽等, 2011), 说明在分析过程中, 将三基因联合可以提供更多的信息, Sinniger 等(2005)也曾利用线粒体 12S 和 16S rRNA 基因联合片段对群体海葵目进行分类来避免单独基因片段分类依据不足。

蜂巢珊瑚是重要的造礁珊瑚, 有学者认为蜂巢珊瑚科的多重起源造成了不同属间复杂的亲缘关系(Fukami *et al*, 2008)。图 1 中反映出蜂巢珊瑚科的角蜂巢珊瑚聚为其它珊瑚的姐妹群, 而扁脑珊瑚和同星珊瑚则聚为一支, 后者与 Huang 等(2009)、Fukami 等(2004)的研究结果类似。我国台湾学者戴昌凤等(2009)认为刺柄珊瑚属也应归属于蜂巢珊瑚科, Romano 等(1997)也得到了相似的研究结论, 但本研究中出现了新的聚类情况, 即刺柄珊瑚属的邻基刺柄珊瑚与菌珊瑚科的十字牡丹珊瑚形成一个单支。多篇研究报道中提到蜂巢珊瑚科存在侧系水平的分支进化(Huang *et al*, 2009; Fukami *et al*, 2004), 也许本文中所用的蜂巢珊瑚恰是与刺柄珊瑚属关系较远的种。另外, 研究区域蜂巢珊瑚样本有限也是该结果产生的一个重要影响因素。徐闻珊瑚礁国家级自然保护区所处海域, 没有大的洋流水团经过, 对外界幼虫的补充造成了很大的限制, 而且近年来由于环境的不断变化珊瑚优势种发生了更替, 也可能是该区蜂巢珊瑚种类较少的原因之一。

鹿角珊瑚科同样是近年来研究较多的造礁石珊瑚, 在本研究中, 所有鹿角珊瑚也聚为一支, 其中蔷薇珊瑚属的两个样本聚为单支, 鹿角珊瑚属的强壮鹿角珊瑚作为盔形珊瑚属的姐妹群, 联合另外一个鹿角珊瑚单系组成进化树主体的另一大支。在运用线粒体 Cyt *b* 研究石珊瑚系统发育关系(刘丽等, 2011)中提到, 就科间关系而言, 枇杷珊瑚科也是与鹿角珊

瑚科共同聚为一个大支的, 与 Romano 等(1997)的研究结果亦类似。

本研究通过对石珊瑚 17 个物种 21 个个体的三基因片段联合分析, 发现该串联片段能够较好地地区分各物种, 可以认为是石珊瑚的一个比较有效的分类序列。但同时作者认为, 仅依赖分子数据对珊瑚进行分类也略有不足, 因为在亲缘关系很近的类群间分子数据的差异不很明显, 而且某些类群的聚类与传统分类大相径庭, 有可能是测序产生误差造成的。但是在科一级水平的分类上还是具有较高的准确性, 故推荐将该串联片段作为较高阶元的分类条码。

参 考 文 献

- 卢圣栋, 1999. 现代分子生物学实验技术. 北京: 中国协和医科大学出版社, 61
- 朱弘复, 郑作新, 黄大卫等, 1997. 中国动物志造礁石珊瑚. 北京: 科学出版社, 27—228
- 刘 丽, 陈育盛, 李晓娜等, 2011. 基于线粒体 Cyt *b* 基因的十种石珊瑚系统发育关系研究. 广东海洋大学学报(自然科学版), 31(1): 6—11
- 齐文同, 柯叶艳, 顾红雅, 2008. 石珊瑚演化的 18S rDNA 分子生物学和形态学研究. 北京大学学报(自然科学版), 44(2): 171—176
- 李晓娜, 刘 丽, 刘楚吾, 2012. 运用线粒体 CO 基因分析 8 种石珊瑚系统发育关系. 渔业科学进展, 33(4): 129—134
- 张秀梅, 柳广东, 高天翔等, 2002. 绒螯蟹种质资源研究进展. 青岛海洋大学学报, 32(4): 533—542
- 陈振鹏, 周善义, 2007. 切叶蚊亚科七属十二种的分子系统学研究. 昆虫学报, 50(4): 395—404
- 彭居俐, 王绪祯, 王 丁等, 2009. 基于线粒体 CO 基因序列的 DNA 条形码在鲤科鲷属鱼类物种鉴定中的应用. 水生生物学报, 33(2): 271—276
- 戴昌凤, 洪圣雯, 2009. 台湾珊瑚图鉴. 台北市: 猫头鹰出版社, 36—256
- Chen C A, Yu J K, 2000. Universal Primers for Amplification of Mitochondrial Small Subunit Ribosomal RNA-Encoding Gene in Scleractinian Corals. *Marine Biotechnology*, 2: 146—153
- Forsman Z H, Barshis D J, Hunter C L *et al*, 2009. Shape-shifting corals: Molecular markers show morphology is evolutionarily plastic in *Porites*. *BMC Evolutionary Biology*, 9: 45
- Forsman Z H, Concepcion G T, Haverkort R D, 2008. Genetic and morphological characterization of a coral Species of Concern, *Montipora dilatata*, in Kaneohe Bay, Oahu, Hawaii. Hawaii Institute of Marine Biology: Pacific Islands Region Species of Concern Project Report: 1—17
- Fukami H, Budd A F, Paulay G *et al*, 2004. Conventional taxonomy obscures deep divergence between Pacific and Atlantic corals. *Nature*, 427: 832—835

- Fukami H, Chen C A, Bodd F *et al*, 2008. Mitochondrial and Nuclear Genes Suggest that Stony Corals are Monophyletic but Most Families of Stony Corals are not (Order Scleractinia, Class Anthozoa, Phylum Cnidaria). *Plos One*, 3(9): 1—9
- Hebert C, 1972. Etude systematique de quelques zoanthaires temperes et tropicaux. *Tehtys Suppl*, 3: 69—156
- Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L *et al*, 2003. Biological identification through DNA barcodes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 270: 313—321
- Huang D, Meier R, Todd P A *et al*, 2008. Slow mitochondrial CO Sequence evolution at the base of the Metazoa tree and its implications for DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66: 167—174
- Huang D, Mrier R, Todd P A *et al*, 2009. More evidence for pervasive paraphyly in scleractinian corals-Systematic study of Southeast Asian Faviidae (Cnidaria Scleractinia) based on molecular and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50: 102—116
- Lwowsky F, 1913. Revision der Gattung *Sidisia* Gray (*Epizoanthus auct.*). Ein Beitrag zur Kenntnis der Zoanthiden. *Zoologische Jahrbücher für Systematik, Ökologie und Geographie der Tiere*, 34: 557—614
- Romanno S L, Palumbi S R, 1997. Molecular evolution of a portion of the mitochondrial 16S ribosomal gene region in Scleractinian Corals. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 5: 97—411
- Ryland J S, Lancaster J E, 2004. A review of zoanthid nematocyst types and their population structure. *Hydrobiologia*, 530/531: 179—187
- Sinniger F, Montoya-Burgos J I, Chevaldone P *et al*, 2005. Phylogeny of the order Zoantharia (Anthozoa, Hexacorallia) based on the mitochondrial ribosomal genes. *Marine Biology*, 147: 1121—1128
- Veron Jen, 1995. Corals in space and time: the biogeography and evolution of the Scleractinia. Ithaca, New York: Comstock/Cornell University Press, 1—321
- Wells J W, 1956. Scleractinia. In: Moore R C ed. *Treatise on Invertebrate Paleontology. Part F. Coelelterata*. Geological Society of America and University of Kansas Press, Lawrence, F328—F444

MOLECULAR SYSTEMATICS STUDY OF SCLERACTINIAN BASED ON MITCHONDRIAL GENES

LIU Li, LI Xiao-Na, CHEN Yu-Sheng, LIU Chu-Wu

(Fisheries College, Guangdong Ocean University, Key Laboratory of Aquaculture in South China Sea for Aquatic Economic Animal, Regular High Education Institution of Guangdong Province, Zhanjiang, 524025)

Abstract Scleractinian was known for its chaotic and difficult morphological identification. DNA barcoding may help for examining such troublesome taxa. The mitochondrial cytochrome oxidase subunit (CO₁), mitochondrial 16S and 12S rRNA (mt SSU) genes was always used as standard molecular markers. Here, a total of 21 single individuals of 17 species pertaining to 10 genera of Scleractinian, collected from Xuwen, Guangdong Province, were obtained and combined partial sequences of these three genes, then the base ratio and variations were analyzed using MEGA 5.0. The result indicated that the averaged A+T content of this combined region accounted for 60%, obviously higher than that of G+C. Also the average Kimura-2-parameter (K2P) distances were conducted. Distance within the same genus was much closer than that of different genus ones. The results showed that the base ratio of Scleractinian mitochondrial gene sequences also obey the rule biased of AT. Well the genetic evolutionary relationship among samples was quantified according to distances analysis. Phylogenetic analysis was carried out with different methods, including neighbor-joining, maximum parsimony and maximum likelihood. The topology of each final trees revealed that molecular systematics is not complete in accordance with traditional taxonomy, display classification based on morphological data may be limited by skeleton plasticity. We discuss advantages and disadvantages of the combined sequence as barcodes for scleractinian, and recommend that this marker be considered for scleractinian higher level phylogenetic analysis.

Key words Scleractinian, Combined analysis, Molecular systematics, Genetic evolutionary relationship