

浙江新昌光唇鱼(*Acrossocheilus*)CO 和 D-loop 基因克隆及系统发育分析*

潘娜¹ 苗亮¹ 李星云¹ 郭晓飞¹ 赵亮¹ 陈炯¹ 张玉明² 吕益龙²

(1. 宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室 宁波 315211; 2. 浙江新昌水利水电局 新昌 312500)

摘要 采用扩增 CO₁、D-loop 序列、进行序列比对和系统树分析并结合形态特征观察的方法,研究了浙江新昌光唇鱼(*Acrossocheilus*)的系统分类和种类鉴定。形态特征结果表明,新昌光唇鱼具有光唇鱼属鱼类的基本特征;扩增得到 CO₁ 序列全长 691bp, D-loop 序列全长 931—944bp, A+T 含量两基因序列都高于 G+C (A+T 的含量分别为 57.30%—57.80%和 65.30%—65.90%), G 的含量在四种碱基中最低; CO₁ 序列有 6 个碱基位点存在转换,而 D-loop 则存在多个碱基的转换、颠换、缺失或插入位点。浙江新昌光唇鱼群体内 CO₁、D-loop 基因的平均遗传距离分别为 0.003、0.005;基于 CO₁ 和 D-loop 序列构建的 NJ 法系统树均显示新昌光唇鱼与温州光唇鱼(*A. wenchowensis*)形成一个紧密的簇,序列相似性分别为 99.94%和 99.36%,遗传距离分别为 0.000、0.011,未达到种间分化水平(遗传距离大于 0.05),表明新昌光唇鱼与温州光唇鱼为同一种,且根据形态特征可以断定为二个不同的地理群体,而 D-loop 序列因进化速度较快更适于光唇鱼属种内及近缘物种的种间亲缘关系的研究。研究结果既有助于新昌光唇鱼资源的开发利用,又可为研究光唇鱼类的分类提供参考资料。

关键词 光唇鱼; CO₁ 基因; D-loop 基因; 序列分析; 系统发育分析

中图分类号 Q346 doi: 10.11693/hyhz20140900235

光唇鱼是对鲤形目、鲤科、鲃亚科、光唇鱼属鱼类的统称,俗称淡水石斑鱼、罗丝鱼等,主要分布于我国浙江、江苏、安徽、福建及台湾等地的山涧溪流和江河中上游等急流环境中,其成鱼体长可达 15—20cm,体侧具有 6 条垂直条纹,体色鲜艳,具有较高的观赏价值,同时其肉质细嫩、鲜美,很受消费者的欢迎(伍献文, 1977; 毛节荣等, 1991; 冀德伟等, 2009)。目前,光唇鱼属已明确的种和亚种有 21 个,主要是采用形态学和生物学的物种概念来进行光唇鱼属物种的判别,但对其系统发育和分类地位研究较少,其命名方式也不统一:有根据形态特征来命名的,如光唇鱼(*Acrossocheilus fasciatus*)、薄颌光唇鱼(*Acrossocheilus kreyenbergii*)、宽口光唇鱼(*Acrossocheilus monticola*)等(朱松泉, 1995);又有

依产地来命名的,如温州光唇鱼(*Acrossocheilus wenchowensis*)、石宾光唇鱼(*Acrossocheilus paradoxus*)、北江光唇鱼(*Acrossocheilus beijiangensis*)等(方世勋等, 1981; 陈湘麟, 1991; 单乡红等, 2000)。浙江省新昌县境内的山涧溪流中所产的光唇鱼,近年来由于环境污染、生态环境的破坏等原因,野生资源急剧减少,有关学者对其进行了生长发育、性腺成熟、繁殖行为等方面的研究(张玉明等, 2010a; 姜建湖等, 2012, 2013),并实现了全人工育苗,目前在当地人工养殖产业已形成一定规模,并逐渐向周边辐射,成为一种新兴的水产养殖品种,社会效益显著。对新昌光唇鱼,除生殖、发育方面外,目前在营养组成与评价、病害检测与防治、养殖技术等方面也已有一些研究(冀德伟等, 2009; 张玉明等, 2010b, c),但尚未有关

* 国家星火计划项目, 2011GA701001 号; 浙江省科技厅重大科技专项遗传育种项目, 2012C12907 号; 浙江省海洋与渔业项目, 浙海渔计[2012]83 号。潘娜, 硕士研究生, E-mail: pnajx16@163.com

通讯作者: 李星云, 教授, 博士生导师, E-mail: liminyun@nbu.edu.cn

收稿日期: 2014-09-01, 收修改稿日期: 2014-10-12

于其分类地位和种类鉴定方面的资料。

在鱼类分类和鉴定中,传统的形态分类方法有一定的局限性。随着分子生物学技术的发展,基于核苷酸序列分析的分子系统学已成为生物分类和系统发育研究中的一种重要方法。在各种分子标记中,线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)具有结构简单、几乎不发生重组、呈母系遗传、进化速度快等特点,已经成为分子系统学研究中应用最为广泛和有效的分子检测标记之一(肖武汉等, 2000; 赵凯, 2006)。同时由于 mtDNA 的特点,利用其检测地理隔离在鱼类群体间产生的遗传差异,已成为近年来鱼类分子遗传学研究的热点之一(Danzman *et al.*, 1991; 杨金权等, 2003; Liu *et al.*, 2010)。尽管传统的形态标记、同工酶分析等已成功应用于鱼类种群的识别,但对于多数鱼类来说,仍难以揭示出一些重要的遗传变异,而 mtDNA 的丰富变异可作为类群识别的基础(郭新红等, 2004)。为了获得比较准确的物种系统发生关系,近年来研究者一般采用多个分子标记相结合的方法构建比较客观的系统进化树(陈四海等, 2011)。本研究扩增了浙江新昌光唇鱼的线粒体 CO 和 D-loop 序列并进行分子系统发育和进化树分析,结合形态特征观察,探讨新昌光唇鱼的分类地位,研究结果可为光唇属鱼类的分类提供理论依据,并为今后新昌光唇鱼资源的开发和利用提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 材料

2013 年 6 月从浙江省新昌县山涧溪流中采捕野生光唇鱼样本共 14 尾,每尾个体均用 HT157 型动物标签(广州洪腾条码技术有限公司)进行活体标记后剪取少量尾鳍,液氮速冻后 -80°C 保存用于提取 DNA。

1.2 方法

对新昌光唇鱼进行外部形态的观察;然后对其进行常规的测量,包括头长、体高、吻长、眼后头长、眼间距、眼径、背鳍式、臀鳍式、侧线鳞、鳃耙。测量数据用 SPSS 软件进行分析。

以常规酚-氯仿法从鳍条中提取 DNA (Sambrook *et al.*, 1989)。根据温州光唇鱼(*A. wenchowensis*)线粒体全序列(GenBank 登录号: NC_020145)设计 CO 扩增引物;使用黄志坚等(2010)设计的鱼类 D-loop 扩增引物,引物序列见表 1。所用引物均由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

PCR 扩增体系为: $2 \times \text{Taq Premix-Dye } 10\mu\text{L}$ (上海

博彩生物科技有限公司), DNA 模板 $2\mu\text{L}$ ($50-100\text{ng}/\mu\text{L}$), 正、反向引物各 $1\mu\text{L}$, 加 ddH₂O 至 $20\mu\text{L}$ 。扩增程序为: 94°C 变性 5min; 94°C 变性 40s, 退火 1min(退火温度见表 1), 72°C 延伸 1min, 循环 30 次; 72°C 延伸 10min。用 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

表 1 CO II 和 D-loop 序列扩增引物
Tab.1 The amplification primers of CO and D-loop sequences

| 引物名称 | 引物序列(5' 3') | 退火温度($^{\circ}\text{C}$) |
|-----------|-------------------------|----------------------------|
| CO (+) | GTCTTTTAGCCCAAGCT | 48 |
| CO (-) | GTCTGGAGTCACCAATCT | |
| D-loop(+) | CACCCYTRRCTCCAAAGCYA | 57 |
| D-loop(-) | GGTGCGGRKACTTGCATGTRTAA | |

用胶回收试剂盒(上海博彩生物科技有限公司)回收 PCR 产物,与 pMD-19 载体(TaKaRa)连接后转化入大肠杆菌感受态细胞,蓝白斑筛选后挑取阳性克隆送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

用 Clustal X 软件对获取的浙江新昌光唇鱼 CO、D-loop 序列与 GenBank 中获取的其它鲤科鱼类 CO 和 D-loop 序列(表 2)进行多重比对;用 MEGA 4.0 软件(Tamura *et al.*, 2007)进行各碱基含量和变异情况分析,用 Kimura 2-parameter 模型计算序列遗传距离,并以鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*, 登录号为 NC_018045)为外群,构建邻接法(NJ)分子系统树。

2 结果

2.1 外部形态特征

采集的浙江新昌野生光唇鱼见图 1。经观察,鱼体长而侧扁,腹部比较平直或稍呈弧形,背部上半部分为灰黑色,下半部分有的带点黄色,腹面为白色;鼻孔前略成凹陷,头长 $[(2.5 \pm 0.2)\text{cm}]$ 小于体高 $[(2.6 \pm 0.3)\text{cm}]$ 。吻钝圆,向前突出,吻长 $[(0.9 \pm 0.1)\text{cm}]$ 小于眼后头长 $[(1.1 \pm 0.1)\text{cm}]$;口下位,口裂呈浅马蹄形,上唇稍薄,紧贴于上颌外表,下唇分两侧瓣,较臃肿,中央相互接触;须两对,口角须略长于眼径,吻须稍短;眼间隆起,间距 $[(1.3 \pm 0.1)\text{cm}]$ 远大于眼径 $[(0.5 \pm 0.1)\text{cm}]$ 。光唇鱼的背鳍式为 D-9,背鳍末跟不分枝,背鳍膜间有黑色斑纹;臀鳍式为 A-6;侧线鳞为 39—42(6/A4—5),侧线上有副孔;鳃耙数为 14—15。有的体侧有 6 条垂直条纹,第二条垂直条纹起点位于背鳍起点下方,向下延伸至腹部;有的则隐约在尾鳍附近有 1—2 条垂直条纹;而有的则没有垂直条纹。

表 2 本研究所用的鲤科鱼类 CO II、D-loop 序列信息
Tab.2 The sequences information of CO II and D-loop used in this study

| 分类 | | 种名 Species | 序列名称 | GenBank 登陆号 | | |
|---|----------------------------|---|----------------------|-------------------------------------|--------------|-----------|
| 亚科 Subfamily | 属 Genus | | | | | |
| 鲃亚科 Barbinae | 光唇鱼属 <i>Acrossocheilus</i> | <i>Acrossocheilus wenchowensis</i> 温州光唇鱼 | CO II、D-loop | KC495074 | | |
| | | <i>Acrossocheilus barbodon</i> 多彩鲃 | CO II、D-loop | KF113879 | | |
| | | <i>Acrossocheilus paradoxus</i> 石兵光唇鱼 | D-loop | AJ300613 | | |
| | | <i>Acrossocheilus hemispinus</i> 半刺光唇鱼 | CO II、D-loop | KF113878 | | |
| | | <i>Acrossocheilus beijiangensis</i> 北江光唇鱼 | D-loop | EU697139 | | |
| | | <i>Acrossocheilus monticola</i> 宽口光唇鱼 | CO II、D-loop | NC_022145 | | |
| | | <i>Onychostoma rara</i> 稀有白甲鱼 | CO II、D-loop | NC_022869 | | |
| | | <i>Onychostoma barbatum</i> 粗须白甲鱼 | CO II、D-loop | JX646870 | | |
| | | <i>Onychostoma sinum</i> 白甲鱼 | CO II、D-loop | NC_021972 | | |
| | | <i>Onychostoma barbatulum</i> 台湾铲颌鱼 | CO II、D-loop | NC_021644 | | |
| 鲤亚科 Cyprininae | 白甲鱼属 <i>Onychostoma</i> | <i>Onychostoma macrolepis</i> 多鳞白甲鱼 | CO II、D-loop | NC_023799 | | |
| | | <i>Onychostoma alticorpus</i> 高身白甲鱼 | CO II、D-loop | NC_021473 | | |
| | | <i>Onychostoma lini</i> 小口白甲鱼 | CO II、D-loop | NC_018043 | | |
| | | <i>Puntius semifasciolatus</i> 五线无须鲃 | CO II、D-loop | KC113209 | | |
| | | <i>Sinyclocheilus grahami</i> 金线鲃 | CO II、D-loop | NC_013189 | | |
| | | <i>Sinyclocheilus altishoulderi</i> 高肩金线鲃 | CO II、D-loop | NC_013186 | | |
| | | <i>Spinibarbus sinensis</i> 中华倒刺鲃 | CO II、D-loop | KF214722 | | |
| | | <i>Scaphiodonichthys acanthopterus</i> 少鳞白甲鱼 | CO II、D-loop | JX486026 | | |
| | | <i>Carassius auratus auratus</i> 金鱼 | CO II、D-loop | AB111951 | | |
| | | <i>Carassius carassius</i> 黑鲫 | CO II | AY714387 | | |
| 野鲮亚科 Laboninae | 鲤属 <i>Cyprinus</i> | <i>Carassius auratus gibelio</i> 银鲫 | D-loop | AB377299 | | |
| | | <i>Cyprinus carpio color</i> 彩鲤 | CO II、D-loop | JX188253 | | |
| | | <i>Cyprinus carpio</i> 锦鲤 | CO II、D-loop | AP009047 | | |
| | | <i>Procypris rabaudi</i> 岩源鲤 | CO II、D-loop | EU082030 | | |
| | | <i>Labeo angra</i> 安格拉野鲮 | CO II、D-loop | AP011329 | | |
| | | <i>Labeo rohita</i> 南亚野鲮 | CO II、D-loop | JN412817 | | |
| | | <i>Megalobrama amblycephala</i> 团头鲂 | CO II、D-loop | NC_010341 | | |
| | | <i>Sinibrama macrops</i> 大眼华鲮 | CO II、D-loop | NC_020013 | | |
| | | <i>Mylopharyngodon piceus</i> 青鱼 | CO II、D-loop | NC_011141 | | |
| | | <i>Ctenopharyngodon idella</i> 草鱼 | CO II、D-loop | NC_010288 | | |
| 鲮亚科 Culterinae | 圆吻鲮属 <i>Distoechodon</i> | <i>Distoechodon tumirostris</i> 圆吻鲮 | CO II | NC_011208 | | |
| | | <i>Xenocypris davidi</i> 黄尾鲮 | CO II、D-loop | KF039718 | | |
| | | <i>Rhodeus ocellatus kurumeus</i> 高体鲮 | CO II、D-loop | AB070205 | | |
| | | <i>Gobiobotia brevibarba</i> 短须鲮 | CO II、D-loop | NC_014878 | | |
| | | <i>Sarcocheilichthys sinensis sinensis</i> 华鲮 | CO II、D-loop | KC847084 | | |
| | | <i>Squalidus wolterstorffi</i> 点纹银鲮 | CO II、D-loop | NC_022190 | | |
| | | 雅罗鱼亚科 Leuciscinae | 鲮属 <i>Xenocypris</i> | <i>Megalobrama amblycephala</i> 团头鲂 | CO II、D-loop | NC_010341 |
| | | | | <i>Sinibrama macrops</i> 大眼华鲮 | CO II、D-loop | NC_020013 |
| | | | | <i>Mylopharyngodon piceus</i> 青鱼 | CO II、D-loop | NC_011141 |
| | | | | <i>Ctenopharyngodon idella</i> 草鱼 | CO II、D-loop | NC_010288 |
| <i>Distoechodon tumirostris</i> 圆吻鲮 | CO II | | | NC_011208 | | |
| <i>Xenocypris davidi</i> 黄尾鲮 | CO II、D-loop | | | KF039718 | | |
| <i>Rhodeus ocellatus kurumeus</i> 高体鲮 | CO II、D-loop | | | AB070205 | | |
| <i>Gobiobotia brevibarba</i> 短须鲮 | CO II、D-loop | | | NC_014878 | | |
| <i>Sarcocheilichthys sinensis sinensis</i> 华鲮 | CO II、D-loop | | | KC847084 | | |
| <i>Squalidus wolterstorffi</i> 点纹银鲮 | CO II、D-loop | | | NC_022190 | | |



图1 采自浙江省新昌县溪流的光唇鱼

Fig.1 *Acrossocheilus* fish sampled from the rivers and creeks in Xinchang, Zhejiang

2.2 新昌光唇鱼 CO 和 D-loop 序列特征

经测序, CO 引物在浙江新昌光唇鱼中的扩增产物长度为 775bp, 其中 CO 基因序列全长均为 691bp; 14 尾新昌光唇鱼的 CO 序列相似度为 99.94%, 只存在 6 个位点的碱基转换, 其中 T/C 和 A/G 转换位点各 3 个。新昌光唇鱼 CO 序列中碱基 A、T、G、C 的平均组成分别为 31.20%、26.40%、15.30%和 27.10%, A+T 含量(57.60%)高于 G+C 含量(42.40%); CO 序列的碱基组成均有明显的偏向性, G 的含量明显低于其它三种碱基。

D-loop 引物在新昌光唇鱼中的扩增产物长度为 1112—1118bp, 其中 D-loop 基因序列全长为 933—939bp; 新昌光唇鱼群体 D-loop 序列的相似度为

99.38%, 有 22 个转换(A-G、T-C)位点、3 个颠换(A-C、A-T)位点和 8 个插入或者缺失(A、T)位点; 其中碱基 A、T、G、C 的平均组成分别为 34.50%、31.20%、12.80%和 21.50%, A+T 含量(65.70%)大于 G+C 含量(34.30%); D-loop 序列中也是 G 的含量明显低于其它三种碱基。

浙江新昌光唇鱼的 CO 基因均编码 230 个氨基酸, 都含有一个起始密码子 ATG 和不完整的终止密码子 T。其 CO 和 D-loop 遗传距离见表 3, 其中新昌光唇鱼群体内 CO、D-loop 基因的平均遗传距离分别为 0.003、0.005; 与表 2 中其它鲤科鱼类的遗传距离分析结果显示, 浙江新昌光唇鱼与温州光唇鱼 (*A. wenchowensis*) 的遗传距离最近, CO、D-loop 序列遗传距离分别为 0.000、0.011。

表3 新昌光唇鱼 CO II 基因(下三角)和 D-loop 基因(上三角)序列的遗传距离

Tab.3 Pairwise genetic distance of CO gene (below diagonal) and D-loop gene (above diagonal) in *ZJxinchang*

| 编号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 1 | — | 0.010 | 0.013 | 0.010 | 0.010 | 0.011 | 0.012 | 0.012 | 0.012 | 0.010 | 0.010 | 0.012 | 0.013 | 0.012 |
| 2 | 0.004 | — | 0.003 | 0.007 | 0.000 | 0.001 | 0.002 | 0.002 | 0.002 | 0.000 | 0.000 | 0.002 | 0.003 | 0.007 |
| 3 | 0.003 | 0.001 | — | 0.010 | 0.003 | 0.004 | 0.005 | 0.003 | 0.003 | 0.003 | 0.003 | 0.003 | 0.004 | 0.010 |
| 4 | 0.003 | 0.001 | 0.000 | — | 0.007 | 0.008 | 0.009 | 0.009 | 0.009 | 0.007 | 0.007 | 0.009 | 0.010 | 0.007 |
| 5 | 0.003 | 0.001 | 0.000 | 0.000 | — | 0.001 | 0.002 | 0.002 | 0.002 | 0.000 | 0.000 | 0.002 | 0.003 | 0.007 |
| 6 | 0.003 | 0.001 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | — | 0.003 | 0.003 | 0.003 | 0.001 | 0.001 | 0.003 | 0.004 | 0.008 |
| 7 | 0.004 | 0.003 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | 0.001 | — | 0.004 | 0.004 | 0.002 | 0.002 | 0.004 | 0.005 | 0.007 |
| 8 | 0.006 | 0.004 | 0.003 | 0.003 | 0.003 | 0.003 | 0.004 | — | 0.002 | 0.002 | 0.002 | 0.000 | 0.003 | 0.009 |
| 9 | 0.003 | 0.001 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.001 | 0.003 | — | 0.002 | 0.002 | 0.002 | 0.003 | 0.009 |
| 10 | 0.003 | 0.001 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.001 | 0.003 | 0.000 | — | 0.000 | 0.002 | 0.003 | 0.007 |
| 11 | 0.003 | 0.001 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.001 | 0.003 | 0.000 | 0.000 | — | 0.002 | 0.003 | 0.007 |
| 12 | 0.003 | 0.001 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.001 | 0.003 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | — | 0.003 | 0.009 |
| 13 | 0.003 | 0.001 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.001 | 0.003 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | — | 0.010 |
| 14 | 0.003 | 0.001 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.001 | 0.003 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | — |

1—14 为新昌光唇鱼的不同个体

2.3 基于 CO 和 D-loop 序列的系统发育分析

图 2 为基于 CO 序列的新昌光唇鱼及其它鲤科鱼类的邻接法(NJ)分子系统发育关系树, 结果显示: 光唇鱼属和白甲鱼属的 12 种鱼聚为一个大簇; 其中温州光唇鱼与新昌光唇鱼形成一个紧密的簇, 二者亲缘性非常近, 序列比对显示其 CO 序列同源性达到 99.94%。之后再与半刺光唇鱼、多彩鲃、台湾铲

颌鱼、白甲鱼、粗须白甲鱼、小口白甲鱼和多鳞白甲鱼聚为一簇; 而宽口光唇鱼、稀有白甲鱼和高身白甲鱼三者则单独聚为一簇。另外, 鲤科的各亚科形成 2 个大簇, 其中鲃亚科、鲤亚科与野鲮亚科聚为一个大簇, 而鮡亚科、雅罗鱼亚科、鳅鲇亚科、鲴亚科与鮠亚科聚为另一个大簇。另外, 鲤科的鲮鱼亚科与外类群鲈鱼形成一簇。

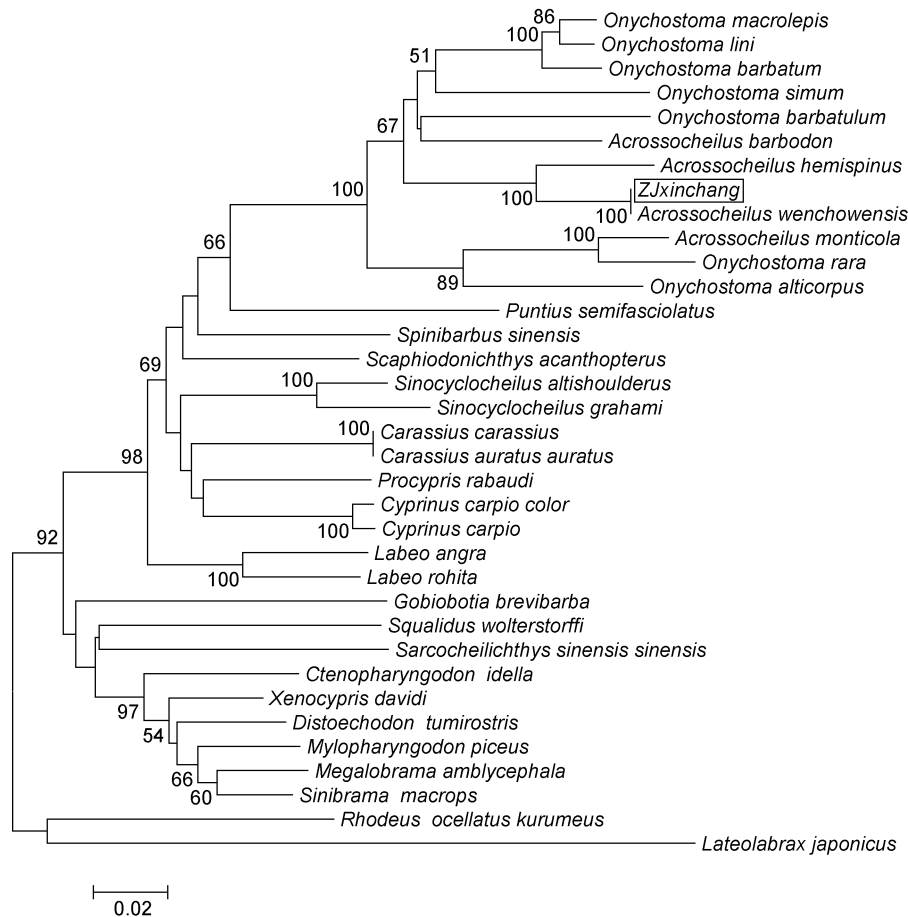


图 2 基于鲤科鱼类线粒体 DNA CO 序列构建的 NJ 系统发育树

Fig.2 Phylogenetic tree on CO sequences of Cyprinidae fishes constructed by Neighbore-Joining method
Bootstrap=1000, 支持率<50%的未显示, ZJxinchang 表示浙江新昌光唇鱼

图 3 为基于 D-loop 序列的新昌及其它鲤科鱼类的邻接法(NJ)分子系统发育关系树, 结果显示: 新昌光唇鱼与温州光唇鱼形成一个紧密的簇, 序列比对显示其 D-loop 序列同源性达到 99.36%; 光唇鱼属和白甲鱼属分别相聚后再聚为一簇, 但稀有白甲鱼和高身白甲鱼聚在光唇鱼属的簇中; 鲤科各亚科形成 2 个大簇, 其中鲃亚科、鲤亚科与野鲮亚科聚为一簇, 而鮡亚科、雅罗鱼亚科、鳅鲇亚科、鲮鱼亚科、鲴亚科与鮠亚科聚为另一簇。

3 讨论

目前对光唇鱼类的种类划分仍存在一定分歧, 如伍献文(1977)鉴定了 19 个种和亚种, 并且根据下唇侧瓣的位置不同, 将其划分为光唇鱼亚属(*Acrossocheilus*)和厚唇鱼亚属(*Lissochilichthys*)两个亚属; Kottelat(2000)则将光唇鱼属划分为有垂直条纹和无垂直条纹的两个类群, 并认为有垂直条纹类群是狭义的光唇鱼属, 无垂直条纹的种类可能属于吻

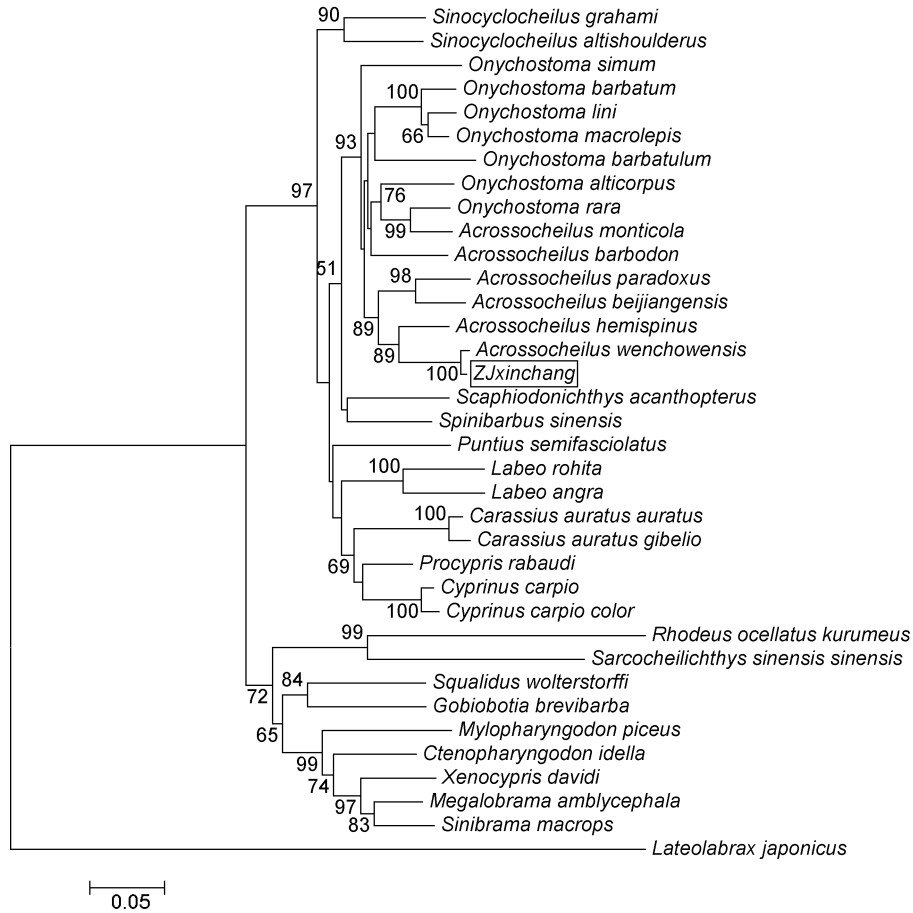


图3 基于线粒体 DNA D-loop 序列构建的鲤科 NJ 系统发育树

Fig.3 Phylogenetic tree on D-loop sequences of Cyprinidae fishes constructed by Neighbour-Joining method
Bootstrap=1000, 支持率<50%的未显示, ZJxinchang 表示浙江新昌光唇鱼

孔鲃属(*Poropuntius*); 袁乐洋(2005)也认为无垂直条纹类群可能不属于光唇鱼属。另外, 赵俊等(1997)根据沅江的标本描述了光唇鱼属新种吉首光唇鱼(*A. jishouensis*), 袁乐洋(2005)也认为吉首光唇鱼是一个有效的种, 但单乡红等(2000)的《中国动物志》中却未确立其物种有效性。究其原因, 一方面光唇鱼属鱼类分布在中国长江以及长江以南各个水系, 且有些物种在多个水系中均有分布, 环境因子会造成种内的不同地理群体间产生一些差异, 再加上种内个体变异、雌雄两性差异以及传统形态特征测量中的人为误差, 往往会使物种鉴定工作变得异常困难, 并且容易产生鉴定错误(袁乐洋, 2005)。本研究中的新昌光唇鱼具有光唇鱼属鱼类的基本特征, 如唇肉质, 包于上下颌外表, 下唇分两侧瓣, 须两对, 背鳍末根不分枝等, 从形态特征上来看, 新昌光唇鱼与已明确种的温州光唇鱼(*A. wenchowensis*)最为相似。但根据袁乐洋(2005)的描述, 温州光唇鱼(*A. wenchowensis*)的雄

鱼眼眶骨前缘有珠星分布, 雌鱼无珠星; 雄鱼垂直条纹仅限于侧线以上, 沿侧线有一条明显的黑色纵纹, 雌鱼纵纹隐约可见, 而采集的 14 尾新昌光唇鱼都有珠星, 有些没有垂直条纹, 故单凭外部形态特征难以准确对新昌光唇鱼进行判定。

线粒体 DNA 是细胞质中具自主复制、转录和翻译能力的闭合环状双链 DNA, 包括一条重链和一条轻链(李殿香, 2000)。mtDNA 具有分子结构简单、几乎不发生重组等特点, 已经成为分子系统学研究的重要标记(肖武汉等, 2000)。其中细胞色素氧化酶亚基 (CO) 是线粒体 13 种编码基因之一, 已有较多使用 CO 序列对鱼类进行系统进化和分类研究的报导, 如凌去非等(2006)对 25 种鲤科鱼类的 CO 系统进化分析显示雅罗鱼亚科可分为北方和东亚两个类群, 北方类群形成一单系群, 而东亚类群则与鲃亚科、鲃亚科、鲃亚科合为一单系群, 并推断鲃亚科、鲃亚科、鲃亚科可能是由原始的雅罗鱼亚科鱼类在东

亚派生的类群; D-loop 区域是线粒体中唯一的非编码区, 不受选择压力的影响, 进化速度比较快, 遗传变异较大, 适合于近缘种及种内不同群体间的遗传差异分析(Rosel *et al.*, 1995; Gatt *et al.*, 2000; Zrdoya *et al.*, 2000; 陈姝君等, 2008), 如 Murakami 等(2001)分析了日本 169 个鲫鱼(*Carassius auratus*)个体的 D-loop 序列, 证明了传统形态分类学将白鲫(*Carassius auratus cuvieri*)定位为鲫鱼的一个亚种的论断。这些研究结果都表明基于线粒体 CO 和 D-loop 序列的系统发育分析可以成为传统依据形态学和生物学特征进行物种分类的有效补充。

在基于 CO 和 D-loop 序列构建的 NJ 系统树中, 新昌光唇鱼均与温州光唇鱼(*A. wenchowensis*)形成一个紧密的簇, 二者 CO 、D-loop 序列的相似性分别为 99.94%和 99.36%、遗传距离分别为 0.000 和 0.011, 均小于 Nei(1987)提出的种间遗传距离大于 0.050 的标准, 因此断定浙江省新昌县采集的光唇鱼与温州光唇鱼(*A. wenchowensis*)为同一种, 但新昌光唇鱼和温州光唇鱼(*A. wenchowensis*)模式种在形态上有一些不同, 可能是由于环境因素造成的不同地理群体间的差异, 如袁乐洋(2005)描述的浙江和福建两地不同地理群体的温州光唇鱼(*A. wenchowensis*)存在较大差别, 差别主要在福建群体体侧有 5—6 条与体轴垂直的黑色条纹, 浙江群体则有 6 条垂直条纹, 前者第二条垂直条纹起点位于背鳍末根不分支鳍条基部之后, 后者第二条垂直条纹起点位于背鳍起点处等, 而本研究中的新昌群体则有些有 6 条垂直条纹, 第二条垂直条纹起点位于背鳍起点处, 有的则隐约在臀鳍与尾鳍之间有 1—2 条垂直条纹, 而有些没有垂直条纹。

本研究所作的系统发育分析显示光唇鱼属与白甲鱼属有较近的亲缘关系, 这与 Wang 等(2007)的 RAG2 序列系统发育分析结果一致。但系统树中两个属的有些种类混杂在一起, 究竟是这些种类有共同的进化起源还是样本采集时的物种鉴定问题, 仍有待进一步深入研究。

光唇鱼作为一种新兴的小型淡水经济鱼类, 具有较大的开发利用价值。笔者在形态特征观察的基础上, 通过扩增 CO 和 D-loop 序列并进行序列比对和系统树分析, 确定了新昌光唇鱼和温州光唇鱼(*A. wenchowensis*)为同一种, 且为二个不同的地理群体, 这既有助于今后新昌光唇鱼的资源开发利用, 又可为研究光唇鱼类的分类提供参考资料。

参 考 文 献

- 毛节荣, 徐寿山, 1991. 浙江动物志: 鱼类. 杭州: 浙江科学技术出版社, 106—107
- 方世勋, 郑葆珊, 1981. 广西淡水鱼类志. 南宁: 广西人民出版社, 67—111
- 朱松泉, 1995. 中国淡水鱼类检索. 南京: 江苏科学技术出版社, 58—59
- 伍献文, 1977. 中国鲤科鱼类志. 上海: 上海科技出版社, 274—277
- 李殿香, 2000. 鱼类线粒体 DNA 研究技术在鱼类系统中的应用. 山东教育学院学报, (1): 60—65
- 杨金权, 刘焕章, 2003. 两种鳞科鱼类在长江和珠江流域 Cyt b 基因序列变异性分析. 水生生物学报, 27(3): 253—257
- 肖武汉, 张亚平, 2000. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化. 水生生物学报, 24(4): 384—391
- 张玉明, 闫家强, 2010a. 光唇鱼胚胎发育的研究. 绍兴文理学院学报, 30(9): 44—48
- 张玉明, 周志明, 潘晓艺, 2010b. 光唇鱼赤皮病病原研究. 上海海洋大学学报, 19(5): 631—634
- 张玉明, 姜建湖, 2010c. 光唇鱼人工繁殖研究. 浙江海洋学院学报, 29(3): 211—214
- 陈四海, 区又君, 李加儿, 2011. 鱼类线粒体 DNA 及其研究进展. 生物技术通报, 3: 13—20
- 陈姝君, 赫崇波, 木云雷等, 2008. 硬骨鱼类线粒体基因系统发育信息效率分析. 中国水产科学, 15(1): 12—23
- 陈湘霖, 1991. 广东淡水鱼类志. 广州: 广东科技出版社, 60—90
- 单乡红, 林人端, 乐佩琦等, 2000. 中国动物志. 北京: 科学出版社, 52—84
- 赵 凯, 2006. 鱼类线粒体 DNA(mt DNA)及其在分类系统中的应用. 青海大学学报, 24(2): 49—53
- 赵 俊, 陈 湘, 李文卫, 1997. 光唇鱼属鱼类一新种. 动物学研究, 18(3): 243—246
- 姜建湖, 张德明, 竺俊全等, 2012. 光唇鱼(*Acrossocheilus fasciatus*)胚胎及仔、稚鱼的发育. 海洋与湖沼, 43(2): 280—287
- 姜建湖, 戴海平, 竺俊全等, 2013. 养殖光唇鱼(*Acrossocheilus fasciatus*)卵巢发育的组织学观察. 海洋与湖沼, 44(2): 348—354
- 袁乐洋, 2005. 中国光唇鱼属鱼类分类整理. 南昌: 南昌大学硕士学位论文, 13—79
- 凌去非, 李思发, 2006. 鲤科 25 种鱼类线粒体 CO 基因序列差异及其系统进化关系. 水产学报, 6(30): 747—752
- 郭新红, 刘少军, 刘 巧等, 2004. 鱼类线粒体 DNA 研究新进展. 遗传学报, 31(9): 983—1000
- 黄志坚, 徐晓鹏, 唐晶晶等, 2010. 鱼类线粒体 DNA 控制区扩增引物及其设计方法和应用: 中国, ZL200710028242.1. 2010-8-25
- 冀德伟, 李明云, 史雨红等, 2009. 光唇鱼的肌肉营养组成与

- 评价. 营养学报, 31(3): 298—301
- Danzman R G, Ihssen P E, Hebert P N D, 1991. Genetic discrimination of wild and hatchery populations of brook charr, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill), in Ontario using mitochondrial DNA analysis. *Journal of Fish Biology*, 39(suppl.A): 69—77
- Gatt M H, Ferguson M M, Liskauskas A P, 2000. Comparison of control region sequencing and fragment RFLP analysis for resolving mitochondrial DNA variation and phylogenetic relationships among Great Lakes Walleyes. *Trans American Fish Soc*, 129(6): 1288—1299
- Kottelat M, 2000. Diagnoses of a new genus and 64 new species of fishes from Laos (Teleostei: Cyprinidae, Balitoridae, Bagridae, Syngnathidae, Chaudhuriidae and Tetraodontidae). *Journal of South Asian Natural History*, 5(1): 37—82
- Liu H Z, Yang J Q, Tang Q Y, 2010. Estimated evolutionary tempo of east Asian gobionid fishes (Teleostei: Cyprinidae) from mitochondrial DNA sequence data. *Chinese Science Bulletin*, 55(15): 1501—1510
- Murakami M, Matsuba C, Fujitani H, 2001. The maternal origins of the triploid ginbuna (*Carassius auratus langsdorfi*): phylogenetic relationships within the *C. auratus* taxa by partial mitochondrial D-loop sequencing. *Genes Genet Syst*, 76: 25—32
- Nei M, 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press, 448—512
- Rosel P E, Dizon A E, Haygood M G, 1995. Variability of the mitochondrial control in populations of the harbour porpoise, *Phocoena phocoena*, on interoceanic and regional scales. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52: 1421—1429
- Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 20—25
- Tamura K, Dudley J, Nei M *et al*, 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 1596—1599
- Wang X Z, Li J B, He S P, 2007. Molecular evidence for the monophyly of East Asian groups of Cyprinidae (Teleostei: Cypriniformes) derived from the nuclear recombination activating gene 2 sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42: 157—170
- Zrdoya R, Meyer A, 2000. Mitochondrial evidence on the phylogenetic position of caecilians (Amphibia: Gymnophiona). *Genetics*, 2: 765—775

MITOCHONDRIAL CO_I AND D-LOOP CLONING AND THE PHYLOGENETIC POSITION OF *ACROSSOCHEILUS* FISH FROM XINCHANG IN ZHEJIANG PROVINCE

PAN Na¹, MIAO Liang¹, LI Ming-Yun¹, GUO Xiao-Fei¹, ZHAO Liang¹,
CHEN Jiong¹, ZHANG Yu-Ming², LV Yi-Long²

(1. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China;
2. The Water Conservancy Bureau of Xinchang County, Xinchang 312500, China)

Abstract To clarify the taxonomy of an *Acrossocheilus* fish (denoted by *ZJxinchang*) captured from Xinchang, Zhejiang Province, China, by combining morphological observation, we amplified and analyzed the mitochondrial CO_I and D-loop gene and constructed phylogenetic trees. *ZJxinchang* was similar to *Acrossocheilus* in external morphology. The entire CO_I and D-loop sequences were 691bp and 931—944bp, respectively. The content of A+T was higher than G+C in both CO_I and D-loop. The proportion of A+T were 57.30%—57.80% and 65.30%—65.90%, and the content of G was the lowest in the four bases. Only six transition sites in CO_I gene, and several variation sites (transition, transversion, deletion, or insertion) in D-loop were determined. The average genetic distances of CO_I and D-loop genes among *ZJxinchang* groups were respectively 0.003 and 0.005. Phylogenetic tree (NJ method) based on CO_I and D-loop show that *ZJxinchang* and *Acrossocheilus wenchowensis* cluster closely, and the sequence similarity between them were 99.94% and 99.36% for CO_I and D-loop, respectively. The genetic distances of CO_I and D-loop between *ZJxinchang* and *A. wenchowensis* were 0.000 and 0.011, respectively; both are below species' divergence (0.05). In addition, the results demonstrate that *ZJxinchang* is a geographical group of *A. wenchowensis*; the morphological variation between *ZJxinchang* and the type species of *A. wenchowensis* might have been resulted from different living environments. D-loop gene evolved faster than CO_I, and it is more suitable for exploring the intra- and inter-specific comparability of genus *Acrossocheilus*. Therefore, the finding shall be informative to the taxonomic study, and the utilization of Xinchang *A. wenchowensis* resources.

Key words *Acrossocheilus*; CO_I; D-loop; sequence analysis; phylogenetic analysis