

文章编号:1674-7054(2010)04-0321-06

基于 CO I 序列的 DNA 条形码 在中国南海裸胸鳝属鱼类中的应用

齐兴柱, 骆 剑, 刘志亮, 胡 静, 朱晓平, 彭艳辉, 尹绍武
(海南大学 海洋学院, 海南大学 热带生物资源教育部重点实验室, 海南 海口 570228)

摘 要: 为探讨中国南海裸胸鳝属 (*Gymnothorax*) 鱼类系统发育关系, 采用 DNA 条形码技术测定了 6 种中国南海裸胸鳝的线粒体细胞色素氧化酶亚基 I (CO I) 基因部分序列 (504 bp)。结合来自 GenBank 中的分布于日本和 3 种同样分布于中国南海的裸胸鳝属鱼类的相应同源序列进行比较分析, 用邻接法和最大简约法构建分子系统树。结果表明: (1) 504 个位点中共有 187 个核苷酸位点存在变异 (37.1%); (2) 序列变异的转换/颠换比值平均为 1.5; (3) 细斑裸胸鳝 (*Gymnothorax fimbriatus*) 与黑斑裸胸鳝 (*G. favagineus*) 之间的同源序列碱基差异只有 0.20%, 支持二者是同种异名的观点; (4) 在 NJ 树和 MP 树中, 蠕纹裸胸鳝和网纹裸胸鳝聚为一支, 位于系统树的基部位置。其余 8 种聚为另外一支, 然后又细分为 2 个较小的分支。

关键词: 裸胸鳝属; 细胞色素氧化酶亚基 I 基因; DNA 条形码; 系统树

中图分类号: Q 959

文献标志码: A

DNA 条形码技术 (DNA Barcoding) 是通过对一个标准目的基因的 DNA 序列进行分析而进行物种鉴定的技术。这个概念的原理与零售业中对商品进行辨认的商品条形码是一样的^[1-3]。自从提出 DNA 条形码的概念以来, 这种新兴分类学技术已经引起了越来越多的生物学家的关注, 它代表了生物分类学研究的一个新方向^[4]。用 DNA 条形码鉴定不同物种类群时需要选择有效的目的基因。目前, 线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (cytochrome oxidase subunit I, CO I) 基因已成为动物 DNA 条形码研究的最重要的标准基因。例如, Hebert 等 2003 年对动物界中 11 门 13 320 个物种的 CO I 基因序列进行分析, 发现其序列间的差异能够很好地区分所有研究物种, 并认为在动物界中 CO I 基因是合适的 DNA 条形码标准基因^[1-2]。Vences 等还在 2005 年利用 DNA 条形码技术对国际上分类混乱的两栖爬行类进行了准确的物种鉴别, 而且还准确无误地识别出其不同地理类群的变异^[5]。

裸胸鳝属 (*Gymnothorax*) 是硬骨鱼纲 (Osteichthyes) 鳗鲡总目 (Anguillomorpha) 鳗鲡目 (Anguilliformes) 海鳝科 (Muraenidae) 的暖水性礁栖鱼类^[6], 裸胸鳝属鱼类在中国分布于西沙群岛、海南岛、台湾等海域以及广东、福建沿海。目前国内外对裸胸鳝属鱼类的区系分类和系统发生研究报道很少^[7], 仅对它们从形态学进行了分类研究^[6,8-9], 由于裸胸鳝属鱼类分布范围广, 种类较多, 且在不同的生长阶段的体色、花纹不尽相同, 传统的形态分类多依赖于体形、齿式、体色、斑纹等性状, 这将对种类鉴定造成困难, 致使种间的分类及系统发育关系比较混乱, 产生了许多分类上的分歧, 如成庆泰等^[6]按照裸胸鳝头部斑点小于体部斑点, 以及身体上斑点和眼径大、同等大小、小将其分为 3 种裸胸鳝 [黑点裸胸鳝 *Gymnothorax melanospius* (Bleeker)、豆点裸胸鳝 *G. favagineus* (Bloch & Schneider)、细斑裸胸鳝 *G. fimbriata* (Bennett)]。而台湾

收稿日期: 2010-12-05

基金项目: 海南省教育厅高等学校科研项目 (Hjkj2010-13); 海南省自然科学基金 (808122)

作者简介: 齐兴柱 (1973-), 男, 湖南津市人, 博士, 海南大学海洋学院副教授。

通信作者: 尹绍武 (1969-), 男, 湖南石门人, 南京师范大学生命科学学院教授, 博士. E-mail: yinshaowu@163.com

学者沈世傑^[8]认为上述3种裸胸鳝是同一种,命名为豆点裸胸鳝。本研究以分布于中国南海常见的6种裸胸鳝属鱼类:黄边裸胸鳝(*Gymnothorax flavimarginatus*)、网纹裸胸鳝(*G. reticularis*),黑点裸胸鳝(*G. melanospilus*),宽带裸胸鳝(*G. rueppelliae*),细斑裸胸鳝(*G. fimbriatus*),黑斑裸胸鳝(*G. favagineus*)为研究材料,提取总DNA,PCR扩增并直接测序获得6种裸胸鳝的线粒体细胞色素氧化酶亚基I(CO I)基因部分序列(504 bp)。结合GenBank中的蠕纹裸胸鳝(*G. kidako*)、波纹裸胸鳝(*G. undulatus*)、匀斑裸胸鳝(*G. reevesi*)、拟密花裸胸鳝(*G. pseudothyrsoides*),探讨了10种裸胸鳝鱼类的分子系统发生关系,为我国南海裸胸鳝属鱼类种质资源保护和开发提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 样本来源 研究的鱼类包括网纹裸胸鳝、黄边裸胸鳝、黑点裸胸鳝、宽带裸胸鳝、细斑裸胸鳝、黑斑裸胸鳝、波纹裸胸鳝、拟密花裸胸鳝、匀斑裸胸鳝和蠕纹裸胸鳝,以日本鳗鲡和花鳗鲡作为外类群。其中,波纹裸胸鳝、拟密花裸胸鳝、匀斑裸胸鳝和蠕纹裸胸鳝(*G. kidako*)及外群花鳗鲡(*Anguilla. marmorata*)、日本鳗鲡(*A. japonica*)的CO I基因B部分序列从GenBank下载,而且,波纹裸胸鳝、拟密花裸胸鳝、匀斑裸胸鳝也来自中国南海,蠕纹裸胸鳝来自日本海域,其他裸胸鳝鱼类的为新测序列,标本均采自中国南海海域,每种鱼类样本数为3~6尾(见表1)。

表1 鱼种类及其来源

鱼种类	来源	GenBank 登录号
拟密花裸胸鳝 <i>G. pseudothyrsoides</i>	中国南海 South China Sea	EU595143
黄边裸胸鳝 <i>G. flavimarginatus</i>	中国南海 South China Sea	HM461874
网纹裸胸鳝 <i>G. reticularis</i>	中国南海 South China Sea	HM461876
黑点裸胸鳝 <i>G. melanospilus</i>	中国南海 South China Sea	HM461875
宽带裸胸鳝 <i>G. rueppelliae</i>	中国南海 South China Sea	HM461877
细斑裸胸鳝 <i>G. fimbriatus</i>	中国南海 South China Sea	HM461873
黑斑裸胸鳝 <i>G. favagineus</i>	中国南海 South China Sea	HM461872
波纹裸胸鳝 <i>G. undulatus</i>	中国南海 South China Sea	EU595146
匀斑裸胸鳝 <i>G. reevesi</i>	中国南海 South China Sea	EU595145
蠕纹裸胸鳝 <i>G. kidako</i>	日本海域 Japanese Sea	NC004417
花鳗鲡 <i>A. marmorata</i>	GenBank	AF074863
日本鳗鲡 <i>A. japonica</i>	GenBank	NC_002707

1.2 总DNA的提取 将活鱼放血后,取鱼体背部肌肉约50 mg,参照Sambrook等^[10]的酚/氯仿抽提方法稍加改进提取总DNA。采用TAE琼脂糖凝胶(质量分数为1.0%)电泳检测提取所得的总DNA,然后存放于-20℃用作PCR反应的模板。

1.3 PCR扩增mtDNA细胞色素氧化酶亚基I基因部分序列 以递交到GenBank的蠕纹裸胸鳝线粒体基因组全序列(NC004417)作为模板,用Primer 5.0软件在其细胞色素氧化酶亚基I基因序列的保守区设计一对引物,引物由上海生物技术有限公司合成,引物序列为GYM-CO I sen;5' GAACTACAGCCCAC-CGCCTA 3' GYM-CO I ant;5' GCCGAAGCCGGGTAAATA 3'。PCR反应体系总体积为25 μL,含Buffer和dNTP各2.5 μL,去离子水16.2 μL,正向和反向引物各1.3 μL,mtDNA模板1.0 μL,ExTaq酶0.2 μL。PCR反应条件:94℃预变性4 min;然后循环40次(94℃,0.5 min→53℃,0.5 min→72℃,2 min);最后72℃延伸10 min。PCR反应试剂盒(包括Buffer,dNTP和ExTaq酶)购自大连宝生物(TaKaRa)公司。用未加模板DNA的反应液作为空白对照以检查是否有污染存在。PCR产物用琼脂糖凝胶(质量分数为

1.0%) 电泳检测,置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.4 PCR 产物纯化和测序 扩增所得 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳,切下所需带用宝生物工程(大连)有限公司(Takara)生产的 DNA 凝胶回收试剂盒(TaKaRa Anarose Gel DNAPurification Kit Ver. 2.0)纯化回收,并直接送上海生物工程公司进行正反双向测序,以确保测序的准确性。

1.5 DNA 序列分析 对照测得的序列阅读测序峰图,去除两端不准确的序列,然后与从 GenBank 下载的 4 种裸胸鳝属鱼类以及作为外群的日本鳗鲡(*A. japonica*)和花鳗鲡(*A. marmorata*)的 CO I 基因部分序列一起用 MEGA version 5.0 软件中的 Clustal W 排序,生成供系统发育分析的矩阵;用 DNAMAN6.0 软件进行序列的比对(图 1);用 MEGA version 5.0 软件分析序列的变异位点、简约信息位点数、转换/颠换值以及 K2P 遗传距离。系统进化树分析用最大简约法(MP)和邻接法(NJ)。最大简约法构树方法采用 Close-Neighbor-Interchange algorithm (CNI),所有数据未加权。邻接法分析使用 Kimura'2-parameter。系统树分支的置信度采用重复抽样分析(Boot strap analysis)的方法,重复抽样的次数为 1 000 次。大于 35% 的 bootstrap 标注在图上。

2 结果与分析

2.1 CO I 基因片段序列特征 经 PCR 扩增、产物纯化回收、测序等步骤得到 CO I 基因部分序列,经过比对核查,获得 CO I 基因部分序列长度 504 bp,没有发现碱基的插入或缺失。从 GenBank 中得到分布于日本、中国南海裸胸鳝属鱼类 CO I 基因部分序列,经比对后发现在 504 bp 的 DNA 序列中,有 187 个碱基存在变异,约占 37.1%,其中 115 bp 具有简约性信息位点,317 个位点是保守的(图 1)。10 种裸胸鳝属鱼类 CO I 基因部分片段序列中 T、C、A 和 G 碱基平均含量分别为 30.5%,26.1%,24.4%和 19.0%,显示 G 碱基相对缺乏。其中 A+T 的含量为 54.9%,高于 G+C 含量(45.1%)。在三联体密码子中的碱基组成有很大的变化(图 2),在密码子的第 1 位中 4 种碱基频率相近,但在第 2 位中 T 碱基的频率高达 41.5%,在第 3 位中,G-3 只有 10.4%。序列中的转换总的来说要比颠换多,但转换与颠换的比值为 1.5。而一般认为转换与颠换比值小于 2.0 时基因序列突变就达到饱和状态^[11-12],所以这些位点突变已经饱和。

除去外群,基于 Kimura'2-parameter 的平均遗传距离为 18.6%,其中细斑裸胸鳝与黑斑裸胸鳝之间同源序列的 K2P 遗传距离只有 0.2%,细斑裸胸鳝与宽带裸胸鳝 K2P 遗传距离为 0.80%、宽带裸胸鳝与黑斑裸胸鳝之间 K2P 遗传距离分别为 1.0%。波纹裸胸鳝与黑点裸胸鳝 K2P 遗传距离最高,为 21.83%,但黑点裸胸鳝与细斑及黑斑裸胸鳝的 K2P 遗传距离分别为 6%和 6.2%(表 2)。

表 2 裸胸鳝属部分鱼类的 CO I 基因部分序列的 K2P 遗传距离(下三角)和转换/颠换(上三角)

鱼种类	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
波纹裸胸鳝		55/27	15/3	67/27	62/27	61/23	71/39	63/28	62/28	62/34
匀斑裸胸鳝	0.187		58/30	54/22	50/20	61/20	59/30	51/17	50/21	62/25
拟密花裸胸鳝	0.037	0.203		64/30	59/30	58/24	67/42	60/31	59/31	58/33
黄边裸胸鳝	0.221	0.172	0.220		8/6	63/22	20/18	7/7	8/7	60/27
细斑裸胸鳝	0.206	0.157	0.206	0.028	60/24	13/16	1/3	0/1	60/29	
网纹裸胸鳝	0.194	0.186	0.188	0.197	0.193		68/32	60/23	60/25	54/21
黑点裸胸鳝	0.264	0.206	0.260	0.080	0.060	0.237		14/17	13/17	69/39
宽带裸胸鳝	0.212	0.152	0.211	0.028	0.008	0.191	0.064		1/4	60/26
黑斑裸胸鳝	0.209	0.159	0.208	0.030	0.002	0.196	0.062	0.010		60/30
蠕纹裸胸鳝	0.224	0.201	0.210	0.201	0.206	0.170	0.258	0.198	0.208	

Gf avagi neus	C	CC	A	C	C	T	GT	C	T	AT	A	G	T	T	C	GA	CT	GC	GC	A	T	T	85							
Gret icul aris	C	CC	A	C	C	T	TT	C	T	AT	A	G	T	T	C	GA	CT	GC	GC	A	T	T	85							
Gmel anospi lus	C	CC	A	C	C	T	TT	C	T	AT	A	G	T	T	C	GA	CT	GC	GC	A	T	G	85							
Grueppel i ae	C	CC	A	C	C	T	TT	C	T	AT	A	G	T	T	C	GA	CT	GC	GC	A	T	G	85							
Gf i nbri at us	C	CC	A	C	C	T	TT	C	T	AT	A	A	T	T	C	GA	GT	GA	T	AC	A	C	T	85						
Gf l avi nar gi nat u	A	TC	A	A	C	T	TC	C	T	AT	G	G	T	T	C	GG	CC	GC	C	GT	A	C	A	85						
Gr eevesi i	A	CC	G	C	C	C	TT	T	C	TT	G	G	C	T	C	GA	CT	AC	A	GC	G	T	G	85						
Gpseudot hyr soi d	A	CT	A	C	C	T	TG	C	C	AC	A	G	T	C	C	GG	CT	GC	C	GC	G	T	T	85						
G undul at us	A	CT	A	C	C	T	TG	C	C	AC	A	G	T	T	C	GG	CT	GC	C	GC	G	T	T	85						
G ki dako	G	TT	A	A	C	C	TC	C	C	CC	G	G	T	T	T	GA	CT	AC	A	GC	G	T	G	85						
Consensus	oct	ta	t	gt	t	tt	gg	gc	ct	gac	g	g	at	gg	gg	ac	gc	t	a	oct	ct	at	c	g	ga	t	a	ca	cc	gg
Gf avagi neus	CC	T	C	A	C	C	C	A	AG	C	T	T	C	A	CA	T	170													
Gret icul aris	CC	T	C	A	C	C	C	A	AG	C	T	T	C	A	CA	T	170													
Gmel anospi lus	CC	T	C	A	C	C	C	A	AC	C	T	T	C	A	CA	T	170													
Grueppel i ae	CT	T	C	A	C	C	C	A	AG	C	T	T	C	A	CA	T	170													
Gf i nbri at us	CT	T	C	A	C	C	C	A	AG	C	T	T	C	A	CA	T	170													
Gf l avi nar gi nat u	TT	T	C	G	C	C	C	A	AG	C	T	T	T	G	CG	T	170													
Gr eevesi i	TC	T	C	A	T	T	C	A	TG	C	T	T	C	A	AA	T	170													
Gpseudot hyr soi d	AC	T	C	A	T	T	T	T	AG	G	C	T	T	G	CG	A	170													
G undul at us	AC	T	C	A	T	T	T	T	AG	G	C	T	T	G	CG	A	170													
G ki dako	TT	T	C	A	C	A	C	A	AG	A	C	C	T	G	CA	T	170													
Consensus	gct	ct	t	agg	ga	gacca	att	a	aat	gt	at	gt	ac	c	cat	gc	tt	gt	aat	aat	tt	ct	tt	at	agt	aat	cc	t	a	
Gf avagi neus	G	C	A	C	C	A	A	G	T	TC	T	A	T	G	AG	T	G	A	C	A	GA	A	T	C	A	255				
Gret icul aris	G	C	A	C	C	A	A	G	T	TC	T	A	T	G	AG	T	G	A	C	A	GA	A	T	C	A	255				
Gmel anospi lus	G	C	A	C	C	A	A	G	T	TC	T	A	T	G	AA	T	G	A	C	A	GA	A	T	C	A	255				
Grueppel i ae	G	C	A	C	C	A	A	G	T	TC	T	A	T	G	AG	T	G	A	C	C	GA	A	T	C	A	255				
Gf i nbri at us	G	C	A	C	C	A	A	G	T	TC	T	A	T	G	AG	T	G	A	T	C	GA	A	T	C	A	255				
Gf l avi nar gi nat u	A	T	A	C	C	A	G	T	CC	G	G	C	A	TG	T	A	A	T	C	GA	G	T	T	G	255					
Gr eevesi i	G	T	A	G	T	A	A	C	T	CT	A	A	T	T	CG	T	G	A	T	C	GA	A	T	T	G	255				
Gpseudot hyr soi d	A	T	G	G	T	A	A	C	T	CC	A	A	C	G	TG	C	G	A	C	C	GG	G	T	C	A	255				
G undul at us	A	T	G	G	T	A	A	C	C	CC	A	A	C	G	TG	C	G	A	C	C	GG	G	T	C	A	255				
G ki dako	G	T	G	T	C	G	A	T	T	TC	T	G	C	G	TG	C	G	G	C	C	GA	A	C	T	G	255				
Consensus	t	at	gg	gg	tt	gg	aact	g	ct	at	cc	t	at	at	gg	gccc	a	at	gc	tt	cc	c	at	aa	aa	at	agct	t		
Gf avagi neus	C	GAC	ACTC	T	T	T	C	TT	AT	GC	A	C	G	A	G	CG	A	A	A	A	T	T	GA	A	T	C	T	340		
Gret icul aris	C	GAC	ACTC	T	T	T	C	TT	AT	GC	A	C	G	A	G	CG	A	A	A	A	T	T	GA	A	T	C	T	340		
Gmel anospi lus	C	AAC	AGCC	C	T	T	C	TT	AT	GC	A	C	G	A	G	CA	A	A	A	A	T	T	AA	A	T	C	T	340		
Grueppel i ae	C	GAC	ACTC	T	T	T	C	TT	AT	GC	A	C	G	A	G	CG	A	A	A	A	T	T	GA	A	T	C	T	340		
Gf i nbri at us	C	GAC	ACTC	T	T	T	C	TT	AT	TC	A	C	G	A	G	CG	A	A	A	A	T	T	GA	A	T	C	T	340		
Gf l avi nar gi nat u	T	GGC	ACTT	C	A	T	C	CC	AC	TC	A	T	T	G	TG	A	G	T	G	T	A	GG	T	T	C	C	340			
Gr eevesi i	C	GAC	ACTT	T	T	T	T	TC	TC	AC	A	T	C	T	T	TG	A	G	A	A	C	T	GA	A	T	C	T	340		
Gpseudot hyr soi d	T	GGC	TCTC	A	T	C	C	CC	AC	TT	G	C	C	T	G	TG	G	A	T	T	C	A	GA	T	T	C	340			
G undul at us	T	GGC	TCTC	A	T	C	C	CC	AC	TT	G	C	C	T	G	TG	G	G	T	A	C	A	GA	T	T	C	340			
G ki dako	C	GGT	ATTG	T	A	C	C	GC	GC	TC	G	C	T	C	T	TG	A	G	A	C	T	A	GA	T	C	T	G	340		
Consensus	t	t	cc	cc	tc	tt	ct	t	t	t	gc	tc	tc	gg	gt	aagc	gg	gc	gg	ac	gg	t	ac	gt	ta	cc				
Gf avagi neus	TC	T	G	C	CT	AG	T	C	T	T	A	T	T	TC	C	C	C	T	T	CT	GG	T	TA	CT	CT	425				
Gret icul aris	TC	T	G	C	CT	AG	T	C	T	T	A	T	T	TC	C	C	C	T	T	CT	GG	T	TA	CT	CT	425				
Gmel anospi lus	TC	T	G	C	CT	AC	T	C	T	G	A	G	T	TC	C	C	C	C	T	CT	CG	G	AA	CC	CT	425				
Grueppel i ae	TC	T	G	C	CT	AG	T	C	T	T	A	T	T	TC	C	C	C	T	T	CT	GG	T	TA	CT	CT	425				
Gf i nbri at us	TC	T	G	C	TT	AG	T	C	T	G	A	T	T	TC	C	C	C	T	CT	GG	A	TA	CT	CT	425					
Gf l avi nar gi nat u	AC	A	A	A	CC	GG	A	T	C	A	A	T	T	CC	T	C	T	C	T	TC	GA	G	TA	AT	CT	425				
Gr eevesi i	TT	A	A	A	TT	AG	C	T	T	A	A	T	T	CC	T	C	T	C	T	TC	GA	T	TG	AT	TT	425				
Gpseudot hyr soi d	TC	T	A	A	CC	AG	G	T	A	G	C	T	A	CT	C	T	T	C	C	TC	GA	T	TT	CT	TT	425				
G undul at us	TC	T	A	A	CC	AG	G	T	A	A	C	T	A	CT	T	T	T	C	C	CT	GA	T	TA	CT	TT	425				
G ki dako	TC	T	A	T	TC	CG	T	C	T	G	A	T	T	CC	C	C	T	T	T	TT	GC	A	TT	AT	CC	425				
Consensus	cc	t	gc	gg	aa	t	c	ca	gc	gg	gc	tc	gt	ga	taac	at	tt	tc	ct	ca	ta	c	gg	g	tc	caat				
Gf avagi neus	GA	T	T	CC	CA	TA	T	C	G	G	C	A	CA	T	A	G	A	TT	A	TT	504									
Gret icul aris	GA	T	T	CC	CA	TA	T	C	G	G	C	A	CA	T	A	G	A	TT	A	TT	504									
Gmel anospi lus	AA	T	T	CA	CT	TA	T	C	G	G	C	A	CT	T	A	A	C	TT	A	T	C	504								
Grueppel i ae	GA	T	T	CC	CA	TA	T	C	G	G	C	A	CA	T	A	G	A	TT	A	TT	504									
Gf i nbri at us	GA	T	T	CC	CA	TA	T	C	G	G	C	A	CA	T	A	G	A	CT	A	TT	504									
Gf l avi nar gi nat u	GG	T	T	TC	AA	TA	T	C	A	A	C	A	CA	C	A	A	A	GT	G	CT	504									
Gr eevesi i	GA	C	T	TC	TA	CA	T	C	G	A	T	A	CA	T	A	A	A	TT	A	TT	504									
Gpseudot hyr soi d	GA	T	C	TC	CA	CA	C	C	G	A	C	A	TA	T	G	A	A	AT	G	TT	504									
G undul at us	GG	T	C	TC	CA	CG	C	T	G	A	C	A	TA	T	G	A	A	CT	A	TT	504									
G ki dako	GG	C	C	TC	TA	TA	T	C	A	A	C	T	CA	C	A	A	G	CT	G	TT	504									
Consensus	tag	gcaat	aa	t	t	at	a	aac	t	t	aa	at	aa	cc	cc	gc	t	acaca	tacca	ac	cc	t	tt	g						

图1 CO I 基因部分序列的比对

黑色部分表示碱基相同的位点, 灰色和白色表示碱基有变化的位点。

2.2 系统进化树的建立 以日本鳗鲡和花鳗鲡作为外群,应用邻接法(NJ)和简约法(MP)构建了裸胸鳝属部分物种的分子系统发育关系树(图 3),树上各分支上的数字用 1 000 次 Bootstrap 表示统计分析后对该支的支持百分比^[13]。从图 3 可以看出,10 种裸胸鳝聚集为 2 个大的分支,蠕纹裸胸鳝和网纹裸胸鳝聚为一支,其余 8 种聚为较大的一支,其中,拟密花裸胸鳝和波纹裸胸鳝聚集为较小一支,其余 6 种聚为另外一支。所构建的 NJ 和 MP 树的拓扑结构也较相似,只有匀斑、黄边、黑点、宽带、细斑和黑斑 6 种裸胸鳝所在的分支内部的拓扑结构有所差异。

3 讨论

裸胸鳝属(*Gymnothorax*)是硬骨鱼纲(Osteichthyes)鳗鲡目(Anguilliformes)海鳝科(Muraenidae)的鱼类^[6],我国南海具有丰富的裸胸鳝属鱼类资源,其中大部分具有重要的经济价值。目前,对裸胸鳝属的分类仅依据体色花纹等外形特征^[6],而且该类群鱼类在不同的生长阶段的体色花纹不尽相同,属、种间也出现重叠,依据该形态的分类方式十分困难,而且也容易出错。由于线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I (cytochrome oxidase subunit I, CO I) 基因已成为动物 DNA 条形码研究的最重要的标准基因,因此,本研究应用 CO I 基因序列作为 DNA 条形码对中国南海裸胸鳝的系统进化进行分析,以解决我国裸胸鳝属鱼类分类上的难题,充实裸胸鳝分类学资料。

NJ 树和 MP 树表明:以日本鳗鲡和花鳗鲡作为外类群,10 种裸胸鳝聚为 2 个分支。蠕纹裸胸鳝和网纹裸胸鳝聚在一起形成 1 个分支,处于系统树的基部位置;其余 8 种裸胸鳝聚为另外 1 个分支,在此分支中,波纹裸胸鳝和拟密花裸胸鳝又聚集成较小的 1 个分支,其余 6 种聚集成另外 1 个分支,支持这 2 个分支的置信度为(55%,NJ 树;100%,MP 树)。虽然其余 6 种裸胸鳝组成的分支的内部拓扑结构在 NJ 树和 MP 树中有些差异,但在 2 种树中,细斑裸胸鳝和黑斑裸胸鳝亲缘关系最近,其次是宽带裸胸鳝,所不同的仅仅是黑点裸胸鳝和黄边裸胸鳝的位置有变动。总的来说,在 10 种裸胸鳝属鱼中,分歧最早的是网纹裸胸鳝和蠕纹裸胸鳝;其次是波纹裸胸鳝和拟密花裸胸鳝。黑斑裸胸鳝和细斑裸胸鳝的分歧最近,实际上,这 2 种裸胸鳝之间的 K2P 遗传距离仅为 0.2%,按照王中铎等^[14]对中国南海硬骨鱼类 40 个物种 CO I 条码 660 bp 的分析结果,同物种的不同个体间的 K2P 遗传距离平均为 0.84%,同属不同物种间的 K2P 遗传距离为 15.67%,证明黑斑裸胸鳝和细斑裸胸鳝是同一个种,支持台湾学者沈世傑^[8]的观点,但黑点裸胸鳝与细斑及黑斑裸胸鳝的 K2P 遗传距离分别为 6% 及 6.2%,因此,明显为另一个种,这一点则支持成庆泰等^[6]的观点。另外,宽带裸胸鳝与细斑裸胸鳝的 K2P 遗传距离为 0.8%,这是由于笔者研究的 CO I 序列(504 bp)短于王中铎等研究的序列长度(660 bp)所致。而蠕纹裸胸鳝虽然来自日本海域,但与来自中国

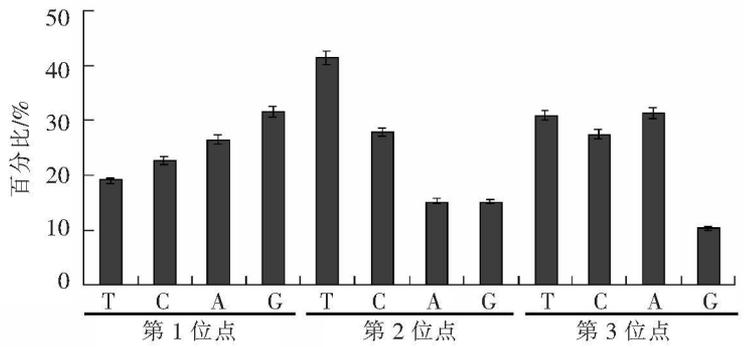


图 2 密码子 3 个位点的碱基组成频率

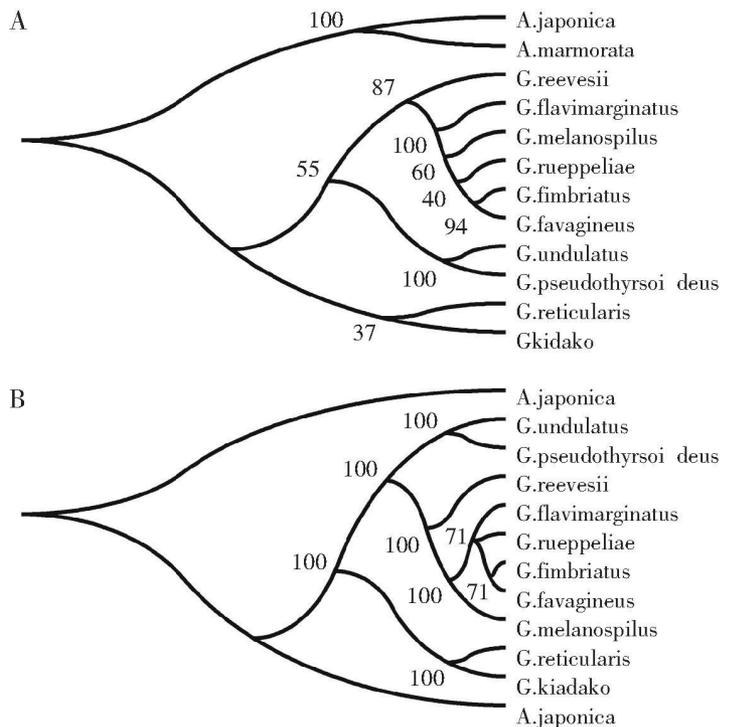


图 3 基于 CO I 条码序列的邻位连接树(A)和最大简约树(B)
图中数字为自举置信水平(BCL)值

南海的网纹裸胸鳝仍聚集为一支,因此,从系统树上来看,它们之间并没有明显的地域差异。

总的来说,本研究以 CO I 条码序列构建 9 种中国南海和 1 种来自日本海域的裸胸鳝的 NJ 和 MP 系统进化树(图 3),可直观地反映出该条码序列能成功分辨 10 种裸胸鳝。这对于辅助完善形态学系统,尤其对补充《中国鱼类系统检索》记录等将具有很好的指导意义。但是,CO I 条码序列在广泛适用于鱼类物种鉴别的同时也存在其局限性。由于 CO I 基因的突变速率相对线粒体 DNA 控制区的要慢些,因此,难以分辨分化程度过低的物种。总之,裸胸鳝的分类较复杂,其系统发生关系有待于对更多的种类从分子水平上进行揭示。

参考文献:

- [1] HEBERT P D N, CYWINSKA A, BALL S L, et al. Biological identification through DNA barcodes [J]. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 2003(a), 270: 313 - 321.
- [2] HEBERT P D N, RATNASINGHAM S, DEWARD J R. Barcoding animal life: Cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 2003(b), 270: 96 - 99.
- [3] HEBERT P D N, STOECKLE MY, ZEMLAK T S, et al. Identification of birds through DNA barcodes [J]. PLOS Biol, 2004, 2(10): 1657 - 1663.
- [4] 肖金花,肖晖,黄大卫.生物分类学的新动向—DNA 条形码 [J]. 动物学报, 2004, 50(5): 852 - 855.
- [5] VENCES M, THOMAS M, BONETT R M, et al. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges [J]. Phil. Trans. R. Soc. B, 2005(a), 360: 1859 - 1868.
- [6] 成庆泰,郑葆珊.中国鱼类系统检索 [M]. 北京:科学出版社, 1987: 99 - 108, 747 - 757.
- [7] 杜民,齐兴柱,尹绍武,等.基于 Cyt b 基因序列研究 6 种裸胸鳝属鱼类的进化关系 [J]. 中国水产科学, 2009, 16(1): 24 - 30.
- [8] 沈世傑.台湾鱼类志 [M]. 台北:国立台湾大学生物系, 1993: 12.
- [9] 国家技术监督局. GB/T 15628.1 - 2009. 中国动物分类代码—脊椎动物 [S]. 北京:中国标准出版社, 1996.
- [10] SAMBROO J, FITCH E, MANIATIS T. Molecular Cloning; A Laboratory Manual. 2nd ed [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [11] 周继亮,张亚平,黄美华,等.蝮亚科蛇线粒体 Cyt b 基因序列分析及其系统发育 [J]. 动物学报, 2001, 47(4): 361 - 366.
- [12] 周发林,江世贵,苏天凤,等.6 种笛鲷属鱼类 Cyt b 基因片段序列的比较 [J]. 热带海洋学报, 2004, 23(4): 87 - 92.
- [13] FELSENSTEIN J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap [J]. Evolution, 1985, 39: 783 - 791.
- [14] 王中铎,郭显嵩,陈荣玲,等.南海常见硬骨鱼类 CO I 条码序列 [J]. 海洋与湖沼, 2009, 40(5): 608 - 614.

Application of CO I -based DNA barcoding in *Gymnothorax* Species in South China Sea

QI Xing-zhu, LUO Jian, LIU Zhi-liang, HU Jing, ZHU Xiao-ping, PENG Yan-hui, YIN Shao-wu
(College of Ocean, Hainan University, Ministry of Education, Key Laboratory for Tropical Biology Resources, Haikou 570228, China)

Abstract: In order to explore the phylogenetic relationships of gymnothorax species in South China Sea, 504 bp length fragments of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I gene from 6 species of genus *Gymnothorax* (*G. flavimarginatus*, *G. reticularis*, *G. melanospilus*, *G. rueppelliae*, *G. fimbriatus*, *G. favagineus*) in South China Sea were sequenced. Based on the phylogenetic analysis of the homologous sequences of CO I gene sequences of *Gymnothorax* from 3 species in South China Sea and 1 species in Japan downloaded from GenBank, neighbor-joining (NJ) and maximum parsimony (MP) methods were used to construct molecular phylogenetic trees. The results indicated that there were 187 nucleotide sites substituted (37.1%) in 504 bp sites; the average value of transition/transversion ratios was 1.5; nucleotide sequence divergence was only 0.20% between *G. fimbriatus* and *G. favagineus*, which supported the opinion that *G. fimbriatus* and *G. favagineus* might be synonyms; the NJ tree and the MP tree Clustering maps showed that the genetic differentiation of *G. reticularis* and *G. kidako* was in the same branch, and the genetic differentiation of eight species *Gymnothorax* was in another branch.

Key words: *Gymnothorax*; cytochrome oxidase subunit I gene; DNA barcodes; molecular phylogenetic tree