

浙江沿海大弹涂鱼、弹涂鱼的线粒体 COI 基因 序列差异及其系统发育

赵 亮, 苗 亮, 李明云*, 张 浩, 郭晓飞, 陈莹莹, 潘 娜

(宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211)

摘要: 为探讨浙江沿海大弹涂鱼和弹涂鱼线粒体细胞色素氧化酶 I 号(COI)基因序列差异及其系统发育, 对两者进行了 COI 扩增、测序和分析. 结果显示: 扩增得到大弹涂鱼、弹涂鱼 COI 基因序列长度分别为 1 554 bp 和 1 556 bp; 大弹涂鱼和弹涂鱼 COI 基因序列中, A+T 所占比例(分别为 55.8%和 56.0%)均高于 G+C 所占比例(分别为 44.2%和 44.0%); 大弹涂鱼和弹涂鱼的种内平均遗传距离分别为 0.002 和 0.003, 两者的种间遗传距离为 0.183. 构建的系统发育树显示, 大弹涂鱼与红狼牙虾虎鱼、孔虾虎鱼、犬齿背眼虾虎鱼聚为一簇(大弹涂鱼 COI 序列与三者的同源性分别为 91.0%、92.0%和 88.0%), 弹涂鱼与青弹涂鱼聚为一簇(两者 COI 序列同源性为 99.0%)后与大弹涂鱼所在的簇相聚. 研究结果可为探讨大弹涂鱼、弹涂鱼的系统发育及建立基于 COI 序列的弹涂鱼类鉴定方法提供参考资料.

关键词: 大弹涂鱼; 弹涂鱼; COI 基因; 系统发育

中图分类号: S917

文献标志码: A

文章编号: 1001-5132 (2016) 01-0013-05

弹涂鱼类是对鲈形目(Perciformes)、虾虎鱼科(Gobiidae)中能离水跳跃和爬行的鱼类的统称, 是沿岸暖温广盐性可以较长时间生活在陆地上的小型鱼类, 喜栖息于港湾和河口潮间带淤泥滩涂, 生命力强, 分布广泛, 食物链短, 很多种类具有较高的经济价值. 目前全世界已知的弹涂鱼类已超过 2 000 种^[1], 有些种类在形态和习性等方面都十分相似, 各种类间物种进化和系统发生关系尚不清楚, 学术界对一些种类的归属划分仍有分歧. 大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)、弹涂鱼(*Periophthalmus cantonensis*)均是代表性的弹涂鱼类, 在我国东南沿海分布广泛, 常混栖并形态十分相似, 尤其是苗种阶段更加难以区分, 常有养民误将弹涂鱼当做大弹涂鱼养殖而造成经济损失. 因此, 有必要对大弹涂鱼、弹涂鱼进行分子进化差异和系统发育分析, 以作为传统形态分类的补充, 也有助于探讨弹涂鱼类各物种间的系统发育关系.

目前各种分子标记已被广泛应用于各种生物分子系统分类和物种鉴定研究^[2-5], 其中线粒体细胞色素氧化酶 I 号(COI)基因是最常用的分子标记之一, 如翁朝红等^[6]通过线粒体 COI 序列研究了近江蛭在缢蛭属中的分类地位, 发现近江蛭为不同于缢蛭的一个新种. 彭居例等^[7]基于线粒体 COI 基因的分析结果显示 4 种鲈属鱼类的种间遗传距离均显著大于种内遗传距离, 表明以 COI 基因作为鲈属鱼类 DNA 条形码进行物种鉴定具有一定的可行性. 杨帆等^[8]研究了广东、福建和上海等地沿海弹涂鱼科常见鱼类 COI 基因的遗传多样性, 结果表明, 三地沿海弹涂鱼、大弹涂鱼、青弹涂鱼的种间分化明显, 种间与种内遗传距离有明显差异. 但目前还未见有关于浙江沿海弹涂鱼类 COI 基因序列差异和系统发育方面的研究报道.

笔者通过对浙江沿海的大弹涂鱼、弹涂鱼 COI 基因进行扩增分析, 比较两者的 COI 序列差异并

收稿日期: 2014-09-03.

宁波大学学报(理工版)网址: <http://journaljg.nbu.edu.cn/>

基金项目: 浙江省自然科学基金(LY14C030002); 长江学者和创新团队发展计划(IRT0734).

第一作者: 赵亮(1990-), 男, 安徽淮北人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 水产动物分子生态. E-mail: 841623632@qq.com

*通信作者: 李明云(1942-), 男, 浙江舟山人, 博导/教授, 主要研究方向: 遗传育种与种质种苗工程. E-mail: limingyun@nbu.edu.cn

探讨系统进化关系, 以期为研究大弹涂鱼、弹涂鱼的系统分类以及弹涂鱼类的系统发育提供参考资料, 并为今后建立基于 DNA 分子标记的弹涂鱼类物种鉴定方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验样品

实验用大弹涂鱼和弹涂鱼分别采自浙江省慈溪市杭州湾和宁海县象山港, 各 6 尾, 大弹涂鱼体长 11.0~15.1 cm, 体重 22.1~28.3 g; 弹涂鱼体长 5.5~8.5 cm, 体重 11.0~16.2 g。取背部肌肉, 液氮速冻后-80℃保存。

1.2 COI 序列扩增与测序

用常规酚-氯仿法提取基因组 DNA^[9], 调整质量浓度至 50 ng·μL⁻¹。根据 GenBank 中虾虎鱼科鱼类的 COI 序列保守区域设计 COI 扩增引物(正向引物序列: 5'-GGACACTAACCCACATCTTCTGC-3'; 反向引物序列: 5'-TAACCCACGATTCTGCCTTGA CA-3'), 引物由上海生工合成。PCR 反应体系(50 μL)为 10×buffer 5.0 μL, Mg²⁺ 最终浓度为 2.0 mmol·L⁻¹, 正、反向引物(10 μmol·L⁻¹)各 2 μL, dNTP (2.5

mmol·L⁻¹) 4 μL, Taq 酶(TaKaRa, 5 U·μL⁻¹) 0.4 μL, 模板 DNA 2.0 μL, 用 ddH₂O 补足体积。反应程序为: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 30 s, 55℃退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 循环 35 次; 最后 72℃延伸 10 min。扩增产物经质量分数 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测后, 送样至 Invitrogen 公司进行纯化、测序。

1.3 COI 序列分析

分析所得大弹涂鱼、弹涂鱼 COI 基因的序列特征、碱基组成及核苷酸变异情况, 利用 Kimura 2-parameter 模型(Bootstrap Replications 数为 1 000)计算两者的种内和种间遗传距离; 用 ClustalW 程序(<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp>)把大弹涂鱼、弹涂鱼与从 GenBank 数据库中获得的另外 15 种虾虎鱼科鱼类及作为外群的塘鳢科鱼类乌塘鳢(*Bostrychus sinensis*)的 COI 基因序列(表 1)进行多重序列比对, 用 MEGA 4.0 软件构建邻接法(NJ)分子系统树(可靠性由 1 000 次自展分支检验)。

2 结果

2.1 COI 基因序列特征、碱基组成

经测序, 扩增得到的大弹涂鱼和弹涂鱼的 COI

表 1 用于序列比对和系统树构建的鱼类 COI 基因信息

俗名	种名	分类地位	GenBank 登录号
钝吻舌虾虎鱼	<i>Glossogobius circumspectus</i>	虾虎鱼科虾虎鱼亚科舌虾虎鱼属	JX536695
斑纹舌虾虎鱼	<i>Glossogobius olivaceus</i>	虾虎鱼科虾虎鱼亚科舌虾虎鱼属	JQ001860
台湾丝虾虎鱼	<i>Cryptocentrus yatsui</i>	虾虎鱼科虾虎鱼亚科丝虾虎鱼属	KC237282
舟山繙虾虎鱼	<i>Amoya chusanensis</i>	虾虎鱼科虾虎鱼亚科繙虾虎鱼属	KC196075
大弹涂鱼	<i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	虾虎鱼科背眼虾虎鱼亚科大弹涂鱼属	本研究
犬齿背眼虾虎鱼	<i>Oxudercus dentatus</i>	虾虎鱼科背眼虾虎鱼亚科背眼虾虎鱼属	NC-016194
青弹涂鱼	<i>Scartelaos histophorus</i>	虾虎鱼科背眼虾虎鱼亚科青弹涂鱼属	NC-017888
弹涂鱼	<i>Periophthalmus cantonensis</i>	虾虎鱼科背眼虾虎鱼亚科弹涂鱼属	本研究
斑尾刺虾虎鱼	<i>Acanthogobius ommaturus</i>	虾虎鱼科拟虾虎鱼亚科刺虾虎鱼属	JX186192
绿斑细棘虾虎鱼	<i>Acentrogobius chlorostigmatoides</i>	虾虎鱼科拟虾虎鱼亚科细棘虾虎鱼属	KC196074
睛尾蝌蚪虾虎鱼	<i>Lophiogobius ocellicauda</i>	虾虎鱼科虾虎鱼亚科蝌蚪虾虎鱼属	HQ561523
矛尾刺虾虎鱼	<i>Acanthogobius hasta</i>	虾虎鱼科拟虾虎鱼亚科刺虾虎鱼属	Y486321
平头竿虾虎鱼	<i>Luciogobius platycephalus</i>	虾虎鱼科拟虾虎鱼亚科竿虾虎鱼属	JX971538
双带缟虾虎鱼	<i>Tridentiger bifasciatus</i>	虾虎鱼科拟虾虎鱼亚科缟虾虎鱼属	NC-015992
长臀姬虾虎鱼	<i>Gillichthys mirabilis</i>	虾虎鱼科拟虾虎鱼亚科姬虾虎鱼属	FJ211845
红狼牙虾虎鱼	<i>Odontamblyopus rubicundus</i>	虾虎鱼科拟虾虎鱼亚科狼牙虾虎鱼属	JX891626
孔虾虎鱼	<i>Trypauchen vagina</i>	虾虎鱼科拟虾虎鱼亚科孔虾虎鱼属	NC-016693
乌塘鳢 ¹⁾	<i>Bostrychus sinensis</i>	塘鳢科乌塘鳢	KC196075

注: 1)表示外群。

基因序列分别为 1 554 bp 和 1 556 bp, 其中用于序列比对、系统树构建的长度均为 1 385 bp. 大弹涂鱼 COI 基因序列中 4 种碱基所占比例分别为 $A = 25.0\%$, $T = 30.8\%$, $G = 18.1\%$, $C = 26.1\%$, $A + T$ 所占比例(55.8%)高于 $G + C$ (44.3%); 弹涂鱼 COI 基因序列中 4 种碱基所占比例分别为 $A = 24.6\%$, $T = 31.5\%$, $G = 18.1\%$, $C = 25.8\%$, $A + T$ 所占比例(55.8%)高于 $G + C$ (44.3%).

表 2 为大弹涂鱼和弹涂鱼的 COI 基因密码子各位点 $G + C$ 所占比例, 可见两者密码子中第 1、第 2、第 3 位点的 $G + C$ 所占比例均依次递减.

表 2 大弹涂鱼和弹涂鱼 COI 基因密码子各位点比例

鱼名	样品/ 个	G+C 所占比例/%			
		全部位点	第 1 位点	第 2 位点	第 3 位点
大弹涂鱼	6	44.2	54.4	41.0	37.3
弹涂鱼	6	43.9	53.1	42.3	36.2

表 3 大弹涂鱼和弹涂鱼 COI 序列密码子各位点碱基变异

项目	不变位点/个	转换位点/个	颠换位点/个	R
全部位点	1 133	143	108	1.3
第 1 密码子	436	21	5	4.7
第 2 密码子	459	2	1	1.4
第 3 密码子	238	120	103	1.2

2.2 核苷酸序列变异及种间、种内遗传距离

表 3 为大弹涂鱼和弹涂鱼 COI 序列密码子各位点的碱基变异情况, 全部位点中有不变位点 1 133 个、转换位点 143 个、颠换位点 108 个, 转换

位点与颠换位点的比例为 13/10; 第 2 位点中不变位点最多(459 个), 第 3 位点中转换位点和颠换位点最多(分别为 120 个和 103 个).

由表 4 可见, 大弹涂鱼种内个体间的遗传距离为 0.000~0.006(平均为 0.002); 弹涂鱼种内个体间的遗传距离为 0.000~0.005(平均为 0.003). 大弹涂鱼与弹涂鱼的种间遗传距离平均为 0.183.

2.3 系统发育分析

图 1 为基于 17 种虾虎鱼 COI 基因序列构建的邻接法(NJ)分子系统树, 可见大弹涂鱼 6 个个体和弹涂鱼 6 个个体均可聚集在各自分支内, NJ 系统树显示, 红狼牙虾虎鱼、孔虾虎鱼、大弹涂鱼、犬齿背眼虾虎鱼、青弹涂鱼、弹涂鱼、双带缟虾虎鱼、

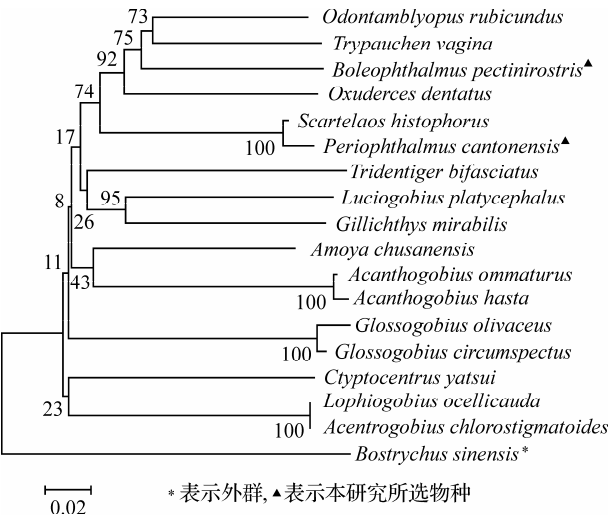


图 1 基于 COI 序列构建的分子系统树(NJ 法)

表 4 大弹涂鱼、弹涂鱼的个体间遗传距离

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	B1	B2	B3	B4	B5	B6
A1												
A2	0.000											
A3	0.004	0.004										
A4	0.000	0.000	0.004									
A5	0.001	0.001	0.005	0.001								
A6	0.001	0.001	0.006	0.001	0.002							
B1	0.191	0.191	0.193	0.191	0.192	0.193						
B2	0.181	0.181	0.183	0.181	0.182	0.183	0.005					
B3	0.181	0.181	0.183	0.181	0.182	0.183	0.005	0.000				
B4	0.181	0.181	0.183	0.181	0.182	0.183	0.005	0.000	0.000			
B5	0.182	0.182	0.184	0.182	0.183	0.184	0.004	0.001	0.001	0.001		
B6	0.180	0.180	0.182	0.180	0.181	0.182	0.004	0.004	0.004	0.004	0.005	

注: A1~A6 表示大弹涂鱼的 6 个不同个体, B1~B6 表示弹涂鱼的 6 个不同个体.

平头竿虾虎鱼、长鄂姬虾虎鱼、舟山缙虾虎鱼、斑尾刺虾虎鱼、矛尾刺虾虎鱼、顿吻舌虾虎鱼、斑纹舌虾虎鱼聚为一大簇,睛尾蝌蚪虾虎鱼、绿斑细棘虾虎鱼、台湾丝虾虎鱼聚为一大簇。其中弹涂鱼与青弹涂鱼聚为一簇(两者其同源性为 99.0%),大弹涂鱼与红狼牙虾虎鱼、孔虾虎鱼、犬齿背眼虾虎鱼聚为一簇(其同源性分别为 91.0%、92.0%和 88.0%)后与弹涂鱼所在的簇相聚。NJ 系统树还显示近盲虾虎鱼亚科、背眼虾虎鱼亚科、拟虾虎鱼亚科鱼类聚为一大簇。

3 讨论

在 Tautz 等^[10]将 DNA 序列作为生物分类系统的重要平台之后,研究人员就开始不断地实践和验证 DNA 条形码在生物学中应用的实用性。COI 基因属线粒体 DNA 基因,其编码的 COI 为呼吸链的重要组分,普遍存在于原核生物和真核生物细胞的线粒体中,其进化速度比核基因快 10 倍以上,故易受环境的影响及诱导而体现进化过程。因此,在鱼类中 COI 基因已被广泛用于分析鱼类的分子进化规律及亲缘关系。如张凤英等^[11]研究了银鲈、翎鲈、中国鲈线粒体 COI 基因序列变异及系统进化,结果显示,基于线粒体 COI 基因片段的鲈属鱼类分类和系统进化研究结果与形态学研究结果一致。

笔者利用 COI 基因分析浙江沿海大弹涂鱼、弹涂鱼的线粒体 COI 基因序列差异,两者的种内平均遗传距离分别为 0.002 和 0.003,远远小于 Hebert 等^[12]提出的物种鉴定中最小的种间遗传距离为 0.020 的标准。两者的种间遗传距离为 0.183,是种内遗传距离的 60 倍,符合 Hebert 等^[12-13]提出的利用 COI 基因序列有效鉴别物种时种间遗传距离须大于种内遗传距离 10 倍以上的标准。由此可见,可以根据 COI 基因序列的差异将弹涂鱼、大弹涂鱼予以区分。

在 NJ 系统树中可见近盲虾虎鱼亚科、背眼虾虎鱼亚科、拟虾虎鱼亚科鱼类聚为一大簇。这与 Thacker 依据形态学提出的可将近盲虾虎鱼亚科、背眼虾虎鱼亚科、瓢虾虎鱼亚科、拟虾虎鱼亚科鱼类都归为拟虾虎鱼亚科鱼类^[14],而将虾虎鱼亚科鱼类单独归为一类的观点相一致。而在亚科水平

以下,大弹涂鱼和弹涂鱼在本研究中与青弹涂鱼、犬齿背眼虾虎鱼聚为一簇,红狼牙虾虎鱼和孔虾虎鱼与背眼虾虎鱼亚科鱼类聚成一大簇,这也与 Thacker 在文献[15]中结合形态学与分子学分析之后得到的结论相一致。但在 NJ 系统树中发现有些弹涂鱼科鱼类 COI 序列差异不大,如 *Lophiogobius ocellicauda* 和 *Acentrogobius chlorostigmatoides*。究其原因,可能是同种虾虎鱼由于地理环境的变化而引起形态特征的变化,如果按形态特征来分类,可以分成种下的 2 个种类,上述提到的弹涂鱼类可能属于这种情况。杨帆等^[8]认为 COI 基因作为 DNA 条形码在种一级水平的鉴别能力较强,但是作为蛋白质编码基因,COI 基因的进化速率可能受到限制,因此对于鉴别地理位置相近,地理隔离格局的形成时间还不够长,还未达到具有显著遗传隔离分化的地理种群之间的差异时,就显得不够灵敏。要证实是否是真正的 1 个种,还是种下的 2 个种类,今后可考虑采用 mtDNA 的其他部分序列,如 D-loop、ND 或其他编码区基因做进一步的研究分析以弥补 COI 序列的不足。

综合上述,基于虾虎鱼科鱼类的线粒体 COI 基因构建出的分类系统与形态学的分类单元划分虽有不同之处但基本一致;至于不同之处,今后可以根据该基因的差异并结合 mtDNA 的其他部分序列,如 D-loop、ND 或其他编码区基因来探讨虾虎鱼科、属、种分类单元的系统发育问题。本研究结果为弹涂鱼的系统分类以及鱼类的系统发育研究提供了参考资料。

参考文献:

- [1] 伍汉霖,钟俊生. 中国动物志:硬骨鱼纲、鲈形目(五)、虾虎鱼亚目[M]. 北京:科学出版社,2008:978-982.
- [2] 王中华,应天雷,黄仲贤. 细胞色素 C 突变研究进展[J]. 化学通报,2010(1):1-36.
- [3] 肖武汉,张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化[J]. 水生生物学报,2000,24(4):384-391.
- [4] 许守明,何艳霞,陈双喜. 细胞凋亡与细胞色素 C[J]. 安徽农学通报,2009,15(15):38-39.
- [5] 凌去非,李思发. 鲤科 25 种鱼类线粒体 COII 基因序列差异及其系统进化关系[J]. 水产学报,2006,30(6):747-752.
- [6] 翁朝红,谢仰杰,肖志群,等. 线粒体 COI 和 16S rRNA 片段确定近江蛭和缙蛭属的分类地位[J]. 水生

- 生物学报, 2013, 37(4):684-690.
- [7] 彭居俐, 王绪祯. 基于线粒体 COI 基因序列的 DNA 条形码在鲤科鲃属鱼类物种鉴定中的应用[J]. 水生生物学报, 2009, 33(2):271-276.
- [8] 杨帆, 何利军, 雷光春, 等. 中国东南沿海弹涂鱼科常见鱼类的遗传多样性和 DNA 条形码[J]. 生态学杂志, 2012, 31(3):676-683.
- [9] SAMBROOK J, FFITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: A laboratory manual[M]. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989:92-112.
- [10] TAUTZ D, ARCTANDER P, MINELLI A, et al. DNA points the way ahead in taxonomy[J]. Nature, 2002, 418(6897):479.
- [11] 张凤英, 马凌波, 施兆鸿, 等. 3 种鲃属鱼类线粒体 COI 基因序列变异及系统进化[J]. 中国水产科学, 2008, 15(3):392-399.
- [12] HEBERT P D N, CYWINSKA A, BALL S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes[J]. Proc R Soc B, 2003, 270:313-322.
- [13] HEBERT P D N, RATNASINGHAM S, DEWAARD J R. Barcoding animal life: *Cytochrome oxidase* subunit I divergences among closely related species[J]. Proc R Soc B, 2003, 270:96-99.
- [14] THACKER C E. Phylogeny of Gobioidae and placement within acanthomorphs with a new classification and investigation of diversification and character evolution[J]. Copeia, 2009(1):93-104.
- [15] THACKER C E. Molecular phylogeny of the gobioid fishes[J]. Mol Phylogenet Evol, 2003, 26(3):354-368.

On Mitochondrial COI Gene Variability and Phylogenetic of *Boleophthalmus pectinirostris* and *Periophthalmus cantonensis* in Coastal of Zhejiang

ZHAO Liang, MIAO Liang, LI Ming-yun*, ZHANG Hao, GUO Xiao-fei, CHEN Ying, PAN Na
(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology of Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: In order to explore the variability of mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) gene and phylogeny of *Boleophthalmus pectinirostris* as well as Mudskippers (*Periophthalmus cantonensis*) in coastal of Zhejiang Province, we sequence and analyze COI gene of these two fish species. The results show: the length of the COI gene of *B. pectinirostris* and *P. cantonensis* is 1 554 bp and 1 556 bp, respectively. In the *B. pectinirostris* and *P. cantonensis* COI sequences, the content of A + T (55.8% and 56.0%, respectively) is higher than G + C (44.2% and 44.0%, respectively). The average intra-specific genetic distance of *B. pectinirostris* and *P. cantonensis* is respectively identified as being 0.002 and 0.003. The genetic distance between the two species is found to be 0.183. The phylogenetic tree indicates that *B. pectinirostris* with *Odontamblyopus rubicundus*, *Trypauchen vagina*, *Oxudercus dentatus* are grouped into a cluster (The homology between *B. pectinirostris* and the other three kind of fishes is 91.0%, 92.2% and 88.0%, respectively); the *P. cantonensis* and *Scartelaos histophorus* gather into a cluster (the sequence homology is 99%) together with the cluster of *B. pectinirostris*. The results are expected to provide the reference for exploring the phylogenetic of *B. pectinirostris* and *P. cantonensis*, as well as identification method of Mudskippers based on COI.

Key words: *Boleophthalmus pectinirostris*; *Periophthalmus cantonensis*; COI gene; phylogenetic

(责任编辑 章践立)