

基于线粒体细胞色素 b 基因序列的 骨舌鱼科鱼类分子系统发育的研究

牟希东, 王培欣, 胡隐昌, 汪学杰, 宋红梅, 李小慧, 罗建仁
(中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380)

摘要:为阐明骨舌鱼科鱼类的遗传结构和进化关系,测定了美丽硬仆骨舌鱼 *Scleropages formosus* 的3个品种金龙(Gold arowana)、红龙(Red arowana)、青龙(Green arowana)细胞色素 b(cyt b)基因全序列(1 141 bp),结合来自GenBank中珍珠龙 *Scleropages leichardti*、星点珍珠龙 *S. jardini*、非洲龙 *Heterotis niloticus*、黑龙 *Osteoglossum ferrerirai*、银龙 *O. bicirrhosum*、海象 *Arapaima gigas* 的全序列,用邻接法(NJ)和最大简约法(MP)构建分子系统树,初步分析了骨舌鱼科鱼类的系统发育关系. NJ树和MP树均一致表明,骨舌鱼类为单系类群,分为4支,支持骨舌鱼科下设4个属(坚体鱼属 *Scleropages*、异耳鱼属 *Heterotis*、骨舌鱼属 *Osteoglossum*、巨骨舌鱼属 *Arapaima*)阶元的分类系统,4个属的系统关系与其形态、生态特征表型进化和地理分布较为一致. 而金龙、红龙和青龙的 mtDNA Cytb 的碱基差异小于1%,说明这3个龙鱼品种还在同一种的水平上.

关键词:骨舌鱼科; 美丽硬仆骨舌鱼; 细胞色素 b 基因; 系统进化

中图分类号: Q959

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2010)02-0100-04

Molecular Phylogenetic Studies of Osteoglossidae Based on the Sequences of Complete Mitochondrial Cytochrome b Gene

MU Xi-dong, WANG Pei-xin, HU Yin-chang, WANG Xue-jie, SONG Hong-mei, LI Xiao-hui, LUO Jian-ren
(Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China)

Abstract: The present study aimed to clarify the genetic structure and evolutionary relationships within Osteoglossidae, using complete mitochondrial cytochrome b (Cyt b) gene sequences (1 141 bp) of three breeds of *Scleropages formosus*: Gold arowana, Red arowana and Green arowana, together with relevant sequences of *Scleropages leichardti*, *S. jardini*, *Heterotis niloticus*, *Osteoglossum ferrerirai*, *O. bicirrhosum*, *Arapaima gigas* obtained from GenBank. The phylogenetic trees constructed by two methods (NJ and MP) supported the same topology, and molecular phylogenetic relationships of fishes of the Osteoglossidae were constructed. Both of NJ tree and MP tree showed that fishes of the Osteoglossidae were a monophyletic group and classified Osteoglossidae into four genera, namely *Scleropages*, *Heterotis*, *Osteoglossum*, *Arapaima*, which were perfectly consistent with their morphological, ecological characteristics, evolution and geographic distribution pattern. Sequence variation of less than 1% in mtDNA Cyt b gene among three breeds of *S. formosus* suggested that they might represent the same species.

Key words: Osteoglossidae; *Scleropages formosus*; Cyt b gene; systematical evolution

骨舌鱼科 Osteoglossidae, 是现存最古老的热带淡水鱼类之一, 国内外记载的骨舌鱼类主要有4属9种^[1], 分布在亚洲、南美洲、澳洲和非洲等地, 因其寿

命长, 鳞片在光照下反射光华, 被视为长寿、兴隆和财富的象征, 深受人们的喜爱. 据记载^[2], 骨舌鱼首次在南美洲亚马逊河流域发现, 此后在非洲尼罗河、

收稿日期: 2009-06-11

作者简介: 牟希东(1981—), 男, 助理研究员; 通信作者: 胡隐昌(1961—), 男, 副研究员, E-mail: huyc2@163.com

基金项目: 农业部“948”项目(2009-Z13); 农业部淡水鱼类遗传育种和养殖生物学重点开放实验室基金(BZ2009-10); 中国水产科学研究院科研基金项目(2003-3-5); 广州市荔湾区科技计划(20082109029)

澳洲及东南亚等地陆续发现不同的骨舌鱼类,而美丽硬仆骨舌鱼在越南安南山脉溪流被发现,由于其优美的体型和体姿使其迅速成为一种国际著名的极珍贵观赏鱼类,由于该鱼野生种群数量不详,又因需求暴增遭酷捕而趋于濒危,于1975年被列入《濒危野生动植物种国际贸易公约》(CITES),成为最高濒危保护物种.同时骨舌鱼类保有真骨鱼类的原始形态,其起源时间可追溯到中生代中后期^[3],具有极高的考古和学术研究价值.目前国内外对骨舌鱼科鱼类的研究报道主要集中在生物学^[3]和遗传多样性^[4]等方面.Yue等^[4-5]采用3种分子标记研究了美丽硬仆骨舌鱼的遗传多样性情况,并报道了美丽硬仆骨舌鱼的线粒体DNA序列.细胞色素 b (Cytochrome b, Cyt b) 基因是线粒体中结构和功能研究最清楚的蛋白质编码基因之一,进化速度适中,可为骨舌鱼科不同分类单元间的系统发育研究提供可靠、有价值的信

息^[6].本文通过对美丽硬仆骨舌鱼线粒体 Cyt b 基因全序列的测定,并结合从 GenBank 中下载的骨舌鱼科鱼类线粒体 Cyt b 基因全序列进行分析和比较,探讨种间的系统发育关系,验证骨舌鱼类的单系起源及分类划分,同时验证美丽硬仆骨舌鱼种内的进化关系,旨在为骨舌鱼类的系统分类、种类演化提供基础资料.

1 材料与方法

1.1 样品采集和 DNA 提取

本试验所用的材料为美丽硬仆骨舌鱼 *Scleropages formosus* (表1),俗称亚洲龙鱼(Asian bonytongue 或 Arowana),是金龙、红龙、青龙等龙鱼品种的学名.将试验龙鱼小心捕捞并实施麻醉手术,剪取少量尾鳍,参照 EZNA 试剂盒的方法提取总 DNA, -20 °C 保存备用.参考 GenBank 其他骨舌鱼类序列,选用齿蝶属齿蝶鱼作为外类群.

表1 骨舌鱼科鱼类的学名及其相关信息

Tab.1 Scientific name, length of Cyt b sequence and GenBank accession numbers of Cyt b sequences for Osteoglossidae

属名	种	序列长度/bp	登录号
坚体鱼属 <i>Scleropages</i>	金龙 <i>S. formosus</i> Gold arowana	1 141	EU594546
	红龙 <i>S. formosus</i> Red arowana	1 141	EU594545
	青龙 <i>S. formosus</i> Green arowana	1 141	EU594547
	珍珠龙 <i>S. leichardti</i>	1 141	AB035237
	星点珍珠龙 <i>S. jardini</i>	1 141	AB035236
异耳鱼属 <i>Heterotis</i>	非洲龙 <i>H. niloticus</i>	1 141	AB035240
骨舌鱼属 <i>Osteoglossum</i>	黑龙 <i>O. ferrerirai</i>	1 141	AB035239
	银龙 <i>O. bicirrhosum</i>	1 141	AB035238
巨骨舌鱼属 <i>Arapaima</i>	海象 <i>A. gigas</i>	1 141	AB035241
齿蝶属 <i>Pantodon</i>	齿蝶鱼 <i>P. buchholzi</i>	1 141	AB035242

1.2 引物设计与 PCR 扩增

参照双须骨舌鱼 *Osteoglossum bicirrhosum* (GenBank:NC_003095) 线粒体 DNA 序列,选择位于 Cyt b 基因外侧保守性较高的区域设计引物:P1:5' - TGCGACTAAACATAAATGTTTAG - 3'; P2:5' - TG-TATGGAAAATTGCAGTTATG - 3'. PCR 反应总体积为 20 μ L,其中含有模板 DNA 0.5 μ L (40 ~ 100 ng/L), 10 \times PCR Buffer 2 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.6 μ L, dNTP (10 mmol/L) 0.4 μ L, TaqDNA Polymerase (5 U/ μ L) 0.3 μ L, 20 pmol/ μ L 引物各 0.5 μ L,其余为灭菌双蒸水. PCR 反应条件为:94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 50 s, 52 °C 退火 50 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 5 min. 每次反应设立不含 DNA 模板的空白对照.用 0.01 g/mL 琼脂糖凝胶电泳检测.扩增产物直接进行正反双向测序并核对,以保证所测序列的准确性.序列数据已提交 GenBank,序列号见表1.

1.3 序列分析与数据处理

将2个片段进行拼接后,先用 Clustal W 排定

DNA 序列,并进行人工核查,与 GenBank 下载的序列一起用 Clustal W 排序,生成供系统发育分析的矩阵.利用 MEGA 3.0 软件^[7]分析序列的碱基组成和差异百分比、变异位点、简约信息位点数、转换/颠换值,用邻接法 (Neighbor-joining NJ) 和最大简约法 (Maximum-parsimony MP) 构建骨舌鱼类种间的系统发育关系.系统树分枝置信度采用重复抽样分析 (Bootstrap analysis) 的方法,通过 1 000 次循环再抽样统计分析,评估系统树的可靠性.

2 结果

2.1 骨舌鱼科鱼类 Cyt b 基因序列特征

本研究获得美丽硬仆骨舌鱼的3个品种红龙、金龙、青龙 mtDNA Cyt b 基因的1 141全序列,并与从 GenBank 下载的其他骨舌鱼科以及外类群的鱼类序列一起比对,生成供系统发育的矩阵.在同源的1 141 bp DNA 序列中没有发现碱基的插入和缺失,主要是因为 Cyt b 基因序列为蛋白质编码序列,插入和缺失

很少发生或发生后很容易被淘汰. ATG 为起始密码子,以 T 为不完全终止密码子,这种不完整的终止密码子在转录过程中需添加 poly A 后才形成终止密码子,在草鱼^[8]等也可见这种现象.就所有分析的序列来看,T、C、A 和 G 平均碱基组成分别为 23.9%,34.6%,27.8%,13.7%,其中 A + T 的组成(51.7%)高于 G + C 组成(48.3%),G 碱基相对缺乏,这与脊椎动物的特点是一致的^[9].在1 141 bp DNA 序列位点中,有 508 个碱基存在变异,约占 44.52%,其中 152 个碱基具有简约性信息位点,约占 13.32%,序列中的转换明显比颠换多,物种间的序列变异点基本上转换多于颠换,这种差异在亲缘关系接近的类

群中更显著^[10];转换/颠换比值平均为 2.75,通常认为转换/颠换 > 2.0 时,基因序列的突变未达到饱和^[7].在三联体密码子中的碱基组成也有很大的变化,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 42.6%,在第 3 位中 C3 的频率达到 51.3%,密码子第 3 位碱基的突变受自然选择压力小,突变率高,但这种突变很少导致氨基酸替代,并且比导致氨基酸替代的突变积累得快^[11],但 G3 只有 4.0% 表现出很明显的碱基差异.

2.2 分子系统树的构建

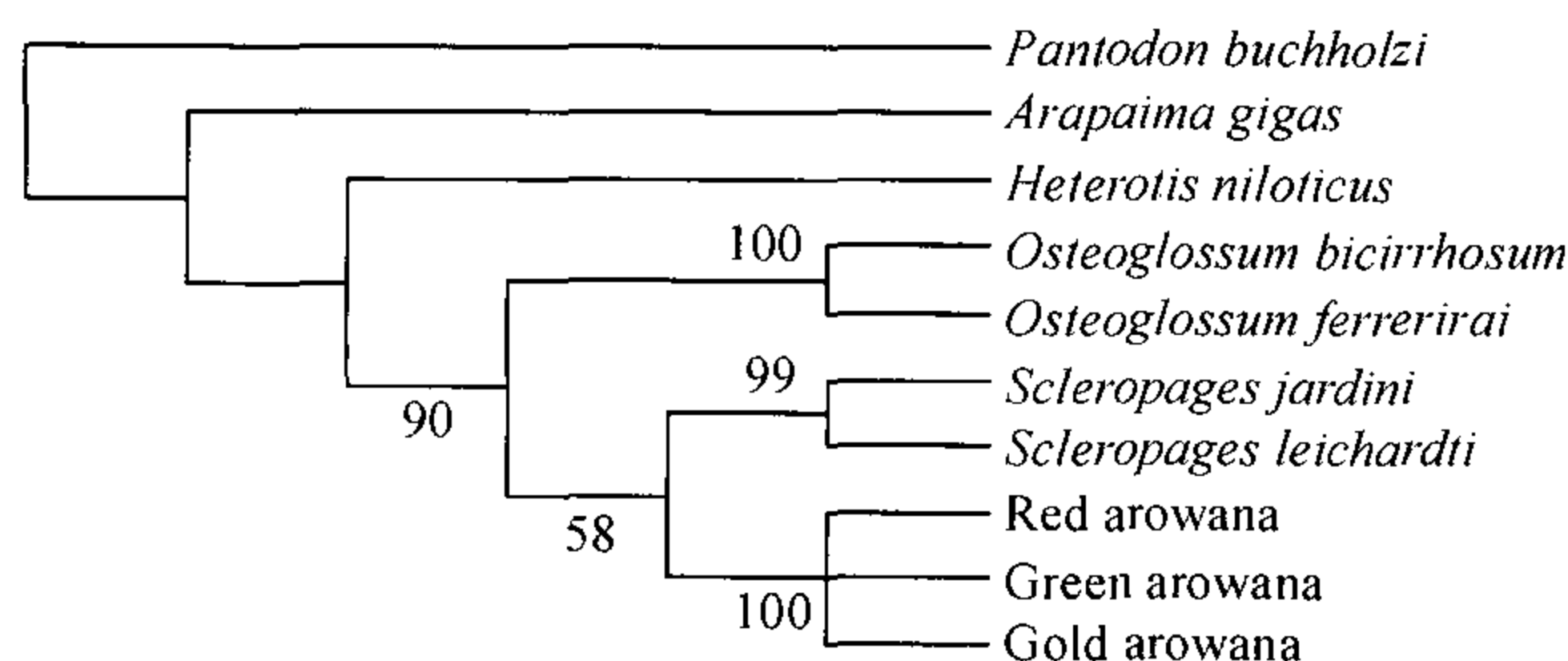
利用 Kimura-2 模型计算出骨舌鱼科的遗传距离(表2),并以齿蝶鱼为外类群,对骨舌鱼科进行系统

表 2 基于 Kimura-2 模型计算的骨舌鱼科鱼类种间遗传距离

Tab. 2 Genetic distances calculated among Osteoglossidae species based on Kimura-2 model

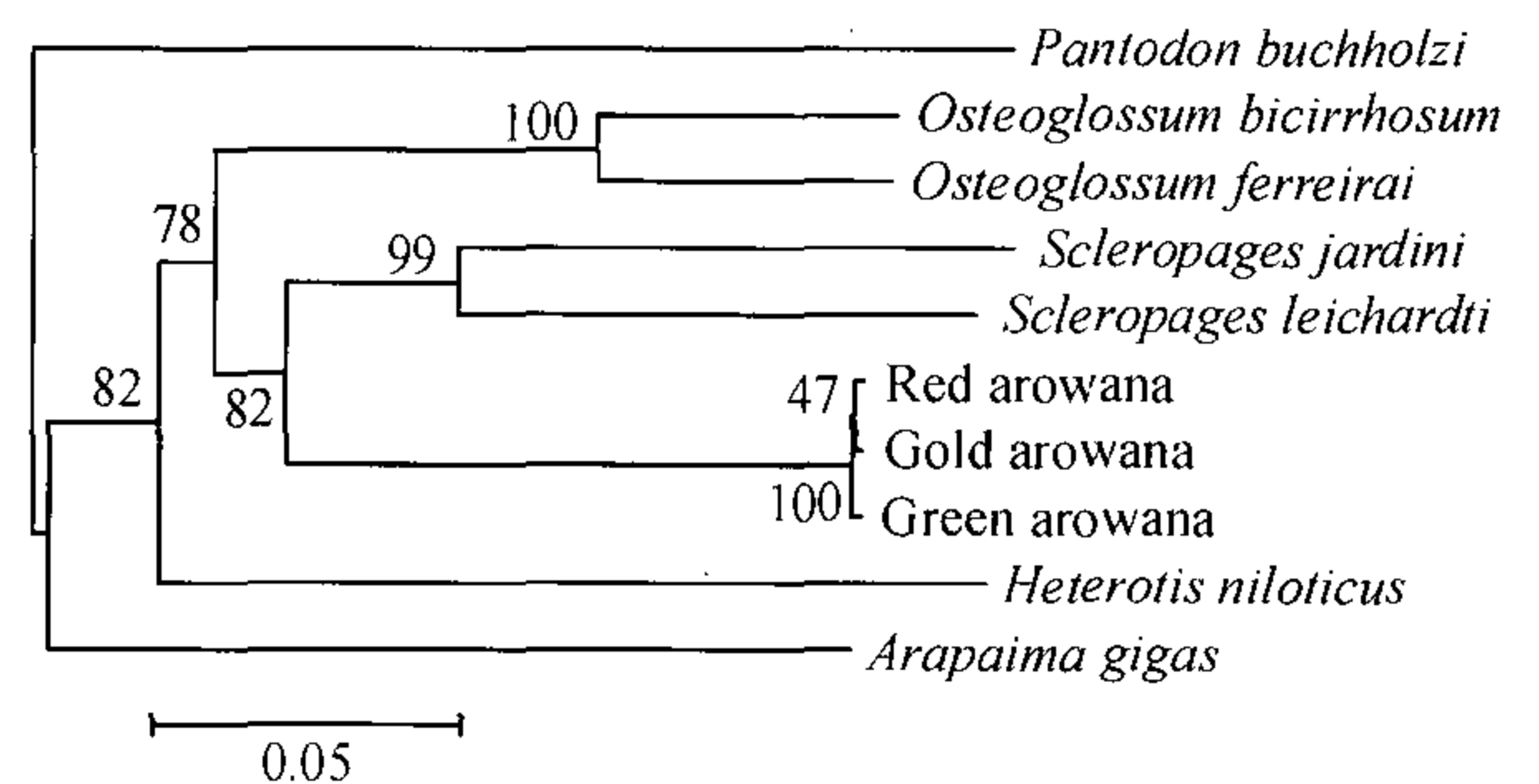
种名	双须骨舌鱼	黑龙	星点珍珠龙	珍珠龙	红龙	金龙	青龙	非洲龙	海象	齿蝶鱼
双须骨舌鱼 <i>Osteoglossum bicirrhosum</i>										
黑龙 <i>O. ferrerirai</i>	0.096									
星点珍珠龙 <i>Scleropages jardini</i>	0.230	0.248								
珍珠龙 <i>S. leichardti</i>	0.223	0.221	0.173							
红龙(Red arowana) <i>S. formosus</i>	0.219	0.219	0.206	0.209						
金龙(Gold arowana) <i>S. formosus</i>	0.220	0.218	0.204	0.210	0.003					
青龙(Green arowana) <i>S. formosus</i>	0.218	0.215	0.204	0.210	0.003	0.004				
非洲龙 <i>Heterotis niloticus</i>	0.263	0.250	0.264	0.263	0.248	0.248	0.250			
海象 <i>Arapaima gigas</i>	0.257	0.273	0.303	0.288	0.259	0.259	0.260	0.268		
齿蝶鱼 <i>Pantodon buchholzi</i>	0.307	0.286	0.311	0.311	0.288	0.287	0.287	0.327	0.291	

发育分析,应用最大简约法(图1)和邻接法(图2)构建分子系统树.从图1、图2中可以看出,最大简约法产生的 MP 树和邻接法产生的 NJ 树均一致表明,所研究的骨舌鱼科鱼类形成 4 个主要分支:巨骨舌鱼属、异耳鱼属、骨舌鱼属、硬骨舌鱼属.骨舌鱼属与硬骨舌鱼属形成姐妹群,异耳鱼属再与他们聚在一起,最后与处在骨舌鱼科类群基部的巨骨舌鱼属相聚.硬骨舌鱼属的 5 种鱼类被分成了二支,形成姐妹群:珍珠龙和星点珍珠龙聚类,置信度 BP = 99%;美丽硬仆骨舌鱼在 NJ 树中,红龙先与金龙结为姐妹种,而后与青龙聚类.



每个分支上的数字表示基于 1 000 次重复的自举检验置信度,齿蝶鱼为外群.
图 1 基于 Kimura 双参数的遗传距离以最大简约法构建的分子系统树

Fig. 1 Maximum-parsimony tree for haplotypes using Kimura 2-parameter distance



每个分支上的数字表示基于 1 000 次重复的自举检验置信度,齿蝶鱼为外群.
图 2 基于骨舌鱼科鱼类 Cyt b 基因全序列通过邻接法构建的分子系统树

Fig. 2 Molecular phylogenetic tree based on the complete Cyt b sequences of Osteoglossidae fishes constructed by neighbor-joining method

3 讨论

3.1 骨舌鱼科鱼类间的进化关系

从化石上的依据^[12]来看,骨舌鱼科在白垩纪早期呈世界性分布,而在白垩纪晚期却仅分布于瓦纳古陆,目前学者们一般以“大陆漂移说”来解释其形成现在分布格局的原因.骨舌鱼类的祖先在中生代时期第一次出现在地球上^[3],当时的地球分为瓦纳古大陆(Gondwanaland)和劳亚古大陆(Laurasia)2个部分,骨舌鱼的祖先就在 2 个隔离的大陆上往不同的方向演化.由于地壳运动,瓦纳古大陆分裂成印

度陆块、南极大陆、澳洲大陆,最后分裂出非洲大陆、南美洲大陆,骨舌鱼类就进化为南美洲的银龙鱼、黑龙鱼和澳洲的珍珠龙鱼、星点珍珠龙鱼.而瓦纳古大陆分裂出的数个小陆块与劳亚古大陆结合形成东南亚陆块,一部分龙鱼从南半球经过海峡到达北半球演化成美丽硬仆骨舌鱼.本文根据骨舌鱼类线粒体 Cyt b 基因所建立的 MP 树和 NJ 树的聚类分析可以很好地反映骨舌鱼类的进化关系,同时 2 种分析方法的聚类结果一致,与其形态特征^[2]、生态习性的进化表现有较高的一致性,验证了骨舌鱼类为单系起源的观点,与 Kumazawa 等^[13]的研究结果一致.

3.2 美丽硬仆骨舌鱼种内进化

美丽硬仆骨舌鱼,俗称亚洲龙鱼,按照体色主要分为 3 个自然群体^[12]:金龙、红龙、青龙,其中红龙分布于印度尼西亚的加里曼丹西部;金龙主要分布在马来西亚和印度尼西亚的苏门答腊;青龙分布广泛,在东南亚国家几乎都有分布.潘阳^[14]比较了红龙、青龙和金龙的形态学性状,认为在形态方面有一定的差异,主要表现在体色和体高/体厚比值上,金龙和红龙、金龙和青龙、红龙和青龙的比值分别为 1.75、1.95、1.94. Yue 等^[4]采用 RAPD 和 AFLP 技术对青龙和红龙的遗传关系进行研究,结果一部分青龙单独成支,另一部分青龙和红龙聚在一起;利用 SSR 和 AFLP 技术研究了青龙、红龙和金龙的遗传多样性情况,研究得出的系统发生关系与 RAPD 的研究结果一致:红龙和青龙的遗传关系较近,与金龙的遗传关系较远.潘阳等^[15]对金龙和红龙 mtDNA D-Loop 全序列分析分化变异程度,发现红龙和金龙的分化变异率很低,说明二者有较近的亲缘关系.本文从美丽硬仆骨舌鱼线粒体 Cyt b 基因的碱基组成上分析,金龙、红龙和青龙的 mtDNA Cyt b 碱基仅有 0.3% 的差异,在 MP 树和 NJ 树相聚,且红龙和金龙亲缘关系较近,与青龙关系较远,这与 Yue 等^[4]的研究结论有些差异,可能与现今商业贸易、人工移植放流等活动引起的不同种内或者不同种群基因混杂,导致种质不纯有关.根据 Avise^[16]认为同一种的个体间一般有 0.1% ~ 5% 的差异.其他一些动物的 Cyt b 基因序列分析表明,种内个体间的序列差异一般在 0% ~ 4.06%^[17-19],差异超过 6% 的个体间已有明显的亚种或种的分化,而金龙、红龙和青龙的序列差异仅为 0.3%,因此 3 种美丽硬仆骨舌鱼的分化仍没有达到种的水平.

参考文献:

- [1] KOTTELAT M, WHITTEN A J, KARTIKASARI S N, et al. Freshwater fishes of Western Indonesia and Sulawesi [M]. Indonesia: Periplus Editions (HK) Ltd, 1993.
- [2] GREENWOOD P H, ROSEN D E, WEITZMAN S H, et al. Phyletic studies of teleostean fishes, with a provisional classification of living form [J]. Bull Am Mus NatHist, 1996, 131: 338-456.
- [3] SCOTT D C B, FULLER J D. The reproductive biology of *Scleropages formosus* (Osteoglossomorpha, Osteoglossidae) in Malaya and morphology of its pituitary gland [J]. J Fish Biol, 1976, 8: 45-53.
- [4] YUE Gen-hua, LI Yang, CHEN Fan, et al. Comparison of three DNA marker systems for assessing genetic diversity in Asian arowana (*Scleropages formosus*) [J]. Electrophoresis, 2002, 23: 1025-1032.
- [5] YUE Gen-hua, LIEW W C, ORBAN L. The complete mitochondrial genome of a basal teleost, the Asian arowana (*Scleropages formosus*, Osteoglossidae) [J]. BMC Genomics, 2006, 21(7): 242-254.
- [6] ORRELL T M, CARPENTER K E, MUSICK J A, et al. Phylogenetic and biogeographic analysis of the Sparidae (Perciformes: Percoidae) from cytochrome b sequences [J]. Copeia, 2002, 3: 618-631.
- [7] KUMAR S, TAMURA K, NEI M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. Briefings in Bioinformatics, 2004, 5(2): 150-163.
- [8] 叶星, 白俊杰, 劳海华, 等. 草鱼线粒体细胞色素 b 基因的克隆与序列分析 [J]. 中国水产科学, 2002, 9(3): 193-197.
- [9] IRWIN D M, KOCHER T D, Wilson A C. Evolution of the cytochrome b of mammals [J]. Mol Evol, 1991, 32: 128-144.
- [10] JIANG J P, ZHOU K Y. Evolutionary relationships among Chinese ranid frogs inferred from mitochondrial DNA sequences of 12S rRNA gene [J]. Acta Zool Sin, 2001, 47(1): 38-44.
- [11] MEYER A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes [M] // HOCHACHUCKA P W, MOMMSEN T P. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes: Vol. 2. London: Elsevier Science Publishers, 1993: 1-38.
- [12] GOH W, CHUA J. The Asian Arowana [M]. Singapore: Dragon Fish Industry, 1999: 26-27.
- [13] KUMAZAWA Y, MUTSUMI N. Molecular phylogeny of Osteoglossoids: A new model for gondwanian origin and plate tectonic transportation of the Asian arowana [J]. Mol Biol Evol, 2000, 17(12): 1869-1878.
- [14] 潘阳. 美丽硬仆骨舌鱼三个种群遗传结构的分析 [D]. 广州: 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 2005.
- [15] 潘阳, 白俊杰, 叶星, 等. 2 种亚洲龙鱼的 D-Loop 序列结构分析 [J]. 湛江海洋大学学报, 2005, 25(4): 5-8.
- [16] AVISE J C. Molecular markers, natural history and evolution [M]. New York: Chapman and Hall, 1994.
- [17] YANG Xue-gan, WANG Yi-quan, ZHOU Kai-ya. The authentication of oviductus ranae and their original animals by using molecular marker [J]. Bio Pharm Buu, 2002, 25: 1035-1039.
- [18] 杨学干, 王义权, 周开亚, 等. 从细胞色素 b 基因序列探讨我国林蛙属动物的系统发生关系 [J]. 动物学研究, 2001, 22(5): 345-350.
- [19] 曹祥荣, 束峰珏, 张锡然, 等. 毛冠鹿与 3 种鹿属动物的线粒体细胞色素 b 的系统进化分析 [J]. 动物学报, 2002, 48(1): 44-49.