

## 基于 16S rRNA 和 Cyt b 基因序列探讨 2 种梅童鱼的遗传分化

马国强<sup>1</sup>, 高天翔<sup>1</sup>, 孙典荣<sup>2</sup>

(1. 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300)

**摘要:** 比较分析了棘头梅童鱼 (*Collichthys lucidus*) 和黑鳃梅童鱼 (*C. niveatus*) 的 16S rRNA 和 Cyt b 基因片段序列差异及遗传分化程度。在长度为 526 bp 的 16S rRNA 和 379 bp 的 Cyt b 基因片段的核苷酸序列中, 2 种间共检测到 44 处核苷酸替代。分析结果表明, 2 个基因片段的鸟嘌呤 (G) 含量较低, 在 Cyt b 蛋白质编码基因第三密码子位点上表现尤为明显。基于 16S rRNA 和 Cyt b 基因片段分析结果显示, 2 种间平均遗传距离分别为 0.012 和 0.111。构建的系统树显示 2 种梅童鱼在这 2 个基因片段上存在显著的遗传分化。根据 Cyt b 基因 2%/百万年的进化速率推断, 棘头梅童鱼与黑鳃梅童鱼的分化时间约为 550 万年, 发生于上新世 (Pliocene) 早期。

**关键词:** 棘头梅童鱼; 黑鳃梅童鱼; 16S rRNA; Cyt b; 遗传分化

**中图分类号:** Q 244; Q 522+.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673-2227-(2010)02-0013-08

## Discussion of relationship between *Collichthys lucidus* and *C. niveatus* based on 16S rRNA and Cyt b gene sequences

MA Guoqiang<sup>1</sup>, GAO Tianxiang<sup>1</sup>, SUN Dianrong<sup>2</sup>

(1. Key Lab. of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;

2. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China)

**Abstract:** *Collichthys lucidus* and *C. niveatus* are commercially important fishery resources in China. Partial nucleotide sequences of mitochondrial DNA 16S rRNA and Cyt b gene fragments were sequenced and analyzed to study the relationship between *C. lucidus* and *C. niveatus*. Forty-four nucleotide substitutions were detected among 16S rRNA (526 bp) and Cyt b (379 bp) fragments. Nucleotide composition analysis indicated that the content of guanine (G) was relatively low in the two fragments, especially at the third codon position of Cyt b genes. Average genetic distances based on 16S rRNA and Cyt b between *C. lucidus* and *C. niveatus* were 0.012 and 0.111, respectively. The phylogenetic tree showed that there was significant genetic divergence between *C. lucidus* and *C. niveatus*. According to the evolutionary rate of 2% per one million years, the estimated divergence time between *C. lucidus* and *C. niveatus* was 5.5 million years, which indicated an early Pliocene divergence for them.

**Key words:** *Collichthys lucidus*; *C. niveatus*; 16S rRNA; Cyt b; genetic differentiation

棘头梅童鱼 (*Collichthys lucidus*) 和黑鳃梅童鱼 (*C. niveatus*) 隶属于鲈形目 (Perciformes)、石首鱼科 (Sciaenidae)、梅童鱼属 (*Collichthys*), 均为中国重要的小型底栖鱼类资源<sup>[1]</sup>。棘头梅童鱼

收稿日期: 2009-12-03; 修回日期: 2009-12-18

资助项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2006AA09Z418); 国家自然科学基金项目 (30471329)

作者简介: 马国强 (1985-), 男, 硕士研究生, 从事鱼类分类学和种群遗传学研究。E-mail: visin1985222@163.com

通讯作者: 孙典荣, E-mail: drsun73@163.com

广泛分布于黄、渤海、东海和南海，营底栖生活；黑鳃梅童鱼常见于黄、渤海，主要营浮游生活<sup>[1-2]</sup>。每年的4~6月和9~10月为梅童鱼的渔汛旺期。近年来，由于过度捕捞和环境变化，梅童鱼资源严重衰退<sup>[3]</sup>。

国内外学者对梅童鱼的研究主要集中在摄食、生长、鱼卵和仔、稚鱼等渔业生物学方面的报道<sup>[4-7]</sup>。遗传学研究方面，田兰香等<sup>[8]</sup>基于 Cyt *b* 序列对国内7种石首鱼科鱼类系统发育进行了研究，发现大黄鱼（*Pseudosciaena crocea*）和棘头梅童鱼亲缘关系较近；蒙子宁等<sup>[9]</sup>研究了中国近海8种石首鱼科鱼类系统发育关系，结果表明，2种梅童鱼16S rRNA 基因片段序列完全相同，但未对其进行深入探讨；陈泉梅<sup>[10]</sup>对中国石首鱼科鱼类的分子系统学研究结果显示，鲚鱼属、梅童鱼属和黄鱼属位于系统树的相邻位置，支持3属组成黄鱼亚科的传统分类学结论。迄今尚未见棘头梅童鱼与黑鳃梅童鱼的遗传分化研究的其他报道。线粒体DNA（mitochondrial DNA）具有分子结构简单、母系遗传、几乎不发生重组、进化速度快以及不同区

域的进化速度存在差异等优点，已被广泛应用于系统发育和种群遗传学研究<sup>[11-13]</sup>。该研究对2种梅童鱼的16S rRNA 和 Cyt *b* 基因片段进行了PCR扩增和序列测定，探讨了2种梅童鱼的遗传分化程度及分化年代，分析了不同基因片段核苷酸替代速率，旨在阐明2种梅童鱼的分类地位，为梅童鱼种质资源保护及其渔业管理提供理论依据，并为石首鱼科鱼类系统发育研究提供新的遗传学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

选用2种梅童鱼样品各3尾。棘头梅童鱼样品于2005年10月采自海州湾121.0~121.5°E，34.5~35.0°N；黑鳃梅童鱼样品于2004年10月采自海州湾123.5~124.0°E，34.5~35.0°N。酒精固定的梅童鱼肌肉组织保存于中国海洋大学渔业生态研究室样品库，入库编号、GenBank下载的梅童鱼属鱼类16S rRNA 序列以及用于外群的白姑鱼（*Argyrosomus argentatus*）序列等信息见表1。

表1 研究所用样本、分子标记和 GenBank 注册号

Tab. 1 Species, molecular markers and GenBank accession No.

种名 species name	缩写编号 abbreviation	16S rRNA	Cyt <i>b</i>
棘头梅童鱼 1 <i>Collichthys lucidus</i>	C. lucidus 1	OUC_ FELA1	OUC_ FELA1
棘头梅童鱼 2	C. lucidus 2	OUC_ FELA2	OUC_ FELA2
棘头梅童鱼 3	C. lucidus 3	OUC_ FELA3	OUC_ FELA3
棘头梅童鱼 4	AY336721	AY336721	—
黑鳃梅童鱼 1 <i>C. niveatus</i>	C. niveatus 1	OUC_ FELA6	OUC_ FELA6
黑鳃梅童鱼 2	C. niveatus 2	OUC_ FELA7	OUC_ FELA7
黑鳃梅童鱼 3	C. niveatus 3	OUC_ FELA8	OUC_ FELA8
黑鳃梅童鱼 4	AY336722	AY336722	—
白姑鱼 <i>Argyrosomus argentatus</i>	A. argentatus	AY336725	AB372025

### 1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 取约100 mg 的梅童鱼肌肉组织，采用标准的酚-氯仿方法提取基因组DNA<sup>[14]</sup>，将乙醇沉淀后的基因组DNA溶解于100 μL TE 溶液中，4℃保存备用。

1.2.2 PCR 扩增 扩增16S rRNA 的引物为：

L2510（5'-CGCCTGTTTAACAAAAACAT-3'）和H3059（5'-CCGGTCTGAAGTCAGATCATGT-3'）<sup>[15]</sup>；在TaKaRa 扩增仪上进行PCR反应：95℃变性3 min；94℃45 s，50℃45 s，72℃45 s，40个循环；72℃延伸10 min；PCR反应体积为25 μL，其中10×缓冲液2.5 μL，MgCl<sub>2</sub>1.5 mmol·L<sup>-1</sup>，各种

dNTP 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , Ex Taq 酶 1.25 U, 每个引物各 0.2  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 模板 DNA 1  $\mu\text{L}$ , 加灭菌蒸馏水至 25  $\mu\text{L}$ 。扩增 Cyt b 基因片段的引物为: L14734 (5'-AACCACCGTTGTTATTCAACT-3') 和 Cyt b (5'-CTCAGAATGACATTTGTCCTCA-3')<sup>[15]</sup>; PCR 反应条件为: 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 50  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 35 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。PCR 反应体积为 25  $\mu\text{L}$ , 其中 10  $\times$  缓冲液 2.5  $\mu\text{L}$ ,  $\text{MgCl}_2$  1.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 各种 dNTP 200  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , Ex Taq 酶 1.25 U, 每个引物各 0.2  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ , 模板 DNA 1  $\mu\text{L}$ , 加灭菌蒸馏水至 25  $\mu\text{L}$ 。以上反应均采用阴性对照来检查是否存在 DNA 污染。

1.2.3 DNA 序列测定 PCR 产物电泳检测后, 于紫外灯下切割目的条带, 用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒 (上海华舜出品) 纯化回收, 取适量回收产物做测序反应。用美国 ABI 公司 3700 型全自动序列分析仪进行双向测序。

1.2.4 数据分析 所有序列均由 Dnastar 软件包 (DNASTAR, Inc., Madison, USA) 进行编辑、校对和排序, 并对排序结果进行分析和手工校正, 然后用 Modeltest 3.7<sup>[16]</sup> 进行模型选择, 得到 2 个目的基因片段的最佳核苷酸替代模型, 并计算相关参数。根据核苷酸最适模型, 应用 MEGA 2.0<sup>[17]</sup> 软件将 Cyt b 蛋白质编码基因核苷酸序列的密码子转化为氨基酸序列, 分析核苷酸组成并计算种间遗传距离。应用 ARLEQUIN Ver 2.000<sup>[18]</sup> 软件计算分析棘头梅童鱼和黑鳃梅童鱼的 DNA 多态性。基于邻接法、最大简约法、最大似然法<sup>[19]</sup> 和贝叶斯法<sup>[20]</sup> 重建 16S rRNA 和 Cyt b 基因片段的系统树。

## 2 结果

### 2.1 替代模型选择和参数估计

Modeltest 3.7 分析结果显示, 2 种梅童鱼 16S rRNA 和 Cyt b 基因片段最适核苷酸替代模型分别

为 GTR 和 HKY + I, 并得到 5 个模型相关参数 (表 2), 包括模型的似然值自然对数的负数 ( $-\ln L$ )、不变位点比率 (I) 和 Gamma 分布的形状参数 (G)。

表 2 Modeltest 检验得到的优化模型参数

Tab. 2 Optimization model parameters estimated by Modeltest analyses		
基因 gene	16S rRNA	Cyt b
	GTR	HKY + I
	$-\ln L = 914.7119$	$-\ln L = 818.3206$
模型选择	$K = 8$	$K = 5$
selected model	$AIC = 1845.4238$	$AIC = 1646.6411$
		(I) = 0.7611
	(G) = Equal rates	(G) = Equal rates

### 2.2 核苷酸组成分析

对棘头梅童鱼与黑鳃梅童鱼线粒体 DNA 2 个基因片段序列进行比对分析, 得到长度分别为 526 bp (16S rRNA) (图 1) 和 379 bp (Cyt b) (图 2) 的目的片段。2 种间在 16S rRNA 基因片段上共检测到了 6 个多态位点; 在 Cyt b 基因片段上检测到了 38 个多态位点 (表 3)。核苷酸组成分析结果表明, 2 种梅童鱼在这 2 个目的基因片段上的鸟嘌呤 (G) 含量均比较低, 其中最低的为黑鳃梅童鱼的 Cyt b 基因片段 (15.8%); G 含量在 Cyt b 蛋白质编码基因的第三密码子位点上呈现明显的反 G 偏倚 (<5%) (图 3)。棘头梅童鱼与黑鳃梅童鱼 Cyt b 基因片段中的 G + C 含量分别为 48.1% 和 48.5%; 16S rRNA 基因片段 G + C 含量分别为 47.34% 和 47.72%。

### 2.3 遗传分化分析

棘头梅童鱼与黑鳃梅童鱼在 16S rRNA 和 Cyt b 基因片段的核苷酸序列以及 Cyt b 基因片段相对应的氨基酸序列上存在着不同程度的遗传分化。在 526 bp

表 3 棘头梅童鱼与黑鳃梅童鱼 16S rRNA 和 Cyt b 基因片段遗传多样性

Tab. 3 Genetic diversity information of 16S rRNA and Cyt b gene in *C. lucidus* and *C. niveatus*

基因 gene	片段长/bp fragment length	插入\缺失位点 gapped site	多态位点 polymorphic site	信息简约位点 parsimony informative site	平均碱基差异 average pairwise difference
16S rRNA	526	0	6	6	3.2
Cyt b	379	0	38	38	22.7

C.lucidus 1	ACTGCGTGCC	CTGTGACCAT	GAGTTTAACG	GCCGCGGTAT	TTTGACCCGTG	CAAGGCTAGC	GCAATCACTT	GTCTTTTAAA	[ 80]	棘头梅童鱼
C.lucidus 2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 80]	
C.lucidus 3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 80]	
C.niveatus 1	C.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 80]	黑鳃梅童鱼
C.niveatus 2	C.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 80]	
C.niveatus 3	C.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 80]	
A.argentatus	C.....	.C.....	.T.....	.....	.....	.....	.....	.T.....	[ 80]	白姑鱼
C.lucidus 1	TAAAGACCCG	TATGAATGGC	AAGACGAGGG	CTTAGCTGTC	TCCTTTTTCa	GGTCAATGAA	ATTGATCTTT	CCGTGCAGAA	[160]	棘头梅童鱼
C.lucidus 2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[160]	
C.lucidus 3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[160]	
C.niveatus 1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[160]	黑鳃梅童鱼
C.niveatus 2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[160]	
C.niveatus 3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[160]	
A.argentatus	.....	.....	.....	..A.....	.....	A.....	.....	.C.....	[160]	白姑鱼
C.lucidus 1	GCGGGAAATAT	TAACATAAGA	CGAGAAGACC	CTATGGAGCT	TTAGACACCA	AGACAGATCA	CGTCAAAACC	CCCTAACAAA	[240]	棘头梅童鱼
C.lucidus 2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[240]	
C.lucidus 3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[240]	
C.niveatus 1	.....	.TC.....	.....	.....	.....	.....	.....	.T.....	[240]	黑鳃梅童鱼
C.niveatus 2	.....	.TC.....	.....	.....	.....	.....	.....	.T.....	[240]	
C.niveatus 3	.....	.TC.....	.....	.....	.....	.....	.....	.T.....	[240]	
A.argentatus	.....	.T.CTC.....	.....	.G.....	.....	.A.....	.....	.T.T.....	[240]	白姑鱼
C.lucidus 1	GGATTAAACT	AACTGAACCC	TGTCCTAATG	TCTTTGGTTG	GGGCGACCAC	GG-GGAACTA	CAAAACCCCC	GGCTGGAATG	[320]	棘头梅童鱼
C.lucidus 2	.....	.....	.....	.....	.....	-	.....	.....	[320]	
C.lucidus 3	.....	.....	.....	.....	.....	-	.....	.....	[320]	
C.niveatus 1	..C.....	.....	.....	.....	.....	-	.....	.....	[320]	黑鳃梅童鱼
C.niveatus 2	..C.....	.....	.....	.....	.....	-	.....	.....	[320]	
C.niveatus 3	..C.....	.....	.....	.....	.....	-	.....	.....	[320]	
A.argentatus	..GCC.....	.G.C.....	...TTC.....	...C.....	.....	.T.....	.C.....	.....	[320]	白姑鱼
C.lucidus 1	AAAGCACCAC	CCTGCTTTTA	CAACTAAGAG	CCTCCGCTCT	AATAACAGA	ATTCTGACC	AACAAGATCC	GGCAACGCCG	[400]	棘头梅童鱼
C.lucidus 2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[400]	
C.lucidus 3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[400]	
C.niveatus 1	.....	.....	.....	.....	.....	.A.....	.....	.....	[400]	黑鳃梅童鱼
C.niveatus 2	.....	.....	.....	.....	.....	.A.....	.....	.....	[400]	
C.niveatus 3	.....	.....	.....	.....	.....	.A.....	.....	.....	[400]	
A.argentatus	.G.....	.T.....	.C.C.....	.CTC.....	.C.....	.....	.T.....	.C.....	[400]	白姑鱼
C.lucidus 1	ATCAACGAAC	CGAGTTACCC	TAGGGATAAC	AGCGCAATCC	TCTTTTAGAG	TCCATATCGA	CAAGAGGGTT	TACGACCTCG	[480]	棘头梅童鱼
C.lucidus 2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[480]	
C.lucidus 3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[480]	
C.niveatus 1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[480]	黑鳃梅童鱼
C.niveatus 2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[480]	
C.niveatus 3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[480]	
A.argentatus	.....	.A.....	C.....	.....	...C....	C.....	.....	.....	[480]	白姑鱼
C.lucidus 1	ATGTTGGATC	AGGACATCCT	AATGGTGCAG	CCGCTATTAA	GGGTTCC	[527] 棘头梅童鱼				
C.lucidus 2	.....	.....	.....	.....	.....	[527]				
C.lucidus 3	.....	.....	.....	.....	.....	[527]				
C.niveatus 1	.....	.....	.....	.....	.....	[527] 黑鳃梅童鱼				
C.niveatus 2	.....	.....	.....	.....	.....	[527]				
C.niveatus 3	.....	.....	.....	.....	.....	[527]				
A.argentatus	.....	.....	.....	.....	.....	[527] 白姑鱼				

图1 棘头梅童鱼与黑鳃梅童鱼 16S rRNA 基因片段核苷酸序列比对

Fig. 1 Nucleotide sequence alignment of partial 16S rRNA of *C. lucidus* and *C. niveatus*

的 16S rRNA 基因片段上, 2 种间检测到 6 个多态位点 (包括 6 个信息简约位点), 6 个核苷酸替代 (nucleotide substitution) 中出现 1 个转换 (transition)、5 个颠换 (transversion), 转换颠换比 ( $T_s/T_v$ ) 为 0.2, 基于 Tamura-Nei 模型得到 2 种间的遗传距离为 0.012, 棘头梅童鱼与黑鳃梅童鱼的种内遗传距离皆为 0, 种内个体间无差异, 2 种梅童鱼与白姑鱼的遗传距离分别为 0.085 和 0.078; 在

379 bp 的 Cyt *b* 基因片段上, 检测到 38 个多态位点 (包括 38 个信息简约位点), 38 个核苷酸替代包含了 35 个转换和 3 个颠换, 转换颠换比 ( $T_s/T_v$ ) 为 11.67, 2 种梅童鱼的种内遗传距离分别为 0 和 0.002, 种间遗传距离为 0.111, 而与白姑鱼的遗传距离分别为 0.153 和 0.155。

在蛋白质编码基因片段中, 大部分的突变是同义突变 (synonymous substitution), 最普遍的核苷

C.lucidus 1	CCC	ACT	CCT	AAA	AAT	CGC	TAA	CGA	CGC	ACT	AGT	AGA	CCT	CCC	CGC	CCC	CTC	TAA	CAT	TTC	AGC	CTG	ATG	AAA	CTT	TGG	[ 78]	棘头梅童鱼	
C.lucidus 2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]		
C.lucidus 3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]		
C.niveatus 1	...	G..	...	...	...	...	...	...	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	C..	T..	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]	黑鲷梅童鱼	
C.niveatus 2	...	G..	...	...	...	...	...	...	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	C..	T..	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]		
C.niveatus 3	...	G..	...	...	...	...	...	...	...	T..	...	...	...	...	...	...	...	C..	T..	...	...	...	...	...	...	...	[ 78]		
A.argentatus	...	CG.	.T.	...	...	...	A..	.C.	...	.T.	...	G..	...	...	...	...	...	C..	...	C..	C..	...	...	...	...	C..	[ 78]	白姑鱼	
C.lucidus 1	CTC	CTT	ACT	TGC	CCT	CTG	TCT	AGG	CGC	CCA	AAT	TCT	CAC	AGG	ACT	CTT	CCT	TGC	TAT	ACA	CTA	TAC	ATC	TGA	CAT	CTC	[156]	棘头梅童鱼	
C.lucidus 2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[156]		
C.lucidus 3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[156]		
C.niveatus 1	...	.C.	...	G..	T..	...	C..	...	...	...	...	C..	...	...	...	T..	...	G..	...	...	...	...	...	TG.	.A.	...	[156]	黑鲷梅童鱼	
C.niveatus 2	...	.C.	...	G..	T..	...	C..	...	...	...	...	C..	...	...	...	T..	...	G..	...	...	...	...	...	TG.	.A.	...	[156]		
C.niveatus 3	...	.C.	...	G..	T..	...	C..	...	...	...	...	C..	...	...	...	T..	...	G..	...	...	...	...	...	TG.	.A.	...	[156]		
A.argentatus	...	...	...	A.G	...	...	C..	G.C	...	...	...	C..	...	...	...	C..	C..	...	...	...	...	...	...	T..	...	...	[156]	白姑鱼	
C.lucidus 1	CAT	AGC	CTT	CTC	GTC	TGT	TGC	ACA	CAT	CTG	CCG	TGA	TGT	CAA	TTA	CGG	ATG	ACT	CAT	CCG	AAA	CCT	CCA	TGC	CAA	CGG	[234]	棘头梅童鱼	
C.lucidus 2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[234]		
C.lucidus 3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[234]		
C.niveatus 1	T..	...	T..	...	A..	...	...	...	...	T..	...	...	C..	...	C..	...	...	...	...	...	...	...	T..	...	...	...	[234]	黑鲷梅童鱼	
C.niveatus 2	T..	...	T..	...	A..	...	...	...	...	T..	...	...	C..	...	C..	...	...	...	...	...	...	...	T..	...	...	...	[234]		
C.niveatus 3	T..	...	T..	...	A..	...	...	...	...	T..	...	...	C..	...	C..	...	...	...	...	...	...	...	T..	...	...	...	[234]		
A.argentatus	T..	...	...	...	A..	C..	...	...	...	T..	...	C..	C..	...	C..	...	G..	...	T..	...	...	T..	...	...	...	...	[234]	白姑鱼	
C.lucidus 1	CGC	CTC	TTT	CTT	CTT	TAT	TTG	CCT	TTA	CCT	CCA	CAT	CGG	CCG	AGG	CCT	CTA	TTA	TGG	CTC	CTA	CCT	GTA	CAA	AGA	GAC	[312]	棘头梅童鱼	
C.lucidus 2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[312]		
C.lucidus 3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[312]		
C.niveatus 1	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...	...	...	...	T..	C..	C..	...	...	...	...	T..	...	...	[312]	黑鲷梅童鱼	
C.niveatus 2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...	...	...	...	T..	C..	C..	...	...	...	...	A..	T..	...	[312]		
C.niveatus 3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	...	...	...	...	T..	C..	C..	...	...	...	...	A..	T..	...	[312]		
A.argentatus	...	...	A..	...	T..	...	C..	...	C..	...	T..	...	T..	...	...	...	C..	C..	...	T..	...	...	T..	...	T..	A..	...	[312]	白姑鱼
C.lucidus 1	ATG	AAA	TAT	CGG	AGT	CGT	ACT	CTT	CCT	GCT	TGT	AAT	AAT	AAC	CGC	CTT	CGT	TGG	TTA	TGT	CTT	CCC	C	...	...	...	[379]	棘头梅童鱼	
C.lucidus 2	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[379]		
C.lucidus 3	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	[379]		
C.niveatus 1	...	...	C..	T..	...	...	T..	...	A..	...	...	...	G..	T..	T..	T..	C..	C..	...	...	...	A..	...	...	...	...	[379]	黑鲷梅童鱼	
C.niveatus 2	...	...	C..	T..	...	...	T..	...	A..	...	...	...	G..	T..	T..	T..	C..	C..	...	...	...	A..	...	...	...	...	[379]		
C.niveatus 3	...	...	C..	T..	...	...	T..	...	A..	...	...	...	G..	T..	T..	T..	C..	C..	...	...	...	A..	...	...	...	...	[379]		
A.argentatus	...	...	C..	...	...	A..	C..	...	C..	A..	...	...	...	...	...	...	C..	...	C..	...	C..	...	C..	...	...	...	...	[379]	白姑鱼

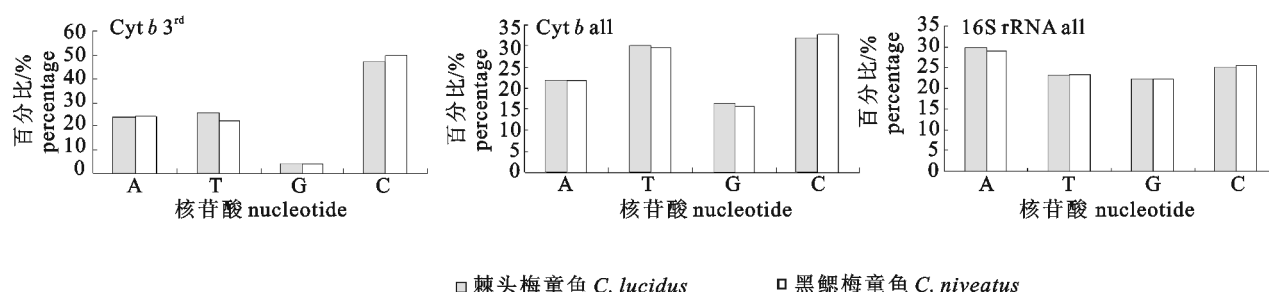
图2 棘头梅童鱼与黑鳃梅童鱼 Cyt *b* 基因片段核苷酸序列比对Fig. 2 Nucleotide sequence alignment of partial Cyt *b* gene of *C. lucidus* and *C. niveatus*

图3 棘头梅童鱼和黑鳃梅童鱼 2 个基因片段核苷酸组成

all. 整个片段; 3<sup>rd</sup>. 蛋白质编码基因第三密码子位点Fig. 3 Nucleotide composition of two partial fragments of *C. lucidus* and *C. niveatus*all. the whole fragment; 3<sup>rd</sup>. the third codon of the gene

酸替代是发生在密码子第三位点上的转换, 其次是密码子第三位点上的颠换和密码子第一位点上的无义转换<sup>[21]</sup>。Cyt *b* 基因片段上的 38 处突变中, 35 处核苷酸替代发生在密码子第三位点上 (2 处为颠换), 3 处位于密码子第一位点上 (1 处为颠换)。氨基酸水平上, 在 Cyt *b* 基因片段编码的 126 个氨基酸序列上, 2 种间共检测到 2 处氨基酸替代 (amino acid substitution), 是由第一密码子非同义替代造成的 (转换、颠换各 1 处) (图 4)。

根据分子钟假说, 某一特定的大分子 (蛋白质或 DNA 分子) 在所有的世系 (Lineage) 中, 核苷酸替代速率在时间上是稳定的。BROWN 等<sup>[13]</sup>将 2%/百万年的核苷酸分歧速率应用于 Cyt *b* 基因片段来推算硬骨鱼的分化时间 (divergence time), 此核苷酸分歧速率被广泛应用于鱼类分化年代的计算。该研究将此分歧速率应用于棘头梅童鱼与黑鳃梅童鱼 Cyt *b* 基因片段, 基于 Tamura-Nei 模型计算的净遗传距离为 0.110, 推测棘头梅童鱼与黑鳃梅

C.lucidus 1	PLKIANDAL	UDLPAPSNIS	AWWNFGSLLA	LGLGAQILTG	LFLAMHYTSD	ISHAFSSUAH	ICRDV	[ 65]	棘头梅童鱼
C.lucidus 2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 65]	
C.lucidus 3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 65]	
C.niveatus 1	.....	.....	.....	.....	.....	UT.....	.....	[ 65]	黑鳃梅童鱼
C.niveatus 2	.....	.....	.....	.....	.....	UT.....	.....	[ 65]	
C.niveatus 3	.....	.....	.....	.....	.....	UT.....	.....	[ 65]	
A.argentatus	.U.....H..	.....	.....G	...A.....	.....	.....	.....	[ 65]	白姑鱼
C.lucidus 1	NYGWLIRNLH	ANGASFFFC	LYLHIGRGLY	YGSYLYKETW	NIGUULFLLV	MHTAFUGYVL	P	[126]	棘头梅童鱼
C.lucidus 2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[126]	
C.lucidus 3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[126]	
C.niveatus 1	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[126]	黑鳃梅童鱼
C.niveatus 2	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[126]	
C.niveatus 3	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[126]	
A.argentatus	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[126]	白姑鱼

图4 棘头梅童鱼与黑鳃梅童鱼 Cyt b 氨基酸序列比对

Fig.4 Amino acid sequence alignment of partial Cyt b of *C. lucidus* and *C. niveatus*

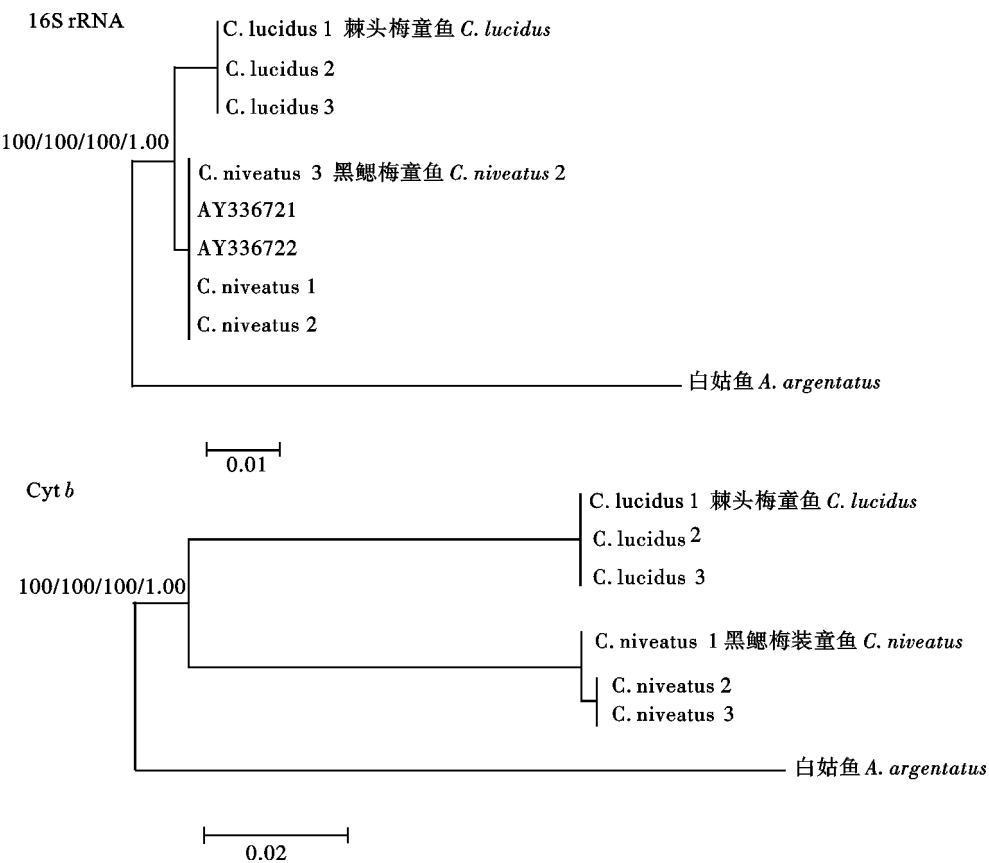


图5 基于邻接法、最大简约法、最大似然估计法和贝叶斯法构建的棘头梅童鱼与黑鳃梅童鱼系统发育树（支持率及后验概率标注在分支上）

Fig.5 Phylogenetic trees of *C. lucidus* and *C. niveatus* based on neighbor-joining analyses, maximum parsimony analyses and Bayes analyses (Numbers on the trees represent the supporting value and posterior probability)

童鱼的分歧时间约为550万年，推算2种间的分化事件发生于上新世（Pliocene）早期。

2.4 系统发育分析

以石首鱼科的白姑鱼作为外群，基于邻接法、最大简约法、最大似然法和贝叶斯法构建的16S

rRNA系统发育树基本一致（图5）。该研究得到的黑鳃梅童鱼序列同GenBank中的棘头梅童鱼序列（AY336721）和黑鳃梅童鱼序列（AY336722）完全相同，三者聚为一支，形成一个单系类群。基于邻接法、最大简约法、最大似然法和贝叶斯法构建

的 Cyt *b* 系统发育树也基本一致 (图 5)。棘头梅童鱼与黑鳃梅童鱼明显分为 2 支, 节点支持率均为 100%。

### 3 讨论

#### 3.1 2 种梅童鱼的分类地位

蒙子宁等<sup>[9]</sup>对中国近海 8 种石首鱼科鱼类 16S rRNA 基因片段序列的研究结果显示, 2 种梅童鱼的 16S rRNA 序列相同。而该研究得到的黑鳃梅童鱼序列与棘头梅童鱼序列 (AY336721) 和黑鳃梅童鱼序列 (AY336722) 完全相同, 共享一个单倍型。基于邻接法、最大简约法、最大似然法和贝叶斯法构建的 16S rRNA 系统发育树显示, 该研究得到的黑鳃梅童鱼序列与蒙子宁等得到的序列 (AY336721 和 AY336722) 聚为一支, 形成一个单系群, 且棘头梅童鱼与黑鳃梅童鱼明显分为 2 个单系群, 节点支持率均为 100%。根据 16S rRNA 基因高度保守性的特点, 推测蒙子宁等研究中所用的“棘头梅童鱼”应为黑鳃梅童鱼。基于 Cyt *b* 基因片段序列构建的系统树与 16S rRNA 系统树的结果一致, 也支持棘头梅童鱼与黑鳃梅童鱼为 2 种不同的梅童鱼。

16S rRNA 比 Cyt *b* 基因进化速率要慢, 2 个基因片段的序列分析结果都显示棘头梅童鱼与黑鳃梅童鱼存在显著的遗传分化, 2 种间遗传距离分别为 0.012 和 0.111, 属于属内种间差异<sup>[22]</sup>, 与笔者对棘头梅童鱼与黑鳃梅童鱼在鳃腔、头部小棘数目、臀鳍第一鳍棘等部位存在显著形态学差异的研究结果 (未发表) 相一致。

#### 3.2 2 种梅童鱼序列分析

4 种核苷酸在线粒体基因组中分布不均动物线粒体基因组的共性<sup>[13]</sup>。该研究得到的 16S rRNA 和 Cyt *b* 基因片段核苷酸组成中的鸟嘌呤 (G) 含量普遍较低。棘头梅童鱼和黑鳃梅童鱼的 Cyt *b* 蛋白质编码基因第三密码子位点的核苷酸组成存在较大偏倚 (Bias), C 占 46.8% 和 50%, 而 G 仅占 4.2% 和 4%。在其他鱼类中, Cyt *b* 基因片段核苷酸组成分析的结果也显示 G 含量普遍较低, 这一点在密码子第三位点上尤为明显<sup>[23-25]</sup>。对于编码重要功能蛋白质的 Cyt *b* 基因来说, 由于在 DNA 水平上受自然选择压力的影响, 密码子第三位点的突变率高于第一和第二位点, 而且密码子第三位点的

突变绝大多数是同义突变, 受自然选择压力较小, 突变后易固定, 所以密码子第三位点能够更清晰地表明线粒体基因组核苷酸组成的不均一性<sup>[26]</sup>, 而第一、第二位点则相反。

密码子第三位点上的突变很少导致氨基酸替代 (同义替代), 所以比导致氨基酸替代的突变 (非同义替代) 积累要快得多, 最常见的突变是密码子第三位点上的转换, 其次是第一密码子位点上的无义转换和密码子第三位点上的颠换<sup>[26]</sup>。该研究中 Cyt *b* 作为编码重要蛋白质的基因片段, 在编码的 126 个氨基酸序列上, 由于第一密码子的非同义替代造成 2 处氨基酸替代, 与先前的研究结果一致<sup>[26]</sup>。

#### 3.3 2 种梅童鱼遗传分化

用一个时间尺度来估计分子进化率和有机体形态变化率以解释生物大进化和生物地理模式是非常必要的<sup>[27]</sup>。HEWITT<sup>[28]</sup>认为物种成种事件 (speciation event) 主要发生在上新世 (Pliocene) 和更新世 (Pleistocene)。目前, 很多研究者将 2%/百万年的核苷酸分歧速率应用于 Cyt *b* 基因片段来推算硬骨鱼类的分化时间<sup>[28-30]</sup>。根据 2 种梅童鱼的 Cyt *b* 基因片段的净遗传距离为 0.110, 推算棘头梅童鱼与黑鳃梅童鱼的分歧时间约为 550 万年, 分化事件发生在上新世 (Pliocene) 早期, 与 HEWITT 的研究结果相符。

### 参考文献:

- [1] 朱元鼎, 罗云林, 伍汉霖. 中国石首鱼类分类系统的研究和新属新种的叙述 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1963.
- [2] 杨纪明. 渤海鱼类的食性和营养级研究 [J]. 现代渔业信息, 2001, 16 (10): 10-19.
- [3] 程济生. 东海、黄海冬季底层鱼类群落结构及其多样性 [J]. 海洋水产研究, 2000, 21 (3): 1-8.
- [4] 单乐州, 邵鑫斌, 闫茂仓. 棘头梅童鱼幼鱼生物学特性的初步观察 [J]. 水产养殖, 2007, 28 (6): 4-5.
- [5] 单乐州, 邵鑫斌, 谢起浪, 等. 棘头梅童鱼人工繁殖及育苗技术研究 [J]. 浙江海洋学院学报: 自然科学版, 2006, 25 (3): 266-271.
- [6] 吴振兴, 吴常文. 浙江近海棘头梅童鱼生长规律与群体组成的研究 [J]. 水产科技情报, 1990, 17 (6): 170-174.
- [7] 谢起浪, 单乐州, 王铁杆, 等. 浙南飞云江口棘头梅童鱼的资源调查和研究 [J]. 渔业现代化, 2006 (1): 35-36.
- [8] 田兰香, 梁冰, 张树义, 等. 细胞色素 b 基因序列与 7 种石首鱼类的系统进化 [J]. 台湾海峡, 2004, 23 (4): 436-443.
- [9] 蒙子宁, 庄志猛, 丁少雄, 等. 中国近海 8 种石首鱼类的线粒

- 体 16S rRNA 基因序列变异及其分子系统进化 [J]. 自然科学进展, 2004, 14 (5): 514–521.
- [10] 陈泉梅. 中国石首鱼科鱼类分子系统学研究 [D]. 广州: 暨南大学, 2007.
- [11] 肖武汉, 张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与分化 [J]. 水生生物学报, 2000, 24 (4): 384–391.
- [12] AVISE J C. Phylogeography [M]. London: Harvard University Press, 2000: 1–36.
- [13] BROWN W M. Evolution of genes and proteins [M]. Sunderland: Sinaue, 1983: 62–88.
- [14] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T, et al. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996: 464–468.
- [15] INOUE J G, MIYA M, TSUKAMOTO K. A mitogeneomic perspective on the basal teleostean phylogeny: resolving higher-level relationships with longer DNA sequences [J]. Mol Phyl Evol, 2001, 20 (2): 275–285.
- [16] POSADA D, CRANDALL K A. Model test: testing the model of DNA substitution [J]. Bioinformatics, 1998, 14 (9): 817–818.
- [17] KUMAR S, TAMURA K, JAKOBSEN I B, et al. MEGA 2.0: Molecular evolutionary genetics analysis software [J]. Bioinformatics, 2001, 17 (12): 1244–1245.
- [18] SCHNEIDER S, ROESSLI D, EXCOFFIER L. ARLEQUIN, Version 2,000: a software of population genetic data analysis [M]. Geneva: University of Geneva, 2000.
- [19] SWOFFORD D L. PAUP\*. Phylogenetic analysis using parsimony (\* and other methods), Version 4 [Z]. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2002.
- [20] RONQUIST F, HUELSENBECK J P. Mrbayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. Bioinformatics, 2003, 19 (12): 1572–1574.
- [21] SBISà E, TANZARIELLO F, REYES A, et al. Mammalian mitochondrial D-loop region structure analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications [J]. Gene, 1997, 205 (1/2): 125–140.
- [22] JOHNS G C, AVISE J C A. Comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial Cyt *b* gene [J]. Mol Phyl Evol, 1998, 15 (11): 1481–1490.
- [23] 高天翔, 陈省平, 韩志强, 等. 大银鱼和小齿日本银鱼线粒体细胞色素 *b* 和 16S rRNA 部分序列分析 [J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34 (5): 791–794.
- [24] 高天翔, 陈四清, 刘进贤, 等. 圆斑星鲽与条斑星鲽线粒体 DNA 部分片段的序列比较研究 [J]. 高技术通讯, 2004 (14): 329–334.
- [25] 张俊丽, 高天翔, 韩志强, 等. 3 种白鲑线粒体细胞色素 *b* 和 16S rRNA 基因片段序列分析 [J]. 中国水产科学, 2007, 14 (1): 8–14.
- [26] MEYER A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes [M] // HOCHACHKA P W, MOMMSEN P. Biochemistry and molecular biology of fishes. Amsterdam: Elsevier Press, 1993: 1–36.
- [27] 彭作刚, 何舜平, 张耀. 细胞色素 *b* 基因序列变异与东亚鳕科鱼类系统发育 [J]. 自然科学进展, 2002, 12 (6): 596–600.
- [28] HEWITT G M. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation [J]. Biol J Linn Soc, 1996, 58 (3): 247–276.
- [29] 毕潇潇, 高天翔, 肖永双, 等. 4 种鳊鱼线粒体 16S rRNA、COI 和 Cyt *b* 基因片段序列的比较研究 [J]. 南方水产, 2009, 5 (3): 46–52.
- [30] 张岩, 肖永双, 高天翔, 等. 两种黄盖鲈线粒体 DNA 部分片段比较分析 [J]. 水产学报, 2009, 33 (2): 201–207.