

# 笛鲷属(*Lutjanus*)鱼类线粒体 16S rRNA 基因序列比较及系统学分析\*

刘楚吾 徐田军 刘丽 郭昱嵩 董秋芬

(广东海洋大学水产学院 湛江 524025)

**提要** 对笛鲷属 9 种鱼的线粒体 DNA 16S rRNA 基因片段进行了 PCR 扩增, 扩增产物经纯化后测序, 得到了长度为 561bp 的分析序列。结合 GenBank 中的另外 9 种笛鲷的 16S rRNA 同源序列计算得出 A、T、G、C 的含量平均为 28.5%、22.1%、23.6% 和 25.8%, AT 含量稍高于 GC 含量, 18 种笛鲷碱基组成差异不大。利用 MEGA3.1 软件对所得序列进行比对后检测到 72 个变异位点, 其中包括简约信息位点 44 个, 在变异位点中 75.61% 的碱基替换是由于发生了转换, 转换/颠换平均为 3.1 : 1。计算了种间的遗传距离, 结果表明, 序列差异在 0.0193—0.0680 之间, 其中勒氏笛鲷和金焰笛鲷、勒氏笛鲷和金带笛鲷的序列差异最小, 而红鳍笛鲷和金焰笛鲷、红鳍笛鲷和画眉笛鲷的序列差异最大。选用高体四长棘鲷(*Argyrops spinifer*)为外群, 利用 NJ 法构建了分子系统树, 结果表明: 本研究中的 9 种南海笛鲷与其它 9 种笛鲷进化关系较远; 并且南海 9 种笛鲷相互之间仍然保持着着相对较远的遗传距离, 遗传多样性较好。

**关键词** 笛鲷属, 16S rRNA, 序列比较, 分子系统学

**中图分类号** Q959.483

线粒体 DNA 是核外遗传物质, 大多数呈母系遗传, 由于具有结构简单, 进化较快, 变异较大, 不同区域进化速度存在差异等优点, 在动物种群的遗传变异分析、种质鉴定和系统进化关系的研究中起了重要的作用(吕国庆等, 1998; Kitaur *et al*, 1998; Dbermiller *et al*, 2003)。在线粒体 DNA 中, 16S rRNA 基因序列具有较强的种间鉴别能力, 因而广泛应用于脊椎动物和无脊椎动物的系统学研究中(孔晓瑜等, 2001a)。

笛鲷属(*Lutjanus*)隶属于鲈形目(Perciformes)、笛鲷科(Lutjanidae), 主要分布于印度洋和太平洋西部海域, 在我国见于南海和东南南部。对笛鲷属的研究, 国外开展得比较早(Chow *et al*, 1993; Gold *et al*, 1997; Santamaria *et al*, 1999), 国内对该属鱼类的研究也取得了较好的进展(王中锋等, 2005; 张俊彬等, 2005; 周发林等, 2004; 易乐飞等, 2005; Guo *et al*, 2007a, b;

Liu *et al*, 2007; Yusong *et al*, 2008)。本研究通过测定笛鲷属 9 种常见种类——勒氏笛鲷(*L. russelli*)、金焰笛鲷(*L. fulviflamma*)、红鳍笛鲷(*L. erythropterus*)、紫红笛鲷(*L. argentimaculatus*)、画眉笛鲷(*L. vitta*)、星点笛鲷(*L. stellatus*)、千年笛鲷(*L. sebae*)、金带笛鲷(*L. vaigiensis*)和约氏笛鲷(*L. johni*)的线粒体 DNA 16S rRNA 基因部分序列, 进行分析比较, 并结合数据库中的另外 9 种笛鲷属鱼类的 16S rRNA 基因同源序列, 对 18 种笛鲷的系统进化关系进行了综合分析, 旨在丰富笛鲷属鱼类的遗传多样性和系统进化关系的研究内容。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

实验用 9 种笛鲷为采集于广东省湛江海区的野生种, 依照《南海鱼类志》(中国科学院动物研究所等,

\* 国家自然科学基金项目, 30671610 号; 国家科技支撑计划项目, 2007BAD29B03 号; 广东省科技计划项目重大专项, A3050202 号。刘楚吾, 教授, 博士生导师, E-mail: liucw@gdou.edu.cn

收稿日期: 2008-11-18, 收修改稿日期: 2009-01-12

1962)进行形态学鉴定,从尾静脉取血液,加 ACD 抗凝, -70 保存备用。

## 1.2 实验方法

**1.2.1 基因组 DNA 的提取** 每尾鱼取 50 $\mu$ l 血液,采用常规的苯酚/氯仿方法(萨姆布鲁克等, 2001)提取基因组总 DNA, 溶解于 TE 中, -70 保存备用。

**1.2.2 PCR 扩增及序列测定** 扩增引物由上海生工公司合成, 序列为: 16SA: 5' CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT 3'; 16SB: 5' CCG GTT GAA CTC AGA TCA 3' (Ui *et al*, 2001), PCR 扩增仪为 Hema8000 型, 反应总体积为 25 $\mu$ l, 反应体系含有 10 $\times$  Buffer 2.5 $\mu$ l、0.2mmol/L dNTPs、0.2 $\mu$ mol/L 双向引物、1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>、1.5U Taq 酶(以上试剂均为上海生工公司的产品), DNA 模板约 100ng, 用灭菌超纯水补足至 25 $\mu$ l。PCR 扩增条件优化为: 94 预变性 5min; 然后 94 变性 50s, 52 退火 1min, 72 延伸 1min, 共 35 个循环; 最后在 72 延伸 5min, 4 保存。每次扩增反应设置一个阴性对照。PCR 扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测并拍照记录。将纯化的 PCR 产物送至上海生工公司进行测序。

**1.2.3 数据处理** 测序结果经过人工校正核对, 使

用 MEGA3.1(Kumar *et al*, 1994)软件对 18 种笛鲷的同源序列进行比对排序, 计算序列的碱基组成以及不同种间的遗传距离; 采用 NJ 法基于 16S rRNA 序列构建了分子系统树, 分析其亲缘关系。

## 2 结果与讨论

### 2.1 18 种笛鲷属鱼类 16S rRNA 基因片断序列的碱基组成

PCR 反应优化后, 扩增特异性较好, 扩增片断大小约在 560bp 左右, 测序后在 9 种笛鲷中得到了 555—560bp 的 16S rRNA 基因序列, 在数据库中检索比后发现与其中笛鲷属鱼类的 16S rRNA 有很高的同源性, 适合进一步的分析。并将获得的序列提交 GenBank, 序列登录号见表 1。

利用 MEGA3.1 计算测得序列的碱基组成(表 1)。碱基组成在不同种中变化不大, 没有明显的差别。GC 含量一般不高于 50%(最低的金焰笛鲷为 48.5%), 而 AT 含量一般不低于 50%, 从 18 种笛鲷碱基组成的平均值来看, A+T 含量(50.6%)要高于 G+C 的含量(49.4%), 这与报道的其它物种 16S rRNA 基因的组成相似(GAO *et al*, 2003)。其中 A 的含量最高平均为

表 1 18 种笛鲷 mtDNA 16S rRNA 的碱基组成及数据库登录号

Tab.1 The base composition of mtDNA 16S rRNA and GenBank accession number of 18 *Lutjanus* species

中文种名	拉丁种属名	T(%)	C(%)	A(%)	G(%)	G+C(%)	序列总长(bp)	序列登录号
勒氏笛鲷	<i>L. russelli</i>	22.2	25.6	28.8	23.4	49.0	559	DQ444478*
金焰笛鲷	<i>L. fulviflamma</i>	22.2	25.6	29.2	22.9	48.5	558	DQ444479*
红鳍笛鲷	<i>L. erythropterus</i>	21.6	26.5	28.1	23.8	50.3	555	DQ444480*
紫红笛鲷	<i>L. argentimaculatus</i>	22.2	25.8	28.0	24.0	49.8	558	DQ444481*
画眉笛鲷	<i>L. vitta</i>	22.8	25.6	28.3	23.3	48.9	558	DQ444482*
星点笛鲷	<i>L. stellatus</i>	21.7	25.9	29.3	23.2	49.1	557	DQ444483*
约氏笛鲷	<i>L. johni</i>	22.9	25.0	28.2	23.9	48.9	560	DQ444484*
千年笛鲷	<i>L. sebae</i>	22.3	26.2	28.0	23.5	49.7	557	DQ444485*
金带笛鲷	<i>L. vaigiensis</i>	21.9	25.8	29.0	23.3	49.1	558	DQ444486*
巴哈马笛鲷	<i>L. synagris</i>	21.7	26.4	28.4	23.5	49.9	557	AY857939
白纹笛鲷	<i>L. jocu</i>	21.7	26.2	27.8	24.2	50.4	557	AY857943
灰笛鲷	<i>L. griseus</i>	22.1	25.7	28.2	23.9	49.6	556	AY857944
交叉笛鲷	<i>L. decussatus</i>	21.9	26.2	28.6	23.3	49.5	549	AF247445
九带笛鲷	<i>L. novemfasciatus</i>	22.6	25.0	28.9	23.5	48.5	544	AY958620
秘鲁笛鲷	<i>L. peru</i>	21.7	25.8	29.1	23.4	49.2	539	AY947840
双色笛鲷	<i>L. analis</i>	22.1	26.0	28.2	23.7	49.7	557	AY857938
纹眼笛鲷	<i>L. argentiventris</i>	22.1	25.2	28.8	23.9	49.1	535	AY947839
西大西洋笛鲷	<i>L. campechanus</i>	21.9	26.2	28.4	23.5	49.7	557	AY857940
平均		22.1	25.8	28.5	23.6	49.4		

\* 表示此序列为本研究所得序列

28.5%, 而 T 最低平均为 22.1%, 总的来说各碱基组成相差不大。经比较, 本研究的 9 种笛鲷的碱基组成与从 GenBank 中下载的另外 9 种笛鲷的组成基本上一致。

2.2 18 种笛鲷属鱼类 16S rRNA 基因序列的变异

图 1、图 2 为 18 种笛鲷属鱼类的 16S rRNA 基因部分同源序列的比对结果, 经过比对后用于分析的实际长度为 561bp。其中单突变子的碱基共 27 个, 占

<i>L. russelli</i>	-AGGTC	CTGC	GCGT	GACT	TAAAGT	TTAAC	GCGCCG	CGGTAT	TTTG	ACCGT	GCGAA	GGTAG	C	GCAA	TCACT	TGCT	TTTAA	[ 85]				
<i>L. fulviflamma</i>	- C. GT	.....	C. -	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 85]				
<i>L. erythropterus</i>	-.....	C. ....	C. -	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 85]				
<i>L. argentimaculatus</i>	-.....	C. ....	C. -	G	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 85]				
<i>L. vitta</i>	- C. T	.....	C. -	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 85]				
<i>L. stellatus</i>	-.....	C. ....	C. -	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 85]				
<i>L. johni</i>	AG. T	.....	C. TGTG	.....	G	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 85]				
<i>L. sebae</i>	-.....	C. ....	C. -	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 85]				
<i>L. vaigiensis</i>	-.....	AT	.....	C. -	G	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 85]				
<i>L. synagris</i>	-.....	C. ....	C. -	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 85]				
<i>L. jocu</i>	-.....	C. ....	C. -	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 85]				
<i>L. griseus</i>	-.....	C. ....	C. -	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 85]				
<i>L. decussatus</i>	-.....	C. ....	C. -	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 85]				
<i>L. novemfasciatus</i>	-----	-----	C. -	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 85]				
<i>L. peru</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 85]				
<i>L. analis</i>	-.....	C. ....	C. -	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 85]				
<i>L. argentiventris</i>	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	[ 85]				
<i>L. campechanus</i>	-.....	C. ....	C. -	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[ 85]				
<i>L. russelli</i>	ATGGAG	ACCT	GTAT	GAAT	GG	CATA	ACGAGG	GCTT	AGCT	GT	CTCCT	ATTTC	CAGT	CAAT	GAA	AATT	GATCTC	CCCGT	G	CAGA	AGCGG	[170]
<i>L. fulviflamma</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[170]
<i>L. erythropterus</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[170]
<i>L. argentimaculatus</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[170]
<i>L. vitta</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[170]
<i>L. stellatus</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[170]
<i>L. johni</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[170]
<i>L. sebae</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[170]
<i>L. vaigiensis</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[170]
<i>L. synagris</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[170]
<i>L. jocu</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[170]
<i>L. griseus</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[170]
<i>L. decussatus</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[170]
<i>L. novemfasciatus</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[170]
<i>L. peru</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[170]
<i>L. analis</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[170]
<i>L. argentiventris</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[170]
<i>L. campechanus</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[170]
<i>L. russelli</i>	GGATAC	GCAC	ATAAG	ACGAG	AAGACC	TCTAT	GGAGC	TCTTAG	ACACCA	AAGC	AGACCA	TGTT	AAGCA	TCCCA	-AAACA	AAGA	ACCAA	[255]				
<i>L. fulviflamma</i>	.....	A. .	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	GA	.....	.....	A. A	.....	-	AAACA	AAGA	ACCAA	[255]			
<i>L. erythropterus</i>	.....	C. C	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	.....	A	.....	T. C	T	-	AAACA	AAGA	ACCAA	[255]	
<i>L. argentimaculatus</i>	.....	A	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[255]	
<i>L. vitta</i>	.....	T	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[255]	
<i>L. stellatus</i>	.....	A	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[255]	
<i>L. johni</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	GA	.....	.....	T	.....	A	C	.....	.....	.....	.....	[255]	
<i>L. sebae</i>	.....	CTC	.....	.....	A	.....	.....	.....	.....	GA	.....	.....	.....	.....	C	T	-	G	T	.....	[255]	
<i>L. vaigiensis</i>	.....	AT	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	A	C	.....	.....	.....	.....	[255]	
<i>L. synagris</i>	.....	T	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	GA	.....	.....	.....	.....	A	C	.....	.....	.....	.....	[255]	
<i>L. jocu</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	.....	.....	.....	[255]	
<i>L. griseus</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	.....	.....	.....	[255]	
<i>L. decussatus</i>	.....	T	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	A	C	.....	.....	.....	.....	[255]	
<i>L. novemfasciatus</i>	.....	A	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	T	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[255]	
<i>L. peru</i>	.....	TT	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	GA	.....	.....	.....	.....	A	C	.....	.....	.....	.....	[255]	
<i>L. analis</i>	.....	TTT	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	GA	.....	.....	.....	.....	A	C	.....	.....	.....	.....	[255]	
<i>L. argentiventris</i>	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	.....	.....	.....	[255]	
<i>L. campechanus</i>	.....	TT	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	GA	.....	.....	.....	.....	A	.....	.....	.....	.....	.....	[255]	
<i>L. russelli</i>	ACCAA	ATGAT	CCCTG	CTCTA	ATGTC	TTTGG	GGCGAC	CGCGGG	GAAA	TACAAA	ACCC	CCACG	TGGAA	CGAGA	AACACC	TCC-T	[340]					
<i>L. fulviflamma</i>	.....	.....	.....	TC	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	T	.....	.....	.....	[340]					
<i>L. erythropterus</i>	.....	G	.....	A	.....	C	C	.....	.....	C	.....	.....	.....	T	.....	G	.....	C	.....	[340]		
<i>L. argentimaculatus</i>	.....	.....	.....	C	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	.....	.....	GG	.....	C	.....	.....	[340]		
<i>L. vitta</i>	.....	.....	.....	C	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	T	T	.....	.....	[340]		
<i>L. stellatus</i>	.....	C	.....	C	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[340]		
<i>L. johni</i>	.....	G	.....	C	.....	C	.....	.....	.....	C	.....	.....	.....	T	.....	G	.....	C	.....	[340]		
<i>L. sebae</i>	.....	G	.....	G	.....	TC	C	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	C	.....	.....	[340]		
<i>L. vaigiensis</i>	.....	A	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[340]		
<i>L. synagris</i>	.....	GC	.....	C	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	.....	.....	[340]		
<i>L. jocu</i>	.....	.....	.....	C	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	C	.....	[340]		
<i>L. griseus</i>	.....	.....	.....	C	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	.....	.....	T	.....	G	.....	C	.....	[340]	
<i>L. decussatus</i>	.....	.....	.....	C	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	.....	.....	.....	T	.....	G	.....	.....	[340]	
<i>L. novemfasciatus</i>	.....	.....	.....	C	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	.....	.....	[340]	
<i>L. peru</i>	.....	GC	.....	C	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	.....	.....	[340]	
<i>L. analis</i>	.....	GC	.....	TC	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	.....	.....	.....	.....	G	.....	.....	.....	[340]	
<i>L. argentiventris</i>	.....	.....	.....	C	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	.....	.....	.....	.....	GT	.....	C	.....	[340]	
<i>L. campechanus</i>	.....	GC	.....	C	.....	.....	.....	.....	.....	C	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	.....	[340]	

图 1 18 种笛鲷的 16S rRNA 基因片段的序列图( )

Fig.1 The sequence of 16S rRNA gene fragment in 18 *Lutjanus* species ( )

<i>L. russelli</i>	CTCACAA	AGAGCTCCCG	CTCTAGTAAA	CAGAAATTCT	GACCAATCAG	ATCCGGCACA	AGCCGATCAA	CGGACCGAGT	TACCC	[425]
<i>L. fulviflamma</i>						T.				[425]
<i>L. erythropterus</i>	T.	T.	AC.	CA.	GCT.					[425]
<i>L. argentimaculatus</i>	G.				TCT.					[425]
<i>L. vitta</i>			C.							[425]
<i>L. stellatus</i>			A.		A.		GA.			[425]
<i>L. johni</i>	T.		A.		TG.					[425]
<i>L. sebae</i>			A.	C.	T.					[425]
<i>L. vaigiensis</i>			C.				T.			[425]
<i>L. synagris</i>										[425]
<i>L. jocu</i>			G.			T.				[425]
<i>L. griseus</i>						T.				[425]
<i>L. decussatus</i>			C.	G.			T.			[425]
<i>L. novemfasciatus</i>						T.				[425]
<i>L. peru</i>			G.		CT.					[425]
<i>L. analis</i>										[425]
<i>L. argentiventris</i>			G.			T.				[425]
<i>L. campechanus</i>			G.		CT.					[425]
<i>L. russelli</i>	TAGGGATAAC	AGCGCAATCC	CCTTTTAGAG	GCCATATCGA	CAAGGGGTT	TACGACCTCG	ATGTTGGATC	AGGACATCCT	AATGG	[510]
<i>L. fulviflamma</i>										[510]
<i>L. erythropterus</i>			T.	A.	A.					[510]
<i>L. argentimaculatus</i>										[510]
<i>L. vitta</i>				A.						[510]
<i>L. stellatus</i>										[510]
<i>L. johni</i>				A.						[510]
<i>L. sebae</i>				A.						[510]
<i>L. vaigiensis</i>										[510]
<i>L. synagris</i>										[510]
<i>L. jocu</i>										[510]
<i>L. griseus</i>										[510]
<i>L. decussatus</i>										[510]
<i>L. novemfasciatus</i>										[510]
<i>L. peru</i>										[510]
<i>L. analis</i>										[510]
<i>L. argentiventris</i>										[510]
<i>L. campechanus</i>										[510]
<i>L. russelli</i>	TGCAGCCGCT	ATTAAGGGTT	CGTTTGTTC	ACGATTAAG	TCCTACGTGA	TC				[562]
<i>L. fulviflamma</i>										[562]
<i>L. erythropterus</i>										[562]
<i>L. argentimaculatus</i>										[562]
<i>L. vitta</i>										[562]
<i>L. stellatus</i>										[562]
<i>L. johni</i>										[562]
<i>L. sebae</i>										[562]
<i>L. vaigiensis</i>										[562]
<i>L. synagris</i>										[562]
<i>L. jocu</i>										[562]
<i>L. griseus</i>										[562]
<i>L. decussatus</i>			G.							[562]
<i>L. novemfasciatus</i>										[562]
<i>L. peru</i>										[562]
<i>L. analis</i>										[562]
<i>L. argentiventris</i>										[562]
<i>L. campechanus</i>										[562]

图 2 18 种笛鲷的 16S rRNA 基因片段的序列图( )

Fig.2 The sequence of 16S rRNA gene fragment in 18 *Lutjanus* species ( )

总片段长度的 4.81%。变异位点有 72 个, 占总片段长度的 12.83%, 其中包括简约信息位点 44 个(占总变异位点的 61.11%, 不包括插入或缺失)。在变异位点中 75.61%的碱基替换是由于发生了转换(Transition), 而 24.39%的碱基突变是发生了颠换(Transversion), 转换/颠换比约为 3.1 : 1。而转换中约 55.56%是来源于嘧啶碱基之间的转换。

利用 MEGA3.1 软件计算了 18 种笛鲷属鱼类相互之间的转换颠换比(表 2), 从表中数据分析可知: 选用的另外 9 种笛鲷属鱼类(主要分布于大西洋海域)平均转换颠换比为 6.9, 转换数远大于颠换数, 同时可以看出很多种间出现转换发生而颠换不发生的现象。

在生物的进化过程中, 转换比颠换容易发生, 因此这样的数据也可以说明此海域的笛鲷相互之间遗传关系较近, 没有维持一定的遗传距离, 这可能与当地的养殖业非常发达、人工选育或者杂交等已经造成了非常严重的基因渐渗和基因混杂等原因有关。而对比可以发现我国海域 9 种笛鲷转换颠换比平均为 2.3, 维持了一个较好的变异比例, 说明南海海域的笛鲷相互之间仍然保持了一定的遗传距离, 遗传多样性较好。

### 2.3 笛鲷属鱼类亲缘关系分析

基于 Kimura 双参数法利用 MEGA 计算了笛鲷属 18 种笛鲷间的遗传距离(表 3), 并应用邻位相连法(Neighbor-joining)构建了分子系统进化树(图 3)。

表 2 18 种笛鲷属鱼类 mtDNA 16S rRNA 基因的转换颠换比(Ts/Tv)  
Tab.2 Ratio of transition/transversion in mtDNA 16S rRNA gene among 18 *Lutjanus* species

种类	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1. <i>L. russelli</i>	—																	
2. <i>L. fulviflamma</i>	2.545	—																
3. <i>L. erythropterus</i>	2.618	2.180	—															
4. <i>L. argentinaculatus</i>	2.201	2.065	2.545	—														
5. <i>L. vitta</i>	4.438	4.088	2.479	2.458	—													
6. <i>L. stellatus</i>	2.035	1.304	2.545	4.385	2.042	—												
7. <i>L. johni</i>	2.964	1.710	1.982	3.459	2.458	2.568	—											
8. <i>L. sebae</i>	2.324	1.644	10.381	3.273	1.946	2.504	2.304	—										
9. <i>L. vaigiensis</i>	1.828	1.452	2.279	2.190	3.066	1.140	2.593	1.946	—									
10. <i>L. synagris</i>	3.328	1.522	4.184	3.721	3.295	3.394	3.295	4.385	1.601	—								
11. <i>L. jocu</i>	4.088	2.661	2.810	3.328	4.385	6.134	4.920	2.872	2.392	7.090	—							
12. <i>L. griseus</i>	4.088	2.243	2.810	2.805	3.854	6.134	3.854	2.872	2.392	9.150	4/0	—						
13. <i>L. decussatus</i>	2.286	1.695	2.181	2.352	4.088	1.828	2.657	2.324	1.416	2.545	3.049	3.741	—					
14. <i>L. novemfasciatus</i>	3.066	2.568	2.863	2.705	3.083	14.367	3.508	3.279	1.750	6.657	10.185	8.118	2.805	—				
15. <i>L. peru</i>	3.854	1.868	3.820	3.295	3.295	3.741	3.295	4.385	1.601	6/0	9.150	11.225	2.028	6.657	—			
16. <i>L. analis</i>	3.854	1.522	4.550	3.936	3.295	3.741	3.721	4.385	1.601	5/0	11.225	13.316	2.545	7.183	7/0	—		
17. <i>L. argentiventris</i>	4.438	2.872	2.964	3.066	3.591	6.657	4.652	3.083	2.568	10.185	3/0	3/0	3.394	9.150	10.185	14.367	—	
18. <i>L. campechanus</i>	3.591	1.868	4.367	3.936	3.508	4.088	3.936	4.652	1.452	9/0	12.268	14.367	2.286	8.241	3/0	10/0	13.316	—

表 3 用 Kimura 双参数法计算 18 种笛鲷的遗传距离  
 Tab.3 Genetic distances among 18 *Lutjanus* species based on Kimura's two parameter method

种类	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1. <i>L. russelli</i>	—																	
2. <i>L. fulviflamma</i>	0.0193	—																
3. <i>L. erythropterus</i>	0.0659	0.0680	—															
4. <i>L. argentimaculatus</i>	0.0411	0.0472	0.0596	—														
5. <i>L. viitta</i>	0.0253	0.0272	0.0680	0.0493	—													
6. <i>L. stellatus</i>	0.0271	0.0251	0.0596	0.0412	0.0311	—												
7. <i>L. johni</i>	0.0474	0.0371	0.0575	0.0474	0.0453	0.0372	—											
8. <i>L. sebae</i>	0.0493	0.0451	0.0414	0.0576	0.0472	0.0472	0.0534	—										
9. <i>L. vaigiensis</i>	0.0212	0.0232	0.0658	0.0452	0.0232	0.0290	0.0473	0.0472	—									
10. <i>L. synagris</i>	0.0292	0.0212	0.0598	0.0432	0.0351	0.0232	0.0352	0.0392	0.0311	—								
11. <i>L. jocu</i>	0.0252	0.0272	0.0514	0.0311	0.0352	0.0252	0.0393	0.0351	0.0351	0.0154	—							
12. <i>L. griseus</i>	0.0252	0.0232	0.0514	0.0271	0.0312	0.0252	0.0312	0.0351	0.0351	0.0193	0.0076	—						
13. <i>L. decussatus</i>	0.0212	0.0232	0.0616	0.0431	0.0232	0.0251	0.0432	0.0492	0.0192	0.0271	0.0232	0.0272	—					
14. <i>L. novemfasciatus</i>	0.0272	0.0331	0.0597	0.0193	0.0331	0.0272	0.0372	0.0473	0.0331	0.0292	0.0213	0.0173	0.0291	—				
15. <i>L. peru</i>	0.0332	0.0251	0.0556	0.0392	0.0351	0.0252	0.0352	0.0392	0.0311	0.0115	0.0193	0.0233	0.0232	0.0292	—			
16. <i>L. analis</i>	0.0332	0.0212	0.0641	0.0453	0.0351	0.0252	0.0393	0.0392	0.0311	0.0076	0.0233	0.0272	0.0271	0.0312	0.0115	—		
17. <i>L. argentiventris</i>	0.0272	0.0292	0.0534	0.0291	0.0292	0.0272	0.0373	0.0371	0.0371	0.0213	0.0057	0.0057	0.0252	0.0193	0.0213	0.0293	—	
18. <i>L. campechanus</i>	0.0312	0.0251	0.0619	0.0453	0.0372	0.0272	0.0413	0.0412	0.0291	0.0174	0.0253	0.0293	0.0251	0.0353	0.0057	0.0174	0.0272	—

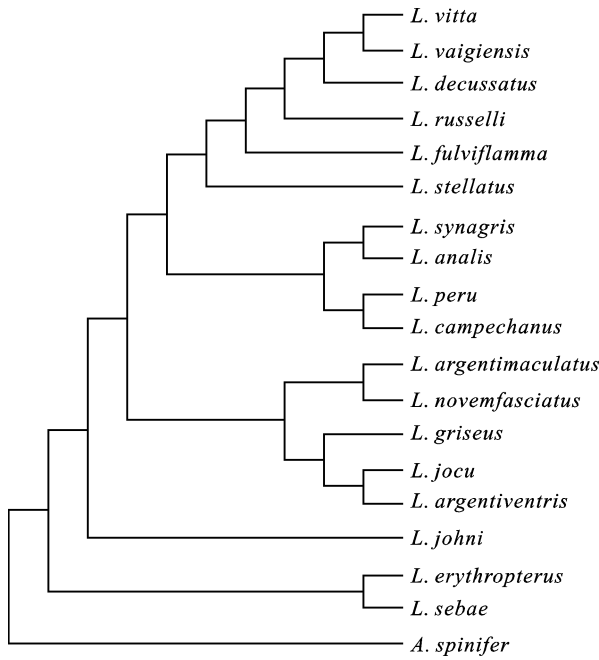


图3 以高体四长棘鲷为外群构建 18 种笛鲷的 NJ 分子系统树

Fig.3 Neighbor-joining phylogenetic tree of 18 *Lutjanus* species using *A. spinifer* as the outgroup

由表 3 可知, 本研究中的 9 种南海笛鲷之间的序列差异在 0.0193—0.0680 之间, 其中勒氏笛鲷和金焰笛鲷序列差异为 0.0193, 亲缘关系最近; 而勒氏笛鲷与红鳍笛鲷的序列差异最大为 0.0680, 说明这两种笛鲷分化比较早, 亲缘关系较远, 这和其它学者研究的结果相似(周发林等, 2004)。红鳍笛鲷与除千年笛鲷外的另外 7 种笛鲷的序列差异都较大, 一般都在 0.6 左右, 从图 3 中也可以看出, 它与千年笛鲷作为独立的一枝在系统树中出现。另外约氏笛鲷与其它笛鲷均有相对较远的遗传距离。虽然 18 种笛鲷并不分布于一个海域, 但是在序列差异上并没有太大的差别, 这也验证了传统形态分类学的正确性。18 种笛鲷序列的比较说明, 本研究中的 9 种笛鲷相互之间存在着相对较远的遗传距离, 而巴哈马笛鲷、白纹笛鲷、双色笛鲷和纹眼笛鲷与其它种序列差异非常小, 在白纹笛鲷与纹眼笛鲷、秘鲁笛鲷与西大西洋笛鲷以及灰笛鲷与纹眼笛鲷之间的序列差异非常小, 均为 0.57%, 这一数值可以认为它们之间序列没有差别。而红鳍笛鲷与其它 17 种笛鲷比较差异仍然非常明显, 在进化过程中可能是最早分化出来的。

选用长棘鲷属的高体四长棘鲷为外群利用 NJ 法构建的分子系统树显示: 高体四长棘鲷作为不同属的外群与笛鲷属鱼类明显分开, 整个笛鲷属鱼类的进

化距离相差不大, 红鳍笛鲷和千年笛鲷聚在一起作为独立的一枝首先分化出来, 然后紫红笛鲷与九带笛鲷聚为一小枝后与聚在一起的灰笛鲷、白纹笛鲷和纹眼笛鲷组成一个大枝出现在系统树中, 南海海域的勒氏笛鲷和金焰笛鲷紧密的聚在一起, 而后与金带笛鲷、画眉笛鲷和交叉笛鲷聚为一大枝, 星点笛鲷和约氏笛鲷聚为一枝。从整体来说, 南海海域的笛鲷在分类地位上与其它 9 种笛鲷关系较远一点, 只有红鳍笛鲷和千年笛鲷, 与所研究的笛鲷相比均有较大的差异, 始终作为独立的一枝出现, 说明与其它笛鲷相比, 它们分化的年代比较久远。

从表 2、表 3 数据分析可以得出这样的结论: 南海海域的 9 种笛鲷相互之间保持了一定的遗传距离, 即使亲缘关系最近的勒氏笛鲷和金焰笛鲷之间也达到了 1.93% 的差异, 没有非常近的关系, 与其它海域的 9 种笛鲷相比遗传距离较大。这也说明了在南海海域的这 9 种笛鲷可能没有与其它种有过多的基因混杂现象或者说基因渐渗的程度不高, 南海笛鲷属鱼类遗传多样性仍然比较好, 仍然保持着自己的遗传特性, 但从另一方面来说, 这样的结果也反映了我国在笛鲷属鱼类中的利用还不充分, 人工选育、杂交和养殖仍然处于较低的水平。

线粒体 DNA 基因序列相对保守, 适合用于种间或属间群体的遗传分析, 也是研究 DNA 多态性的有效方法之一, 因此广泛应用于水产动物遗传变异和分子系统学的研究中。苏天凤等(2005)对近江牡蛎的线粒体 16S rRNA 基因片段进行了扩增, 序列比较结果显示在研究的四个群体中广西钦州湾的群体遗传多样性最高。刘亚军等(2002)扩增了栉孔扇贝线粒体 16S rRNA 的基因片段, 序列分析表明四群体中以朝鲜的群体遗传多样性最高, 同时结果显示不同自然分布区的栉孔扇贝出现明显的遗传分化。在海水鱼类中 16S rRNA 的研究还比较少, 孔晓瑜等(2001b)对牙鲆和石鲽的 16S rRNA 的基因片段进行比较, 结果显示川鲽和石鲽的序列差异很小, 而牙鲆与川鲽和石鲽的序列差异明显。周发林等(2004)对 6 种笛鲷的 16S rRNA 基因片段进行序列分析表明六种笛鲷明显分为三枝。本研究对笛鲷属的 18 种鱼类进行了系统学的分析, 较大范围的了解了常见笛鲷属鱼类进化关系的信息, 同时本实验室正在开展笛鲷属鱼类分子生物学方面的其它研究, 以期最终达到明确笛鲷属鱼类进化关系, 分析其遗传多样性的目的。

## 参 考 文 献

- 王中铎, 刘楚吾, 郭昱嵩, 2005. 5 种笛鲷 mtDNA 及 Cytb 基因片段的 RFLP 比较. 水产学报, 29(3): 327—332
- 中国科学院动物研究所, 中国科学院海洋研究所, 上海水产学院, 1962. 南海鱼类志. 北京: 科学出版社, 469—470
- 孔晓瑜, 姜艳艳, 相建海等, 2001a. 魁蚶线粒体 16S rRNA 和 COI 基因片段序列测定及其应用前景. 海洋科学, 25(12): 46—48
- 孔晓瑜, 刘亚军, 喻子牛等, 2001b. 牙鲆、石鲈和川鲈的线粒体 16S rRNA 基因片段的序列比较研究. 青岛海洋大学学报, 31(5): 713—717
- 刘亚军, 喻子牛, 姜艳艳等, 2002. 栉孔扇贝 16S rRNA 基因片段序列的多态性研究. 海洋与湖沼, 33(5): 477—482
- 吕国庆, 李思发, 1998. 鱼类线粒体 DNA 动态研究和应用发展. 中国水产科学, 5(3): 94—103
- 苏天凤, 江世贵, 周发林等, 2005. 近江牡蛎 16S rRNA 基因片段序列变异分析. 高技术通讯, 15(2): 100—103
- 张俊彬, 黄良民, 陈真然, 2005. AFLP 技术在笛鲷的仔鱼鉴定及其分类学上的研究. 海洋学报, 27(2): 165—171
- 周发林, 江世贵, 苏天凤等, 2004. 6 种笛鲷属鱼类线粒体 16S rRNA 基因片段的序列比较. 中国水产科学, 11(2): 99—103
- 易乐飞, 刘楚吾, 2005. 4 种笛鲷属鱼类随机扩增多态性 DNA 及遗传多样性研究. 水产科学, 24(1): 9—12
- 萨姆布鲁克 J, 弗里克 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 2001. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础等译, 2002. 分子克隆实验指南(第三版). 北京: 科学出版社, 461—486
- Chow S, Clarke M E, Walsh P J, 1993. PCR-RFLP analysis on thirteen western Atlantic snappers (subfamily Lutjaninae): A simple method for species and stock identification. Fishery Bulletin U S, 91: 619—627
- Dbermiller L E, Pfeiler E, 2003. Phylogenetic relationships of elopo morph fishes inferred from mitochondrial ribosomal DNA sequences. Mol Phylogenet Evol, 26(2): 202—214
- GAO Tian-xiang, LI Jian, WANG Qing-yin, 2003. Sequence analysis on mitochondrial 16S rRNA gene in *Fenneropenaeus chinensis*. Journal of Fishery Sciences of China, 10(5): 359—364
- Gold J R, Sun F, Richardson L R, 1997. Population structure of red snapper from the Gulf of Mexico as inferred from analysis of mitochondrial DNA. Transactions of the American Fisheries Society, 126: 386—396
- Guo Y, Wang Z, Liu C *et al*, 2007a. Phylogenetic relationships of south China Sea snappers (Genus *Lutjanus*; Family Lutjanidae) based on mitochondrial DNA sequences. Mar Biotechnol (NY), 9(6): 682—688
- Guo Y, Wang Z, Liu C *et al*, 2007b. Isolation and characterization of microsatellite DNA loci from Russell's snapper (*Lutjanus russellii*). Molecular Ecology Notes, 7(6): 1219—1221
- Kitaur J, Yamamoto G, Nishida M, 1998. Genetic variation in populations of the diamond-shaped squid *Thysanoteuthis rhombus* as examined by mitochondrial DNA sequence analysis. Fisheries Science, 64(4): 538—542
- Kumar S, Tamura K, Nei M, 1994. MEGA: Molecular evolutionary genetic analysis. Ver.11.02. University Park, the Pennsylvania State University, 150—163
- Liu Li, Liu Chu-Wu, 2007. Genetic diversity and molecular markers of five snapper species. Chinese Journal of Agricultural Biotechnology, 4(1): 39—46
- Santamaria A, Chavez E A, 1999. Fishery evaluation: *Lutjanus speru* (Pisces: Lutjanidae) from Guerrero, Mexico. Revista De Biologia Tropical, 47(3): 571—580
- Ui W H, Chan J P, Tai S S *et al*, 2001. One-Step PCR Amplification of complete arthropod mitochondrial genomes. Molecular Phylogenetics and Evolution, 19(3): 345—352
- Yusong Guo, Zhongduo Wang, Chuwu Liu *et al*, 2008. Sequencing and analysis of the complete mitochondrial DNA of Russell's snapper (*L. russellii*). Progress in Natural Science, 18(10): 1233—1238



## SEQUENCE COMPARISON AND SYSTEMATIC ANALYSIS OF mtDNA 16S rRNA GENOMIC FRAGMENTS OF *LUTJANUS*

LIU Chu-Wu, XU Tian-Jun, LIU Li, GUO Yu-Song, DONG Qiu-Fen  
(Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, 524025)

**Abstract** MtDNA 16S rRNA genomic fragments of nine *Lutjanus* were amplified by PCR; and the purified product yielded a systematic sequence with 561bp being sequenced. The contents of A, T, G and C are respectively 28.5%, 22.1%, 23.6% and 25.8%. The contents of AT are slightly higher than those of GC, and the difference in base composition in 18 *Lutjanus* species is the minimum. Comparison with MEGA 3.1 software revealed 72 variation loci, of which 44 are information loci. For base replacement, 75.61% are caused by transition in it, and the ratio of transition/transversion is 3.1. The results of heredity distances computing show that the sequence difference is from 0.0193 to 0.0680, of which those of *L. russelli* and *L. fulviflamma*, *L. russelli* and *L. vaigiensis* are the smallest, while those of *L. erythropterus* and *L. fulviflamma*, *L. erythropterus* and *L. vitta* are the largest. By choosing *Argyrops spinifer* as outgroup and integrating the 16S rRNA homologous sequences of other nine *Lutjanus* from GenBank, the molecular phylogenetic trees with NJ method was constructed. The result shows that the nine *Lutjanus* in the research is away from the other nine's in terms of evolutionary relationship, and the nine *Lutjanus* from South China Sea keep relative long heredity distance between each other with obvious genetic diversity.

**Key words** *Lutjanus*, 16S rRNA, Sequence comparison, Molecular systematic analysis