

中国沙塘鳢属鱼类线粒体 12S rRNA 基因序列分析

任 岗^{1, 2} 章 群¹

(1. 暨南大学水生生物研究所, 广州 510632; 2. 绍兴文理学院生命科学院, 绍兴 312000)

摘要:沙塘鳢属鱼类为东亚特有的小型淡水经济鱼类, 中国产沙塘鳢属鱼类分类问题长期存在争议。本文测定了中国产沙塘鳢属鱼类全部种类的线粒体 12S rRNA 基因部分序列, 结合 GenBank 中下载的 2 种日本沙塘鳢属鱼类和塘鳢科鱼类同源序列, 探讨中国产 4 种沙塘鳢属鱼类的物种有效性, 分析沙塘鳢属鱼类的系统发育关系。作者所使用的同源序列长度为 690bp, 其中变异位点 258 个, 简约信息位点 201 个, 包括插入/缺失位点 34 个, 转换/颠换平均值为 3.0, 表明 12S rRNA 基因是研究沙塘鳢属鱼类系统发育关系的合适分子标记。基于 *p-distance* 模型的 6 种沙塘鳢属鱼类种内遗传距离为 0.000—0.024, 种间遗传距离为 0.058—0.064, 支持暗色沙塘鳢和中华沙塘鳢为不同种, 中国产沙塘鳢属鱼类包括中华沙塘鳢、河川沙塘鳢、海丰沙塘鳢、鸭绿江沙塘鳢 4 个种的观点; 至于中国还有没有新的沙塘鳢属鱼类, 尚有待进一步研究。系统发育分析表明海丰沙塘鳢是河川沙塘鳢的姐妹群, 暗色沙塘鳢与 *O. hikimius* 的亲缘关系最为密切, 而同属其余类群之间的系统发育关系则由于自展数据支持率较低而尚不明确。中国产沙塘鳢和日本产沙塘鳢并未单独分群, 推测沙塘鳢属鱼类的共同原始祖先可能广泛分布于中国、朝鲜和日本等东亚地区, 约在 4.9—6.5 百万年前的上新世开始分化, 系统发育过程比较适合离散假说。

关键词: 沙塘鳢属; 线粒体 12S rRNA 基因; 分子系统学; 生物地理学

中图分类号: Q959.483 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2007)04-0473-06

沙塘鳢属鱼类 (*Odontobutis*) 隶属鲈形目 (Perciformes) 虎鱼亚目 (Cobioidei) 沙塘鳢科 (Odontobutidae), 为东亚特有的小型淡水底栖肉食性鱼类, 特别是在江浙地区为传统的名贵食用鱼, 具有一定的渔业价值。沙塘鳢属由 Bleeker 于 1874 年以暗色沙塘鳢为模式种建立^[1], 目前已报道有效种 8 个^[2]。中国产沙塘鳢属鱼类的分类问题长期存在争议^[2-7], 伍汉霖等^[7]根据沙塘鳢属鱼类的头部感觉管孔 c 的有无及感觉乳突之排列方式以及背鳍和胸鳍鳍棘数、纵列鳞、横列鳞等可数性状作为分类根据, 从形态学上将中国沙塘鳢属鱼类分为中华沙塘鳢、河川沙塘鳢、海丰沙塘鳢、鸭绿江沙塘鳢和暗色沙塘鳢等 4 个种, 但目前中国沙塘鳢属鱼类的分子系统发育研究尚未见报道。

线粒体 12S rRNA 基因目前已广泛运用于鱼类的系统发育研究。Wang, *et al.* 基于线粒体 12S rRNA 基因对 虎鱼类的系统发育研究表明, 该基因适合 虎鱼类科内科间关系的研究^[8]。本文选择线

粒体 12S rRNA 基因作为遗传标记, 从分子水平对中国沙塘鳢属鱼类的系统发育关系进行了探讨。

1 材料和方法

1.1 材料来源 所用标本于 2003 年 7 月至 2004 年 11 月间采自中国辽宁、广东等地 (表 1)。所有标本均用 95% 乙醇固定保存。

1.2 DNA 提取 总 DNA 的提取采用改进的汪永庆等^[9]的方法, 在用饱和氯化钠抽提后, 加一步用等体积氯仿: 异戊醇 (24:1) 抽提 1—2 次的步骤。

1.3 PCR 扩增 PCR 扩增引物为 12SL: 5'-CCCCG NARGCAGAAAAGGCTTGGTCG-3', 12SR: 5'-TCAGCTTTCCTTCGGTAC-3'。

PCR 反应总体积 50 μ L, 包括: 5 μ L 10 $\times$ Buffer, 4 μ L 25mmol/L MgCl₂, 4 μ L 2.5mmol/L dNTPs, 0.5 μ L 20mmol/L 上下游引物, 2U Taq 酶, 0.8 μ L 模板 DNA (约 10ng)。PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 然后 95 $^{\circ}$ C 变性 45s, 56 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共

收稿日期: 2006-01-17; 修订日期: 2007-02-27

基金项目: 国家自然科学基金 (40106014); 教育部留学归国人员科研启动基金 (2005); 广东省自然科学基金 (000760) 资助

作者简介: 任岗 (1978—), 男, 汉族, 浙江绍兴人; 硕士研究生; 主要从事鱼类分子系统学研究

通讯作者: 章群, E-mail: tqzhang@jnu.edu.cn

表 1 沙塘鳢属鱼类及其外类群种名、测序样品编号、
地理来源、基因库索取号

Tab. 1 Species designation, sample no., geographic origin, GenBank accession of <i>Odontobutis</i> and outgroup			
物种名 Species name	样品编号 Sample No.	地理来源 Geographic origin	GenBank 登陆号 GenBank accession
中华沙塘鳢 <i>O. sinensis</i>	ML	湖南汨罗	DQ250639
中华沙塘鳢 <i>O. sinensis</i>	ZP	广西昭平	DQ250629
海丰沙塘鳢 <i>O. haifengensis</i>	HF1	广东海丰	DQ250630
海丰沙塘鳢 <i>O. haifengensis</i>	HF2	广东海丰	DQ250631
鸭绿江沙塘鳢 <i>O. yaluensis</i>	DD1	辽宁丹东	DQ250632
鸭绿江沙塘鳢 <i>O. yaluensis</i>	DD2	辽宁丹东	DQ250633
鸭绿江沙塘鳢 <i>O. yaluensis</i>	ZH	辽宁庄河	DQ250634
河川沙塘鳢 <i>O. potamophila</i>	FH	福建福清	DQ250635
河川沙塘鳢 <i>O. potamophila</i>	YT	福建永泰	DQ250636
暗色沙塘鳢 <i>O. obscura</i>	KN	日本神奈川县	AB095527
暗色沙塘鳢 <i>O. obscura</i>	KG	日本鹿儿岛县	AB095530
<i>O. hikimius</i>	SH	日本岛根县	AB095519
尖头塘鳢 <i>Eleotris oxycephala</i>	RA	浙江瑞安	DQ250637
黑体塘鳢 <i>E. melanosoma</i>	<i>E. melanosoma</i>	unknown	AF265372
云斑尖塘鳢 <i>Oxyeleotris marmorata</i>	DG	广东东莞	DQ250638
嵴塘鳢 <i>Butis butis</i>	<i>B. butis</i>	unknown	AF265382
蛇塘鳢 <i>Ophiocara porocephala</i>	<i>O. porocephala</i>	unknown	AF265379

进行 32 个循环,最后 72 °C延伸 10 min。反应设不含

模板的反应液作空白对照,PCR 产物用 1 %琼脂糖凝胶电泳检测得到清晰谱带,产物送至上海英骏生物技术有限公司纯化,并在 ABI 3730 自动测序仪上用 12SL 引物测序。

1.4 序列分析及系统发育树的构建 使用 clustal1.81^[10] 软件对位排列本实验所测定的序列和 GenBank 中下载的沙塘鳢属和塘鳢科塘鳢属 (*Eleotris*)、尖塘鳢属 (*Oxyeleotris*)、嵴塘鳢属 (*Butis*) 以及蛇塘鳢属 (*Ophiocara*) 鱼类 12S rRNA 基因序列,截取同源长度,用 MEGA3.1^[11] 软件计算序列间变异位点,简约信息位点,转换/颠换值。用 MEGA3 软件基于 p-distance 模型计算遗传距离并采用 NJ (Neighbor joining) 法、ME (Minimum evolution) 法、MP (Maximum parsimony) 法、UPGMA (Unweighted pair-group method using arithmetic averages) 构建系统发育树,系统树各分枝的置信度自举检测(Bootstrap) 1000 次。

2 结 果

2.1 12S rRNA 基因的序列特征

本实验测定 12S rRNA 基因的序列部分序列已登录 GenBank (DQ250629-DQ250639),在同源的 690bp 的序列长度中,变异位点 258 个,插入/缺失位点 34 个,简约信息位点 201 个,A、T、C、G 碱基的平均含量为 33.9 %、19.0 %、26.5 %、20.7 %。

在同源的 678bp 的沙塘鳢属内群序列中,变异位点 171 个,插入/缺失位点 10 个,简约信息位点 140 个,A、T、C、G 碱基的平均含量为 34.3 %、18.8 %、26.7 %、20.3 %。转换平均值为 51,颠换平均值为 17,转换/颠换平均值为 3.0,表明 12S rRNA 基因序列未达到饱和状态,适于构建系统进化树^[11]。12S rRNA 基因部分序列在位点 142—172、220—282、634—578 之间分别存在 30bp、62bp、44bp 的序列保守区域,在位点 457—498 和 580—621 之间都存在 41bp 的序列高变区。

2.2 不同类群 12S rRNA 基因序列间遗传距离

采用 p-distance 模型计算序列间的核苷酸替代数,结果不同地点同种沙塘鳢种内的遗传距离为 0.00—0.024。沙塘鳢属暗色沙塘鳢和 *O. hikimius* 的遗传距离为 0.058—0.064,暗色沙塘鳢和中华沙塘鳢的遗传距离在 0.115—0.118 之间,海丰沙塘鳢、鸭绿江沙塘鳢、中华沙塘鳢、河川沙塘鳢的种间遗传距离为 0.066—0.133(表 2)。

表2 基于 12S rRNA 基因部分序列的沙塘鳢属鱼类种间 p-distance 遗传距离
Tab. 2 Interspecific p-distance's genetic distances in the genus *Odontobutis* based on the 12S rRNA gene partial sequences

	1	2	3	4	5	6
1 <i>O. sinensis</i>						
2 <i>O. haifengensis</i>	0.102 —0.107					
3 <i>O. yaluensis</i>	0.125 —0.133	0.115 —0.124				
4 <i>O. potamophila</i>	0.110 —0.113	0.098 —0.099	0.066 —0.082			
5 <i>O. obscura</i>	0.115 —0.118	0.104 —0.107	0.121 —0.131	0.118 —0.121		
6 <i>O. hikimius</i>	0.110 —0.116	0.098 —0.099	0.111 —0.121	0.108	0.058 —0.064	

2.3 沙塘鳢属的系统发育关系

选 p-distance 算法,通过 NJ 法、ME 法、MP 法、UPGMA 法得到的系统发育树拓扑结构一致(仅示

ME 树图 1)。结果表明,沙塘鳢属鱼类聚成一大支,分支置信度为 100,分支内不同地域的同种沙塘鳢属鱼类单独聚成小支,分支置信度都为 100 %。

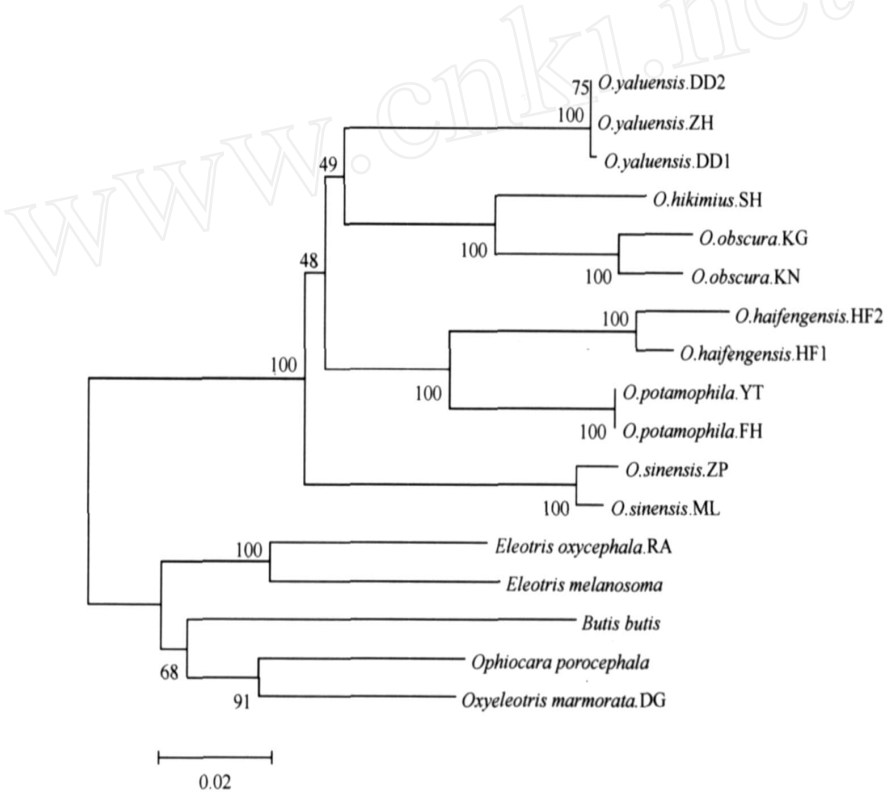


图1 基于 12S rRNA 基因部分序列的沙塘鳢属的 ME 分子系统树
Fig. 1 The minimum evolution tree of *Odontobutis* fishes based on 12S rRNA gene partial sequences

3 讨 论

3.1 沙塘鳢属内种的分类

早先对中国产的沙塘鳢属鱼类研究比较混乱,许多学者都对此作过讨论。其中以伍汉霖、陈炜、郑慈英、Iwata 等人的工作较为突出。陈炜、郑慈英^[5]依据前鳃盖骨上黏液沟及体侧纵列鳞、横列鳞数目,建立了海丰沙塘鳢新种。Iwata 等^[4]检查了保存在大英博物馆的河川沙塘鳢模式标本,发现并无

犁齿,恢复了河川沙塘鳢的学名,仍属沙塘鳢属。伍汉霖等^[6,7]依据眼后头顶部鳞片呈同心圆或辐射状的特殊排列方式建立了鸭绿江沙塘鳢新种;依据眼后无感觉孔 C 及第一背鳍鳍棘、胸鳍鳍条、纵列鳞、横列鳞的数目,建立了中华沙塘鳢新种,成功区分暗色沙塘鳢和中华沙塘鳢,从而从形态学上解决沙塘鳢属长期未决的分类问题;同时他们认为中国产沙塘鳢属只包括中华沙塘鳢、河川沙塘鳢、海丰沙塘鳢、鸭绿江沙塘鳢,而暗色沙塘鳢仅存在于日本。

本研究中暗色沙塘鳢和中华沙塘鳢的遗传距离在 0.115—0.118 之间,中国产沙塘鳢属种类的遗传距离在 0.066—0.133 之间,都大于暗色沙塘鳢和 *O. hikimius* 的遗传距离(0.058—0.064),也大于塘鳢科尖头塘鳢和黑体塘鳢的遗传距离(0.079),达到种间的遗传差异水平。结果支持伍汉霖等人认为暗色沙塘鳢不同于中华沙塘鳢以及中国产沙塘鳢属鱼类包括中华沙塘鳢、河川沙塘鳢、海丰沙塘鳢、鸭绿江沙塘鳢 4 个种,不存在亚种分类阶元的观点;至于中国大陆还有没有其他种类沙塘鳢,我们将进一步研究。研究同时表明,海丰沙塘鳢与河川沙塘鳢亲缘关系较近,暗色沙塘鳢与 *O. hikimius* 亲缘关系较近,而中华沙塘鳢、鸭绿江沙塘鳢、暗色沙塘鳢和 *O. hikimius*、海丰沙塘鳢和河川沙塘鳢四者之间的亲缘关系,由于分

支置信度小于 50%,在我们的研究中尚不明确,可能是它们在进化过程中各自独立的平行进化。

3.2 沙塘鳢属的生物地理学

Sakai 等^[12]曾依据中国、日本都存在而朝鲜半岛不存在暗色沙塘鳢的现象,提出假说认为:在中新世到上新世早期曾存在一个大的淡水体系连接大陆水系和日本西部内陆水系,分布于中国、日本的暗色沙塘鳢和分布于朝鲜的断纹沙塘鳢 *O. interrupta*、平头沙塘鳢 *O. platycephala* 等沙塘鳢属鱼类的祖先种共同生活在这一个大的淡水体系中,并且已经出现分化。500 万年前,中国大陆水系开始从这一淡水体系中分离,暗色沙塘鳢的祖先在中国和日本都保存下来。现已证实中国存在的暗色沙塘鳢应为中华沙塘鳢,因而以上的假说是不确切的。



图2 沙塘鳢属鱼类的地理分布(仿伍汉霖、H. Sakai 等人)

Fig. 2 Distribution of *Odontobutis* (From Wu, H.-L., H. Sakai, et al.)

●中华沙塘鳢(*O. sinensis*) ○河川沙塘鳢(*O. potamophila*) ■海丰沙塘鳢(*O. haifengensis*) □鸭绿江沙塘鳢(*O. yaluensis*) ◇断纹沙塘鳢(*O. interrupta*) ◆平头沙塘鳢(*O. platycephala*) △暗色沙塘鳢(*O. obscura*) ▲*O. hikimius*

沙塘鳢属鱼类为东亚地区特有种类,分布范围最北端到达中国辽河流域,最南端到达中国海南岛,其中中国产 4 个种(中华沙塘鳢、河川沙塘鳢、海丰沙塘鳢、鸭绿江沙塘鳢),朝鲜半岛产 2 个种(断纹沙塘鳢、平头沙塘鳢),日本产 2 个种(暗色沙塘鳢、*O.*

hikimius),种的地理分布区域相对独立(图 2)。本研究中,除河川沙塘鳢和海丰沙塘鳢、暗色沙塘鳢和 *O. hikimius* 的遗传距离较小外,6 种沙塘鳢属鱼类的种间遗传距离大部分在 0.098—0.133 之间,其种间的分化程度较为相近,它们可能是由同一个祖先

进化而来,按照脊椎动物线粒体进化速度 2 %/ Mar 计算^[13],沙塘鳢属鱼类的分化时间在 4.9—6.5 百万年前的上新世中期。这一结果与 Sakai 等^[14]对暗色沙塘鳢、断纹沙塘鳢、平头沙塘鳢的限制性酶切分析的结果相似,三者的 Nei's 遗传距离为 1.053—1.230,分化时间在 5—6 百万年前。因此,我们推测沙塘鳢属鱼类的共同原始祖先可能广泛分布在中国、朝鲜半岛和日本,并且通过连接大陆水系和日本西部内陆水系的淡水体系相互联系^[15],大约 5 百万年前东海开始从这一大的淡水体系中分离^[12],各地的沙塘鳢基因交流中断并开始分化。另外,由于河川沙塘鳢和海丰沙塘鳢、暗色沙塘鳢和 *O. hikimius* 的遗传距离较小(分别为 0.066—0.082 和 0.058—0.064),海丰沙塘鳢可能是从河川沙塘鳢中分化出来的,*O. hikimius* 可能是从暗色沙塘鳢中分化出来的。综上所述,沙塘鳢属的系统进化过程可能比较适合用离散假说(Vicariant hypothesis)^[16]进行说明,即沙塘鳢属的共同原始祖先广泛分布在中国、朝鲜半岛和日本,由于历史上的多次离散事件的发生,不同地域的共同原始祖先产生分化,形成沙塘鳢属 8 种鱼类目前的地理分布格局。

致谢:

衷心感谢华南师范大学陈湘 教授提供部分海丰沙塘鳢标本,日本岐阜大学 Dr. Takahiko Mukai 提供部分珍贵资料,上海水产大学伍汉霖教授对本文提供宝贵意见。

参考文献:

- [1] Bleeker P. Esquisse d'un systeme naturel des Gobioides [J]. *Archs. Neerl. Sci.*, 1874, **9**: 289—331
- [2] Iwata A, Sakai H. *Odontobutis hikimius* n. sp.: A new freshwater goby from Japan, with a key to species of the genus [J]. *Copeia*, 2002, **1**: 104—110
- [3] Nichols J T. The freshwater fishes of China [J]. *Nat. Hist. Centr. Asia*, 1943, **9**: 254—265, New York
- [4] Iwata A, Sakai H. A revision of the Eleotrid goby genus *Odontobutis* in Japan, Korea and China [J]. *Japan. J. Ichthyol.*, 1985, **31** (4): 373—388
- [5] Chen W, Zheng C Y. On three new species of the family Eleotridae from Guangdong province, China [J]. *Sci. Med. Jinan Univ.*, 1985, (1): 73—80 [陈炜,郑慈英. 中国塘鳢科鱼类的三新种. 暨南理医学报, 1985, (1): 73—80]
- [6] Wu H L, Wu X Q, Xie Y H. A revision of the genus *Odontobutis* from China with description of a new species [J]. *Shanghai Fish. Univ.*, 1993, **2**(1): 52—61 [伍汉霖,吴小清,解玉浩. 中国沙塘鳢属鱼类的整理和一新种的叙述. 上海水产大学学报, 1993, **2**(1): 52—61]
- [7] Wu H L, Chen r S, zhuang D H. A new species of the genus *Odontobutis* (Pisces, *Odontobutidae*) from China [J]. *Shanghai Fish. Univ.*, 2002, **11**(1): 52—61 [伍汉霖,陈义雄,庄棣华. 中国沙塘鳢属 (*Odontobutis*) 鱼类之一新种(鲈形目:沙塘鳢科). 上海水产大学学报, 2002, **11**(1): 52—61]
- [8] Wang H Y, Tsai M P, Dean J, Lee S C. Molecular phylogeny of gobioid fishes (Perciformes: Gobioidae) based on mitochondrial 12S rRNA sequences [J]. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2001, **20** (3): 390—408
- [9] Wang Y X, Wang X G, Xu L X, et al. A new rapid method for extraction of high quality of genomic DNA from animal tissues [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2001, **36**(1): 27—29 [汪永庆,王新国,徐来祥,等. 一种动物基因组 DNA 提取方法的改进. 动物学杂志, 2001, **36**(1): 27—29]
- [10] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, et al. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by Quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Res.*, 1997, **25** (24): 4876—4882
- [11] Kumar S, Tamura K, Jakobsen B I, et al. MECA: molecular evolutionary genetics analysis [J]. *Bioinformatics*, 2001, **17**: 1244—1245
- [12] Sakai H, Yamamoto C, Iwata. A genetic divergence variation and zoogeography of a freshwater goby, *Odontobutis obscura* [J]. *Ichthyological Research*, 1998, **45**: 363—376
- [13] Brown W M, George J M, Wilson A C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1979, **76**: 1967—1971
- [14] Sakai H, Iwata A, Jeon S R. Genetic evidence supporting the existence of tree distinct species in the genus *Odontobutis* (Gobiidae) from Japan and Korea [J]. *Japan. J. Ichthyol.*, 1993, **40**: 61—64
- [15] Iihara M. The Osaka group and the Rokko movements [J]. *Earth Sci.*, 1966, (85/86): 12—18
- [16] Zhang R Z. A new trend of Historic Biogeography-Vicariance Biogeography [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 1990, **25** (2): 47—49 [张荣祖. 历史生物地理学新趋势——衍生物地理学 (Vicariance Biogeography). 动物学杂志, 1990, **25** (2): 47—49]

MOLECULAR PHYLOGENY OF THE GENUS ODONTOBUTIS BASED UPON PARTIAL SEQUENCES OF MITOCHONDRIAL 12S rRNA GENES

REN Gang^{1,2} and ZHANG Qun¹

(1. Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632; 2. College of Life Science, Shaoxing University, Shaoxing 312000)

Abstract : The *Odontobutis* are valuable small freshwater fishes restricted to the East Asia, but their specific validities and phylogeny has been controversial for a long time. To determine interspecific relationships and evolution of the genus *Odontobutis*, partial sequences of mitochondrial 12S rRNA genes of all putative species of Chinese *Odontobutis* fishes (*O. sinensis*, *O. haifengensis*, *O. yaluensis*, and *O. potamophila*) were sequenced and subjected to phylogenetic analysis with the inclusion of two Japanese species (*O. obscura* and *O. hikimius*) and available taxa from Eleotridae obtained from GenBank. The resultant mitochondrial DNA sequence were 690bp long with 34 indels, of which 258 sites were variable and 201 sites were parsimony-informative, and average transition/transversion ratio was 3.0, suggesting that 12S rRNA gene was a suitable molecular marker to be used in studying the interspecies relationships within *Odontobutis* species. The genus *Odontobutis* formed a monophyletic group with 100% bootstrap support, and p-distance model-based pairwise genetic distances within each putative species ranged from 0.000-0.024, and those among the six *Odontobutis* species were between 0.058 to 0.133, which agree with Wu's taxonomic treatment of the genus, i.e., that *O. obscura* and *O. sinensis* were different species, and there were 4 species of *Odontobutis* in China. In phylogenetic tree, while *O. haifengensis* and *O. potamophila* were closely related, and *O. hikimius* is sister group, and the phylogenetic relationships among the remaining taxa of the genus were not well resolved. As Chinese *Odontobutis* had not been sampled extensively and intensively in the present study, whether there are new *Odontobutis* species or not yet to be further studied. Chinese species and Japanese taxa of the genus *Odontobutis* were not resolved as monophyletic group respectively, it is deduced that the common ancestors of the genus *Odontobutis* might be widely distributed in China, Korea peninsula and Japan, diverged from 4.9 to 6.5 million years B. P. in middle Pliocene, and their phylogenetic process might be explained by vicariant hypothesis.

Key words : *Odontobutis*; Mitochondrial 12S ribosomal RNA gene; Molecular phylogeny; biogeography