

doi: 10.7541/2021.2020.050

基于线粒体基因组全序列的鲟形目鱼类(Pisces: Acipenseriformes)的分子系统发育重建

程佩琳¹ 俞丹² 刘焕章² 杜浩¹ 危起伟¹

(1. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 农业农村部淡水生物多样性保护重点实验室, 武汉 430223;

2. 中国科学院水生生物研究所水生生物多样性与保护重点实验室, 武汉 430072)

摘要: 为厘清鲟形目鱼类的系统发育, 研究新测定了中华鲟(*Acipenser sinensis*)、长江鲟(*A. dabryanus*)、短吻鲟(*A. brevirostrum*)、纳氏鲟(*A. naccarii*)、鳇(*Huso dauricus*)和匙吻鲟(*Polyodon spathula*)共6种鲟类的线粒体全基因组序列。联合已测的17种鲟类的线粒体基因组数据, 利用最大似然法和贝叶斯法重建了鲟形目鱼类的分子系统发育关系, 并采用似然值检验对不同的树拓扑结构进行了评价。结果表明, 6种新测鲟类的线粒体基因组大小为16521—16766 bp, 编码13个蛋白质编码基因、22个转运RNA基因和2个核糖体基因, 与大多数已测的鲟类的线粒体基因组结构高度相似。基于23种鲟形目鱼类线粒体基因组数据, 系统发育分析的结果表明: (1) 鲟形目的两个科, 匙吻鲟科(Polyodontidae)和鲟科(Acipenseridae)均为单系; (2) 鲟科的内部亲缘关系复杂, 鲟属和鳇属的物种均不构成单系群。鲟科鱼类按分子系统发育重建结果可以分为3个类群: 尖吻鲟类(*A. sturio* - *A. oxyrinchus* clade)、大西洋鲟类(Atlantic clade)和太平洋鲟类(Pacific clade)。树拓扑结构的检验结果表明, 鲟科的系统发育关系为(尖吻鲟类(太平洋鲟类, 大西洋鲟类))。铲鲟属(*Scaphirhynchus*)是大西洋鲟类的基部类群。研究也说明线粒体基因组数据在鲟形目鱼类系统与进化研究方面具有重要应用价值。

关键词: 线粒体基因组; 鲟类; 系统发育分析; 最大似然法; 贝叶斯推断; 拓扑结构检验

中图分类号: Q959.46

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2021)03-0487-08



鲟形目鱼类(Acipenseriformes), 隶属于辐鳍鱼亚纲(Subclass Actinopterygii)、软骨硬鳞鱼下纲(Chondrostei), 是现生软骨硬鳞鱼类的代表类群^[1]。除已绝迹的2个化石科类群(Chondrosteidae和Peipiaosteidae)外, 现生鲟形目鱼类总计有2科6属27个有效种^[2-4]。作为最古老的鱼类之一, 鲟类的化石记录最早可追溯到2亿年前的白垩纪时代, 因此鲟类在鱼类乃至整个脊椎动物进化史上都占有极其重要的地位, 被誉为鱼类的“活化石”^[5, 6]。

在过去的20多年中, 基于形态学特征及分子数据对鲟形目鱼类的系统进化关系进行了广泛探讨, 但仍未取得一致意见。特别是, 鲟科的内部系统发育关系及鲟科的各个属的单系性仍存有许多争议。Birstein等^[7]基于3个线粒体基因(Cytochrome

b、12S rRNA和16S rRNA)首次较为完整地分析了鲟形目20个物种的系统发育关系, 发现鲟形目鱼类的2个科, 匙吻鲟科和鲟科是单系群。但鲟科内部关系复杂, 鲟属和鳇属不是单系群; 铲鲟属是鲟科最原始的基部类群^[7, 8]。张四明等^[9, 10]采用2个线粒体基因(ND4L和ND4)对包括中国特有鲟类在内的12种鲟形目鱼类进行了分子系统分析, 指出环太平洋地区的鲟科鱼类可能有共同的起源。Ludwig等^[11, 12]基于22种鲟类的线粒体细胞色素*b*基因序列进行了分子系统发育构建, 显示铲鲟属和尖吻鲟类为并系, 位于鲟科的基部位置; 并发现鲟科的部分鱼类按生物地理分布区域进行聚类, 首次提出鲟科内部可以划为大西洋鲟类和太平洋鲟类2个大类群。这一划分得到之后的许多鲟类分子系统发育

收稿日期: 2020-03-21; 修订日期: 2020-07-28

基金项目: 中国博士后科学基金(2017M622560); 湖北省博士后创新岗位项目(2017C08); 国家自然科学基金(31772854)资助 [Supported by China Postdoctoral Science Foundation (2017M622560); Hubei Postdoctoral Innovation Post Project (2017C08); the National Natural Science Foundation of China (31772854)]

作者简介: 程佩琳(1986—), 女, 助理研究员; 研究方向为鱼类进化生物学。E-mail: chengpeilin@yfi.ac.cn

通信作者: 危起伟, 研究员; E-mail: weiqw@yfi.ac.cn

研究的支持^[5,13]。Fontana等^[14]回顾了早期的鲟类染色体核型和分子系统发育的研究结果,基于18种鲟类的线粒体基因细胞色素**b**基因序列进行了系统发育重建,确认了尖吻鲟类(大西洋鲟和尖吻鲟组成的单系群)是鲟科的基部类群。但Krieger等^[15]基于25个鲟物种的5个线粒体基因(Cytochrome *b*、12S rRNA、Cytochrome *c* oxidase subunit II、tRNA Asp和tRNA Phe)联合数据,结果显示鲟科鱼类的基部类群仍无法确定,可能是铲鲟属,也可能是尖吻鲟类。Luo等^[16]基于16种鲟类的30个单拷贝核基因序列联合数据,分子系统分析认为,鲟科可以划分为3个类群:尖吻鲟类、太平洋鲟类和大西洋鲟类;并确认了尖吻鲟类为鲟科的基部类群。尽管早期鲟形目鱼类形态分类与分子系统发育结果的差异很大,但近些年的鲟形态分类学的研究也得到了新的进展。Hilton等^[17,18]对鲟类化石物种和现生种进行了物种水平的形态学比较研究,证据支持鲟属不是单系群,并定义了鲟科的2个新类群:鲤科(Husinae)及拟铲鲟科(Pseudoscaphirhynchinae)。因此,鲟科的基部类群究竟是铲鲟属还是尖吻鲟类?鲟科的鲟属和鲤属的单系性是否有效?及鲟科内部的系统发育关系如何?都是尚未解决的问题。

鱼类线粒体基因组是一个15—20 kb的环状双链DNA分子,通常编码37个基因,即13个蛋白质编码基因(PCGs)、22个转运RNA基因(tRNAs)和2个核糖体RNA基因(rrnL和rrnS)^[19]。此外,线粒体基因组通常还有2个负责复制和转录的非编码区(OL和OH)。由于线粒体基因组具有母系遗传、多拷贝、缺少遗传重组及进化速率快等特点,已广泛应用到系统发育重建、比较基因组学、谱系地理学及种群遗传学等研究领域^[20,21]。在过去的10年中,鱼类线粒体基因组研究受到了高度关注,并由于高通量测序技术的广泛应用而使得已测线粒体基因组的鱼类种类呈现快速增长的趋势。目前,线粒体基因组数据广泛用于硬骨鱼类不同分类阶元的系统进化关系研究^[22,23]。然而,鲟类中基于线粒体基因组数据的研究很少。一方面,鲟类作为全球珍稀保护鱼类,广泛分布在北半球,样本珍贵且难以收集;另一方面,不同的线粒体基因数据集的构成,不同的系统发育分析方法对系统发育的构建的结果也存在影响。因此,获取更多的鲟线粒体基因组数据,特别是鲟属鱼类,并比较分析不同系统发育分析方法在构建鲟形目鱼类的系统进化关系方面的价值和潜力,显得非常必要。

本研究新测定了中华鲟(*Acipenser sinensis*)、长江鲟(*A. dabryanus*)、短吻鲟(*A. brevirostrum*)、纳

氏鲟(*A. naccarii*)、鲤(*H. dauricus*)和匙吻鲟(*Polyodon spathula*),共计3属6个种的线粒体基因组,进一步丰富了鲟形目鱼类的线粒体基因组数据库。在注释这6种鲟的线粒体基因组基础上,联合已有的17个鲟类的线粒体基因组,基于5个线粒体基因组数据集(Pro、AA、2rRNA、Pro_2rRNA和Com_Mito),采用2种方法(最大似然法和贝叶斯法)重新构建了鲟形目的系统发育关系,并采用似然值检验对不同的树拓扑结构进行了评价。

1 材料与方法

1.1 基因组DNA提取、NGS技术测序组装

本研究样本均由中国水产科学研究院长江水产研究所荆州太湖基地提供,包括3属6种鲟形目鱼类样本(中华鲟、长江鲟、鲤、短吻鲟、纳氏鲟和匙吻鲟)。本研究所涉及的动物实验均得到中国水产科学研究院长江水产研究所实验动物福利伦理委员会(编号:YFI-001)批准。收集样本的新鲜血液或鳍条送至武汉天一辉远生物科技有限公司进行测序。采用DNA提取试剂盒(天根生物,北京)在提取总DNA后,用Thermo Scientific NanoDrop 2000测定DNA浓度,采用琼脂糖电泳和Agilent 2100 Bioanalyzer检测DNA完整性。采用全基因组鸟枪法(Whole Genome Shotgun, WGC)策略,构建400 bp文库,利用第二代测序技术(Next Generation Sequencing, NGS),基于Illumina Miseq测序平台进行双末端(Paired-end, PE)测序。采用A5-miseq v20150522^[24]和SPAdes v3.9.0^[25]对高质量的二代测序数据进行从头拼装,构建contig和Scaffold序列。根据拼接序列的测序深度提取序列,将高测序深度的序列同NCBI(National Center for Biotechnology Information)的nt库进行blastn(BLAST v 2.2.31)比对,挑出各拼接结果的线粒体序列。将得到的线粒体拼接结果利用mummer v 3.1^[26]软件进行共线性分析,确定contig间的位置关系,进行contigs间gap填补。使用pilon v 1.1.8^[27]软件对结果进行校正得到最终的完整线粒体基因组全序列。将拼接得到的完整线粒体基因组序列上传至MITOS网页服务器(<http://mitos.bioinf.uni-leipzig.de/>)进行编码基因, RNA和非编码区的注释^[28]。密码子选择脊椎动物数据库,其余为默认参数。采用软件tRNAscan-SE 1.2.1^[29]鉴定tRNA基因,并预测其二级结构。采用Mega 6.06^[30]分析碱基组成和密码子使用,并计算AT-偏斜(AT-skew)和GC-偏斜(GC-skew)。

1.2 系统发育分析

采用本研究新测的6种鲟的线粒体基因组全序

列, 结合NCBI中已发表的17种鲟类的线粒体基因组进行系统发育分析。通过软件CLUSTAL X version 1.83^[31]进行序列的多重比对。为了明确线粒体数据集的构成差异对系统发育结果的影响, 构建了5个线粒体数据集: Pro(Combined 13 coding protein gene nucleotide sequences, 13个蛋白质编码基因核苷酸序列)、AA(Combined 13 protein coding gene amino acid sequence, 13个蛋白质编码基因氨基酸序列)、2 rRNA(Combined 2 rRNA nucleotide sequences, 2个rRNA联合序列)、Pro_2 rRNA(Combined 13 coding protein gene and 2 rRNA gene nucleotide sequence, 13个蛋白编码基因及2个rRNA联合序列)和Com_Mito(Complete mitochondrial genome nucleotide sequences, 线粒体基因组核苷酸全序列)。其中1、2、3和4数据集均由单个蛋白质编码基因或者rRNA基因单独比对。为了避免比对位点的偏倚, 排除模糊区域位点(包括蛋白质编码基因的起点和终点区域, 及rRNA序列中高度可变区域)使用软件GBlocks 0.91b^[32]进行比对删除。将比对好的单个蛋白质编码基因或者rRNA基因联合在一起获得目标数据集。而5个线粒体基因组全序列则采用所有碱基无差别对待策略, 通过CLUSTAL进行序列多重比对后, 采用GBlocks去除空位及模糊位点, 最后基于比对删除后得到的23种完整线粒体基因组数据的集合。对于这5个不同类型的数据集, 分别采用IQ-TREE web server^[33](<http://iqtree.cibiv.univie.ac.at/>)的Model Finder^[34]选择序列的最佳分区及最优碱基/氨基酸替代模型检测, 并应用于后续系统发育分析。对不同数据集分别使用IQ-TREE的Tree Inference^[35]构建最大似然(ML)树, 采用对应的最佳分区模式及进化模型, 选择超快自展法(Ultrafast bootstrapping)^[36]构建ML树, 节点可靠性采用1000次的bootstrap进行评估。贝叶斯BI分析采用软件Mrbayes 3.2.2^[37]进行, 基于贝叶斯信息准则(BIC)选择最优碱基替换模型。根据结果设置模型参数, 然后再运行4条独立的马尔可夫链(Markov chains), 即3条热链(Hot chain)和1条冷链(Cold chain)同时运行6千万代(Generation)。每运行100代抽样1次, 当运行结束时显示“分列频率平均标准差”(Average standard deviation of split frequencies)小于0.01即认为分析趋于稳定状态。舍去25%的老化样本, 再由剩余树产生多数一致树, 并计算贝叶斯后验概率。

由于不同的数据集及树构建方法获得的鲟形目的系统发育关系存在不一致性, 因此为了明确哪种系统发育树值得信任, 进一步采用了IQ-TREE

web server的Tree topology evaluation and tests进行树拓扑结构检验。对于5个数据集, 分别采用SH(Shimodaira-Hasegawa test)^[38]、WKH(Weighted Kishino-Hasegawa test)^[39]、WSH(Weighted SH test)^[38]和AU(Approximately unbiased test)^[40]共4种方法进行统计分析, 并设置1000次重复。其结果顺序在扩展名为iqtree的文件中给出, 一般认为SH-aLRT $\geq 80\%$ 且ultrafast bootstrap value $\geq 95\%$ 的节点可信赖。

2 结果与讨论

2.1 六种新测鲟的线粒体基因组基本特征

通过测序组装, 我们获得了中华鲟、长江鲟、短吻鲟、纳氏鲟、鳇和匙吻鲟的完整线粒体基因组(GenBank登录号: MK078260-MK078265)。新测的6种鲟的线粒体基因组均显示是典型的闭合环状双链DNA分子, 总长度为16439—16766 bp, 编码37个线粒体基因, 即13个PCGs、22个tRNAs和2个rRNAs, 及非编码控制区(OH区)和轻链复制起始区(OL区)。只有8个tRNA和ND6基因在L链上编码, 其余多数基因均在H链上编码, 且基因排序与鱼类线粒体基因的原始排序完全一致。

新测的6种鲟显示鲟类的基因组结构较为紧凑。以中华鲟为例, 统计共有15处碱基间隔区, 间隔碱基数为1—395 bp; 有9处碱基重叠区, 重叠碱基数为1—10 bp。其中有3对蛋白质编码基因的开放阅读框存在碱基重叠, 包括ATP8-ATP6、Nad4L-Nad4和Nad5-Nad6分别重叠10、7和4 bp。基因间既没有间隔又无重叠的基因对共15处。其余物种的线粒体基因组特征同中华鲟类似。

6种鲟的碱基组成显示具有一定的A+T偏向性, 同时还呈现出较强的A碱基和C碱基偏好。以中华鲟为例, 线粒体全基因组的碱基A、C、G和T含量分别为30.17%、29.51%、16.47%和23.85%。其中A+T含量(54.02%)大于G+C含量(45.98%), 表明存在一定的A+T偏向性, 这与其他脊椎动物的线粒体基因组特征类似。而且, 除ND6基因外, 线粒体基因组基因都表现出一定的A+T偏向性, 其中ATP8基因的A+T偏向性最高(60.12%)。因为ND6基因以L链为反义链, 所以密码子第三位G比重较大, 因而整个基因的T+G含量很高(76.82%), 这与脊椎动物的线粒体基因组的情况是相似的。6个鲟的线粒体全基因组的AT-偏斜均为正值(0.109—0.126), 而GC-偏斜为负值(-0.284—0.316), 这与其他脊椎动物的线粒体基因组核苷酸偏斜的规律一致(表1)。在6种鲟中, 匙吻鲟的线粒体基因核

类的基部类群。太平洋鲟类由鳇和7个鲟属物种构成。3个BI树的结果完全一致,且节点支持率极高(BI>0.95),仅一处节点支持率较低。而2个ML树中节点支持率低于90的共计有2处。

Pro数据集的ML树仅有一处不同于BI树,位于大西洋鲟类内部的闪光鲟(*A.stellatus*)位置上(BI:40)。这表明,尽管最大似然法在系统发育分析中得到广泛应用,但在构建某些类群的系统发育关系方面有时表现欠佳,这与其他已有研究结果一致。2 rRNA数据集的BI和ML树的结果一致,支持铲鲟属为鲟科的基部类群(BI:1.00/ML:100),然后是尖吻鲟类(BI:0.52/ML:65)。其余鲟科鱼类可以分为2个单系群(BI:0.31/ML:36)。AA数据集的BI和ML结果显示,支持尖吻鲟类是鲟科的基部类群(BI:1.00/ML:100),其余鲟科鱼类可以分为2个单系群(BI:0.98/ML:54)。

综合比较10个系统发育树发现(表2),核苷酸数据与氨基酸数据相比,表现出更好的系统发育信息。而与13个蛋白质编码基因联合序列或者2个rRNA基因联合序列相比,蛋白质编码基因和2个rRNA基因联合序列,及线粒体基因组全序列2个数据集的结果具有一致且极高的节点支持率,这表明完整的线粒体基因组数据更有助于解决鲟形目的系统发育关系。

2.3 树拓扑结构检验

按照鲟形目的系统发育关系,本研究的10个系统发育树共有5种不同的树拓扑结构。树拓扑结构检验结果表明,基于5个数据集的树拓扑结构检验,获得了高度一致的结果,均支持Pro_2 rRNA和Com_Mito两个数据集的BI和ML的系统发育关系(表3)。系统发育结果表明,鲟科的基部位置有2种情况:(1)拓扑结构检验支持率最高的是尖吻鲟类为基部类群,这与Fontana等^[14]为代表的研究结果是一致的。(2)铲鲟属为鲟科的基部类群,拓扑结构检验支持度较低,但早期的研究如Birstein等^[7,8]也曾发现该系统发育关系。基于相同数据集的SH检验结果表明,尖吻鲟类为鲟科的基部类群;铲鲟属与欧鳇,及里海区鲟类共同构成大西洋鲟类。

2.4 鲟形目鱼类的系统发育关系探讨

回顾鲟形目鱼类的分子系统发育研究,不同的研究在数据集构成,分析方法及物种选择数量等方面存在差异,推测这可能是导致鲟形目鱼类不同研究的分子系统发育结果不一致的主要原因。鲟形目鱼类目前现生种总计有27种,本研究共收集23种,覆盖率达85.2%。本研究结果表明,鲟形目鱼类包括匙吻鲟科和鲟科2个单系群。鲟科内部关系复杂,鲟属和鳇属不是单系群。鲟科的基部类群为尖吻鲟类,其余19种鲟科鱼类可以分为大西洋鲟类和太

表2 不同数据集、不同方法获得的鲟形目鱼类的系统发育结果
Tab. 2 Phylogenetic relationships within order Acipenseriforme based on different dataset

系统发育关系Phylogenetic topology	Pro		AA		Pro_2 rRNA		2 rRNA		Com_Mito	
	BI	ML	BI	ML	BI	ML	BI	ML	BI	ML
匙吻鲟科是单系群Polyodontidae is a monophyletic subfamily	1.00	100	1.00	100	1.00	100	1.00	100	1.00	100
鲟科是单系群Acipenseridae is a monophyletic subfamily	1.00	100	1.00	100	1.00	100	1.00	100	1.00	100
鲟属是单系群Acipenser is a monophyletic genus	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
鳇属是单系群Huso is a monophyletic genus	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
铲鲟属是单系群Scaphirhynchus is a monophyletic genus	1.00	100	1.00	100	1.00	100	1.00	99	1.00	100
尖吻鲟类是单系群 <i>A. sturio</i> - <i>A. oxyrinchus</i> cluster is a monophyletic group	1.00	100	1.00	100	1.00	100	1.00	100	1.00	100
尖吻鲟类是鲟科的基部类群 <i>A. sturio</i> - <i>A. oxyrinchus</i> cluster is the basal lineage of Acipenseridae	1.00	100	1.00	100	1.00	100	—	—	1.00	100
铲鲟属是鲟科的基部类群Scaphirhynchus is the basal lineage of Acipenseridae	—	—	—	—	—	—	1.00	100	—	—
大西洋鲟类是单系群Atlantic clade is a monophyletic group	1.00	86	1.00	87	1.00	96	—	—	1.00	99
太平洋鲟类是单系群Pacific clade is one monophyletic group	1.00	100	1.00	95	1.00	100	0.98	78	1.00	100
铲鲟属是大西洋鲟类的基部类群Scaphirhynchus is the basal group of Atlantic clade	1.00	86	—	—	1.00	96	—	—	1.00	99
(大西洋鲟类,太平洋鲟类)(<i>A. sturio</i> - <i>A. oxyrinchus</i> cluster, Pacific clade)	0.99	70	0.98	54	0.97	71	0.31	36	0.96	79
闪光鲟是大西洋鲟类基部类群 <i>A. stellatus</i> is the basal group of Atlantic clade	—	—	1.00	—	—	—	—	—	—	—
(<i>H. dauricus</i> (<i>A. medirostris</i> , <i>A. mikadoi</i>))(<i>A. dabryanus</i> , <i>A. sinensis</i>) (<i>A. transmontanus</i> , <i>A. schrenckii</i>)	1.00	100	1.00	95	1.00	100	0.98	78	1.00	100
((<i>A. nudiventris</i> , <i>A. ruthenus</i>) <i>A. stellatus</i>) (<i>A. fulvescens</i> (<i>A. brevirostrum</i> (<i>A. baerii</i> (<i>A. naccarii</i> , <i>A. gueldenstaedtii</i>))))	1.00	—	—	—	1.00	100	—	—	1.00	100

表 3 系统发育树拓扑结构检验结果

Tab. 3 Results of topological tests for five phylogenetic trees

数据集 Dataset	拓扑结构 Tree topology	-ln likelihood	SH	WKH	WSH	AU
Pro	Com_Mitogeno me_BI+ML	-42355.2	0.83	0.31	0.72	0.28
	Pro_ML	-42352.8	1.00	0.69	0.96	0.72
	AA_BI	-42559.2	0	0	0	0
	AA_ML	-42514.7	0	0	0	0
	2 rRNA_BI+ML	-42503.5	0	0	0	0
AA	Com_Mitogeno me_BI+ML	-14865.7	0.48	0.17	0.52	0.06
	Pro_ML	-14862.9	0.61	0.34	0.71	0.39
	AA_BI	-14857.9	1.00	0.53	0.79	0.65
	AA_ML	-14859.3	0.78	0.47	0.78	0.47
	2 rRNA_BI+ML	-14888.5	0.03	0.02	0.04	0
Pro_2 rRNA	Com_Mitogeno me_BI+ML	-52330.1	1	0.94	1	0.96
	Pro_ML	-52336.9	0.67	0.06	0.20	0.04
	AA_BI	-52608.3	0	0	0	0.02
	AA_ML	-52546.3	0	0	0	0.01
	2 rRNA_BI+ML	-52465.9	0	0	0	0
2 rRNA	Com_Mitogeno me_BI+ML	-5930.6	0.37	0.14	0.32	0.09
	Pro_ML	-5935.6	0.21	0.04	0.10	0
	AA_BI	-5981.2	0	0	0	0
	AA_ML	-5975.5	0	0	0	0
	2 rRNA_BI+ML	-5920.4	1.00	0.87	0.97	0.94
Com_Mito	Com_Mitogeno me_BI+ML	-57626.0	1.00	0.95	1.00	0.94
	Pro_ML	-57633.6	0.68	0.05	0.15	0.06
	AA_BI	-57913.2	0	0	0	0
	AA_ML	-57853.5	0	0	0	0
	2rRNA_BI+ML	-57763.6	0	0	0	0

平洋鲟类。这与多数前人的鲟类分子系统发育研究结果是一致的^[11, 12, 14, 16]。大西洋鲟类包括12个鲟科物种, 其中铲鲟属3种、鲟属1种和鲟属8种。值得注意的是, 本研究首次显示铲鲟属为大西洋鲟类的基部类群。这与Dillman等^[41]的推测是吻合的。Dillman等^[41]基于2个线粒体基因(Cyt *b*和控制区片段)对铲鲟亚科进行分子系统发育重建, 结果显示铲鲟亚科单系性被拒绝, 拟铲鲟属与闪光鲟有更近的亲缘关系, 并推测铲鲟属与鲟属物种的亲缘关系更近。太平洋区类群共7个鲟科物种, 包括鲟属1种和鲟属6种。其中达乌尔鲟、中吻鲟、长江鲟、中华鲟和施氏鲟, 均属于亚洲特有物种。而分布在中国的长江鲟, 及分布在东太平洋区的高首鲟, 被认为可能是淡水陆封种。

本研究没有覆盖的鲟物种有4种, 包括拟铲鲟属(*Pseudoscaphirhynchus*)的3个物种和鲟属的波斯鲟(*A. persicus*)。已有的形态学及分子生物学的证

据表明, 拟铲鲟属与闪光鲟有很近的亲缘关系^[16, 17, 41], 因此建议将拟铲鲟属和闪光鲟共同列入大西洋鲟类。综合考虑到现有鲟形目鱼类的分子系统发育结果同形态学结果仍有许多不一致, 未来仍需要联合形态学数据进行综合分析, 可为鲟形目鱼类的分类, 尤其是鲟科的属的分类及属间亲缘关系提供新的认识。

3 结论

本研究新测定了包括中华鲟、长江鲟、短吻鲟、纳氏鲟、鳇和匙吻鲟在内的6种鲟的线粒体基因组全序列, 基因含量、基因排序、碱基组成、密码子使用模式及tRNA二级结构等与大部分已测鲟类高度相似。基于5个线粒体基因组数据集及2种树构建方法的系统发育分析结果表明, 鲟科的基部类群是尖吻鲟类, 其余鲟科鱼类可以划分为大西洋鲟类和太平洋鲟类2个生物地理类群。鲟科的系统发育关系为(尖吻鲟类(太平洋鲟类(铲鲟属(欧鳇, 里海区鲟类))))。尽管线粒体数据集的构成及系统发育分析方法对树拓扑结构具有一定影响, 但线粒体全基因组数据在解决鲟形目鱼类的系统发育关系上显示出重要的系统发育信息价值。

参考文献:

- [1] Nelson J S, Grande T, Wilson V H, *et al.* Fishes of the World. Fifth edition [M]. Hoboken. New Jersey: John Wiley and Sons, 2016: 118-121.
- [2] Froese R, Pauly D. Editors. FishBase. World Wide Web Electronic Publication. www.fishbase.org, version (02/2019).
- [3] Jin F. Late Mesozoic Acipenseriformes (Osteichthyes: Actinopterygii) in northern Hebei and western Liaoning [M]//Chen P J, Jin F (Eds.), Jehol Biota (Palaeoworld). Hefei: University of Science and Technology of China Press, 1999: 188-280. [金帆. 冀北、辽西中生代中晚期鲟形鱼类化石 [M]//陈丕基, 金帆主编. 热河生物群. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1999: 188-280.]
- [4] Bemis W E, Findeis E K, Grande L. An overview of Acipenseriformes [J]. *Environmental Biology of Fishes*, 1997, **48**(1): 25-71.
- [5] Peng Z, Ludwig A, Wang D, *et al.* Age and biogeography of major clades in sturgeons and paddlefishes (Pisces: Acipenseriformes) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, **42**(3): 854-862.
- [6] Gardiner B G. Sturgeons as Living Fossils [M]//Eldredge N, S M Stanley (Eds.), Living Fossils. New York: Springer Verlag, 1984: 148-152.
- [7] Birstein V J, Hanner R, Desalle R. Phylogeny of the Acipenseriformes: cytogenetic and molecular approaches

- [J]. *Environmental Biology of Fishes*, 1997, **48**(1-4): 127-155.
- [8] Birstein V J, Desalle R. Molecular phylogeny of Acipenserinae [J]. *Molecular Phylogenetics & Evolution*, 1998, **9**(1): 141-155.
- [9] Zhang S M, Zhang Y P, Zheng X Z, *et al.* Sequence variation of mt DNA ND4I-ND4 and its molecular phylogeny in 12 species of Acipenseriformes [J]. *Scientia Sinica Vitae*, 1999, **29**(6): 607-614. [张四明, 张亚平, 郑向忠, 等. 12种鲟形目鱼类mtDNA ND4I-ND4基因的序列变异及其分子系统学 [J]. 中国科学C辑: 生命科学, 1999, **29**(6): 607-614.]
- [10] Zhang S M, Yan Y, Deng H, *et al.* Genome size, ploidy characters of several species of sturgeons and paddlefishes with comment on cellular evolution of Acipenseriformes [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1999b, **45**(2): 200-206. [张四明, 晏勇, 邓怀, 等. 几种鲟鱼基因组大小、倍体的特性及鲟形目细胞进化的探讨 [J]. 动物学报, 1999b, **45**(2): 200-206.]
- [11] Ludwig A, May B, Debus L, *et al.* Heteroplasmy in the mtDNA control region of sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*) [J]. *Genetics*, 2000, **156**(4): 1933-1947.
- [12] Ludwig A, Belfiore N M, Pitra C, *et al.* Genome duplication events and functional reduction of ploidy levels in sturgeon (*Acipenser*, *Huso* and *Scaphirhynchus*) [J]. *Genetics*, 2001, **158**(3): 1203.
- [13] Wang D Q, Wei Q W, Wang Z M, *et al.* PCR-RFLP analysis of mitochondrial DNA in thirteen species of Acipenseriformes [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, **12**(4): 383-389. [汪登强, 危起伟, 王朝明, 等. 13种鲟形目鱼类线粒体DNA的PCR-RFLP分析 [J]. 中国水产科学, 2005, **12**(4): 383-389.]
- [14] Fontana F, Tagliavini J, Congiu L. Sturgeon genetics and cytogenetics: Recent advancements and perspectives [J]. *Genetica*, 2001, **111**(1-3): 359-373.
- [15] Krieger J, Hett A K, Fuerst P A, *et al.* The molecular phylogeny of the order Acipenseriformes revisited [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2008, **24**(supplement 1): 36-45.
- [16] Luo D H, Li Y P, Zhao L P, *et al.* Highly resolved phylogenetic relationships within order Acipenseriformes according to novel nuclear markers [J]. *Genes*, 2019, **10**(1): 38.
- [17] Hilton E J, Grande L. Review of the fossil record of sturgeons, family Acipenseridae (Actinopterygii: Acipenseriformes), From North America [J]. *Journal of Paleontology*, 2006, **80**(4): 672-683.
- [18] Hilton E J, Grande L, Bemis W E. Skeletal anatomy of the shortnose sturgeon, *Acipenser brevirostrum* Lesueur 1818, and the systematics of sturgeons (Acipenseriformes, Acipenseridae) [J]. *Fieldiana Life and Earth Sciences*, 2011, **3**(1): 1-168.
- [19] Gong L, Shi W, Si L Z, *et al.* Rearrangement of mitochondrial genome in fishes [J]. *Zoological Research*, 2013, **34**(6): 666-673. [龚理, 时伟, 司李真, 等. 鱼类线粒体DNA重排研究进展 [J]. 动物学研究, 2013, **34**(6): 666-673.]
- [20] Tang P A, Li M, Feng R Q, *et al.* Phylogenetic relationships among superfamilies of Cucujiformia (Coleoptera: Polyphaga) inferred from mitogenomic data [J]. *Scientia Sinica Vitae*, 2019, **49**(2): 163-171. [唐培安, 李敏, 冯润秋, 等. 基于线粒体基因组数据的扁甲系总科间系统发育关系分析 [J]. 中国科学: 生命科学, 2019, **49**(2): 163-171.]
- [21] Chen X, Shen Y Y, Zhang Y P. Review of mtDNA in molecular evolution studies [J]. *Zoological Research*, 2012, **33**(6): 566-573. [陈星, 沈永义, 张亚平. 线粒体DNA在分子进化研究中的应用 [J]. 动物学研究, 2012, **33**(6): 566-573.]
- [22] Zhang C, Cheng Q, Geng H, *et al.* Molecular phylogeny of *Onychostoma* (Cyprinidae) based on mitochondrial genomes [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2018, **42**(3): 64-68. [张晨, 程琪, 耿红, 等. 基于线粒体基因组的白甲鱼属分子系统发育学研究 [J]. 水生生物学报, 2018, **42**(3): 64-68.]
- [23] Yang Y, Song X J, Tang W Q, *et al.* Complete mitochondrial genome of *Acrossocheilus kreyenbergii*, with phylogenetic analysis of genus *Acrossocheilus* [J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2018, **53**(2): 207-219. [杨杨, 宋小晶, 唐文乔, 等. 克氏光唇鱼线粒体基因组测定及光唇鱼属的系统发育分析 [J]. 动物学杂志, 2018, **53**(2): 207-219.]
- [24] Coil D, Jospin G, Darling A E. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data [J]. *Bioinformatics*, 2015, **31**(4): 587-589.
- [25] Bankevich A, Nurk S, Antipov D, *et al.* SPAdes: A new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing [J]. *Journal of Computational Biology*, 2012, **19**(5): 455-477.
- [26] Kurtz S, Phillippy A, Delcher A L, *et al.* Versatile and open software for comparing large genomes [J]. *Genome Biology*, 2004, **5**(2): R12.
- [27] Walker B J, Abeel T, Shea T, *et al.* Pilon: an integrated tool for comprehensive microbial variant detection and genome assembly improvement [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(11): e112963.
- [28] Bernt M, Donath A, Juhling F, *et al.* MITOS: improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2013, **69**(2): 313-319.
- [29] Lowe T M, Eddy S R. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25**(5): 955-964.
- [30] Tamura K, Stecher G, Peterson D, *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0 [J]. *Mo-*

- lecular Biology and Evolution*, 2013, **30**(12): 2725-2729.
- [31] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, **25**(24): 4876-4882.
- [32] Castresana J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2000, **17**(4): 540-552.
- [33] Trifinopoulos J, Nguyen L T, von Haeseler A, *et al.* W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis [J]. *Nucleic Acids Research*, 2016, **44**(W1): W232-W235.
- [34] Kalyaanamoorthy S, Minh B Q, Wong TKF, *et al.* ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates [J]. *Nature Methods*, 2017, **14**(6): 587-589.
- [35] Nguyen L T, Schmidt H A, Arndt von Haeseler, *et al.* IQ-TREE: A fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum likelihood phylogenies [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2015, **32**(1): 268-274.
- [36] Hoang D T, Chernomor O, Arndt von Haeseler, *et al.* UF-Boot2: improving the ultrafast bootstrap approximation [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2017, **35**(2): 518-522.
- [37] Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, *et al.* MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space [J]. *Systematic Biology*, 2012, **61**(3): 539-542.
- [38] Shimodaira H, Hasegawa M. Multiple comparisons of log-likelihoods with applications to phylogenetic inference [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 1999, **16**(8): 1114-1116.
- [39] Kishino H, Hasegawa M. Evaluation of the maximum likelihood estimate of the evolutionary tree topologies from DNA sequence data, and the branching order in hominoidea [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1989, **29**(2): 170-179.
- [40] Shimodaira H. An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection [J]. *Systematic Biology*, 2002, **51**(3): 492-508.
- [41] Dillman C B, Wood R M, Kuhajda B R, *et al.* Molecular systematics of the shovelnose sturgeons (Scaphirhynchinae) of North America and Central Asia [J]. *Journal of Applied Ichthyology*, 2007, **23**(4): 290-296.

MOLECULAR PHYLOGENY OF ACIPENSERIFORMES BASED ON COMPLETE MITOCHONDRIAL GENOME SEQUENCE

CHENG Pei-Lin¹, YU Dan², LIU Huan-Zhang², DU Hao¹ and WEI Qi-Wei¹

(1. Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of China, Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China; 2. Key Laboratory of Aquatic Biodiversity and Conservation, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: In this study, six complete mitochondrial genomes of Acipenseriformes (*Acipenser sinensis*, *A. dabryanus*, *A. brevirostrum*, *A. naccarii*, *Huso dauricus* and *Polyodon spathula*) were successfully assembled. Based on 6 novel mitogenomes and 17 previously published mitogenomes of sturgeons and paddlefishes, the molecular phylogeny of Acipenseriformes was constructed by maximum likelihood and Bayesian method, and the tree topologies were evaluated by likelihoods value test. The results showed that the length of entire mitochondrial genomes of the six species were 16521—16766 bp, encoding 13 protein-coding genes, 22 tRNA genes and two rRNA gene, which were similar to those of other sturgeons and paddlefishes. Molecular phylogenetic analyses showed that (i) the Acipenseriformes contained two monophyly families (Polyodontidae and Acipenseridae); (ii) genus *Huso* and *Acipenser* were demonstrated as non-monophyletic and the family Acipenseridae can be divided into 3 subgroups: *A. sturio*-*A. oxyrinchus* clade, Atlantic clade and Pacific clade. Tree topology tests indicated that the phylogenetic relationship of the subfamily Acipenseridae is [*A. sturio*-*A. oxyrinchus* clade (Pacific clade, Atlantic clade)]. The species of genus *Scaphirhynchus* has occupied the basal position of the Atlantic clade in Acipenseridae. This study showed that mitochondrial genome data has important application value in the systematic and evolutionary study of Acipenseriformes.

Key words: Mitochondrial genome; Acipenseriformes; Phylogeny; Maximum likelihood; Bayesian method; Tree topology test