

CO I 基因序列在蛇鳎科鱼类种类鉴定中的适用性研究

张稚兰, 林汝榕, 邢炳鹏
(国家海洋局第三海洋研究所, 福建 厦门 361005)

摘要:为研究 DNA 条形码技术在蛇鳎科鱼类分类鉴定中的可行性,选取了蛇鳎科 7 属 10 种 36 个个体进行 CO I 基因扩增,结果共获取 36 条基因序列,平均长度为 655 bp,序列中 T、C、G、A 碱基的平均含量分别为:27.50%、28.10%、26.00%、18.40%,A + T 含量均高于 50%。样品种内、种间和属间的遗传距离(K2P)分别为:0.52%、20.07%、23.96%,遗传距离随着分类阶元的提高而增大,种间遗传距离是种内遗传距离的 38.59 倍,符合 Hebert 提出的相差 10 倍的物种鉴定标准,表明 CO I 基因序列可以作为蛇鳎科鱼类分类鉴定的有效 DNA 条形码。

关键词:海洋生物学;蛇鳎科;细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因;DNA 条形码;物种鉴定
DOI:10.3969/J. ISSN. 2095-4972. 2017. 03. 015
中图分类号:P735 **文献标识码:**A **文章编号:**2095-4972(2017)03-0411-06

蛇鳎科(Ophichthidae)鱼类隶属于鳎鲷目(Anguilliformes),是鳎鲷目中种类分化最多的一个科,目前已发现 55 属 260 多种,我国已定名有 13 属 33 种,其中蛇鳎属(*Ophichthus*)有 14 种^[1]。主要分布于各大海洋的热带和亚热带大陆架浅水水域,多数生活于珊瑚礁和沙质沿岸,有些种类栖息于河口,少数可进入淡水生活^[2]。蛇鳎科鱼类身体细长,前段一般呈圆形,尾部常稍侧偏,外形及其相似,又缺少鳞片、腹鳍和尾鳍等结构,可用作鉴别的形态特征相对较少,且在不同生长阶段的形态特征不尽相同,增加了形态分类鉴定的难度。蛇鳎科鱼类不同属间的物种性状间存在重复和交叉,如蛇鳎属和蠕鳎属(*Scolecenchelys*)都有鳃膜骨条交叠现象等,依据形态的分类方式十分困难,易鉴别错误^[3]。

鱼类的形态学鉴定主要是通过外部形态特征进行区分,但鱼类样品在采集过程中外部形态特征常受到损坏,并且样品形态性状受环境因子影响较大,从而导致分类困难甚至错误^[4]。DNA 条形码技术对样品形态完整性要求低,操作简便、结果准确,已被广泛应用于鱼类的物种鉴定中,尤其是在保护生物

学和生物多样性调查等领域^[4-6]。线粒体 DNA 的分子结构简单,呈母性遗传,进化速度快且几乎不发生重组,是一种应用较广的分子标记,其中线粒体细胞色素 C 氧化酶亚基 I 基因(CO I)是动物物种鉴定常用的目的基因^[7-10]。因此本研究对蛇鳎科 7 属 10 种鱼类样品的线粒体 CO I 基因片段进行了 PCR 扩增及序列测定,分析该基因在蛇鳎科鱼类样品鉴定中的适用性,为蛇鳎科鱼类物种鉴定及多样性研究提供分子生物学数据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

文中所用样品均采集于福建沿海,采样时间为 2014~2015 年(表 1)。经形态鉴定后置超低温冰箱保存,每种各选 3~4 条,使用天根动物基因组 DNA 提取试剂盒提取总 DNA。

1.2 PCR 扩增及测序

根据 COI 基因序列设计的 2 对引物组合进行巢式 PCR,引物 C1-F 和 C1-R、C2-F 和 C2-R 的序列如下: C1-F: 5'-TGTAACGACGGCCAGTCCTCGATC-

CTACATTCTCTTAGT-3’；C1-R：5’-CAGGAAA-AACAGCTAA-3’；C2-R：5’-TGTAACGACGGC-CAGCTATGACGCNAGTCAGCTAAANACTTT-3’；C2-F：5’-CGGCCAGTCCTCGATCCTACATTCTCTTAGTT

表 1 实验样品相关信息
Tab. 1 Information of samples in this study

序号	属名	种名	GenBank 序列号
1	蠕蛇鳎属 (<i>Scolecenchelys</i>)	大鳍蠕蛇鳎 (<i>Scolecenchelys macroptera</i>)	KX215169、KX426302、KY472810、KY472811
2	虫鳎属 (<i>Muraenichthys</i>)	裸鳍虫鳎 (<i>Muraenichthys gymnopterus</i>)	KX215178、KX215179、KX215180、KY472816
3	蛇鳎属 (<i>Ophichthus</i>)	短尾蛇鳎 (<i>Ophichthus brevicaudatus</i>)	KX215170、X215171、KY472812、KY472813
4	蛇鳎属	尖吻蛇鳎 (<i>Ophichthus apicalis</i>)	KX215176、KX215177、KY472814、KY472815
5	蛇鳎属	西里伯蛇鳎 (<i>Ophichthus celebicus</i>)	KX215188、KX215189、KY472819
6	豆齿鳎属 (<i>Pisodonophis</i>)	食蟹豆齿鳎 (<i>Pisodonophis cancrivorus</i>)	KX215181、KX215182、KY472817
7	豆齿鳎属 (<i>Pisoodonophis</i>)	杂食豆齿鳎 (<i>Pisoodonophis boro</i>)	KX215190、KX215191、KX355474、KX355480
8	新鳎属 (<i>Neenchelys</i>)	微鳍新鳎 (<i>Neenchelys parvipectoralis</i>)	KX215185、KX215186、KX215187、KY472818
9	须鳎属 (<i>Cirrhimuraena</i>)	中华须鳎 (<i>Cirrhimuraena chinensis</i>)	KX215192、KX215193、KX215194、KY472820
10	无鳍蛇鳎属 (<i>Apterichtus</i>)	克氏无鳍蛇鳎 (<i>Apterichtus klazingai</i>)	KX215197、KX215198、JQ681408*、JQ681363*、JQ681409*、JQ681407*
11	蛇鳎属	黄蛇鳎 (<i>Ophichthus zophochir</i>)	GU440436*、EU520650*
12	虫鳎属	裸虫鳎 (<i>Scolecenchelys gymnota</i>)	JQ432117*、JQ432116*
13	油鳎属 (<i>Myrophis</i>)	扁吻油鳎 (<i>Myrophis platyrhynchus</i>)	GU224964*、GU224965*
14	阿尔鳎属 (<i>Ahlia</i>)	大眼阿尔鳎 (<i>Ahlia egmontis</i>)	GU224299*、GU224659*

注：“*”表示序列从 Genbank 数据库获取

PCR 反应分两轮进行,使用 TIANGEN 公司 2 × Taq Plus PCR MasterMix 试剂盒,体系均为 25 mm³. 第一轮 PCR 反应循环为:95℃ 预变性 2 min,95℃ 变性 15s,60℃ 退火 30 s,每个循环退火温度降低 0.5℃;72℃ 延伸 50 s,30 个循环;72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存. 每次反应均设置阴性对照以检测是否存在污染. 第 2 轮 PCR 反应循环为:98℃ 预变性 2 min;95℃ 变性 15s,60℃ 退火 30 s,每个循环退火温度降

低 0.3℃;68℃ 延伸 40 s,35 个循环;72℃ 延伸 10 min,4℃ 保存. PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测并进行双向测序,保证序列的可靠性.

1.3 生物信息学分析

运用 DNAMAN 及 Chromas 软件拼接每个样品正反向测序结果并进行校对后提交至 GenBank(表 1)并计算序列长度、碱基组成及 GC 含量. 利用 ClustalW 及 MEGA6.0 软件检测多态位点和简约信息位

点数量,使用 Kimura-2-parameter (K2P) 双参数模型计算种内距离及种间距离(表 2)。结合 Genbank 检索到的 12 条蛇鳎科序列,以邻接法(Neighbor-Joining)构建系统发育树^[11]。

2 结果与讨论

2.1 序列结构特征分析

本研究共测序获得蛇鳎科 7 属 10 种 36 个个体的 CO I 基因片段。经比对后得到 CO I 基因 5' 端一段长度为 655bp 的序列,共编码 218 个氨基酸,所有序列没有插入、缺失密码子并不含终止密码子。36 条 CO I 序列共有 20 个单倍型。20 个 CO I 单倍型之间共检测到保守位点 441 个(约占 67.33%),变异位点 215 个(约占 32.82%),包括 214 个简约信息位点和 1 个自裔位点。

CO I 序列碱基组成分析显示平均碱基含量为 T (27.50%)、C (28.10%)、A (26.00%) 和 G (18.40%),其中 C 含量最高,G 含量最低,A + T 含量为 53.5%,高于 G + C 含量 46.5%。密码子 3 个位点在碱基使用偏向性中,只有 C 使用频率相近,其余 3 个碱基使用频率有显著不同:第 1 密码子中 4 种碱基使用频率相近,分别为 T (25.00%)、C

(25.10%)、A (29.00%) 和 G (20.50%);第 2 密码子中 4 种碱基分别为 T (27.00%)、C (27.30%)、A (23.60%) 和 G (21.60%);第 3 密码子中 C 含量最高,高达 32.00%,A (25.30%) 和 T (30.00%);G 的含量最低,仅为 13.20%,出现了明显的反 G 偏倚现象。

本研究采用 Kimura-2-parameter (K2P) 双参数模型,使用 MEGA6.0 软件,结合 Genbank 数据库中 12 条 CO I 序列,计算分析样品种内、种间及属间的遗传距离。结果显示实验样品种内的 K2P 遗传距离为 0 ~ 1.41%,平均为 0.52%,其中最小距离为 0,最大为大眼阿尔鳎 1.41%,其次为微鳍新鳎 1.02%,其余均小于 1.00%。种间遗传距离为 3.97% ~ 29.33%,平均为 20.07%,是种内遗传距离的 38.59 倍。种间遗传距离最小的两个种为大鳍蠕蛇鳎和短尾蛇鳎,其中大鳍蠕蛇鳎的种内遗传距离为 0,大鳍蠕蛇鳎的种内遗传距离为 0.20%。属间的遗传距离为 14.83% ~ 37.41%,平均为 23.96%。属间的遗传距离大于种内和种间的遗传距离,分类阶元越高遗传距离越大,而且遗传距离的增长随分类阶元的增加变缓。

表 2 各阶元 K2P 遗传距离
Tab.2 K2P genetic divergences among different taxonomic levels

阶元	样品数	平均值/%	最小值/%	最大值/%	标准误差/%
种内	48	0.52	0	1.41	0.38
种间	14	20.07	3.97	29.33	1.15
属间	8	23.96	14.83	37.41	1.24

2.2 系统进化分析

利用距离法构建 NJ 树(图 1),14 个物种共分成 14 组,同一物种的序列均聚合在一起,与形态学分析一致。在属及属以上阶元中,NJ 系统进化树与形态学系统进化树并不一致,同属的样品未能完全聚合在一起,存在一定的交叉。

2.3 讨论

DNA 条形码是利用一段标准的短序列进行物种鉴定,具有操作简且不受样品的形态完整性及生长发育影响,能准确鉴别形态相似种、发掘隐存种等优点,已广泛用于鱼类物种鉴定中^[12-14]。Ward 等(2005)对澳大利亚海洋鱼类的 CO I 基因进行了研究^[15],共获取了 207 种鱼类的 754 条 CO I 基因序列,分析了它们的 GC 含量以及种内、种间及属科遗传距离的差异,得出 CO I 基因序列可以用于鱼类物

种鉴定。Zhang 等(2011)利用 CO I 基因对日本海洋鱼类进行了鉴定研究^[16],发现 158 个鱼类样品的种间遗传距离是种内遗传距离的 60 倍,并证明了 DNA 条形码在鱼类不同生长阶段中鉴定的可行性。Barros-Garcia 等(2016)利用 DNA 条形码技术对深海鱼类海蜥鱼科和棘背鱼科的样品进行了鉴定,96% 的样品鉴定到种^[17]。

本研究通过扩增测序共获得蛇鳎科 7 属 10 种 36 个个体的 CO I 基因片段。经比对后得到 CO I 基因 5' 端一段长度为 655bp 的序列,碱基组成分析显示平均碱基含量为 T (27.5%)、C (28.1%)、A (26.0%) 和 G (18.4%)。36 条 CO I 序列的 A + T 含量相似,最高为尖吻蛇鳎(55.3%),最低为大鳍蠕蛇鳎(52.2%),平均含量为 53.5%,均高于 G + C 含量,与以往鱼类 CO I 基因序列的研究结果一

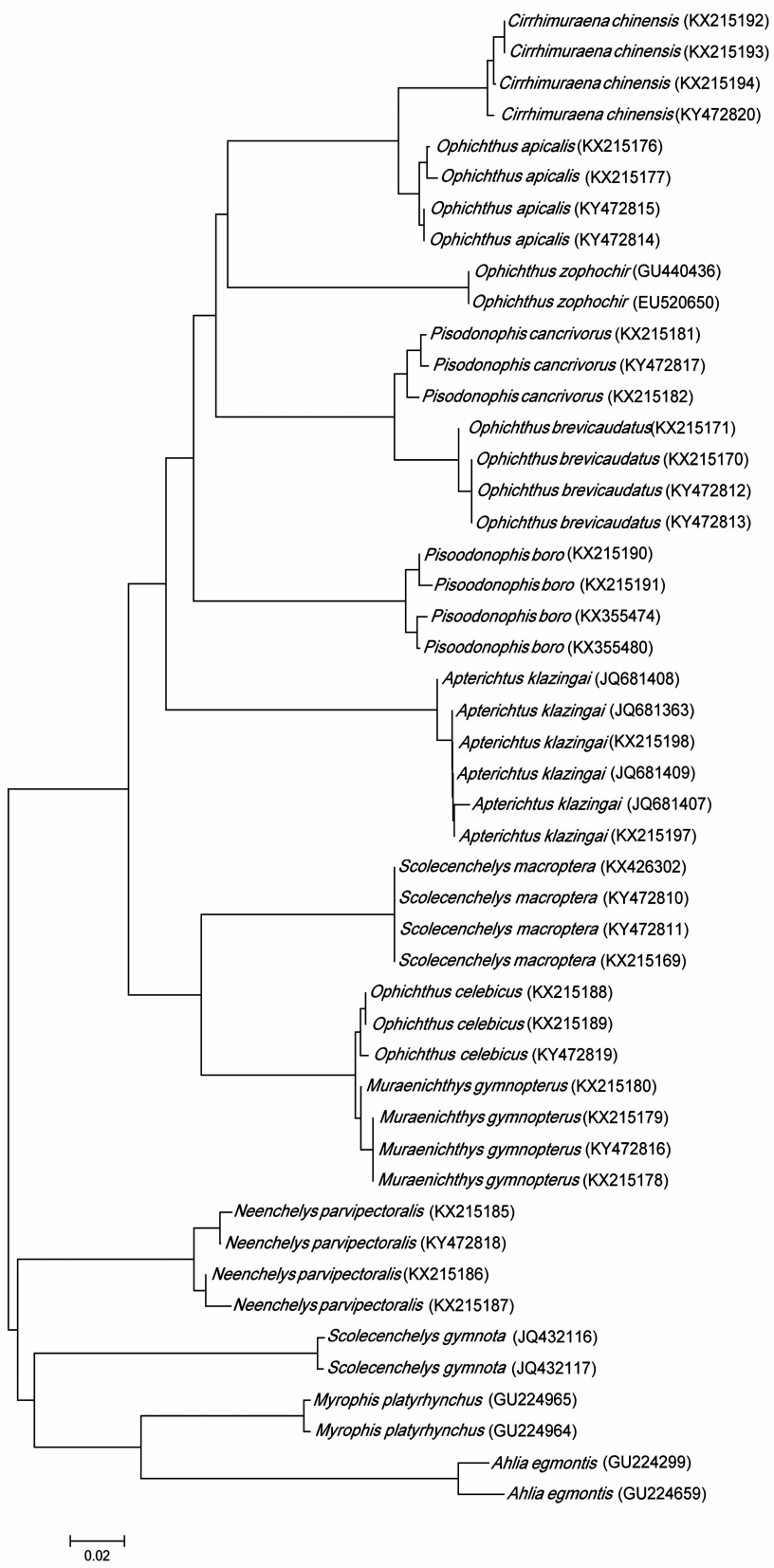


图 1 基于 CO I 序列的蛇鳎科鱼类邻接关系树

Fig. 1 Neighbor-joining tree of Ophichthidae based CO I sequences

致^[12]. 密码子 3 个位点对碱基使用偏向性有显著差异;第 1 密码子中 4 种碱基使用频率相近,分别为 T (25.00%)、C (25.10%)、A (29.00%) 和 G (20.50%);第 2 密码子中 4 种碱基分别为 T

(27.00%)、C (27.30%)、A (23.60%) 和 G (21.60%);第3密码子中C含量最高,高达32.00%,A(25.30%)和T(30.00%);G的含量最低,仅为13.20%,出现了明显的反G偏倚现象,在鳎科鱼类中也发现类似现象^[18].在物种进化中,线粒体基因密码子位点会受到不同程度的碱基突变选择压,碱基使用偏向性可能是由密码子位点上碱基突变压力造成的.

DNA序列能否成为物种鉴定条形码的主要标准为种内和种间遗传距离的大小. Hebert等(2003)对动物CO I基因研究后得出物种种内的遗传距离通常低于2%,并提出只有种间遗传距离大于种内遗传距离,且差异高于10倍时,CO I基因才可对物种进行有效鉴定^[19].本研究所有蛇鳎科鱼类样品中,CO I序列种内的遗传距离为0~1.41%,平均为0.52%,其中最小距离为0,最大为大眼阿尔鳎1.41%,其次为微鳍新鳎1.02%,其余均小于1%.种间遗传距离为3.97%~29.33%,平均为20.07%,是种内遗传距离的38.59倍,符合Hebert提出的标准,表明COI基因序列可以作为蛇鳎科鱼类物种鉴定的DNA条形码.

本研究利用距离法构建NJ系统进化树,在种的水平上,36样品序列首先与同种的序列聚合,14个

物种共分成12组,与形态学分析一致,具有一定的低阶元系统进化分析能力,同时也验证了CO I序列在蛇鳎科鱼类鉴定中的可行性.同属的样品并未在NJ系统进化树聚合到一枝,不同科属间样品存在一定交叉,这与形态学系统进化树不符,可靠性明显降低.究其原因,虽然CO I基因序列在属及属以上水平变异增大,但是所获取基因仅为CO I基因5'端一段长度为655bp的序列,信息位点数量少,且在高级分类阶元中碱基置换趋于饱和,因而系统学水平上的分辨效果较差,不适合作为蛇鳎科属科阶元系统进化研究的分子标记.

3 结论

本研究共获得蛇鳎科7属10种36个个体的CO I基因片段,CO I序列种间的K2P遗传距离平均为20.07%,种内的K2P遗传距离平均为0.52%,种间遗传距离是种内遗传距离的38.59倍,符合Hebert等(2003)提出的相差10倍的物种鉴定标准^[19],表明CO I基因序列可以作为蛇鳎科鱼类物种鉴定的条形码.另外,CO I基因序列在属及属以上阶元分辨效果较差,不适合用于高级分类阶元分类鉴定及系统进化的研究.

参考文献:

- [1] 唐文乔,张春光. 蛇鳎科分类综述及中国蛇鳎科系统分类(鱼纲,鳎目)[J]. 上海水产大学学报, 2004,13(1): 16-22.
- [2] 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. 南海鱼类志[M]. 北京:科学出版社,1962.
- [3] 刘东,唐文乔,张春光. 中国南海蛇鳎科一新纪录属及一新纪录种(鱼纲,鳎目)[J]. 动物分类学报, 2005,30(1): 199-201.
- [4] 产久林,姜华鹏,刘一萌,等. CO I和16S rRNA基因在高原裂腹鱼物种鉴定中的应用[J]. 水生生态学杂志, 2015,36(4): 98-104.
- [5] 张馨月,刘岩,张秀梅,等. 基于CO I基因的西南大西洋部分经济鱼类DNA条形码鉴定[J]. 水生生物学报, 2014,38(6): 1161-1167.
- [6] 彭居俐,王绪祯,王丁,等. 基于线粒体CO I基因序列的DNA条形码在鲤科鲃属鱼类物种鉴定中的应用[J]. 水生生物学报, 2009,33(2): 271-276.
- [7] Baek S Y, Jang K H, Choi E H, et al. DNA barcoding of metazoan zooplankton copepods from South Korea[J]. PLoS ONE, 2016, 11(7): e0157307.
- [8] Gajapathy K, Tharmasegaram T, Eswaramohan T, et al. DNA barcoding of Sri Lankan phlebotomine sand flies using cytochrome c oxidase subunit I reveals the presence of cryptic species[J]. Acta Tropica, 2016, 161: 1-7.
- [9] 辛翠娜,王莹,彭建军,等. DNA条形码在龟鳖类物种鉴定中的应用[J]. 林业实用技术, 2010(4): 12-14.
- [10] 王中铎,郭昱嵩,陈荣玲,等. 南海常见硬骨鱼类CO I条码序列[J]. 海洋与湖沼, 2009,40(5): 608-614.
- [11] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide-sequences[J]. Journal of Molecular Evolution, 1980, 16(2): 111-120.
- [12] 毕潇潇,高天翔,肖永双,等. 4种鳕鱼线粒体16S rRNA、CO I和Cyt b基因片段序列的比较研究[J]. 南方水产, 2009, 5(3): 46-52.
- [13] 彭居俐. 东亚特有鲤科类群的DNA条形码研究及其系统发育分析[D]. 武汉:中国科学院研究生院(水生生物研究所), 2007.

[14] 李琪,邹山梅,郑小东,等. DNA 条形码及其在海洋生物中的应用[J]. 中国海洋大学学报:自然科学版, 2010,40(8): 43-47.

[15] Ward R D, Zemlak T S, Innes B H, et al. DNA barcoding Australia's fish species[J]. Philosophical Transactions-Royal Society. Biological Sciences, 2005, 360(1 462): 1 847-1 857.

[16] Zhang J, Hanner R. DNA barcoding is a useful tool for the identification of marine fishes from Japan[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2011, 39(1): 31-42.

[17] Barros-Garcia D, Banon R, Carlos Arronte J, et al. DNA barcoding of deep-water notacanthiform fishes (Teleostei, Elopomorpha)[J]. Zoologica Scripta, 2016, 45(3): 263-272.

[18] 王淑英,时伟,江金霞,等. CO I 和 16S rRNA 基因序列在鲷科(Soleidae)鱼类种类鉴定中的适用性研究[J]. 热带海洋学报, 2014,33(3): 57-65.

[19] Hebert P D N, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identification through DNA barcodes[J]. Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences, 2003, 270(1 512): 313-321.

Suitability analysis of mitochondrial CO I gene used as DNA barcode for Ophichthyidae

ZHANG Zhi-lan, LIN Ru-rong, XING Bing-peng
(Third Institute of Oceanography, SOA, Xiamen 361005, China)

Abstract: In this study, we collected DNA barcodes based on CO I sequences from 36 individuals of 10 species in 7 genera of Ophichthyidae. The mean length of the sequences was 655bp and the average content of T, C, G and A was 27.50%, 28.10%, 26.00% and 18.40%, respectively. The A + T content was higher than 50% in every species. The average Kimura two parameter (K2P) genetic distances of interspecies, intraspecies and genus were 0.52%, 20.07% and 23.96%, respectively. K2P genetic distance values were found increasing with taxonomic level. Interspecific genetic distance was about 38.59 times higher than the differences of intraspecies, which met Hebert's species identification standard (interspecies genetic distance was more than 10 times of intraspecies). As high efficiency of species identification is demonstrated in the present study by DNA barcoding, we conclude that CO I sequencing can be used to identify fish species.

Key words: marine biology; Ophichthyidae; CO I; DNA barcoding; species identification

DOI:10.3969/J. ISSN.2095-4972.2017.03.015

(责任编辑:肖 静)