

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.01391

虾虎鱼类线粒体全基因组序列结构特征分析及系统发育关系探讨

金逍逍, 孙悦娜, 王日昕, 汤达, 赵盛龙, 徐田军

浙江海洋学院海洋科学与技术学院, 鱼类分子遗传与免疫进化实验室, 舟山 316000

摘要: 虾虎鱼类体态变异大、体型小、种类多, 形态鉴定及谱系分类较为困难。为深入开展虾虎鱼类的鉴定、分类及遗传进化等研究, 文章对已获得的 26 种虾虎鱼线粒体全基因组进行分析。结果发现, 虾虎鱼类线粒体基因组的基因组成及排列模式与大多数脊椎动物线粒体基因组特征基本一致; 由于不同物种的控制区存在不同数量的重复序列而导致基因组序列长度存在明显的差异; 26 种虾虎鱼线粒体全基因组序列及不同基因中 A+T 的含量均超过 50%, 并存在碱基 G 偏倚现象。基于 37 个编码基因序列, 利用 Kimura 双参数法计算遗传距离, 发现矛尾刺虾虎鱼与斑尾刺虾虎鱼、斑纹舌虾虎鱼与钝吻舌虾虎鱼分别为同种异名。通过对 26 种虾虎鱼线粒体基因组控制区序列的比较, 识别了终止结合序列区、中央保守区及保守序列区。利用 26 种虾虎鱼线粒体基因组的 36 个编码基因序列构建系统发育树, 发现部分聚类结果不同于传统的形态学分类方式, 虾虎鱼科中的 5 个亚科出现了明显的分化, 近盲虾虎鱼亚科、背眼虾虎鱼亚科、瓢虾虎鱼亚科亲缘关系较近而聚成一大支, 然后与拟虾虎鱼亚科种类形成姐妹类群, 虾虎鱼亚科与其它 4 个亚科亲缘关系较远, 单独成为一个类群。根据分子钟估算结果推测虾虎鱼科物种可能起源于始新世晚期至渐新世时段, 在中新世进一步分化为具有现代特征的虾虎鱼种类。

关键词: 虾虎鱼类; 线粒体基因组; 结构特征; 系统发育基因组学

Characteristics and phylogenetic analysis of mitochondrial genome in the gobies

JIN Xiao-Xiao, SUN Yue-Na, WANG Ri-Xin, TANG Da, ZHAO Sheng-Long, XU Tian-Jun

Laboratory of Fish Biogenetics & Immune Evolution, College of Marine Science, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316000, China

Abstract: The vast number of species, small size and high variation of morphology make the morphological identification and classification of gobies very difficult. In this study, the complete mitochondrial genome (mitogenome) of 26 species of gobies was analyzed, aiming at accumulating the molecular information on the identification, classification and mo-

收稿日期: 2013-05-22; 修回日期: 2013-08-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31272661)和浙江省自然科学基金项目(编号: LY13C040001)资助

作者简介: 金逍逍, 硕士, 专业方向: 鱼类分子系统学。E-mail: jinxiaoxiaoyy@163.com

通讯作者: 徐田军, 副教授, 研究方向: 鱼类分子免疫及分子进化。E-mail: tianjunxu@163.com

网络出版时间: 2013-9-17 14:41:32

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20130917.1441.004.html>

lecular evolution of gobies. The results showed that the gene composition and arrangement of mitogenome of gobies are similar to most vertebrates. Due to various degrees of repetitive sequences in the control region, the mitogenome of 26 gobies exhibits a great variation in length. The A+T content of the mitogenome is greater than 50% and the lowest frequency is for G among the four bases. Thirty-seven coding gene sequences were used to calculate the average Kimura 2-parameter genetic distance of 26 species of gobies. *Acanthogobius hasta* and *A. ommaturus*, *Glossogobius olivaceus* and *G. circumspectus* were synonyms, respectively. By comparing the control region sequences of 26 gobies, the terminal associated sequences, central conserved sequence block and conserved sequence block were identified, respectively. Thirty-six coding gene sequences of 26 gobies were used to construct the phylogenetic tree and the results were different from the traditional morphological classification. The five subfamilies of Gobiidae were obviously evolved: Amblyopinae, Oxudercinae and Sicydiinae were clustered into a group and then formed a sister group with Gobionellinae; the fishes of Gobiinae had distant relationship with the four subfamilies and formed a group alone. Molecular clock analysis estimated that gobies probably originated in the late Eocene to Oligocene time and further evolved into modern characteristic gobies in the Miocene.

Keywords: Gobies; mitochondrial genome; structure characteristic; phylogenomic analysis

虾虎鱼类(Gobies)是虾虎鱼亚目(Gobioidei)所有物种的统称,目前主流的分类方法将其分为9个科5个亚科,共2200种左右。它们广泛分布于世界各地不同气候的淡水及海水水域中,具有生境差异大、分化程度高、适应能力强的特点,最突出的特征是左右腹鳍愈合成一吸盘或腹鳍相互靠近但不形成吸盘^[1]。绝大多数的虾虎鱼类体型较小,仅有少数物种具有一定的经济价值,作为鲈形目(Perciformes)鱼类中最大的一个类群以及生态环境中的一个重要的组成部分,虾虎鱼类表现出显著多样的生活习性和形态特征,使其在进化生物研究中有一定的研究价值^[2]。然而,由于虾虎鱼类形态上的多样性及不同程度的退化与特化,导致单纯地依据形态学对其鉴定显得较为困难,很多分类结果一直存在着争议^[3]。

鱼类线粒体基因组(Mitochondrial DNA, mtDNA)与其它脊椎动物相似,呈闭环环状结构,由37个编码基因、轻链复制起始区(O_L)、主要的控制区(CR)及散布于不同基因间的非编码序列组成。37个编码基因包括13个编码参与氧化呼吸链的蛋白质基因:细胞色素b(*Cytb*)、2个ATP合成酶的亚单位(*ATPase8*和*ATPase6*)、3个细胞色素c(*Cyte*)氧化酶的亚单位(*COI*, *COII*和 *COIII*)、7个NADH还原酶复合体的亚单位(*NDI-6* 和 *ND4L*)、2个编码核糖体RNA基因(rRNA):12S rRNA和16S rRNA,22个编码转运RNA基因(tRNA)。鱼类mtDNA作为细胞核外具有自主复制、转录及翻译能力的遗传因子,相比于核DNA,其

结构简单、拷贝数多、进化速度快、不同区域进化速率不同,而且易于扩增测序。基于这些优点,越来越多的研究者将线粒体基因作为分子标记应用到鱼类的物种鉴别、分类及系统发育等研究领域^[3-11]。相比于形态学研究,分子生物学分析方法能很好地克服虾虎鱼类形态特征多样、体型特征不明显、表征退化及特化等困难,而更能真实有效地反映其分类地位及进化关系。目前,有关虾虎鱼类线粒体全基因组的研究发展迅速,至今,GenBank中已公布了26种虾虎鱼线粒体全基因组序列,然而却未曾在线粒体基因组水平上系统开展分子系统学的相关研究。

本研究基于本实验室测定的16种虾虎鱼线粒体全基因组序列,结合数据库中已公开的另外10种虾虎鱼线粒体全基因组序列,对虾虎鱼类线粒体全基因组序列的结构特征进行了比较分析,并且利用26种虾虎鱼类线粒体基因组的36个编码基因序列构建系统发育树探讨了各物种之间的系统发育关系。

1 材料和方法

1.1 线粒体全基因组数据的获得

从GenBank数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)中检索、下载得到本研究中所有的26种虾虎鱼线粒体全基因组序列,其中有16个物种的线粒体全基因组序列为本实验室获得。所有物种的命名及分类地位采用Nelson(2006)提出的分类标准^[12]。物种相关信

息见表 1。

1.2 基因组序列分析

利用 MEGA5.0 软件对基因序列进行比对, 分析基因组序列的碱基组成、结构特征, Kimura 双参数法计算遗传距离; 利用 CGViewer 软件并结合制图软件绘制线粒体基因组结构图。

1.3 系统发育分析

使用 MEGA5.0 软件对 26 种虾虎鱼线粒体全基因组序列进行整理及分类, 通过 Clustal X 软件多重比对后进行人工校正, 每个物种分别获得 12 个蛋白质编码基因(去除所有终止密码子, ND6 基因由于核苷酸及氨基酸的组成有所偏离而弃用)^[21]、2 个

表 1 GenBank 中所有已公布的虾虎鱼线粒体全基因组序列信息

科	亚科	属	物种	序列登录号	文献或采样点
虾虎鱼科 Gobiidae	拟虾虎鱼亚科 Gobionellinae	缟虾虎鱼属	双带缟虾虎鱼 <i>Tridentiger bifasciatus</i> *	NC_015992	象山
		<i>Tridentiger</i>	髯缟虾虎鱼 <i>Tridentiger barbatus</i> *	JX536694	舟山
		刺虾虎鱼属	斑尾刺虾虎鱼 <i>Acanthogobius ommaturus</i> *	JX186192	舟山
		<i>Acanthogobius</i>	矛尾刺虾虎鱼 <i>Acanthogobius hasta</i>	AY486321	[13]
		姬虾虎鱼属	长腭姬虾虎鱼 <i>Gillichthys mirabilis</i>	FJ211845	[14]
		<i>Gillichthys</i>	刺毛姬虾虎鱼 <i>Gillichthys seta</i>	NC_012908	[14]
		裸身虾虎鱼属	尾纹裸头虾虎鱼 <i>Gymnogobius petschiliensis</i>	AY525784	[15]
		<i>Gymnogobius</i>	竿虾虎鱼属		
		<i>Luciogobius</i>	平头竿虾虎鱼 <i>Luciogobius platycephalus</i> *	JX971538	舟山
		细棘虾虎鱼属	普氏细棘虾虎鱼 <i>Acentrogobius pflaumi</i> *	NC_018064	舟山
	虾虎鱼亚科 Gobiinae	<i>Acentrogobius</i>	绿斑细棘虾虎鱼 <i>Acentrogobius chlorostigmatoides</i> *	KC196074	舟山
		丝虾虎鱼属	台湾丝虾虎鱼 <i>Cryptocentrus yatsui</i> *	KC237282	舟山
		<i>Cryptocentrus</i>	缙虾虎鱼属		
		<i>Amoya</i>	舟山缙虾虎鱼 <i>Amoya chusanensis</i> *	KC196075	舟山
		舌虾虎鱼属	斑纹舌虾虎鱼 <i>Glossogobius olivaceus</i> *	JQ001860	象山
		<i>Glossogobius</i>	钝吻舌虾虎鱼 <i>Glossogobius circumspectus</i> *	JX536695	舟山
		蝌蚪虾虎鱼属	睛尾蝌蚪虾虎鱼 <i>Lophiogobius ocellicauda</i> *	KC480264	岱山
		<i>Lophiogobius</i>	孔虾虎鱼属		
		<i>Trypauchen</i>	孔虾虎鱼 <i>Trypauchen vagina</i> *	NC_016693	舟山
		近盲虾虎鱼亚科 Amblyopinae	狼牙虾虎鱼属		
	背眼虾虎鱼亚科 Oxudercinae	<i>Odontamblyopus</i>	红狼牙虾虎鱼 <i>Odontamblyopus rubicundus</i> *	JX891626	舟山
		背眼虾虎鱼属	犬齿背眼虾虎鱼 <i>Oxuderces dentatus</i> *	NC_016194	温岭
		<i>Oxuderces</i>	大弹涂鱼属		
		<i>Boleophthalmus</i>	大弹涂鱼 <i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	JN631352	[16]
		青弹涂鱼属	青弹涂鱼 <i>Scartelaos histophorus</i> *	NC_017888	舟山
		<i>Scartelaos</i>	枝牙虾虎鱼属		
		<i>Stiphodon</i>	<i>Stiphodon alcedo</i>	NC_018054	[17]
		瓢鳍虾虎鱼属	日本秃头鲨 <i>Sicyopterus japonicus</i>	NC_018826	[18]
		<i>Sicyopterus</i>	沙塘鳢属		
	沙塘鳢科 Odontobutidae	<i>Odontobutis</i>	平头沙塘鳢 <i>Odontobutis platycephala</i>	NC_010199	[19]
		塘鳢属	刺盖塘鳢 <i>Eleotris acanthopoma</i>	NC_004415	[20]
		<i>Eleotris</i>	乌塘鳢属		
		<i>Bostrychus</i>	中华乌塘鳢 <i>Bostrychus sinensis</i> *	JQ665462	舟山
溪鳢科 Rhyacichthyidae	瓢鳍虾虎鱼亚科 Sicydiinae	溪鳢属	溪鳢 <i>Rhyacichthys aspro</i>	AP004454	[20]
		<i>Rhyacichthys</i>			

注：表中带*的物种线粒体全基因组序列为本实验室获得。

rRNA 基因及 22 个 tRNA 基因序列的 15 395 bp 的联合数据集, 分别采用距离法(Neighbor joining, NJ)、最大简约法(Maximum parsimony, MP)和贝叶斯法(Bayesian Inference)构建了 26 种虾虎鱼(表 1)的系统发育树, 其中 NJ 和 MP 树使用 MEGA5.0 构建, 系统树各分支置信度经 Bootstrap 法检验, 共 1 000 次循环, 其他参数为软件默认值。

采用贝叶斯法构建系统发育树, 基于 jModel-Test 0.1 软件^[22]对序列的替代模型进行分析, 最终选择 GTR+I+G 模型作为最佳替代模型用于后续计算。利用 MrBayes 3.2 软件^[23]进行贝叶斯分析, 采用马尔科夫链的蒙特卡洛(Markov Chain Monte Carlo, MCMC)方法, 以随机树为起始树, 4 条马尔科夫链(1 条冷链及 3 条热链)各运行 100 万代, 每 100 代取样 1 次, 运算开始的 2500 棵树“burn in”去掉, 重复计算两次, 最后通过后验概率(Posterior probability, PP)的估算对树枝的可信度进行评估。

1.4 物种分化时间估算

虾虎鱼科各物种的分化时间使用 PAML 软件包中的 MCMCTree 软件进行估计。具体方法为: 以基于 26 种虾虎鱼线粒体基因组的 36 个编码基因构建的二叉系统发育树作为背景树, 利用 MCMCTree 程序在 Clock2 模型(独立速率模型)下, 依据系统发育树根节点和内节点化石年代标定信息(虾虎鱼科种类的时间标定点参考 Miller(1973)提出的虾虎鱼科种类化石年代信息^[24])计算虾虎鱼科种类的分歧时间。使用 FigTree 软件对估算结果中包含各节点的 95% 置信区间值及分歧时间信息的背景树进行注释。

2 结果与分析

2.1 虾虎鱼类线粒体全基因组序列结构特征

用于分析的 26 种虾虎鱼线粒体全基因组序列, 分布于 4 个科、5 个亚科、21 个属, 序列全长在 16 424~17 588 bp 之间, 其中最短的是拟虾虎鱼亚科中的尾纹裸头虾虎鱼, 最长的是沙塘鳢科中的平头沙塘鳢(表 2)。所有全基因组序列的基因组成与大部分脊椎动物一样, 均包括 13 个蛋白质编码基因、2 个核糖体 RNA 基因、22 个转运 RNA 基因共 37 个编码基因及一个主要的非编码控制区(Control region, CR)。37 个编码基因中除 ND6 基因及 8 个 tRNA 基因

(tRNA-Gln、Ala、Asn、Cys、Tyr、Ser (UCN)、Glu 和 Pro)由轻链编码外, 其余的均由重链编码。除平头沙塘鳢的基因排列稍有差异(ND4 与 ND5 基因之间的 tRNA-His 与 tRNA-Leu 发生位置交换以及在 tRNA-His 一侧存在长度为 533 bp 的非编码序列), 其余的虾虎鱼类线粒体基因排列与绝大多数脊椎动物的排列顺序一致^[25-27](图 1)。

2.2 碱基组成

对 26 种虾虎鱼线粒体全基因组、13 个蛋白质编码基因、转运 RNA 基因、核糖体 RNA 基因及控制区 5 个分析区段的长度及碱基组成的分析结果见表 2。结果发现蛋白质编码基因、rRNA 基因、tRNA 基因区段序列长度差异不大, 而控制区序列长度呈现较大程度的差异, 这些特点体现了编码基因承受选择压力而相对保守及非编码控制区所受选择压力小的进化特性, 分析结果表明不同物种间线粒体全基因组序列长度差异主要是由非编码区变异造成; 不同分析区段中 A+T 的含量均大于 50%, 碱基 G 存在低含量的偏向, 与大多数脊椎动物线粒体基因组高 AT, 低 G 含量偏向的特点相一致^[28]。

2.3 蛋白编码基因

由表(3)可以看出, 26 种虾虎鱼线粒体基因组 13 个蛋白质编码基因中共有 3 种起始密码子: 编码甲硫氨酸(Met)的 ATG 和 ATA, 编码缬氨酸(Val)的 GTG, 其中 ATG 的使用率最高(89.05%); 其次是 GTG (8.88%), 其作为起始密码子发现于所有 26 种虾虎鱼的 COI 基因中; 而 ATA (2.07%)的使用频率最低, 仅在出现在 ATP6 基因中。终止密码子一共有 6 种: 4 种完全终止密码子(TAA、TAG、AGA、AGG)和 2 种不完全终止密码子(TA-和 T--), 其中使用率较高的为 TAA(44.67%)、T--(26.33%)和 TAG(17.16%), 不完全终止密码子可能是在 mRNA 转录后利用 PolyA 尾中的 A 添加为完全终止密码子^[29]。对 26 种虾虎鱼线粒体基因组的 13 个蛋白质编码基因平均长度分别进行计算, 发现除矛尾刺虾虎鱼中的 ND4 基因(1 434 bp)比平均长度(1 384 bp)多 49 bp, 其它不同物种的相同基因均较为保守, 长度差异微小。基于 Kimura 双参数遗传距离方法分别计算 26 种虾虎鱼的 13 个蛋白质编码基因序列的平均遗传距离, 结果显示遗传距离最小的是 COII 基因(21.48%),

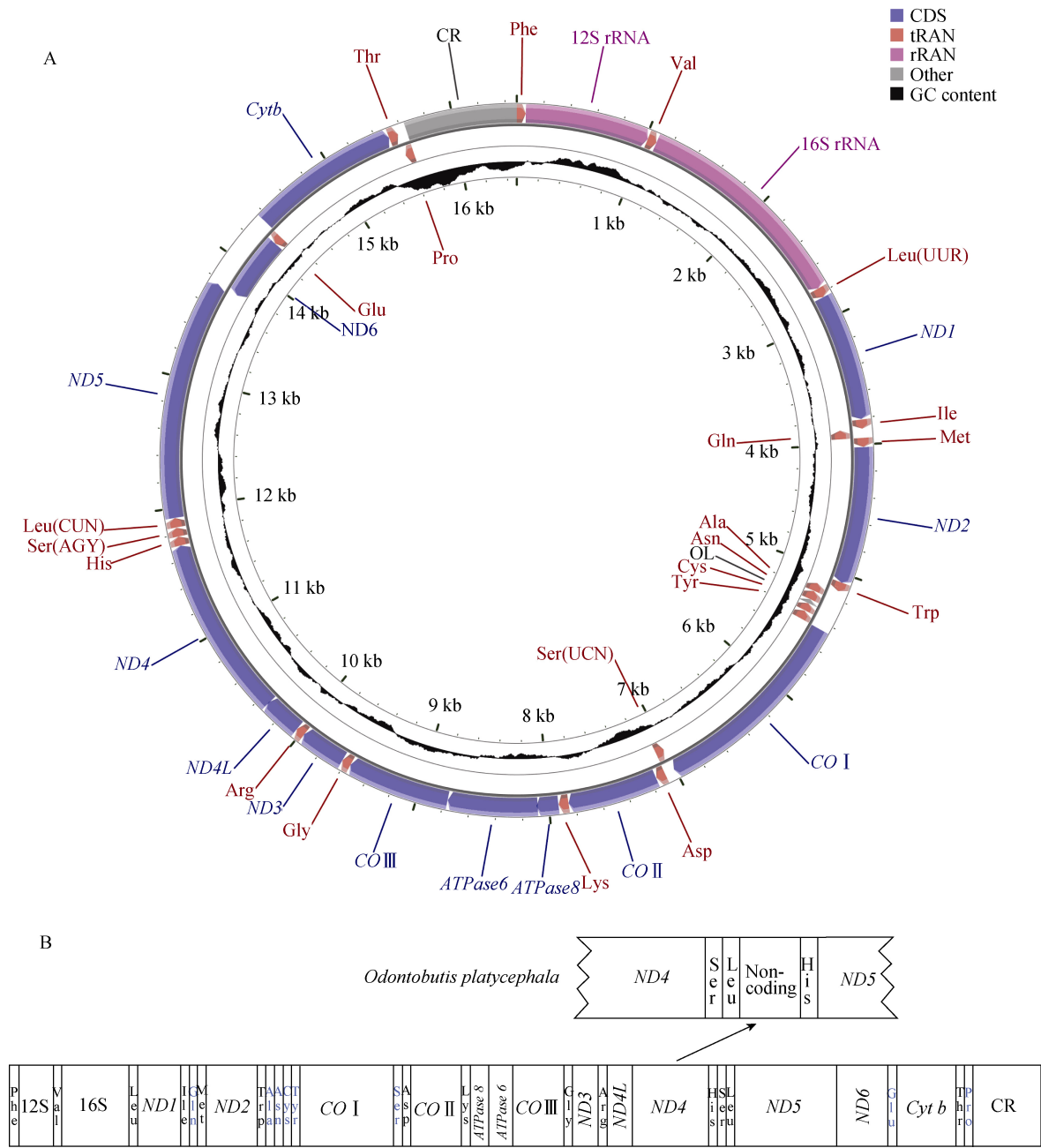


图 1 虾虎鱼类线粒体基因组结构图
A : 虾虎鱼类线粒体基因组环状结构图, 外环为重链, 内环为轻链; B : 虾虎鱼类线粒体基因组直线展开图, 蓝色字体为轻链编码基因; 箭头所指图为发生基因重排的平头沙塘鳢线粒体部分基因组示意图。12S 和 16S : 12S rRNA、16S rRNA; ND1-6 和 ND4L : NADH 还原酶复合体亚基; COI-III : 细胞色素 c 氧化酶亚基; ATPase8 和 ATPase6 : ATP 合成酶亚基; Cytb : 细胞色素 b 基因; CR : 控制区; tRNA 基因用氨基酸代码表示;

最大的是 ND6 基因(42.87), 13 个蛋白质编码基因的保守性大致可以分为 3 组: 较保守的一组为 COI, COII, COIII, Cytb 基因; 中等的为 ND1, ND3, ND4L, ND4, ND5, ATP6 基因; 相对最不保守的为 ND2, ATP8, ND6 基因。基于 37 个编码基因组成的一致序

列, 用 Kimura 双参数法计算物种间的遗传距离, 发现物种间遗传距离最大的为 33.8%(平头沙塘鳢与矛尾刺虾虎鱼之间), 遗传距离最小的为 0.65%(矛尾刺虾虎鱼与斑尾刺虾虎鱼之间), 其次为 0.9%(斑纹舌虾虎鱼与钝吻舌虾虎鱼之间), 依据物种内个体遗

表 2 26 种虾虎鱼线粒体全基因组序列不同分析区段的长度及碱基组成

物种	全序列			蛋白质编码基因			rRNA			tRNA			CR		
	长度 (bp)	A+T	G	长度 (bp)	A+T	G	长度 (bp)	A+T	G	长度 (bp)	A+T	G	长度 (bp)	A+T	G
髯缟虾虎鱼	16522	55.9	16.1	10881	55.6	14.9	2646	55.0	20.2	1560	55.5	19.7	851	64.5	14.2
双带缟虾虎鱼	16532	55.8	17.1	10890	55.6	16.0	2665	54.7	21.0	1555	55.6	20.1	844	64.2	14.0
矛尾刺虾虎鱼	16663	54.5	17.4	10950	54.1	16.4	2627	54.4	21.1	1555	53.4	21.1	984	64.7	14.5
斑尾刺虾虎鱼	16660	54.7	17.4	10902	54.2	16.3	2633	54.7	21.0	1550	53.7	21.0	984	64.7	14.3
长臀姬虾虎鱼	16481	53.7	17.0	10878	53.0	15.9	2630	53.2	20.7	1554	54.6	19.9	828	63.4	16.4
刺毛姬虾虎鱼	16481	54.5	16.8	10884	54.2	15.5	2630	53.5	20.6	1554	54.6	19.8	828	64.0	16.4
尾纹裸头虾虎鱼	16424	57.0	16.9	10881	57.6	15.7	2570	55.0	20.7	1552	54.9	19.7	830	62.3	17.1
平头竿虾虎鱼	16478	58.2	15.1	10884	58.4	13.7	2626	56.2	19.5	1552	56.5	18.6	831	65.8	14.9
睛尾蝌蚪虾虎鱼	16663	55.6	16.0	10890	55.2	14.7	2626	54.8	20.3	1550	53.4	20.3	1023	65.8	13.4
绿斑细棘虾虎鱼	17098	55.4	15.9	10884	54.4	14.4	2632	54.0	20.6	1555	55.2	19.7	1434	65.8	16.0
普氏细刺虾虎鱼	16515	52.3	18.3	10881	51.5	17.3	2620	52.8	21.6	1559	53.0	21.2	857	61.1	16.1
台湾丝虾虎鱼	16584	52.4	17.7	10899	51.8	16.6	2637	51.5	21.3	1555	52.9	21.4	920	61.5	15.9
舟山缟虾虎鱼	16486	55.4	15.9	10881	55.1	14.5	2622	53.7	20.5	1555	56.2	19.2	848	63.3	15.7
钝吻舌虾虎鱼	16573	52.9	17.4	10887	52.4	16.2	2633	52.5	21.5	1560	53.5	20.3	907	60.4	16.6
斑纹舌虾虎鱼	16568	52.8	17.4	10887	52.3	16.2	2627	52.5	21.4	1560	53.5	20.3	907	60.9	16.2
孔虾虎鱼	16686	57.1	15.3	10878	56.8	14.1	2631	55.6	19.7	1555	56.5	19.1	1034	65.0	13.1
红狼牙虾虎鱼	17119	55.9	15.7	10881	55.3	14.6	2636	55.4	19.6	1554	56.0	19.3	1458	61.3	14.1
犬齿背眼虾虎鱼	17116	58.1	15.1	10887	57.5	14.2	2624	55.9	19.8	1565	55.6	19.3	1456	69.2	10.5
大弹涂鱼	17111	56.2	15.5	10881	55.7	14.4	2633	54.5	20.0	1561	56.2	19.2	1453	63.9	12.2
青弹涂鱼	16496	55.9	16.1	10881	55.7	14.9	2644	55.2	20.0	1561	55.8	19.2	830	62.4	16.0
<i>Stiphodon alcedo</i>	16505	55.5	16.4	10881	55.1	15.2	2640	55.2	20.6	1556	55.3	19.3	842	62.1	16.3
日本秃头鲨	16514	54.4	16.9	10881	53.8	15.7	2640	54.3	20.9	1561	55.0	20.1	846	62.2	16.0
平头沙塘鳢	17588	56.9	15.0	10881	56.0	14.0	2612	55.2	19.7	1561	55.3	18.9	1283	68.3	13.4
刺盖塘鳢	16522	53.2	16.9	10884	52.8	15.5	2641	52.4	20.9	1555	54.0	20.6	850	59.8	17.4
中华乌塘鳢	16508	52.7	16.2	10884	51.8	14.7	2632	52.7	20.7	1558	54.7	19.4	846	61.3	16.4
溪鳢	16518	51.9	17.2	10920	50.9	15.9	2632	52.0	21.4	1550	53.9	20.3	852	61.9	16.7
平均值	16740	55.0	16.5	10888	54.5	15.3	2630	54.1	20.6	1556	54.8	19.9	986	63.5	15.1

注：A+T 与 G 的含量均为所占各个区段中的百分比含量。

表 3 26 种虾虎鱼各蛋白质编码基因平均长度、平均遗传距离、起始密码子及终止密码子

	基因名称													
	ND1	ND2	COI	COII	ATP8	ATP6	COIII	ND3	ND4L	ND4	ND5	ND6	Cytb	百分比(%)
平均长度(bp)	975	1048	1555	692	166	683	785	350	297	1384	1840	541	1141	—
遗传距离	27.88	39.43	21.84	21.48	37.78	34.40	22.94	30.57	29.67	31.39	30.37	42.87	25.78	—
起始密子														
ATG	25	26	—	26	26	19	26	26	26	23	26	26	26	89.05
GTG	1	—	26	—	—	—	—	—	—	3	—	—	—	8.88
ATA	—	—	—	—	—	7	—	—	—	—	—	—	—	2.07
终止密子														
TAA	13	16	21	—	21	17	—	4	26	—	19	14	—	44.67
TAG	12	8	1	1	4	—	—	14	—	2	5	11	—	17.16
AGA	—	—	3	3	—	—	—	—	—	1	1	—	—	2.37
AGG	—	—	1	—	—	—	—	—	—	—	—	1	—	0.59
TA-	—	2	—	—	—	9	17	—	—	1	1	—	—	8.88
T--	1	—	—	22	1	—	9	8	—	22	—	—	26	26.33

注：密码子对应的数字表示相应密码子的使用次数；—表示无相应密码子；百分比表示相应密码子的使用频率。

传距离小于 2%的规则^[30], 并参考多种不同学者提出的形态分类学方法及分类观点的分歧^[1,31,32], 推断矛尾刺虾虎鱼与斑尾刺虾虎鱼、斑纹舌虾虎鱼与钝吻舌虾虎鱼分别为同种异名。

2.4 控制区及特征区段分析

控制区作为mtDNA复制和转录的关键区段而受到较小的选择压力, 相比于mtDNA中其它区段, 控制区序列的进化速度最快, 比其它基因高 2~5 倍, 而且其序列和长度变异大、多态性丰富, 因此被广泛作为群体遗传多样性研究的理想标记^[33]。26 种虾虎鱼线粒体基因组控制区碱基组成的分析结果显示, AT平均含量为 63.5%, 明显大于GC, 序列结构中存在一段碱基T富集区。控制区序列长度最短为长腭姬虾虎鱼和刺毛姬虾虎鱼(828 bp), 最长为红狼牙虾虎鱼(1 458 bp), 不同虾虎鱼类之间序列长度差异较大。其中, 在绿斑细棘虾虎鱼、孔虾虎鱼、红狼牙

虾虎鱼、犬齿背眼虾虎鱼、大弹涂鱼和平头沙塘鳢中分别发现了不同长度及不同重复次数的重复序列: 长度为 119 bp的 5 个重复单位及 1 个长度为 55 bp的不完全重复单位; 长度为 141 bp的 2 个重复单位及 1 个长度为 72 bp的不完全重复单位; 长度为 143 bp的 4 个重复单位及 1 个长度为 63 bp的不完全重复单位; 长度为 150 bp的 3 个重复单位及 1 个长度为 146 bp的不完全重复单位; 长度为 130 bp的 5 个重复单位及 1 个长度为 33 bp的不完全重复单位; 长度为 34 bp的 14 个重复单位及 1 个长度为 8 bp的不完全重复单位。通过比对分析, 识别出了 26 种虾虎鱼控制区序列中的终止结合序列区(Trminial associated sequences)、中央保守区(Central conserved sequence block, CSB)^[34](图 2)。其中CSB1、CSB2、CSB3 均能够在 26 种虾虎鱼中识别到, 其特征序列分别为: CATAA--GA---CA-G--CATAA, AA-CCCCC----ACC-

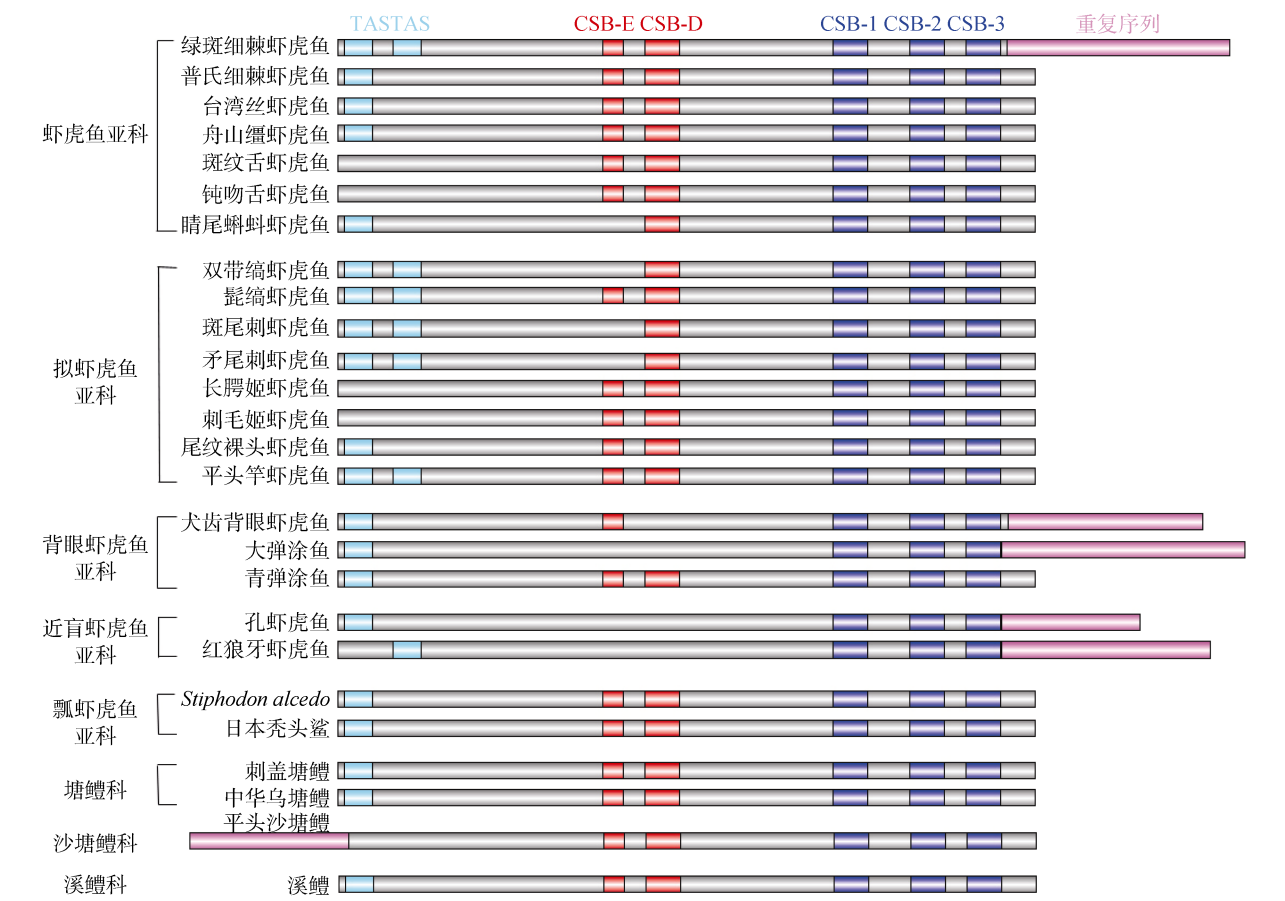


图 2 26 种虾虎鱼线粒体基因组控制区结构模式图
TAS(复制终止相关序列); CSB-E、CSB-D(中央保守区); CSB-1、2、3(保守序列区)。

CC-, AAA-CCCC---G-AA-CAGGA (“-”表示发生变异的碱基, 即转换、颠换或缺失)。在 21 种虾虎鱼中识别到终止结合序列区的核心序列(ACATATATGT), 与其他的硬骨鱼类序列一致^[35,36]。中央保守区在不同的虾虎鱼物种间存在不同的缺失现象, 未识别到 CSB-F; 多数鱼类中识别到 CSB-E 的核心序列 (GTGGG); CSB-D 序列则相对较为保守, 这可能与参与线粒体代谢及重链复制有关联^[37]。

2.5 系统发育关系分析

基于 26 种虾虎鱼线粒体基因组的 36 个编码基因序列利用 NJ、MP、贝叶斯方法分别构建得到了拓扑结构完全一致的系统进化树, 仅在个别进化节点存在支持数值的差异。图 3 为利用贝叶斯推断得到的系统发育树和后验概率, 从中可以看出绝大部

分节点均得到较高的概率支持, 除了一个分枝的后验概率为 0.58, 其余均达到 1.00, 说明基于 36 个编码基因序列可以得到稳健的系统发育树。系统发育树结果显示, 同一科或亚科的物种绝大部分都归类在一起或者单独形成一枝, 但是睛尾蝌蚪虾虎鱼归类到拟虾虎鱼亚科类群中, 与目前形态学上将其归类于虾虎鱼亚科的结果不一致。溪鳢作为虾虎鱼类中最为原始的物种, 是所有虾虎鱼类中唯一具有侧线的种类, 其在鱼类系统分类学研究中具有极重要的价值, 数量稀少, 属于濒危物种, 已被列入中国物种红色名录(2004)^[1]。本研究中系统发育树结果显示了溪鳢位于进化树根部位置, 显示了其分化的原始性, 同时也支持形态学上把溪鳢作为其它所有虾虎鱼类的姐妹种的观点。平头沙塘鳢独自形成一枝位于树的根部位置, 符合其他形态学及分子

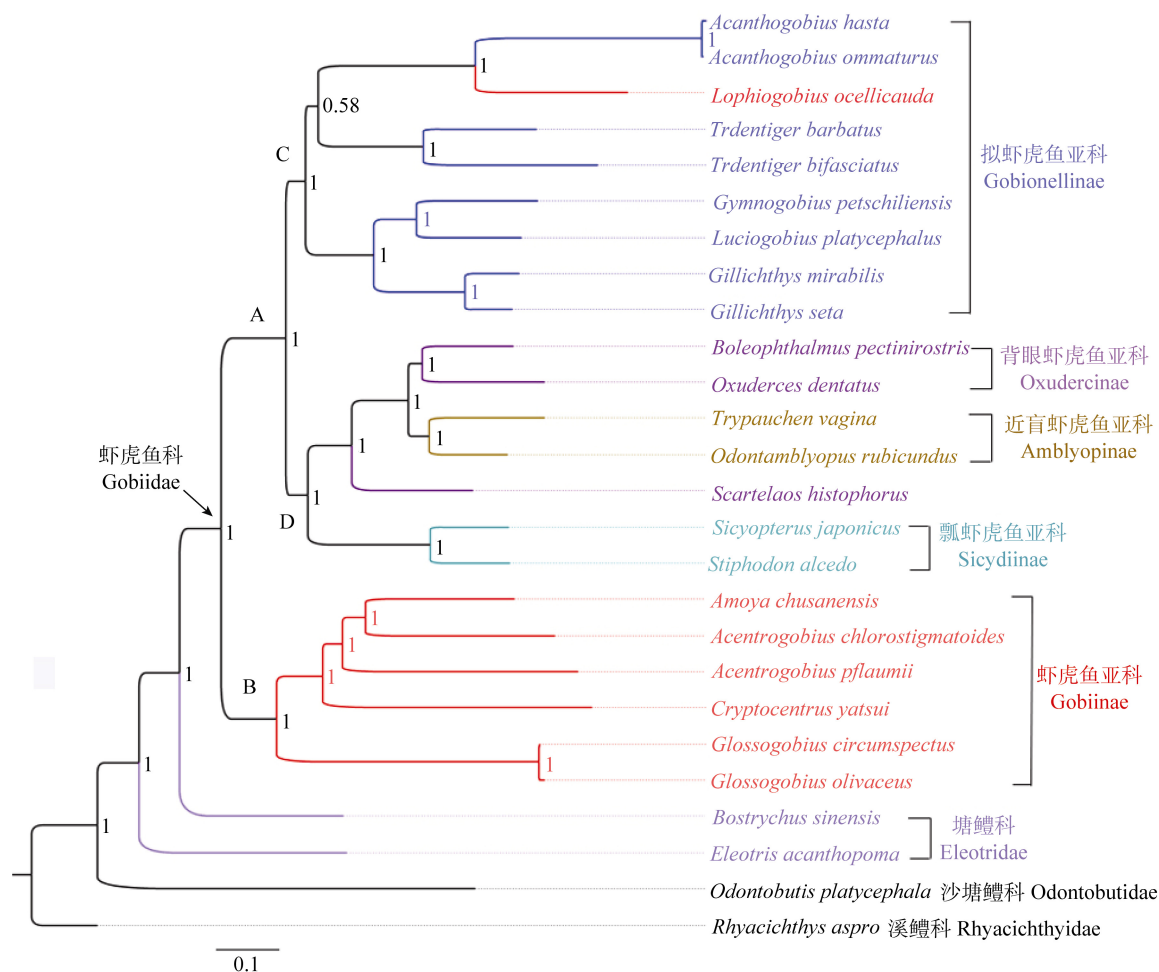


图 3 采用贝叶斯方法构建的分子系统树
节点上的数字表示后验概率值, 相同颜色代表同一虾虎鱼分类单元。

系统学的分类观点:除了溪鳢科鱼类之外,沙塘鳢科与所有其它的虾虎鱼类形成姐妹群体^[3,5,38]。刺盖塘鳢与中华乌塘鳢都属于塘鳢科种类, Nelson^[39]与 Akihito等^[4]都曾将塘鳢科分为峭塘鳢亚科跟塘鳢亚科,根据此分类,刺盖塘鳢与中华乌塘鳢分属于塘鳢亚科和峭塘鳢亚科。本研究得到的系统树显示中华乌塘鳢与刺盖塘鳢单独形成一枝,其中刺盖塘鳢与平头沙塘鳢关系较近,而中华乌塘鳢跟其它虾虎鱼科种类关系较近,这一结果也支持将塘鳢科分为峭塘鳢亚科跟塘鳢亚科。

虾虎鱼科形态学上区别于溪鳢科、沙塘鳢科及塘鳢科,具有 5 根鳃盖条,而后 3 个类群种类均具有 6 根, Akihito等^[40]认为具有 6 根鳃盖条的物种较为原始。本研究中所有 22 种虾虎鱼科的物种在所构建的系统发育树种均聚在一起,一共分为两大枝,近盲虾虎鱼亚科、背眼虾虎鱼亚科、拟虾虎鱼亚科及瓢虾虎鱼亚科种类及一种虾虎鱼亚科鱼类聚为一枝(A),另外一枝由虾虎鱼亚科种类构成(B)。枝A分为两枝,拟虾虎鱼科种类与一种虾虎鱼亚科鱼类聚为一枝(C),近盲虾虎鱼亚科、背眼虾虎鱼亚科及瓢虾虎鱼亚科种类聚为一枝(D),两支互为并系类群,这一结论与 Thacker^[3]结合形态学与分子学数据得出的结论相一致。枝D包括了 3 个不同亚科的种类,首先近盲虾虎鱼亚科聚到了背眼虾虎鱼亚科之内然后与瓢虾虎鱼亚科形成姐妹群体,该结果支持 Thacker^[3]、Akihito等^[4]及 Wang等^[5]得到的结论。枝B共包括 6 种虾虎鱼亚科种类,其中舟山缙虾虎鱼为中国特有种,仅分布于中国东海近海沿岸,系统发育结果显示舟山缙虾虎鱼与绿斑细棘虾虎鱼、普氏细棘虾虎鱼聚在一起,亲缘关系较近。台湾丝虾虎鱼为台湾特有种,其亲缘关系与棘虾虎鱼属关系较近,聚在一起,而与舌虾虎鱼属种类关系较远。

综上所述,基于 26 个虾虎鱼物种的线粒体基因组构建的分子系统发育树,结果与传统的形态学分类观点有所不同:虾虎鱼科中的 5 个亚科出现了明显的分化,近盲虾虎鱼亚科、背眼虾虎鱼亚科与瓢虾虎鱼亚科亲缘关系较近而聚成一大支,与拟虾虎鱼亚科种类形成姐妹群体,虾虎鱼亚科种类与其它的 4 个亚科亲缘关系较远,独自形成一个群体。Thacker曾依据形态学及分子学的证据提出将近盲虾虎鱼亚科、背眼虾虎鱼亚科、瓢虾虎鱼亚科与拟

虾虎鱼亚科归为拟虾虎鱼科,而将虾虎鱼亚科归类于虾虎鱼科^[7],该观点与本研究得到的结论有着一定的相似之处。然而,由于数据资源的限制导致本研究的物种信息有限,所分析的代表物种只占了庞大虾虎鱼类群中的极少部分,想要彻底厘清虾虎鱼类不同科、属、种之间的系统关系,需要更多物种及序列信息的支持。

2.6 虾虎鱼科种类分化时间估算

虾虎鱼类的化石比较少见, Miller^[24]和 Patterson等^[41]提出虾虎鱼类的分化时间不会早于始新世。Frost^[42]曾报道了虾虎鱼类(Gobius)的化石记录,该化石发现于始新世晚期的巴顿粘土,与现存的虾虎鱼类极为相似,具有典型的虾虎鱼类耳石特征,并且与塘鳢科(Eleotris)种类存在明显的区别。本研究利用MCMCTree软件计算得到的分子钟标定系统树见图 4,结果表明在虾虎鱼科种类中,虾虎鱼亚科种类分化时间约为 32.81 Mya(百万年);拟虾虎鱼亚科种类分化时间约为 35.24 Mya;背眼虾虎鱼亚科、近盲虾虎鱼亚科及瓢虾虎鱼亚科聚成的一大类的分化时间约为 34.11 Mya。不同亚科种类的分化时间差异较大,拟虾虎鱼亚科种类分化时间早于其它亚科种类,分化时间相对最晚的则是瓢虾虎鱼亚科种类。

地质资料表明始新世晚期曾发生过被称作大置换的大型生物集群灭绝事件,全球气候缓慢变冷,而深海洋流则相对异常温暖,充满了鱼群及其他海洋生物。渐新世全球气候下降趋势被打断,气温平稳变化,然而海洋持续变冷,海洋动物具有了很多现代特征,被认为是一个重要的过渡时期,是一条连接“炎热的始新世时期的古老世界和生态系统更具有现代特征的中新世”的纽带^[43]。本研究中虾虎鱼科种类大多数分化时间位于始新世晚期至中新世中期这段时间内,与相应的地质时期事件及特点相呼应,推测现存的虾虎鱼科种类起源于始新世晚期至渐新世时间段内,而到了较寒冷的中新世,不同的虾虎鱼类为了适应其相应的栖息环境而进一步分化为具有现代特征的各个类群。

3 讨论

本研究分析了 26 种虾虎鱼线粒体全基因组序列的结构特征、碱基组成、蛋白编码基因、控制区

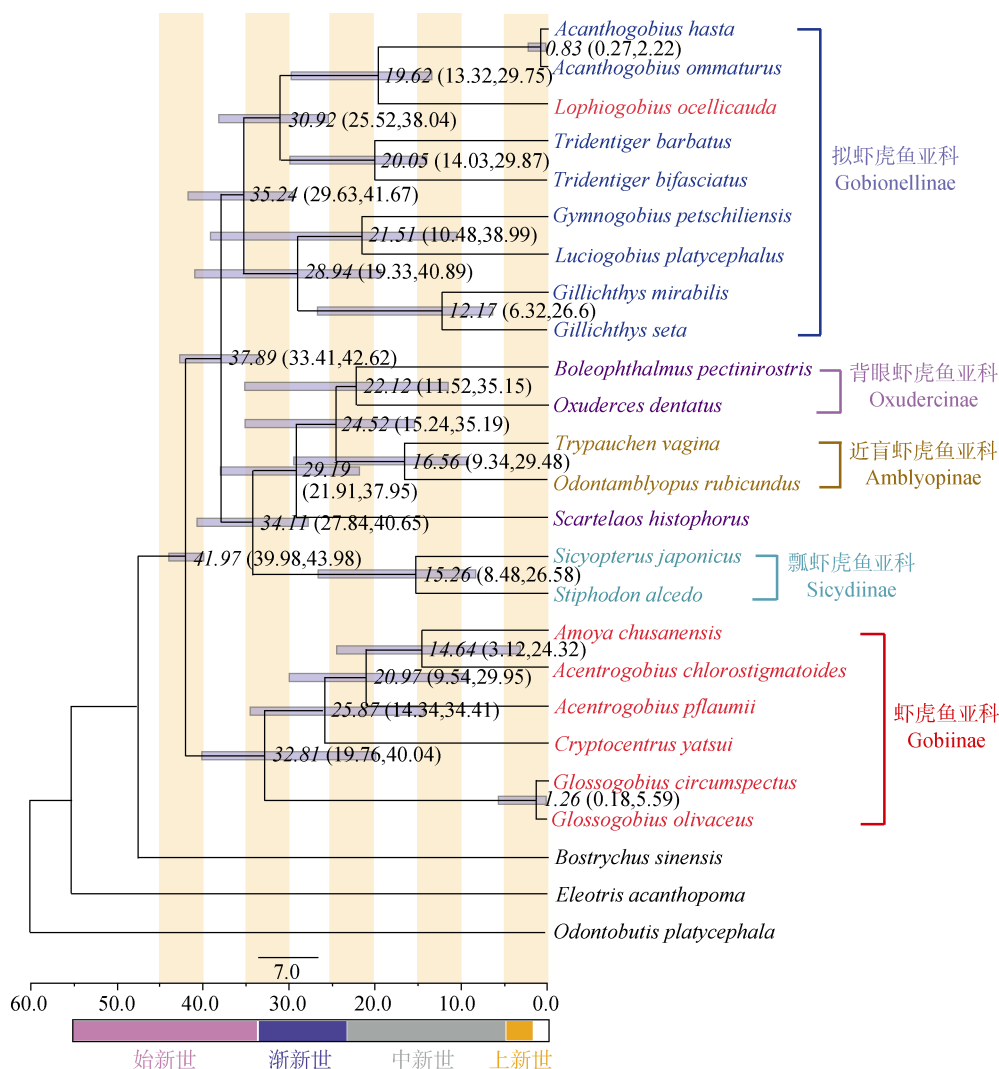


图 4 基于松散分子钟法估算的虾虎鱼科种类分化时间

数值表示平均分化时间, 括号中的数值表示 95% 的置信区间值, 时间单位均为百万年(Mya)。

序列及系统发育关系, 并且估算了虾虎鱼科种类的分化时间。研究结果表明系统发育分类结果与传统形态学分类有所区别, 虾虎鱼科中的 5 个亚科出现了明显的分化, 近盲虾虎鱼亚科、背眼虾虎鱼亚科、瓢虾虎鱼亚科亲缘关系近而聚成一大支, 然后与拟虾虎鱼亚科种类形成姐妹群体, 虾虎鱼亚科种类与其他的 4 个亚科亲缘关系较远, 独自形成一个群体。根据分子钟估算结果推测虾虎鱼科种类可能起源于始新世晚期至渐新世时间段内, 在中新世进一步分化为具有现代特征的虾虎鱼种类。本研究首次对虾虎鱼类线粒体全基因组序列特征进行分析, 并且在线粒体基因组水平上探讨了虾虎鱼类不同科属及种类之间的系统进化关系, 为今后虾虎鱼类遗传结构

分析、开发和保护虾虎鱼类资源及虾虎鱼类的进化关系研究奠定了理论基础。

参考文献(References):

- [1] 伍汉霖, 钟俊生. 中国动物志: 硬骨鱼纲 鲈形目 (五) 虾虎鱼亚目. 北京: 科学出版社, 2008. [DOI](#)
- [2] 孙希福. 基于形态学和分子生物学资料探讨中国沿海 10 种虾虎鱼类的系统发育关系. 青岛: 中国海洋大学, 2009. [DOI](#)
- [3] Thacker CE. Molecular phylogeny of the gobioid fishes (Teleostei: Perciformes: Gobioidae). *Mol Phylogenet Evol*, 2003, 26(3): 354–368. [DOI](#)
- [4] Akihito, Iwata A, Kobayashi T, Ikeo K, Imanishi T, Ono H, Umehara Y, Hamamatsu C, Sugiyama K, Ikeda Y, Saka-

- moto K, Fumihito A, Ohno S, Gojobori T. Evolutionary aspects of gobioid fishes based upon a phylogenetic analysis of mitochondrial cytochrome b genes. *Gene*, 2000, 259(1-2): 5–15. [\[DOI\]](#)
- [5] Wang HY, Tsai MP, Dean J, Lee SC. Molecular phylogeny of gobioid fishes (Perciformes: Gobioidae) based on mitochondrial 12S rRNA sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 2001, 20(3): 390–408. [\[DOI\]](#)
- [6] Thacker CE, Hardman MA. Molecular phylogeny of basal gobioid fishes: Rhyacichthyidae, Odontobutidae, Xenisthmidae, Eleotridae (Teleostei: Perciformes: Gobioidae). *Mol Phylogenet Evol*, 2005, 37(3): 858–871. [\[DOI\]](#)
- [7] Thacker CE. Phylogeny of Gobioidae and placement within Acanthomorpha, with a new classification and investigation of diversification and character evolution. *Copeia*, 2009, 2009, (1): 93–104. [\[DOI\]](#)
- [8] Keith P, Lord C, Lorion J, Watanabe S, Tsukamoto K, Couloux A, Dettai A. Phylogeny and biogeography of Sicydiinae (Teleostei: Gobiidae) inferred from mitochondrial and nuclear genes. *Mar Biol*, 2011, 58(2): 311–326. [\[DOI\]](#)
- [9] Lord C, Lorion J, Dettai A, Watanabe S, Tsukamoto K, Cruaud C, Keith P. From endemism to widespread distribution: phylogeography of three amphidromous *Sicyopterus* species (Teleostei: Gobioidae: Sicydiinae). *Mar Ecol*, 2012, 455: 269–285. [\[DOI\]](#)
- [10] Jeon HB, Choi SH, Suk HY. Exploring the utility of partial cytochrome c oxidase subunit 1 for DNA barcoding of gobies. *J Anim Syst, Evol Diver*, 2012, 28(4): 269–278. [\[DOI\]](#)
- [11] 李林, 梁宏伟, 李忠, 罗相忠, 呼光富, 张志伟, 朱媛媛, 皱桂伟. 瓦氏黄颡鱼线粒体全基因组序列分析及系统进化. *遗传*, 2011, 33(6): 627–635. [\[DOI\]](#)
- [12] Nelson JS. *Fishes of the world*. 4d ed. New York: John Wiley and Sons, 2006. [\[DOI\]](#)
- [13] Kim IC, Kweon HS, Kim YJ, Kim CB, Gye MC, Lee WO, Lee YS, Lee JS. The complete mitochondrial genome of the javeline goby *Acanthogobius hasta* (Perciformes, Gobiidae) and phylogenetic considerations. *Gene*, 2004, 336(2): 147–153. [\[DOI\]](#)
- [14] Bucciarelli G, Di Filippo M, Costagliola D, Alvarez-Valin F, Bernardi G, Bernardi G. Environmental genomics: a tale of two fishes. *Mol Biol Evol*, 2009, 26(6): 1235–1243. [\[DOI\]](#)
- [15] Kim YJ, Kweon HS, Kim IC, Lee JM, Lee JS. The complete mitochondrial genome of the floating goby, *Gymnogobius petschiliensis* (Perciformes, Gobiidae). *Mol Cells*, 2004, 17(3): 446–453. [\[DOI\]](#)
- [16] Liu ZZ, Wang CT, Ma LB, He AY, Yang JQ, Tang WQ. Complete mitochondrial genome of the mudskipper *Boleophthalmus pectinirostris* (Perciformes, Gobiidae): Repetitive sequences in the control region. *Mitochondr DNA*, 2012, 23(1): 31–33. [\[DOI\]](#)
- [17] Maeda K, Mukai T, Tachihara K. A new species of amphidromous goby, *Stiphodon alcedo*, from the Ryukyu Archipelago (Gobiidae: Sicydiinae). *Cybiu*, 2011, 35(4): 285–298. [\[DOI\]](#)
- [18] Chiang TY, Chen IS, Lin HD, Chang WB, Ju YM. Complete mitochondrial genome of *Sicyopterus japonicus* (Perciformes, Gobiidae). *Mitochondr DNA*, 2013, 24(3): 191–193. [\[DOI\]](#)
- [19] Ki JS, Jung SO, Hwang DS, Lee YM, Lee JS. Unusual mitochondrial genome structure of the freshwater goby *Odontobutis platycephala*: rearrangement of tRNAs and an additional non-coding region. *J Fish Biol*, 2008, 73(2): 414–428. [\[DOI\]](#)
- [20] Miya M, Takeshima H, Endo H, Ishiguro NB, Inoue JG, Mukai T, Satoh TP, Yamaguchi M, Kawaguchi A, Mabuchi K, Shirai SM, Nishida M. Major patterns of higher teleostean phylogenies: a new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences. *Mol Phylogenet Evol*, 2003, 26(1): 121–138. [\[DOI\]](#)
- [21] Waddell PJ, Cao Y, Hauf J, Hasegawa M. Using novel phylogenetic methods to evaluate mammalian mtDNA, including amino acid-invariant sites-LogDet plus site stripping, to detect internal conflicts in the data, with special reference to the positions of hedgehog, armadillo, and elephant. *Syst Biol*, 1999, 48(1): 31–53. [\[DOI\]](#)
- [22] Guindon S, Gascuel O. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol*, 2003, 52(5): 696–704. [\[DOI\]](#)
- [23] Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol*, 2012, 61(3): 539–542. [\[DOI\]](#)
- [24] Miller PJ. The osteology and adaptive features of *Rhyacichthys aspro* (Teleostei: Gobioidae) and the classification of gobioid fishes. *J Zool*, 1973, 171(3): 397–434. [\[DOI\]](#)
- [25] Meganathan PR, Pagan HJT, McCulloch ES, Stevens RD, Ray DA. Complete mitochondrial genome sequences of three bats species and whole genome mitochondrial analyses reveal patterns of codon bias and lend support to a basal split in Chiroptera. *Gene*, 2012, 492(1): 121–129. [\[DOI\]](#)

- [26] 杨超, 汪青雄, 黄原, 肖红. 棕头鸥线粒体基因组全序列测定与分析. *遗传*, 2012, 34(11): 1434–1446. [DOI]
- [27] 柯杨, 黄原, 雷富民. 黑尾地鸦线粒体基因组序列测定与分析. *遗传*, 2010, 32(9): 951–960. [DOI]
- [28] Shackelton LA, Parrish CR, Holmes EC. Evolutionary basis of codon usage and nucleotide composition bias in vertebrate DNA viruses. *J Mol Evol*, 2006, 62(5): 551–563. [DOI]
- [29] Ojala D, Montoya J, Attardi G. tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature*, 1981, 290(5806): 470–474. [DOI]
- [30] Hebert PDN, Cywinska A, Ball SL, DeWaard JR. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc Royal Soc B: Biol Sci*, 2003, 270(1512): 313–321. [DOI]
- [31] 秦克静, 姜志强. 斑尾复鰕虎鱼和矛尾复鰕虎鱼同物异名的探讨. *大连水产学院学报*, 1987, (2): 37–39. [DOI]
- [32] 宋娜, 高天翔, 孙希福, 柳本卓. 矛尾复鰕虎鱼物种命名有效性探讨. *动物分类学报*, 2010, 35(2): 352–359. [DOI]
- [33] Cheng YZ, Jin XX, Shi G, Wang RX, Xu TJ. Genetic diversity and population structure of miiuy croaker populations in East China Sea revealed by the mitochondrial DNA control region sequence. *Biochem Syst Ecol*, 2011, 39(4-6): 718–724. [DOI]
- [34] 郭新红, 刘少军, 刘巧, 刘筠. 鱼类线粒体DNA研究新进展. *遗传学报*, 2004, 31(9): 983–1000. [DOI]
- [35] Liu Y, Cui ZX. The complete mitochondrial genome sequence of the cutlassfish *Trichiurus japonicus* (Perciformes: Trichiuridae): Genome characterization and phylogenetic considerations. *Mar Genomics*, 2009, 2(2): 133–142. [DOI]
- [36] Catanese G, Manchado M, Infante C. Evolutionary relatedness of mackerels of the genus *Scomber* based on complete mitochondrial genomes: Strong support to the recognition of Atlantic *Scomber colias* and Pacific *Scomber japonicus* as distinct species. *Gene*, 2010, 452(1): 35–43. [DOI]
- [37] Lee WJ, Conroy J, Howell WH, Kocher TD. Structure and evolution of teleost mitochondrial control region. *J Mol Evol*, 1995, 41(1): 54–66. [DOI]
- [38] Hoese DF, Gill A. Phylogenetic relationships of eleotridid fishes (Perciformes: Gobioidae). *Bull Mar Sci*, 1993, 52(1): 415–440. [DOI]
- [39] Nelson JS. Fishes of the world. 3d ed. New York: John Wiley and Sons, 1994. [DOI]
- [40] Akihito, Iwata A, Sakamoto K, Ikeda Y. Suborder Gobioidae. In: Nakabo T. Fishes of Japan with pictorial keys to the species. Tokyo: Tokai University Press, 1993: 997–1116, 1355–1392. [DOI]
- [41] Patterson C. Osteichthyes: Teleostei. In: Benton MJ. The Fossil Record 2. London: Chapman and Hall, 1993: 622–656. [DOI]
- [42] Frost GA. A comparative study of the otoliths of the Neopterygian fishes (continued). *Ann Mag Nat Hist*, 1929, 10(4): 120–130. [DOI]
- [43] Haines T. Walking with Beasts: A Prehistoric Safari. New York: Dorling Kindersley Publishing Inc., 1999. [DOI]