

陈晨,贺晶晶,邵青臣,等. 乌鳢(*Channa argus*)线粒体 *COI* 基因序列测定及其系统发育关系分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):297-299.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.086

乌鳢(*Channa argus*)线粒体 *CO I* 基因序列测定及其系统发育关系分析

陈晨,贺晶晶,邵青臣,刘坤,王加连

(盐城师范学院生命科学与技术学院,江苏盐城 224000)

摘要:为了进一步探讨乌鳢(*Channa argus*)的分类地位及其系统发育关系,通过测定其线粒体细胞色素氧化酶亚基 I (*CO I*) 基因部分序列,并从 GenBank 获取鳢科另外 18 种鱼类的 *CO I* 基因同源序列,以银鲴(*Pampus argenteus*) 为外群,采用非加权配对算术平均法(UPGMA)构建分子系统树。结果表明:(1)支持鳢科分为鳢属和副鳢属;(2)乌鳢与同属的斑鳢(*C. maculata*)等鱼类的亲缘关系较近。

关键词:乌鳢;*CO I*;序列测定;系统发育

中图分类号:S917 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)08-0297-03

鳢科隶属于鱼纲鲈形目,包括 2 属 29 种。其中鳢属 26 种,分布于中东、南亚和东亚等地;而副鳢属只有 3 种,主要分布于西非地区^[1]。乌鳢(*Channa argus*)别称北方蛇头鱼、黑鱼、生鱼、乌鱼等,是鳢科鳢属中个体大、生长快、经济价值高的名贵经济鱼类。乌鳢原产于中国、俄罗斯和韩国,国内主要分布于长江和黑龙江流域的大部分地区^[2],通常栖息于水草

丛生、底泥细软的静水或微流水中。因乌鳢具有肉质好、味道鲜美、营养丰富等特点,成为我国重要的淡水经济鱼类。长期以来,人们关于乌鳢的形态学、生态学以及人工养殖技术等方面的研究较多,而关于其分子生物学资料则很少,其分类地位和系统发育关系尚存争议。

线粒体 DNA 是真核生物细胞质中的遗传物质,呈母系遗传,具有分子量小、进化速度较快、拷贝数量多等特点,且不易发生重组现象,已成为研究物种起源、进化、分类及种群遗传分化的理想工具。与其他动物一样,线粒体细胞色素氧化酶亚基 I (*COI*) 基因是鱼类线粒体 13 个蛋白编码基因之一,中度保守,既能保证足够的变异又易于被通用引物扩增,在种群遗传学研究中,可作为属、种系统进化研究的良好标记,常被用于分析亲缘关系较近物种的系统发育以及地理种群之间系统关系

收稿日期:2015-11-24

基金项目:国家自然科学基金(编号:31071897);国家级大学生创新训练计划(编号:201310324013)。

作者简介:陈晨(1995—),女,江苏兴化人,主要从事生物学学习和研究。E-mail:760990734@qq.com。

通信作者:王加连,硕士,教授,主要从事动物分子生物学及动物生态学。E-mail:jlw0901@163.com。

[6] Lam T J G M, Old R R G M, Sampimo O C. Mastitis diagnostics and performance monitoring: a practical approach[J]. Irish Vet J, 2009, 62: 34-39.

[7] Urech E, Puhon Z, Schällibaum M. Changes in milk protein fraction as affected by subclinical mastitis[J]. Journal of Dairy Science, 1999, 82(11): 2402-2411.

[8] Naeem A, Zhong K, Moisés S J, et al. Bioinformatics analysis of microRNA and putative target genes in bovine mammary tissue infected with *Streptococcus uberis* [J]. Journal of Dairy Science, 2012, 95(11): 6397-6408.

[9] Fu H, Gao R, Gao Y, et al. Curcumin attenuates inflammatory responses by suppressing TLR4-mediated NF-κB signaling pathway in lipopolysaccharide-induced mastitis in mice [J]. Int Immunopharmacol, 2014, 20: 54-58.

[10] Li F, Liang D, Yang Z, et al. Astragalosin suppresses inflammatory responses via down-regulation of NF-κB signaling pathway in lipopolysaccharide-induced mastitis in a murine model [J]. International Immunopharmacology, 2013, 17(2): 478-482.

[11] Fu Y, Zhou E, Liu Z, et al. Staphylococcus aureus and *Escherichia coli* elicit different innate immune responses from bovine mammary

epithelial cells[J]. Veterinary Immunology and Immunopathology, 2013, 155(4): 245-252.

[12] Liu S, Shi X, Bauer I, et al. Lingual antimicrobial peptide and IL-8 expression are oppositely regulated by the antagonistic effects of NF-κB p65 and C/EBPβ in mammary epithelial cells [J]. Molecular Immunology, 2011, 48(6/7): 895-908.

[13] Bowen Y M B, Bennett C F, Nation N, et al. Amelioration of chronic and spontaneous intestinal inflammation with an antisense oligonucleotide (Isis 9125) to intracellular adhesion molecule-1 in the HLA-B27/β2 microglobulin transgenic rat model [J]. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2002, 302(3): 908-917.

[14] 罗成, 沈娜. 黄芪多糖对 LPS 诱导的脓毒症小鼠急性肝损伤 MDA、caspase-3 和 ICAM-1 的影响研究[J]. 重庆医科大学学报, 2014(11): 203-208.

[15] 施颖琦, 于成功. 姜黄素对 TNF-α 诱导的 HUVEC 表达 ICAM-1 的调节作用[J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2014, 34(11): 1476-1480.

[16] Lam T, Olde R R, Sampimon O, et al. Mastitis diagnostics and performance monitoring: a practical approach [J]. Irish Veterinary Journal, 2009, 62(Suppl 4): S34-S39.

的分子工具。已有研究表明,线粒体 *COI* 基因是许多鱼类、昆虫和鸟类等动物分类与鉴别的最适 DNA 条形码之一^[3-5]。

本研究对乌鳢线粒体 *CO I* 基因进行扩增和测序,并从 GenBank 下载部分鳢科鱼类的同源序列进行比较研究,初步分析它们之间的亲缘关系和系统进化关系,以为乌鳢的系统进化及其种质资源的保护和利用进一步提供分子生物学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

乌鳢,购自盐城市农贸市场,活体带回实验室后,用于 DNA 提取。

1.2 总 DNA 提取

取约 200 mg 样品肌肉,采用传统的酚-三氯甲烷方法提取基因组 DNA。DNA 经沉淀、洗涤并干燥后,溶于 100 μL TE 缓冲液中,4 ℃ 冰箱保存备用。

1.3 PCR 扩增和测序

乌鳢 *CO I* 基因序列扩增所用引物是根据其他鱼类相应序列设计的通用引物^[6],引物序列:*CO I* F,5′-TTCTCCAC-CAACCACAARGAYATYGG-3′;*CO I* R,5′-CACCT-CAGGGTGTCCGAARAAYCARAA-3′,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应总体积 30 μL,反应体系:各 1 μL 10 mmol/L 的 2 条引物,2 μL 2 mmol/L dNTP,2 μL 25 mmol/L Mg²⁺,2 μL 1 mg/mL 牛血清白蛋白(BSA),3 μL PCR 缓冲液,0.2 μL 5 U/μL *Taq* 酶,2 μL 模板,加 ddH₂O 补足到 30 μL。反应程序:94 ℃ 5 min;94 ℃ 30 s,54 ℃ 30 s,72 ℃ 60 s,30 个循环;72 ℃ 10 min。PCR 扩增产物用 1.0% 含溴化乙锭的琼脂糖凝胶电泳分离,用凝胶成像系统观察并照相。然后将样品送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。

1.4 数据分析

测序结果同 GenBank 中获得的其他 18 种鳢科鱼类的线粒体 *CO I* 基因序列合并(表 1),用 Clustal X 1.83 软件比对,确定变异位点;用 MEGA 4.1 软件对序列进行分析,并基于 Kimura 双参数模型,计算上述不同序列的碱基组成、密码子不同位点的碱基含量,以及相互间的遗传距离等信息;以鲈形目鲈亚目鲈科的银鲈(*Pampus argenteus*)为外群,用非加权配对算术平均法(UPGMA)构建分子系统树,通过重抽样检验获得系统树分支的置信度(重复次数为 1 000 次)。

2 结果与分析

2.1 *CO I* 基因序列分析

通过对乌鳢线粒体总 DNA 的提取、PCR 扩增和序列测定,得到长度为 708 bp 的基因序列,经 BLAST 分析比较,证实所得序列为乌鳢 *COI* 基因片段。分析该序列的碱基组成,其中 T、C、A、G 的含量分别为 26.7%、31.1%、23.6%、18.6%,A+T 含量为 50.3%,G+C 含量为 49.7%。从其碱基组成的偏向性看,G 含量最低,A+T 含量略高于 G+C 含量,这与其他鱼类线粒体 *COI* 基因同源序列的碱基特点相似^[7-10]。

2.2 遗传距离及系统发育分析

利用 Clustal X 软件对表 1 中鱼类的 *CO I* 基因序列进行多重序列比对,辅以人工校对,得到长度为 650 bp 的同源序列,用于后续分析。

表 1 本研究鱼类的 *CO I* 基因信息

编号	鱼种名称	拉丁名	GenBank 登录号
1	斑卡鳢	<i>C. bankanensis</i>	KJ937395
2	带鳢	<i>C. lucius</i>	KJ937433
3	巨鳢	<i>C. marulius</i>	KJ937440
4	月鳢	<i>C. asiatica</i>	KC819605
5	黑体鳢	<i>C. melasoma</i>	KJ937380
6	线鳢	<i>C. striata</i>	HQ682668
7	缘鳢	<i>C. gachua</i>	KJ937429
8	斯氏鳢	<i>C. stewartii</i>	KJ847154
9	巴卡鳢	<i>C. barca</i>	KJ847150
10	东方鳢	<i>C. orientalis</i>	JX983247
11	翠鳢	<i>C. punctata</i>	JX983251
12	斑鳢	<i>C. maculata</i>	KJ937459
13	乌鳢	<i>C. argus</i>	本研究
14	红鳢	<i>C. diplogramma</i>	KJ937445
15	小盾鳢	<i>C. micropeltes</i>	KJ937458
16	侧眼鳢	<i>C. pleurophthalmus</i>	KJ937390
17	非洲副鳢	<i>Parachanna africana</i>	KJ937418
18	暗副鳢	<i>P. obscura</i>	KJ937453
19	真副鳢	<i>P. insignis</i>	KJ937444
20	银鲈	<i>Pampus argenteus</i>	HM068264

注:表 2、图 1 编号与本表同。

遗传距离多用来分析不同群体间的遗传分化程度和群体内的遗传多样性,数值越大,群体内或群体间分化程度越高;数值越小,群体内或群体间分化程度越低。根据 Kimura 双参数模型得到 19 种鳢科鱼类之间的遗传距离,其中乌鳢与斑鳢的遗传距离最小,为 0.002;乌鳢与月鳢等其他 14 种同属鱼类之间的遗传距离为 0.178~0.241;而乌鳢与同科副鳢属 3 种鱼类的遗传距离则为 0.239~0.253(表 2)。可见,乌鳢与同属的斑鳢等鱼类间的分化程度较低,亲缘关系较近,与副鳢属鱼类之间的分化程度相对较高。

基于线粒体 *CO I* 基因部分序列,采用非加权配对算术平均法构建分子系统树。图 1 显示,相对于鲈科银鲈的外群,所有供分析鳢科的 2 属 19 种鱼类聚成 1 个单系群;在鳢科内部,16 种鳢属鱼类聚在一起形成单系,3 种副鳢属鱼类聚成另 1 支,两者互为姊妹群;乌鳢首先与斑鳢聚为 1 支,进而与由小盾鳢、红鳢、侧眼鳢组成的单系群形成姊妹群关系,且具有较高的置信度,说明乌鳢与这些物种的亲缘关系较近。

3 讨论

细胞色素氧化酶亚基 I(*CO I*)为线粒体 13 个蛋白编码基因中研究得最清楚的基因之一。相对于线粒体其他序列如 D-loop、Cyt b 等,*CO I* 的进化速率较低,被广泛用于鱼类系统发育及 DNA 条形码研究^[11]。Hubert 等通过对加拿大 28 科 85 属 190 种共 1 360 尾淡水鱼类样本的研究,得出 DNA 条形码可以有效应用于淡水鱼类、尤其是小个体鱼类分类学和系统学研究的结论^[12]。近年来,国内学者也陆续开展了鱼类 DNA 条形码方面的研究工作,但迄今未见运用 *CO I* 基因作为乌鳢 DNA 条形码进行分类及其系统发育关系研究的报道。

为了进一步揭示乌鳢的分类地位及其系统发育关系,本研究通过分子生物学技术获得乌鳢线粒体 *CO I* 基因部分序列,联合 GenBank 中其他 18 种鳢科鱼类的 *CO I* 基因序列,

表 2 本研究鱼类的种间遗传距离

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1																				
2	0.103																			
3	0.186	0.199																		
4	0.199	0.197	0.162																	
5	0.213	0.246	0.184	0.192																
6	0.232	0.247	0.168	0.180	0.122															
7	0.237	0.261	0.217	0.213	0.231	0.209														
8	0.245	0.255	0.225	0.226	0.254	0.226	0.057													
9	0.234	0.247	0.196	0.219	0.229	0.231	0.161	0.161												
10	0.265	0.269	0.205	0.232	0.251	0.230	0.179	0.175	0.172											
11	0.226	0.224	0.189	0.199	0.197	0.189	0.209	0.220	0.217	0.209										
12	0.204	0.200	0.178	0.185	0.206	0.204	0.227	0.241	0.222	0.221	0.208									
13	0.204	0.199	0.178	0.185	0.206	0.204	0.227	0.241	0.222	0.221	0.208	0.002								
14	0.194	0.202	0.199	0.200	0.190	0.227	0.222	0.239	0.228	0.233	0.212	0.184	0.186							
15	0.193	0.188	0.175	0.204	0.191	0.202	0.234	0.253	0.228	0.224	0.202	0.193	0.193	0.096						
16	0.218	0.235	0.205	0.199	0.203	0.212	0.185	0.217	0.227	0.237	0.226	0.198	0.197	0.142	0.163					
17	0.211	0.199	0.228	0.239	0.265	0.257	0.285	0.292	0.265	0.269	0.235	0.239	0.239	0.259	0.258	0.242				
18	0.208	0.193	0.230	0.237	0.263	0.259	0.280	0.292	0.260	0.278	0.238	0.241	0.241	0.261	0.261	0.244	0.006			
19	0.231	0.227	0.242	0.252	0.274	0.265	0.278	0.267	0.273	0.287	0.263	0.253	0.253	0.263	0.269	0.253	0.090	0.093		
20	0.231	0.218	0.257	0.269	0.271	0.264	0.264	0.275	0.283	0.280	0.262	0.255	0.258	0.263	0.263	0.278	0.270	0.273	0.285	

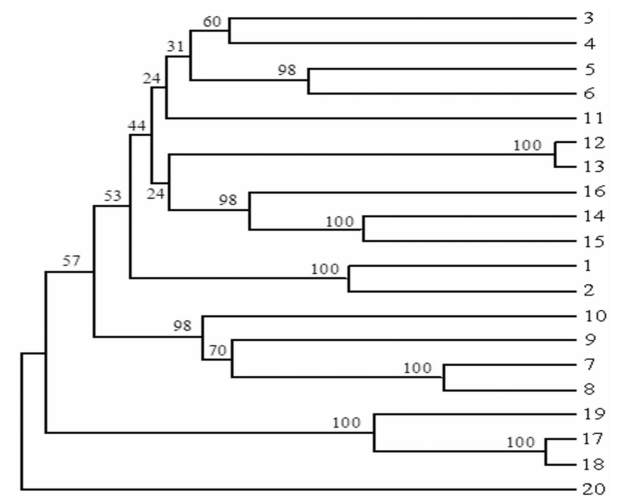


图 1 基于 *CO I* 基因序列构建的鱼类 UPGMA 分子系统树

以其长度 650 bp 的同源序列为材料,进行遗传距离分析及系统进化关系研究。结果表明:鳢科鱼类明显分化为 2 支,分别代表鳢属和副鳢属,这与目前公认的鳢科分类观点一致^[1,13];鳢属中乌鳢与斑鳢的亲缘关系最近,与小盾鳢、红鳢、侧眼鳢等物种也有比较近的亲缘关系,这与 Li 等以线粒体 ND2 及其侧翼基因序列为材料所得到的研究结论^[1]完全一致。

虽然本研究进一步验证了鳢科的分类状况,也进一步明确了乌鳢的分类地位及其系统发育关系,但由于受客观条件的限制,本研究仅仅基于 *CO I* 基因的部分序列,研究对象也仅涉及到鳢科 29 个物种中的 19 种,因而研究结果仍然是初步的,还有待于我们从更多的鳢科物种、基于更丰富的线粒体基因或核基因材料,对乌鳢分类地位及鳢科鱼类系统发育关系进行更加系统的研究。

参考文献:

[1] Li X, Musikasinthorn P, Kumazawa Y. Molecular phylogenetic analy-

ses of snakeheads (Perciformes: Channidae) using mitochondrial DNA sequences [J]. Ichthyological Research, 2006, 53 (2): 148 - 159.

[2] 董新培, 穆淑梅, 周楠, 等. 不同地理群体乌鳢线粒体 DNA 控制区结构分析及遗传多样性 [J]. 水产学报, 2014, 38 (9): 1277 - 1285.

[3] 刘连为, 许强华, 陈新军. 基于线粒体 *CO I* 和 *Cytb* 基因序列的北太平洋柔鱼种群遗传结构研究 [J]. 水产学报, 2012, 36 (11): 1675 - 1684.

[4] 张迪, 雷光春, 龚成, 等. 基于 *CO I* 基因序列的太湖新银鱼遗传多样性 [J]. 湖泊科学, 2012, 24 (2): 299 - 306.

[5] 于亚男, 宋超, 侯俊利, 等. 基于线粒体 *CO I* 基因部分序列的长江口虾虎鱼科鱼类系统分类 [J]. 淡水渔业, 2014, 44 (5): 3 - 8.

[6] Ivanova N V, Zemlak T S, Hanner R H, et al. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding [J]. Molecular Ecology Notes, 2007, 7 (4): 544 - 548.

[7] 郭奕惠, 喻达辉, 黄桂菊, 等. 中国主要养殖罗非鱼亲缘关系的 *CO I* 序列分析 [J]. 华中农业大学学报, 2009, 28 (1): 75 - 79.

[8] 孟玮, 杨天燕, 海萨, 等. 基于线粒体 *CO I* 基因序列的亚东鲑 DNA 条形码研究 [J]. 水产学杂志, 2010, 23 (1): 6 - 10.

[9] 董丽娜, 黄梓荣, 艾红, 等. 北部湾 3 种金线鱼属鱼类 *CO I* 基因序列的比较分析 [J]. 中国水产科学, 2011, 18 (3): 508 - 514.

[10] 赵明, 宋炜, 马春艳. 基于线粒体 *CO I* 基因序列的棘头梅童鱼 7 个野生群体遗传结构分析 [J]. 中国水产科学, 2015, 22 (2): 233 - 242.

[11] 张凤英, 马凌波, 施兆鸿, 等. 3 种鲴属鱼类线粒体 *CO I* 基因序列变异及系统进化 [J]. 中国水产科学, 2008, 15 (3): 392 - 399.

[12] Hubert N, Hanner R, Holm E, et al. Identifying Canadian freshwater fishes through DNA barcodes [J]. PLoS One, 2008, 3 (6): e2490.

[13] Adamson E A S, Hurwood D A, Mather P B. A reappraisal of the evolution of Asian snakehead fishes (Pisces, Channidae) using molecular data from multiple genes and fossil calibration [J]. Molecular Phylogenetics and Evolution, 2010, 56 (2): 707 - 717.