

S7 核糖体蛋白基因序列变异与 亚科鱼类的单系性研究

王绪桢 何舜平

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 使用分子生物学的方法对 亚科鱼类的单系性进行了探讨。通过 PCR 方法, 获得了 13 种鲤科鱼类 S7 核糖体蛋白基因第 1 内含子序列, 其中包括 6 种 亚科鱼类。使用 MEGA 软件中的 Neighbor Joining 法和 Most Parsimony 法分别构建分支系统图。研究结果显示目前所确认的 亚科鱼类实际上没有形成单系类群。其中 属、波鱼属和低线 属位于系统树基部, 显示出原始性。而由细鲫属、马口鱼属和 属构成的类群相对于 亚科中的原始种类起源较晚, 可能和较晚起源的东亚鲤科类群之间有更为密切的关系。

关键词: 亚科; S7 核糖体蛋白基因; 系统发育; 鲤科

中图分类号: Q95914 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2003)02-0122-005

鲤科是现生鱼类中最大的科, 种类超过 2000 种, 其分类系统特别是亚科的划分长久以来一直没能很好解决。根据形态和化石特征, 鲤科鱼类被划分为 5 或 12 个亚科^[1,2], 但其中的 亚科(波鱼亚科)在亚科阶元系统分类问题上一直存在着许多疑问, 尤其是目前认定的 亚科鱼类的单系性、它们在鲤科中的地位以及现生 亚科鱼类之间的关系如何, 至今尚未做出合理的确定。 亚科鱼类的系统发育研究是目前鲤科鱼类系统学研究中的难点之一。近年来, 迅速增加的 DNA 序列分析为 亚科鱼类的系统发育研究提供了另一条较为客观的途径。基于 RAPD 分析以及 Cytb 基因序列分析, 何舜平等^[3,4]也指出 亚科实际上包括了几个没有直接关系的类群。这些分子系统学的研究结果对于重新认识 亚科鱼类的系统演化历史有着重要的指导意义。由于不同基因的进化历史存在差异, 不能武断地用一两种基因构建的分支图来反映物种间的进化关系, 而应用尽量多的基因序列来进行系统发育研究。

S7 核糖体蛋白基因是不连续的蛋白质编码基因, 由一系列的外显子和内含子相互串联而成。同人类和两栖类相比, 鱼类 S7 基因组结构较为紧凑, 这主要是因为鱼类 S7 基因中内含子的片段长度显

著短于人类及两栖类^[5]。鱼类的 S7 基因第 1 内含子长度比较合适而容易得到该内含子的全序列, 本研究特选择 S7 基因第 1 内含子用于 亚科的系统演化研究。由于所承受的进化压力不同, 内含子序列无论是在种间还是在种内都较外显子序列具有更明显的遗传多态现象。因此基于内含子序列的分子进化分析可能会提供丰富的进化信息。本文运用 PCR 的方法从总 DNA 中扩增 S7 基因第 1 内含子, 通过分析其序列为阐明现生 亚科鱼类的系统进化问题提供新的证据。

1 材料与方法

1.1 材料 所用研究样本主要为 亚科以及部分鲤科其他亚科的代表种类。具体种类的名称分别为: 胭脂鱼 [*Myxocyprinus asiaticus* (Bleeker)]; 亚科的 (*Danio nigrofasciatus*)、滇西低线 [*Barilius barila* (Hamilton)]、波鱼 (*Rasbora* sp.)、宽鳍 [*Zacco platypus* (Temminck et Schlegel)]、马口鱼 (*Opsariichthys bidens* Gunther)、细鲫 (*Aphyocypris* sp.); 亚科的小 (*Puntius* sp.)、 *Saobwa replendens*; 野鲮亚科的野鲮 (*Labeo senegalensis*); 雅罗鱼亚科的 *Rhinichthys atratulus*、 *Cyprinellab latensis*、鲴亚科的鲴 (*Xenocypris* sp.) 和 亚科的翘嘴 (*Culter alburnus* Basilewsky)。

收稿日期: 2001-09-20; 修订日期: 2001-12-24

基金项目: 自然科学基金(39830050); 中国科学院重点项目(K2925 JF-044); 国家重点基础发展规划项目(G2000046804)资助

作者简介: 王绪桢(1975—), 男, 河南省罗山县人; 现从事淡水鱼类的分类及系统进化研究。瑞典国家自然历史博物馆的芳芳博士提供了本研究所用的一些珍贵标本, 在此表示衷心感谢

通讯作者: 何舜平, Email: clad@ihb.ac.cn

其中胭脂鱼在本研究中用作外类群。所有研究标本整体或肌肉组织用 95% 酒精保存。

1.2 DNA 的提取、PCR 扩增和序列测定 用酚抽提法从肌肉组织中提取总 DNA。依据 S7 基因第 1 内含子两端外显子的保守区域设计了一对引物: 5' TGGCCTCTTCCTTGGCCGTC3' 和 5' AACTCGTCTG-GCTTTTGGCC3' [6]。以总 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 条件为 94℃ 预变性 3 min, 然后 94℃ 变性 30s, 60℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 1 min 30s, 35 个循环后, 72℃ 延伸 8 min, 回收长度为 900 bp 的目的条带。DNA 序列由上海联合基因公司进行测定。

1.3 系统发育分析 应用 ClustalX 软件[7] 进行 DNA 序列排定并人工校正。使用 MEGA (Version 2. 1) 软件[8] 中的 Neighbor Joining(NJ) 法和 Most Parsimony(MP) 法来分别计算亲缘关系并构建分支系统

图, 并进行 1000 次自展(Bootstrap) 分析。

2 结果

2.1 S7 核糖体蛋白基因第 1 内含子序列

将获得的 14 种鱼类的核苷酸序列经 Clustal X 程序排列后生成了供系统发育分析的序列矩阵。当这些鱼类的 S7 基因第 1 内含子核苷酸序列根据保守区域对齐后, 我们确定了前 743 个核苷酸位点用于系统发育分析。在这 743 个排列位点中, 保守位点有 116 个; 变异位点有 592 个, 其中包括简约性信息位点 366 个和单个变异位点 217 个。物种之间的遗传距离(P-distance) 见表 1 所示。从表中可以看出, 亚科鱼类间 P 距离的变化范围为 0. 026—0. 433; 而外类群胭脂鱼和鲤科鱼类的遗传距离则从 0. 398 到 0. 519。

表1 用于研究的 13 种鲤科鱼类之间及其与外类群胭脂鱼间的遗传距离(P distance)
Tab. 1 P distance between the 13 analyzed cyprinid species and the outgroup *M. asiaticus*

Taxon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
<i>Rhinichthys</i>														
<i>Cyprinella</i>	. 119													
<i>Culter</i>	. 215	. 244												
<i>Xenocypris</i>	. 208	. 239	. 081											
<i>Opsariichthys</i>	. 253	. 293	. 139	. 159										
<i>Zacco</i>	. 251	. 288	. 147	. 160	. 026									
<i>Aphyocypris</i>	. 227	. 256	. 162	. 171	. 208	. 216								
<i>Barilius</i>	. 296	. 338	. 327	. 314	. 341	. 341	. 322							
<i>Sawbwa</i>	. 317	. 361	. 300	. 324	. 325	. 332	. 323	. 331						
<i>Labeo</i>	. 307	. 349	. 296	. 316	. 332	. 335	. 320	. 323	. 189					
<i>Puntius</i>	. 365	. 376	. 356	. 351	. 391	. 393	. 369	. 386	. 257	. 286				
<i>Myxocyprinus</i>	. 419	. 443	. 398	. 412	. 431	. 438	. 411	. 455	. 459	. 466	. 504			
<i>Danio</i>	. 389	. 420	. 388	. 403	. 420	. 417	. 398	. 433	. 421	. 418	. 437	. 519		
<i>Rasbora</i>	. 359	. 382	. 354	. 376	. 389	. 398	. 384	. 415	. 409	. 389	. 428	. 480	. 373	

2.2 分支系统图

当采用 Kimura 2-parameter Model 和 Pairwise Deletion, 利用 NJ 法 S7 基因第 1 内含子序列进行分析后得到 NJ 分支图(图 1a), 该分支图经 Bootstrap 检验(1000 次重复取样) 来测试其可信度。此外在不对简约位点进行加权的前提下, 排列后的前 743 个位点经 Pairwise Deletion 和 MP 法的 Close neighbor interchange(CNI) 处理后得到的 MP 分支图(图 1b), 其中 CI= 0. 72, RI= 0. 56。以上的分支系统图中除了

亚科鱼类外, 还包括了 亚科、野鲮亚科、雅罗鱼亚科、鲴亚科以及 亚科的种类作为比较类群。

2.3 系统发育

基于 S7 基因第 1 内含子序列的 NJ 树中, 当胭脂鱼作为外类群时, 属(*Danio*) 和波鱼属(*Rasbora*) 首先聚为一个单系群, 低线 属(*Barilius*) 则和小 属(*Puntius*)、*Sawbwa* 属、野鲮属(*Labeo*) 属聚为单系群。 亚科的细鲫属(*Aphyocypris*)、马口鱼属(*Opsariichthys*) 和 属(*Zacco*) 和鲴属(*Xenocypris*) 及 属

(*Culter*) 共同形成一个单系群; 而雅罗鱼亚科的 *Rhinichthys* 和 *Cyprinella* 构成另一单系群, 然后与前者形成姐妹群。同样在 MP 分支图(图 1b) 中, 可以发现 亚科鱼类相似的聚类结果。

从上述的分支图可以看出, 亚科的种类没有形成一个单系类群。在所研究的 亚科 6 个属中, 属、波鱼属以及低线 属和属于原始鲤科鱼类的 亚科种类同处于分支图的基部, 其余的属则在分

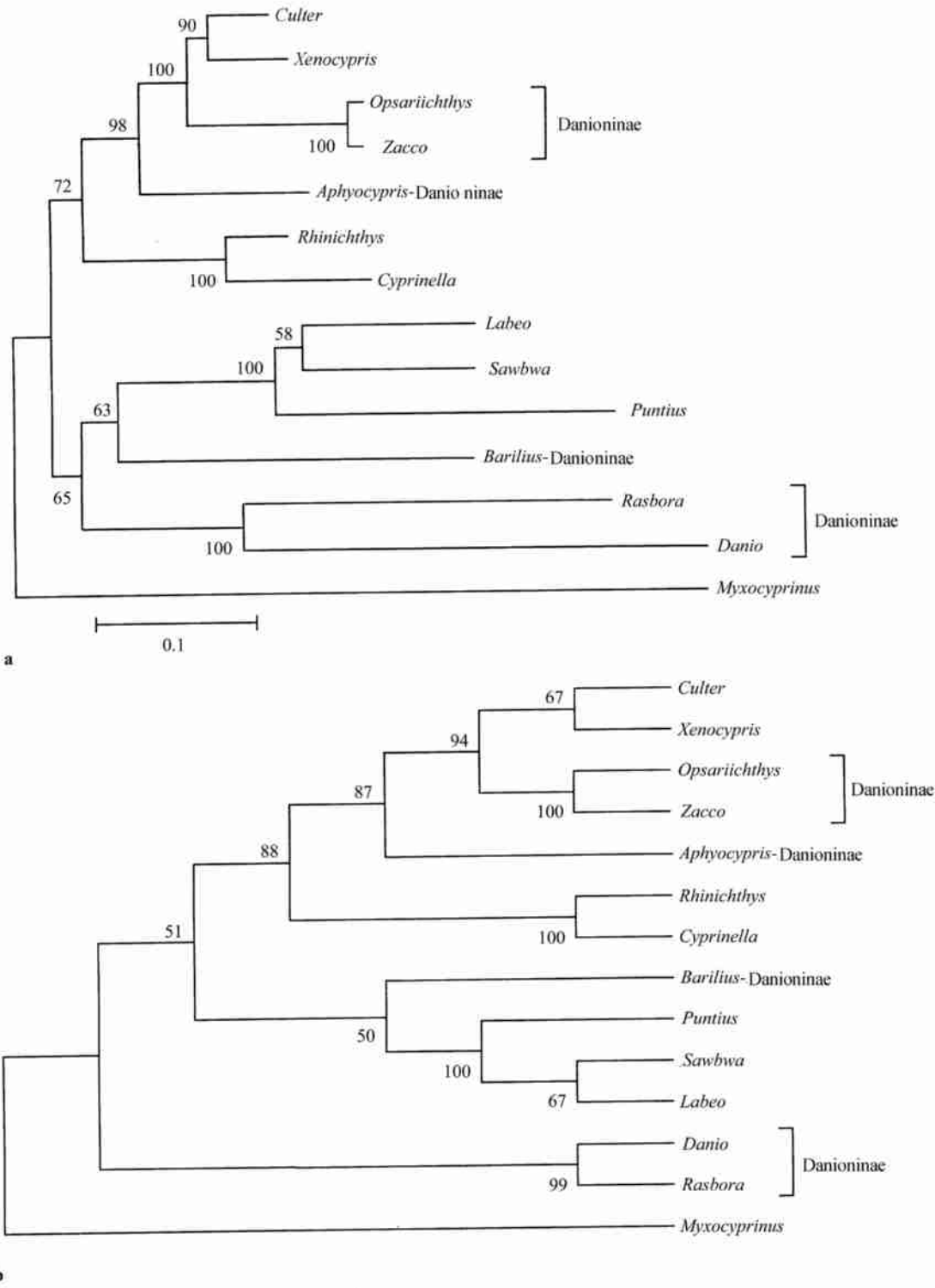


图 1 亚科鱼类的 NJ 树(a) 和 MP 树(b); 节点显示 1000 次重复抽样检验 Bootstrap 值

Fig. 1 Neighbor Joining tree (a) and Most Parsimony tree (b) of Danioninae; numbers on the node represent the 1000 replicates bootstrap values

支图中表现得相对特化并且分属不同的类群。而且在所得分支系统图中,各个节点都具有较高的 Bootstrap 支持率。

3 讨论

基于 S7 基因第 1 内含子序列变异的系统发育研究结果表明目前所确认的 亚科鱼类实际上不是一个单系类群,在其进化过程中包括了两个独立进化的类群。本研究结果只支持 属和波鱼属构成单系群,而 亚科的其他属则分别与另外一些鲤科鱼类构成单系。如果去掉 亚科以外的种类,细鲫属、马口鱼属和 属则可以形成一个单系。这样的研究结果和基于细胞色素 b 基因的系统发育研究结果有一致之处^[4]。

化石记录表明,以 亚科和 亚科鱼类为主体的鲤科鱼类区系在老第三纪一直占据着主导地位^[1],因此认为 亚科和 亚科属于低等鲤科鱼类。本研究中, 亚科的 属、波鱼属和低线 属和 亚科的种类处于分支图的基部,同时它们与研究中的其他类群间具有高度的序列变异,这也表明它们在物种分歧上经历了一个相对较长的时间尺度。

在传统分类上马口鱼类属于 亚科,而且形态上通常被认为是最低等的鲤科鱼类。然而本研究结果并不支持这样的推论,因为研究中马口鱼类、细鲫属和鲴亚科及 亚科的种类聚为一个单系群。S7 基因第 1 内含子在马口鱼属、 属、细鲫属、鲴属和 属间较高的序列相似性说明这些鱼类的物种分化时间相对短暂。

综合本研究结果,作者认为 亚科中的 属、波鱼属和低线 属属于原始的鲤科类群,它们和原始的 亚科同属于老第三纪类群的后裔。由细鲫属、

马口鱼属和 属构成的类群相对于 亚科中的原始种类起源较晚,可能和较晚起源的东亚鲤科类群之间有更为密切的关系。由于本研究所选种类的限制,该类群在鲤科中具体的系统地位尚不能明确界定,还有待于对整个鲤科鱼类进一步的系统学研究去加以解决。

参考文献:

- [1] Chen Y Y. Fauna Sinica. Osteichthyes, Cypriniformes II [M]. Beijing: Sciences Press, 1998. (陈宜瑜. 中国动物志. 硬骨鱼纲, 鲤形目. 中卷. 北京: 科学出版社, 1998.)
- [2] Howes G J. Systematics and biogeography: an overview [C]. Wirtfield I J and J S Nelson Cyprinid fishes: systematics, biology and exploitation [M]. London: Chapman and Hall, 1991, 1—33
- [3] He S P, Wang W, Chen Y Y. The RAPD analysis and the phylogenetic concerning for primitive Cyprinidae [J]. *Acta Hydrobio. Sin.* 2000, **24**(2): 101—106. (何舜平, 王伟, 陈宜瑜. 低等鲤科鱼类的 RAPD 分析和系统发育研究. 水生生物学报, 2000, **24**(2): 101—106.)
- [4] He S P, Chen Y Y, Nakajima T. Sequences of cytochrome b gene for primitive cyprinid fishes in East Asia and their phylogenetic concerning [J]. *Chin. Sci. Bull.* 2000, **45**(21): 2297—2302. (何舜平, 陈宜瑜, Nakajima T. 东亚低等鲤科鱼类细胞色素 b 基因序列测定及系统发育. 科学通报, 2000, **45**(21): 2297—2302.)
- [5] Cecconi F, Crosio C, Mariottini P, et al. A functional role for some Fugu introns larger than the typical short ones: the example of the gene coding for ribosomal protein S7 and snoRNA U17 [J]. *Nucl. Acids Res.*, 1996, **24**(16): 3167—3172
- [6] Chow S, Hazama K. Universal PCR primers for S7 ribosomal protein gene introns in fish [J]. *Mole. Ecol.*, 1998, **7**: 1255—1256
- [7] Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F. The Clustal_X windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucl. Acids Res.*, 1997, **25**: 4876—4882
- [8] Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, et al. MEGA (Molecular Evolutionary Genetic Analysis), Version 2.1 [P]. Arizona: Arizona State University, 2001

**STUDIES ON MONOPHYLY OF DANIONINE FISHES(TELEOSTEI:
CYPRINIDAE) , BASED ON SEQUENCE VARIATIONS OF THE S7
RIBOSOMAL PROTEIN GENE**

WANG Xu-Zhen and HE Shun Ping

(*Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072*)

Abstract: The S7 ribosomal protein gene was used as a DNA marker for the phylogenetic analyses of Cyprinidae in present paper. Sequences of the 1st intron of the S7 ribosomal protein gene were determined by Polymerase Chain Reaction (PCR) for 13 species of cyprinid including 6 danionine species. An alignment of 743 nucleotide sites was used in the phylogenetic studies. Out of these sites, variable sites were 592 and parsimony informative sites 366. Sequence divergence among the cyprinids analyzed ranges from 2.6% between close species to 48.0% between distant species. The cladograms were produced using Neighbor Joining method and Most-Parsimony method included in software MEGA. The present results indicate that the currently recognized Danionine fishes cannot be related as a monophyletic group. The location of *Danio*, *Rasbora* and *Barilius* closely nearing the root of the cladograms shows that they seem to be derived earlier from common cyprinid ancestor. Compared with these basal Danioninae genera, speciation of the genera *Aphyocypris*, *Zacco* and *Opsariichthys* occurred more recently and they may be closely related to the East Asian fish group.

Key words: Danioninae; The S7 ribosomal protein gene; Phylogeny; Cyprinidae