

用细胞色素 *b* 部分序列研究斑马鱼的 分子分类与系统发育*

项方^① 邹记兴^② 邓凤姣^{①**} 刘思阳^① 隋阳^①

(^①武汉大学生命科学学院发育生物学教育部重点实验室 武汉 430072; ^②中国科学院南海海洋研究所 广州 510301)

摘要: 用细胞色素 *b* 特异性引物,对长尾斑马鱼、短尾斑马鱼、豹纹斑马鱼、食蚊鱼和青石斑鱼的总 DNA 进行 PCR 扩增、克隆、测序后与 Genbank 数据库的团头鲂、青鳉鱼、草鱼、金桔鱼的细胞色素 *b* 基因同源序列进行序列比较。结果显示,长度为 426 bp 的细胞色素 *b* 同源序列的平均碱基组成是:26.7% A, 26.1% C, 16.6% G, 30.5% T, 密码子第三位点的碱基组成存在较大的偏倚,G 的含量仅占 6.4%。长尾斑马鱼、短尾斑马鱼和豹纹斑马鱼之间细胞色素 *b* DNA 序列变异很小,相似性高于 99%。NJ 法构建的分子系统树表明:豹纹斑马鱼先与长尾斑马鱼聚在一起,再与短尾斑马鱼聚为一组。本研究结果支持 Frankel 和 David 等人认为豹纹斑马鱼应该是 *Danio rerio* 的一个亚种,而不是单独的一个种的观点。

关键词: 斑马鱼;分子分类;系统发育;细胞色素 *b*

中图分类号: Q959 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2004)05-13-06

The Molecular Taxonomy and Phylogeny of Zebrafish (*Danio rerio*) Based on the Cyt-*b* Partial Sequences

XIANG Fang^① ZOU Ji-Xing^② DENG Feng-Jiao^① LIU Si-Yang^① SUI Yang^①

(^① Key Laboratory of MOE for Developmental Biology, College of Life Science, Wuhan University, Wuhan 430072;

^② Institute of Nanhai Ocean, Chinese Academy of Science, Guangzhou 510301, China)

Abstract: The taxonomy and phylogenetic relationships of zebrafish were investigated by the cyt-*b* gene partial DNA sequence analysis of mitochondria. 426 bp of cyt-*b* from *Danio rerio* (long fin), *D. rerio* (short fin), *D. rerio frankei*, *Gambusia affinis* and *Epinephelus awoara*, respectively, were cloned and sequenced. Combined with the homologous sequences of *Megalobrama amblycephala*, *Oryzias latipes*, *Ctenopharyngodon idella* and *Etroplus maculatus* from Genebank, the alignment shows that the mean base composition for partial cyt-*b* is 26.7% adenine, 26.1% cytosine, 16.6% guanine, and 30.5% thymine and that the third position of the codon have a base bias (G% is only 6.4%). The sequence similarity of *D. rerio* (long fin), *D. rerio* (short fin) and *D. rerio frankei* is above 99%. Phylogenetic trees were constructed with Neighbor Joining method. Those results collectively indicated that *D. rerio frankei* might be clustered with *D. rerio* (long fin) first, then with *D. rerio* (short fin). The results support the opinion of Frankel and David that *D. rerio frankei* belongs to a subspecies of *D. rerio* and is not an individual species.

* 国家自然科学基金资助项目(No.30370744, 30150005);

** 通讯作者, E-mail: fish4@whu.edu.cn and klzhang@whu.edu.cn;

第一作者简介 项方, 25岁,男,硕士研究生;研究方向:动物分子发育生物学。

收稿日期:2004-04-31,修回日期:2004-06-20

Key words: Zebrafish; Molecular taxonomy; Phylogeny; Cyt-*b*

斑马鱼隶属鲤科 (Cyprinidae)、丹尼尔属 (*Danio*, 曾称为 *Brachydanio*), 是一种起源于印度和巴基斯坦的小型热带鱼类。由于它具有体外受精、胚胎透明、发育迅速、操作方便等优点, 20 世纪 90 年代发展成为脊椎动物分子发育生物学研究的模式生物^[1,2]。目前实验室使用较多的是长尾斑马鱼和短尾斑马鱼, 属于 *Danio rerio* 种中的不同亚种。而豹纹斑马鱼, Meinken 于 1963 年把它定为单独的一个种, 命名为 *D. frankei*^[3]。Frankel 和 David 通过杂交实验则认为豹纹斑马鱼应该是 *D. rerio* 的一个亚种^[4,5]。那么豹纹斑马鱼究竟是一个单独的种, 还是 *D. rerio* 中的一个亚种, 至今尚无统一论。

从 DNA 水平上研究物种的分类和系统发育, 具有许多形态分类无可比拟的优点, 可避免

形态分类中趋同进化的干扰。线粒体 DNA 属母系遗传, 并具有遗传上的半自主性、分子量小、进化速度快等特点, 是一种有效的研究物种进化的分子标记。特别是线粒体上的细胞色素 *b* 基因是研究种间、种内分子进化和系统发育最有用的基因之一, 在各个分类阶元都得到运用^[6-8]。本文拟通过测定、分析线粒体细胞色素 *b* 基因的部分序列, 为从分子水平上探讨丹尼尔属中的几个品种的分子分类与系统发育。

1 材料与方法

1.1 材料 长尾斑马鱼、短尾斑马鱼、豹纹斑马鱼取自中国科学院水生生物研究所。食蚊鱼、青石斑鱼取自中国科学院南海海洋研究所。详细情况见表 1。

表 1 实验用鱼

物种	目	科
豹纹斑马鱼 <i>Danio rerio frankei</i>	鲤形目 Cypriniformes	鲤科 Cyprinidae
长尾斑马鱼 <i>D. rerio</i> (long fin)	鲤形目 Cypriniformes	鲤科 Cyprinidae
短尾斑马鱼 <i>D. rerio</i> (short fin)	鲤形目 Cypriniformes	鲤科 Cyprinidae
食蚊鱼 <i>Gambusia affinis</i>	鲈形目 Cyprinodontiformes	胎鳉科 Poeciliidae
青石斑鱼 <i>Epinephelus awoara</i>	鲈形目 Perciformes	鲷科 Serranidae
团头鲂 <i>Megalobrama amblycephala</i>	鲤形目 Cypriniformes	鲤科 Cyprinidae
青鳉鱼 <i>Oryzias latipes</i>	鲈形目 Cyprinodontiformes	青鳉科 Oryziatidae
草鱼 <i>Ctenopharyngodon idella</i>	鲤形目 Cypriniformes	鲤科 Cyprinidae
金桔鱼 <i>Etroplus maculatus</i>	鲈形目 Perciformes	慈鲷科 Cichlidae

表 1 中团头鲂、青鳉鱼、草鱼、金桔鱼 4 种鱼对应的细胞色素 *b* 的部分序列引自 Genbank, 检索号分别是: AF051867, AP004421, AF420424, AF370625

1.2 DNA 的提取和 PCR 扩增 DNA 的提取根据 Sambrook 的方法^[9], 取肌肉组织, 蛋白酶 K 消化, 苯酚、氯仿抽提, 乙醇沉淀, 洗涤后用 TE 溶液溶解备用。

用于 PCR 扩增的特异引物为 5'GAACGTTGATATGAAAAACCATCGTTG 3', 5'AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCTCA 3'。反应总体系 25 μl, 其中包括: 2.5 μl dNTPs (2.5 mmol/L), 2.5 μl (10 ×) reaction buffer, 2.5 μl MgCl₂ (25 mmol/L), 1 μl 引物 (10 mmol/L), 1 μl 模板 DNA (50 ng/μl), 1 U *Taq* DNA polymerase。PCR

反应的程序为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 1 min, 50℃ 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 30 个循环, 最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物于 1.2% 的琼胶上电泳, 紫外灯下检测。

1.3 PCR 产物的克隆与测序 PCR 产物用 Glassmilk Kit (Biostar) 纯化回收, 克隆到 pGEM-T 载体 (Promega) 上, 阳性克隆通过 PCR 筛选。以载体上的 M13 位点为测序引物, 在自动测序仪 (Applied Biosystems 377 Stretch) 上进行测序。

1.4 DNA 数据的处理和分析 DNA 序列采用 CLUSTAL W^[10] 的方法进行比对。统计多态性

核苷酸位点,计算序列间的相似百分比,对密码子三个位点的碱基变异进行 *P* 值检验。用软件 MEGA 中的 Neighbor-Joining(NJ)法作树,采用 Bootstrap 1 000 次检验系统树各分支的置信限。

2 结果

2.1 PCR 扩增

用细胞色素 *b* 基因的特异引物,分别对长尾斑马鱼、短尾斑马鱼、豹纹斑马鱼、食蚊鱼、青石斑鱼总 DNA 进行了扩增、电泳,结果见图 1。图 1 表明:5 种鱼的扩增片段大约为 500 bp,细胞色素 *b* 基因在这些物种之间不存在长度多态性。

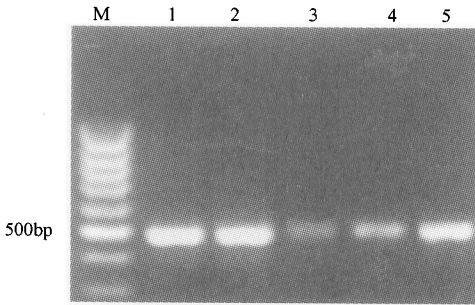


图 1 PCR 产物的电泳图谱

M:marker,100 bp ladder;1.豹纹斑马鱼;2.长尾斑马鱼;
3.短尾斑马鱼;4.食蚊鱼;5.青石斑鱼

2.2 细胞色素 *b* 部分序列的变异

分别将 5 种鱼的扩增片断(约 500 bp)的带切下来,进行克隆,每种鱼挑选两个克隆进行测序,测序重复一次。除去细胞色素 *b* 以外的序列,得到 5 种

鱼的细胞色素 *b* 的部分序列是 426 bp。为了从分子水平上说明丹尼尔属在鱼纲中的系统发育,除了上述 5 种鱼的细胞色素 *b* 部分序列外,从 GenBank 上引用了团头鲂、青鳉鱼、草鱼、金桔鱼 4 种鱼相对应的部分序列(检索号分别是:AF051867, AP004421, AF420424, AF370625)进行比较研究。通过 9 种鱼的细胞色素 *b* 基因部分序列比较分析,没有发现任何碱基的插入和缺失(图 2)。长尾斑马鱼、短尾斑马鱼及豹纹斑马鱼细胞色素 *b* 部分序列差别较小,它们之间的序列相似性高于 99%,多态性核苷酸位点只有 4 个,它们与其它鲤科鱼类的序列相似性要高于其它科目的鱼类(表 2)。

9 种鱼的细胞色素 *b* 部分序列的平均碱基组成是:26.7% A,26.1% C,16.6% G,30.5% T,有 167 个多态性核苷酸位点(39.2%)。密码子第一位点没有显示碱基组成的偏好,各个碱基的含量大体相同;第二位点的 T 的含量稍微有一点偏高(T=39.2%);但是第三位点 G 的含量明显偏低(G=6.4%),A 和 C 的含量都是 34.3%(表 3)。

2.3 分子进化和系统发育

从图 3 可以看出细胞色素 *b* 密码子的第一位点和第二位点的转换(Ts)和颠换(Tv)与遗传距离呈线性关系(图 3:A)。但是第三位点的转换与颠换与遗传距离呈没有规律的发散状(图 3:B),表明在第三位点的碱基取代的速率明显高于第一位点和

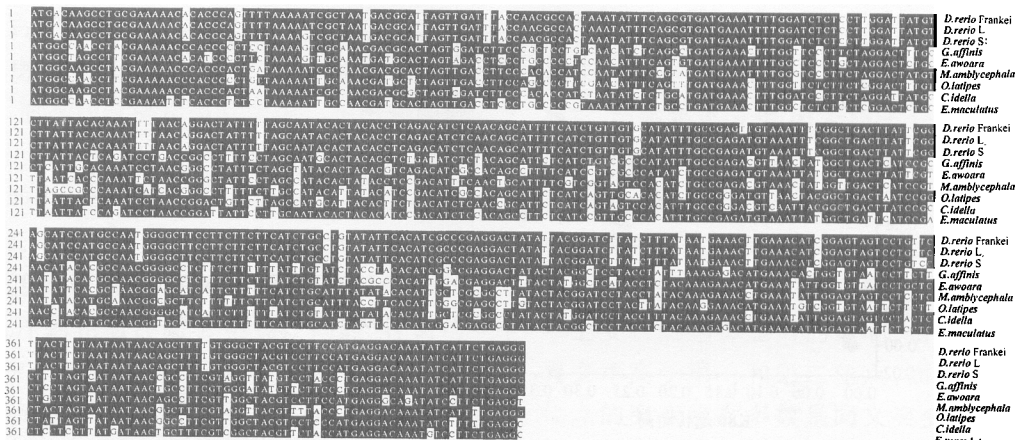


图 2 细胞色素 *b* 基因部分序列的比对

表 2 细胞色素 b 部分序列碱基相似百分比

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. 豹纹斑马鱼		99.8	99.3	71.8	74.6	76.1	69.0	76.3	72.8
2. 长尾斑马鱼			99.5	72.1	74.9	76.3	69.5	76.8	73.0
3. 短尾斑马鱼				72.3	74.9	75.6	69.0	76.1	72.1
4. 食蚊鱼					81.0	77.0	77.9	79.3	79.3
5. 青石斑鱼						76.5	78.2	75.4	79.6
6. 团头鲂							76.1	86.4	77.0
7. 青鲂鱼								73.2	76.5
8. 草鱼									76.3
9. 金桔鱼									76.3

表 3 细胞色素 b 部分序列各位点的分析

参数	第一位点	第二位点	第三位点	所有位点	第一、二位点
多态性核苷酸位点比例(%)	20.4	9.9	87.3	39.2	15.1
碱基取代的 γ 分布(α)	0.15	0.18	0.97	0.17	0.18
转换与颠换比值 $T_s/T_v(\kappa)$	4.90	3.02	9.83	4.29	3.25
碱基 A 的含量(%)	25.2	20.7	34.3	26.7	23.0
碱基 C 的含量(%)	22.0	22.1	34.3	26.1	22.1
碱基 G 的含量(%)	25.6	17.9	6.4	16.6	21.8
碱基 T 的含量(%)	27.2	39.2	25.0	30.5	33.2
碱基变异的 P 值检验	$X^2 = 18.72$	$X^2 = 1.02$	$X^2 = 45.70$	$X^2 = 25.15$	$X^2 = 3.41$
	$df = 24$	$df = 24$	$df = 24$	$df = 24$	$df = 24$
	$P > 0.05$	$P > 0.05$	$P < 0.05$	$P > 0.05$	$P > 0.05$

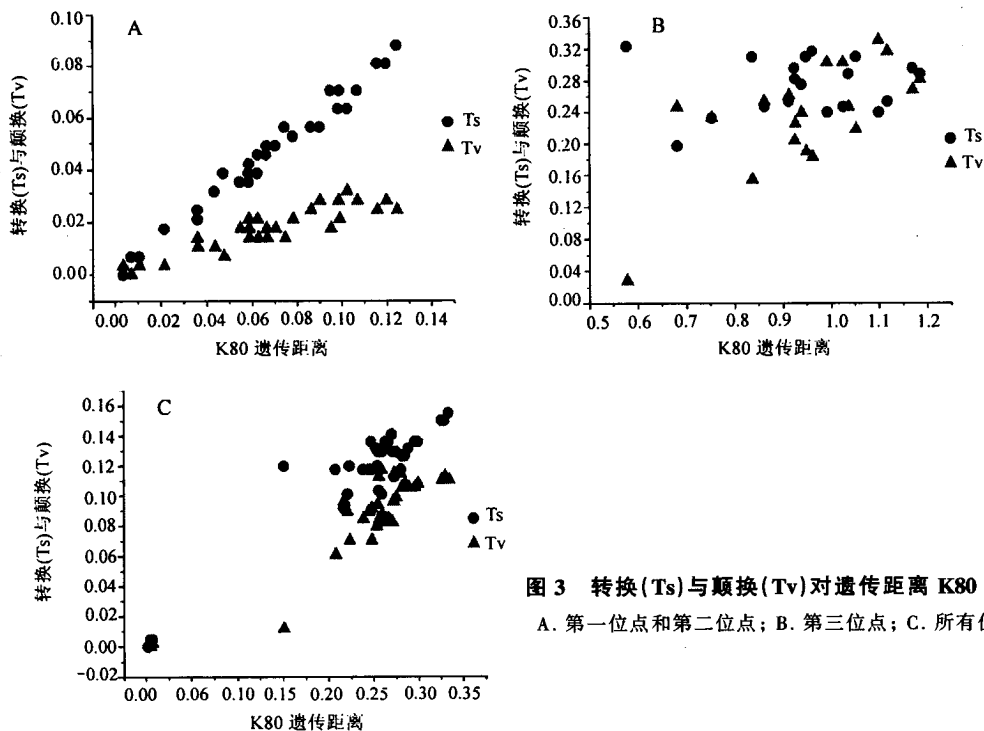


图 3 转换(Ts)与颠换(Tv)对遗传距离 K80 作图
A. 第一位点和第二位点; B. 第三位点; C. 所有位点

第二位点,并且碱基取代发生了一定程度的饱和。对于密码子的所有位点,用转换和颠换对 *k*80 遗传距离作图,由于第三位点碱基取代饱和的影响,所作的图形也是不规则的(图 3:C)。

由于在第三位点上发生的饱和取代将影响系统发育树的拓扑结构,因此在作系统树的时候

排除了密码子的第三位点。根据密码子的第一、二位点的信息作出 NJ 树(图 4)。各分支上的数字是 bootstrap 1 000 次后的置信值。从图 4 聚类可以看出:豹纹斑马鱼先与长尾斑马鱼聚类,再与短尾斑马鱼聚类到一组。斑马鱼与鲤科的草鱼、团头鲂先聚,再与其它科目聚类。

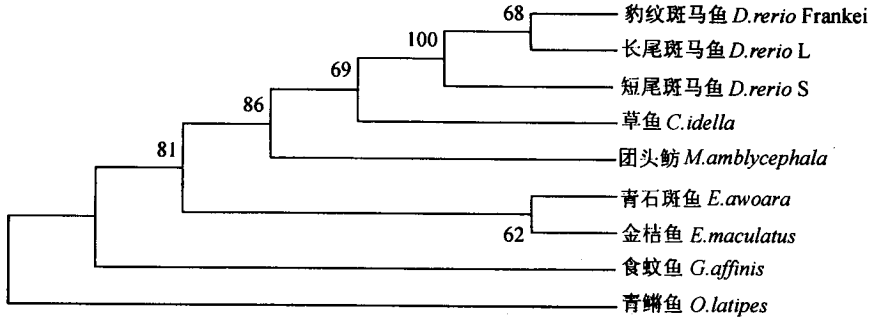


图 4 根据 Neighbor-Joining (NJ) 法作的分子进化树

各分支上的数字是 bootstrap 1 000 次后的置信值

3 讨论

3.1 斑马鱼的分子分类 斑马鱼 1822 年由 Hamilton 定为 *Danio* 属,1916 年 Weber 和 Beaufort 改名为 *Brachydanio* 属。直到 1994 年 4 月在美国冷泉港召开的关于斑马鱼发育和遗传的专门会议上才正式将斑马鱼的属名定为 *Danio* 属。长尾斑马鱼和短尾斑马鱼属 *D. rerio* 种中的不同亚种,由于豹纹斑马鱼形态上的差异(身体上有豹纹斑),Meinken 定名为另一个种 (*D. frankei*)^[3],这一观点也得到了一些学者的认同^[11]。Frankel 和 David 通过遗传杂交实验则认为豹纹斑马鱼也应该是 *D. rerio* 种的一个亚种^[5,6]。那么豹纹斑马鱼究竟是一个单独的种,还是 *D. rerio* 中的一个亚种,本研究结果与 Frankel 和 David 通过杂交实验得到结果基本一致。从长尾斑马鱼、短尾斑马鱼及豹纹斑马鱼的细胞色素 *b* 部分序列来看,它们的差别很小,并且序列相似性高于 99%。同时 NJ 树(图 4)聚类也表明豹纹斑马鱼先与长尾斑马鱼聚类,再与短尾斑马鱼聚类到一组,而不是单独的一组。因此,我们认为豹纹斑马鱼应该是 *D. rerio* 的一个亚种,而不是单独的一个种。

3.2 斑马鱼的系统发育 NJ 聚类树表明:长尾斑马鱼、短尾斑马鱼及豹纹斑马鱼同其它科目的鱼相比较,它们与同属于鲤科的草鱼、团头鲂亲缘关系最近。从细胞色素 *b* 部分同源序列的分子信息可以看出,鲤形目 (Cypriniformes) 的这几种鱼同鲈形目 (Perciformes) 的金桔鱼 (*E. maculatus*) 和青石斑鱼 (*E. awoara*)、颌针鱼目 (*Beloniformes*) 的青鳉鱼 (*O. latipes*) 及鲿形目 (Cyprinodontiformes) 的食蚊鱼 (*G. affinis*) 相比较,鲤形目同鲈形目的亲缘关系最近,这一点同传统的分类学一致^[12],说明了 NJ 树的可靠性,也从分子水平上说明了丹尼尔 (*Danio*) 属在鱼纲中的分子进化地位。

3.3 细胞色素 *b* 基因密码子分析 细胞色素 *b* 基因部分序列密码子第三位点的碱基组成存在较大的偏倚 (bias), G 的含量仅占 6.4%。这种现象在其它鱼类也有发现^[8]。对于编码有重要功能的细胞色素 *b* 基因来说,由于在 DNA 水平上受自然选择压力的影响,密码子第三位点突变率高于第一和第二位点,而且密码子第三位点的突变绝大多数是同义突变,受自然选择的压力较小,突变后容易固定 ($X^2 = 45.70$, $df = 24$, $P < 0.05$), 第一、二位点则相反 ($X^2 = 3.41$,

$df = 24, P > 0.05$)。细胞色素 *b* 基因的密码子的各个位点的碱基取代速率有快有慢, 给我们提供了不同信息含量。已经有研究评估了细胞色素 *b* 基因各位点的碱基取代速率差异以及由此产生的背景噪音对分子系统发育树的影响^[13, 14]。本研究的结果也表明细胞色素 *b* 基因密码子各个位点的 κ 值(T_s/T_v)、变异位点的比例、 α 值是不同的(表 3)。在第一位点和第二位点相对较小的 α 值说明这两个位点上的大多数位置的碱基取代的速率相对较低或者是不变, 只有少数的位置是有相对较高的碱基取代速率。在第三位点上有相对较高的 α 值说明第三位点上的大多数位置有一个中间速率的碱基取代速率, 而少数位置有很高或者很低的速率。第三位点的 κ 值也比第一、二位点的大, 这些特征也可以在位点饱和性分析中看到(图 3)。

参 考 文 献

[1] Concordet J P, Ingham P. Catch of the decade. *Nature*, 1994, **369**:19 ~ 20.

[2] Kahn P. Zebrafish hit the big time. *Science*, 1994, **264**:904 ~ 905.

[3] Meinken H. Mitteilungen der Fischbestimmungsstelle des VDA XLII; *Brachydanio frankei* spec nov der Leopard-Danio. *Monatsschr Ornithol Vivarienknd*, 1963, **1**:39 ~ 43.

[4] Frankel J S. Inheritance of spotting in the Leopard *Danio*. *J Hered*, 1979, **70**(2):287 ~ 288.

[5] David M Parichy, Stephen L Johnson. Zebrafish hybrids suggest genetic mechanisms for pigment pattern diversification in *Danio*. *Dev Genes Evol*, 2001, **211**:319 ~ 328.

[6] Meyer A. Evolution of mitochondria DNA in fishes. *Biochem and Mol Bio of Fishes*, 1993, **2**:1 ~ 38.

[7] Tsigenopoulos C S, Berrebi P. Molecular phylogeny of North Mediterranean freshwater barbs inferred from cytochrome *b* sequences: biogeographic and systematic implications. *Mol Phy Evol*, 2000, **14**:165 ~ 179.

[8] Esposti D M, De V S, Crimi M, et al. Mitochondrial cytochrome *b*: evolution and structure of the protein. *Biochim Biophys Acta*, 1993, **1143**:243 ~ 271.

[9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor laboratory Press, 1989.

[10] Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22**:4 637 ~ 4 680.

[11] Fang F. *Danio kyathit*, a new species of cyprinid fish from Myitkyina, northern Myanmar. *Ichthyol Explor Freshwaters*, 1998, **2**:273 ~ 280.

[12] Chen J S. *The Evolvement and Taxonomy of Fishes*. Guangzhou: Guangdong Technology Press, 1984.

[13] Bjorklund M. Are third position really that bad? A test using vertebrate cytochrome *b*. *Cladistics*, 1999, **15**:191 ~ 197.

[14] Prychitko T M, Moore W S. Comparative evolution of the mitochondrial cytochrome *b* gene and nuclear β -fibrinogen intron 7 in woodpeckers. *Mol Biol Evol*, 2000, **17**:1 101 ~ 1 111.