

鲾科 10 种鱼类核糖体 ITS2 序列比较分析

杨敏^{①②} 孔晓瑜^{①*} 时伟^① 龚理^③

① 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室, 中国科学院南海海洋研究所 广州 510301; ② 中国科学院大学 北京 100049;

③ 浙江海洋大学国家海洋设施养殖工程技术研究中心, 海洋科学与技术学院 舟山 316022

摘要: 为了解鲾科鱼类 ITS2 序列的多态性特征, 本研究获得了鲾科 10 种鱼类 310 条 ITS2 序列, 长度在 419 ~ 486 bp 之间。种内序列长度差异最小的为粒鲾 (*Clidoderma asperrima*) (419 ~ 420 bp) 和太平洋拟庸鲾 (*Hippoglossoides elassodon*) (419 ~ 420 bp), 其次为北岩鲾 (*Lepidopsetta polyxystra*) (447 ~ 452 bp) 和刺黄盖鲾 (*Limanda aspera*) (457 ~ 463 bp), 松木高眼鲾 (*Cleisthenes pinetorum*) (452 ~ 462 bp) 和圆斑星鲾 (*Verasper variegatus*) (465 ~ 479 bp) 的种内序列差异分别为 10 bp 和 14 bp; 其余 4 种鱼类根据长度差异 (14 ~ 32 bp) 分型为长 (A 型)、短 (B 型) 序列类型, 同时检测存在重组类型 (R 型), 其中长度差异最大的是钝吻黄盖鲾 (*Pseudopleuronectes yokohamae*) (454 ~ 486 bp), 其次为尖吻黄盖鲾 (*P. herzensteini*) (433 ~ 458 bp)、虫鲾 (*Eopsetta grigorjewi*) (420 ~ 439 bp)、星突江鲾 (*Platichthys stellatus*) (466 ~ 480 bp)。通过双参数模型 (K2P) 计算遗传距离可见, 种内遗传距离多集中于 0.002 ~ 0.027 之间, 仅星突江鲾和尖吻黄盖鲾因类型差异导致较高数值 (0.043 和 0.053); 不同物种间遗传距离在 0.046 ~ 0.180 之间。10 种鱼类 ITS2 的 GC 含量为 63.95% ~ 70.16%; 9 种鱼类的二级结构均为具有 5 个分支 (Helix I ~ V) 的闭合环状结构, 仅圆斑星鲾中由于存在 Helix IV 变异形成 Helix IV-a 和 Helix IV-b 而具有 6 个分支。基于 ITS2 构建的鲾科 10 种鱼类的系统进化树显示, 不同种鱼类的克隆序列均单独聚支。序列的多态性特征分析表明, 在具有不同序列类型的虫鲾、星突江鲾、尖吻黄盖鲾和钝吻黄盖鲾 4 种鲾科鱼类中, ITS2 以非协同进化的方式存在, 而其他 6 种鱼类为协同进化; 虽然存在种间 K2P 遗传距离小于种内的个例, 但 ITS2 在属间不同物种的区分上具有适用性。本研究结果丰富了鲾形目鱼类的 ITS2 数据, 也将为鱼类的核糖体 RNA 序列多态性的研究提供科学依据。

关键词: 鲾科; ITS2; 多态性; 二级结构; 协同进化; 非协同进化

中图分类号: Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2018) 06-938-13

Comparative Analysis of Ribosomal ITS2 Sequences in 10 Species of Pleuronectidae

YANG Min^{①②} KONG Xiao-Yu^{①*} SHI Wei^① GONG Li^③

① CAS Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences,

基金项目 国家自然科学基金项目 (No. 31272273);

* 通讯作者, E-mail: xykong@scsio.ac.cn;

第一作者介绍 杨敏, 女, 博士研究生; 研究方向: 鱼类分类及系统进化; E-mail: minyang@scsio.ac.cn.

收稿日期: 2018-04-16, 修回日期: 2018-08-24 DOI: 10.13859/j.cjz.201806012

Guangzhou 510301; ② University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049; ③ National Engineering Research Center for Facilitated Marine Aquaculture, Marine Science and Technology College, Zhejiang Ocean University, Zhoushan 316022, China

Abstract: The main objective of this study was to better understand the characteristics of ITS2 sequence polymorphism in Pleuronectidae species. We cloned and sequenced ITS2 fragments in 10 species of Pleuronectidae, and then performed further analyses, including analysis of polymorphic statistics, calculation of Kimura-2-parameter (K2P) genetic distances, prediction of secondary structure and minimum free energy, and determination of recombinants. Finally, the phylogenetic relationship among different species was constructed by Maximum likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) method with *Bothus myriaster* as outgroup species. A total of 310 sequences were obtained from 10 species of Pleuronectidae. Among 6 of 10 species, *Clidoderma asperrima* (419 - 420 bp) and *Hippoglossoides elassodon* (419 - 420 bp) have the lowest variation in length, comparing to *Lepidopsetta polyxystra* (447 - 452 bp) and *Limanda aspera* (457 - 463 bp) with 5 bp and 6 bp variations, and *Cleisthenes pinetorum* (452 - 462 bp) and *Verasper variegatus* (465 - 479 bp) with 10 bp and 14 bp variations. For other four species, the biggest length variation of each species is 14 - 32 bp, resulting in longer, shorter or recombinant sequence types that are classified as types A, B and R. The biggest length variation occurs in *Pseudopleuronectes yokohamae* (454 - 486 bp), then *Ps. herzensteini* (433 - 458 bp), *Eopsetta grigorjewi* (420 - 439 bp), and *Platichthys stellatus* (466 - 480 bp) (Table 1). The K2P genetic distances of intra-species ranges from 0.002 to 0.027, except the high values in *Pl. stellatus* and *Ps. herzensteini*, up to 0.043 and 0.053, respectively; while the genetic distance of inter-species ranges from 0.046 to 0.180 (Table 2). The GC contents of ITS2 in the 10 species range from 63.95% to 70.16% (Table 1). The secondary structure has a uniform loop structure with five branches Helix I - V, except for *V. variegatus* with Helix IV-a and IV-b (Fig. 2). The phylogenetic trees constructed based on ITS2 sequences of 10 Pleuronectidae species show that the different clones of each species are clustered together (Fig. 3). According to the ITS2 sequence polymorphism characteristics, these four species *Ps. yokohamae*, *Ps. herzensteini*, *E. grigorjewi*, and *Pl. stellatus* with different types may be evolved in non-concerted evolution, while the other six species in concerted evolution. Although the K2P genetic distance of intra-species has overlap with that of inter-species, ITS2 is considered to be applicable for species identification among these species. The results of this study will enrich the ITS2 data of flatfish, and further provide a scientific reference for the researches on ribosomal RNA polymorphism of teleostean fishes.

Key words: Pleuronectidae; ITS2; Polymorphism; Secondary structure; Concerted evolution; Non-concerted evolution

真核生物核糖体 RNA 基因 (nuclear ribosomal DNA, nrDNA) 为串联重复的多基因家族, 包括 3 个核糖体 RNA 编码基因 18S rDNA、5.8S rDNA、28S rDNA 和 2 个位于编码基因之间的非编码区内转录间隔区 (internal transcribed spacer, ITS), 即 ITS1 和 ITS2 (Gerbi 1986)。

ITS2 序列作为非编码区具有较小的选择压力, 进化速率相对较快, 在种间能够提供较多的信息位点; 同时由于 nrDNA 重复单元以协同进化 (concerted evolution) 的方式存在于种内, 使得 ITS2 序列在种内存在较小的差异而在不同的物种间存在较大的差异 (Gerbi 1986, Liao 1999), 因此, ITS2 序列适用于种属鉴定

的研究中 (Yao et al. 2010, Marinho et al. 2012, Schoch et al. 2012, Edger et al. 2014)。Yao 等 (2010) 明确了 ITS2 序列在植物和动物物种鉴定中的适应性, 发现在属水平上鉴定的成功率均达到 97.9% 以上, 并且在动物 28 个属内的种类 (每个属 20 ~ 79 个种类) 鉴别时成功率在 73.8% ~ 100% 之间, 具有较高的鉴别效率。在鱼类 ITS2 序列的研究中, 袁万安 (2010) 通过对鲤形目 5 种鱼类的 ITS2 序列分析, 得到具有物种特异性的条带, 认为 ITS2 序列可以应用于物种鉴别。

随着对核糖体基因研究的深入, 发现当种内基因同质化的速率小于序列变异的速率时, 基因不同拷贝之间出现序列间的异质性 (heterogeneity), 导致基因非协同进化 (non-concerted evolution) 的进化方式 (Zheng et al. 2008, Li et al. 2013)。Gong 等 (2016) 对桑给巴尔舌鳎 (*Cynoglossus zanzibarensis*) ITS2 序列的研究, 发现 3 种序列类型在长度和 GC 含量上存在显著的差异, A 型序列长 497 bp, GC 含量 75.3% ~ 76.1%, B 型序列长 319 bp, GC 含量 73.4% ~ 74.6%, 重组产生的重组子 (recombinant) C 型序列长 323 bp, GC 含量 74.9%。其结果支持了在桑给巴尔舌鳎中 ITS2 遵循非协同进化模式。核糖体 RNA 基因的序列多态性有时会导致系统关系的混乱 (Bailey et al. 2003, Shapoval et al. 2015), Redmond 等 (2009) 测定了 7 种海绵 (Haplosclerida) 的 ITS1-5.8S-ITS2 序列, 发现其具有明显的种内差异, 尤其是 *Haliclona cinerea* 的 3 个个体分别单独聚为一支, 分散在系统树中, 从而得出 ITS1-5.8S-ITS2 序列并不适用于海绵系统研究的结论。

ITS2 的二级结构在核糖体 RNA 成熟过程中起到指导剪切作用, 具有非常保守的结构区域, 为相关核酸内切酶提供了识别位点 (Fromm et al. 2017)。Schultz 等 (2009)、Joseph 等 (1999) 以及 Coleman (2007, 2015) 比较了真菌、植物、脊椎动物等真核生物的 ITS2 二级结构, 发

现均具有多分支闭合环状结构及特征: 有 Helix I ~ IV 稳定的螺旋分支, 其中 Helix III 相对较长和偶有分支, Helix IV 是较短且变化最大的区域; 同时在 Helix II 和 III 之间还存在保守的单链序列, 并且在 Helix III 的茎区上也存在保守的酶切识别位点。

目前鱼类中对于 ITS2 序列的研究, 见于 Joseph 等 (1999) 对鲤形目、鲈形目和软骨鱼类几个代表物种的 ITS2 序列二级结构的研究以及袁万安 (2010) 在鲤形目 5 种鱼类中的研究, 而同样隶属于硬骨鱼类的鲽形目 ITS2 序列的报道仅出现在对桑给巴尔舌鳎 (Gong et al. 2016) 和黑颊无线鳎 (*Symphurus plagiusa*) (Gong et al. 2018) 的研究中。因此, 本研究选择了鲽科 9 属 10 种代表鱼类 (表 1), 分析了这些鱼类 ITS2 序列多态性特征, 并探究该序列在物种鉴定中的适用性, 以期丰富鲽形目鱼类 ITS2 的研究, 为今后鱼类的核糖体 RNA 序列多态性的研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

研究所用 9 属 10 种鲽科鱼类 (表 1) 的 19 个样品中, 松木高眼鲽 (*Cleisthenes pinetorum*) 1 尾采集于江苏盐城, 星突江鲽 (*Platichthys stellatus*) 1 尾采集于广西北海, 其他样品均采集于山东青岛市场, 样品用冰盒带回实验室, 鉴定后取背部肌肉组织约 20 ~ 30 mg 于 -20 °C 保存。

1.2 DNA 提取及 PCR 扩增和测序

将保存的肌肉组织使用天根海洋动物基因组提取试剂盒 [TIANamp Marine Animals DNA kit, 天根生化科技 (北京) 有限公司] 提取总 DNA, 最后用双蒸水溶解, 保存于 -20 °C 冰箱中。参考 Xu 等 (2009) 和 Gong 等 (2016) 的研究, 设计两对扩增引物 ITS1F/ITS2R 和 ITS2F/ITS2R, 引物序列分别为, ITS1F 5'-TCG CTA CTA CCG ATT GGA TGG TTT A-3', ITS2F 5'-CAA CTC TTA GCG GTG GAT CA-3' 和

ITS2R 5'-GCT CTT CCC TCT TCA CTC G-3'。PCR 反应总体积为 25 μ l, 包括 2.0 mmol/L MgCl₂, 0.4 mmol/L dNTP[宝生物工程(大连)有限公司], 每个引物 0.5 μ mol/L, 1.0 U *rTaq* 酶[宝生物工程(大连)有限公司], 2.5 μ l 10 \times Taq buffer 缓冲液, 50 ng 模板 DNA, 灭菌双蒸水补足至 25 μ l。前期预实验中发现, ITS2 具有较高的 GC 含量, 在反应体系中加入 8% 的二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)变性剂, 以利于提高 GC 含量较高序列的扩增效率(Kitade et al. 2003)。反应在 ABI Veriti 96 孔梯度 PCR 仪(USA)中进行。PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 50 $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1~2.5 min, 35 个循环, 后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶片段回收, 连接 pMD19-T 载体[宝生物工程(大连)有限公司], 转入大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态细胞 DH5 α , 扩大培养后菌液摇匀后取 100~200 μ l 涂布于 LB 营养琼脂平板(含氨苄青霉素 ampicillin, 100 μ g/ml), 将平板倒置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱中培养 12~14 h, 挑取并检测阳性克隆, 由上海英潍捷基公司使用 ABI 3730 DNA 测序仪(Applied Biosystems, USA)进行双向测序。

1.3 数据分析

测定的克隆序列进行 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST/>) 检索, 根据两端 5.8S 和 28S 序列与已有鲽形目鱼类序列的相似性确定目的片段。获得 310 条序列, 其 Genbank 号为 MH204213 ~ MH204273、MH204275 ~ MH204292、MH204294 ~ MH204446、MH204448 ~ MH204526。应用软件 CodonCode Aligner 6.0.2、ClustalX 2.1 (Larkin et al. 2007) 和 Bioedit 7.0.1 (Hall 1999) 进行拼接、比对并辅以手工校对, 得到完整的 ITS2 序列; 使用 MEGA 6.0 (Tamura et al. 2013) 统计碱基含量、变异位点和简约信息位点, 应用 DNAsp5.0 (Librado et al. 2009) 统计单倍型及单倍型多样性、核苷酸多样性, 平均核苷酸

变异数; 在线网站 (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) 预测 ITS2 序列的二级结构和最小自由能, 参数设置为默认值, 并应用 VARNA (Darty et al. 2009) 对预测所得二级结构图进行调整; 应用软件 RDP4.85 (Martin et al. 2015) 检测重组片段, 设置默认参数值(检测步长 20 bp, 置信重复 100 次等), 并辅以序列比对和人工校对。

选取鲆科鱼类繁星鲆(*Bothus myriaster*) 为外群(outgroup), 序列 Genbank 号 MH509948 ~ MH509956, 应用 MEGA 6.0 最大似然法(maximum likelihood, ML), 采用双参数模型(Kimura-2-parameter, K2P), 设置 Bootstrap = 1 000, 构建 ML 树; 应用 MrBayes v2.0 进行贝叶斯推断分析(Bayesian inference, BI) (Huelsenbeck et al. 2001), 最适进化模型在 MrModeltest 2.2 (Nylander et al. 2004) 24 个模型中依据 AIC (Akaike information criterion) 准则, 选择最适参数模型 GTR + G, 蒙特马科链(Metropolis-coupled Markov chain Monte Carlo, MCMC) 起始于随机树, 运行 200 万代, 每 100 代取样一次, 同时运行 3 条热链、1 条冷链, 为了检测运行是否稳定, 贝叶斯推断同时进行 3 次, 并观测是否存在差异; “Burnin” 数值设定为 5 000, 每个分支的后验概率值由 3 次独立运行综合归纳取得贝叶斯推断树。

2 实验结果

2.1 ITS2 序列特征多态性

本研究得到 10 种鲽科鱼类 ITS2 共 310 条克隆序列, 序列长度在 419~486 bp 之间, 表现出不同程度的种间长度异质性(表 1, 图 1)。同时, 种内序列长度也存在变异。粒鲽(*Clidoderma asperrima*) 和太平洋拟庸鲽(*Hippoglossoides elassodon*) 种内变异最小, 仅为 1 bp, 松木高眼鲽、北岩鲽(*Lepidopsetta polyxystra*)、刺黄盖鲽(*Limanda aspera*) 以及圆斑星鲽(*Verasper variegatus*) 序列长度差异在 4~14 bp 之间(表 1)。位点的插入/缺失以

表 1 10 种鲾科鱼类 ITS2 序列特征信息

Table 1 The information of ITS2 sequence characteristics in 10 species of Pleuronectidae

种名 Species	个体数 Individual	序列类型 Type	克隆数 Clone number	长度 (bp) Length	保守位点 Conserved site	变异位点 Variable site	简约位点 Parsimony informative site	GC 含量 (%) GC content	单倍型 Haplotype	单倍型 多样性 Haplotype diversity	核苷酸 多样性 Nucleotide diversity	平均核苷 酸差异 Nucleotide difference
粒鲾 <i>Clidoderma asperrima</i>	2	-	32	419 - 420	388	32	4	65.71 - 66.11	23	0.909 3	0.005 46	2.282
松木高眼鲾 <i>Cleisthenes pinetorum</i>	2	-	29	452 - 462	426	37	3	67.75 - 69.41	24	0.972 9	0.007 63	3.434
北岩鲾 <i>Lepidopsetta polyxystra</i>	1	-	11	447 - 451	449	5	1	66.52 - 66.96	8	0.955 6	0.003 05	1.356
刺黄盖鲾 <i>Limanda aspera</i>	1	-	11	457 - 463	433	30	7	64.72 - 65.37	11	1.000 0	0.014 96	6.836
太平洋拟庸鲾 <i>Hippoglossoides elassodon</i>	1	-	37	419 - 420	383	37	2	66.90 - 68.02	21	0.837 8	0.005 15	2.141
圆斑星鲾 <i>Verasper variegatus</i>	2	-	29	465 - 479	451	25	2	64.90 - 65.89	19	0.940 9	0.004 74	2.185
	2	A	34	434 - 439	404	36	9	68.20 - 70.16	28	0.982 2	0.009 30	4.018
虫鲾 <i>Eopsetta grigorjewi</i>	-	B	8	420 - 422	416	6	0	68.48 - 68.72	5	0.785 7	0.003 58	1.500
	-	总克隆 Total	42	420 - 439	398	42	9	68.20 - 70.16	33	0.981 4	0.008 54	3.561
	3	A	3	456 - 458	454	4	0	66.38 - 66.89	3	1.000 0	-	-
尖吻黄盖鲾 <i>Pseudopleuronectes herzensteini</i>	-	B	45	434 - 439	403	36	9	66.51 - 67.43	26	0.950 5	0.008 05	3.477
	-	R	1	433	-	-	-	65.82	1	1.000 0	-	-
	-	总克隆 Total	49	433 - 458	412	52	23	66.38 - 67.43	30	0.958 3	0.011 48	4.913
	2	A	25	480 - 486	458	28	2	66.80 - 67.50	24	0.996 7	0.004 70	2.227
钝吻黄盖鲾 <i>P. yokohamae</i>	-	B	6	454 - 457	454	3	0	66.59 - 67.18	5	0.933 3	0.002 22	1.000
	-	总克隆 Total	31	454 - 486	458	30	2	66.59 - 67.50	29	0.995 7	0.004 18	1.858
	3	A	40	475 - 480	432	50	5	67.16 - 68.28	37	0.994 9	0.007 30	3.469
星突江鲾 <i>Platichthys stellatus</i>	-	B	1	466	-	-	-	63.95	-	-	-	-
	-	总克隆 Total	41	466 - 480	415	68	5	63.95 - 68.28	38	0.995 1	0.009 18	4.261

- 表示该处不分类型或者无数值。 - Denotes no types or no value.

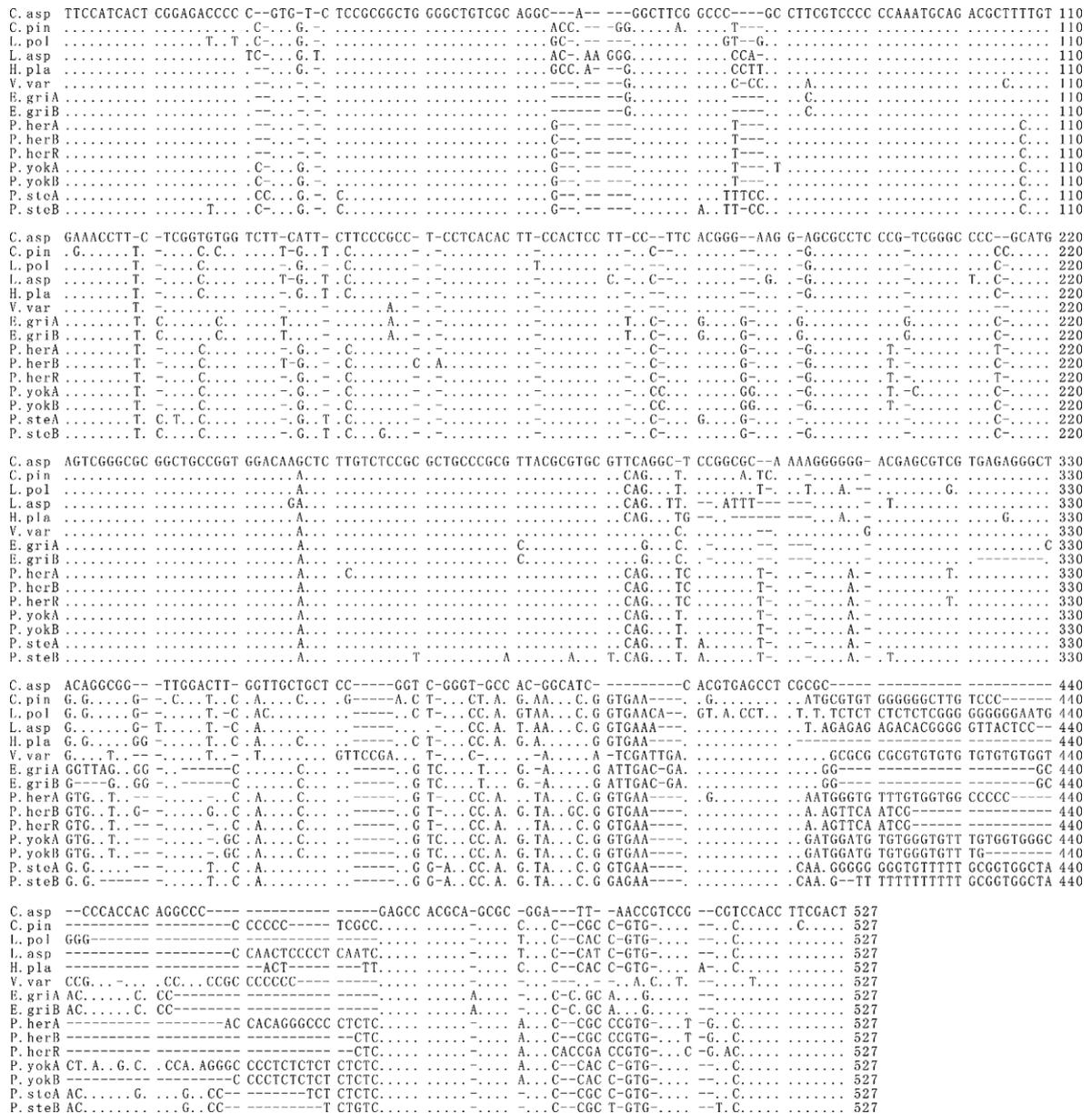


图 1 10 种鲽科鱼类 ITS2 序列比对

Fig. 1 Sequence alignments of ITS2 in 10 Pleuronectidae species

图中左侧缩写代表物种: C. asp. 粒鲽; C. pin. 松木高眼鲽; L. pol. 北岩鲽; L. asp. 刺黄盖鲽; H. ela. 太平洋拟庸鲽; V. var. 圆斑星鲽; E. gri. 虫鲽; P. her. 尖吻黄盖鲽; P. yok. 钝吻黄盖鲽; P. ste. 星突江鲽; 名称之后的字母 A、B、R 代表序列类型。

Abbreviations in the left side of the figure present species name as following: C. asp. *Clidoderma asperrima*; C. pin. *Cleisthenes pinetorum*; L. pol. *Lepidopsetta polyxystra*; L. asp. *Limanda aspera*; H. ela. *Hippoglossoides elassodon*; V. var. *Verasper variegatus*; E. gri. *Eopsetta grigorjewi*; P. her. *Pseudopleuronectes herzensteini*; P. yok. *P. yokohamae*; P. ste. *Platichthys stellatus*; Capital letter A, B and R followed the names presents the sequence type.

及微卫星拷贝数差异是造成序列长度差异的主要原因, 不同鱼类的微卫星存在种类及重复数

的差异: 北岩鲽 (TC)₈₋₁₀, 刺黄盖鲽 (GA)₅₋₆ 和松木高眼鲽中 (GC)₂₋₃ 为单一类型的微卫星

星, 圆斑星鲈则存在 3 种微卫星类型 (CG)₆₋₇、(TG)₅₋₉ 和 (CCCCCG)₂₋₃ (图 1)。

星突江鲈、虫鲈 (*Eopsetta grigorjewi*)、尖吻黄盖鲈 (*Pseudopleuronectes herzensteini*) 以及钝吻黄盖鲈 (*P. yokohamae*) 的 ITS2 序列长度差异明显, 其中长序列类型为 A 型, 短序列类型为 B 型, 本研究将重组产生的重组子命名为 R 型 (表 1, 图 1): 虫鲈中 A 型 (433 ~ 439 bp) 和仅存在于 1 尾个体中的 B 型 (420 ~ 422 bp) 有 12 bp 的缺失; 星突江鲈也存在 A 型 (475 ~ 480 bp) 和只有 1 尾个体由于 20 bp 位点缺失和 5 bp 位点插入导致的 B 型 (466 bp); 尖吻黄盖鲈的 3 尾个体中, 存在 34 bp 插入导致的 A 型 (456 ~ 458 bp) 以及 B 型 (433 ~ 439 bp), 同时还发现了由 A 型和 B 型重组产生的 R 型 (433 bp); 比较发现, 尖吻黄盖鲈只在 1 尾个体内同时存在上述 3 种片段类型, 其余 2 尾个体只有 B 型; 在钝吻黄盖鲈的 2 尾个体内均有 A 型 (480 ~ 486 bp) 和 B 型 (454 ~ 457 bp), 两类型间的长度差异是由于 B 型中 29 bp 的片段缺失以及序列中有 1 处微卫星 (TC)₅₋₇ 导致的。

计算鲈科 10 种鱼类 ITS2 序列的种内和种间 K2P 遗传距离 (表 2)。种内遗传距离普遍在 0.002 ~ 0.027 之间, 仅在星突江鲈和尖吻黄盖鲈中分别达到了 0.043 和 0.053; 分别计算星突江鲈与尖吻黄盖鲈中不同序列类型内的遗传距离, 最高值分别为 0.019 和 0.026。种间遗传距离尖吻黄盖鲈与钝吻黄盖鲈间最低 (0.046), 其他物种间在 0.049 ~ 0.180 之间。比较种内和种间遗传距离发现, 尖吻黄盖鲈和钝吻黄盖鲈的种间遗传距离低于尖吻黄盖鲈种内遗传距离。

ITS2 序列的碱基组成在种内和种间均表现出明显的 GC 偏倚 (表 1), GC 含量 (63.95% ~ 70.16%) 远高于 AT 含量, 碱基含量由高到低为 C (33.84% ~ 37.81%)、G (29.44% ~ 33.63%)、T (18.45% ~ 22.32%)、A (11.39% ~ 14.29%)。星突江鲈、虫鲈、尖吻黄盖鲈以及

钝吻黄盖鲈 4 种鱼类中, 种内不同序列类型间 GC 含量没有明显的变异 (表 1)。

本研究中 9 种鲈科鱼类 ITS2 序列在种内的变异位点多为单碱基突变位点 (> 76.7%), 仅在尖吻黄盖鲈中单碱基突变位点较少 (55.8%), 而具有较高的简约信息位点。单倍型多样性指数, 太平洋拟庸鲈为 0.837 8, 虫鲈的短序列类型为 0.785 8, 其余 9 种鲈科鱼类单倍型多样性指数均高于 0.900 0。核苷酸多样性指数刺黄盖鲈中最高 (0.014 96), 其他 9 种鱼类以及不同类型内的核苷酸多样性指数在 0.003 05 ~ 0.114 80 之间。平均核苷酸差异数最高也出现在刺黄盖鲈 (6.836), 最低则为钝吻黄盖鲈 (1.858), 其他鱼类以及不同序列类型均在此范围内。

2.2 ITS2 序列二级结构及最小自由能预测与分析

对 10 种鱼类 ITS2 (包括种内不同序列类型) 进行了二级结构与最小自由能预测, 并参考已有研究中的模型进行人工校对, 得到 ITS2 与 5.8S rDNA 的 3'端以及 28S rDNA 的 5'端序列相互作用而共同形成多分支闭合环状结构 (multi-branched loop structure)。9 种鱼类的闭合环上均具有 5 个分支 (Helix) 结构 I ~ V, 圆斑星鲈在 Helix IV 位置上存在分支, 形成 Helix IV-a 和 Helix IV-b 的结构 (图 2)。

在所有 ITS2 序列的二级结构中, Helix I、II 以及 III 的两个分支的端凸 (terminal bulge) 均具有统一的单链序列, 分别为 CCCG、TTCG、TCAC 和 ACTC; 同时, 发现了位于分支 Helix II 和 Helix III 之间的 “CAGAC” 和在 Helix III 的 5'端茎区结构上的 “CCGGTGGGA” 两个保守序列。10 种鲈科鱼类 ITS2 序列的比对 (图 1) 显示, 不同种间在 5'端具有较高的保守性, 而在 3'端则表现出较高的差异, 这与 Helix I ~ III 结构的保守性相吻合, Helix IV 和 Helix V 的变异也与序列上变异最显著的区段相对应。此外, 比较星突江鲈、虫鲈、尖吻黄盖鲈以及钝吻黄盖鲈种内不同序列类型的 ITS2 的二级

表 2 10 种鲷科鱼类 ITS2 序列种内及种间 K2P 遗传距离

Table 2 The Kimura-2-parameter genetic-distance of ITS2 sequence within and between 10 species of Pleuronectidae

物种 Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1 粒鲷 <i>Clidoderma asperrima</i>	0.002 ~ 0.017									
2 松木高眼鲷 <i>Cleisthenes pinetorum</i>	0.128	0.002 ~ 0.020								
3 北岩鲷 <i>Lepidopsetta polyxystra</i>	0.135	0.103	0.002 ~ 0.007							
4 刺黄盖鲷 <i>Limanda aspera</i>	0.136	0.112	0.129	0.004 ~ 0.027						
5 太平洋拟庸鲷 <i>Hippoglossoides elassodon</i>	0.098	0.050	0.054	0.062	0.002 ~ 0.022					
6 圆斑星鲷 <i>Verasper variegatus</i>	0.049	0.144	0.176	0.180	0.114	0.002 ~ 0.019				
7 虫鲷 <i>Eopsetta grigorjewi</i>	0.087	0.137	0.176	0.147	0.114	0.110	0.002 ~ 0.024			
8 尖吻黄盖鲷 <i>Pseudopleuronectes herzensteini</i>	0.107	0.075	0.079	0.089	0.053	0.140	0.133	0.002 ~ 0.053		
9 钝吻黄盖鲷 <i>P. yokohamae</i>	0.120	0.099	0.097	0.115	0.057	0.175	0.128	0.046	0.002 ~ 0.021	
10 星突江鲷 <i>Platichthys stellatus</i>	0.105	0.100	0.094	0.136	0.066	0.167	0.137	0.071	0.091	0.002 ~ 0.043

表中对角线数值为该种内 ITS2 克隆序列间 K2P 遗传距离范围。

The figure of diagonal line mean the range of K2P genetic distances of ITS2 clone sequences within species.

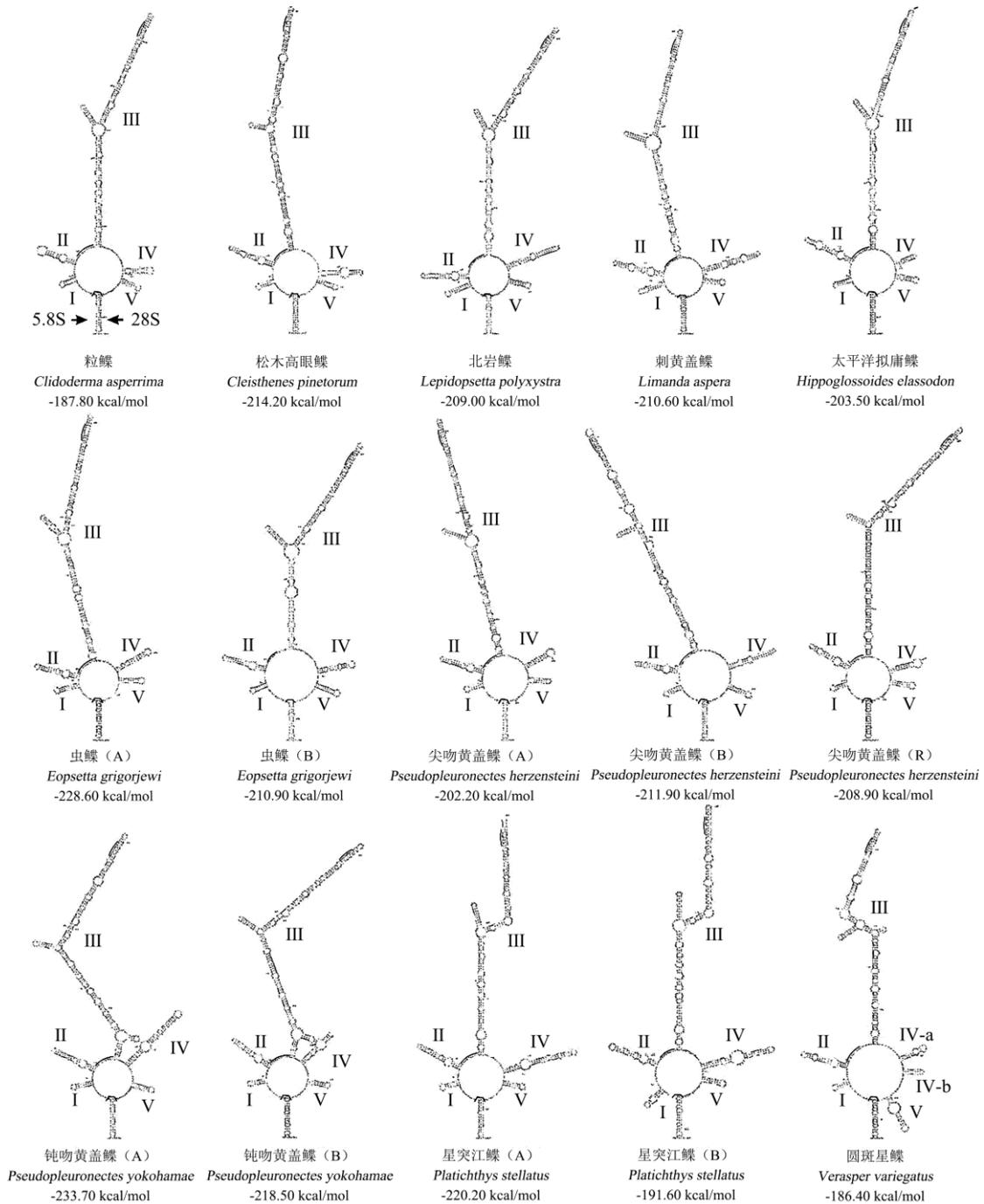


图 2 10 种鲽科鱼类 ITS2 序列的二级结构及最小自由能

Fig. 2 Secondary structure and minimum free energy of ITS2 sequence in 10 Pleuronectidae species

ITS2 二级结构的分支结构标记为 I ~ V，在粒鲽中标记出参与构成闭环的 5.8S rDNA 和 28S rDNA 部序列的位置；各二级结构图下数值为该种类及种内不同类型的最低自由能。

The structure of branched Helix were noted as I - V, and the fragments of 5.8S rDNA and 28S rDNA that formed the loop were showed in *C. asperrima*; the minimum free energies of each species and different types were showed below each separating graphs.

结构显示，不同类型主要是导致了序列分支长度、分支上侧凸 (lateral bulge) 大小、数量以及最小自由能的变化，而没有造成二级结构构型的改变。

2.3 基于 ITS2 序列的聚类分析

为进一步探讨 ITS2 序列能否作为种类鉴定的分子标记，以鲆科鱼类繁星鲆为外群，应用本研究中 10 种鲆科鱼类的 310 条克隆序列构

建最大似然树 (ML 树) 和贝叶斯推断树 (BI 树)。ML 树和 BI 树具有相同的树形 (仅展示 BI 树, 图 3), 10 种鲆科鱼类聚为两大分支。每个种类的 ITS2 序列不管是否具有不同类型都单独聚支。同属的尖吻黄盖鲆和钝吻黄盖鲆聚支后与星突江鲆形成姐妹群, 北岩鲆和太平洋拟庸鲆聚支后与松木高眼鲆形成姐妹群, 之后以上两姐妹群与刺黄盖鲆形成一个大的分

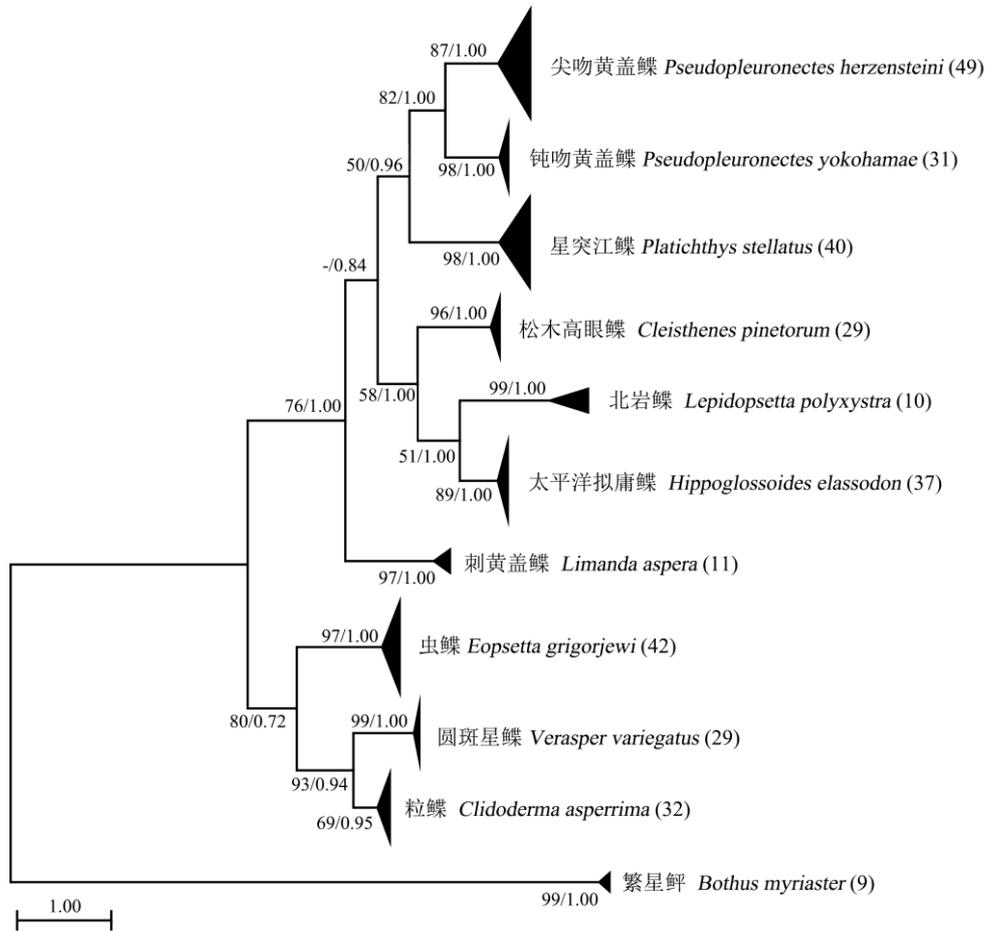


图 3 基于 10 种鲆科鱼类 ITS2 序列构建的贝叶斯推断树

Fig. 3 The Bayesian Inference (BI) tree was constructed based on the ITS2 sequences in 10 species of Pleuronectidae

节点位置依次显示最大似然树 (ML) 置信值和贝叶斯树 (BI) 的后验概率值, “-”表示置信值低于 50%; 括号内数值为序列条数; 三角形为该种类分支集合; 标尺表示遗传距离。

The first number at each node indicates the bootstrap support values for ML (numbers below 50% not show) and the second number indicates Bayesian posterior probability for BI; “-” means the bootstrap support values lower than 50%; numbers in brackets present the clone numbers; triangles present the cluster branch of each species; scale shows genetic-distance.

支；而圆斑星鲷和粒鲷聚支后则与虫鲷聚支形成另外一个大的分支。

3 讨论

3.1 进化方式与物种鉴定的适用性

对 10 种鲷科鱼类的 ITS2 序列多态特征的研究发现，在不同鱼类种内序列变异程度存在差异并遵循了不同的进化方式。通过对序列长度差异的分析，粒鲷、松木高眼鲷、北岩鲷、刺黄盖鲷、太平洋拟庸鲷以及圆斑星鲷 6 种鱼类中均只有一种序列类型；同时种内 K2P 遗传距离的统计也显示，这 6 种鱼类遗传距离在 0.002 ~ 0.027 之间，均低于这 10 种鲷科鱼类种内的遗传距离。因此，在这 6 种鱼类中基因的不同拷贝以协同进化的方式共存。

在虫鲷、星突江鲷、尖吻黄盖鲷和钝吻黄盖鲷的 ITS2 中，存在因长、短片段和单碱基位点的插入/缺失而导致的不同序列类型以及重组产生的重组子；而在种内遗传距离的计算中，虫鲷和钝吻黄盖鲷的种内遗传距离最高分别为 0.024 和 0.021，但在星突江鲷和尖吻黄盖鲷中却高达 0.043 和 0.053，造成这种差异的原因是由于在虫鲷和钝吻黄盖鲷中序列的差异来源是片段的缺失导致的长度变异，而在星突江鲷和尖吻黄盖鲷中序列的差异除了位点缺失和片段插入导致的长度差异，还存在碱基变异导致的序列差异（图 1）。因此，在这 4 种鱼类中 ITS2 遵循了非协同的进化方式，而不同于前面提到的 6 种鲷科鱼类。

虽然在种内和种间 K2P 遗传距离分析时，同属鱼类尖吻黄盖鲷和钝吻黄盖鲷的 K2P 遗传距离（0.046）低于尖吻黄盖鲷种内遗传距离（0.053），但是鲷科 10 种鱼类 ITS2 序列的聚类分析中，各鱼类种内的克隆序列均单独聚支，没有因种内不同序列类型的存在而出现聚支混乱，显示了 ITS2 序列在属间不同物种的区分上具有适用性，可以将不同鱼类明确区分开来。

本研究中，虽然不同物种的聚类没有受到种内不同序列类型的影响，但要注意在应用 ITS2 序列进行物种的鉴定或者分类分析时，需

要对其序列的多态性特征进行详细的分析比较，以避免因序列多态性、序列类型差异等原因导致的错误结果。

3.2 GC 含量特征

司李真等（2017）对已有硬骨鱼类的 ITS2 全长序列进行了统计分析，发现在硬骨鱼类中均表现出较明显的 GC 偏倚，GC 含量普遍高于 60%，而鲷科这 10 种鱼类的 GC 含量为 63.95% ~ 70.16% 之间，表现出与已有硬骨鱼类 ITS2 相同的趋势，说明鲷科与其他硬骨鱼类在 ITS2 序列碱基组成方面存在着相似的进化模式。但是 Yao 等（2010）对于部分动物的统计数据中，ITS2 序列的平均 GC 含量仅为 48.3%，这与目前本研究 and 已有的硬骨鱼类的含量存在较大差异，我们试图探究这一现象的原因，但是其研究的动物没有明确的物种信息，因此无法分析这种不同的结果是否是由于动物种类的选择所造成的。

已有硬骨鱼类基因组 GC 含量统计数据显示为 40% 左右（Kryukov et al. 2012），整体并未显示出对 GC 碱基的偏倚，这与非编码间隔区 ITS2 序列的高 GC 碱基组成存在不同。到目前为止，已有对于物种基因组以及基因的 GC 含量的研究中，涉及到的物种、基因种类和数量等的的数据积累，并不能为 GC 含量的分布特点提供合理解释，需要进一步的数据积累和深入探究。

3.3 ITS2 序列二级结构

本研究中 10 种鲷科鱼类的 ITS2，不同序列类型能够形成统一的 5 或 6 个螺旋分支的闭合环状结构，其中除了圆斑星鲷外，其余种类的 Helix I ~ IV 分支均与 Coleman（2015）总结的结构基本一致，在本研究由于序列长度及碱基变异还多出了一个分支 Helix V。比较本研究的结果和前人的研究可以发现，ITS2 的 Helix I ~ III 分支是非常保守的，在 Helix II 和 III 之间的与其他鱼类中相同的保守的单链 CAGAC（Joseph et al. 1999），Helix III 的 5' 端的序列 CCGGTGGA 也与新鳍亚纲中保守的“YCGGTGGR”（Y 和 R 为简并碱基，Y 代

表 C/T, R 代表 A/G) (Coleman 2007) 序列相一致。Helix III 之后的结构变异较大, 这也与本研究 10 种鲮科鱼类的序列比对结果相吻合, 即在 ITS2 序列的比对位点 390 bp 之前的序列相对保守, 之后的 140 bp 序列变异较大(图 1)。

正是由于 ITS2 二级结构的稳定性, 近来有研究将其应用于物种的进化分类研究 (Marinho et al. 2011, Edger et al. 2014, 李倩等 2015); 此外, 序列一级结构的改变将导致二级结构发生相应的改变, 因此在 ITS2 序列多态性特征的研究中, 也可以将其作为假基因推断的依据之一 (Bailey et al. 2003, Gong et al. 2018)。本研究发现同一物种的不同序列类型间, 存在片段插入或缺失的序列中, 在其对应的二级结构中表现为对应位置分支结构长度的改变, 比如在尖吻黄盖鲮中片段的插入导致 Helix IV 增长, 而钝吻黄盖鲮中片段的缺失导致 Helix IV 变短; 虫鲮中除了片段的缺失导致了 Helix III 变短, 同时其侧凸增大; 而星突江鲮中则是增加了 Helix III 中侧凸的数量。以上对于种内不同序列类型二级结构的预测和分析也将为下一步真、假基因的推断提供重要的线索。

目前鲮形目鱼类中 ITS2 序列研究仅有舌鳎科两种鱼类——桑给巴尔舌鳎 (Gong et al. 2016) 和黑颊无线鳎 (Gong et al. 2018) 的报道。在这两种鱼类中 ITS2 序列都出现了不同的序列类型, 并且不同序列类型间序列特征如长度、GC 含量、最小自由能等都表现出显著的差异 (桑给巴尔舌鳎种内不同类型间差异 178 bp, 2.7%, 101.2 kcal/mol; 黑颊无线鳎种内不同类型间差异 65 bp, 22.5%, 80.1 kcal/mol), 均为非协同的进化方式。本研究的 10 种鲮科鱼类 ITS2 序列中既有协同进化, 也存在非协同进化。本研究中, 协同进化的鱼类中序列间多态性特征差异较小; 非协同进化的鱼类中, 不同序列类型间虽然存在差异, 但没有达到舌鳎科两种鱼类的差异程度。另外比较发现, 舌鳎科鱼类的 GC 含量 (> 74%) 相比于鲮科鱼类

(63.95% ~ 70.16%) 较高。由此也可以看出, 鲮科与舌鳎科鱼类 ITS2 序列在进化上的不同, 本研究也为鲮形目鱼类的进化分类提供了分子数据的参考。

参 考 文 献

- Bailey C D, Carr T G, Harris S A, et al. 2003. Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 29(3): 435–455.
- Coleman A W. 2007. Pan-eukaryote ITS2 homologies revealed by RNA secondary structure. *Nucleic Acids Research*, 35(10): 3322–3329.
- Coleman A W. 2015. Nuclear rRNA transcript processing versus internal transcribed spacer secondary structure. *Trends in Genetics*, 31(3): 157–163.
- Darty K, Denise A, Ponty Y. 2009. VARNA: Interactive drawing and editing of the RNA secondary structure. *Bioinformatics*, 25(15): 1974–1975.
- Edger P P, Tang M, Bird K A, et al. 2014. Secondary structure analyses of the nuclear rRNA internal transcribed spacers and assessment of its phylogenetic utility across the Brassicaceae (Mustards). *PLoS One*, 9(7): e101341.
- Fromm L, Falk S, Flemming D, et al. 2017. Reconstitution of the complete pathway of ITS2 processing at the pre-ribosome. *Nature Communications*, 8(1):1787.
- Gerbi S A. 1986. The evolution of eukaryotic ribosomal DNA. *Biosystems*, 19(4): 247–258.
- Gong L, Shi W, Yang M, et al. 2016. Non-concerted evolution in ribosomal ITS2 sequence in *Cynoglossus zanzibarensis* (Pleuronectiformes: Cynoglossidae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 66: 181–187.
- Gong L, Shi W, Yang M, et al. 2018. Marked intra-genomic variation and pseudogenes in the ITS1-5.8S-ITS2 rDNA of *Symphurus plagiusa* (Pleuronectiformes: Cynoglossidae). *Animal Biology*, 64(4): 353–365.
- Hall T A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41(41): 95–98.
- Joseph N, Krauskopf E, Vera M I, et al. 1999. Ribosomal internal

- transcribed spacer 2 (ITS2) exhibits a common core of secondary structure in vertebrates and yeast. *Nucleic Acids Research*, 27(23): 4533–4540.
- Kitade Y, Ootsuka S, Iitsuka O, et al. 2003. Effect of DMSO on PCR of *Porphyra yezoensis* (Rhodophyta) gene. *Journal of Applied Phycology*, 15(6): 555–557.
- Kryukov K, Sumiyama K, Ikeo K, et al. 2012. A new database (GCD) on genome composition for eukaryote and prokaryote genome sequences and their initial analyses. *Genome Biology and Evolution*, 4(4): 501–512.
- Larkin M A, Blackshields G, Brown N P, et al. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21): 2947–2948.
- Li Y, Jiao L, Yao Y J. 2013. Non-concerted ITS evolution in fungi, as revealed from the important medicinal fungus *Ophiocordyceps sinensis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 68(2): 373–379.
- Liao D Q. 1999. Concerted evolution: Molecular mechanism and biological implications. *American Journal of Human Genetics*, 64(1): 24–30.
- Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11): 1451–1452.
- Marinho M, Junqueira A, Azeredo-Espin A. 2011. Evaluation of the internal transcribed spacer 2 (ITS2) as a molecular marker for phylogenetic inference using sequence and secondary structure information in blow flies (Diptera: Calliphoridae). *Genetica*, 139(9): 1189–1207.
- Marinho M, Junqueira A, Paulo D F, et al. 2012. Molecular phylogenetics of Oestroidea (Diptera: Calyptratae) with emphasis on Calliphoridae: Insights into the inter-familial relationships and additional evidence for paraphyly among blowflies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 65(3): 840–854.
- Martin D P, Murrell B, Golden M, et al. 2015. RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evolution*, 1(1): vev003.
- Redmond N E, McCormack G P. 2009. Ribosomal internal transcribed spacer regions are not suitable for intra- or inter-specific phylogeny reconstruction in haplosclerid sponges (Porifera: Demospongiae). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 89(6): 1251–1256.
- Schoch C L, Seifert K A, Huhndorf S, et al. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16): 6241–6246.
- Schultz J, Wolf M. 2009. ITS2 sequence-structure analysis in phylogenetics: A how-to manual for molecular systematics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52(2): 520–523.
- Shapoval N A, Lukhtanov V A. 2015. Intragenomic variations of multicopy ITS2 marker in *Agrodiaetus* blue butterflies (Lepidoptera, Lycaenidae). *Comparative Cytogenetics*, 9(4): 483–497.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12): 2725–2729.
- Xu J, Zhang Q, Xu X. 2009. Intragenomic variability and pseudogenes of ribosomal DNA in Stone flounder. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 52(1): 157–166.
- Yao H, Song J Y, Liu C, et al. 2010. Use of ITS2 region as the universal DNA barcode for plants and animals. *PLoS One*, 5(10): e13102.
- Zheng X, Cai D, Yao L, et al. 2008. Non-concerted ITS evolution, early origin and phylogenetic utility of ITS pseudogenes in *Pyrus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(3): 892–903.
- 李倩, 闫淑珍, 陈双林. 2015. 绒泡菌目黏菌的 ITS1-5.8S-ITS2 二级结构的比较分析. *菌物学报*, 34(2): 235–245.
- 司李真, 武宝生, 孔晓瑜, 等. 2017. 11 种鲈形目鱼类的核糖体基因 GC 含量及其与硬骨鱼类的特征比较. *中国水产科学*, 24(4): 657–668.
- 袁万安. 2010. 核糖体转录间隔子 2 应用于鱼类种属的鉴别. *遗传*, 32(4): 369–374.