

# 三种海豚线粒体 COI 基因的序列分析

李莉好<sup>①②</sup> 喻达辉<sup>①\*</sup> 黄桂菊<sup>①</sup> 郭奕惠<sup>①</sup> 梁沛文<sup>①</sup> 江世贵<sup>①</sup> 贾晓平<sup>①</sup>

(<sup>①</sup>中国水产科学研究院南海水产研究所 广州 510300 ;<sup>②</sup>上海水产大学 上海 200090)

**摘要** :对瓶鼻海豚 (*Tursiops truncatus*) 中华白海豚 (*Sousa chinensis*) 和糙齿海豚 (*Steno bredanensis*) 的线粒体 DNA COI 基因进行了测序分析。PCR 产物约 700 bp。扩增产物直接测序,去除引物序列后分别获得 643、618 和 618 bp 的核苷酸序列。碱基组成平均为 T 31.07% ,C 26.13% ,A 27.27% ,G 15.50% ,GC 含量为 41.63% ,其中碱基 G 的含量明显较低。与 GenBank 中 9 种鲸的同源序列比对,去除部分端部序列后得到 597 个比对位点,包括 141 个简约信息位点,43 个单突变子,无插入/缺失位点。12 种鲸的种间序列差异较大,其序列变异度在 2.1% ~ 17.1% 之间。597 个比对位点编码 199 个氨基酸,其中有 9 个氨基酸发生改变,其中一个氨基酸突变可将齿鲸亚目和须鲸亚目分开。NJ 系统树表明,海豚科形成单系类群,瓶鼻海豚和中华白海豚的亲缘关系较近。上述分析表明,COI 基因可用于鲸类的种类鉴定和系统发育分析。

**关键词** :海豚 ;COI 基因 ;序列分析

中图分类号 :Q953 文献标识码 :A 文章编号 :0250-3263(2007)03-20-08

## Sequence Analysis of Mitochondrial COI Gene in Three Dolphin Species

LI Li-Hao<sup>①②</sup> YU Da-Hui<sup>①\*</sup> HUANG Gui-Ju<sup>①</sup> GUO Yi-Hui<sup>①</sup>

LIANG Pei-Wen<sup>①</sup> JIANG Shi-Gui<sup>①</sup> JIA Xiao-Ping<sup>①</sup>

(<sup>①</sup>South China Sea Fisheries Research Institute ,Chinese Academy of Fishery Sciences ,Guangzhou 510300 ;

<sup>②</sup>Shanghai Fisheries University ,Shanghai 200090 ,China )

**Abstract** :Mitochondrial cytochrome oxidase subunit I (COI) gene fragments were amplified from dolphins *Tursiops truncatus* ,*Sousa chinensis* and *Steno bredanensis* using PCR technique. The PCR products ,which were about 700 bp long ,were directly sequenced. Then 643 ,618 and 618 bp nucleotide sequences were determined for the three dolphin species respectively after excluding the primer sequence. The average base compositions were 31.07% ,26.13% ,27.27% and 15.50% for T ,C ,A and G respectively ,with GC content being 41.63% . Base G content was much lower than the others. Alignment with nine homologous sequences of nine cetacean species in GenBank revealed 141 parsimony-informative sites and 43 singletons among 597 truncated alignment sites ,but no insertion/deletions were observed. The sequence divergences among the 12 species varied greatly ,ranging from 2.1% to 17.1% . The 597 bp nucleotide sequence encoded 199 amino acids ,among which there were nine amino acid mutations ,and one of them can be used to discriminate Odontoceti from Mysticeti species. The NJ tree indicated that Family Delphinidae was a monophyletic group ,and *T. truncatus* was closely related to *S. chinensis* . These observations suggest that COI gene is useful in species identification and phylogenetic study of cetaceans.

**Key words** :Dolphin ;COI gene ;Sequence analysis

基金项目 中国水产科学研究院水产种质资源与养殖技术重点实验室基金(0501)资助 ;

\* 通讯作者 ,E-mail :pearlydh@163.com ;

第一作者介绍 李莉好,女,硕士研究生,从事水产动物种质资源与种苗工程研究 ,E-mail :lih0823@163.com.

收稿日期 :2006-09-11 ,修回日期 :2007-03-13

鲸目(Cetacea)是所有哺乳动物中最适应水栖生活的一支,现存种分属于齿鲸亚目(Odontoceti)和须鲸亚目(Mysticeti)。其中海豚科(Delphinidae)是齿鲸亚目中种类最多,也是人们最熟悉的一科,包含 10 属 28 种,中国水域分布 7 属 12 种<sup>[1]</sup>。海豚可驯养成为观赏动物,以及用于军事目的,被列为国家一、二级重点保护野生动物。但随着人类对其大肆捕杀和渔业误捕,加上经济活动对其栖息地的破坏和污染,其种群数量急剧下降,大部分种类成了濒危物种<sup>[1]</sup>。因此,开展海洋鲸豚类的遗传背景研究对探讨其濒危机制和多样性保护具有重要意义。

国外学者对鲸类的分子进化进行了大量研究,许多研究表明鲸目与有蹄类尤其偶蹄目之间有较近的亲缘关系<sup>[2-4]</sup>,并支持鲸类是单系起源<sup>[5,6]</sup>,但对鲸目不同类群(须鲸类、抹香鲸类及其他齿鲸类)之间的分子系统发生关系仍存在争议。一些学者认为齿鲸亚目是单系类群<sup>[7,8]</sup>,与形态分类一致,但另一些学者认为齿鲸亚目不是单系类群<sup>[9-11]</sup>,须鲸类与齿鲸类没有直接亲缘关系<sup>[12]</sup>。国内杨光<sup>[13-15]</sup>、刘珊<sup>[16]</sup>、Yan<sup>[17]</sup>等对淡水豚类分子系统发生进行了研究,杨光<sup>[18,19]</sup>、夏军红<sup>[20]</sup>等研究了我国水域江豚种群遗传变异和遗传结构。在海水鲸类方面,Wang<sup>[21]</sup>、季国庆<sup>[22]</sup>等对我国水域瓶鼻海豚(*Tursiops sp.*)线粒体 DNA 控制区序列进行了分析,发现存在 2 个类群。王加连等<sup>[23]</sup>对中国水域真海豚(*Delphinus sp.*)线粒体 DNA 的控制区和 *cyt b* 序列进行了分析,认为中国水域的真海豚在分类上应归属于长喙真海豚(*D. capensis*)。杨光等<sup>[24]</sup>对 5 科 12 种齿鲸的 *c-mos* 序列分析发现该序列对解决科以上分类关系有用,但不能很好地区分科以下(不含科)分类关系。线粒体 DNA 中细胞色素氧化酶第 I 亚基(cytochrome oxidase subunit I, COI)的 DNA 序列变异性较大,可提供丰富的 DNA 多态信息,已被应用到遗传多样性和分子进化领域中<sup>[25-28]</sup>,但海豚科物种的 COI 基因序列报道很少,仅见白喙斑纹海豚(*Lagenorhynchus albirostris*) 1 种

(AJ554061)<sup>[29]</sup>。本文首次对瓶鼻海豚(*Tursiops truncatus*)、中华白海豚(*Sousa chinensis*)和糙齿海豚(*Steno bredanensis*)的 COI 基因片段进行了测序分析,为海豚的种质资源保护及其分子系统学与种群遗传学研究提供基础资料。

## 1 材料与方法

**1.1 实验材料** 瓶鼻海豚、中华白海豚和糙齿海豚分别采于深圳蛇口渔港、珠江口伶仃洋中北部和深圳小梅沙,均为搁浅死亡海豚。样品数分别为 2、2、1 头。取肌肉样品保存于 95% 酒精中备用。

**1.2 基因组 DNA 的提取** 分别取约 20 mg 海豚肌肉组织,加入 500  $\mu$ l TEN9 细胞裂解缓冲液(50 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0; 100 mmol/L EDTA; 200 mmol/L NaCl),剪碎,再分别加入 150  $\mu$ l SDS (10%) 和 10  $\mu$ l 蛋白酶 K (10 mg/ml)于 56 $^{\circ}$ C 消化至溶液澄清。然后用酚、氯仿、异戊醇常规方法<sup>[30]</sup>抽提 DNA,用去离子超纯水溶解。提取的基因组 DNA 定量后配成 20 ng/ $\mu$ l 的工作溶液备用。

**1.3 PCR 扩增与电泳检测** 所用 COI 基因引物序列为 L1490:5'-GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTGG-3' 与 H2198:5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA-3'<sup>[31]</sup>,由上海生物工程技术服务有限公司合成。PCR 反应在 Biometra 扩增仪上进行,反应体系为 20  $\mu$ l,包括 2  $\mu$ l PCR buffer (10 $\times$ ), 2  $\mu$ l dNTP (2 mmol/L), 1.2  $\mu$ l Mg<sup>2+</sup> (25 mmol/L), 10  $\mu$ mol/L 的引物各 0.5  $\mu$ l, 0.2  $\mu$ l Taq 酶 (5 U/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l DNA (20 ng/ $\mu$ l), 其余为纯水。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 45 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。每次反应均设不含模板 DNA 的空白对照。PCR 结束后取 5  $\mu$ l 扩增产物于 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测(1 $\times$  TBE 5 V/cm 恒压),溴化乙锭染色,凝胶成像系统观察和拍照。

**1.4 测序和数据分析** PCR 产物送往上海联合基因科技有限公司直接测序。将测序得到的 DNA 序列用 Clustal X 软件<sup>[32]</sup>先进行种内序列

比对,并将不同单倍型的序列在 GenBank 中注册(表 1,带 \* 号者)。然后以藏羚羊 (*Pantholops hodgsonii* (DQ191826)<sup>[33]</sup>) 和马鹿 (*Cervus elaphus*) (AB245427 (未发表资料)) 2 种偶蹄动物作为外群,同 GenBank 中 9 种鲸豚类(表 1)的 9 条同源序列进行比对分析,用 MEGA3 软件<sup>[34]</sup>计算其变异位点(variable sites)、简约信息位点(parsimony informative sites)、单突变子(singleton sites)、碱基组成(base composition)、变异位点比

例(变异位点数/比对位点数)、转换/颠换比率(Ts/Tv ratios)和氨基酸突变位点,根据 Kimura 双参数模型计算遗传距离。分别用 UPGMA (unweighted pair-group method of arithmetic means)、NJ (neighbor-joining)、ME (minimum evolution)和 MP (maximum parsimony)方法进行聚类分析,并采用 Bootstrap 1 000 次重复检验分子系统树的置信度。

表 1 样品种类、GenBank 序列号和碱基组成

Table 1 Species, GenBank accession numbers and base compositions of samples used in this study

科名 Family	属名 Genus	种名 Species	数量 Number	GenBank 序列号 Accession no.	碱基组成 Base composition(%)				GC 含量(%) GC content
					T	C	A	G	
海豚科 Delphinidae	宽吻海豚属 <i>Tursiops</i>	瓶鼻海豚 <i>T. truncatus</i>	2	DQ922631*	30.8	26.3	27.6	15.2	41.5
	白海豚属 <i>Sousa</i>	中华白海豚 <i>S. chinensis</i>	2	DQ922632*	30.7	26.6	27.6	15.1	41.7
	糙齿海豚属 <i>Steno</i>	糙齿海豚 <i>S. bredanensis</i>	1	DQ922633*	31.7	25.5	26.6	16.2	41.7
	斑纹海豚属 <i>Lagenorhynchus</i>	白喙斑纹海豚 <i>L. albirostris</i>	1	AJ554061	31.0	26.3	28.0	14.7	41.0
鼠海豚科 Phocoenidae	鼠海豚属 <i>Phocoena</i>	鼠海豚 <i>P. phocoena</i>	1	AJ554063	29.1	27.5	26.3	17.1	44.6
一角鲸科 Monodontidae	一角鲸属 <i>Monodon</i>	一角鲸 <i>M. monoceros</i>	1	AJ554062	28.3	28.1	27.8	15.7	43.8
露脊鲸科 Balaenidae	弓头鲸属 <i>Balaena</i>	北极鲸 <i>B. mysticlus</i>	1	AP006472	26.6	29.8	27.8	15.7	45.5
	露脊鲸属 <i>Eubalaena</i>	南露脊鲸 <i>E. australis</i>	1	DQ095155	27.3	29.1	27.8	15.7	44.8
小露脊鲸科 Neobalaenidae	小露脊鲸属 <i>Caperea</i>	小露脊鲸 <i>C. marginata</i>	1	AP006475	29.1	27.5	27.6	15.7	43.2
须鲸科 Balaenopteridae	须鲸属 <i>Balaenoptera</i>	长须鲸 <i>B. physalus</i>	1	X61145	27.1	29.3	28.0	15.6	44.9
	座头鲸属 <i>Megaptera</i>	座头鲸 <i>M. novaeangliae</i>	1	AP006467	28.0	28.8	26.6	16.6	45.4
灰鲸科 Eschrichtiidae	灰鲸属 <i>Eschrichtius</i>	灰鲸 <i>E. robustus</i>	1	AP006471	26.5	30.3	27.1	16.1	46.4

\* 来自本研究 From this study.

## 2 结果

**2.1 扩增结果及序列分析** 经 PCR 扩增,分别得到了瓶鼻海豚、中华白海豚和糙齿海豚共 5 个个体清晰的扩增带。经单向直接测序,去除引物序列后分别得到 643、618 和 618 bp 的序

列。通过 BLAST 分析比较,证实所得序列确实为 COI 基因片段。同源比对结果显示,瓶鼻海豚 2 个个体、中华白海豚 2 个个体间序列分别相同。3 种海豚的序列已在 GenBank 数据库注册(表 1 带星号者)。12 种鲸的碱基组成中碱基 G 的含量明显较低(14.7% ~ 17.1%)其他 3

A	1 1111111111 1111111111 1111111111 1222222222 2222222222
	1112223 3444455566 677788990 0011122223 3444455566 6677788899 9000111222 2223444444
	3692381780 3258914701 6258140692 5814703696 8145703492 5814713692 8247036903 5687013469
<i>T. truncatus</i>	TTTATTACAA TCCGCTTTTC ATTCCATTAT ATTATACTGT ATCTAACGCT CAACCTGCCA CCACCTCTCT ACATAAAGTG
<i>S. chinensis</i>	..... G..... C..... T..... C..... CT..... T..... A..... T..... ..... C..... A.....
<i>S. bredanensis</i>	..... C..... T..... ..... T..... C..... G..... C..... GTC..... T..... G..... T..... A..... ..... A..... C..... G..... G..... A
<i>L. albirostris</i>	..... T..... A..... C..... ..... C..... ..... G..... AC..... C..... T..... C..... TCTA..... T..... TT..... C..... CGC..... A..... A
<i>M. monocoeros</i>	..... CC..... T..... AC..... AT..... C..... GC..... A..... G..... CGG..... AC..... CT..... ..... T..... T..... A..... T..... GTT..... TC..... C..... T..... A..... A
<i>P. phocoena</i>	CC..... T..... T..... AAC..... A..... CT..... GC..... A..... GC..... CGA..... C..... T..... G..... T..... T..... A..... G..... T..... TTCTC..... CGG..... A
<i>E. australis</i>	..... C..... C..... G..... A..... TAGCCCAT..... CC..... T..... CC..... A..... C..... CTA..... AC..... ..... T..... A..... GT..... CAATT..... T..... TC..... C..... C..... G..... CA
<i>B. mysticelus</i>	CC..... C..... G..... A..... TAGCC..... AT..... CC..... CC..... A..... C..... CA..... AC..... ..... T..... A..... GT..... CAATT..... T..... TC..... C..... G..... C..... G..... CA
<i>C. marginata</i>	CC..... C..... G..... A..... AGCC..... GT..... C..... ..... C..... CACAC..... C..... ..... T..... TTCAAT..... T..... TT..... TCTC..... T..... C..... CA
<i>B. physalus</i>	CC..... GC..... AT..... AGCCCAT..... C..... G..... CG..... ..... CACAC..... CAC..... T..... A..... T..... AATT..... T..... TCTC..... GT..... C..... ACA
<i>M. novaeangliae</i>	..... C..... GC..... G..... AT..... AGCCCAT..... C..... G..... CG..... ..... CACAC..... C..... C..... T..... A..... TT..... AATT..... T..... TCT..... T..... C..... G..... CA
<i>E. robustus</i>	..... C..... C..... G..... TG..... ATTAACCG..... CC..... CCGC..... G..... GCAC..... C..... C..... G..... A..... T..... T..... AAT..... G..... T..... C..... C..... T..... G..... CA
	2222222222 2223333333 3333333333 3333333333 3444444444 4444444444 4444444444 4445555555
	5567778889 9990012223 3334445556 6677788899 9001122223 3334455566 6667777788 9990001111
	2513692561 4783651470 3695681470 3925814736 9254703692 5891736790 2591247817 2561470367
<i>T. truncatus</i>	CCTTATTTC ATCATCACTT TCTTTACTAT ATATTCCCTT TTACTACACA ATCCCACTAG CAGTACTCT TCCACATTAC
<i>S. chinensis</i>	..... CC..... ..... C..... C..... ..... G..... T..... T..... C..... ..... T..... T.....
<i>S. bredanensis</i>	..... ..... G..... G..... T..... T..... T..... T..... G..... C..... T..... T.....
<i>L. albirostris</i>	..... ..... T..... A..... TC..... T.....
<i>M. monocoeros</i>	..... C..... G..... A..... C..... G..... C..... CG..... C..... C..... CC..... T..... C..... TAA..... C..... A..... T..... A..... CTC..... T..... C.....
<i>P. phocoena</i>	T..... CC..... C..... A..... G..... C..... GTCC..... C..... C..... A..... G..... C..... T..... G..... C..... TG..... C..... TG..... A..... T..... T.....
<i>E. australis</i>	..... TC..... C..... C..... TC..... C..... CC..... TC..... C..... TC..... C..... T..... TC..... TA..... C..... GCG..... C..... T..... CCG.....
<i>B. mysticelus</i>	..... TC..... C..... C..... TC..... C..... CC..... TC..... C..... TC..... C..... C..... C..... T..... TA..... TC..... AC..... C..... C..... GT..... CCG.....
<i>C. marginata</i>	TT..... C..... T..... C..... C..... TC..... C..... T..... CC..... T..... C..... C..... TTT..... C..... CGTC..... T..... G..... A..... TC..... T..... AC..... C..... A..... T..... C..... GT.....
<i>B. physalus</i>	..... TC..... CCT..... T..... T..... C..... C..... CC..... C..... C..... CC..... T..... C..... CC..... C..... GT..... TC..... TA..... G..... AC..... CTC..... TT..... AG.....
<i>M. novaeangliae</i>	TT..... CCT..... C..... TT..... C..... C..... CCC..... CGC..... CG..... C..... C..... C..... TCG..... TG..... C..... TA..... C..... A..... C..... CTT..... CCG.....
<i>E. robustus</i>	TTC..... G..... C..... C..... TT..... C..... C..... CCC..... C..... C..... C..... CC..... TC..... TA..... TA..... TC..... A..... C..... C..... CCG.....
	5555555555 5555555555 5555
	2222344455 6667777788 8999
	0258406928 1470367902 5247
<i>T. truncatus</i>	CATTCCCTCG AAATCAACTA TTAC
<i>S. chinensis</i>	..... C..... T..... ..... C.....
<i>S. bredanensis</i>	T..... C..... T.....
<i>L. albirostris</i>	..... C..... T..... C..... A.....
<i>M. monocoeros</i>	..... C..... C..... T..... C..... G..... C..... CG.....
<i>P. phocoena</i>	..... GCC..... TTCTT..... GCTTG..... C.....
<i>E. australis</i>	T..... CCTTC..... T..... T..... A..... CG..... C.....
<i>B. mysticelus</i>	T..... CC..... TC..... T..... T..... A..... CG..... C.....
<i>C. marginata</i>	T..... CC..... TC..... C..... T..... A..... CG..... CC..... T.....
<i>B. physalus</i>	..... T..... CCTTC..... T..... T..... A..... CG..... CC.....
<i>M. novaeangliae</i>	..... T..... CCT..... C..... T..... GT..... A..... TCG..... CC.....
<i>E. robustus</i>	..... T..... CTTC..... C..... T..... AT..... C..... CC.....
B	111
	115688559
	072112473
<i>T. truncatus</i>	TLGLMVVVI
<i>S. chinensis</i>	..... R..... I.....
<i>S. bredanensis</i>	.....
<i>L. albirostris</i>	..... I..... I.....
<i>M. monocoeros</i>	SI..... IIV
<i>P. phocoena</i>	SI..... V..... V
<i>E. australis</i>	..... V..... M.....
<i>B. mysticelus</i>	..... V..... M.....
<i>C. marginata</i>	..... V..... M.....
<i>B. physalus</i>	..... V..... M..... I.....
<i>M. novaeangliae</i>	..... V..... M.....
<i>E. robustus</i>	SI..... M..... I.....

图 1 12 种鲸类线粒体 COI 基因的核苷酸 A) 和氨基酸 B) 变异位点

Fig. 1 Variable sites of nucleotide (A) and amino acid (B) of mitochondrial COI gene in 12 cetaceans

表 2 12 种鲸类线粒体 COI 基因的变异位点数( % ) ( 对角线以下 ) 及其 Kimura 双参数遗传距离( 对角线以上 )  
 Table 2 Numbers ( percentage ) of variable sites ( below diagonal ) and pairwise genetic distances ( above diagonal ) among 12 cetaceans as revealed by mitochondrial COI gene based on Kimura two-parameter model

种类 Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. 瓶鼻海豚 <i>T. truncatus</i>	-	0.042	0.053	0.056	0.125	0.146	0.161	0.165	0.172	0.183	0.181	0.174
2. 中华白海豚 <i>S. chinensis</i>	24 (4.0)	-	0.072	0.081	0.139	0.157	0.176	0.181	0.181	0.171	0.188	0.183
3. 糙齿海豚 <i>S. bredanensis</i>	30 (5.0)	40 (6.7)	-	0.083	0.146	0.148	0.181	0.195	0.188	0.202	0.202	0.195
4. 白喙斑纹海豚 <i>L. albirostris</i>	32 (5.4)	45 (7.5)	46 (7.7)	-	0.135	0.167	0.152	0.156	0.159	0.174	0.182	0.175
5. 一角鲸 <i>M. monoceros</i>	67 (11.2)	74 (12.4)	77 (12.9)	72 (12.1)	-	0.132	0.153	0.153	0.171	0.163	0.184	0.146
6. 鼠海豚 <i>P. phocoena</i>	77 (12.9)	82 (13.7)	78 (13.1)	87 (14.6)	70 (11.7)	-	0.177	0.179	0.196	0.188	0.198	0.183
7. 南露脊鲸 <i>E. australis</i>	84 (14.1)	91 (15.2)	93 (15.6)	80 (13.4)	80 (13.4)	91 (15.2)	-	0.028	0.093	0.103	0.099	0.098
8. 北极鲸 <i>B. mysticelus</i>	86 (14.4)	93 (15.6)	99 (16.6)	82 (13.7)	80 (13.4)	92 (15.4)	16 (2.1)	-	0.085	0.091	0.099	0.098
9. 小露脊鲸 <i>C. marginata</i>	89 (14.9)	93 (15.6)	96 (16.1)	83 (13.9)	88 (14.7)	99 (16.6)	51 (8.5)	47 (7.9)	-	0.130	0.113	0.125
10. 长须鲸 <i>B. physalus</i>	94 (15.8)	89 (14.9)	102 (17.1)	90 (15.1)	85 (14.2)	96 (16.1)	56 (9.4)	50 (8.4)	69 (11.6)	-	0.062	0.103
11. 座头鲸 <i>M. novaeangliae</i>	93 (15.6)	96 (16.1)	102 (17.1)	93 (15.6)	94 (15.8)	100 (16.8)	54 (9.1)	54 (9.1)	61 (10.2)	35 (5.9)	-	0.095
12. 灰鲸 <i>E. robustus</i>	90 (15.1)	94 (15.8)	99 (16.6)	90 (15.1)	77 (12.9)	94 (15.8)	54 (9.1)	54 (9.1)	67 (11.2)	56 (9.4)	52 (8.7)	-

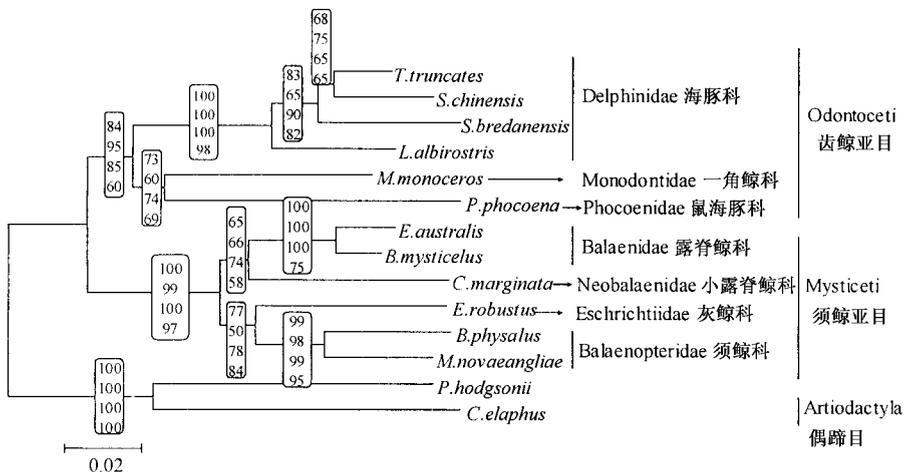


图 2 12 种鲸类 COI 基因片段的 NJ 树

Fig. 2 The NJ tree of 12 cetaceans based on partial mitochondrial COI gene sequences

图中数字从上到下依次为 NJ、UPGMA、ME 和 MP 的置信度。

The numbers from top to bottom represent bootstrap values of NJ, UPGMA, ME and

MP trees ,respectively ,with 1 000 replications.

种碱基含量较高且差异不大(25.5% ~ 31.7%),AT 含量比 GC 丰富。其中,海豚科的 T 碱基含量较其他鲸类略高,GC 含量较其他鲸类略低。

**2.2 序列变异和遗传距离** 3 种海豚与 9 种其他鲸豚类的同源序列进行比对分析,两端截平后得到 597 个比对位点(图 1:A),包含 184 个(30.8%)变异位点,其中简约信息位点 141 个,单突变子 43 个,无插入/缺失位点。转换/颠换比为 5.2。597 bp 包括 199 个密码子,其中第 1 位碱基发生突变的密码子有 31 个(27 个转换,4 个颠换),第 3 位突变的有 153 个(128 个转换,25 个颠换),第 2 位没有发生突变,其中有 20 个密码子的第 1 和第 3 位碱基都发生突变。

12 种鲸的种间变异位点范围为 16~102 个(2.1%~17.1%) (表 2,下三角),其中,瓶鼻海豚与中华白海豚的变异位点数为 24 个,占 4.0%,其中 23 个转换,1 个颠换,糙齿海豚与瓶鼻海豚之间为 30 个,占 5.0%,28 个转换,2 个颠换,中华白海豚与糙齿海豚之间为 40 个,占 6.7%,37 个转换,3 个颠换。齿鲸亚目的海豚科、露脊鲸科和须鲸科的科内变异位点较少且差别不大,分别为 24~46(4.0%~7.7%),16(2.1%)和 35(5.9%)个,而科间的变异位点较多,达 67~87(11.2%~14.6%)个,比须鲸亚目的科间变异位点(47~69 个,7.9%~11.6%)略高。齿鲸亚目和须鲸亚目之间的序列变异位点最高,达 77~102(12.9%~17.1%)个。

在推导的 199 个氨基酸残基中 9 个氨基酸发生突变(图 1:B),其中 7 个是高度疏水氨基酸(亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸)之间的突变,1 个是轻度疏水氨基酸(苏氨酸和丝氨酸)之间的突变,另一个是轻度疏水的甘氨酸(除中华白海豚之外的 11 种鲸类)与高度亲水的精氨酸(中华白海豚)之间的突变。所分析的齿鲸亚目种类的第 61 位氨基酸 181~183 碱基位点均为亮氨酸,而须鲸亚目种类均为甲硫氨酸。

瓶鼻海豚、中华白海豚、糙齿海豚与其他 9 种鲸类的遗传距离见表 2(上三角)。遗传距离

最小为 0.028(北极鲸和南露脊鲸),最大为 0.202(糙齿海豚和长须鲸、座头鲸),与序列变异格局一致。齿鲸亚目科间的遗传距离为 0.125~0.167,略高于须鲸亚目科间的遗传距离(0.085~0.125),齿鲸亚目与须鲸亚目间的遗传距离最大,为 0.146~0.202。

**2.3 聚类分析** 聚类分析得到瓶鼻海豚、中华白海豚、糙齿海豚与其他 9 种鲸类的 NJ、ME、MP 和 UPGMA 系统树,4 种系统树的拓扑结构图总体趋势相似,因此这里仅给出 NJ 树(图 2)。NJ 树显示 12 个种形成两个大的支系,一个支系是由齿鲸亚目中的海豚科、鼠海豚科和一角鲸科组成,另一个支系是由须鲸亚目的露脊鲸科、小露脊鲸科、灰鲸科和须鲸科组成。海豚科形成单系群(monophyly),其中瓶鼻海豚和中华白海豚先聚合一起然后与糙齿海豚相聚。

### 3 讨论

本文初步分析了海豚科的瓶鼻海豚、中华白海豚和糙齿海豚线粒体 DNA COI 基因部分序列并与其他鲸豚类进行了比较分析。研究表明鲸类线粒体 COI 基因碱基组成中 G 的含量特别低(14.7%~17.1%),其他 3 种碱基含量差异不大,其中 T 含量略高,并且 GC 含量比 AT 低,不同科之间的 GC 含量略有不同。在外群藏羚羊和马鹿 2 种偶蹄动物中也发现碱基 G 的含量比较低,分别为 16.6%、15.8%,AT 含量明显高于 GC 含量。在鲸类中 16S rRNA 的碱基组成情况有所不同,我们对瓶鼻海豚、中华白海豚和糙齿海豚线粒体 16S 的序列分析发现碱基 A 明显偏高(30.8%~32.5%),其他 3 种碱基组成相差不大,其中 G 含量为 20.5%~21.9%,AT 比 GC 含量丰富(未发表资料)。海水鱼类黄鲷(*Taius tumifrons*) COI 基因的 G 含量为 24.3%,AT(54.7%)高于 GC(45.3%)含量<sup>[26]</sup>。无脊椎动物凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*) COI 基因片段的 G 含量为 18.2%,AT 含量为 62.6%<sup>[27]</sup>,中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) COI 基因片段的 G 含量为 20.0%,AT 含量为 62.3%<sup>[28]</sup>。这些数据说明 AT 含量高可能是动

物线粒体 DNA COI 基因碱基组成中普遍存在的现象,而 G 碱基含量在不同分类单元之间变化较大。

序列分析表明,不同分类单元之间 COI 基因序列的变异程度不同。亚目之间的变异程度最大,其次是科间,最小是属间,与分类关系相符。不同种的序列不同,种间序列变异较大,可作为种类鉴别标记。其中,海豚科中 4 个属之间的变异位点为 24~46(4.0%~7.7%,平均 6.1%)个,露脊鲸科中 2 个属之间的变异位点为 16(2.1%)个,须鲸科中 2 个属之间的变异位点为 35(5.9%)个。而海豚科、鼠海豚科和一角鲸科之间的变异位点为 67~87 个(11.2%~14.6%,平均 12.7%)个(齿鲸亚目),露脊鲸科、小露脊鲸科、须鲸科和灰鲸科之间为 47~69 个(7.9%~11.6%,平均 9.8%)个(须鲸亚目)。两个亚目之间的序列变异位点为 77~102(12.9%~17.1%,平均 15.2%)个。从总体上看,不同亚目的种间变异程度有所不同,齿鲸亚目科间的变异比须鲸亚目科间的大。16S rRNA 基因的序列分析显示,齿鲸亚目属间变异程度为 3.2%,科间为 10.8%;须鲸亚目属间为 2.3%,科间为 5.7%;两亚目之间为 14.3%;其中糙齿海豚与瓶鼻海豚和中华白海豚之间的变异位点均为 8(1.6%)个,瓶鼻海豚和中华白海豚之间的变异位点为 2(0.4%)个(未发表资料)。比较分析表明,鲸类 16S rRNA 基因在两个亚目间的变异格局与 COI 相似,但变异程度较 COI 小。

此外,编码的 199 个氨基酸中有 9 个氨基酸发生了改变,这些氨基酸大部分都是疏水性氨基酸之间的替换,无功能上的改变。其中第 61 位的亮氨酸(海豚科、鼠海豚科和一角鲸科种类)突变为甲硫氨酸(露脊鲸科、小露脊鲸科、须鲸科和灰鲸科),从而将所分析的齿鲸亚目和须鲸亚目种类区分开。

系统发育分析表明,海豚科的瓶鼻海豚(瓶鼻海豚属)和中华白海豚(白海豚属)的亲缘关系较近,其次为糙齿海豚(糙齿海豚属),而白喙斑纹海豚(斑纹海豚属)较远。遗传距离分析结果也与此相符。和 16S rRNA 基因构建的系统

树(未发表资料)相比,这 4 个属的聚类关系解析得十分清楚,可能与 COI 基因进化快有关。此系统树也支持 Waddell<sup>[35]</sup>等的观点,即鼠海豚科与一角鲸科有更近的亲缘关系。此外,须鲸亚目形成两个支系,露脊鲸科的北极鲸(弓头鲸属)、南露脊鲸(露脊鲸属)和小露脊鲸科的小露脊鲸聚合一个支系,另一个支系是由灰鲸科的灰鲸和须鲸科的长须鲸(须鲸属)、座头鲸(座头鲸属)组成。这与形态分类差异很大,也与 Arnason 等<sup>[36]</sup>的观点不一致,即露脊鲸科形成一支系与须鲸亚目中其他科分开。因此灰鲸有可能是须鲸属内的一个特化类群或须鲸科的另一个属。系统树较高的置信度以及较高的序列变异度,表明 COI 基因适合于鲸类的系统发育研究。

## 参 考 文 献

- [1] 王丕烈. 中国鲸豚. 香港: 海洋企业有限公司出版, 1999, 9~13.
- [2] Irwin D M, Kocher T D, Wilson A C. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 1991, **32**: 128~144.
- [3] Graur D, Higgins D G. Molecular evidence for the inclusion of cetaceans within the order Artiodactyla. *Molecular Biology and Evolution*, 1994, **11**: 357~364.
- [4] Nikaido M, Rooney A P, Okada N. Evolution and phylogenetic relationships among cetartiodactyls based on insertions of short and long interspersed elements: Hippopotamuses are the closest extant relatives of whales. *Proceeding of National Academy of Science of USA*, 1999, **96**: 10 261~10 266.
- [5] Arnason U. Southern blot hybridization in cetaceans using killer whale restriction fragment as a probe. *Hereditas*, 1982, **97**: 47~49.
- [6] Hoelzel A R, Hancock J M, Dover G A. Evolution of the cetacean mitochondrial D-loop region. *Molecular Biology and Evolution*, 1991, **8**: 475~493.
- [7] Nikaido M, Matsuno F, Hamilton H, et al. Retroposon analysis of major cetacean lineages: the monophyly of the toothed whales and the paraphyly of river dolphins. *PNAS*, 2001, **98**: 7 384~7 389.
- [8] May-Collado L, Agnarsson I. Cytochrome *b* and Bayesian inference of whale phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006, **38**: 344~354.
- [9] Milinkovitch M C, Meyer A, Powell J R. Phylogeny of all major

- groups of Cetaceans based on DNA sequences from three mitochondrial genes. *Molecular Biology and Evolution*, 1994, **11**(6):939 ~ 948.
- [ 10 ] Hasegawa M, Adachi J, Milinkovitch M C. Novel phylogeny of whales supported by total molecular evidence. *Journal of Molecular Evolution*, 1997 **44** (Suppl. 1):117 ~ 120.
- [ 11 ] Messenger S, McGuire J. Morphology, molecules, and the phylogenetics of cetaceans. *Systematic Biology*, 1998 **47**:90 ~ 124.
- [ 12 ] Amason U, Gullberg A. Cytochrome *b* nucleotide sequences and the identification of five primary lineages of extant cetaceans. *Molecular Biology and Evolution*, 1996, **13**(2):407 ~ 417.
- [ 13 ] 杨光, 周开亚. 淡水豚类分子系统发生的研究. 兽类学报, 1999, **19**(1):1 ~ 9.
- [ 14 ] 杨光, 刘珊, 季国庆等. 淡水豚类线粒体 DNA 12S rRNA 基因的序列变异及其分子系统学研究. 动物学研究, 2000 **21**(6):425 ~ 431.
- [ 15 ] Yang G, Zhou K Y, Ren W H, *et al.* Molecular systematics of river dolphins inferred from complete mitochondrial cytochrome-*b* gene sequences. *Marine Mammal Science* 2002, **18**(1):20 ~ 29.
- [ 16 ] 刘珊, 杨光, 周开亚. 淡水豚类 mtDNA 16S rRNA 基因的系统发生. 南京师范大学学报(自然科学版), 2000, **23**(4):74 ~ 78.
- [ 17 ] Yan J, Zhou K Y, Yang G. Molecular phylogenetics of 'river dolphins' and the baiji mitochondrial genome. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2005 **37**(3):743 ~ 750.
- [ 18 ] 杨光, 周开亚. 中国水域江豚种群遗传变异的研究. 动物学报, 1997 **43**(4):411 ~ 419.
- [ 19 ] Yang G, Ren W H, Zhou K Y, *et al.* Population genetic structure of finless porpoises, *Neophocaena phocaenoides*, in Chinese waters inferred from mitochondrial control region sequences. *Marine Mammal Science* 2002, **18**(2):336 ~ 347.
- [ 20 ] 夏军红, 郑颈松, 魏卓等. 天鹅洲保护区长江江豚 AFLP 遗传多样性分析. 高技术通讯, 2004, **14**:25 ~ 28.
- [ 21 ] Wang J Y, Chou L S, White B N. Mitochondrial DNA analysis of sympatric morphotypes of bottlenose dolphins (genus: *Tursiops*) in Chinese waters. *Molecular Ecology*, 1999, **8**:1603 ~ 1612.
- [ 22 ] 季国庆, 杨光, 刘珊等. 中国水域瓶鼻海豚的 mtDNA 控制区序列变异性分析. 动物学报, 2002 **48**(4):487 ~ 493.
- [ 23 ] 王加连, 杨光, 刘海等. 线粒体 DNA 序列分析在中国水域真海豚物种鉴定中的初步应用. 兽类学报, 2003, **23**(2):120 ~ 126.
- [ 24 ] 杨光, 季国庆, 周开亚等. 鲸类 *c-mos* 基因的序列变异性及在系统发生分析中应用的初步研究. 兽类学报, 2003, **23**(4):277 ~ 282.
- [ 25 ] Baldwin J D, Bass A L, Bowen B W, *et al.* Molecular phylogeny and biogeography of the marine shrimp *Penaeus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 1998, **10**(3):399 ~ 407.
- [ 26 ] 张凤英, 夏连军, 马凌波等. 黄鲷线粒体 COI 基因部分序列遗传变异研究. 热带海洋学报, 2005 **24**(5):83 ~ 89.
- [ 27 ] 郑连明, 林元烧, 曹文清等. 凡纳滨对虾线粒体 DNA COI 基因片段序列. 厦门大学学报(自然科学版), 2005, **44**(6):815 ~ 820.
- [ 28 ] 孔晓瑜, 喻子牛, 刘亚军等. 中华绒螯蟹与日本绒螯蟹线粒体 COI 基因片段的序列比较研究. 青岛海洋大学学报, 2001 **31**(6):861 ~ 866.
- [ 29 ] Amason U, Gullberg A, Janke A. Mitogenomic analyses provide new insights into cetacean evolution. *Gene*, 2004, **333**:27 ~ 34.
- [ 30 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual* (second edition). Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, 954 ~ 955.
- [ 31 ] Folmer O, Black M, Hoeh W, *et al.* DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 1994, **3**:294 ~ 299.
- [ 32 ] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The clustalx windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997 **25**(24):4876 ~ 4882.
- [ 33 ] Xu S Q, Yang Y Z, Zhou J, *et al.* A mitochondrial genome sequence of the Tibetan Antelope (*Pantholops hodgsonii*). *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2005 **3**(1):5 ~ 17.
- [ 34 ] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA 3: an integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinformatics* 2004 **5**(2):150 ~ 163.
- [ 35 ] Waddell V G, Milinkovitch M C, Stanhope M J, *et al.* Molecular phylogenetic examination of the Delphinoidea trichotomy: congruent evidence from three nuclear loci indicates that porpoises (Phocoenidae) share a more recent common ancestry with white whales (Monodontidae) than they do with true dolphins (Delphinidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 2000 **15**(2):314 ~ 318.
- [ 36 ] Amason U, Gullberg A, Widegren B. Cetacean mitochondrial DNA control region sequences of all extant baleen whales and two sperm whale species. *Molecular Biology and Evolution*, 1993, **10**(5):960 ~ 970.