

三斑海马线粒体基因组核苷酸 全序列结构与分析

张艳红^① 刘帅帅^{②#} 王 信^{①③} 王昌命^② 林 强^{①*}

① 中国科学院南海海洋研究所, 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室 广州 510301; ② 西南林业大学生命科学学院 昆明 650224; ③ 中国科学院大学 北京 100049

摘要: 通过 PCR 扩增并测序获得了三斑海马 (*Hippocampus trimaculatus*) 线粒体 DNA (mtDNA) 全序列。三斑海马线粒体基因组全序列长度为 16 534 bp (GenBank 登录号为 KJ956892), 编码 37 个基因, 包括 13 个蛋白编码基因、22 个 tRNA 基因和 2 个 rRNA 基因。非编码区域包括 1 个控制区 (D-loop) 及一个轻链复制起始区域。大部分基因由 H-链编码, 包括 14 个 tRNA 基因、2 个 rRNA 基因、12 个蛋白编码基因; 只有 ND6 和 8 个 tRNA 基因是在 L-链编码。预测的 22 个 tRNA 基因的二级结构均为典型的三叶草状。基因间隔一般 1 ~ 14 bp 不等。此外, 还存在 7 处碱基重叠, 其中, 4 处是鱼类和脊椎动物典型的基因重叠位点。总的碱基含量分别为, A 32.7%, C 23.4%, G 14.6%, T 29.3%, A + T 含量为 62.0%。其线粒体基因组序列的结构与脊椎动物的典型结构近似。邻接法和贝叶斯法构建的三斑海马系统进化树的拓扑结构相似, 这与现有的三斑海马的系统演化地位一致。本研究为海马的进化研究以及保护工作提供了基础数据。

关键词: 线粒体基因组; 全序列; 系统进化; 三斑海马

中图分类号: Q953 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2016) 03-413-10

Structure and Analysis of Complete Mitochondrial Genome in the Three-spot Seahorse, *Hippocampus trimaculatus*

ZHANG Yan-Hong^① LIU Shuai-Shuai^{②#} WANG Xin^{①③} WANG Chang-Ming^② LIN Qiang^{①*}

① Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, Chinese Academy of Sciences, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301; ② School of Life Sciences, Southwest Forestry University, Kunming 650224; ③ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: The nucleotide sequence of complete mitochondrial DNA (mtDNA) genome was determined in *Hippocampus trimaculatus*. According to the mtDNA sequence of *H. kuda* (AP005985) and *H. erectus*

基金项目 国家自然科学基金青年科学基金项目 (No. 41306148), 广东省自然科学基金博士启动项目 (No. S2013040016935);

* 通讯作者, E-mail: linqiang@scsio.ac.cn;

第一作者介绍 张艳红, 女, 博士; 研究方向: 海洋动物生理与分子生态学; E-mail: zhangyanhong1218@163.com;

同等贡献第一作者介绍 刘帅帅, 女, 硕士研究生; 研究方向: 群体遗传学; E-mail: liuss2015@yeah.net.

收稿日期: 2015-09-09, 修回日期: 2015-12-08 DOI: 10.13859/j.cjz.201603009

(KF557652) which had been published in GenBank, six PCR primers were designed to amplify the mtDNA sequence using 3 muscle samples of *H. trimaculatus* (Table 1). The purified PCR products were sequenced directly or cloned into pMD-18T Vector and then sequenced. The structure and gene order of *H. trimaculatus* mtDNA were determined by referring to *H. kuda* mtDNA. The complete mitogenome of *H. trimaculatus* was 16 529 bp with the GenBank Accession No. KJ956892, and it consisted of 13 protein-coding genes, 22 tRNA genes, 12S rRNA gene, 16S rRNA gene and 1 control region (D-loop) (Fig. 1). The heavy DNA strand (H-strand) carried most of the genes: 12 protein-coding genes, 2 rRNA and 14 tRNA. ND6 and 8 tRNA genes were encoded on the L-strand. The lengths of 22 tRNA genes ranged from 66 to 76 bp, and all of them could fold into the typical cloverleaf-shaped secondary structure. The lengths of intergenic nucleotide ranged from 1 to 14 bp with 7 overlaps inside (Table 2). Four of the seven overlaps (*ATP8* and *ATP6*, *ATP6* and *COIII*, *ND4L* and *ND4*, *ND5* and *ND6*) were typical overlap sites of the teleost. The overall base composition of *H. trimaculatus* was 32.7% A, 29.3% T, 14.6% G and 23.4% C, with a slight A + T rich feature (62.0%). Codon usage bias was found in mitochondrial-encoded genes of *H. trimaculatus* (Table 3). The gene order and composition of *H. trimaculatus* were similar to those of most other vertebrates. Two phylogenetic trees constructed by Neighbour-joining and Bayesian methods showed basically the same result (Fig. 2). Seven species of genus *Hippocampus* clustered into a branch, which supported the existing classification of these seahorses. The availability of mitogenome of the three-spot seahorse will shed light on understanding evolution and provides clues for conservation in this species.

Key words: Mitochondrial genome; Genome sequence; Phylogenetic evolution; *Hippocampus trimaculatus*

三斑海马 (*Hippocampus trimaculatus*) 是珍稀的海洋药源性和观赏性动物, 隶属于海龙科海马属, 是一种小型海洋硬骨鱼类。海马具有极高的经济价值, 在我国素有“南方人参”之称 (林强等 2007)。早在《神农本草》中已有记载: 海马性温, 味甘, 无毒, 具有强身补肾, 舒筋活络, 止痛止血, 退热生肌, 强心明目, 祛疾止喘, 妇人催生等功能。三斑海马在我国东海、南海分布较广, 福建沿海、广东沿海和海南岛均有分布, 除此之外, 三斑海马还分布于东非、印度、新加坡和印度尼西亚沿海 (Luo et al. 2015)。目前, 由于人类对海马资源的过度开发利用, 加之海马栖息地的破坏, 野生海马资源已濒临枯竭 (CITES 2004, Lin et al. 2009a, b, c)。海马的过度捕捞以及生境的破坏使我国海马资源量大幅下降, 三斑海马已被 IUCN 红色名录列为易危物种 (IUCN 2003), 并且被 CITES 的附录 II 收录。

目前, 全世界已发现的海马有 46 种, 均隶

属于海龙科海马属 (Koldewey et al. 2010)。已报道线粒体基因组序列的海马只有 7 种。海马作为一种形态和繁殖方式都比较特殊的珍稀硬骨鱼类, 对其在海洋环境的适应性进化研究具有非常重要的科学意义 (Wilson et al. 2001)。相关数据资料的缺乏将阻碍人们对于海马基础生物学的研究。因此, 对我国沿海分布广泛的三斑海马线粒体基因组进行测序和系统进化研究是非常有必要。鱼类线粒体 DNA (mtDNA) 与其他许多脊椎动物的 mtDNA 一样, 是共价闭合、环状的双链 DNA 分子, 具有 mtDNA 的共同特征: (1) 分子结构简单; (2) 严格的母系遗传; (3) 几乎不发生重组; (4) 进化速度快; (5) 不同的区域进化速度存在差异, 允许选择不同的区域进行不同时间尺度的进化分析 (肖武汉等 2000)。由于鱼类线粒体 DNA 具有以上特点, 所以线粒体 DNA 成为鱼类进化遗传学、分子生态学、遗传多样性及其保护生物学等研究的重要标记。随着分子生物学技术

向生物学各研究领域的渗透, 以 mtDNA 作为分子标记, 已成为鱼类群体遗传结构与系统演化关系研究中的重要工具 (郭新红等 2004)。

随着测序技术的不断发展, 已有大量的关于线粒体 DNA 的信息、结构和功能遗传、系统进化的应用研究 (Brown 1983, Meyer 1994)。目前, 很多鱼类 mtDNA 全序列已被公布 (赫崇波等 2007, Yamanoue et al. 2007, 2008, 杨琴玲等 2009), 其中包括 7 种海马。本文测定了三斑海马的线粒体基因组全序列, 分析了其结构特点, 并通过系统发育分析探讨了三斑海马与其他海马种的系统进化关系。本研究的结果可以为三斑海马的资源保护以及海马的起源与进化研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用的 5 尾三斑海马采自海南省文昌县, 自然死亡后取其尾部肌肉于 -80°C 保存备用。实验中共提取了 5 尾海马的基因组 DNA, 对线粒体基因组序列进行扩增之后, 将其中 3 尾海马的 PCR 纯化产物测序, 个体间无显著差异。

1.2 基因组 DNA 的提取

采用 TIANGEN 海洋动物基因组 DNA 提取试剂盒 DP324-02 提取肌肉组织的总 DNA, -20°C 保存备用。

1.3 引物设计和 PCR 扩增

引物的设计参照 GenBank 中已公布的大海马 (*H. kuda*, AP005985) (Kawahara et al. 2008) 和线纹海马 (*H. erectus*, KF557652) (Zhang et al. 2015c) 的序列, 利用 Clustal X 和在线 BLAST 进行序列比对后, 再用 Primer Premier 5.0 设计引物 (表 1)。

PCR 反应体系为: 高保真 *Taq*DNA 聚合酶 PCR mix 25 μl (TAKARA 公司), 上游引物和下游引物各 1 μl (10 pmol/L), 模板 DNA 3 μl (约 1 μg), 加 ddH₂O 至 50 μl 。PCR 反应程序为: 94°C 预变性 3 min, 94°C 变性 30 s, 56°C 退

表 1 扩增三斑海马线粒体全序列所用的引物信息

Table 1 Table of primers used for amplification of the three-spot seahorse mitochondrial genome

引物名称 Primers	序列 (5' - 3') Sequences (5' - 3')
F1	ATTAAAGCATAAACHCTGAAG
R1	TAGATAGAACTGACCTGGA
F2	GTTTACGACCTCGATGTTGGATC
R2	GCGGTGGATTGTAGACCCATA
F3	GGTGAAAATCCCTTAGTCCC
R3	TCAACTCCTCCCTTTCTCG
F4	CTAAGCCATCCTACCTGTG
R4	AACCAAGACCAGGTGATTGG
F5	TTAGAAGCAGCCGCMTGATACT
R5	TAGCTGCTACTCGATTGACCC
F6	AAGGATAACAGCTCATCCGTTGG
R6	CTCAGAATGACATTGTCTCTCA

火 30 s, 72°C 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后一个循环结束后, 72°C 延伸 10 min。扩增产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。纯化回收后, 将 PCR 纯化产物直接进行测序。

1.4 mtDNA 序列拼接、分析及系统进化研究

对于测定的 DNA 片段序列首先用 Seqman5.01 进行拼接分析, 通过与大海马 (AP005985) (Kawahara et al. 2008) 和线纹海马 (KF557652) (Zhang et al. 2015c) 序列的比对, 确定三斑海马 mtDNA 上各基因位置。线粒体基因组中存在的的基因间隔、基因重叠、碱基组成和氨基酸编码情况通过 Mega6.0 软件进行统计。利用 tRNAscan-SE 1.21 (<http://lowelab.ucus.edu/tRNAscan-SE/>) 对 tRNA 的二级结构进行预测分析。用 ClustalX 软件对序列进行多重比对, 为了保证建树结果的可靠性, 通过邻接法 (neighbor joining, NJ) 和贝叶斯法两种方法构建系统进化树, 比较研究了多种海马之间的分子进化关系。

2 结果与分析

2.1 三斑海马线粒体基因组组成与结构

三斑海马线粒体基因组 (mtDNA) 全长

16 534 bp, 共包括 22 个 tRNA 基因、2 个 rRNA 基因、13 个疏水性蛋白编码基因、1 个主要非编码区 (D-loop) 和一个轻链复制起始区。大部分基因由重链编码, 包括 14 个 tRNA 基因、2 个 rRNA 基因、12 个蛋白编码基因; 只有 ND6 和 8 个 tRNA 是由轻链编码 (图 1)。

三斑海马线粒体基因组有 9 处基因间隔区共 28 bp, 最长间隔位于 CO I 和 tRNA^{ser} (UCN) 之间为 14 bp。除了基因间隔还有 7 处存在碱基重叠, 共 27 bp, 其中有 4 处是鱼类和脊椎动物典型的基因重叠位点 (ATP8 和 ATP6, ATP6 和 COIII, ND4L 和 ND4, ND5 和 ND6, 表 2)。12s rRNA 和 16s rRNA 基因的长度分别为 938 bp 和 1 706 bp。13 个疏水性蛋白编码基因包括, 1 个细胞色素 *b* 基因 (Cytochrome *b*, *Cyt b*), 2 个 ATP 合成酶亚基

基因 (ATP synthase subunit, ATPase8 和 ATPase6)、3 个细胞色素氧化酶亚基基因 (Cytochrome oxidase subunit, CO I, CO II, COIII) 和 7 个 NADH 氧化还原酶亚基 (NADH dehydro-genase subunit, ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6), 除了 ND6 由轻链 (L 链) 编码外, 其余 12 个蛋白编码基因皆由重链 (H 链) 编码。控制区 (D-loop) 长度为 877 bp。轻链复制起始区位于 5'-tRNA-Asn 和 3'-tRNA-Cys 之间, 长度为 36 bp。三斑海马线粒体基因组总的碱基组成为, A 32.7%, C 23.4%, G 14.6%, T 29.3%, A + T 含量大约 62.0%。

2.2 编码蛋白基因分析

13 种疏水性蛋白质编码基因总长为 11 425 bp, 占线粒体全基因组的 69.01%。三斑海马线粒体

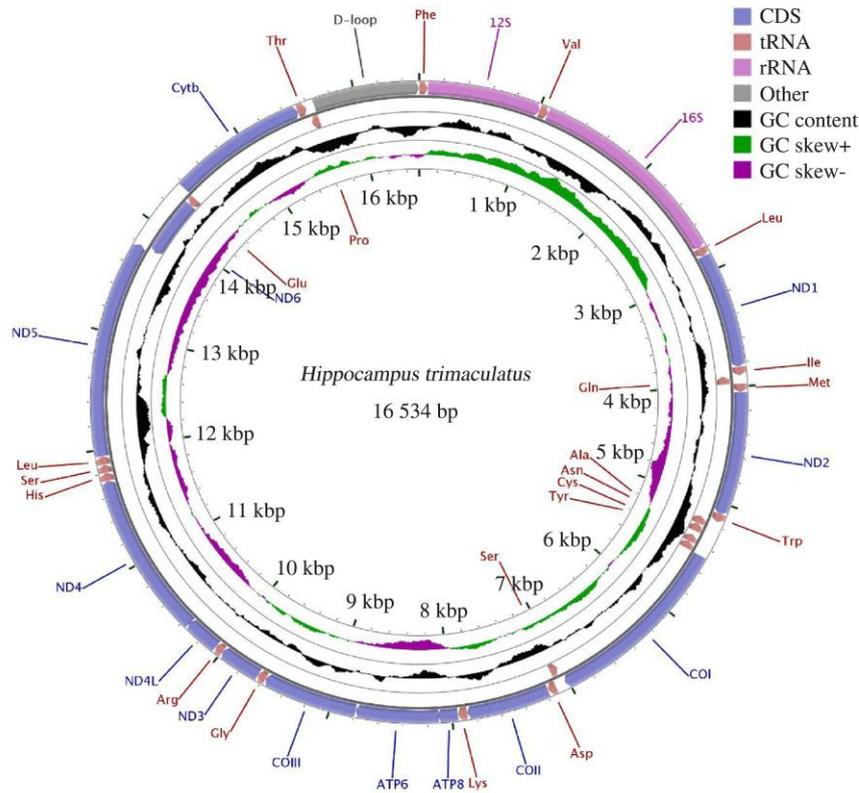


图 1 三斑海马线粒体基因组信息图

Fig. 1 Gene map of the mitochondrial genome of *Hippocampus trimaculatus*

基因组中的所有的 13 个蛋白质编码基因的排列顺序和其他大部分硬骨鱼类相同。除 *CO I* 是以 GTG 为起始密码子, 其他 12 个基因均以 ATG 起始。同大部分硬骨鱼一样, 所有的基因

都是以 TAA、TAG 或者单独 T 作为终止密码子 (表 2), 推测蛋白质基因中的不正常终止密码子在转录成 mRNA 后会通过 RNA 编辑转变为正常终止密码子。

表 2 三斑海马线粒体基因组全序列的组成

Table 2 Organization of the mitochondrial genome of three-spot seahorse

组成 Feature	位置 Position		长度 (bp) Base length	起始密码子 Start codon	终止密码子 Stop codon	序列重叠 Intergenic nucleotides	编码链 Strand
tRNA ^{Phe}	1	71	71			0	H
12S rRNA	72	1009	938			0	H
tRNA ^{Val}	1010	1082	73			0	H
16S rRNA	1083	2788	1 706			0	H
tRNA ^{Leu (UUR)}	2789	2861	73			0	H
<i>ND1</i>	2862	3836	975	ATG	TAG	2	H
tRNA ^{Ile}	3839	3909	71			- 1	H
tRNA ^{Gln}	3909	3979	71			1	L
tRNA ^{Met}	3981	4050	70			0	H
<i>ND2</i>	4051	5091	1 041	ATG	TAA	- 2	H
tRNA ^{Trp}	5090	5161	72			1	H
tRNA ^{Ala}	5163	5231	69			1	L
tRNA ^{Asn}	5233	5305	73			0	L
O _L	5306	5341	36			0	L
tRNA ^{Cys}	5342	5407	66			0	L
tRNA ^{Tyr}	5408	5474	67			1	L
<i>COX I</i>	5476	7029	1 554	GTG	TAA	0	H
tRNA ^{Ser (UCN)}	7030	7100	71			14	L
tRNA ^{Asp}	7113	7180	68			4	H
<i>COX II</i>	7185	7875	691	ATG	T—	0	H
tRNA ^{Lys}	7876	7951	76			0	H
ATPase8	7952	8119	168	ATG	TAA	- 10	H
ATPase6	8110	8793	684	ATG	TAA	- 1	H
<i>COX III</i>	8793	9576	784	ATG	T—	0	H
tRNA ^{Gly}	9577	9646	70			0	H
<i>ND3</i>	9647	9997	351	ATG	TAA	- 2	H
tRNA ^{Arg}	9996	10064	69			0	H
<i>ND4L</i>	10065	10361	297	ATG	TAA	- 7	H
<i>ND4</i>	10355	11735	1 381	ATG	T—	0	H
tRNA ^{His}	11736	11804	69			0	H
tRNA ^{Ser (AGY)}	11805	11872	68			2	H
tRNA ^{Leu (CUN)}	11875	11947	73			0	H
<i>ND5</i>	11948	13783	1 836	ATG	TAA	- 4	H
<i>ND6</i>	13780	14301	522	ATG	TAA	0	L
tRNA ^{Glu}	14302	14370	69			4	L
<i>Cyt b</i>	14375	15515	1 141	ATG	T—	0	H
tRNA ^{Thr}	15516	15588	73			0	H
tRNA ^{Pro}	15589	15657	69			0	L
D-loop	15658	16534	877			0	

序列重叠: 正数表示在基因间隔区核苷酸数目, 负数表示基因重叠区核苷酸重叠位点数目; 编码链: H 和 L 分别表示基因转录的重链和轻链。

Intergenic nucleotides: Positive numbers indicate the number of nucleotides found in intergenic spacers between different genes. Negative numbers indicate overlapping nucleotides between adjacent genes; Strand: +H and L indicate genes transcribed on the heavy and light strands.

三斑海马线粒体基因组蛋白质氨基酸密码子使用频率见表 3, 共有 4 940 个氨基酸, 使用频率最高的是 UUA (Leu) 和 AUU (Ile)。NNA、NNT、NNC 和 NNG 的密码子使用率分别为 44.9%、27.9%、21.1% 和 5.1%, 可以看出第三

位为 A 的密码子使用频率最高, 而 G 的频率则最低。由此可以看出三斑海马蛋白质氨基酸密码子使用有较强的 G 偏移和 A 偏离。

2.3 rRNA 基因、tRNA 基因及非编码区特征

12S rRNA 和 16S rRNA 基因位于 tRNA-Phe

表 3 三斑海马蛋白质编码基因氨基酸密码子使用频率

Table 3 Codon Usage of all protein-coding genes in the mitochondrial genome of three-spot seahorse

密码子 Codon	氨基酸 Amino acid	数量 Quantity	频率 (%) Frequency	密码子 Codon	氨基酸 Amino acid	数量 Quantity	频率 (%) Frequency
UAG	*	1	0.0	AAC	N	79	1.6
UAA	*	8	0.2	AAU	N	61	1.2
AGA	*	0	0.0	CCU	P	65	1.3
AGG	*	0	0.0	CCG	P	8	0.2
GCU	A	90	1.8	CCC	P	59	1.2
GCG	A	7	0.1	CCA	P	77	1.6
GCC	A	70	1.4	CAA	Q	94	1.9
GCA	A	127	2.6	CAG	Q	2	0.0
UGU	C	12	0.2	CGA	R	54	1.1
UGC	C	12	0.2	CGC	R	6	0.1
GAU	D	40	0.8	CGG	R	8	0.1
GAC	D	31	0.6	CGU	R	4	0.1
GAG	E	13	0.3	AGC	S	32	0.6
GAA	E	87	1.8	UCA	S	120	2.4
UUU	F	119	2.4	UCC	S	29	0.6
UUC	F	104	2.1	UCG	S	8	0.2
GGU	G	60	1.2	UCU	S	65	1.3
GGG	G	26	0.5	AGU	S	18	0.4
GGC	G	25	0.5	ACA	T	139	2.8
GGA	G	125	2.5	ACU	T	69	1.4
CAC	H	60	1.2	ACC	T	83	1.7
CAU	H	43	0.9	ACG	T	11	0.2
AUU	I	191	3.9	GUU	V	72	1.5
AUC	I	111	2.2	GUG	V	16	0.3
AAA	K	82	1.7	GUC	V	21	0.4
AAG	K	2	0.0	GUA	V	97	2.0
UUG	L	26	0.5	UGA	W	107	2.2
UUA	L	235	4.8	UGG	W	15	0.3
CUA	L	191	3.9	UAC	Y	70	1.4
CUC	L	49	1.0	UAU	Y	47	1.0
CUG	L	21	0.4	NNA ^a		1 708	44.9
CUU	L	105	2.1	NNT ^a		1 061	27.9
AUG	M	33	0.7	NNC ^a		841	22.1
AUA	M	165	3.3	NNG ^a		197	5.1

* 终止密码子; a. 密码子第三位是 A 或 T 或 C 或 G 的所有密码子。

* Stop codon; a. Refers to all codon which the third codon is A or T or C or G.

和 tRNA-Leu 之间, 由 tRNA-Val 分开。控制区位于 tRNA-Pro 和 tRNA-Phe 之间。所有 22 个 tRNA 长度范围为 66 bp (Cys) 到 76 bp (Lys), 其中 21 个 tRNA 结构可以直接通过 tRNAscan-SE 识别, tRNA-Ser (AGC) 则无法识别, 我们与其他硬骨鱼类比较将其识别, 通过 RNAstructure 预测其二级结构, 发现其 DHU 臂只有 3 个碱基对构成的臂 (T = A、C ≡ G 和 G ≡ C), 而环区也只有 3 个碱基。很多硬骨鱼中 tRNA-Ser (AGC) 的 DHU 臂是缺失的, 但是我们比较了 tRNA-Ser (UGA)、tRNA-Val 和 tRNA-Tyr, 发现它们的 DHU 臂也只有 3 个碱基对, 并且 3 碱基的环区也有足够的空间折叠, 所以推断三斑海马的 tRNA-Ser (AGC) 是存在 DHU 臂的。

2.4 系统进化分析

利用线粒体基因组 12 个蛋白编码序列的数据, 应用 MEGA 6.0 的邻接法 (NJ) 为 8 种海马和 5 种海龙构建系统进化树, 确定三斑海马的进化地位 (图 2a)。选取 GenBank 中已登录的海龙科的 8 种海马和 5 种海龙的线粒体 12 个编码蛋白基因序列, 利用贝叶斯法构建系统树 (图 2b)。构建的 NJ 树和贝叶斯树在拓扑结构上基本一致。所得结果均表明, 海马属的 8 种海马构成了一个单系类群。

从 13 种海龙科鱼类的系统进化树可以看出, 海马属 8 种鱼类之间的遗传距离十分相近, 说明该属鱼类物种及个体间的关系非常密切, 同时也反映出海马属线粒体基因组在进化上的保守性。

3 讨论

本文测序并报道了三斑海马的线粒体全基因组序列信息, 数据分析表明, 其结构与脊椎动物线粒体基因组的典型结构相一致, 并且不存在基因重排现象。已报道的几种海马的线粒体基因组的全长都在 16.5 kb 左右 (Wang et al. 2014, Zhang et al. 2015a, c), 本研究获得的三斑海马线粒体基因组全长为 16 529 bp, 包括编

码区和非编码区 (D-loop, H 链复制起始区) 两部分, 编码了 2 种 rRNA 基因 (12S rRNA 和 16S rRNA)、22 个 tRNA 以及 13 种参与线粒体能量代谢的蛋白质。三斑海马的线粒体基因组结构非常紧凑, 相邻基因间非编码的核苷酸很少甚至没有, 一些相邻基因还存在着碱基重叠现象, 这个结果与其他几种海马的线粒体基因组结构非常相似 (Wang et al. 2014, Zhang et al. 2015a, c)。三斑海马线粒体全基因组序列数据与 Zhang 等 (2015b) 获得的黄带冠海龙 (*Corythoichthys flavofasciatus*) 线粒体全基因组序列数据相比较, 在 D-loop 区和 16S rRNA 分别少了 188 bp 和 253 bp 的核苷酸, 这可能是造成物种差异的重要原因。

本文将三斑海马的线粒体基因组序列与其他种类的海马以及鱼类进行序列比对, 构建了系统进化树, 研究结果支持海马属鱼类为一个单系类群, 其中, 鲍氏海马 (*Hippocampus barbouri*)、虎尾海马 (*H. comes*)、刺海马 (*H. histrix*)、三斑海马聚为一支, 而线纹海马 (*H. erectus*)、大海马 (*H. kuda*) 和太平洋海马 (*H. ingens*)、棘海马 (*H. spinosissimus*) 聚为一支, 这个结果与 Casey 等 (2004) 基于线粒体细胞色素 *b* 基因对海马属鱼类进行系统进化分析的结果完全一致。三斑海马在中国以及东南亚地区分布比较广泛, 是一个温度适应范围比较广的种, 所以在漫长的进化过程中, 三斑海马可能会通过边域种化和临域种化而产生新种 (魏美才等 2010)。

海龙科鱼类的分类问题一直被科学家们广泛关注, 而海马属鱼类作为一种珍贵的海洋药源鱼类, 其分类以及系统进化研究更是国际上研究的热点问题。目前, 关于海马属的物种数目、种间亲缘关系的说法不一, 虽然早期的研究已经积累了一些海马形态学、线粒体个别基因等层面的资料, 但这些研究并没有从线粒体基因组全序列的角度彻底解决海马属内系统发育关系。以往一些研究表明, 在构建鱼类分子系统树时, 所选择的基因或区域不同, 结果往

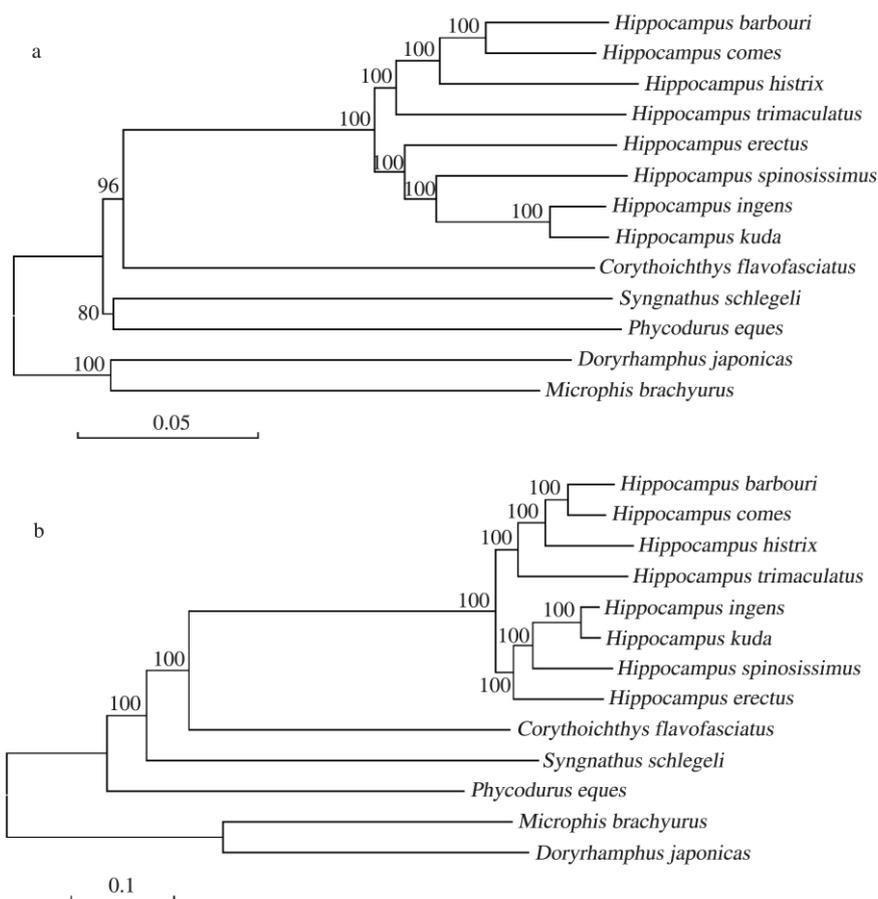


图 2 基于 12 个编码基因的和核苷酸序列构建的三斑海马系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Hippocampus trimaculatus* based on 12 protein-coding genes

a. 邻接法建树; b. 贝叶斯法建树。a. Neighbor-Joining method; b. Bayes method.

a 图中的标尺代表遗传距离, b 图中的标尺代表位点的替换数; 进化树分支节点的数字代表支持率。

Scale bar in figure 2-a refers to genetic distance, scale bar in figure 2-b refers to substitution number of nucleotide per site; The numbers on the branch node refer to support values.

Hippocampus barbouri. 鲍氏海马 (KF712276); *Hippocampus comes*. 虎尾海马 (JX970973); *Hippocampus histrix*. 刺海马 (KJ123693); *Hippocampus trimaculatus*. 三斑海马 (JX682713); *Hippocampus erectus*. 线纹海马 (KF557652); *Hippocampus ingens*. 太平洋海马 (KF680453); *Hippocampus kuda*. 大海马 (AP005985); *Hippocampus spinosissimus*. 棘海马 (KJ123693); *Corythoichthys flavofasciatus*. 黄带冠海龙 (KJ139455); *Syngnathus schlegeli*. 薛氏海龙 (AP012318); *Phycodurus eques*. 叶海龙 (AP012313); *Doryrhamphus japonicas*. 日本海龙 (AP012309); *Microphis brachyurus*. 短尾海龙 (AP005986)。

往受到较大的影响 (邵爱华等 2005)。目前, 线粒体基因组全序列已经被广泛的应用到鱼类的系统发育研究中, Lavoué等 (2005) 利用线粒体基因组全序列对鼠鱈目鱼类进行了分子系统学分析, 结果表明, 硬骨鱼纲为单系, 鼠鱈鱼

目和耳鳔鱼科是姐妹群; Kawahara 等 (2008) 利用线粒体基因组全序列对刺鱼目 (Gasterosteiform) 的 11 个科之间的系统进化关系进行了研究; Lavoué等 (2007) 基于线粒体基因组全序列分析了真骨鱼总目 (Teleostei)

的单系地位和各科之间的系统演化关系; Yamanoue 等(2007)基于 44 种鱼类全序列对鲈形目鱼类在硬骨鱼中的分化地位进行了贝叶斯系统分析。我们在研究中,将线粒体 DNA 全序列的 12 个重链编码蛋白基因所含的系统发育信息用于了解海马属乃至海龙科鱼类系统演化关系,阐明了海马属 8 种海马的系统发育关系,将了解不同海马种间的进化关系提供充足的信息。前期研究主要通过形态学特征或者个别基因进行比较,对于阐明海马属内的系统发育关系尚不完善,线粒体基因组全序列信息的获得可以帮助我们理清海马属内各个种之间的进化关系,为海马起源与进化研究提供更精确证据(Wilson et al. 2001)。以此研究为基础,我们将继续探讨线粒体 DNA 全序列所含的系统发育信息,通过更多海马种间的系统比较来探讨其系统演化关系研究的可信度。

本文所报道的三斑海马的线粒体 DNA 全序列以及对其基因组成和结构的分析都将为三斑海马的资源保护及分子生物学研究提供基础资料。所构建海马系统进化关系为三斑海马的系统进化地位提供了一定的数据支撑,同时也为整个海马属鱼类的进化研究提供了线索。

参 考 文 献

- Brown W M. 1983. Evolution of animal mitochondrial DNAs // Nei M, Koehn R K. Evolution of Genes and Proteins. New York: Sinauer Association Inc Press, 62–88.
- Casey S P, Hall H J, Stanley H F, et al. 2004. The origin and evolution of seahorses (genus *Hippocampus*): a phylogenetic study using the cytochrome *b*, gene of mitochondrial DNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 30(2): 261–272.
- CITES. 2004. Seahorses and other members of the family Syngnathidae (decision 12.54)—Report of the Working Group. AC20 Doc. 17. Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora (CITES), Twentieth meeting of the Animals Committee Johannesburg (South Africa). 29 March - 2 April 2004.
- IUCN. 2003. The IUCN Red List of Threatened Species. [EB/OL]. [2015-02-26]. <http://www.iucnredlist.org>.
- Kawahara R, Miya M, Mabuchi K, et al. 2008. Interrelationships of the 11 gasterosteiform families (sticklebacks, pipefishes, and their relatives): A new perspective based on whole mitogenome sequences from 75 higher teleosts. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46(1): 224–236.
- Koldewey H J, Martin-Smith K M. 2010. A global review of seahorse aquaculture. *Aquaculture*, 302(3/4): 131–152.
- Lavoué S, Miya M, Inoue J G, et al. 2005. Molecular systematics of the gonorynchiform fishes (Teleostei) based on whole mitogenome sequences: implications for higher-level relationships within the Otocephala. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 37(1): 165–177.
- Lavoué S, Miya M, Saitoh K, et al. 2007. Phylogenetic relationships among anchovies, sardines, herrings and their relatives (Clupeiformes), inferred from whole mitogenome sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43(3): 1096–1105.
- Lin Q, Lin J D, Wang C. 2009a. Biochemical composition of the wild and cultured seahorses, *Hippocampus kuda* Bleeker and *H. trimaculatus* Leach. *Aquaculture Research*, 40(6): 710–719.
- Lin Q, Lin J D, Zhang D, et al. 2009b. Weaning of the juvenile seahorses *Hippocampus erectus* Perry, 1810 from live feed to frozen food. *Aquaculture*, 291(3/4): 224–229.
- Lin Q, Zhang D, Lin J D. 2009c. Effects of light intensity, stocking density, feeding frequency and salinity on the growth of sub-adult seahorses *Hippocampus erectus* Perry, 1810. *Aquaculture*, 292(1/2): 111–116.
- Luo W, Qu H Y, Li J Y, et al. 2015. A novel method for the identification of seahorses (genus *Hippocampus*) using cross-species amplifiable microsatellites. *Fisheries Research*, 172(1): 318–324.
- Meyer A. 1994. DNA Technology and phylogeny of fish // Beaumont A R. Genetic and Evolution of Aquatic Organisms. London: Chapman & Hall.
- Wang X, Zhang Y H, Zhang H X, et al. 2014. Complete mitochondrial genome sequence of the longsnout seahorse *Hippocampus reidi* (Ginsburg, 1933; Gasterosteiformes: Syngnathidae). *Mitochondrial DNA*, 25(1): 1–2.
- Wilson A B, Vincent A, Ahnesjö I, et al. 2001. Male pregnancy in

- seahorses and pipefishes (family Syngnathidae): rapid diversification of paternal brood pouch morphology inferred from a molecular phylogeny. *Journal of Heredity*, 92(2): 159–166.
- Yamanoue Y, Miya M, Matsuura K, et al. 2007. Phylogenetic position of tetraodontiform fishes within the higher teleosts: bayesian inferences based on 44 whole mitochondrial genome sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45(1): 89–101.
- Yamanoue Y, Miya M, Matsuura K, et al. 2008. A new perspective on phylogeny and evolution of tetraodontiform fishes (Pisces: Acanthopterygii) based on whole mitochondrial genome sequences: basal ecological diversification? *BMC Evolutionary Biology*, 8(1643): 212.
- Zhang H X, Zhang Y H, Lin Q. 2015a. Complete mitochondrial genome of the pacific seahorse *Hippocampus ingens* Girard, 1858 (Gasterosteiformes: Syngnathidae). *Mitochondrial DNA: The Journal of DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 26(5): 755–756.
- Zhang H X, Zhang Y H, Qin G, et al. 2015b. The complete mitochondrial genome sequence of the network pipefish (*Corythoichthys flavofasciatus*), and the analyses of phylogenetic relationships within the Syngnathidae species. *Marine Genomics*, 19(1): 59–64.
- Zhang Y H, Zhang H X, Lin Q, et al. 2015c. Complete mitochondrial genome sequence of the lined seahorse *Hippocampus erectus* Perry, 1810 (Gasterosteiformes: Syngnathidae). *Mitochondrial DNA: The Journal of DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 26(5): 659–660.
- 郭新红, 刘少军, 刘巧, 等. 2004. 鱼类线粒体 DNA 研究新进展. *遗传学报*, 31(9): 983–1000.
- 赫崇波, 高祥刚, 王效敏, 等. 2007. 圆斑星鲈线粒体基因组全序列结构及其进化. *中国水产科学*, 14(4): 584–592.
- 林强, 吕军仪, 张彬, 等. 2007. 大海马消化系统胚后发育的形态学及组织学研究. *热带海洋学报*, 26(6): 46–51.
- 邵爱华, 朱江, 陈葵, 等. 2005. 暗纹东方纯线粒体 CO II 及两侧 tRNA 基因的克隆和序列分析. *动物学杂志*, 40(6): 1–8.
- 魏美才, 聂海燕, 牛耕耘. 2010. 同域物种形成: 物种演化和形成的基本模式. *中南林业科技大学学报*, 30(3): 1–11.
- 肖武汉, 张亚平. 2000. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化. *水生生物学报*, 24(4): 384–391.
- 杨琴玲, 李思发, 徐嘉伟, 等. 2009. 鳊的线粒体基因组核苷酸全序列分析. *生物技术通报*, 2(2): 112–117.