

# 运用线粒体 CO I 基因分析 8 种石珊瑚系统发育关系

李晓娜 刘 丽\* 刘楚吾

(广东海洋大学水产学院 南海水产经济动物增养殖广东省普通高校重点实验室, 湛江 524025)

**摘 要** 通过 CO I 基因特异扩增测序, 对徐闻地区的 8 种石珊瑚 CO I 基因片段序列进行了比较分析。结果表明, 该片段的平均 G+C 含量为 41.60%。其中, 第 1 密码子位点的含量最高(42.26%~44.05%, 平均为 43.45%); 转换和颠换多发生在第 3 密码子位点, 比例高达 70.30% 和 72.70%。采用邻位连接(NJ)、最小进化(ME)和最大似然(ML)法对本研究中徐闻的 8 种及引自 GenBank 的 20 种石珊瑚 CO I 基因片段构建了系统发育树。结果显示, 分子系统分类与传统分类略有差异, 暗示珊瑚表型可塑性可能对传统分类存在影响。

**关键词** 石珊瑚 线粒体 CO I 分子系统分类

中图分类号 Q951<sup>+</sup>.3 文献标识码 A 文章编号 1000-7075(2012)04-0083-06

## Phylogenetic relationship in 8 species of Scleractinian coral based on CO I sequences

LI Xiao-na LIU Li\* LIU Chu-wu

(Key Laboratory of Aquaculture in South China Sea for Aquatic Economic Animal, Regular High Education Institution of Guangdong Province, Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025)

**ABSTRACT** Partial sequences of CO I genes from 8 species of Scleractinian in Xuwen area, Guangdong Province, were amplified and sequenced, and the base ratio and variations were analyzed. The result indicated that the average G+C content of this region accounted for 41.60%, while the codon position 1 was the highest, in the range of 42.26%~44.05% (43.45% in average). The proportion of transition and transversion was 70.30% and 72.70% respectively in codon position 3. The phylogenetic trees were also constructed based on CO I genes of these 8 samples and other 20 Scleractinian species recorded in GenBank. According to the Neighbour-joining, minimum-evolution and maximum-likelihood trees, molecular systematics was slightly different from the morphological conclusion, which suggested that morphological classification may be limited by coral skeletons plasticity. Consequently, the CO I gene is one of the auxiliary tools to classify the phylogeny of Scleractinia.

**KEY WORDS** Scleractinian CO I Molecular systematics

国家海洋公益性行业科研专项(201105012)、广东省自然科学基金(S2011010000269)和广东省海洋渔业科技推广专项(A200908F01)共同资助

\* 通讯作者。E-mail: zjouliuli@163.com, Tel: 13828208595

收稿日期: 2011-09-18; 接受日期: 2011-11-01

作者简介: 李晓娜(1987-), 女, 硕士研究生, 主要从事海洋水产动物发育生物学研究。E-mail: lixiaona.cn@163.com, Tel: 13822544363

珊瑚礁生态系统是地球上第二大生态系统,进入20世纪后珊瑚礁在世界范围内的大面积白化、消失引起了广泛关注而成为研究的热点(Bellwood *et al.* 2004; Hoegh-Guldberg *et al.* 2007; Wilkinson 2004)。珊瑚礁礁体主要由石珊瑚构成,石珊瑚的种类多样性和分布趋势能够帮助分析珊瑚礁对于海洋环境变化的响应机制。因此,必须对珊瑚物种(种、属、家系)进行准确描述,才能避免对物种多样性的错误估计(Ann *et al.* 2010)。

利用珊瑚群体形态及其骨骼或微结构的特征对珊瑚进行分类曾是分类学家最常用的研究手段,然而,近年来的研究发现,珊瑚尤其是石珊瑚的分类存在以下问题:珊瑚骨骼及其微结构的发育会受到外部环境的局限,使其外部形态具有一定的可塑性(Forsman *et al.* 2009);许多珊瑚分类群在亚目水平存在并系类群(齐文同等 2008; Huang *et al.* 2009)。传统分类受到的限制导致石珊瑚的分类及系统发育研究在分类学和发育生物学界一直存在争议。而分子分类在传统分类的基础上能够揭示出内在的系统发生关系,准确揭示物种之间的区别与联系,因此有必要将分子生物学标记手段补充到石珊瑚形态学系统分类的研究中。

近年来,依赖DNA分子标记研究手段有效地解决了生物的分类问题,核DNA及线粒体DNA(mtDNA)在珊瑚的研究中均有运用。其中,mtDNA因具有可以如实反映出母系进化历史的一系列特点,而被广泛接受为种系发生研究的遗传标记(张广军等 2002)。细胞色素C氧化酶亚基I(Cytochrome Oxidase subunit I, COI)、细胞色素b(Cyt b)基因等在许多物种的研究中均有相关报道。自2003年始,Hebert等(2003)等通过分析动物界11个门13320个物种的研究结果发现,线粒体COI基因靠近5'端的一段序列因同时具有保守性和较高的变异率,能够对动物界的物种进行有效的鉴定,COI基因由此成为应用最广泛的分子标记。

徐闻珊瑚礁是中国大陆架上唯一的一片大面积珊瑚岸礁,珊瑚礁区面积达10867 hm<sup>2</sup>,其中密集区约6000 hm<sup>2</sup>,且连片面积大、种类密集,目前已发现腔肠动物门Cnidaria、珊瑚虫纲Anthozoa共3目19科82种。但目前对其分子系统发育的研究却鲜有报道。本研究利用COI基因对徐闻常见的8种石珊瑚进行分子系统分类,旨在为徐闻地区石珊瑚的研究及保护计划的制定提供参考资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 样品的获得

8种石珊瑚(戴昌凤等 2009)(表1),于2010年7月~2011年4月,采集于广东省徐闻珊瑚礁国家级自然保护区(20°10'36"~20°27'00"N),加冰包装运回实验室-20℃保存。用苯酚/氯仿抽提法(卢圣栋 1999)提取总DNA,4℃保存备用。

表1 珊瑚样品

Table 1 Coral samples

科 Family	属 Genus	种 Species
滨珊瑚科 Poritidae	滨珊瑚属 <i>Porites</i>	柱形滨珊瑚 <i>Porites cylindrica</i>
		澄黄滨珊瑚 <i>Porites lutea</i>
蜂巢珊瑚科 Faviidae	角孔珊瑚属 <i>Goniopora</i>	二异角孔珊瑚 <i>Goniopora duo facia</i>
	刺星珊瑚属 <i>Cyphastrea</i>	锯齿刺星珊瑚 <i>Cyphastrea serailia</i>
木珊瑚科 Dendrophylliidae	筒星珊瑚属 <i>Tubastrea</i>	橙杯珊瑚 <i>Tubastrea aurea</i>
裸肋珊瑚科 Merulinidae	刺柄珊瑚属 <i>Hydnophora</i>	邻基刺柄珊瑚 <i>Hydnophora contignatio</i>
菌珊瑚科 Agariciidae	牡丹珊瑚属 <i>Pavona</i>	叶形牡丹珊瑚 <i>Pavona frondifera</i>
枇杷珊瑚科 Oculinidae	盔形珊瑚属 <i>Galaxea</i>	丛生盔形珊瑚 <i>Galaxea fascicularis</i>

### 1.2 主要仪器及试剂

高速冷冻离心机:SIGMA3K30 PCR扩增仪:Bio-Rad S1000, TaqDNA聚合酶、dNTP、蛋白酶K为宝生物工程(大连)有限公司产品,引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

### 1.3 引物设计、PCR 及序列测定

使用 Primer 5 软件以 *Favites* sp. 部分 COI 序列为模板设计得到引物:

PCO I F: 5-TGC TCG GTA CAG CCT TCA GT-3'

PCO I R: 5-GC TAA TAC GGG CAA AGA CAA-3'

PCR 反应体系:10×Buffer(含  $Mg^{2+}$ ) 2.5  $\mu$ l,dNTPs 2  $\mu$ l,上下游引物(5  $\mu$ mol/L)各 1  $\mu$ l, rTaqDNA 聚合酶 0.2  $\mu$ l,总 DNA 约 50 ng,补超纯水至 25  $\mu$ l。

PCR 反应程序:94  $^{\circ}$ C 变性 5 min;94  $^{\circ}$ C 变性 45 s,56  $^{\circ}$ C 退火 45 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共 35 个循环;最后 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后送生工生物工程(上海)有限公司测序。

### 1.4 序列校正与比对

测序结果输入 Chromos 软件检验其测序峰图质量,并进行人工校正。将得到的序列通过 Contigexpress 软件(Vector NTI Advance11)进行拼接后在 NCBI 上运行 BLAST 程序进行序列同源性比较,以确保所获得的序列是目标序列。运用 MEGA 4.1 对各物种同源性进行多重序列比对,并分析各基因序列的碱基组成和变异转换与颠换比。基于邻接(Neighbor-Joining, NJ)、最小进化(Minimum-Evolution, ME)和最大似然(Maximum-Likelihood, ML)3 种方法构建系统发育树。Bootstrap 法运行 1 000 次进行检验。

## 2 结果与分析

### 2.1 序列分析

#### 2.1.1 序列碱基组成

通过 PCR 扩增,获得石珊瑚目的 6 科 7 属 8 种石珊瑚的线粒体 COI 基因 5' 端保守性较高的 503 bp 片段,该片段编码 167 个氨基酸,比对结果显示,序列间同源性在 89.1%~98.8% 之间,没有任何碱基的插入、缺失。平均碱基组成为 A:20.73%、T:37.67%、G:23.63%、C:17.97%,A+T 含量(58.4%) 高于 G+C (41.6%)。从表 2 可以看出,密码子第 2 位、第 3 位的 T 碱基含量显著高于其他碱基的频率,而第 1 密码子位点的 G+C 含量最高,达到 43.45%,密码子第 3 位的 G+C 含量为 39.45%,是 3 个位点中最低的,暗示线粒体蛋白质编码基因的一个显著特征即为核苷酸碱基构成的偏倚。

表 2 8 种珊瑚的 COI 基因部分序列中各碱基平均分布频率(%)

Table 2 Average nucleotide frequency of COI partial sequences of the 8 corals species (%)

碱基 Base	总频率 Total frequency	1st 位点 1st site	2nd 位点 2nd site	3rd 位点 3rd site
A	20.73	27.53	13.62	21.03
T	37.67	29.02	44.49	39.52
C	17.97	15.55	25.74	12.57
G	23.63	27.90	16.15	26.87

#### 2.1.2 变异位点

核苷酸变异情况见表 3。其中不变位点第 2 密码子位点最多,为 183 个;而转换位点和颠换位点第 3 密码子位点最多,分别占有所有转换和颠换位点的 70.30%和 72.70%。

#### 2.1.3 密码子位点 G+C 含量

8 种石珊瑚的 COI 基因片段平均 G+C 含量(表 4)为 41.35%~41.95%,其中第 3 密码子的 G+C 含量变化范围最大(37.72%~40.72%),第 1 密码子位点的 G+C 含量最高,其次是第 2 密码子位点的含量,最低的是第 3 密码子位点。

表 3 8 种珊瑚的 CO I 部分序列各密码子碱基变异情况

Table 3 Sequences variation of CO I gene of the 8 coral species

密码子位点 Codon position	不变位点(个) Identical pairs( <i>ii</i> )	转换位点(个) Transitional pairs( <i>si</i> )	颠换位点(个) Transversional pairs( <i>sv</i> )	$R=si/sv$
1st 位点 1st site	174	8	5	1.61
2nd 位点 2nd site	183	3	1	1.70
3rd 位点 3rd site	146	26	16	1.65
全部位点 All sites	503	37	22	1.65

表 4 8 种珊瑚 CO I 基因密码子位点 G+C 含量

Table 4 The G+C content for the 8 coral species in all CO I codon position

物种 Species	平均 G+C 含量 Average content of G+C(%)			
	全部位点 All sites	1st 位点 1st site	2nd 位点 2nd site	3rd 位点 3rd site
柱形滨珊瑚 <i>Porites cylindrica</i>	41.95	44.05	41.67	40.12
澄黄滨珊瑚 <i>Porites lutea</i>	41.55	44.05	42.86	37.72
二异角孔珊瑚 <i>Goniopora duofaciata</i>	41.95	44.05	42.26	39.52
锯齿刺星珊瑚 <i>Cyphastrea serailia</i>	41.35	42.86	42.26	38.92
橙杯珊瑚 <i>Tubastrea aurea</i>	41.35	42.86	42.26	38.92
邻基刺柄珊瑚 <i>Hydnophora contignatio</i>	41.75	43.45	41.07	40.72
叶形牡丹珊瑚 <i>Pavona frondifera</i>	41.35	44.05	41.67	38.32
丛生盔形珊瑚 <i>Galaxea fascicularis</i>	41.55	42.26	41.07	41.32
平均 Average	41.60	43.45	41.89	39.45

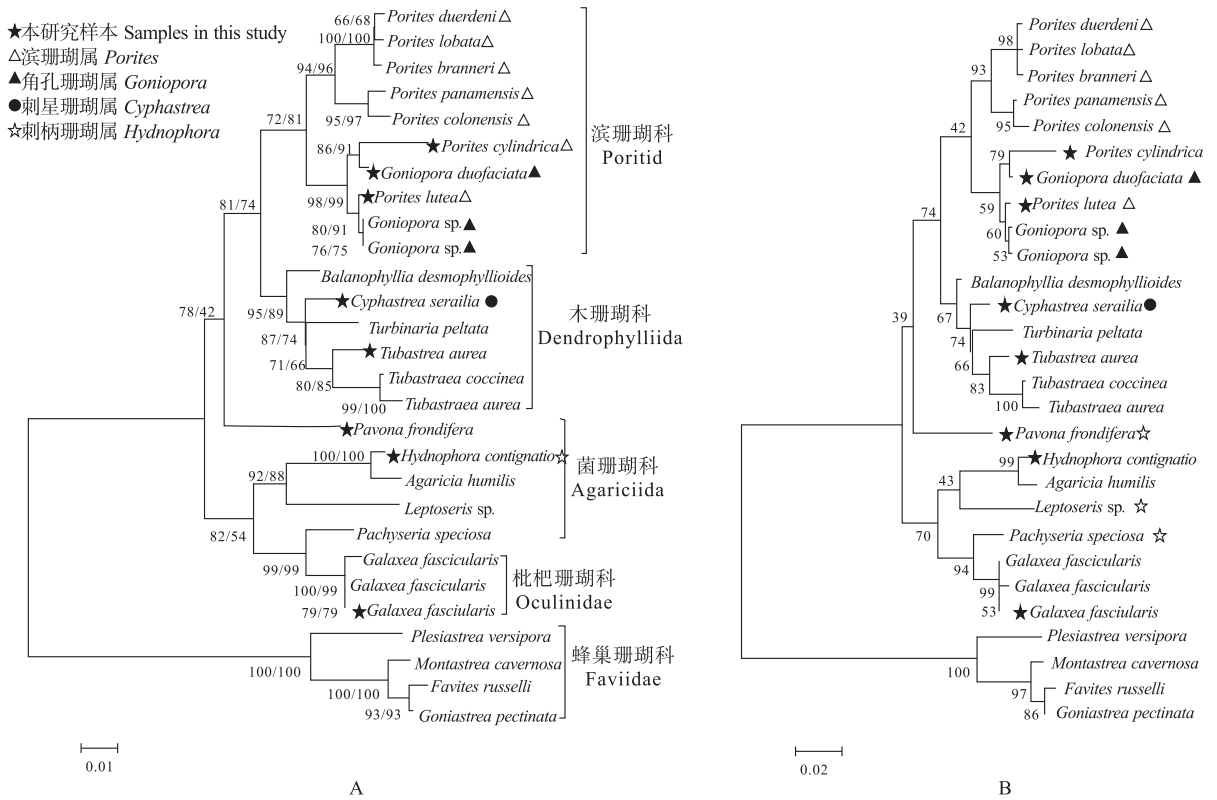
## 2.2 系统发育树

采用 NJ、ME 和 ML 法对本研究中徐闻的 8 种及引用自 GenBank 的 20 种石珊瑚的 CO I 基因序列(表 5)构建了系统发育树,其中 NJ、ME 得到一致的拓扑结构,本研究在 NJ 树置信度后标注出 ME 结果;ML 树与前二者在分支长度以及滨珊瑚科顶端和枇杷珊瑚科的分支结构上略有差别(图 1)。

表 5 引自 GenBank 的 20 种珊瑚名称及序列号

Table 5 Sequence names and number of 20 species of coral from GenBank

物种 Species	GenBank 登录号 GenBank Accession No.	物种 Species	GenBank 登录号 GenBank Accession No.
<i>Goniopora</i> sp.	AB441241.1	<i>Porites duerdeni</i>	FJ423977.1
<i>Balanophyllia desmophyllioides</i>	HM018607.1	<i>Porites lobata</i>	FJ423973.1
<i>Turbinaria peltata</i>	AB441240.1	<i>Porites panamensis</i>	FJ423990.1
<i>Tubastraea coccinea</i>	DQ445807.1	<i>Porites colonensis</i>	FJ423972.1
<i>Tubastraea aurea</i>	AB441237.1	<i>Porites branneri</i>	FJ423992.1
<i>Agaricia humilis</i>	AB441219.1	<i>Favites russelli</i>	HQ203266.1
<i>Galaxea fascicularis</i>	AB441202.1	<i>Goniastrea pectinata</i>	AB117270.1
<i>Pachyseris speciosa</i>	AB441222.1	<i>Goniopora</i> sp.	AB441241.1
<i>Leptoseris</i> sp.	AY451373.1	<i>Montastrea cavernosa</i>	AF108714.1
<i>Galaxea fascicularis</i>	AB441021.1	<i>Plesiastrea versipora</i>	AB289561.1



A. Phylogenetic trees reconstructed using NJ based on partial CO I sequence data (the confidence result of ME is shown behind); B. Phylogenetic trees reconstructed using ML based on partial CO I sequence data

图 1 系统发育树

Fig. 1 Phylogenetic trees

### 3 讨论

#### 3.1 CO I 序列碱基组成

实验中 8 种珊瑚 CO I 基因片段核苷酸碱基构成偏倚的情况与刘 丽等(2011)利用 Cyt b 对 10 种珊瑚的研究结果相似。所研究的 8 种珊瑚密码子变异多发生在第 3 位,分别占有转换和颠换位点的 70.3%和 72.7%,而密码子第 3 位点所发生的碱基替换不易引起氨基酸的突变,且碱基替换主要是同义替换,由此可以解释 CO I 基因编码的蛋白质在石珊瑚中进化较为缓慢的现象。

#### 3.2 系统发育关系

3 种方法构建系统发育树得到了相似的拓扑结构,由于 3 种方法有不同的基本假设和优缺点,所以存在结构和分支长度的差别。本研究的 8 种珊瑚中,除了裸肋珊瑚科的邻基刺柄珊瑚在 GenBank 筛选引用珊瑚种时未找到与其临近种的相关序列外,其余 7 种珊瑚均有近缘种。从用 CO I 构建的 3 种进化树可以看出,在这 7 种珊瑚中,除菌珊瑚科的叶形牡丹珊瑚 *Pavona frondifera* 外,均和其亲缘关系较近的外缘种聚在一起,和传统的形态分类结果基本一致。但是聚为一大支的滨珊瑚科的几种珊瑚中出现了聚类异常的现象:1)在形态学分类中本应分别属于滨珊瑚属和角孔珊瑚属的柱形滨珊瑚 *Porites cylindrica* 和二异角孔珊瑚 *Goniopora duofaciata* 在 3 种树中均聚为一支,并且在 1 000 次的自展检测中均有较高的置信度;2)澄黄滨珊瑚 *Porites lutea* 同样与另两种角孔珊瑚 *Goniopora* sp. 聚在了一支。类似聚类异常现象在刘 丽等(2011)以 *Cyt b* 序列

作分子标记的研究中也出现过,珊瑚骨骼生长的环境可塑性造成珊瑚内部真实亲缘关系模糊的原因是目前关于滨珊瑚分类难题较为被众研究者普遍认可的解释(Zac *et al.* 2009; Peter 2008; Todd 2008; Fukami *et al.* 2004a; Veron 2000)。虽然角孔珊瑚和滨珊瑚已经在形态上产生了较大的分歧,但是从线粒体基因标记的研究中却看不到明显的分化,也可能是由于珊瑚线粒体基因的进化速率过于缓慢(Huang *et al.* 2008; 张广军等 2002),不能准确反映滨珊瑚科部分种在近期的进化演替造成的。另外,目前珊瑚分子系统发育研究处于早期阶段,针对滨珊瑚科的分子分类研究数据较少,该推测是否成立还需进一步的系统实验进行验证。对珊瑚的科间关系进行分析时,木珊瑚科与滨珊瑚科先聚为一支,再与其他珊瑚进行聚类这一现象,验证了利用 Cyt b(刘 丽等 2011)标记和线粒体 16S 核糖体标记对石珊瑚分类研究中的结论(Sandra *et al.* 1997)。

裸肋珊瑚科刺柄珊瑚属的邻基刺柄珊瑚聚在了菌珊瑚科中,而刘 丽等(2011)、Romano 等(1997)认为刺柄珊瑚属与蜂巢珊瑚科亲缘关系更近,台湾学者戴昌凤等(2009)也认为,应将刺柄珊瑚属归入蜂巢珊瑚科。由于在 GenBank 中未找到与邻基刺柄珊瑚临近种的相关序列,因此该珊瑚是否会归于裸肋珊瑚科的相关证据暂时无法获得,另外多篇研究报道中提到蜂巢珊瑚科存在侧系水平的分支进化,亲缘关系较为复杂(Huang *et al.* 2009; Fukami *et al.* 2004b),也许本研究中所引用蜂巢珊瑚科的序列恰好是与刺柄珊瑚属关系较远的,从而出现了新的聚类情况,因此后续研究将增加线粒体 CO I 基因对蜂巢珊瑚科的分类适用性分析。

## 参 考 文 献

- 卢圣栋. 1999. 现代分子生物学实验技术. 北京:中国协和医科大学出版社, 61
- 刘 丽,陈育盛,李晓娜,申玉春,刘楚吾. 2011. 基于线粒体 Cyt b 基因的 10 种石珊瑚系统发育关系. 广东海洋大学学报(自然科学版),31(1):6~11
- 齐文同,柯叶艳,顾红雅. 2008. 石珊瑚演化的 18S rDNA 分子生物学和形态学研究. 北京大学学报(自然科学版),44 (2):171~176
- 张广军,邱持平,邱东川,夏明仪. 2002. 基于线粒体基因分析的中华血吸虫分子种系发生研究. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志,20(1):10~13
- 戴昌凤,洪圣雯. 2009. 台湾珊瑚图鉴. 台北市:猫头鹰出版社,153
- Bellwood, D. R., Hughes, T. P., Folke, C., and Nyström, M. 2004. Confronting the coral reef crisis. *Nature*, 429: 827~833
- Budd, A. F., Romano, S. L., Smith, N. D., and Barbeitos, M. S. 2010. Rethinking the phylogeny of scleractinian corals: A review of morphological and molecular Data. *Integrative and Comparative Biology*, 50(3): 411~427
- Forsman, Z. H., Barshis, D. J., Hunter, C. L., and Toonen, R. J. 2009. Shape-shifting corals: Molecular markers show morphology is evolutionarily plastic in *Porites*. *BMC Evolutionary Biology*, 9:45
- Fukami, H., Budd, A. F., Levitan, D. R., Jara, J., Kersanach, R., and Knowlton, N. 2004a. Geographic differences in species boundaries among members of the *Montastraea annularis* complex based on molecular and morphological markers. *Evolution*, 58(2):324~337
- Fukami, H., Budd, A. F., Paulay, G., Paulay, G., Solé-Cava, A., Chen, C. A., Iwao, K., and Knowlton, N. 2004b. Conventional taxonomy obscures deep divergence between Pacific and Atlantic corals. *Nature*, 427: 832~835
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., and deWaard, J. R. 2003. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proceedings of the Royal Society B. London. Biological Sciences (Suppl.)*, 270:96~99
- Hoegh-Guldberg, O., Mumby, P. J., Hooten, A. J., Steneck, R. S., Greenfield, P., Gomez, E., Harvell, C. D., Sale, P. F., Edwards, A. J., Caldeira, K., Knowlton, N., Eakin, C. M., Iglesias-Prieto, R., Muthiga, N., Bradbury, R. H., Dubi, A., and Hatziolos, M. E. 2007. Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science*, 318:1 737~1 742
- Huang, D., Meier, R., Todd, P. A., and Chou, L. M. 2009. More evidence for pervasive paraphyly in scleractinian corals-Systematic study of South-east Asian Faviidae(Cnidaria Scleractinia) based on molecular and morphological data. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 50:102~116
- Huang, D., Meier, R., Todd, P. A., and Chou, L. M. 2008. Slow mitochondrial CO I Sequence evolution at the base of the Metazoan tree and its implications for DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66:167~174
- Romano, S. L., and Palumbi, S. R. 1997. Molecular evolution of a portion of the mitochondrial 16S ribosomal gene region in Scleractinian Corals. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 45(4):397~411
- Shearer, T. L., van Oppen, M. J. H., Romano, S. L., and Wörheide, G. 2002. Slow mitochondrial DNA sequence evolution in the Anthozoa (Cnidaria). *Molecular Ecology*, 11(12):2 475~2 487
- Todd, P. A. 2008. Morphological plasticity in scleractinian corals. *Biological Reviews*, 83(3): 315~337
- Veron, J. 2000. Corals of the World, Volume 3. Australia: Australian Institute of Marine Science
- Wilkinson, C. 2004. Status of coral reef of the world. Townsville: Australian Institute of Marine Science Press, 1~316