

长江水系不同水体鳊 mtDNA 控制区序列的遗传分析*

赵金良¹, 李思发¹, 蔡完其¹, 王伟伟¹, 杨晓发², 程久发³, 钱叶洲³, 吴超³

(1: 上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090)

(2: 安徽省池州市贵池水产局, 池州 247100)

(3: 安徽省池州市白沙湖联营渔场, 池州 247100)

摘要:对长江水系洞庭湖、鄱阳湖、秋浦河和太湖 4 个鳊群体共 42 尾的 mtDNA 控制区核苷酸序列进行了测定, 获得了长度 785 bp 的同源序列。4 个群体中共检测到变异位点 36 个, 占全部序列 4.6%。42 个体中共检测到 19 种单倍型, 根据碱基组成特征, 19 种单倍型可分为两大类型: I 型和 II 型。两大类型的主要区别在第 6、8、17、25、35 变异位点上, I 型的核苷酸分别为 G、C、G、A、C, II 型为 A、T、A、G、T。除太湖群体全部表现为 II 型单倍型外, 不同水体鳊两大单倍型的分布频率并无明显的地理变化规律。洞庭湖、鄱阳湖、秋浦河和太湖鳊群体内的核苷酸序列差异分别为 0.5%、1.0%、0.6%、0.5%, 群体间的遗传差异为 0.6% - 0.9%。利用控制区核苷酸序列构建的 NJ 分子树中, 各群体内的个体均未单独成群, 而是互有交叉。由于遗传分化低, 初步认为洞庭湖、鄱阳湖、秋浦河和太湖鳊群体可能同属一个种群——长江种群。

关键词:鳊; 长江; mtDNA; 控制区; 序列分析

Analysis on mitochondrial DNA control region sequence of *Siniperca chuatsi* from different sections of the Yangtze River

ZHAO Jinliang¹, LI Sifa¹, CAI Wanqi¹, WANG Weiwei¹, YANG Xiaofa², CHENG Jiufa³, QIAN Yezhou³ & WU Chao³

(1: Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecosystem Certificated by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, P. R. China)

(2: Chizhou Fisheries Bureau, Chizhou 247100, P. R. China)

(3: Baishahu Union Fish Farm, Chizhou 247100, P. R. China)

Abstract: The mitochondrial DNA control region of *Siniperca chuatsi* stocks collected from the Lake Dongting (DT), Lake Poyang (PY), Qiupu River (QP) and Lake Taihu (TH) of the Yangtze River were amplified with PCR technique and DNA sequencing. The result showed 36 nucleotide sites were variable among 785 bp length of homologous sequence. A total of 19 haplotypes found in all 42 individuals could be grouped into two groups: type I and type II, of which 6 sites were significant differentiated. Nucleotide at the 6th, 8th, 17th, 25th, 35th variable position was G, C, G, A, C in type I, while A, T, A, G, T in type II. Regular geographical changes of the haplotype distribution was not observed in different sections along the Yangtze River except for TH possessing only type II haplotypes. Sequence divergence of control region of *S. chuatsi* within DT, PY, QP, TH stock was 0.5%, 1.0%, 0.6%, 0.5%, respectively. Sequence divergence among the 4 populations was 0.6% - 0.9%. Molecular tree constructed by NJ method showed the individuals of the different stocks couldn't be clustered as one independent group and mixed to each other. The lower divergence among 4 stocks suggested they maybe belong to one single the Yangtze River population. These results could be served as base for further study on the genetic diversity of *S. chuatsi*, genetic conservation and utilization of the Yangtze River population.

Keywords: *Siniperca chuatsi*; the Yangtze River; mtDNA; control region; sequencing

* 上海市重点学科建设项目(Y1101)和上海水产大学水产养殖重点学科开放课题(04SC11)资助。2006-01-23 收稿; 2006-03-13 收修改稿。赵金良, 男, 1969 年生, 硕士, 副教授, E-mail: jlzhao@shfu.edu.cn.

鳊 *Siniperca chuatsi* (Basilewsky) 又称桂鱼、胖鳊、翘嘴鳊等,其肉质鲜嫩,滑爽少刺,富含人体必需氨基酸,为中外驰名的淡水名贵鱼类。鳊为东亚特有种类,主要分布在我国各大江河、湖泊和水库中,其中以长江流域资源最为丰富^[1-4]。受水域污染、气候变化、过度捕捞等影响,自上世纪 70 年代起,鳊野生资源急剧下降,在华北部分地区面临绝迹^[5]。近年来,由于我国南方养殖地区鳊病害的大面积暴发^[6],研究开发和保护长江水系鳊资源越显重要和迫切。然而,目前关于鳊的遗传特性和遗传多样性研究十分薄弱^[7-10]。

控制区又称 D-环区,位于 tRNA^{Phe} 和 tRNA^{Phe} 基因之间,是整个线粒体 DNA 序列中变异最大的区域,但其中也包含有保守片段。利用 mtDNA 控制区高度变异区包含的大量信息,在鱼类分类、系统发育、群体遗传学等方面已有广泛的应用^[11,12]。为此,本研究拟通过测序法获得长江水系洞庭湖、鄱阳湖、秋浦河和太湖 4 个水体鳊 mtDNA 控制区的核苷酸序列,了解不同水体鳊的遗传特征和遗传差异,为长江水系鳊资源开发、管理和保护提供基础资料和依据,进一步丰富鳊的遗传多样性研究内容。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验所用的材料鳊分别取自长江中游洞庭湖(11 尾)、鄱阳湖(10 尾)、下游秋浦河(11 尾)(安徽池州境内)、太湖(10 尾),取样品的尾鳍浸入 95% 的酒精中固定和保存。

1.2 基因组 DNA 的提取

取 20-30 mg 鱼尾,剪碎。待酒精完全挥发后,用蛋白酶 K 消化、酚-氯仿法提取总 DNA,用 0.8% 琼脂糖凝胶进行电泳检测。

1.3 基因扩增与测序

本实验中控制区扩增使用的引物为:P1(5' - CACGTTCTCGAACCTTCCTT - 3') 和 P2(5' - TTAATC-CCACCCCTGGCT - 3'),由上海生工生物工程技术有限公司合成。PCR 反应体系为 50 μ l:模板 DNA 2 μ l,10 \times Buffer 5 μ l,dNTP 2 μ l(2.5 mmol/ μ l),引物 P1 2 μ l(10 pmol/ μ l),引物 P2 2 μ l(10 pmol/ μ l),Taq DNA 聚合酶 1 μ l(2.5 U/ μ l),用去离子灭菌水补足 50 μ l。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 45s,45 $^{\circ}$ C 复性 45s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min;4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测。特异扩增片断产物纯化后,由上海生工生物工程技术有限公司用 ABI 377 自动测序仪进行序列测定。

1.4 序列分析

使用 BIOEDIT 软件中的 Clustal W 程序^[13],将测序得到控制区的序列进行多序列比对。使用 MEGA 3.0 软件^[14]进行分析,统计变异位点并分析单倍型,计算群体内和群体间的遗传差异。用邻连法(NJ)构建其分子亲缘关系树,系统树各分支的置信度由 1000 次自举法(Bootstrap)检验。

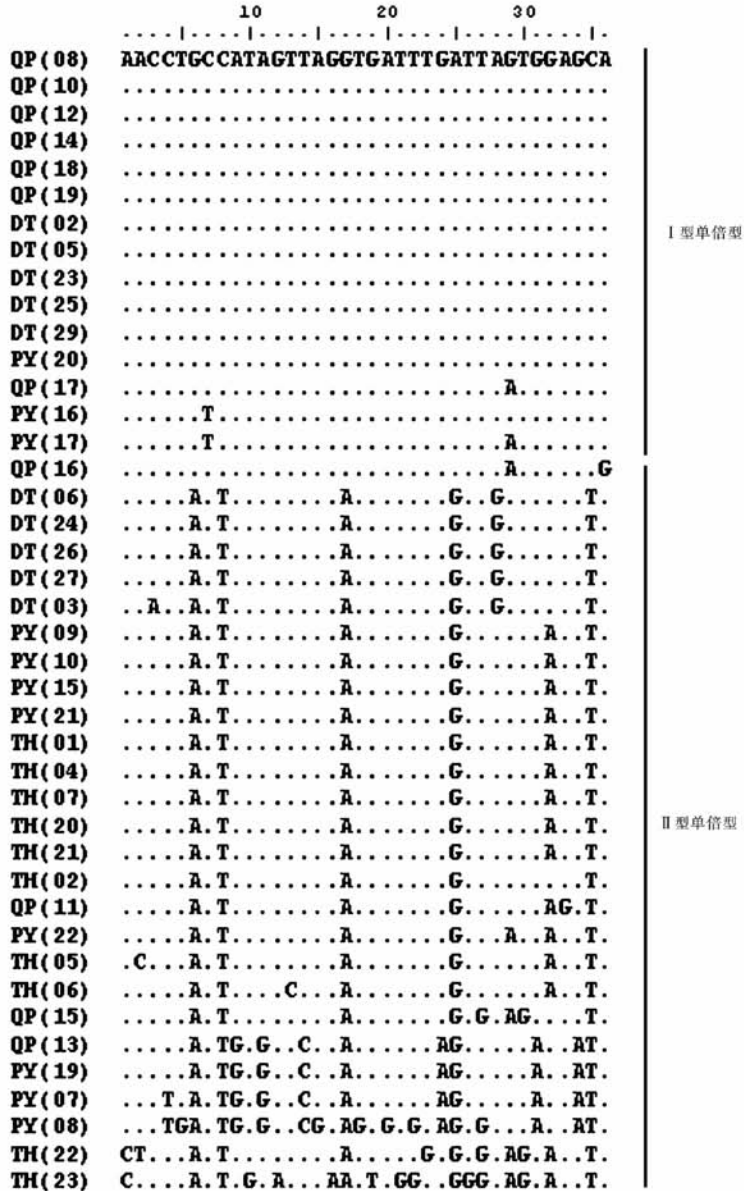
2 结果

将 4 个水体鳊 42 个体的 mtDNA 控制区序列片段经多序列比对,删去首尾两侧部分模糊序列,共获得长度为 785 bp 的同源序列,序列中未发生插入或缺失。四个水体中检测到变异位点为 36 个,占全部序列的 4.6%。其中转换位点 24 个,颠换位点 12 个(图 1)。42 个体中共检测到 19 种单倍型,根据碱基组成特征,可分为两大类型 I 和 II 型,I 型含 5 种,II 型含有 14 种,两大类型的主要区别在第 6、8、17、25、35 变异位点上,I 型碱基分别为 G、C、G、A、C,而 II 型为 A、T、A、G、T。

表 1 长江不同水体鳊控制区的核苷酸序列差异

Tab. 1 Sequence divergence of control region within and among 4 stocks of *S. chuatsi* from the Yangtze River

	洞庭湖	鄱阳湖	秋浦河	太湖
洞庭湖	0.005			
鄱阳湖	0.008	0.010		
秋浦河	0.006	0.009	0.006	
太湖	0.008	0.008	0.009	0.005



I型单倍型

II型单倍型

图 1 长江不同水体鳊 mtDNA 控制区序列变异位点和单倍型

(DT:洞庭湖, PY:鄱阳湖, QP:秋浦河, TH:太湖, 括号内为样品编号)

Fig. 1 Variable sites of mtDNA control region and haplotypes of 4 stocks of *S. chuatsi* from the Yangtze River

两大单倍型在不同群体中的分布频率情况为 I 型单倍型: 洞庭湖 5/10、鄱阳湖 3/11、秋浦河 8/11; II 型单倍型: 洞庭湖 5/10、鄱阳湖 8/11、秋浦河 3/11、太湖 10/10。其中, 太湖群体全部表现为 II 型。

4 个水体群体内和群体间的遗传差异见表 1。洞庭湖、鄱阳湖、秋浦河和太湖鳊群体内的核苷酸序列差异分别为 0.5%、1.0%、0.6%、0.5%。4 个水体群体间的遗传差异为 0.6%–0.9%。

根据控制区核苷酸序列构建了不同水体鳊的分子亲缘关系树(图 2)。不同水体鳊的个体可分为两大

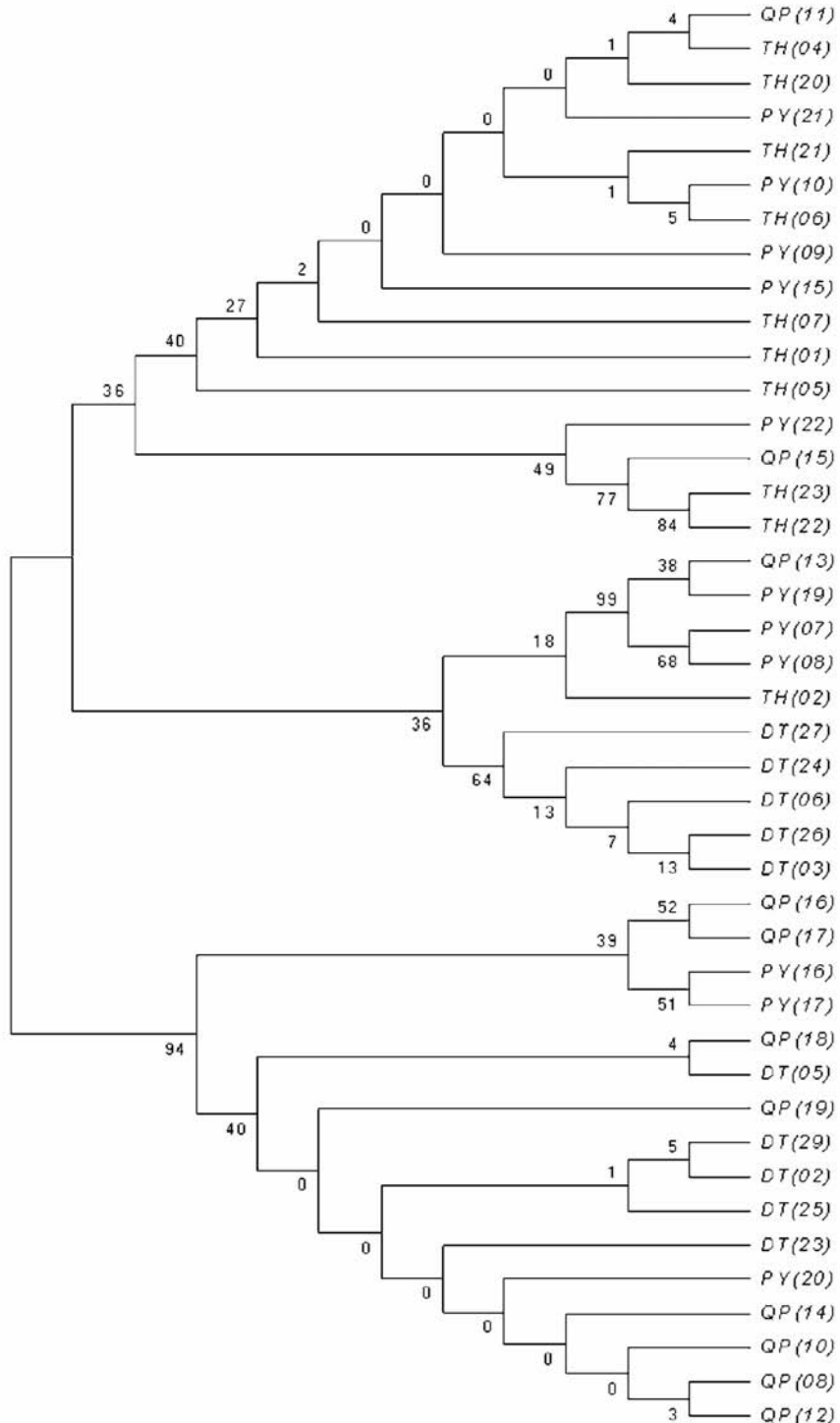


图2 长江水系不同水体鳊控制区的NJ聚类图

Fig.2 NJ tree based on the control region of 4 stocks of *S. chuatsi* from the Yangtze River

类,与两大单倍型 I、II 吻合,但不同群体内个体均未单独成群,互有交叉。

3 讨论

线粒体 DNA 控制区包含与 DNA 复制和转录相关的序列,结构上较为复杂,一般可分为 3 个区:终止结合序列区(Termination Associated Sequences, TAS)、中央保守区(Central Conserved Domain)和保守序列区(Conserved Sequence Block, CSB)^[12]。此前,我们已报道了鳊类控制区的结构分析^[15]。

由于控制区为 mtDNA 的非编码区域,也是 mtDNA 长度变异和位点变异程度最高的区域。本研究结果表明,洞庭湖、鄱阳湖、秋浦河和太湖鳊间控制区的变异位点数仅为 4.6%,群体内的遗传差异为 0.5% - 1.0%,不同群体间的遗传差异为 0.6% - 0.9%。这表明长江水系不同水体间的遗传变异水平低,分化程度不高,低于种(不同鳊种间变异位点 22.4%^[15])、种群(斑鳊不同水系间的变异位点 13.7%^[16])以下水平。杨受保等^[9]对长江、安徽池州秋浦河、安徽舒城万佛湖的鳊群体进行了 RAPD 研究,也表明鳊 3 群体内的遗传相似性系数较高。NJ 树表明洞庭湖、鄱阳湖、秋浦河和太湖鳊群体内的个体均未单独成群,而是互有交叉,不同水体间难以区分。这与对它们的形态框架研究结果基本一致(李思发等,未发表)。洞庭湖、鄱阳湖、秋浦河和太湖鳊分属长江中、下游的附属湖泊或支流,与长江干流相通,相互之间无地理隔离,且距离不远。虽然鳊喜固定栖所^[4],但伴随江湖水体的交流,与干流中鳊的基因交流频繁,可能是造成不同水体鳊间的遗传分化较低的主要原因。因此,初步认为洞庭湖、鄱阳湖、秋浦河和太湖鳊群体可能同属一个种群——长江种群。

尽管长江水系鳊控制区的遗传变异水平低,根据碱基组成,鳊控制区可分为两大单倍型(I 和 II 型),两大类型在第 6、8、17、25、35 变异位点上明显差异,呈现有一定程度的分化。由于控制区为非编码区,除部分位点与其结构、功能相关较为保守外,其他位点变异范围较大。而表现在上述位点的核苷酸固定,可能暗示了自然选择对鳊控制区变异和进化的影响。综观长江中、下游不同水体鳊在两大单倍型的分布频率上并无明显的变化规律,但是,我们发现本研究中太湖群体个体全部表现为 II 类单倍型,无 I 类单倍型。这一现象是否反映太湖群体已产生较明显的分化,或是与分析样本数不大有关? 还需进一步研究。另据生产单位反映,鳊体色有两种类型:黄色和暗黑,暗黑体色个体的生长速度略快于黄色。长江鳊是否有亚群分化? 本研究结果是否与这一提法存在某种关联尚待进一步验证。

4 参考文献

- [1] 周才武, 杨青, 蔡德霖. 鳊亚科 SINIPERCINAE 鱼类的分类整理和地理分布. 动物学研究, 1988, 9(2): 113 - 125.
- [2] 李思忠. 鳊亚科鱼类地理分布的研究. 动物学杂志, 1991, 26(4): 40 - 44.
- [3] 湖北省水生生物研究所鱼类研究室. 长江鱼类. 北京: 科学出版社, 1976: 192 - 196.
- [4] 蒋一圭. 梁子湖鳊鱼的生物学. 水生生物学集刊, 1959, 3: 375 - 384.
- [5] 张春光, 赵亚辉. 我国鳊资源现状及其恢复和合理利用的途径. 生物学通报, 1999, 34(12): 9 - 11.
- [6] 李新辉, 吴淑勤. 鳊鱼病毒核酸的初步分析. 水产学报, 2000, 24(2): 171 - 174
- [7] 殷文莉, 戴建华, 杨代淑等. 鳊及大眼鳊线粒体 DNA 比较研究. 水生生物学报, 1998, 22(3): 257 - 264.
- [8] 杨受保. 鳊鱼资源利用及遗传多样性研究. 水产科技情报, 2003, 30(3): 121 - 125.
- [9] 杨受保, 祖国掌, 程久发. 鳊鱼遗传多样性的 RAPD 指纹分析. 水产养殖, 2003, 24(4): 33 - 35.
- [10] 方展强, 陈军, 郑文彪等. 鳊野生群体与养殖群体的 RAPD 分析. 大连水产学院学报, 2005, 20(1): 16 - 19.
- [11] 肖武汉, 张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化. 水生生物学报, 2000, 24(4): 384 - 391.
- [12] 郭新红, 刘少军, 刘巧等. 鱼类线粒体 DNA 研究新进展. 遗传学报, 2004, 31(9): 983 - 1000.
- [13] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl Acids Symp Ser, 1999, 41: 95 - 98.

- [14] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Brief in Bioinf*, 2004, **5**: 150 - 163.
- [15] Zhao J L, Wang W W, Li S F *et al.* Structure of the mitochondrial DNA control region of the siniperine fishes and their phylogenetic relationship. *Acta Genetica Sinica*, 2006, **33**(9):793 - 799.
- [16] 王伟伟, 赵金良, 李思发. 我国斑鳊不同群体 mtDNA 控制区的遗传变异. *上海水产大学学报*, 2006, **15**(4):398 - 402.