

文章编号: 1004 - 7271(2007)06 - 0513 - 05

八个品种金鱼及野生鲫线粒体 控制区遗传差异和亲缘关系的研究

张学义, 李家乐, 汪桂玲, 赵晓勤

(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)

摘要:采用PCR技术扩增了红草金鱼(RC), 红文鱼(RF), 红顶白高头(WR), 白珍珠(WP), 红狮头(RT), 红龙睛蝶尾(MB), 墨龙睛(BM), 红水泡(RB)八个品种金鱼和野生鲫(WC)线粒体DNA的D-Loop区部分序列, PCR产物经纯化、测序、同源序列比对后获得长度为699 bp的核苷酸序列, 在129个样本中共检测到了17个单倍型, 9个品种共享1种单倍型, 5个品种的金鱼(BM, MB, WR, RF, RC)检测到各自独有的单倍型。遗传距离和聚类分析结果显示6个品种金鱼(WP, BM, MB, RT, WR, RB)首先聚在一起, 然后依次与红文鱼(RF)、红草金鱼(RC)、野生鲫(WC)聚在一起。金鱼首先演化为草系金鱼, 草系金鱼在演变为文系中较为古老的品种之后, 经过进一步的变异, 分化出金鱼其他各个品种。

关键词: 金鱼; 线粒体DNA; D-Loop区; 遗传差异

中图分类号: S 917 文献标识码: A

The genetic diversity and phylogenetic relationships of mitochondrial D-Loop partial sequences in eight representative varieties of goldfishes (*Carassius auratus* var) and wild crucian carp (*Carassius auratus*)

ZHANG Xue-yi, LI Jia-le, WANG Gui-ling, ZHAO Xiao-qin

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecology Certificated
by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract: Genetic diversity and phylogenetic relationship in goldfish (*Carassius auratus* var) were examined using mitochondrial D-Loop partial sequences at eight representative varieties of goldfishes and wild crucian carp. The eight representative varieties were Red Common Goldfish (RC), Red Fantail (RF), White Oranda with Red Carp (WR), White Pearlscale (WP), Red Tigerhead (RT), Black Moor (BM), Red Moor with Butterfly Tail (MB) and Red Bubble-eye with Dorsal Fin (RB). 699 base-pair nucleotide sequences of Mitochondrial D-Loop were examined and analyzed for genetic polymorphism. Sequences data showed that all 129 sequences were grouped into 17 haplotypes. Nine representative varieties shared same haplotype. Five representative varieties of goldfishes (BM, MB, WR, RF, RC) had haplotypes respectively. The results from

收稿日期: 2007-03-18

基金项目: 上海市科技兴农重点攻关项目(2006-6-3); 上海市水产养殖重点学科建设项目(Y1101)

作者简介: 张学义(1980-), 男, 河北衡水人, 硕士研究生, 专业方向为水产动物种质资源与种苗工程。

通讯作者: 李家乐, Tel: 021-65710216, E-mail: jlli@shfu.edu.cn

the analyses of genetic distance and cluster analysis showed that six representative varieties (WP, BM, MB, RT, WR, RB) were clustered together first, which then clustered together with RF and finally clustered together with RC and WC. Wild common carp evolved to common goldfish first, and then common goldfish evolved to some primitive varieties of fantail goldfish, then differentiated to other representative varieties.

Key words: goldfish; mtDNA; D-Loop; genetic diversity

金鱼起源于我国普通鲫鱼,早在南宋就已开始饲养金鱼,在近千年的饲养及人工选择下,逐渐形成了今天的众多品种,传统上被分为四大品系:草系、文系、龙系和蛋系^[1]。国外以金鱼为对象在生理^[2],生化^[3]等领域研究较多,国内在形态^[4-6],蛋白^[7-8]等方面对金鱼系统进化有过一些报道。线粒体 DNA D-Loop 区由于不编码蛋白质,受到选择压力较小,被认为是线粒体基因组上进化最快的部分^[9]。本研究以草系中的红草金鱼,文系中的四个品种:红文鱼、红顶白高头、白珍珠、红狮头,龙系中的红龙睛蝶尾和墨龙睛,蛋系中的红水泡以及野生鲫为材料,测定其 mtDNA D-Loop 区部分序列,并分析了金鱼的遗传差异和亲缘关系,为金鱼的种质资源和良种选育提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

八个品种的金鱼分别为红草金鱼 (Red Common Goldfish, "RC"), 红文鱼 (Red Fantail, "RF"), 红顶白高头 (White Oranda with Red Carp, "WR"), 白珍珠 (White Pearlscale, "WP"), 红狮头 (Red Tigerhead, "RT"), 红龙睛蝶尾 (Red Moor with Butterfly Tail, "MB"), 墨龙睛 (Black Moor, "BM"), 红水泡 (Red Bubble-eye with Dorsal Fin, "RB") 金鱼,均由上海万金观赏鱼养殖有限公司提供。野生鲫 (Wild Crucian Carp, "WC") 采自长江江苏南通段。每种实验鱼随机采样,每尾剪尾鳍少许,95%酒精保存备用。

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取

每个品种随机选取 13 ~ 16 个样本,总计 129 个样本(见表 1),每个样本取保存的尾鳍边缘部分,剪碎。提取步骤参照已报道的标准抽提程序^[10]进行,并用 752 型紫外分光光度计检测样品 DNA 的纯度和浓度,4 °C 保存备用。

表 1 八个品种金鱼和野生鲫 D-Loop 区基因片段的碱基平均组成
Tab.1 Base compositions of D-Loop partial sequences of eight representative varieties of goldfishes and wild crucian carp (%)

品种	样本数	T	C	A	G	A + T
WC	15	30.3	15.9	2.7	21.1	63.0
RC	13	30.2	15.9	32.5	21.4	62.7
RF	14	30.3	15.8	32.6	21.3	62.9
WR	14	30.2	15.9	32.5	21.3	62.7
WP	16	30.3	15.8	32.5	21.4	62.8
RT	14	30.3	15.8	32.6	21.3	62.9
MB	15	30.2	15.9	32.6	21.2	62.8
BM	14	30.2	15.9	32.5	21.3	62.7
RB	15	30.3	15.9	32.6	21.3	62.9
Ave.	129	30.3	15.9	32.6	21.3	62.9

1.2.2 PCR 扩增与序列测定

从 GenBank 中下载金鱼线粒体控制区的同源序列,使用 Primer Primer 5.0 设计引物。正向引物为 5'-TAAACTAACTATTTTCTGG-3'; 负向引物为 5'-TCTCATCTTAGCATCTTC-3',引物由上海生工生物工

程有限公司合成。

PCR 反应条件:95 °C 预变性 4 min,进行 35 个循环(94 °C 变性 30 s、49 °C 退火 60 s、72 °C 延伸 90 s),最后 72 °C 充分延伸 10 min,4 °C 保存。扩增中同时设立空白对照。PCR 反应体系总体积为 50 μ L,每个样品取 5 μ L 用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测其片段大小、纯度及亮度(电泳结果见图 1),样品纯化与回收测序由上海生工生物工程有限公司完成。

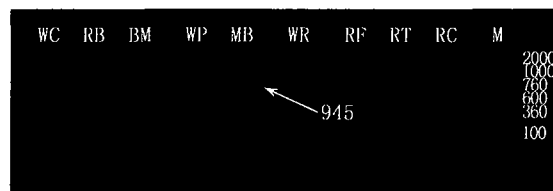


图 1 金鱼和野生鲫的 mtDNA D-Loop 区基因片段扩增结果

Fig. 1 The amplification result of mtDNA D-Loop partial sequence of eight representative varieties of goldfishes and wild crucian carp

WC:野生鲫;RB:红水泡;BM:墨龙睛;WP:白珍珠;MB:红龙睛蝶尾;WR:红顶白高头;RF:红文鱼;RT:红狮头;RC:红草金鱼

2 结果

2.1 同源排序

金鱼的 mtDNA 基因组总长度为 16578bp,其中 D-loop 区的全序列长度为 921bp^[11]。本文测定得到的 D-loop 区部分序列位于 D-loop 区靠近 tRNAPhe 基因一端。利用 Clustal W 软件在对所测得的正、反向序列进行同源比对之后进行拼接,将拼接好的 129 条序列同源排序并删除非确定的两端序列,每条最终保留 699 bp 的同源序列用于分析。各品种测得的线粒体控制区 A + T 碱基平均含量(62.7% ~ 62.9%)明显高于 G + C 含量,结果见表 1。

2.2 八个品种金鱼和野生鲫的遗传差异分析

用软件计算所有序列的单倍型数和各个单倍型在 8 个金鱼品种及鲫鱼间的分布情况,结果见表 2。在 129 尾样品中共检测到 17 种单倍型,并提交到 GenBank(序列号为:EF191049-EF191065)。9 个品种中检测到 1 种共享单倍型,5 个品种金鱼(BM, MB, WR, RF, RC)均检测到各自独有的单倍型,野生鲫独有 6 种单倍型,8 个品种金鱼(114 尾样品)检测到 11 种单倍型。

表 2 野生鲫和八个品种金鱼间的单倍型分布

Tab. 2 Distribution of haplotype in eight representative varieties of goldfishes and wild crucian carp

品种	单倍型率	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	H15	H16	H17
WC	0.600	0.067		0.067		0.067	0.133	0.133	0.133	0.267	0.067	0.067						
RC	0.215	0.615		0.231	0.077													0.077
RF	0.286	0.357	0.286	0.286														0.071
WR	0.019	0.846														0.154		
WP	0.250	0.375	0.063	0.375	0.188													
RT	0.215	0.214	0.357	0.429														
MB	0.267	0.200	0.400											0.200	0.200			
BM	0.286	0.571	0.071	0.214													0.143	
RB	0.330	0.267	0.267	0.267	0.133	0.067												

根据所得序列用 DNASP4.10 计算各遗传多样性参数,结果见表 3。共检测到 11 个核苷酸变异位点,野生鲫单倍型和核苷酸多态性都最高,在其他 8 个金鱼品种中白珍珠(WP)的单倍型多态性最高,红狮头(RT)的核苷酸多态性最高。

2.3 遗传距离和分子系统树

软件 DNASP4.10 对 9 个品种中 17 种单倍型以邻接法(NJ)建立的系统进化树(图 2)显示野生鲫独有的 4 种单倍型(H7, H8, H9, H10)与其他单倍型之间遗传距离较远。同时从邻接法构建八个品种金鱼和野生鲫的系统进化树(图 3)可以看出 6 个品种金鱼(WP, BM, MB, RT, WR, RB)首先聚在一次,然后依次与红文鱼(RF)、红草金鱼(RC)、野生鲫(WC)聚在一起。

表3 八个品种金鱼和野生鲫 D-Loop 区部分序列遗传多样性参数
Tab.3 Genetic diversity parameters of D-Loop partial sequences of eight representative varieties of goldfishes and wild crucian carp

品种	单倍型多态性(Hd)	多态位点数(S)	简约信息位点数(Pi)	平均核苷酸差异数(k)	核苷酸多样性指数(P)
WC	0.905	7	6	2.533	0.003 65
RB	0.824	4	3	1.286	0.001 84
BM	0.615	3	3	0.967	0.001 39
WP	0.825	4	4	1.292	0.001 85
MB	0.771	4	4	1.543	0.002 21
WR	0.264	2	2	0.527	0.000 76
RF	0.758	3	2	1.022	0.001 47
RT	0.747	3	2	1.165	0.001 67
RC	0.603	3	2	0.821	0.001 18
Total	0.786	11	11	1.534	0.002 21

3 讨论

前人对金鱼各个品系的遗传多态性研究报道较少。本研究基于 D-Loop 序列分析结果显示,野生鲫的单倍型率为 0.600,远高于金鱼各个品种的单倍型率 0.019~0.330,金鱼各品种核苷酸多态性指数只有野生鲫的一半左右。以上结果说明金鱼的遗传多态性低于野生鲫,这是由于在定向选育过程中,选留具有较好性状的金鱼作为亲本,往往限制了繁殖群体的数量,造成近亲繁殖,这样一代一代传递,影响了遗传多样性。另外,在金鱼育种过程中,为了保持其变异性状的稳定遗传,往往采取不同程度的近交,这样也会造成其遗传多样性降低。因此,为了增加金鱼的遗传多样性,建议采取相应的提纯复壮措施,比如加大对各地同一品种金鱼亲本的交流。

从十二世纪金鱼开始家庭饲养以来,在近一千年的演化过程中,金鱼身体各个部分的形态特征发生了很大的变化,形成了众多的金鱼品种。RAPD 标记分析金鱼一些品种基因组 DNA 的结果表明,它们的遗传相似性程度较高,而遗传变异程度低,但同时也发现了某些品种的特异性条带^[12]。通过肌肉蛋白电泳分析后发现,金鱼某些品种演化过程中消失了一些在野生鲫中可以检测到的蛋白组分,同时也出现了新的蛋白组分^[7]。作者通过线粒体 D-loop 区序列的分析结果发现,8 个品种金鱼与野生金鱼共享一种单倍型,墨龙睛、红龙睛蝶尾、红顶白高头、红文鱼和红草金鱼共 5 个品种金鱼享有特有单倍型。综合本研究 and 前人研究结果可以推论,野生鲫在演化为金鱼的过程中其遗传物质发生了较大的变异,各个品种金鱼的遗传物质也形成了一定的分化。

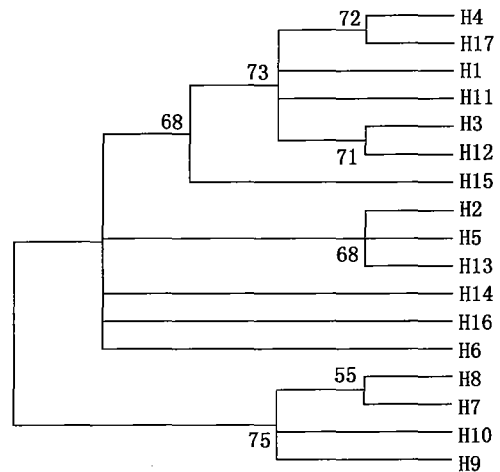


图2 八个品种金鱼和野生鲫线粒体 DNA D-Loop 序列 17 种单倍型的 NJ 分子系统树

Fig. 2 Phylogenetic tree of seventeen haplotypes of mtDNA D-loop sequences by NJ method in eight representative varieties of goldfishes and wild crucian carp

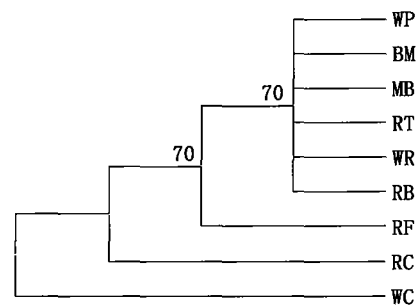


图3 八个品种金鱼和野生鲫线粒体 DNA D-Loop 序列 NJ 分子系统树

Fig. 3 Phylogenetic tree of mtDNA D-loop sequences by NJ method in eight representative varieties of goldfishes and wild crucian carp

本研究聚类分析结果显示,红草金鱼最早从野生鲫中分化出来,这与前人推断野生鲫经过草系金鱼再演化为金鱼其他各个品种的结论一致^[1,4-5]。然而,以往研究结果对于文系金鱼的演化地位存在一些分歧。其一是认为草系金鱼在演变为文系之后,经过进一步的变异分化出蛋系和龙系金鱼^[6-7,12]。其二是认为草系金鱼发生了较大的变异,从而直接分化为文系、蛋系和龙系金鱼^[7-8]。本次研究结果表明,文系中的红文鱼与草系金鱼的亲缘关系最近,而文系中的红顶白高头、白珍珠、红狮头和龙系中的墨龙睛、红龙睛蝶尾以及蛋系中的红水泡与草系金鱼的亲缘关系则较远。红文鱼为文系金鱼中较为古老的品种,依此可以推论草系金鱼在演变为文系中较为古老的品种之后,经过进一步的变异后,再分化出金鱼其他各个品种。

参考文献:

- [1] 李 璞. 我国金鱼的品系及其在系统发生上的关系[J]. 动物学杂志, 1969, 6: 248 - 251.
- [2] Nelson E R, Habibi H R. Molecular characterization and sex-related seasonal expression of thyroid receptor subtypes in goldfish [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2006, 253: 83 - 95.
- [3] Huesa G, van den Pol AN, Finger T E. Differential distribution of hypocretin (orexin) and melanin-concentrating hormone in the goldfish brain [J]. *J Comp Neurol*, 2005, 488 (4): 476 - 491.
- [4] 陈 桢. 金鱼的家化与变异[M]. 北京: 科学出版社, 1959.
- [5] 王春元, 李延龄. 我国现有金鱼品系的分类及其系统发育探讨[J]. 动物学报, 1983, 29 (3): 267 - 277.
- [6] 梁前进, 彭奕欣, 余秋梅. 野生鲫和五个金鱼品系的辨别分析和聚类分析[J]. 水生生物学报, 1998, 22 (3): 236 - 243.
- [7] 梁前进, 彭奕欣. 野生鲫和五个金鱼代表品种的肌肉蛋白电泳分析[J]. 动物学研究, 1994, 15 (2): 68 - 75.
- [8] 梁前进, 彭奕欣. 中国几个金鱼品种血清抗原性的探讨[J]. 水产学报, 1998, 22 (1): 16 - 22.
- [9] Avise J C. Gene tree and organismal histories: phylogenetic approach to population [J]. *Biology Evolution*, 1989, 43: 1192 - 1208.
- [10] Chen H, Leibegguth F. Studies on multilocus fingerprints, RAPD markers and mitochondrial DNA of a gynogenetic fish (*Carassius auratus gibelio*) [J]. *Biochem Genet*, 1995, 33: 297 - 306.
- [11] Murakami M, Yamashita Y, Fujitani H. The complete sequence of mitochondrial genome from a gynogenetic triploid gimbuna (*Carassius auratus langsdorfi*) [J]. *Zool Sci*, 15: 335 - 337.
- [12] 王晓梅, 宋文芹. 文种金鱼系统发育地位的研究[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2006, 33 (2): 127 - 128.