

文章编号: 1004-7271(2007)05-0409-05

中国少鳞鳊不同群体 mtDNA 控制区序列的遗传变异分析

赵丽丽, 赵金良

(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:少鳞鳊为东亚特有鱼类, 为了解中国少鳞鳊在我国不同水域内的遗传结构特征, 利用 PCR 扩增和直接测序法分析了长江、钱塘江、西江、南渡江 34 尾样品 mtDNA 控制区的序列差异。在长度 838 bp 的同源序列中, 共发现 81 个变异位点, 占分析位点总数的 9.67%; 定义了 4 个单倍型, 每个群体仅发现一个单倍型, 群体之间没有共享单倍型, 且每个群体都有鉴别位点。群体间的核苷酸歧义度 (D_{xy}) 在 0.360% ~ 8.043% 之间, 南渡江群体与长江、钱塘江、西江 3 个群体间的差异最大。分子变异分析 (AMOVA) 得出群体间的遗传分化指数 (F_{st}) 为 1.000 ($P < 0.001$), 差异极显著。构建的 NJ 树中, 4 个群体分为两支, 一支为南渡江群体, 另一支为长江、钱塘江、西江群体。这些表明中国少鳞鳊群体的遗传多样性较低, 不同地理群体之间出现了明显的遗传分化, 南渡江群体与长江、钱塘江、西江 3 个群体之间的分化水平最高。

关键词:中国少鳞鳊; 群体; 控制区; 遗传变异

中图分类号: S 917 文献标识码: A

Genetic variation of the mitochondrial DNA control region among 4 populations of *Coreoperca whiteheadi*

ZHAO Li-li, ZHAO Jin-liang

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

Abstract: *Coreoperca* is a group of freshwater fishes endemic in East Asia. To study the genetic structure and differentiation of *C. whiteheadi* in China, the sequences of mitochondrial DNA control region of 34 samples, collected from Yangtze River, Qiantangjiang River, Xijiang River and Nanduijiang River, respectively, were analyzed by PCR and sequencing methods. Among the 838 bp length homologous sequences, 81 variable sites (9.67%) were detected. 4 haplotypes were identified, each belonged to one single population. No haplotype was shared among four populations while each population had some fixed diagnostic sites. The nucleotide divergence (D_{xy}) among populations was 0.360% - 8.043%, while Nanduijiang population showed significant divergence with the others. The fixation index (F_{st}) calculated by the analysis of molecular variance (AMOVA) reached 1.000 ($P < 0.001$). NJ tree of the control region suggested that the 4 populations were divided into two clades: one clade included Nanduijiang population, another clade comprised

收稿日期: 2006-09-04

基金项目: 上海水产大学水产养殖重点学科开放课题(04SC11)和上海市重点学科建设项目(Y1101)

作者简介: 赵丽丽(1979-), 女, 山东日照人, 硕士研究生, 专业方向为水产动物种质资源。E-mail: richy81@163.com

通讯作者: 赵金良, jlzhao@shfu.edu.cn

Yangtze, Qiantangjiang, Xijiang populations. These results suggested that genetic variance of *C. whiteheadi* is relatively low and the genetic differentiation among the four populations is significant; the Nanduijiang population diverged distinctly from the other three populations.

Key words: *Coreoperca whiteheadi*; population; control region; genetic differentiation

少鳞鳊(*Coreoperca*)为东亚特有的淡水鱼类,现生种类有3种,其中朝鲜少鳞鳊(*C. herzi*)和日本少鳞鳊(*C. kawamebari*)仅分布于朝鲜半岛和日本岛,中国少鳞鳊(*C. whiteheadi*)分布范围相对较广,从我国长江水系向南至越南北方均有分布^[1-2]。对少鳞鳊的研究报道,主要集中在形态分类^[1-2]、资源调查^[3-7]、生态学^[8]、系统发育^[9-12]等方面。关于少鳞鳊种内不同群体的比较研究报道极少,仅 Okazaki 等^[13]利用同工酶技术研究了日本少鳞鳊、朝鲜少鳞鳊不同群体的遗传差异,而关于中国少鳞鳊群体遗传特征研究迄今还未见有报道。动物 mtDNA 呈母系遗传,无重组发生,且具较高突变率。控制区(D-loop)为线粒体上的非编码区,其进化速率是线粒体上最快的部分,在鱼类群体遗传学和分子系统学研究中得到了广泛的应用^[14]。本研究通过测定我国主要水系中国少鳞鳊的 mtDNA 控制区序列,初步了解中国少鳞鳊不同地理群体的遗传特征和遗传分化,进一步丰富鳊类的起源、系统发育和生物地理学研究。

1 材料与方法

1.1 样品采集

实验用中国少鳞鳊样品分别采自长江、钱塘江、西江、南渡江,共34尾(表1)。野外采集后立即剪取实验鱼的尾鳍浸入95%的酒精中固定和保存。

1.2 实验方法

取20~30 mg酒精固定的尾鳍,剪碎。待酒精完全挥发后,用蛋白酶K(20 mg/mL)56℃消化过夜(约10 h),酚-氯仿法提取总DNA^[15]。

控制区扩增所用的特异性引物序列参照文献^[16],引物序列为DL1:5'-ACC CCT GGC TCC CAA AGC3'和DH2:5'-ATC TTA GCA TCT TCA GTG 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 μL:10×Buffer溶液5 μL,dNTP1 μL(10 mmol/L),DL1 2 μL(10 pmol/μL),DH2 2 μL(10 pmol/μL),模板DNA 2 μL(100 ng/μL),Taq DNA聚合酶1 μL(2.5 U/μL),用去离子灭菌水补足50 μL。PCR反应条件为:94℃预变性3 min;94℃变性30 s,50℃退火30 s,72℃延伸1 min,30个循环;72℃延伸10 min;4℃保存。

PCR的扩增产物通过1%的琼脂糖凝胶进行电泳检测,对特异性的PCR扩增产物进行纯化,由上海生工生物工程技术有限公司用ABI 377 DNA自动测序仪进行双向序列测定。

1.3 数据分析

使用Bioedit软件^[17]进行控制区基因序列的序列比对,确定变异位点和单倍型。用DnaSP3.0^[18]计算各群体内的核苷酸多样性、群体间的核苷酸歧义度(D_{xy})、平均核苷酸差异数(K)和基因流(Nm)。应用Arlequin3.0^[19]软件中的分子变异分析(AMOVA)方法估算群体间的遗传分化指数(F_{st})。选择鳊属的鳊(*Siniperca chuatsi*)和斑鳊(*S. scherzeri*)作为内群^[20],并用鲴科副鲴(*Paralabrax clathratus*)(DQ192365)作为外类群,基于Kimura^[21]双参数法估算遗传距离,应用MEGA3.0^[22]的邻近距离法(NJ)构建亲缘关系树,自引导(bootstrap)检验估计系统树中结点的置信度(重复次数为1 000次)。

表1 中国少鳞鳊采集地点和分析样本数

Tab.1 Population, sampling location and number of *C. whiteheadi* in this study

群体	采集地点	个体数
长江,YZ	安徽秋浦河	10
钱塘江,QT	浙江千岛湖	10
西江,XJ	广西三江县	10
南渡江,ND	海南白沙县	4

2 结果

2.1 控制区序列变异分析

测序比对后,获得了中国少鳞鳊 mtDNA 控制区长度为 838bp 的同源序列。A、T、C 和 G 四种核苷酸的比例分别为 32.2% ~ 32.7% (平均 32.6%)、30.6% ~ 31.1% (平均 30.9%)、20.6% ~ 21.5% (平均 20.9%) 和 15.4% ~ 15.7% (平均 15.5%), A + T 含量明显高于 G + C 含量。

共发现 81 个变异位点,占分析位点总数的 9.67%,变异位点全部为简约信息位点。变异位点中含 43 个转换位点、26 个颠换位点、10 个插入/缺失、1 个位点同时存在转换和插入/缺失、1 个位点同时存在颠换和插入/缺失,转换与颠换的比值为 1.65:1,颠换大部分发生在终止序列区,转换主要发生在中央保守区和保守序列区^[11]。

共定义了 4 个单倍型(表 2)。每个群体只有一个单倍型,群体间无共享单倍型。群体间的平均核苷酸差异数在 3 ~ 75 之间,其中长江群体与西江群体间的平均核苷酸差异数最少,南渡江群体与其他群体的平均核苷酸差异数较大。位点 91、94、217、248、406、676、680、801、831 为钱塘江群体的鉴别位点,位点 221 为长江群体的鉴别位点,位点 386、619 为西江群体的鉴别位点,南渡江群体存在 68 个鉴别位点。

表2 中国少鳞鳊mtDNA控制区的变异位点及单倍型
Tab.2 Variable sites and haplotypes of mtDNA control region of *C. whiteheadi*

单倍型	变异位点	观察个体数	分布
	11111111111111111111111112222222222223333455555555556666666666777777888888		
	2677889990001113455666777890111223333473348001125555781112335677783346679000333		
	470452713412513798134017023504067121267810146690431246123594257602602481943136013		
Hap1	ATGTAGCATAAT-CTTATAAATATTGACATTACCCCATGTAGTCTTTCACATTGCATAA-AGTACCTTACTGTGTTGT-	10	QT
Hap2 T. T. - C. A. CT. C. T. - . A. . TA. C. . . C-	10	YZ
Hap3 T. T. - C. A. C. C. CT. - . G. - . A. . TA. C. . . C-	10	XJ
Hap4	-AAATTTTC-TCGACAGATT-. T. ACAGACCCC. TTTTCACTA. TGG-TGTGCC-A-. CT-. CGTTACGTAACACC--T	4	ND

注:上方数字表示变异位点的位置;圆点(.)表示与(Hap1)有相同的碱基组成,横线(-)表示缺失。

2.2 中国少鳞鳊群体内和群体间的遗传差异

中国少鳞鳊群体内的核苷酸多样性和群体间的核苷酸歧义度(D_{xy})见表 3。群体内的核苷酸多样性均为 0,遗传多样性极低。群体间的核苷酸歧异度为 0.360% ~ 8.043% 之间(不计插入/缺失),南渡江与长江、钱塘江、西江群体间的核苷酸歧异度最高。

分子变异分析(AMOVA)得出,群体间的遗传分化指数 F_{st} 为 1.000 ($P < 0.001$),群体间存在极显著的差异。基因流 N_m 为 0,群体间缺乏基因交流。

表3 中国少鳞鳊群体间的核苷酸歧异度
Tab.3 Nucleotide variance between populations of *C. whiteheadi*

	长江	钱塘江	西江
钱塘江	1.573% ± 0.211%	0	-
西江	0.360% ± 0.048%	1.696% ± 0.227%	0
南渡江	7.640% ± 1.552%	8.043% ± 1.634%	7.774% ± 1.579%

2.3 分子系统树

根据控制区基因序列构建了中国少鳞鳊 4 个群体的 NJ 树。4 个群体明显分为两支,一支为南渡江群体,另一支为长江、钱塘江、西江群体(图 1)。其中长江与西江群体之间的亲缘关系最近,最先聚在一起,再与钱塘江群体聚合。

3 讨论

本研究表明,中国少鳞鳊控制区的 A、T、C、G 碱基序列组成比例分别为 32.6%、30.9%、20.9% 和 15.5%, A+T 含量高于 G+C 含量,这与刘焕章^[23]关于鱼类控制区的研究结果是一致的。两群体中共检测出变异位点 81 个,占分析位点数的 9.67%,转换明显大于颠换,且大部分变异发生在终止序列区内。

本研究发现中国少鳞鳊 4 个群体内的核苷酸多样性均为 0,遗传多样性水平很低,这与鳊、斑鳊不同地理群体的遗传变异较为丰富明显不同^[20,24]。Wang 等^[25]在利用 D-loop 序列研究了台湾铲颌鱼(*Varicorhinus barbatulus*)的种群遗传结构中,也发现各种群间的基因交流很少,种群内部遗传变异极低。中国少鳞鳊为溪涧性鱼类,对生存环境的水质要求比较高,一般生活于水流较急、水质清晰的溪流中,多栖息于石砾底的上游区段。由于其生存环境狭小,群体数量不大,或由于生态环境破坏导致群体萎缩(其中,福建木兰溪已无法采到样品),致使各群体的基因库较小,遗传变异低下。

中国少鳞鳊 4 个地理群体间无共享单倍型,并且每个群体都存在鉴别位点,这为不同群体的遗传鉴别提供依据。群体间遗传分化水平指数 F_{st} 值很高(1.000),差异极显著;在聚类分析中每个群体均分别组成单系(置信度高 99%);基因流 N_m 为 0。这些均表明,中国少鳞鳊 4 个地理群体间缺乏基因交流,存在着显著的遗传分化。

聚类关系显示群体间遗传分化水平与地理分布存在着一定的关联。特别是南渡江群体与大陆其他 3 个群体间的核苷酸歧异度较高。鳊类鱼类属于江河平原鱼类区系复合体,为新生代第三纪由热带平原迁入我国长江、黄河流域平原区,在这一地区特有自然气候条件下逐渐形成地区性鱼类^[6]。海南岛是在中新世、上新世与大陆分离,分离后琼州海峡阻碍了海南岛与大陆淡水鱼类的基因交流,因此使得南渡江群体与大陆其他群体间产生较大的遗传差异。假定鱼类 mtDNA 控制区的进化速率为每百万年 3.6%^[26],南渡江群体和大陆其他群体间的核苷酸歧异度值在 7.640%~8.043% 之间,估算南渡江群体与大陆群体的分化时间大约为 200 多万年,这与海南岛和大陆分离的时间基本吻合。

大陆群体中,西江群体与长江群体最先聚合,而钱塘江群体与长江群体亲缘关系略远。王伟伟等^[20]在我国斑鳊不同群体 mtDNA 控制区序列的遗传变异研究中也发现钱塘江斑鳊群体与其地理相近的南方群体(长江、闽江、西江)有较大差异,产生这一现象的原因有待于进一步研究。

本研究采样中得到安徽省池州市贵池区水产局、广西壮族自治区柳州市畜牧水产局、融安县畜牧水产局及浙江淳安县千岛湖渔民、海南岛白沙县渔民的大力协助,特此致谢。

参考文献:

- [1] 周才武,杨青,蔡德霖. 鳊亚科鱼类的分类整理和地理分布[J]. 动物学研究, 1988, 9(2): 113 - 126.
- [2] 李思忠. 鳊亚科鱼类地理分布的研究[J]. 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[M]. 北京:科学出版社, 1976, 192 - 196.
- [4] 郑慈英. 广西淡水鱼类志[M]. 南宁:广西人民出版社, 1981, 204 - 211.
- [5] 朱元鼎. 福建鱼类志(下卷)[M]. 福州:福建科学出版社, 1985, 25 - 32.
- [6] 中国水产科学研究院珠江水产研究所. 海南岛淡水及河口鱼类志[M]. 广州:广东科技出版社, 1986, 4 - 220.
- [7] 毛节荣,徐寿山. 浙江动物志 淡水鱼类[M]. 杭州:浙江科学技术出版社, 1991, 186 - 188.
- [8] Tachihara K, Shinomiya A, Kimura S, et al. Development of aggressive behavior of Japanese perch, *Coreoperca kawamebari*, with its growth [J]. Japanese Journal of Ecology, 1988, 38(2): 159 - 167.
- [9] 孔晓瑜,周才武. 中国鳊亚科(Sinipercinae)七种鱼类骨骼形态特征的比较研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1993, 23(3): 116 -

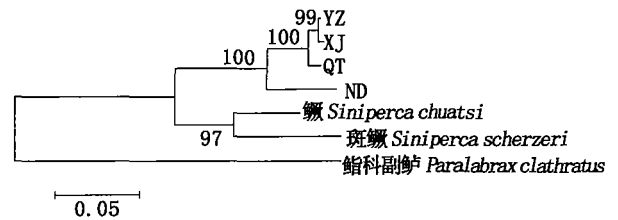


图 1 中国少鳞鳊 4 群体控制区的 NJ 树
Fig. 1 NJ tree of 4 populations of *C. whiteheadi* by sequence of the control region
YZ 长江, XJ 西江, QT 钱塘江, ND 南渡江

- 123.
- [10] 刘焕章. 鳊类的系统发育研究及若干种的有效性探讨[J]. 动物学研究, 1994, 15(增刊): 1 - 12.
- [11] Zhao J L, Wang W W, Li S F, *et al.* Structure of the mitochondrial DNA control region of the Siniperce fish and their phylogenetic relationship [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33(9): 793 - 799.
- [12] Shirai S, Yabumoto Y, Kim I S, *et al.* Phylogeny of siniperceid fishes and their relatives inferred from mtDNA cytochrome b gene: a preliminary study [J]. *Bull Kitakyushu Mus Nat Hist Hum Hist, Ser A*, 2003, (1): 45 - 49.
- [13] Okazaki T, Jeon S R. Genetic differentiation of the genus *Coreoperca* (Pisces: Serranidae) from Korea [J]. *Korean Journal of Limnology*, 1996, 29(4): 387 - 391.
- [14] 郭新红, 刘少军, 刘巧, 等. 鱼类线粒体 DNA 研究新进展[J]. 遗传学报, 2004, 31(9): 983 - 1000.
- [15] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning [M]*. A Laboratory Manual, 2nd Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [16] 张燕, 张鸲, 何舜平. 中国鳊科鱼类线粒体 DNA 控制区结构及其系统发育分析[J]. 水生生物学报, 2003, 27(5): 463 - 467.
- [17] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT [J]. *Nucl Acid Symp Ser*, 1998, 41: 95 - 98.
- [18] Rozas J, Rozas R. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis [J]. *Bioinformatics*, 1999, 15: 174 - 175.
- [19] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis [M]. Berne: Computational and Molecular Population Genetics Laboratory (CMPG), University of Berne, Switzerland, 2006.
- [20] 王伟伟, 赵金良, 李思发. 我国斑鳊不同群体 mtDNA 控制区序列的遗传变异[J]. 上海水产大学学报, 2006, 15(4): 398 - 402.
- [21] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences [J]. *Molecular Evolution*, 1980, 16: 111 - 120.
- [22] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment [J]. *Briefings in Bioinformatics*, 2004, 5: 150 - 163.
- [23] 刘焕章. 鱼类线粒体 DNA 控制区的结构与进化: 以鳊鱼类为例[J]. 自然科学进展, 2002, 12(3): 266 - 270.
- [24] 赵金良, 李思发, 蔡完其, 等. 长江水系不同水体鳊 mtDNA 控制区的遗传分析[J]. 湖泊科学, 2007, 19(1): 92 - 97.
- [25] Wang J P, Lin H D, Huang S. Phylogeography of *Varicorhinus barbatulus* (Cyprinidae) in Taiwan based on nucleotide variation of mtDNA and allozymes [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2004, 31: 1143 - 1156.
- [26] Donaldson K A, Wilson R R Jr. Amphipanamic geminates of snook (Percoidei: Centropomidae) provide a calibration of the divergence rate in the mitochondrial DNA control region of fishes [J]. *Mol Phyl Evol*, 1999, 13(1): 208 - 213.