

闽江和漓江暗鰽 mtDNA 控制区序列差异分析

赵丽丽 赵金良* 曹 阳

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

摘要:为解决暗鰽(*Siniperca obscura*)在分类上的争议,利用 PCR 和直接测序法分析了闽江和漓江 13 尾暗鰽 mtDNA 控制区的序列差异。在长度 813 bp 的同源序列中,共发现 71 个变异位点,占分析位点总数的 8.73%,定义了 11 个单倍型,其中闽江群体 7 个,漓江群体 4 个,两群体之间没有共享单倍型,且有 37 个鉴别位点。两群体间的核苷酸歧义度(D_{xy})为 $5.421\% \pm 1.129\%$ 。分子方差分析(AMOVA)得出两群体间的固定指数(F_{st})为 0.852($P < 0.001$)。构建的 NJ 亲缘关系树中,闽江暗鰽和漓江暗鰽各自组群,明显分为两支。这些表明闽江和漓江暗鰽群体之间出现了显著的遗传分化,其分化可能与南岭山脉的隆起形成有关。

关键词:暗鰽;群体;控制区;遗传分化

中图分类号:Q953 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2007)01-54-05

Genetic Differentiation of the Mitochondrial DNA Control Region of *Siniperca obscura* from Minjiang River and Lijiang River

ZHAO Li-Li ZHAO Jin-Liang* CAO Yang

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecosystem Certificated

by the Ministry of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract Genetic differences of the mitochondrial control region of *Siniperca obscura* from Minjiang River (MJ) and Lijiang River (LJ) were investigated by PCR and direct sequencing. Among 813 bp sequences, 71 variable sites (8.73%) were detected. A total of 11 haplotypes with 37 diagnostic sites were identified, of which 7 haplotypes in MJ population, and 4 haplotypes in LJ population. No haplotype was shared between these two populations. The nucleotide divergence (D_{xy}) between these two populations reached $5.421\% \pm 1.129\%$. The analysis of molecular variance (AMOVA) showed that the fixation index (F_{st}) reached 0.852 ($P < 0.001$). NJ trees derived from the control region showed that the samples were divided into two clades and each population constituted its own monophyletic group. These data suggest that there are significant genetic differences between the two populations, and that the differentiation is associated with the uplift and formation of the Nanling Mountains between the Minjiang River and the Lijiang River.

Key words: *Siniperca obscura*; Population; Control region; Genetic differentiation

暗鰽(*Siniperca obscura*)属鲈形目(Perciformes) 鲈科(Serranidae) 鰽属(*Siniperca*),为我国特有种类,现仅分布于长江以南水系^[1-3]。暗鰽的分类过去较为模糊,根据周才武等^[2]对鰽亚科鱼类分类的重新整理,漓江鰽(*S. loona*)、运江鰽(*Coreoperca yunkianensis*)、麻鰽

基金项目 上海市教委资助项目(No. 05KZ02),上海市重点学科建设项目(No. Y1101);

* 通讯作者, E-mail: jljzhao@shfu.edu.cn;

第一作者介绍 赵丽丽,女,硕士研究生;研究方向:水产动物种质资源;E-mail: richy81@163.com;

收稿日期 2006-06-27,修回日期 2006-11-06

(*C. fortis*)与暗鰻为同物异名,而刘焕章等^[4]根据骨骼形态特征研究,又提出将漓江鰻恢复为有效种。根据地方鱼类志对暗鰻的记载,福建暗鰻和广西暗鰻在形态上存在一定的差异,如体侧斑点、幽门垂数目等^[5,6]。关于福建暗鰻和广西暗鰻是否存在种的分化问题有着两种不同观点,郑慈英^[7]对广西暗鰻和福建暗鰻的形态性状特征比较,认为它们在形态特征上没有明显差异,而孔晓瑜等^[8]认为它们在骨骼形态特征上存在一定的差异。

动物 mtDNA 呈母系遗传,无重组发生,且碱基替换速率较快,尤其是控制区(D-loop)的进化速率是其他区段的 5~10 倍,在鱼类群体遗传学研究中得到了广泛应用^[9]。为此,本研究测定了来自福建闽江、广西漓江暗鰻的 mtDNA 控制区序列,初步了解闽江和漓江暗鰻的遗传特征和遗传分化,为其分类学研究提供新的分子证据,为鰻类的系统进化提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 样品采集 实验用暗鰻样品分别采自闽江(MJ,福建省顺昌县)7 尾,漓江(LJ,广西壮族自治区桂林市)6 尾。取实验鱼的尾鳍浸入 95% 的酒精中固定和保存。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增和序列测定 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^[10]。

控制区扩增所用的特异性引物序列参照文献^[11],引物序列为 DL₁:5' ACC CCT GGC TCC CAA AGC 3' 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, dNTP 1 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^[12]进行控制区基因序列比对,确定变异位点和单倍型。用 DnaSP 3.0^[13]计算各群体内的核苷酸多样性和群体间的核苷酸歧义度(D_{xy})。应用 Arlequin 3.01^[14]软件中的分子变异分析(AMOVA)方法估算群体间的固定指数(F_{st})。用同属的鰻(*S. chuatsi*)、大眼鰻(*S. kneri*)作为外群,基于 Kimura^[15]双参数法估算遗传距离,应用 MEGA 3.0^[16]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)。

2 结果

对 13 个样品提取的基因组 DNA 进行 mtDNA 控制区 PCR 扩增,均获得一条 900 bp 左右的特异性产物,扩增结果见图 1。

测序比对后,获得了 13 尾暗鰻 mtDNA 控制区 813 bp 的同源序列。A、T、C 和 G 4 种核苷酸的比例分别为 32.5%~33.2% (平均 32.8%), 29.2%~29.9% (平均 29.7%), 20.7%~21.3% (平均 21.1%) 和 16.1%~17.4% (平均 16.4%), A+T 含量明显高于 G+C 含量。

共发现 71 个变异位点,占分析位点总数的 8.73%。其中,简约信息位点 49 个,占 6.03%。变异位点中含 43 个转换、25 个颠换和 3 个插入/缺失,转换与颠换的比值为 1.72:1。

共定义了 11 个单倍型(表 1)。闽江群体有 7 个单倍型(MJ1~MJ7),漓江群体有 4 个单倍型(LJ1~LJ4)。2 个群体间无共享单倍型,且存在 37 个鉴别位点。

闽江群体和漓江群体内的核苷酸多样性分别为 1.117% ± 0.306% 和 0.413% ± 0.103%, 群体间的核苷酸歧义度(D_{xy})为 5.421% ± 1.129%。

结果是一致的。两群体中共检测出变异位点 71 个,占分析位点数的 8.73%,转换明显大于颠换,且大部分变异发生在终止序列区内,这与

我国斑鳅不同地理群体控制区的变异特点基本一致^[18]。

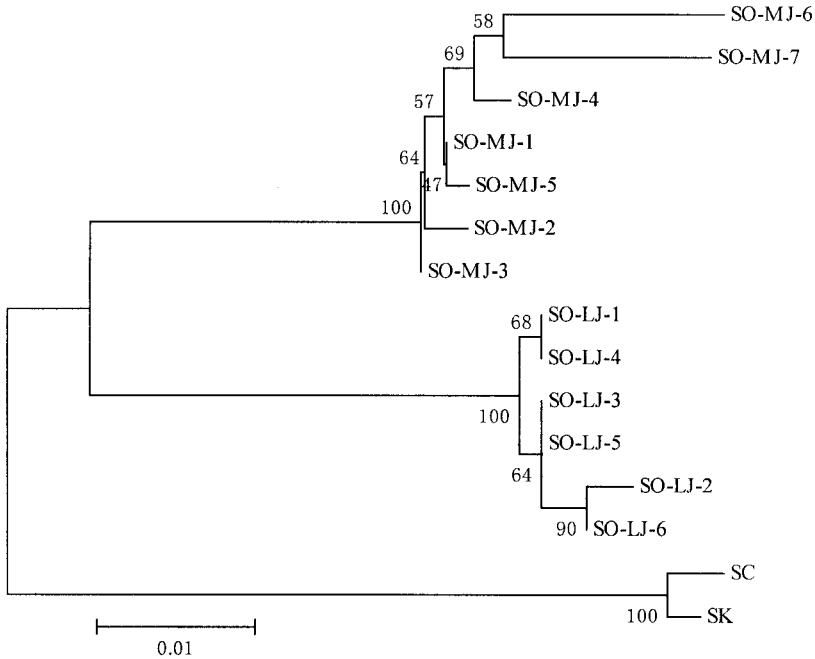


图 2 基于 mtDNA 控制区序列构建的暗鳅两群体的 NJ 亲缘关系树

Fig. 2 NJ phylogenetic tree of 2 populations of *S. obscura* (SO) based on the control region sequences

SC: 鳅; SK: 大眼鳅。SC: *S. chuatsi*; SK: *S. kneri*。

研究发现,福建闽江和广西漓江群体间的核苷酸歧义度(D_{xy})达 5.421%,显著高于群体内的核苷酸多样性(0.413%~1.117%),两群体间无共享单倍型,并且有 37 个鉴别位点;群体间固定指数 F_{st} 值较高(0.852),差异极显著。亲缘关系树中两群体各自构成单系,置信度高达 99% 以上。这些均表明,福建闽江和广西漓江的暗鳅群体间存在显著的遗传分化。相比而言,斑鳅不同地理群体间共检测到 112 个变异位点,占分析位点数的 13.69%;群体间的核苷酸歧义度(D_{xy})为 2.3%~7.4%^[18]。据此,我们初步推测闽江暗鳅和漓江暗鳅为具有明显分化的地理群体,尚未达到种的分化水平。

闽江位于南岭山脉以北,漓江位于南岭山脉以南,推测自晚第三纪开始至第四纪初期达鼎盛期的南岭山脉隆起^[19]可能对闽江和漓江

两地暗鳅的遗传分化产生了影响。南岭山脉隆起之前,南岭南北不同水系暗鳅间可能存在着交流,南岭山脉隆起形成使得这种交流中断,地理隔离导致了闽江和漓江暗鳅群体间产生了一定的遗传分化。假定鱼类 mtDNA 控制区的进化速率为每百万年 3.6%^[20],闽江和漓江暗鳅群体间的核苷酸歧义度值为 5.421%,估算两群体的分化时间大约为 150 万年,与南岭山脉的形成时间基本吻合。

致谢 本研究采样中得到福建省顺昌县畜牧水产局、广西壮族自治区桂林市畜牧水产局及渔民的大力协助,特此致谢。

参 考 文 献

[1] Nichols J T. Some Chinese freshwater fishes. XXIV. Two new

- mandarin fishes. *Am Mus Novit* ,1930 **431** 2.
- [2] 周才武,杨青,蔡德霖. 鳊亚科鱼类的分类整理和地理分布. *动物学研究* ,1988 **9** (2):113 ~ 126.
- [3] 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.
- [4] 刘焕章. 鳊类的系统发育研究及若干种的有效性探讨. *动物学研究* ,1994 **15** (增刊):1 ~ 12.
- [5] 朱元鼎. 福建鱼类志(下卷). 福州:福建科学出版社,1985 25 ~ 32.
- [6] 郑葆珊. 广西淡水鱼类志. 南宁:广西人民出版社,1981,204 ~ 211.
- [7] 郑慈英. 珠江鱼类志. 北京:科学出版社,1989,312 ~ 315.
- [8] 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. *青岛海洋大学学报* ,1993 **23** (3):116 ~ 123.
- [9] 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 ~ 1 000.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* ,2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [11] 张燕,张鹞,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. *水生生物学报* ,2003 **27** (5):463 ~ 467.
- [12] Hall T A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl Acid Symp Ser* ,1998 **41** 95 ~ 98.
- [13] Rozas J, Rozas R. DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* ,1999 **15** :174 ~ 175.
- [14] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin 3.01: An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. Berne: Computational and Molecular Population Genetics Laboratory (CMPG), University of Berne, Switzerland, 2006.
- [15] Kimura M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequences. *Molecular Evolution* ,1980 **16** :111 ~ 120.
- [16] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* ,2004 **5** :150 ~ 163.
- [17] 刘焕章. 鱼类线粒体 DNA 控制区的结构与进化:以鳊鳊类为例. *自然科学进展* ,2002 **12** (3):266 ~ 270.
- [18] 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. *上海水产大学学报* ,2006 **15** (4):398 ~ 402.
- [19] 竺可桢. 中国自然地理古地理(上册). 北京:科学出版社,1984,191 ~ 206.
- [20] Donaldson K A, Wilson R R Jr. Amphipanamic geminates of snook (Percoidae: Centropomidae) provide a calibration of the divergence rate in the mitochondrial DNA control region of fishes. *Mol Phylogenet Evol* ,1999 **13** (1):208 ~ 213.