

两种 科鱼类在长江和珠江流域 Cytb 基因序列变异性分析

杨金权 刘焕章

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 采用 PCR 技术获得了长江和珠江流域的两种 科鱼类 1137bp Cytb 基因的片段, 进行了序列测定, 并用 Mega 软件进行了序列分析。研究发现两种 科鱼类的全序列从第十位碱基起有一个三联体密码子的缺失, 推测为鲇形目鱼类 Cytb 序列所特有特征。黄颡鱼和大鳍 种群间的序列差异分别为 0.4% 和 1.6%, 介于一般淡水鱼类 mtDNA 种内序列的变异范围, 而高于洄游鱼类序列变异。黄颡鱼属和 属 Cytb 基因序列间的差异为 17.6%—18.0%, 大大高于种间的序列差异率, 也从分子水平上证实了二者属级分类单元的有效性。依据分子进化速率推测, 长江和珠江两水系间大鳍 的分歧时间为距今 27 万年左右的更新世中晚期, 黄颡鱼的分歧时间在距今 7 万年左右的更新世末期。推测造成二者有着不同分歧时间的可能原因是: 大鳍 属暖水性鱼类, 在第四纪冰川期间, 由于全球性气候变冷, 大鳍 退至长江以南, 并在各水系间产生隔离, 各自独立分化至今。而黄颡鱼具有很强的适应性, 在第四纪数次冰川期间可能进行过广泛的交流。

关键词: 科鱼类; mtDNA; Cytb 基因; 遗传分化

中图分类号: Q959.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2003)03-0253-05

近年来, PCR 结合的 DNA 序列分析技术的日益完善和广泛应用, 为系统进化研究提供了新的手段。DNA 分子作为遗传信息的载体, 是进化历史的忠实记录者, 以其分子一级序列提供的信息, 可探寻鱼类进化的途径。mtDNA 具有结构稳定, 进化速度快和严格的母系遗传等特征, 使得其成为系统进化研究的理想工具^[1]。Cytb 基因相比其他线粒体基因其进化速率虽不及 d loop(控制区)快^[2], 但由于其易用一些通用引物扩增和测序, 而且它的结构和功能也了解的较为清楚^[3-6], 因而也常用作种下阶元的进化研究。已有不少学者利用 Cytb 基因的序列研究了鱼类的系统进化, 取得了许多有启发性的结果。

长江和珠江是我国的两大河流, 鱼类资源丰富。李思发等曾对珠江、长江和黑龙江河流中四大家鱼的种质资源进行了研究, 结果表明同种鱼不同水系之间存在着明显的生化遗传差异^[7]。科 Bagridae 分布于亚洲和非洲^[8,9], 在我国分布仅次于鲇科 Siluridae 的常见鲇形目 Siluriformes 淡水鱼类。我国境内已知有 4 属 30 种, 主要集中分布于华东和华南各水系, 而在宁蒙区水系无分布。由于其分布广, 数量

多, 为重要的捕捞对象, 具有较大的经济价值, 因而关于 科鱼类的系统发育, 已越来越多的见诸报道^[10-15], 但对不同地域的种内种群差异, 尤其 DNA 序列的变异研究还未见报道。以线粒体 DNA 做标记, 开展其遗传分化研究, 将有助于了解 科鱼类各地群体相互间的系统进化关系, 并为种群鉴别奠定基础。此外, 对于阐明物种形成过程中, 地理隔离因素对物种形成影响等重大理论问题或许也有所裨益。作者对 Cytb 基因的全序列变异情况进行分析, 探讨了 科两个种自然群体的分化和地理分布关系。

1 材料与方法

1.1 材料 选用分别采自广西阳朔和江西上饶、婺源的黄颡鱼 *Pelteobagrus fulvidraco* 和大鳍 *Mystus macropterus* 进行序列分析, 所有标本均用 95% 的酒精固定保存。

1.2 基因组总 DNA 提取 取鱼背部肌肉 50mg 用蒸馏水、TE(10mmol/L Tris·HCl, 1mmol/L EDTA, pH=8.0)缓冲液浸泡直至将组织中的酒精去除。加入 620μL STE (0.1mol/L NaCl, 10mmol/L Tris·HCl,

收稿日期: 2002-10-22; 修订日期: 2002-12-16

基金项目: 国家自然科学基金 49832010 资助

作者简介: 杨金权(1976—), 男, 陕西省洛南县人; 硕士生; 主要从事鱼类分子进化与生物地理学研究

通讯作者: 刘焕章, Email: hzliu@ihb.ac.cn

1mmol/L EDTA, pH8.0) 缓冲液, 10μL 10μg/ μL 蛋白酶 K 和 70μL 10% SDS 消化, 56℃恒温作用直至消化完全。平衡酚, 氯仿-异戊醇(24: 1) 抽提, 2 倍体积无水乙醇沉淀, 用 50μL TE 缓冲液溶解, 保存于- 20℃冰箱中待用。

1.3 PCR 扩增、测序 PCR 扩增和测序引物为:
L14724: 5'-GACITGAAAAACCAACCGTTG-3';
H15915: 5'-CTCCGATCTCCGGAATACAAGA G-3'^[16]

PCR 反应使用大约 50ng 基因组 DNA 作为模板, 每一样品的扩增体积为 50μL, 其中 10× 缓冲液 5μL, dNTPs 2μL(各 2. 5mmol/L), 引物各 1μL, Taq 酶 2. 0U。PCR 反应条件为: 94℃预变性 3min, 然后 35 个循环包括: 94℃变性 45s, 58℃退火 45s, 72℃延伸 1min, 最后在 72℃延伸 8min。每次反应设立不含 DNA 模板的空白对照。扩增产物用 0. 8% 的琼脂糖凝胶后用 Glassmilk DNA 纯化回收试剂盒回收, 并取一定量回收产物送上海基康公司进行测试。序列已

经送 GenBank, 序列号为: AF430373- AF430376。
1.4 数据分析 利用 Clustal X 软件^[17] 对基因序列进行排序(Alignment)。应用 MEGA(ver2. 0)^[18] 对核苷酸位点的替换数进行统计, 计算不同种群间的 Cytb 基因序列变异率。
1.5 参考序列 从基因库(GenBank) 中的鲤线粒体全序列中取得 Cytb 基因序列, 加入到研究中一同作变异性分析。

2 结果

2.1 细胞色素 b 基因及序列 对每一物种的 Cytb 基因均得到 2 段序列。将 2 段序列经拼接和双向对准后, 得到了 Cytb 基因的全序列, 所有序列均读入 Clustal X 中, 经排序后生成了供进行分析的序列矩阵。其部分序列的对比见图 1, 四种碱基的含量见表 2。

表1 两种不同水系的 科鱼类的总碱基含量及密码子的不同位点碱基含量, 其中 M. 表示 *M. macropterus*, P. 表示 *P. fulvidrao*, Avg. 表示碱基的平均含量

Tab. 1 Base composition and bias for the Cytochrome b gene of the two species of bagrid fishes in different water systems. M. indicates *M. macropterus*. P. indicates *P. fulvidrao*. Avg. indicates the average quantities of nucleotides

	T	C	A	G	T 1	G 1	A 1	G 1	T 2	G 2	A 2	G 2	T 3	G 3	A 3	G 3
M. ys	31. 5	26. 4	28. 8	13. 4	27. 2	23. 7	23. 5	25. 6	43. 0	23. 7	21. 1	12. 1	24. 3	31. 7	41. 7	2. 4
M. wy	31. 8	25. 8	29. 1	13. 3	27. 4	23. 5	24. 5	24. 5	43. 0	23. 7	21. 1	12. 1	25. 1	30. 1	41. 7	3. 2
Avg. m	31. 7	26. 1	28. 9	13. 3	27. 3	23. 6	24. 0	25. 1	43. 0	23. 7	21. 1	12. 1	24. 7	30. 9	41. 7	2. 8
P. ys	26. 6	32. 0	27. 6	13. 7	25. 1	26. 4	23. 2	25. 3	42. 0	24. 8	20. 1	13. 2	12. 9	44. 9	39. 6	2. 6
P. sr	26. 6	32. 0	27. 6	13. 8	24. 8	26. 9	22. 7	25. 6	42. 0	24. 5	20. 3	13. 2	12. 9	44. 6	39. 8	2. 6
Avg. f	26. 6	32. 0	27. 6	13. 8	24. 9	26. 6	23. 0	25. 5	42. 0	24. 7	20. 2	13. 2	12. 9	44. 7	39. 7	2. 6
Avg.	29. 1	29. 0	28. 3	13. 5	26. 1	25. 1	23. 5	25. 3	42. 5	24. 2	20. 6	12. 7	18. 8	37. 8	40. 7	2. 7

由图 1 可见, 与鲤 Cytb 基因相比, 科这两种鱼的序列其起始密码子 ATG 后第四位三联体密码子缺失, 因此其序列全长为 1137bp, 在此 1137bp 中有 211 个变异位点, 占总序列的 18. 6%。由表 1 可见 A、T、G 和 C 的含量, 黄颡鱼分别为 27. 6%、26. 6%、13. 8% 和 32. 0%, A+ T 含量为 54. 2%, 大鳍 分别为 28. 9%、31. 7%、13. 3% 和 26. 1%, A+ T 含量为 60. 3%, 两种之间差异较大, 尤其表现在 T、C 含量。碱基平均含量为 A 28. 3%、T 29. 1%、G 13. 5% 和 C 29. 0%, 平均 A+ T 为 57. 5%, 高于 G+ C 的含量(42. 5%)。同时还可看到, Cytb 基因的碱基组成有很大的偏向性, 即在四个碱基 A、T、G、C 中, G 的含量非常低(13. 8% 和 13. 3%)。这些都与脊椎动

物线粒体 DNA 的特点相一致^[19]。
2.2 细胞色素 b 基因全序列的变异情况
应用 Mega 软件分析序列变异情况, 碱基替换率统计于表 2。

表2 两种不同来源 科鱼类 cytb 基因序列转换数 (下三角) 和颠换数(上三角)

Tab. 2 Numbers of transitions (lower triangle) and transversions for cytochrome b gene sequences of two species of bagrid fishes in the present study

	1	2	3	4
1 <i>M. macropterus</i> . ys		3	83	80
2 <i>M. macropterus</i> . wy	15		82	79
3 <i>P. fulvidrao</i> . ys	122	122		3
4 <i>P. fulvidrao</i> . sr	122	122	2	

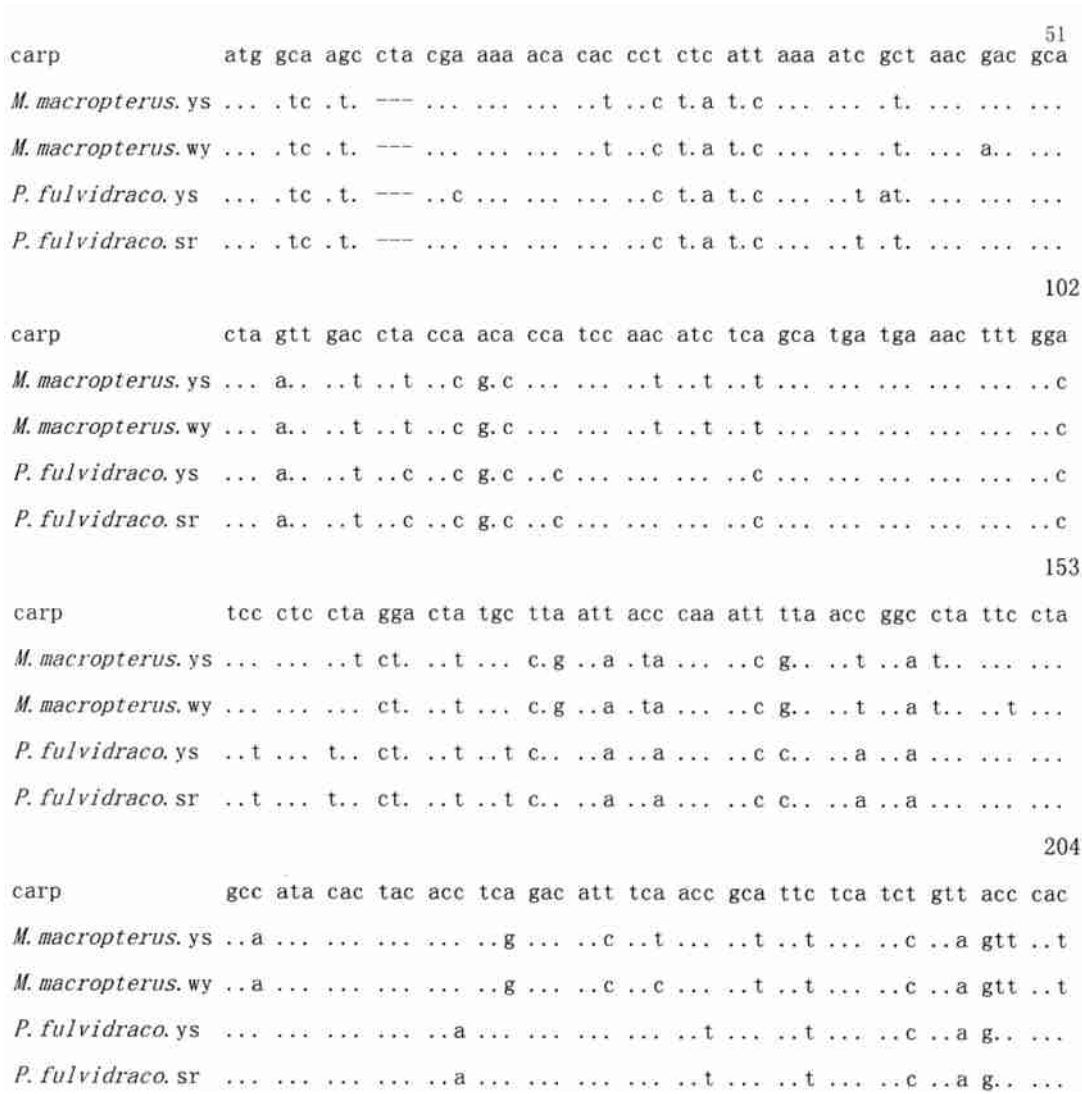


图1 两种不同水系来源的 科鱼类 Cytb 基因部分序列排序结果。其中“-”表示核苷酸有缺失,“.”表示此位点与鲤(最上排)核苷酸相同,种名后的 .ys、wy、和 .sr 分别表示采自广西阳朔、江西婺源和江西上饶,carp 为从 GenBank 下载的参考鲤 Cytb 基因全序列

Fig. 1 Aligned partial sequences of mitochondrial Cytb gene of two bagrid species in two different water systems. Hyphens and dots indicate gaps and nucleotide identity to carp (top row), respectively. ys, wy and sr in the last of specific name indicate the specimens collected from Yangshuo of Guangxi province, Wuyuan and Shangrao of Jiangxi province respectively. The referential carp Cytb gene sequence downloaded from GenBank

由表 2 可见,在 1137 个碱基的 Cytb 基因全序列中,大鳍 两种种群间有 15 个位点发生了转换,3 个位点发生了颠换,转换多于颠换。黄颡鱼种群间有 2 个位点发生了转换,颠换数为 3,转换少于颠换。大鳍 和黄颡鱼有相同的颠换数。通过统计,序列变异主要发生在密码子的第三碱基上,少数发生在第一位点上,极少发生在第二位点上,这与编码蛋白质的基因密码子第三位点进化最快,第二位点最保守的规律相一致^[20]。

2.3 碱基转换/颠换比和序列差异百分比

碱基转换/颠换情况和序列的差异率统计于表 3:

表 3 两种不同来源的 科鱼类 Cytb 基因序列转换/颠换 (上三角)和序列差异率(下三角)				
Tab. 3 Ratios of transitions/transversions(upper triangle) and percent of sequences differences (lower triangle) for cytochrome b gene sequences of two species of bagrid catfishes in the present study				
	1	2	3	4
1 <i>M. macropterus</i> .ys		5.000	1.470	1.525
2 <i>M. macropterus</i> .wy	0.016		1.488	1.544
3 <i>P. fulvidraco</i> .ys	0.180	0.179		0.667
4 <i>P. fulvidraco</i> .sr	0.178	0.177	0.004	

由表 3 可见,大鳍 种群间的转换/颠换值为 5.000,黄颡鱼种群间的转换/颠换值为 0.667,属间的转换/颠换值为 1.470—1.544。大鳍 种群间的序列差异百分比为 1.6%,黄颡鱼种群间的序列差异百分比为 0.4%,属间的差异百分比为 17.7%—18.0%。

3 讨论

两种 科鱼类的全序列从第十位碱基起有一三联体密码子的缺失,从 GenBank 下载了大量鲇形目和其他目的鱼类的同一区段序列进行排序比较,发现仅有鲇形目鱼类序列在此有一缺失,可以初步确定此特征为鲇形目鱼类 Cytb 序列所特有特征,可作为鲇形目鱼类分子分类的依据。

黄颡鱼和大鳍 种群间的序列差异分别为 0.4%和 1.6%,介于一般淡水鱼类 mtDNA 种内序列的变异范围,而高于洄游鱼类序列变异。黄颡鱼属和 属在形态上差异显著,其 Cytb 基因序列间的差异为 17.6%—18.0%,大大高于种间的序列差异率,也从分子水平上证实了二者属级分类单元的有效性。同时种内的这种序列差异也为进行种群识别提供了依据。

一般来说,物种间序列变异位点应是转换多于颠换,但由表 3 可见黄颡鱼两种群间的转换/颠换为 0.667,转换少于颠换。而种内的碱基替换是不会达到饱和的,这表明不同类群间的碱基替换情况可能不尽如此。两水系间大鳍 比黄颡鱼有更大的序列差异,提示二者可能有着不同的分歧时间。经过比较不同学者提出的分子进化速率,作者认为台湾学者曾晴贤提出的 3%/百万年的进化速率较适合 科鱼类^[21]。据此推测,两水系间大鳍 的分歧时间为距今 27 万年左右的更新世中晚期,黄颡鱼的分歧时间在距今 7 万年左右的更新世末期。造成二者有着不同分歧时间的可能原因是:大鳍 属暖水性鱼类,仅分布于长江以南各水系,在第四纪冰川期间,由于全球性气候变冷,大鳍 退至长江以南,并在各水系间产生隔离,各自独立分化至今。而黄颡鱼具有很强的适应性,广布于东亚各水系,它们在第四纪数次冰川期间可能进行过广泛的交流。

参考文献:

[1] Billington N,Hebert P D N. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions [J]. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1991, **48** (suppl.1): 80—94

[2] Digby T J. Gray M W, Lazier C B. Rainbow trout mitochondrial DNA: sequences and structure characteristics of the non coding con-

trol region and flanking tRNA genes [J]. *Gene*, 1992, **113**: 197—204

[3] Chen I, Hsu C, Hui C, *et al.* Sequence length and variation in the mitochondrial control region of two freshwater gobiid fishes belonging to *Rhinogobius* (Teleostei: Gobiidae) [J]. *J. Fish Biol.*, 1998, **53**: 179—191

[4] Irwin D M. Kocher T D, Wilson A C. Evolution of the cytochrome b gene of mammals [J]. *J. Mol. Evol.*, 1991, **32**: 128—144

[5] Esposti M D, Vries De S, Crimi M, *et al.* Review: Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of the protein [J]. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1993, **1143**: 243—271

[6] Xiao W, Zhang Y. Genetics and Evolution of mitochondrial DNA in fish [J]. *Acta Hydrobi. Sinica*, 2000, **24**(4): 384—391[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]

[7] Li S, Wang Q, Chen Y. Biochemical genetic structures and variations in natural populations of silver carp, big head and grass carp in Changjiang River, Zhujiang River and Heilongjiang River [J]. *Journal of Fisheries of China*, 1986, **10**(4): 351—372[李思发, 王强, 陈永乐. 长江、珠江、黑龙江三水系的鲢、鳙、草鱼原种种群的生化遗传结构与变异. 水产学报, 1986, **10**(4): 351—372]

[8] Barra T M. *An Atlas of Distribution of the Freshwater Fish Families of the world*[M]. Univ Nebraska Press, Oshama. 1981

[9] Guy G. Teugels. Taxonomy, phylogeny and biogeography of catfishes (Ostariophysi, Siluridae): an overview [J]. *Aquat. Living Resour.*, 1996, **9**: 9—34

[10] Chu X, Zheng B, Dai D. Eds. *Fauna Sinica, Osteichthyes, Siluriformes*[M]. Science Press, Beijing, China 1999[褚新洛, 郑葆珊, 戴定远. 中国动物志. 硬骨鱼纲. 鲇形目. 北京: 科学出版社. 1999]

[11] Tilak R. The osteocranium and the weberian apparatus of the fishes of the family Bagridae (Pisces: siluroridei) [J]. *Gegebarus Morph. Jb.*, 1965, **107**: 415—443

[12] Jayaram K C. Contribution on the study of bagrid fishes (Siluridae: bagridae). 3. A systematic account of the Japanese, Chinese, Malayan And Indonesian genera [J]. *Traibia*, 1968, **27** (2—3): 287—386

[13] Zhang Y, Wang D. Study on the osteology of the bagrid catfishes from Jialing River (IV): an approach to the phylogenetic relationship [J]. *J. Southwest China Normal Univ.*, 1995, **20**(4): 432—439

[14] Wang D, Luo Q, Liu S. Morphological observations on the skull of *Mystus macropterus* Bleeker (Bagridae, Siluriformes) [J]. *J. Southwest China Normal Univ.*, 1990, **15**(3): 399—404[王德寿, 罗泉笙, 刘少英. 大鳍 头骨的形态观察(鲇形目: 科). 西南师范大学学报, 1990, **15**(3): 399—404]

[15] Dai F, Su J. Studies on isozymes, skeleton characters of eight bagrid catfishes and comments on phylogenetic relationship (Siluriformes: Bagridae) [J]. *Acta Zootaxonomic Sinica*, 1998, **23**(4): 432—439 [戴凤田, 苏锦祥. 科八种鱼类同工酶和骨骼特征分析及系统演化的探讨(鲇形目: 科). 动物分类学报, 1998, **23**(4): 432—439]

[16] Okazaki T. Genetic relationships of japanese and Korean bagrid catfishes inferred from mitochondrial DNA analysis [J]. *Zool. Sci.*,

1999, **16**: 363—379

[17] Xiao W, Zhang Y, Liu H. Molecular systematics of xenocyprinae (Teleostei: Cyprinidae): taxonomy, biogeography, and coevolution of a special group restricted in east asia [J]. *Mol. Phyl. and Evol.* , 2001, **18** (2): 163—173

[18] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, *et al.* The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by Quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Res.* , 1997, **25** (24): 4876—4882

[19] Kumar S, Tamura K, Jakobsen B I, *et al.* MEGA: molecular evolutionary genetics analysis. Ver. 2.0 [J]. *Bioinformatics*, 2001, **17**: 1244—1245

[20] Meyer A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In: Hochachka and Mommsen eds., *Biochemistry and molecular biology of fishes* [M]. Elsevier Science Publishers, 1993, **2**: 1—38

[21] Tzeng C. *The Mitochondrial Genome of Crossostoma Lacustre (Homalopteridae), and Phylogenetic Relationships of Homalopterid Fishes of Taiwan Based on the Mitochondrial DNA Sequence Analysis* [Ph. D Thesis] [D]. National Taiwan University, Taiwan. 1992, 45—47 [曾晴贤. 台湾缨口鳅之线粒体基因组和台湾产平鳍鳅科鱼类之分子演化的研究. [博士论文]. 台湾, 国立台湾大学, 1992, 45—47]

MITOCHONDRIAL CYTOCHROME B GENE SEQUENCE VARIATIONS OF TWO BAGRID FISHES IN CHANGJIANG RIVER AND ZHUJIANG RIVER

YANG Jirr-Quan and LIU Huan Zhang

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences , Wuhan 430072)

Abstract:MtDNA cytochrome b gene sequence variations of samples of two bagrid fishes from Changjiang and Zhujiang Rivers were studied in the present paper. 1137 bp sequences were obtained through PCR amplifications. Sequence analysis was conducted using MEGA program with the sequence of the common carp downloaded from GenBank for comparison. The results showed that there is a codon deletion in cytochrome b gene of the two bagrid species at the tenth nucleotide position compared with that of the common carp, which could be a common character for all catfishes. The intraspecific sequence divergences of *Pelteobagrus fulvidraco* and *Mystus macropterus* were 0.4% and 1.6% respectively, which were in the range of freshwater fishes, but higher than those of anadromous fishes. The sequence differences between *P. fulvidraco* and *M. macropterus* were from 17.6% to 18.0%, which were much higher than the intraspecific variations. Inferred from the molecular evolution rate, the divergent time of *M. macropterus* in Changjiang and Zhujiang rivers was about 270 thousand years ago during middle and late Pleistocene, and that of *P. fulvidraco* was 70 thousand years ago in the late Pleistocene. The reason that the two bagrid fishes in Changjiang and Zhujiang Rivers have different divergent times might be that *M. macropterus* is warm freshwater fishes, and they were limited to the south of Changjiang River in China during the middle and late Pleistocene glacial period and differentiated in different water systems till now; while *P. fulvidraco* is a widespread species and can adapt to different environments, thus exchanges among *P. fulvidraco* populations might have occurred among different water systems during the Quaternary glacial period.

Key words: Bagrid fishes; mtDNA; Cytochrome b gene; Genetic divergence