

研究简报

亚口鱼科鱼类核 DNA 18S-ITS1-5.8S 序列比较分析

孙玉华¹ 谢从新¹ 刘思阳²

(1. 华中农业大学水产学院, 水产养殖重点实验室, 武汉 430070;
2. 武汉大学生命科学学院, 发育生物学重点实验室, 武汉 430072)

THE GENETIC VARIATION OF 18S-ITS1-5.8S SEQUENCES OF 7 CATOSTOMIDS

SUN Yir-Hua¹, XIE Cong-Xin¹ and LIU Si-Yang²

(1. College of Fishery, Key laboratory of Aquaculture, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070;
2. College of Life Science, Wuhan University, key laboratory of development biology, Wuhan 430072)

关键词: 亚口鱼科; 中国胭脂鱼; 18S-ITS1-5.8S

Key words: Catostomidae; *Myxocyprinus asiaticus*; Chinese sucker; 18S-ITS1-5.8S

中图分类号: Q173 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2006)03-0367-04

中国胭脂鱼, Cycleptinae 亚科, *Myxocyprinus* 属, 是亚口鱼科鱼类在亚洲大陆唯一分布的单型属、种^[1], 主要分布于我国的长江和闽江流域。由于人类的破坏, 目前中国胭脂鱼野生种群近于灭绝, 处于濒危状态, 被列为国家一级保护动物。由于中国胭脂鱼的物种及分布区域的独特性, 使得其在亚口鱼科鱼类的生物地理学、系统发育进化以及保护生物学研究中具有极为重要的价值。

目前, 对亚口鱼科鱼类的研究主要是在线粒体 DNA 层次, 如以线粒体 DNA 的控制区和 DN5/6 基因为分子标记, 调查胭脂鱼种群间、种群内的遗传结构和遗传分化以阐明其多样性衰退的程度^[2-4], 以线粒体 DNA 细胞色素 *b* 基因以及 16S 和 18S 基因为分子标记探讨亚口鱼科鱼类的系统发育关系等^[5]。然而, 线粒体 DNA 只占鱼类遗传信息的极少部分, 越来越多的学者希望以鱼类核 DNA 为分子标记来检测遗传变异情况, 其中, rRNA 基因受到普遍的关注^[6]。真核生物的 rRNA 基因以串联重复方式存在, 其中 18S、5.8S、28S 组成一个转录元, 其前体是由 18S-ITS1-5.8S-ITS2-28S 剪切而来。本文以中国胭脂鱼为中心, 比较了亚口鱼科 6 属 7 种在 18S-ITS1-5.8S 序列变异情况, 并以此序列为分子标记, 构建了亚口鱼科鱼类系统发育树。18S-ITS1-5.8S 既含有编码序列 18S 和 5.8S, 又含有非编码序列转录间隔区 1 (ITS1), 适合用来分

析比较亚口鱼科鱼类在核 DNA 编码与非编码区域的遗传变异情况。

1 材料与方法

1.1 材料 亚口鱼科 6 属 7 种的鳍条或肌肉材料, 低温保存于 95% 的乙醇中 (表 1)。

表 1 亚口鱼科 6 属 7 种 18S-ITS1-5.8S 的 GenBank 登录号及材料来源

Tab. 1 Genbank accession no. for 18S-ITS1-5.8S and fish materials of 7 catostomids

亚口鱼 亚科	代表 种名	GenBank 登录号	材料 来源
Cycleptinae	<i>Myxocyprinus asiaticus</i> *	AY540759	宜昌中华鲟所
Ictiobinae	<i>Ictiobus cyprinellus</i> *	进行中	湖北省良种场
Catostominae	<i>Moxostoma robustum</i> *	AY540758	Oconee, GA, USA
	<i>Catostomus macrocheilus</i> *	AY540756	Oregon, USA
	<i>Catostomus commersoni</i> *	AY540754	willamette, USA
	<i>Deltistes luxatus</i> *	AY540757	NYS Museum, USA
	<i>Chasmistes brevirostris</i> *	AY540755	Oregon, USA

1.2 DNA 抽提 按照孙玉华^[7]等方法进行。

收稿日期: 2005-07-06; 修订日期: 2005-09-28

基金项目: 华中农业大学引进人才基金 (No. 52204-04031) 资助

作者简介: 孙玉华 (1973—), 男, 湖北荆州人, 博士。研究方向: 动物遗传学。E-mail: yhsun67@sina.com. 致谢: 鸣谢美国 NYS Museum 的 Richard Morse 和 Robert Daniels 博士, 俄勒冈州立大学 M. Douglas 博士和纽约大学医学院 Isaac Wirgin 博士等提供部分北美亚口鱼科的材料

1.3 18S-ITS1-5.8S 基因部分片段的扩增 基因部分片断的 PCR 在 Biometra PCR 仪 (德国) 上进行。采用一对通用引物^[7], 序列为 18d:5'-CACACCGCCCCGTCGCTACTACCGATTG-3'; 5.8C:5'-GTGCGTTCGAAGTGTCGATGATCAA-3', 预计的扩增片段跨越部分 18S 和 5.8S 序列以及完整的 ITS1。反应体系 25μL:10 ×Buffer 2.5μL (2.5mmol/L Mg²⁺), 2.5mmol/L dNTP 1μL, 12.5μmol/L 正反向引物各 1μL, 约 20ng DNA 模板, 1U 的 Taq 酶, 最后超纯水补至 25μL。扩增程序如下: 94 预变性 5min, 94 变性 40s, 55 退火 35s, 72 延伸 60s, 35 个循环。最后 72 延伸 8min。扩增产物上样于有少量 EB 的 1.0% 琼脂糖胶孔点样 5μL, 电泳后紫外线检测, 以标准 100bp Ladder 估计产物大小。将电泳胶条切下, 按纯化试剂盒 (MBI Fermentas, Lithuania) 说明书纯化, 直接送北京三博志远公司测序。

1.4 序列分析及系统发育树的构建方法 用 CLUSTALW^[9] 软件将获得的 18S-ITS1-5.8S 同源序列对齐, 比较各物种序列组成和遗传变异情况。以 Kimura 双参数法为距离测度, 利用 MEGA2.1^[10] 软件中的非加权对组算术平均法 (UPGMA) 和最大简约数法 (MP) 程序构建系统发育树。

2 结果

2.1 18S-ITS1-5.8S 部分片段扩增结果

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 发现亚口鱼科 7 个种均能获得较明亮的单一扩增条带。通过比较标准 100bp Ladder, 扩增片段大小在 300—500bp 之间。PCR 产物测序后, 通过 NCBI BLAST 命令, 结果显示: 获得的序列确为 18S-ITS1-5.8S 部分片段, 包括完整 ITS1 区以及 18S 和 5.8S 部分片段 (Genbank 登录号见表 1), 与鲤形目鳅科鱼类泥鳅 (Loach) 相应片段同源性最大 (约有 90% 左右)。用 CLASTALX 软件将同源序列对齐后, 发现大口胭脂鱼 *Ictiobus cyprinellus* 18S-ITS1-5.8S 序列最长 575bp, 红马胭脂鱼 *Moxostoma robustum* 最短, 仅 315bp, 其他胭脂鱼相应片段的长度大小居中。

分析 7 种亚口鱼类 18S-ITS1-5.8S 部分片段, 发现序列长度变异主要在 ITS1 上。各物种之间 ITS1 长度变化很大, 红马胭脂鱼仅 53bp, 大口胭脂鱼达 289bp。在保守的 18S 和 5.8S 两个序列片段, 序列长度相对变化不大, 遗传变异主要

表现为核苷酸替代 (表 2)。

表 2 亚口鱼科 6 属 7 个种 18S-ITS1-5.8S 部分序列长度及其组成

Tab. 2 Variation of 18S-ITS1-5.8S sequences of 7 catostomids			
代表种名	GenBank 登录号	18S-ITS1-5.8S 长度	分割位点
<i>Ictiobus cyprinellus</i>	登录中	575	1-176:18S rRNA 177-465:ITS1 466-575:5.8S
<i>Moxostoma robustum</i>	AY540758	315	1-150:18S rRNA 151-204:ITS1 205-315:5.8S
<i>Catostomus macrocheilus</i>	AY540756	406	1-155:18S rRNA 156-296:ITS1 297-406:5.8S
<i>Catostomus commersoni</i>	AY540754	405	1-154:18S 155-295:ITS1 296-405:5.8S rRNA
<i>Deltistes luxatus</i>	AY540757	407	1-156:18S rRNA 157-297:ITS1 298-407:5.8S
<i>Chasmistes brevirostris</i>	AY540755	410	1-155:18S 156-300:ITS1 301-410:5.8S
<i>Myxocyprinus asiaticus</i>	AY540759	565	1-168:18S rRNA 169-453:ITS1 454-565:5.8S

2.2 以 18S-ITS1-5.8S 序列为标记构建系统发育树

分别以 18S-ITS1-5.8S 序列、18S-5.8S 序列以及 ITS1 序列为分子标记, 用 EMGA 软件构建了 6 属 7 种亚口鱼类的亲缘关系树 (图 1)。这 3 个标记获得的系统发育树是一致的。

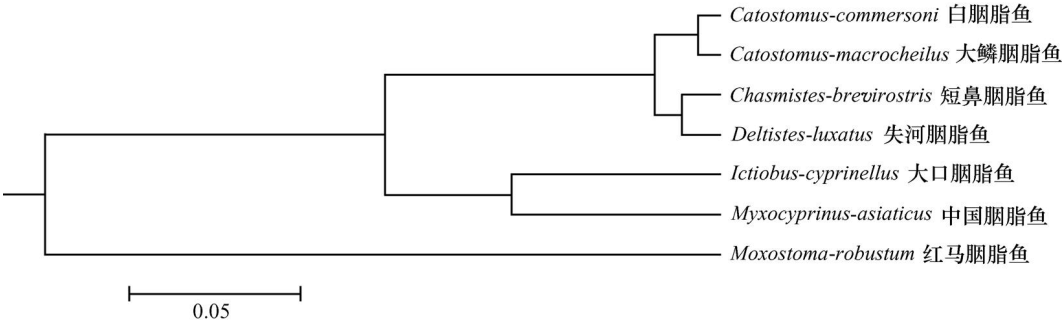


图 1 基于 UPGMA 方法亚口鱼科 7 个种的 18S-ITS1-5.8S、18S-5.8S 及 ITS1 序列的系统发育树
Fig. 1 Phylogenetic tree based on 18S-ITS1-5.8S, 18S-5.8S and ITS1 for 7 catostomids using UPGMA method

3 讨论

3.1 18S-ITS1-5.8S 序列变异特点

亚口鱼科 7 个种之间 18S-ITS1-5.8S 序列变异见表 3,平均成对遗传距离为 0.203。其中, *Catostomus* 属内白胭脂鱼 *C. commersoni* 与大鳞胭脂鱼 *C. macrocheilus* 之间序列差异最小, DNA 成对距离仅为 1.30%。红马胭脂鱼 *M. robustum* 与失河胭脂鱼 *D. luxatus* 之间序列差异最大, DNA 间成对距离为 41.6%。中国胭脂鱼和亚口鱼科其他属种之间核苷酸的差异总体来说较大:与大口胭脂鱼之间成对遗传距离为 12.3%,与短鼻胭脂鱼 *C. brevirostris* 之间成对遗传距离为 22.0%。

表 3 基于 Kimura 双参数法亚口鱼科 7 个种的 18S-ITS1-5.8S 序列成对遗传距离

Tab.3 Pairwise genetic distances of 18S-ITS1-5.8S sequences based on Kimura 2-parameter of 7 catostomids							
	1	2	3	4	5	6	7
<i>Catostomus commersoni</i>							
<i>Catostomus macrocheilus</i>	0.013						
<i>Chasmistes brevirostris</i>	0.040	0.040					
<i>Deltistes luxatus</i>	0.037	0.037	0.023				
<i>Ictiobus cyprinellus</i>	0.186	0.186	0.213	0.208			
<i>Myxocyprinus asiaticus</i>	0.184	0.175	0.220	0.206	0.123		
<i>Maxostoma robustum</i>	0.391	0.392	0.405	0.416	0.380	0.395	

7 种亚口鱼类的核基因片段 ITS1 长度变化很大。红马胭脂鱼 ITS1 最短,仅 53bp;大口胭脂鱼最长,达 289bp,种间变异很大。大口胭脂鱼与中国胭脂鱼的 ITS1 区域长度明显比其他物种大,分别为 289bp 和 285bp。除红马胭脂鱼外,其他种 ITS1 长度均为 150bp。作者推测,ITS1 是非编码序列,它在进化中由于受到的选择压力较小,进化速率快,是高变异的区域。

亚口鱼科 7 个种 18S-ITS1-5.8S 中保守的 18S-5.8S 部分片段遗传变异情况见表 4,平均成对遗传距离为 0.169。*Catostomus* 属内白胭脂鱼与大鳞胭脂鱼之间序列差异最小, DNA 成对距离仅为 0.80%。红马胭脂鱼和失河胭脂鱼之间序列差异最大, DNA 间成对距离为 38.3%。中国胭脂鱼与其他亚口鱼类之间核苷酸的差异总体来说较大:与大鳞胭脂鱼之间核苷酸变异率为 10.4%, DNA 间成对距离为 12.6% (共 27 个核苷酸替代,其中转换 14 个,颠换 13 个);与失河胭脂鱼之间核苷酸变异率为 11.9%, DNA 间成对距离为 15.1% (共 31 个核苷酸替代,其中转换 16 个,颠换 15 个)。从核苷酸组成来看,18S-5.8S 总体还是较为保守的,没有大的片段缺失,主要是碱基替代。在 18S 片段,中国胭脂鱼和大口胭脂鱼与其他胭脂鱼比较:大口胭脂鱼在 18S 片段约 70bp 位点处多了 19bp 的插入片段,中国胭脂鱼在 18S 片段约 100bp 处多了 16bp 的插入片段。

作者比较了亚口鱼科鱼类在核 DNA 18S-5.8S 片段和线粒体细胞色素 *b* 基因片段的核苷酸替代率大小。在约 308bp

的细胞色素 *b* 片段中,中国胭脂鱼与大鳞胭脂鱼之间共 42 个核苷酸替代,其中转换 30 个,颠换 12 个,变异率为 13.6%;与失河胭脂鱼之间共 45 个核苷酸替代,其中转换 32 个,颠换 13 个,变异率为 14.6%。可以看出,线粒体细胞色素 *b* 基因的变异率要比核 rDNA 18S-5.8S 编码基因略高一些,推测核基因编码基因与线粒体细胞色素 *b* 基因在进化中,受到的选择压力大小不同。核内 rDNA 18S-5.8S 编码基因受到的压力较大,进化速率较慢,相对要保守一些。

表 4 基于 Kimura 2-parameter 亚口鱼科 7 个种的 18S-5.8S 序列成对遗传距离

Tab.4 Pairwise genetic distances of 18S-5.8S sequences based on Kimura 2-parameter							
	1	2	3	4	5	6	7
<i>Catostomus commersoni</i>							
<i>Catostomus macrocheilus</i>	0.008						
<i>Chasmistes brevirostris</i>	0.033	0.025					
<i>Deltistes luxatus</i>	0.037	0.029	0.012				
<i>Myxocyprinus asiaticus</i>	0.136	0.126	0.146	0.151			
<i>Ictiobus cyprinellus</i>	0.148	0.138	0.169	0.174	0.108		
<i>Maxostoma robustum</i>	0.362	0.349	0.376	0.383	0.302	0.330	

3.2 亚口鱼科系统发育关系

亚口鱼科鱼类的系统发育关系十分复杂,一直以来是学者们感兴趣的课题。随着分子标记技术的发展,亚口鱼科鱼类的系统发育关系研究取得了相当的成绩,但仍然存在许多疑问。鱼类遗传信息主要储存于核 DNA 中,如果能结合核 DNA 和线粒体 DNA 遗传信息构建系统发育树,相互印证,相互补充,那么就有可能获得真树。基于此认识,首次以核 DNA 18S-ITS1-5.8S 序列构建了亚口鱼科鱼类的系统发育树(图 2)。本次实验结果与先前以线粒体细胞色素 *b* 基因构建的系统发育树是吻合的。遗憾的是,由于亚口鱼科鱼类绝大多数分布于北美,材料收集困难重重,本研究只探讨了 7 种亚口鱼科鱼类的亲缘关系。

一般认为,高变异序列如 ITS1 序列,不适合高分类阶元的系统重建工作,在本次研究中,以 18S-ITS1-5.8S、18S-5.8S 以及 ITS1 序列构建的系统进化树是一致的,这说明保守的 18S-5.8S 基因和进化速率快的 ITS1 序列可以作为分子标记,用于亚口鱼科鱼类的系统发育研究。该结果提示,在解决亲缘关系较近、内部关系复杂的 Catostominae 亚科内属种之间的系统发育关系时,如果用编码序列如线粒体 DNA 细胞色素 *b*、12S rRNA 和 16S rRNA 等构建的系统发育树相互之间存在争议,采用诸如类似 ITS1 等进化速率快的非编码序列为分子标记,可能是一个不错的选择。当然,仅根据一个或几个标记基因获得的系统发育树去推测物种树是不太准确的,因此重建亚口鱼科鱼类系统发育树可能需要更多的标记序列。

参考文献:

[1] Wang S, Yue P Q, Chen Y Y. China red data book of endangered

- animals[M]. Beijing: Science Press. 1998[汪松,乐佩琦,陈宜. 中国濒危动物红皮书——鱼类. 北京,科学出版社,1998]
- [2] Sun Y H, Liu S Y, Wang W, *et al.* Genetic diversity analysis of mtDNA D-loop region of Chinese sucker (*Myxocyprinus asiaticus*) [J]. *Acta Genetica Sinica*. 2002, **29**(2):787—790[孙玉华,刘思阳,王伟,等. 中国胭脂鱼线粒体控制区遗传多样性分析. 遗传学报, 2002, **29**(2):787—790]
- [3] Sun Y H, Liu S Y, Peng Z, *et al.* Genetic structure of Chinese sucker (*Myxocyprinus asiaticus*) by mtDNA and RAPD markers[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*. 2003, **27**:248—251[孙玉华,刘思阳,彭智,等. 中国胭脂鱼种群遗传分析. 水生生物学报, 2003, **27**:248—251]
- [4] Yuhua Sun, Siyang Liu, Gang Zhao *et al.* Population structure of Chinese sucker *Myxocyprinus asiaticus* in the Yangtze River based on mitochondrial DNA control region sequences[J]. *Fisheries science*, 2004, **70**:412—420
- [5] Harris P M, Mayden R. Phylogenetic relationships of Major clades of Catostomidae as inferred from Mitochondrial SSU and LSU rDNA sequences[J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2001, **20**(2): 225—237
- [6] Harris P M, Mayden R, Perez H, *et al.* Phylogenetic relationships of *Maxostoma* and *Scartomyzon* (Catostomidae) based on mitochondrial cytb sequence data[J]. *Journal of fish biology*, 2002, **61**:1433—1452
- [7] Tang B P, Zhou K Y, Song D X. Application of sequences of nrDNA ITS to molecular systematics of invertebrates[J]. *Chinese journal of Zoology*, 2002, **37**(4):67—73[唐伯平,周开亚,宋大祥. 核 rDNA ITS 区在无脊椎动物分子系统学研究中的应用. 动物学杂志, 2002, **37**(4):67—73]
- [8] Hillis. *Molecular systematics*[M]. The 2-th edition. 1996, 233—234, Sinaur Press
- [9] Hingins DG, Sharp P. M. CLUSTAL: A package for performing multiple sequence alignments on a microcomputer[J]. *Gene*, 1988, **73**:237—244
- [10] Kumar S, Tamura K, Jakobsen IB, *et al.* MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software [R]. Arizona State University, USA. 2001