

三个鲤品种线粒体基因片段序列保守性

童金苟 吴清江

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 在红鲤、镜鲤和野鲤中进行线粒体 16S rRNA 和 Cyt b 基因片段的序列测定。结果发现, 3 个鲤品种在多达 859 个碱基长度上无变异, 但是与已报道的鲤全序列中的同源序列则有约 1.5% 的差异。这个结果提示 3 个鲤品种可能在起源中是独立的一支, 并且分化极低。

关键词: 鲤; 品种; 线粒体序列; 16S rRNA; Cyt b; 保守性

中图分类号:S965. 116 文献标识码:A 文章编号: 1000- 3207(2001) 01- 007

中国现有 10 个以上鲤(*Cyprinus carpio* L. var.)品种(系), 但是它们在起源以及进化上的关系如何, 目前并不清楚。研究这些问题的主要困难是缺乏合适的遗传标记。尽管鲤是最早完成线粒体基因组全序列测定的少数几种鱼类之一^[1], 从线粒体基因序列上比较鲤品种间的变异还未见报道。

近十多年来, 分子技术的长足进步极大地丰富了遗传标记的内容^[2]。在所有方法中, DNA 序列的比较是最直接地揭示遗传变异的方法。DNA 序列变异的数据既可用于种内(品种、群体)间的微进化, 也可用于种间的宏观进化研究。PCR 的发明以及 DNA 测序的自动化极大地促进了这方面的研究^[3-5]。线粒体基因组作为一个小分子量环状分子(脊椎动物中约为 16kb), 一般认为它具有比核 DNA 高几倍的进化率^[6]。由于在绝大多数动物中它们是单亲(系)遗传, 因而没有像核基因存在的重组现象^[12]。线粒体 DNA 作为遗传标记被越来越广泛地应用于群体遗传和系统进化的研究^[7]。本文报道利用 2 个线粒体基因片段序列研究几种常见中国鲤品种的变异, 目的是通过与一个已报道的鲤同源线粒体基因的序列的比较, 探讨它们保守性的可能原因。

1 材料与方法

1.1 鲤品种及采样地点 红鲤(兴国红鲤)及散鳞镜鲤采自水生所关桥试验场, 用 Rcarp 和 M carp 表示。野鲤采自武汉庙湖, 用 Wcarp 表示。另外, 以鲫(彭泽鲫)3 尾(采自江西省水产研究所)作为外群(Outgroup), 用 PJCCP 表示。每个品种的鲤分别采集 5 尾体形、体色一致的个体, 然后每个品种随机地抽取 2 尾分析线粒体 DNA。

1.2 总 DNA 提取及线粒体 16S rRNA 和 Cyt b 基因扩增 取 100mg 肝脏提取总 DNA。

收稿日期: 1998-12-28; 修订日期: 2000-09-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(批准号: 39970587)

作者简介: 童金苟(1961-), 男, 湖北武汉人, 副研究员, 博士; 从事鱼类遗传育种研究

采用酚氯仿(酚: 氯仿: 异戊二醇= 25: 24: 1) 抽提 2 次, 氯仿异戊二醇(24: 1) 抽提 2 次, 上清液用 2 倍无水乙醇沉淀, DNA 经 70% 乙醇洗涤后贮存于 -20℃ 备用。

用 MJ- PTC- 100PCR 仪从总 DNA 中扩增线粒体 16S rRNA 和 Cyt b 基因片段。采用 2 对通用引物, 扩增 Cyt b 时用 CBH (1478): GCCCCTCAGAATGATATTGTCCTCA 和 CBL (1091): CCATCCAACATCAGCATGATGAAA^[3], 扩增 16S rRNA 时用 16Sar (L2510): CGCCTGTTTATCAAAACAT 和 16Sbr (H3080): CCG-GTCTGAACTCAGATCACGT^[8]。在 50μL 体积的反应溶液内, 含有 1μL DNA 模板 (总 DNA 100 倍稀释, 大约 20ng/ μL), 5μL PCR 缓冲液, 5μL MgCl₂ (25mmol/ L), 0.5μL 的引物 (2μmol/ L), 0.8μL dNTP (5mmol/ L), 2 IU Taq 酶 (Promega, 5 IU/ μL), 37.3μL ddH₂O。扩增条件为 94℃ 预变性 1.5min, 然后以下列参数循环 35 个周期: 94℃ 5s, 48℃ 30s, 72℃ 30s, 最后一个循环时在 72℃ 延伸 5min。PCR 产物纯化以后即可以用于测序。

1.3 序列测定 利用 ABI (Applied Biosystem Inc) 公司的荧光标记终止物测序试剂盒 (Dye terminator sequencing kit) 作测序反应。反应产物在 ABI310 型自动测序仪 (香港中文大学) 中测出核苷酸序列。每个品种测定 2 个个体。

1.4 数据处理 每个个体的二条互补链在 ABI SeqEditor 中经互补排序后用肉眼检查碱基的吸收峰以证实测序的准确性。经核对无误后输出核苷酸序列作分析用。用 Clastal W 软件作不同个体间序列的多重排序 (Multiple alignment)。用 MEGA 软件包作不同鲤品种间以鲤鲫间核苷酸序列的比较和统计分析。本文共统计比较了百分数趋异、碱基构成、转换/ 颠换比率及 Cyt b 基因密码子构成等参数。

1.5 参考序列 从基因库 (GenBank) 中的鲤线粒体全序列^[1] 中取得 16S rRNA 和 Cyt b 基因序列, 加入到本研究中一同作变异性分析。由于该文的作者只说明是普通鲤 (Common carp) 而未注明是何种品种, 因此本文将这个参考序列记为参考鲤品种。

2 结果与讨论

2.1 鲤品种间线粒体 16S rRNA 和 Cyt b 基因片段序列的比较

从所有个体的总 DNA 中成功地扩增出大约 570bp (碱基对) 的 16S rRNA 及大约 380bp 的 Cyt b 基因。PCR 产物的直接测序得到了 517bp 16S rRNA 和 342bp Cyt b。通过与鲫 (外群) 的同源序列片段排序后的序列见图 1 和图 2。

从图 1 可见, 16S rRNA 基因非常保守, 在 3 种测试鲤品种中完全相同 (变异为 0)。3 种鲤品种与本文引用的参考鲤鱼品种比较, 则有 3 个变异, 其中 2 个为插入/ 缺失变异, 1 个碱基转换。鲤与鲫比较, 共有 18 个变异位点, 其中 4 个为插入/ 缺失, 其余为碱基转换和颠换。表 1 (上半三角) 列出了鲤品种之间的趋异。在 3 种测试鲤与参考鲤品种间有 0.19% 的趋异, 而鲫则为 3.5%。16S rRNA 基因的碱基组成在鲤与鲫之间很相似, 均为约 32% A、21% T、24% C 及 23% G (表 2)。很明显, AT 比率大于 GC 比率, 转换/ 颠换比率在 3 种测试鲤品种中不存在 (因无变异), 在鲫与 4 种鲤品种之间则有 2.6。这个结果与其它一些分类地位相近动物中的数值相类似^[10]。

在 Cyt b 基因片段中, 鲤品种与鲫比较则在碱基组成上有较大的差异 (表 2), 尤其是

	1
Mcarp	ATAGGAGGTG CACCTGGCC AGTGACTACA AGTCAACGG CC-GCCGT- AITTTGACCG TGCAAAGGTA GCGAAATCAC
Ucarp CG..... T
Wcarp
Rcarp
PJCCP G
Mcarp	TTGCTTTA AATAGAGACC TGTATGAATG GCTAAACGAG GGCTTAACIG TCTCCCCTT CAAGTCAGTG AAATTGACCT
Ucarp
Wcarp
Rcarp
PJCCPC.....
Mcarp	ACCCGTGGAG AAGCGGTAT AATACTACAA GACGAGAGA CCCTTGGAG CTAAAGGTAC AAAACTAAC CACTGGAAAC
Ucarp
Wcarp
Rcarp
PJCCP A.....
Mcarp	AACTCAATAA AAAGCAAAAA CCTTGTGGAC CATGAGATT TACCTTCGGT TGGGGGACCC ACGGAGGAAA GAAAAGCCTC
Ucarp T
Wcarp
Rcarp
PJCCP TG..... T..... A..... A..... G.....
Mcarp	CAGGTGGACT GGGAAAACCT CCTAAACCA AGAGAGACAT CTCTAAGCCA CAGAACATCT GACCAAATAT GATCCGGCTA
Ucarp T
Wcarp
Rcarp
PJCCP AC..... G..... TT..... T..... T..... T..... T.....
Mcarp	ACACATAGCC GATCAACGAA CCAAGTTACC CTAGGGATAA CAGGCCAATC CTCTCCAGA GTCCCATATCG ACGAGGGGT
Ucarp
Wcarp
Rcarp
PJCCP	T..... -.....
	517
Mcarp	TTACGACCTC GATGTTGGAT CAGGACATCC TAATGGT
Ucarp
Wcarp
Rcarp
PJCCP

图1 经排序后的不同鲤品种线粒体 16S rRNA 基因片段的核苷酸序列。“•”表示此位点与鲫(最上排)核苷酸相同，“—”被引进序列中以改进排序。PICCP: 鲫; Ucarri 参考鲤品系^[1]; Mcamp: 镜鲤; Wcard: 野鲤; Rcarp: 红鲤。

Fig. 1 Aligned partial sequences of mitochondrial 16S rRNA gene in various strains of Chinese carp. Dots indicate nucleotide identity to crucian carp (top row), and dashes indicate gaps introduced to the sequences for improvement of alignment. PJCCP: crucian carp; Ucarp: reference carp^[1]; Mcarp: mirror carp; Wcarp: wild carp; Rcarp: red carp.

第3位密码子: 在鲫有2.6%G, 在鲤更低至0.9%。这种碱基组成的偏离远较其它动物为大(如对虾的COI基因中第3位密码上大约有4%G, 童金苟等, 未发表资料)。较高的碱基组成偏差使得第3位密码子位置上很容易产生大量的碱基转换以致达到饱和^[10]。在Cyt b基因片段中鲫与参考鲤品种间的转换/颠换比率达到6.4, 而3种测试鲤品种更高达9.7。这表明鲤与鲫之间的碱基变异主要是转换, 而甚少发生颠换。这种情形只发

342

Mcarp	GGA	GCT	ACA	GTA
Ucarp	..C	..C
Wcarp
Rcarp
PJCCP

图2 经排序后的不同鲤品种线粒体 Cytb 基因片段的核苷酸序列。“•”表示此位点与鲫(最上排)核苷酸相同。“#”表示此位点变异导致1个氨基酸的改变。PJCCP: 鲫; Ucarp: 参考鲤品系^[1]; Mcarp 镜鲤; Wcarp: 野鲤;
Rcarp: 红鲤

Fig. 2 Aligned partial sequences of mitochondrial 16S rRNA gene in various strains of Chinese carp. Dots indicate nucleotide identity to crucian carp (top row) and # indicate base substitution resulting in an amino acid change. PJCCP: crucian carp; U carp; reference carp^[1]; M carp; mirror carp; W carp; wild carp; R carp; red carp.

生于亲缘关系很近的动物之间。上述碱基构成的偏差以及较高的转换/ 颠换率从另外一个侧面证实本文所分析的核苷酸序列是线粒体基因而不是核基因的假基因^[11]。

在Gvt.b的密码子使用上，共使用了44个密码子，其中使用频率最高的密码子为UUC。

CTA(8.8%), 编码亮氨酸(L); 其余依次为 TAC(6.4%), 编码酪氨酸(Y); TGA(4.0%), 编码色氨酸(W)。以哺乳动物的遗传密码为模式在 Cyt b 的氨基酸序列中鲤鲫之间只有 1 个氨基酸变异, 由位于第 151 位的 A-G 转换所产生。在鲤鲫之间, 共有 37 个碱基变异位点, 3 个发生在第 1 位密码子上, 34 个发生于第 3 位密码子, 第 2 密码子无变异。可见, 与其它亲缘关系近的动物一样, 鲤、鲫间的变异主要发生在第 3 位密码子。在 342 个碱基长度 Cyt b 片段中, 3 种鲤品种之间仍没有任何变异, 但是在参考鲤品种与 3 种鲤品种之间, 则有 1.46% 差异(表 1)。

表 1 鲤品种间及鲤鲫间的百分数差异。上三角为 16S rRNA 基因数据, 下三角为 Cyt b 基因数据

Tab. 1 Percentage divergence among strains of common carp and between common carp and crucian carp.

Data above triangle are from mitochondrial 16S rRNA gene and those below diagonal from cytochrome b gene.

	U carp	M carp	W carp	R carp	PJCCP
U carp	-	0.19	0.19	0.19	3.50
M carp	1.46	-	0	0	3.49
W carp	1.46	0	-	0	3.49
R carp	1.46	0	0	-	3.49
PJCCP	10.82	9.36	9.36	9.36	-

表 2 鲤品种及鲫线粒体 Cyt b 基因片段的碱基组成

Tab. 2 Base composition of partial sequences of mitochondrial cytochrome b gene

in strains of common carp and crucian carp.

种(品种)	总核苷酸					第 3 位密码子核苷酸				
	A%	T%	C%	G%	A+T %	A ₃ %	T ₃ %	C ₃ %	G ₃ %	A ₃ +T ₃ %
U carp	27.8	28.7	28.4	15.2	56.5	38.6	16.7	43.9	0.9	55.3
M carp	28.4	28.9	27.5	15.2	57.3	40.4	17.5	41.2	0.9	57.9
W carp	28.4	28.9	27.5	15.2	57.3	40.4	17.5	41.2	0.9	57.9
R carp	28.4	28.9	27.5	15.2	57.3	40.4	17.5	41.2	0.9	57.9
PJCCP	27.8	33.0	23.7	15.5	56.8	37.7	29.8	29.8	2.6	67.5

2.2 鲤线粒体序列的低分化性与不同品(亚)种间的差异

一般认为线粒体 16S rRNA 是动物种内个体间较为保守的序列, 主要用于种以上水平变异分析; 同时, 它也是鱼类种内的分子遗传标记之一^[12, 13]。但是像本结果所显示的 3 种测试鲤品种在多达 859(= 517+ 342) bp 无任何变异, 则是十分少见的情形。因为在其它动物的群体遗传和进化研究中, 同一种的不同个体间一般有 0.1%—5% 的差异(视不同物种以及群体的分化程度而定)^[2]。明显的例子是 3 种鲤品种与参考鲤品种之间有 0.19%(16S rRNA) 及 1.46%(Cyt b) 的差异。本文结果表明, 至少在 16S rRNA 和 Cyt b 这 2 个基因上, 3 种测试鲤品种的分化是极低的。

中国鲤品种的记载有千年以上, 而且由于地理阻隔等原因, 某些品种不仅在体色上有变异, 在体形及其他特征上也有了变异^[14]。然而, 本文在 2 个线粒体基因片段未能发现变异, 这似乎与事实不同。现将可能的原因探讨如下: 1) 上述形态特征主要由核基因所控制, 线粒体基因组不参与这些变异。2) 由于线粒体基因组缺乏突变修饰功能, 因此, DNA

突变一般会积累下来, 从而使得它具有比核基因组更快的进化率。可能在中国鲤中存在某种选择机制, 例如稳定性选择(Stabiling selection), 使得主导线粒体基因型在群体中保持绝对优势。当然, 像其它动物一样, 是否真正存在这种选择机制是较难证实的^[10]。3) 如果以 3.3×10^{-8} 为鲤科鱼类的进化率, 根据 Nei 的公式 $T = D/2\alpha$ (这里 T 为分化年代, D 为遗传距离, α 为进化率), 则鲤和鲫鱼的分化年代大约为 5.3×10^5 年, 3 种测试鲤品种(红鲤、镜鲤和野鲤)与参考鲤品种分化于大约 2.8×10^4 年前。上述估算根据线粒体 16S rRNA 的趋异, 若根据 Cyt b 基因估算, 分化年代大约要再早 1 万年。总之, 本结果表明, 红鲤、镜鲤和野鲤与参考鲤品种只是从一个共同祖先在很近的时间才分化出来, 品种间的分化程度相当低。4) 根据伍献文先生^[14]的研究结果, 中国鲤主要有 3 个亚种, 分布于新疆西北部的为西鲤(*C. c. carpio*), 分布于岭南以北的鲤(*C. c. haematopterus*)和华南鲤(*C. c. rubrofuscus*)。从线粒体 16S rRNA 和 Cyt b 基因的序列分析结果看, 兴国红鲤的祖先应是我国分布最广的鲤(*C. c. haematopterus*), 而且育成的时间不长。前苏联的散鳞镜鲤的祖先可能也是我国的鲤。关于欧洲镜鲤的祖先, 有不同的观点。有人认为是中国的鲤, 有人认为是多瑙河的野鲤。关于这一问题将另文讨论。Chang 等分析的鲤材料来自于台湾, 台湾的塘养鲤应为华南鲤, 其线粒体基因的序列与本文所测试的其它鲤鱼品种有一定差异是合理的。5) 一个有趣的但尚待探讨的问题是中国的野鲤是否还能真正称为一个野生的品种? 一般相信, 其它鲤品种是从野鲤突变而来, 即野鲤应保留一些原始性状。这在线粒体基因序列上是否也应有所反映? 尽管变异水平很低, 本文在 2 个 mtDNA 片段中未发现野鲤具有别于其它品系的变异位点。目前已经证实, 除少数几种无脊椎动物以外, 绝大多数动物线粒体基因组并不受父系线粒体基因组的“渗入”。理论上即便发生了杂交, 如果母本为野鲤, 则杂种的线粒体基因组仍是野鲤型的。但是, 自然杂交的结果却使得根据形态特征所进行的采样变得较为困难。随着人类对自然水体的开发, 遗传资源逐渐受到破坏, 保护中国鲤及其它鱼类的天然种质基因库将变得越来越重要。

2.3 进一步探讨鲤种内遗传变异和演化的可能性

本文结果表明鲤品种间 mtDNA 遗传变异较低。选用其它线粒体基因检测鲤种内遗传变异是否能得到不同的结论, 是一个值得探讨的问题。已证实哺乳动物及一些无脊椎动物线粒体转录控制区(D-环区)具有较高的进化速率^[7]。对于 D-环区是否就是鱼类线粒体中进化最快的区域, 目前尚无系统的比较资料。例如 Danzman 等就认为 D-环区并非一定比其它线粒体基因进化快。作者猜测, 可能不同种类以及不同生态条件下的鱼类, 其 D-环区的进化速率有所不同。总之, 利用线粒体 D-环区来进一步研究包括西欧本土鲤以及俄罗斯(伏尔加流域)鲤在内的更多鲤品种间的遗传变异将不失为弄清鲤起源问题的可行方法之一。

参考文献:

- [1] Chang Y S, Huang F L, Lo T B. Complete nucleotide sequences and gene arrangement of carp mitochondrial genome [J]. *J Mol Evol*, 1994, 38: 138—155
- [2] Avise J C. Molecular markers, natural history and evolution [M]. New York: Chapman and Hall, 1994

- [3] Kocher T D, Thomas W K, Meyer A, et al. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 6196—6200
- [4] Saiki R, Gelfand D H, Stoffel S et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase [J]. *Science*, 1988, **239**: 487—491
- [5] Sanger F, Nicklen S, Coulson A R. DNA sequencing with chain terminating inhibitors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977A, **74**: 5463—5467
- [6] Brown W M, George M Jr., Wilson A C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**: 1967—1971
- [7] Harrison R G. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology [J]. *Trend Ecol Evol*, 1989, **4**: 6—11
- [8] Hillis D M, Moritz C, Bable B. Molecular Systematics 2nd edition [M]. Sunderland: Sinauer, 1996
- [9] Sarver S K, Silberman J D, Walsh P J. Mitochondrial DNA sequence evidence supporting the recognition of two subspecies or species of Florida spiny lobster *Panulirus argus* [J]. *J Crustacean Biol*, 1998, **18**: 177—186
- [10] Palumbi S R, Benzie J. Large mitochondrial differences between morphologically similar penaeid shrimp [J]. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1991, **1**: 27—34
- [11] Zhang D X, Hewitt G M. Nuclear integrations: Challenges for mitochondrial DNA markers [J]. *Trend Ecol Evol*, 1996, **11**: 247—251
- [12] Whitmore D H, Thai T H, Craft C M. The largemouth bass cytochrome b gene [J]. *J Fish Biol*, 1994, **44**: 637
- [13] Carr S M, Marshall H D. Detection of intraspecific DNA sequence variation in the mitochondrial cytochrome b gene of Atlantic cod (*Gadus morhua*) by the polymerase chain reaction [J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 1991, **48**: 48—52
- [14] 伍献文等. 鲤科鱼类志 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1981

SEQUENCE CONSERVATION ON SEGMENTS OF MITOCHONDRIAL 16S rRNA AND CYTOCHROME B IN STRAINS OF COMMON CARP (*CYPRINUS CARPIO L. VAR.*)

TONG Jirr gou and WU Qing-jiang

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

Abstract: Mitochondrial DNA sequence analysis was carried out in 3 strains of Chinese carp (*Cyprinus carpio L. var.*), i.e. red carp, mirror carp and wild carp and compared with reference carp strain of unknown origin. There were no base substitutions among 3 strains at up to 859 base pairs, however, comparison between these sequences and homologous sequence of the reference strain showed about 0.19% and 1.46% divergence at 16S rRNA and Cytochrome b sequence, respectively. These results indicate that the genetic divergence among red carp, mirror carp and wild carp is exceptionally low, and they are probably an independent branch in the evolution of carp.

Key words: Carp (*Cyprinus carpio*); Strain; mtDNA sequence; 16S rRNA; Cyt b; Conservation