

中国 科鱼类线粒体 DNA 控制区结构及其系统发育分析

张 燕 张 鄂 何舜平

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 采用 PCR 技术获得了中国 科鱼类代表种类线粒体 DNA 控制区基因的全序列, 对控制区基因结构进行了分析, 并选用粒鲇科的中华粒鲇, 科的三线纹胸 作为外类群, 用最大简约法 (MP) 和邻接法 (NJ) 构建了系统发育树。结果显示 科鱼类中控制区基因适于系统发育分析, 科鱼类构成一个单系类群; 圆尾拟 应该放入 属里。

关键词: 控制区基因; 分子系统学; 科; 鲇形目

中图分类号: Q951 文献标识码: A 文章编号: 1009-3207(2003)05-0463-005

科 (Bagridae) 隶属于鲇形目 (Siluriformes), 在我国分布广泛, 仅次于鲇科 (Siluridae) 分为 4 属 30 个种: 黄 鱼属 (*Pelteobagrus* Bleeker) 五种; 属 (*Leiocassis* Bleeker) 7 种; 拟 属 (*Pseudobagrus* Bleeker) 14 种; 属 (*Mystus* Scopoli) 4 种^[1,2]。科鱼类种类较多, 分类比较混乱, 国外做过一些研究, 多为骨骼形态方面的描述^[3,4]; 国内有 Zhang 等^[5] 对嘉陵江 11 种 科鱼类骨骼进行了系统研究, 张耀光等^[6] 对短尾拟 的分类地位进行了研究探讨, 戴凤田等^[7] 从同工酶和骨骼特征方面对八种 科鱼类的系统演化进行了探讨, 彭作刚等^[8] 从分子水平细胞色素基因序列的变异研究了东亚 科鱼类的系统发育。

线粒体 DNA 以其较快的进化速度, 严格的母系遗传, 几乎不发生重组等特征成为分子群体遗传学和分子系统学研究的重要标记^[9,10]。线粒体 DNA 中存在一个非编码区, 即控制区 DNA, 位于 rRNA^{pro} 和 tRNA^{phe} 之间, 包含与 DNA 复制和转录相关的序列^[11]。控制区 DNA 的结构在已研究的生物中都是类似的, 分为三个部分: 中央保守区 (Central conserved domain), 终止序列区 (Extended termination associated sequences, ETAS) 和保守序列区 (Conserved sequence blocks, CSB), 还识别了一些功能保守序列, 如终止相关序列 TAS, 保守序列 CSB1, CSB2, CSB3, CSB-A, CSB-B, CSB-C, CSB-D, CSB-E, CSB-F 等。这些研究主要是针对哺乳动物进行的。对鸟类的研究中也识别了类似的结构, 但有其特殊性, 与哺乳动物

有一些区别^[12]。Lee 等^[13,14] 和刘焕章等^[15,16] 识别了鱼类一些类群的保守序列, 但目前关于鲇形目 科鱼类尚无报道。本研究拟通过对 科鱼类线粒体 DNA 控制区的研究, 分析中国 科鱼类的系统发育关系。

1 材料和方法

1.1 材料来源 实验分析的 4 属 6 种 科鱼类的序列都是通过 PCR 产物直接测序获得。为检验 科鱼类的单系性, 选用鲇形目粒鲇科 (Siluridae) 粒鲇属 (*Silurus*) 和 科 (Sisoridae) 纹胸 属 (*Glyptothorax*) 鱼类作为外类群。材料和 DNA 数据 (表 1)。所用鱼类标本均用 95% 的酒精保存。标本的鉴定工作在中国科学院水生生物研究所内进行。

1.2 基因组 DNA 提取、PCR 扩增及序列测定 鱼肌肉总 DNA 的提取用 Ausubel^[17] 的方法。PCR 扩增控制区的完整片段。反应体系含 100 ng DNA, 0.2 mmol/L DNTPS, 1 μmol/L 引物, 4.0 mmol/L MgCl₂, 5.0 μL 110x 缓冲液, Taq 酶 2U。PCR 反应程序: 每一循环包括 94℃ 预变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1.5 min, 共进行 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 8 min。PCR 扩增所用引物为 DL1 (ACC CCT GGC TCC CAA AGC) 和 DH2 (ATC TTA GCA TCT TCA GTG), 分别位于脯氨酸和苯丙氨酸的 rRNA 上。扩增产物经

收稿日期: 2002-11-05; 修订日期: 2003-04-18

基金项目: 中国科学院创新方向性项目 (KSCX2-SW-101B); 国家自然科学基金 (39830050) 资助

作者简介: 张 燕 (1979—), 女, 湖北省襄樊市人; 硕士研究生; 研究方向: 鱼类分子进化

通讯作者: 何舜平, E-mail: clad@ihb.ac.cn

表 1 测序用 科标本及外类群 DNA 序列
Tab.1 The specimens of the Bagridae and the outgroups for sequencing

形态分类	物 种	序列长度
黄颡鱼属 <i>Pelteobagrus</i>	光泽黄颡鱼 <i>P. nitidus</i>	893bp
属 <i>Leiocassis</i>	长吻 <i>L. longirostris</i>	891bp
	粗唇 <i>L. crassilabris</i>	891bp
拟 属 <i>Pseudobagrus</i>	圆尾拟 <i>P. tenuis</i>	891bp
属 <i>Mystus</i>	斑 <i>M. guttatus</i>	891bp
	丝尾 <i>M. nemurus</i>	846bp
粒鲇属 <i>Akysidae</i>	中华粒鲇 <i>A. sinensis</i>	857bp
纹胸 属 <i>Glyptothorax</i>	三线纹胸 <i>G. trilineatus</i>	892bp

0.8% 的琼脂糖凝胶电泳后回收进行 DNA 测序。对回收产物的 DNA 序列测定使用相同引物用末端荧光标记法在自动测序仪 (Applied Biosystem 310 stretch) 上测定。

1.3 数据分析方法 使用 CLUSTALX^[18] 软件和 MELALIGN 软件进行控制区基因的对位排列, 然后通过手工进行排序。应用 MEGA2.1 中 Kimura's 2-Parameter 模型进行系统发育分析构建 NJ (Neighbor-joining) 树, 并构建 MP (Maximum parsimony) 树 (Search option: CNI with search level 3), 重复抽样分析 (Bootstrap analysis) 使用 MEGA 软件。

2 结果

2.1 科鱼类控制区基因序列及变异

科鱼类控制区基因碱基频率见表 2, A, T, C, G 的平均碱基含量为 31.1%, 31.2%, 23.3%, 14.3%。其中 G 的含量显著低于其他碱基的含量, 这也是线粒体 DNA 的一个特点^[19]。A+T (62.3%) 的含量明显高于 C+G (37.6%) 的含量, 这与刘焕章

等的关于控制区的研究结果也是一致的^[16]。转换颠换比(TS/TV) 为 1.0。

2.2 中央保守区 (CD)

在整个控制区 DNA 中, 中央保守区是最为保守的区域。中央保守区几乎在所有的种类中都十分保守, 它可能比细胞色素 b 变异更慢。在哺乳动物中, Southern 等人识别了保守序列 B, C, D, E, F。^[20] 在鸟类中, Randi 和 Luchin 等识别了类似 F, E, D, C 序列^[12]。而在鱼类中, Lee 等仅在一些科识别了类似于 CSB-D 的序列, 刘焕章等在 Cypriniforms 中除了 CSB-D 外, 还识别了 CSB-F 和 CSB-E。在 科鱼类中, 识别出了 CSB-D 且 CSB-D 相当保守, 在 科鱼类中它的普遍序列为: TATTACTGGCATCTGGTTCCTATTTCa。在 CSB-F 的位置, 也识别出了一个保守区, 与刘焕章等在 Cypriniforms 中识别的基本一致, 其基本形式为: ATGTAGTAAGA-ACCA-CAACC。在 CSB-F 和 CSB-D 之间, 保守区 CSB-E 也被识别出来, 它在 科鱼类中的普遍形式为: TCAGGG-CAAAA-TTGTGGGGGT。其中有一个 GTGGGBOX。

表 2 几种 科鱼类线粒体碱基频率
Tab.2 Nucleotide frequencies of the mitochondrial DNA in several bagrid fishes

物 种		T%	C%	A%	G%
光泽黄颡鱼	<i>P. nitidus</i>	30.9	23.8	30.4	14.9
长吻	<i>L. longirostris</i>	31.8	24.0	29.7	14.5
粗唇	<i>L. crassilabris</i>	31.8	23.8	30.1	14.3
圆尾拟	<i>P. tenuis</i>	32.1	23.6	29.9	14.4
斑	<i>M. guttatus</i>	31.3	24.2	29.9	14.6
丝尾	<i>M. nemurus</i>	30.3	23.6	32.4	13.7
中华粒鲇	<i>A. sinensis</i>	29.1	21.6	36.2	13.2
三线纹胸	<i>G. trilineatus</i>	30.1	21.3	33.7	14.9
Avg		31.0	23.3	31.4	14.3

2.3 终止序列区(ETAS)

终止序列区是控制区中变异最大的部分, 它包含于 DNA 复制终止相关的序列 TAS. Sbisà 等在哺乳动物的终止序列区中识别了两个终止相关序列 ETAS1和 ETAS2. Randi 和 Luchin 在鸟类中也识别了类似的结构。作者在 科中识别了 ETAS1 (TACATAATATGCATAA-ACAA)。

2.4 保守序列区(CSB)

保守序列区包含有重链的复制起点(Oh), 重链和轻链的启动子(HSP 和 LSP), 以及三个保守区 CSB1, CSB2, CSB3, Walbert 和 Clayton^[21]推测其参与了H链 RNA 引物的发生。Randi 等在鸟类中 CSB2 和 CSB3 合并, 在鱼类中 Broughton 等成功的识别了雅罗鱼上的 CSB1, CSB2, CSB3; 刘焕章等对比哺乳动物的序列, 识别了鲤形目一些鱼类上的 CSB1, CSB2, CSB3。对比他们的序列, 在 科鱼类, CSB2 和 CSB3 比较保守, 很容易被识别出来。其中 CSB2 的序列与刘焕章等在鲤形目中描述的序列一致, 为 AAAC-

CCCG-TACCCCC, CSB3 的序列为 TGTTAAACCCG-TAAACCA, 与刘焕章等描述的序列有一些不同。CSB1 在 科鱼类中的序列为 TCACGTGCATAG-CITTA, 与刘焕章等^[16]的描述不同。

2.5 分子系统树

基于线粒体控制区序列的 NJ 树和 MP 树在拓扑结构上基本一致(图 1, 2), 枝长表示分歧度, 枝上的数值为 1000 次重复抽样检验得到的支持率。从 NJ 树和 MP 树都可以看出, 科鱼类形成一个单系类群。由于 NJ 树的支持率明显高于 MP 树, 所以主要通过 NJ 树的结果来分析。从 NJ 树可以看到, 圆尾拟 和粗唇 聚在一起, 支持率为 50%, 然后与长吻 聚在一起形成一个单系类群, 支持率高达 97%, 然后拟 属和 属形成的单系类群与黄颡鱼属聚在一起, 支持率为 99%, 然后与 属的斑 聚在一起, 支持率为 100%, 但是 属的斑 和丝尾 没有聚在一起。

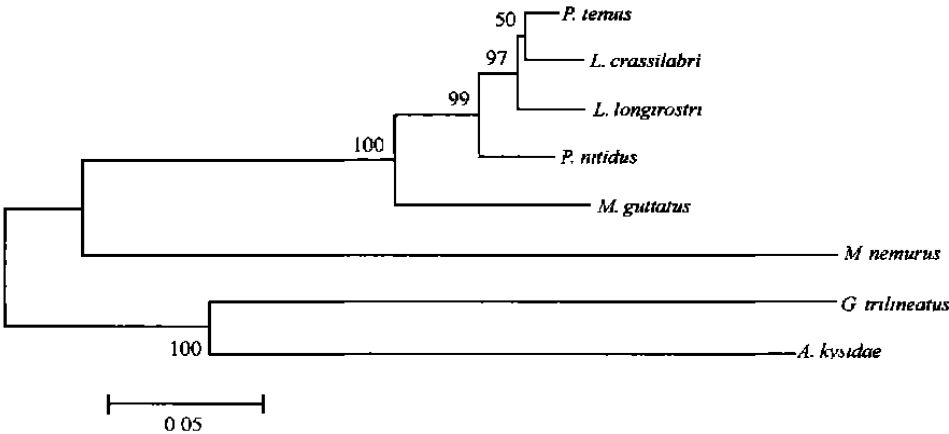


图 1 基于 Kimura's 2 Parameter 模型构建的 NJ 树(全序列)
Fig. 1 NJ tree based on the Kimura's 2 Parameter model (entire sequence)

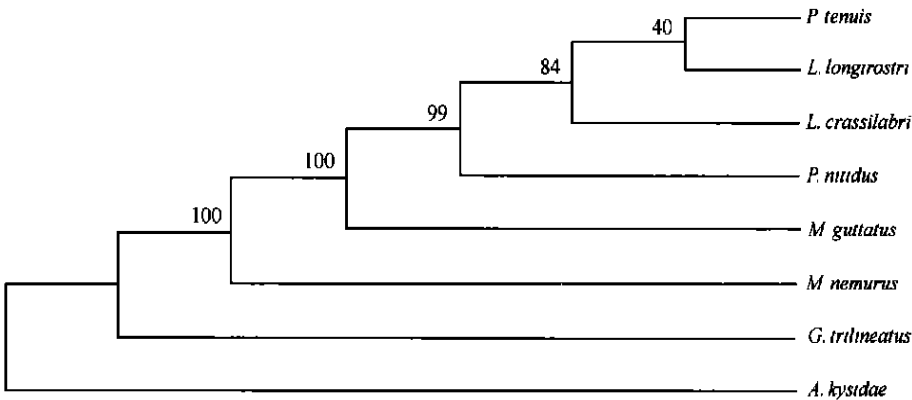


图 2 MP(maximum parsimony) 树(全序列)
Fig. 2 Maximum Parsimony tree(Entire sequence)

3 讨论

3.1 科鱼类控制区基因特点及其作为系统发育分子标记的可行性

从分析的控制区基因可以看出, 鲇形目 科鱼类的控制区基因的基本结构与以前的研究显示的其他生物控制区基因结构基本一致, 分为中央保守区、终止序列区和保守序列区。中央保守区中识别了 CSB-D、CSB-E 和 CSB-F, 终止序列区中识别了 E-TAS1, 保守序列区识别了 CSB1、CSB2 和 CSB3。但是, 一些保守区并不与其他种类完全一致。

控制区基因进化速度被认为是线粒体基因中最快的。Yang^[22] 指出那些进化速度快的基因(每个位点平均 0.3—0.6 个替换), 即使是在简约法中也比进化速度慢的基因更适于系统发育研究。只有在分歧水平大大高于以前所认为的情况下, 快速的进化速率才会误导系统发育分析。在许多情况下, 快速进化位点可以提供更多的信息位点^[23]。从以上观点看, 控制区用来进行系统发育研究是比较合适的。

构建的分子系统树中, 节点的支持率都比较高, 进一步证明线粒体 DNA 控制区可以用来对 科鱼类进行系统发育研究。

3.2 科鱼类的系统发育分析

从以粒鲇科中华粒鲇和 科三线纹胸 为外类群构建的分子系统树中可以看出 科鱼类构成一个单系类群(图 1, 2)。拟 属和 属聚在一起(图 1, 2), 支持率为 97%(NJ 树)和 84%(MP 树), 形成一个单系类群, 然后与黄颡鱼树聚在一起, 支持率为 99%, 再与 属的斑 聚在一起。但是, 属的斑和丝尾 没有聚在一起。由于每个属所选择的物种并不多, 所以, 结果仍需进一步验证。

构建的 NJ 分子系统树中(图 1), 圆尾拟 和粗唇 聚在一起, 不过其支持率在 NJ 树中只有 50%, 然后与长吻 聚在一起形成一个单系类群, 支持率很高(97%)。戴凤田等的骨骼学研究表明 属的粗唇 具有所有的祖征为最原始的种类, 拟 属中的圆尾拟 接近粗唇, 相对较少特化, 而且同工酶的研究分析也说明圆尾拟 和粗唇 都表现了一定的酶学相似性, 那么结合作者的分子数据, 可以初步认为圆尾拟 应该放入 属里。

参考文献:

[1] Mo T. Anatomy, relationship and systematics of the Bagridae (Teleostei: Siluridae) with a hypothesis of silurid phylogeny[M].

Konigstein: Koeltz Scientific Books. 1991

- [2] Chu X L, Zheng B S, Dai D Y. Fauna Sinica Osteichthyes Siluriformes[M]. Beijing: Science Press. 1999. [褚新洛等. 中国动物志·硬骨鱼纲·鲇形目. 北京: 科学出版社. 1999]
- [3] Alexander R M. Structure and function in catfish [J]. *J. Zool*, 1965, **148**: 88—152
- [4] Tilak R. The osteocranium and the Weberian apparatus of the fishes of the family Bagridae (Pisces: Siluroidei) [J]. *Morphologisches Jahrbuch*, 1965, **107**(4): 415—443
- [5] Zhang Y G, Wang D S. Studies on the osteology of the bagrid catfishes from Jialing River (IV): an approach to the phylogenetic relationship [J]. *Journal of Southwest China Normal University*, 1995, **20**(4): 432—439
- [6] Zhang Y G, Wang D S. Studies on the taxonomical position of *Pseudobagrus brevicaudatus* (Bagridae, Siluriforme) [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1996, **20**(4): 379—382. 张耀光, 王德寿. 短尾拟 分类地位的探讨[J]. 水生生物学报, 1996, **20**(4): 379—382
- [7] Dai F T, Su J X. Studies on isozymes, skeleton characters of eight bagrid catfishes and comments on phylogenetic relationship [J]. *Acta Zootaxonomica 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)[J]. 动物分类学报, 1998, **23**(4): 432—439]
- [8] Peng Z G, He S P, Zhang Y G. Mitochondrial cytochrome b sequence variation and phylogeny of the East Asian bagrid catfishes [J]. *Prog. Nat. Sci.*, 2002, **12**(6): 37—41. [彭作刚, 何舜平, 张耀光. 细胞色素 b 基因序列变异与东亚 科鱼类系统发育[J]. 自然科学进展, 2002, **12**(6): 37—41]
- [9] Xiao W H, Zhang Y P. Genetics and evolution of mitochondrial DNA in fish, Wuhan [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2000, **24**(4): 384—391. [肖武汉, 张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化[J]. 水生生物学报, 2000, **24**(4): 384—391]
- [10] Alessandra Larizza, Graziano P esole, Aurelio Reyes, et al. Lineage specificity of the evolutionary dynamics of the mtDNA D loop region in rodents [J]. *J Mol Evol*, 2002, **54**: 145—155
- [11] Clayton D A. Replication of animal mitochondrial DNA [J]. *Cdl*, 1982, **28**: 693—705
- [12] Ettore Randi, Vittorio Iucchini. organization and evolution of the mitochondrial DNA control region in the avian genus *Alectoris* [J]. *J Mol Evol*, 1998, **47**: 449—462
- [13] Lee W-J, Conroy J, Howell W H, et al. Structure and evolution of teleost mitochondrial control region [J]. *J Mol Evol*, 1995, **41**: 54—66
- [14] Myer A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In: Hochachka and Mommsen eds Biochemistry and molecular biology of fishes [M]. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 1993, 1—38
- [15] Liu H Z. The structure and evolution of mitochondrial DNA control region of fish: a case study to bitterlings [J]. *Prog. Nat. Sci*, 2002, **12**(3): 266—271. [刘焕章. 鱼类线粒体 DNA 控制区的结构和进化: 以 鱼类为例[J]. 自然科学进展, 2002, **12**(3): 266—271]
- [16] Liu H Z, Tzeng C S, Teng H Y. Sequence variations in the mitochondrial DNA control region and their implications for the phylogeny

- of the Cypriniformes [J]. *Can. J. Zool.*, 2002, **80**: 569—581
- [17] Ausubel F M. Short Protocols in Molecular Biology [M]. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 1992
- [18] Thompson J D. The Clustal X windows interface: Flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Res.*, 1997, **25**(24): 4876
- [19] Wolstenholme D R. Animal mitochondrial DNA: Structure and evolution in: *Mitochondrial genomes* [M]. 173—372. San Diego: Academic press.
- [20] Sárka O Southem, Péter J. Southem, and Andrew E. Dizon. Molecular characterization of a cloned dolphin mitochondrial genome [J]. *J Mol Evol.*, 1992, **28**: 32—42
- [21] Walberg M W, Clayton D A. Sequence and properties of the human K B cell and mouse L cell D-loop regions of mitochondrial DNA [J]. *Nucleic Acids Res.*, 1981, **9**: 5411—5421
- [22] Yang Z H. On the best evolutionary rate for phylogenetic analysis [J]. *Syst Biol.*, 1998, **47**: 125—133
- [23] Matthew A. Saunders, Scott V. Edwards. Dynamics and phylogenetic implications of mtDNA control region sequences in new world jays (Aves: Corvidae) [J]. *J Mol Evol.*, 2000, **51**: 97—109

STUDIES ON THE STRUCTURE OF THE CONTROL REGION OF THE BAGRIDAE IN CHINA AND ITS PHYLOGENETIC SIGNIFICANCE

ZHANG Yan, ZHANG E and HE Shun-Ping

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

Abstract: Bagridae belonging to Siluriformes, is a group of fishes widely distributed in China. The phylogenetic relationships of the species in this family are not fully identified and most of the previous works were based on external and osteological characteristics. Complete sequence of the mitochondrial DNA control region of the typical species of Family Bagridae were obtained by PCR and the structure of the control region was analyzed. The vertebrate mitochondrial control region is commonly subdivided into three domains that different from each other in base composition as well as in rate and mode of evolution. The central domain, containing the heavy strand's origin of replication is relatively conserved and characterized by a high GC content served domain; the ETAS (extended termination associated sequence) domain that usually has one or copies of termination associated sequences and that signals termination of the α -loop strands, and the CSB domain that are believed to function in its initiation.

Nucleotide sequences of mitochondrial DNA control region were aligned with the Clustal X and MEGALIGN, then refined manually. Choosing *A. sinensis* and *G. trilineatus* as the outgroup, the phylogenetic trees were constructed with MEGA 2.1 by the neighbour-joining method and maximum parsimony method based on the complete sequence of the control region. And the result is compared based on the topology and the bootstrap value.

The average base composition is A: 31.1% T: 31.2% C: 23.3 G: 14.3%. The base composition has bias against G, which is also the characteristic of mitochondrial DNA. And the A+T content is much higher than that of C+G. The mitochondrial DNA control region of Bagridae can also be divided into central domain, ETAS domain and CSB domain, which is in accordance with the basic structure shown in other species. Central domain, ETAS domain and CSB domain as well as some conserved sequences were identified in Bagridae and compared with other species. The phylogenetic studies based on neighbour-joining method and maximum parsimony method are consistent. Family Bagridae forms a monophyletic group, and there is strong evidence that *Pseudobagrus tenuis* is grouped with *Leiocassis crassilabris*.

It can be concluded that the control region can be used for the phylogenetic analysis; Family Bagridae forms a monophyletic group; *P. tenuis* should be transferred to the genus *Leiocassis*.

Key words: Control region; Molecular phylogenetics; Bagridae; Catfish