

刺鲃基于线粒体细胞色素 b 基因的生物地理学过程

唐琼英^{1,2} 杨秀平² 刘焕章¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070)

摘要:以中华倒刺鲃 *Spinibarbus sinensis* 为外类群, 研究了不同地理种群刺鲃 *Spinibarbus caldwelli* 细胞色素 b 基因序列(1140bp)变异, 以探讨其生物地理学过程。结果表明: 长江下游水系与珠江水系种群的变异值为 1.2%—2.3%, 与闽江水系的为 2.7%—3.7%, 与九龙江水系的为 3.1%—4.2%, 这些值都远远低于它们与中华倒刺鲃的变异值(13.2%—14.6%)。遗传变异值表明了刺鲃的生物地理学过程, 首先是东南沿海的水系同内地的水系发生隔离, 然后珠江水系同长江水系隔离, 这些变化均发生在第四纪。

关键词: 刺鲃; 细胞色素 b; 生物地理学过程
中图分类号: Q178 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2003)04-0352-005

刺鲃 *Spinibarbus caldwelli* 隶属于鲤形目 Cypriniformes 鲤科 Cyprinidae 亚科 Barbinae 倒刺鲃属 *Spinibarbus*。广泛分布于元江、珠江、九龙江、闽江、钱塘江、长江、海南岛及台湾岛等水系。主要栖息于清水石底的激流河段, 为中下层鱼类。因其体厚肉肥, 味道鲜美, 是我国重要的经济鱼类之一。由于生态环境上的差异, 不同地理种群的刺鲃在形态上发生了一些变异, 因而造成分类上的困难。一些研究者曾经认为刺鲃 *S. caldwelli* 为光倒刺鲃 *S. hollandi* 的同物异名^[1]。但是, 最近的研究表明它们都应该是有效种(结果另文报道)。

近年来, 分子生物学技术的飞速发展, 尤其是 DNA 测序技术的完善, 为研究生物的地理学过程提供了一种新的手段, 由此而出现了一门新兴的学科——分子系统发育生物地理学(Molecular phylogeography), 分子系统发育生物地理学主要采用分子生物学技术, 在分子水平上来研究种内的地理格局的形成过程^[2]。

鱼类的线粒体 DNA(mtDNA)是一种共价闭合环状的双链 DNA 分子。具有分子结构简单, 严格的母系遗传, 几乎不发生重组, 进化速度快, 不同的区域进化速度存在差异等特征^[3]。用 mtDNA 检测地理隔离在鱼类群体间产生的遗传差异, 是近年来鱼类分子遗传学研究的热点之一^[4]。

细胞色素 b 基因(Cytb)为线粒体 DNA 上的蛋白质编码基因, 其进化速度较快, 适合种群水平差异的检测, 而且容易为保守序列扩增, 研究最为广泛^[5]。目前尚未见到从分子水平上来研究刺鲃地理分化的报道, 故本研究采用 Cytb 基因来进行比较分析, 探讨不同地理种群刺鲃的遗传分化, 推测形成这种地理分化的过程, 从而为保护生物的遗传多样性提供一定的参考。

1 材料与方法

1.1 研究用标本 采用的样品为95%的酒精固定标本。具体的种类及采集地见表 1。

表 1 标本及采集地			
Tab. 1 Specimens and their localities in the present study			
样品编号	物种名	采集地	所属水系
1	刺鲃 <i>S. caldwelli</i>	江西上饶	长江下游
2	刺鲃 <i>S. caldwelli</i>	江西上饶	长江下游
3	刺鲃 <i>S. caldwelli</i>	江西婺源	长江下游
4	刺鲃 <i>S. caldwelli</i>	福建建欧	闽江水系
5	刺鲃 <i>S. caldwelli</i>	福建平和	九龙江水系
6	刺鲃 <i>S. caldwelli</i>	广西桂林	珠江水系
7	刺鲃 <i>S. caldwelli</i>	广西阳朔	珠江水系
8	中华倒刺鲃 <i>S. sinensis</i>	四川泸州	长江上游

收稿日期: 2002-06-25; 修订日期: 2002-11-12
基金项目: 国家自然科学基金 49832010 资助项目
作者简介: 唐琼英(1976—), 女, 四川简阳人; 硕士; 从事鱼类进化生物学研究。张国华、王绪桢等帮助采样, 谨此致谢
通讯作者: 刘焕章, Email: hzliu@ihb.ac.cn

1.2 基因组 DNA 的提取 取鱼背部肌肉适量于 1.5mL 的 Eppendorf 管中,用蒸馏水、TE (10mmol/L Tris·HCl, 1mmol/L EDTA, pH=8.0)缓冲液浸泡,直到组织中无酒精味。然后加入 620μL 的 STE(0.1mol/L NaCl, 10mmol/L Tris·HCl, 1mmol/L EDTA, pH=8.0)细胞裂解液,70μL 10%的 SDS,10μL 蛋白酶 K(10μg/μL),置于 56℃的恒温箱中消化至透明。加入等体积的平衡酚抽提两次,再加入等体积的氯仿——异戊醇(24:1)抽提,至无蛋白质。加入上清液两倍体积的无水乙醇沉淀 2h 以上,离心后再用 75%的乙醇洗涤沉淀,再离心去乙醇干燥后加入 30—50μL 的灭菌双蒸水或 TE 缓冲液溶解,并存于一20℃的冰箱中备用。

1.3 PCR 扩增 用于扩增全序列 Cytb 基因的引物是 L14724 和 H15915,其序列分别为:
L14724:5′-GACITGAAAAACCACCGTTG-3′;
H15915:5′-CTCCGATCTCCGGATTACAAGAC-3′^[6]。

PCR 反应的总体积为 60μL,大约用 50ng 的基因组 DNA 作为模板,反应体系还包括:10×Buffer 6μL, dNTPs 3μL(2.5mmol/L),引物各 3μL(10pM),Taq 酶 1.5U。PCR 反应条件为:94℃预变性 3min,然后循环包括:94℃变性 45s,56℃退火 45s,72℃延伸 1min,共 35 个循环,最后在 72℃延伸 8min。

1.4 PCR 产物的纯化和测序 PCR 产物用 0.8%的琼脂糖电泳检测,在紫外透射仪上观察,并割下亮带。将割下的胶用 Glassmilk DNA 纯化回收试剂盒进行纯化回收,回收产物送上海基康生物公司测序。

1.5 数据分析 DNA 序列的排列(Alignment)使用

Clustal X 软件^[7],并辅以手工调整。以 GenBank 中的鲤形目鱼类的全序列 Cytb 基因(序列号为 NC-001606)为参照序列,找出序列的起始密码子(ATG),删除起始密码子前的碱基。分支系统树的生成使用 Mega2.0 软件^[8]中的最大简约法(MP)和邻接法(NJ),其分支的置信度采用重复抽样分析(Bootstrap analysis)的方法,重复抽样的次数为 1000 次。序列中各碱基的含量及变异情况用 Mega 中的 Statistic 命令进行分析。

2 结果

2.1 刺鲀 Cytb 基因序列

由统计结果可知,不同地理种群的刺鲀 Cytb 基因序列全长为 1140bp,无碱基的插入或缺失,这主要是因为 Cytb 基因是蛋白质编码基因,对于蛋白质编码区域而言,由于蛋白质功能上的需要和三联体密码结构的限制,缺失/插入很少发生或发生后很容易被选择淘汰。序列中共有 178 个变异位点,37 个信息位点。由 Mega 中的 Statistic 命令统计可得序列中碱基的组成情况(表 2)。由表 2 可知 A、T、G、C 的含量,其平均值分别为 29.4%、28.5%、14.4% 和 27.8%,A+T 的含量为 57.9%,G+C 的含量为 42.2%,A+T 的含量明显高于 G+C 的含量。同时还可以得出,Cytb 基因表现出很强的碱基组成偏向性,即在 A、T、G、C 四种碱基中,G 的含量明显低于其他三种碱基的含量,这些都与脊椎动物线粒体 DNA 的特点相一致^[5]。

表 2 不同地理种群的刺鲀的碱基组成及密码子不同位点碱基含量
Tab.2 Base composition and bias for the Cytochrome b gene sequences of *S. caldwelli* samples from different areas.
Avg· indicates the average quantities of nucleotides

	T(U)	C	A	G	T-1	C-1	A-1	G-1	T-2	C-2	A-2	G-2	T-3	C-3	A-3	G-3
PH	28.9	27.5	29.3	14.3	23.7	25.5	25.8	25.0	42.1	24.7	20.0	13.2	20.8	32.4	42.1	4.7
JO	28.5	27.7	29.8	13.9	23.9	25.5	25.5	25.0	42.1	24.7	20.0	13.2	19.5	32.9	43.9	3.7
SR1	28.4	27.7	29.1	14.7	23.9	25.5	25.5	25.0	41.8	24.7	19.7	13.7	19.5	32.9	42.1	5.5
SR2	28.4	27.8	29.1	14.6	24.2	25.5	25.5	24.7	42.1	24.7	20.0	13.2	18.9	33.2	41.8	6.1
WY	28.3	28.0	29.1	14.6	24.2	26.1	25.0	24.7	41.8	24.7	20.0	13.4	18.9	33.2	42.4	5.5
GL	28.6	27.6	29.6	14.2	23.9	25.5	25.5	25.0	42.1	24.7	20.0	13.2	19.7	32.6	43.2	4.5
YS	28.6	27.6	29.6	14.2	23.9	25.8	25.5	24.7	42.1	24.5	20.0	13.4	19.7	32.6	43.2	4.5
OUT	28.2	28.1	29.2	14.5	23.2	26.6	24.2	26.1	42.6	23.9	20.0	13.4	18.9	33.7	43.4	3.9
Avg	28.5	27.8	29.4	14.4	23.9	25.8	25.3	25.0	42.1	24.6	20.0	13.3	19.5	32.9	42.8	4.8

注:PH 福建平和 JO 福建建欧 SR1 江西上饶 1 SR2 江西上饶 2 WY 江西婺源 GL 桂林 YS 阳朔 OUT 外类群中华倒刺鲀,表 3、4 代号意义同

2.2 刺𩚰 Cytb 基因全序列的变异情况

应用 Mega 软件中的 statistic 命令分析序列的变

异情况,得到碱基的替换情况(表 3)。

表 3 不同地理种群的刺𩚰 Cytb 基因序列转换数(下三角)和颠换数(上三角)
Tab.3 Numbers of transitions (lower triangle) and transversions (upper triangle) for the Cytochrome b gene sequences of *S. caldwelli* samples from different areas

	PH	JO	SR ¹	SR ²	WY	GL	YS	OUT
PH		6	7	8	17	6	8	23
JO	21		3	4	13	2	4	17
SR ¹	28	27		3	12	1	3	18
SR ²	27	26	3		13	2	4	19
WY	29	28	5	4		11	13	26
GL	28	27	12	11	13		2	17
YS	28	27	12	11	13	0		15
OUT	120	118	121	119	121	119	119	

由表 3 可见,不同地理种群的刺𩚰 Cytb 基因中,发生转换的位点数为 0—29,颠换数为 2—13,转换数明显大于颠换数(个别例外)。刺𩚰和中华倒刺𩚰不同种群间的转换数和颠换数均大于刺𩚰种群内的转换数和颠换数。同时还可得出:序列的变异主要发生在密码子的第三个碱基上,少数发生在第二

位,这与蛋白质编码基因密码子第三位点进化最快,第二位点较保守的一般规律是一致的^[9]。

2.3 碱基转换/颠换比和遗传变异分析

采用 Kimura-2 参数模型统计得出刺𩚰 Cytb 基因序列转换/颠换和遗传变异率(表 4)。

表 4 不同地理种群的刺𩚰 Cytb 基因序列转换/颠换(上三角)和遗传变异率(下三角)
Tab.4 Ratios of transition/transversion(upper triangle) and percent of sequence variations (lower triangle) of the cytochrome b gene for *S. caldwelli* samples from different areas.

	PH	JO	SR ¹	SR ²	WY	GL	YS	OUT
PH		3.500	4.000	3.375	1.706	4.667	3.500	5.217
JO	0.024		9.000	6.500	2.154	13.500	6.750	6.941
SR ¹	0.032	0.027		1.000	0.417	12.000	4.000	6.722
SR ²	0.031	0.027	0.005		0.308	5.500	2.750	6.263
WY	0.042	0.037	0.015	0.015		1.182	1.000	4.654
GL	0.031	0.026	0.012	0.012	0.021		0.000	7.000
YS	0.032	0.028	0.013	0.013	0.023	0.002		7.933
OUT	0.141	0.133	0.137	0.136	0.146	0.134	0.132	

由表 4 可见,刺𩚰同一地理种群间的遗传变异率为 0.2%—2.4%,不同地理种群间为 1.2%—4.2%,与不同种中华倒刺𩚰间的遗传变异率为 13.2%—14.6%。种间的遗传变异率明显大于种内的遗传变异率。转换/颠换比的变化范围为 0.000—13.500(其中有个别的转换小于颠换而使得比值小于 1.000)。

2.4 分子系统树

基于所得的序列数据,使用 Mega2.0 软件中的最大简约法(MP)和邻接法(NJ)构建分子系统树,并重复抽样 1000 次,得到不同地理种群刺𩚰的分子系统树(以中华倒刺𩚰为外类群,图 1)。

由得出的分子系统树可以看出,同一水系江西上饶和婺源(属长江下游水系)的个体聚在一起,桂

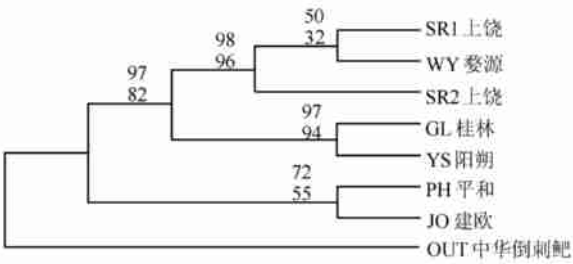


图 1 不同地理种群刺鲃的分子系统树(数值表示 1000 次重复抽样的百分比,上面为 NJ 方法,下面为 MP 方法)

Fig.1 The molecular phylogenetic tree of *S. caldwelli* samples in different areas. Numbers indicate bootstrap values of 1000 replicates (upper for NJ, bottom for MP)

林和阳朔(属珠江水系)的聚在一起,这两个水系类群的亲缘关系较近,构成了一个姊妹群,表明了长江下游和珠江水系的关系较近。其次是福建建瓯(闽江水系)的类群和福建平和(九龙江水系)的类群聚在一起,属于东南沿海一带水系的类群,它们与内陆的关系稍远。

3 讨论

一般情况下,序列中转换数大于颠换数,本研究中有少数例外,即颠换数大于转换数,其原因有待进一步研究。不同个体刺鲃的遗传变异率变化范围从 0.2%到 4.2%,淡水鱼同种个体间线粒体遗传变异的峰值水平是 10%^[10],本研究中的遗传变异范围在此峰值之内,且其值远远小于与不同种群中华倒刺鲃的遗传距离值(13.2%—14.6%),故认为这些个体均为刺鲃。其中长江下游水系与珠江水系的变异值为 1.2%—2.3%,与闽江水系的为 2.7%—3.7%,与九龙江水系的为 3.1%—4.2%,这些数据说明长江下游水系与珠江水系的关系较密切,其次为闽江和九龙江水系。

从分子系统树上来看,刺鲃的生物地理过程为,首先是东南沿海的水系同内地的水系发生隔离,然后珠江水系同长江水系隔离。从分子变异率看,这些变化均发生在第四纪。值得注意的是,珠江水系同长江水系之间一些样本的差异甚至小于长江水系

内部样本之间的差异,说明这两个水系间有非常晚近的交流,或者人为的引种活动^[11]。

参考文献:

[1] Shan X, Lin R, Yue P, et al. Barbinae. In (Yue P Q. ed.)“*Fauna Sinica, Osteichthyes, Cypriniformes*”(Ⅲ)[M]. Beijing: Science Press. 2000. [单乡红,林人端,乐佩琦. 鲃亚科. 见:乐佩琦主编. 中国动物志·硬骨鱼纲·鲤形目(下卷)[M]. 北京:科学出版社,2000]

[2] Wang J, Li M, Wei F, et al. Molecular phylogeography and applications [J]. *Acta Zootaxon. Sinica*, 2001, **26**(4):431—439. [王静,李明,魏辅文,等. 分子系统地理学其应用[J]. 动物学分类学报,2001,**26**(4):431—439]

[3] Xiao W H,Zhang YP. Genetics and evolution of mitochondrial DNA in fish [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]

[4] Bermingham E, Avise J C. Molecular zoogeography of freshwater fishes in the southeastern United States [J]. *Genetics*, 1986, **113**:939—965

[5] Hochachka, Mommsen eds. *Biochemistry and molecular biology of fishes* [M]. London:Elsevier Science. Publishers. 1993, **2**:1—38

[6] 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. Phylogenet. Evol.*, 2001, **18**(2):163—173

[7] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F. The Clustal X windows interface:flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools [J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, **25**(4):4876—4882

[8] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, and Nei M. *MEGA2: Molecular Evolution Genetics Analysis Software*. Arizona State University, Tempe. 2001

[9] 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

[10] Billington N. , and 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

[11] Liu H. Z. A preliminary analysis to biogeographical process of the eastern Asia freshwater fishes [J]. *Acta Zootaxon. Sinica*, 1998, **23**(suppl.):49—55. [刘焕章. 东亚淡水鱼类生物地理学过程的初步研究[J]. 动物分类学报,1998,**23**(增刊):49—55]

BIOGEOGRAPHICAL PROCESS OF *SPINIBARBUS CALDWELLI* REVEALED BY SEQUENCE VARIATIONS OF MITOCHONDRIAL CYTOCHROME b GENE

TANG Qiong-Ying^{1,2}, YANG Xiu-Ping² and LIU Huan-Zhang¹

(1. Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072; 2. College of Fishery, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)

Abstract: *Spinibarbus caldwelli* (Cyprinidae, Barbinae, *Spinibarbus*) is a kind of small to middle sized fish dwelling in the middle or at the bottom of rivers, widely distributed in Yuanjiang River, Zhujiang River, Jiulongjiang River, Minjiang River, Changjiang River, Hainan and Taiwan. Because of the differences of ecological environments, morphological variations were found among the samples of *S. caldwelli* from different localities. In the present paper, with *Spinibarbus sinensis* as the outgroup, the cytochrome b genes (1140) of *S. caldwelli* specimens from different localities were sequenced to study biogeographical process of this species. Molecular phylogenetic trees were constructed according to the neighbor-joining method and the most parsimony method in Mega 2.0 software. The results showed that variations between samples from Changjiang and Zhujiang rivers, Changjiang and Minjiang rivers, Changjiang and Jiulongjiang rivers, were 1.2%—2.3%, 2.7%—3.7%, and 3.1%—4.2% respectively. All these are much lower than the interspecies variations (13.2%—14.6%). These variations and molecular phylogenetic trees indicate that the biogeographical process might be that water systems in southeastern coast region separated from the inland water systems first, then separation between Zhujiang River and Changjiang River occurred, and these events should be in the Quaternary.

Key words: *Spinibarbus caldwelli*; cytochrome b gene; biogeographical process