

文章编号 : 1004 - 7271(2006)04 - 0398 - 05

我国斑鳊不同群体 mtDNA 控制区 序列的遗传变异

王伟伟, 赵金良, 李思发

(上海水产大学农业部水产种质资源与养殖生态重点开放实验室, 上海 200090)

摘要 :采用 PCR 技术扩增了鸭绿江、长江、钱塘江、闽江、西江 5 个群体 36 尾斑鳊(*Siniperca scherzeri* Steindachner) mtDNA 控制区的基因序列。在长度 818 bp 片段序列中共检测到 112 个多态性核苷酸位点, 具有 20 种单倍型, 不同地理群体的单倍型表型不同, 鸭绿江、钱塘江群体中含有多个特异性的核苷酸位点。用 MEGA 3.0 构建了 NJ 分子树, 鸭绿江、长江、钱塘江、西江群体内的个体均能单独聚成群, 而闽江群体未能单独成群, 个体分别与长江、西江群体聚在一起。这些表明我国斑鳊不同群体间有较明显的遗传分化。

关键词 :斑鳊; 群体; 控制区; 序列

中图分类号 : S 917 **文献标识码 :** A

Genetic variation of the mitochondrial DNA control region among 5 populations of *Siniperca scherzeri* Steindachner in China

WANG Wei-wei, ZHAO Jin-liang, LI Si-fa

(Key Laboratory of Aquatic Genetic Resources and Aquacultural Ecosystem Certificated by the Ministry
of Agriculture, Shanghai Fisheries University, Shanghai 200090, China)

Abstract : The mitochondrial DNA control regions of *Siniperca scherzeri* Steindachner collected from the Yalujiang River, Yangtze River, Qiantangjiang River, Minjiang River and Xijiang River were amplified with PCR technique and sequenced. The result showed 112 nucleotide sites were variable among 818 bp length of homologous sequence and 20 haplotypes were found in all 36 individuals. Each population owned the different haplotypes, some population specific sites were also found in the populations from the Yalujiang River and Qiantangjiang River. Molecular tree constructed by NJ method showed all the individuals from the Yalujiang River, Yangtze River, Qiantangjiang River and Xijiang River populations, respectively, could be clustered as one group independently, except that the individuals from the Minjiang River were mixed with those of the Yangtze River and Xijiang River. These showed there were significant genetic differences among the 5 populations of *S. scherzeri* in China.

Key words : *Siniperca scherzeri*; population; control region; sequence

收稿日期 2005-11-10

基金项目 : 上海市教委资助项目(05KZ02); 上海市重点学科建设资助项目(Y1101)

作者简介 : 王伟伟 (1979 -), 女, 山西沁水人, 硕士研究生, 专业方向为水产动物种质资源。E-mail : sxndweiwei@163.com

通讯作者 : 赵金良, E-mail : jlzhao@shfu.edu.cn

斑鳊 (*Siniperca scherzeri* Steindachner) 属鲈形目 (Perciformes) 鲈科 (Serranidae) 鳊属 (*Siniperca*), 为东亚特有种, 广泛分布于我国内陆水域, 朝鲜和越南也有少量分布^[1-3]。斑鳊的分类学研究过去较为模糊, 根据周才武等^[1]对鳊亚科鱼类分类的重新整理, 广西鳊 (*S. kwangsiensis* Fang) 钱氏鳊 (*S. chieni* Fang) 朱氏鳊 (*S. chui* Fang & Chong) 为斑鳊的变异个体, 河南百泉鳊 (*S. paichuanensis* Fu) 四川鳊 (*S. szechuanensis* Shith) 与斑鳊同物异名。关于斑鳊是否有地方种的问题, 孔晓瑜等^[4]对其肌肉 LDH 同工酶表型研究发现广西斑鳊和福建斑鳊酶谱差别不大, 认为它们为同一种。

由于天然水域生态环境不断遭到人为破坏以及渔业上的捕捞过度, 斑鳊的野生资源正在下降。近年来, 斑鳊人工繁殖技术也取得了成功^[5-7]。人工繁殖群体的扩大、异地引种及管理不善等都可能对当地天然群体的种质造成遗传污染。然而, 关于斑鳊的遗传背景迄今还未见有报道, 且不同群体是否存在地方种 (种群) 也有争议。因而, 本研究通过对我国斑鳊主要水系 mtDNA 控制区序列分析, 初步了解我国斑鳊的遗传特征和群体遗传多样性、遗传分化, 为保护和合理利用这一珍贵资源提供科学依据, 为其分类争议提供新的证据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用 5 个群体斑鳊分别采集于鸭绿江 (辽宁省宽甸县水丰水库) 8 尾、长江 (安徽省池州市秋浦河) 8 尾、钱塘江 (浙江省淳安县千岛湖) 7 尾、闽江 (福建省顺昌县富屯溪) 6 尾、西江 (广西壮族自治区融水县融江) 7 尾, 共 36 尾。剪取实验鱼的尾鳍末端作为样品浸入 95% 的酒精中固定和保存。

1.2 实验方法

1.2.1 总 DNA 的提取

取 20 ~ 30 mg 酒精固定的尾鳍, 剪碎后让酒精完全挥发, 用蛋白酶 K (20 mg/mL) 56 °C 消化过夜 (约 10 h), 酚-氯仿法提取总 DNA。

1.2.2 PCR 扩增

斑鳊控制区扩增所用的特异性引物序列参照文献^[8]。引物序列为 DL1 5' ACC CCT GGC TCC CAA AGC3' 和 DH2 5' ATC TTA GCA TCT TCA GTG 3', 分别位于脯氨酸和苯丙氨酸的 tRNA 上, 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

PCR 反应体系为 50 μ L: 10 \times Buffer 溶液 5 μ L, dNTP 1 μ L (10 mmol/ μ L), 上游引物 2 μ L (10 pmol/ μ L), 下游引物 2 μ L (10 pmol/ μ L), 模板 DNA 2 μ L (100 ng/ μ L), Taq DNA 聚合酶 1 μ L (2.5 u/ μ L), 用去离子灭菌水补足 50 μ L。实验使用的 Taq DNA 聚合酶和 dNTP 均购自上海生工生物工程技术服务有限公司。PCR 反应条件为 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环, 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。

PCR 的扩增产物通过 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测, 对特异性的 PCR 扩增产物进行纯化, 由上海生工生物工程技术服务有限公司用 ABI 377 DNA 自动测序仪进行序列测定。

1.3 数据分析

使用 Bioedit 软件^[9]进行控制区基因序列的序列排对, 应用 MEGA3.0 软件^[10]分析各群体间 DNA 序列差异和遗传距离的计算。以同属的鳊 (*S. chuatsi*) 大眼鳊 (*S. kneri*) 作为外群, 构建 NJ 分子树, 置信度用 Bootstrap 重复 1 000 次检验。

2 结果

2.1 控制区序列的碱基组成

对斑鳊 5 个群体 36 个体的 mtDNA 控制区序列片断进行比对, 除去端部部分模糊序列后, 获得长度

为 818 bp 的同源序列。斑鳊控制区中 A、T、G、C 四种碱基的组成分别为 33.4%、30.3%、16.0%、20.3%。AT 含量高于 GC 含量,这与刘焕章等^[11]的关于鱼类控制区的研究结果基本一致。

斑鳊不同群体中控制区序列变异位点见图 1。818 bp 长度的核苷酸序列中共检测到 112 个变异位点,占分析位点数的 13.69%。其中存在 5 个缺失/插入,67 个转换位点,19 个颠换位点,12 个转换、颠换同时存在的位点,6 个转换、缺失同时存在的位点,2 个颠换缺失同时存在的位点,1 个转换、颠换、缺失同时存在的位点。转换明显大于颠换,这与其他一些脊椎动物的数值相类似^[12]。

Table with 15 columns representing different populations (YL1, YL2, YL3, YL4, YL5, YL6, YL7, YL8, YZ1, YZ2, YZ3, YZ4, YZ5, YZ6, YZ7, YZ8, QT1, QT2, QT3, QT4, QT5, QT6, QT7, MJ1, MJ2, MJ3, MJ4, MJ5, MJ6, XJ1, XJ2, XJ3, XJ4, XJ5, XJ6, XJ7) and their corresponding mtDNA control region sequences with highlighted variations.

图 1 斑鳊不同群体 mtDNA 控制区序列差异比较

Fig.1 Variable sites of mtDNA control region among 5 populations of *S. scherzeri*

注:YL. 鸭绿江;YZ. 长江;QT. 钱塘江;MJ. 闽江;XJ. 西江;— 碱基缺失;图上数字由上至下为碱基变异位点在所测序列中的位置

在斑鳊 36 个个体中共检出 20 种单倍型,鸭绿江 8 个个体存在 4 种单倍型,长江 8 个个体存在 8 种单倍型;钱塘江 7 个个体存在 3 种单倍型,闽江 6 个个体存在 4 种单倍型,西江 6 个个体存在 2 种单倍型,其中,闽江斑鳊和西江斑鳊共享其中的一种单倍型。单倍型频率表明长江群体(100%)的遗传多样性水平最丰富,西江群体(33.3%)的遗传多样性水平最低。

根据控制区碱基组成特征,发现鸭绿江和钱塘江群体具有较明显的特异性位点。位点 4、146、147、645、199 为鸭绿江和钱塘江共有特异性位点。位点 10、151、164、177、201、253、254、469、549、550、609 为鸭绿江群体特有,位点 36、64、153、155、165、211、389、558、644、664、675、740 为钱塘江群体特有。而闽江与长江、西江群体间未见有明显差异。

2.2 群体内和群体间的遗传差异

斑鳊群体内和群体间控制区的遗传差异见表 1。鸭绿江、长江、钱塘江、闽江、西江 5 个群体内的核苷酸序列差异分别为 0.3%、0.8%、0.6%、3%、0。其中,广西群体内的遗传变异相较最小。而 5 个群体之间的核苷酸序列差异较大(2.3%~7.4%)。

表 1 斑鳊 5 群体内和群体间控制区基因序列差异

Tab.1 Nucleotide variation of the control region within and among populations of *S. scherzeri*

	鸭绿江	长江	钱塘江	闽江	西江
鸭绿江	0.3%	—	—	—	—
长江	7.4%	0.8%	—	—	—
钱塘江	5.5%	7.3%	0.6%	—	—
闽江	6.8%	2.3%	6.8%	3.0%	—
西江	6.1%	5.6%	6.3%	3.6%	0%

2.3 分子树

根据控制区基因序列,以鳊和大眼鳊为外群,用 MEGA 3.0 构建了斑鳊 5 个群体的 NJ 树(图 2)。鸭绿江、长江、钱塘江、西江群体内个体均能单独聚成群,而闽江群体未能单独成群,个体分别与长江、西江群体聚在一起。

3 讨论

3.1 我国斑鳊不同群体的遗传变异

本研究测得的斑鳊控制区的部分序列,含有高度变异(部分终止序列区)和保守(中央保守区、部分保守序列区)的片段^[11]。群体内核苷酸序列的遗传变异水平(0~3%)低于不同群体间的遗传差异(2.3%~7.4%)。这表明进化速率较快的控制区序列,较适合于斑鳊群体间的遗传分析。20 种单倍型在不同水系中的出现频率差异表明,长江群体的遗传多样性最高,西江群体遗传多样性最低。这可能与长江流域范围广,分布区向西延伸至四川境内,群体数量大,基因变异丰富;而融江仅为西江(珠江支干)上游的一个支流,地理范围相对狭小,与其他群体的基因交流缺乏有关。

3.2 我国斑鳊不同群体的遗传分化

从分子树中看出,鸭绿江、钱塘江、长江、西江斑鳊群体内的个体均能单独聚在一起,表明这些群体内的差异较小,而群体间已产生明显的遗传分化。闽江斑鳊群体未能单独聚为一支,个体分别与长江、西江群体混在一起。这可能表明闽江群体处于长江、西江群体遗传分化的过渡带,与其地理位置关系基本一致。钱塘江群体与鸭绿江群体表现有较近的亲缘关系,而与其地理相近的南方群体(长江、闽江、西江)有较大差异,这可能是由于控制区为线粒体 DNA 上非编码区域,位点变异速度较快,且核苷酸位点的变异未与其群体的地理分化过程表现一致。

由于鸭绿江、长江、钱塘江、西江斑鳊群体之间无共享单倍型,部分群体存在大量的特异性核苷酸位点,表现出群体特有的单倍型,这些可为不同群体间的遗传判别提供依据。本研究结果初步表明,我国斑鳊不同群体间表现有较明显的遗传差异。今后应进一步加深对不同群体间的遗传差异分析,为斑鳊种质资源遗传保护、遗传选育和种质改良提供更充分的依据。

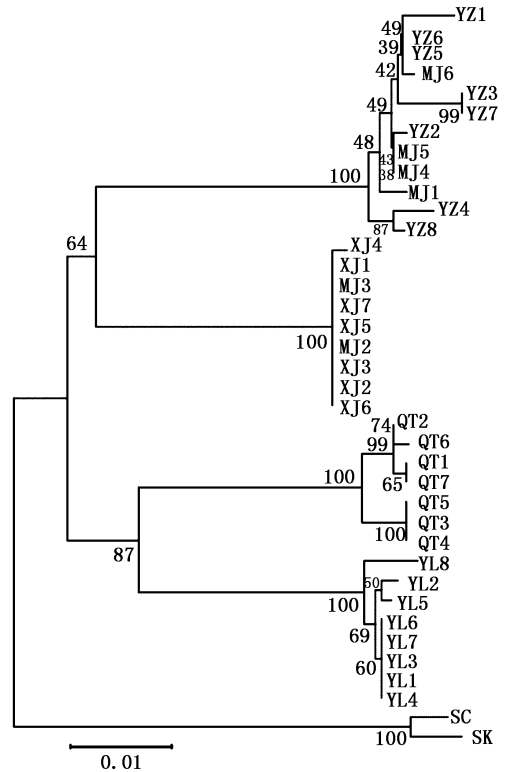


图 2 斑鳊 5 群体控制区的 NJ 树

Fig.2 NJ tree of the control region among 5 populations of *S. scherzeri*

YL. 鸭绿江; YZ. 长江; QT. 钱塘江; MJ. 闽江; XJ. 西江; SC. 鳊; SK. 大眼鳊

本研究采样中得到辽宁省丹东市水产技术推广站、安徽省池州市贵池区水产局、福建省顺昌县畜牧水产局、广西壮族自治区融水县畜牧水产局、浙江省淳安县千岛湖渔民的大力协助。特此致谢。

参考文献：

- [1] 周才武, 杨青, 蔡德霖. 鳊亚科鱼类的分类整理和地理分布[J]. 动物学研究, 1988, 9(2): 113-126.
- [2] 刘焕章. 鳊类的系统发育研究及若干种的有效性探讨[J]. 动物学研究, 1994, 15(增刊): 1-12.
- [3] 赵金良, 李思发, 蔡完其, 等. 由 16S rDNA 序列初步推断鳊类与低等鲈形目鱼类的系统关系[J]. 上海水产大学学报, 2005, 14(4): 364-369.
- [4] 孔晓瑜, 周才武. 鳊亚科 SINIPERCINAE 鱼类的 LDH 同工酶的比较研究[J]. 青岛海洋大学学报, 1992, 22(1): 103-109.
- [5] 吴立新, 邹波. 碧流水库斑鳊胚胎发育的形态观察[J]. 水产科学, 1993, 12(9): 5-8.
- [6] 曾可为, 王青云, 高爱银, 等. 斑鳊的生物学及繁殖生物学的研究[J]. 内陆水产, 2005, 30(2): 21-23.
- [7] 凌继忠. 斑鳊人工繁育技术总结[J]. 渔业致富指南, 2004, (16): 33-34.
- [8] 张燕, 张鹤, 何舜平. 中国鳊科鱼类线粒体 DNA 控制区结构及其系统发育分析[J]. 水生生物学报, 2003, 27(5): 463-467.
- [9] Hall T A. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. Nucl Acid Symp Ser, 1998, 41: 95-98.
- [10] Kumar M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequence[J]. Mol Evol, 1980, 16: 111-120.
- [11] 刘焕章. 鱼类线粒体 DNA 控制区的结构与进化: 以鳊鱼类为例[J]. 自然科学进展, 2002, 12(3): 266-270.
- [12] Saccone C, Pesole G, Sbisà E. Structural elements highly preserved during the evolution of the D-loop containing region in vertebrate mitochondrial DNA[J]. Mol Evol, 1987, (26): 205-211.

欢迎订阅 2007 年《淡水渔业》

《淡水渔业》创刊于 1971 年, 是中国水产学会主办, 中国水产科学研究院长江水产研究所编辑出版的学术期刊。主要刊载渔业生物技术、渔业资源、渔业设施、渔业环境保护、水产养殖与增殖、水产生物病害、水产品加工利用等方面的科学实验和生产试验报告, 少量刊登研究简报综述。关注参考或引用价值, 突出学术热点和基础理论。

本刊为中国自然科学核心期刊, 多次被评为全国优秀科技期刊。本刊立足水产, 面向全国, 适为教学、科研和生产服务, 力求经典、权威、实用, 是中国水产科技发展的一部活档案, 是进行学术交流理想的平台, 是水产学苑一本及时更新的通讯录。

欢迎水产相关高校、科研院所和技术推广部门的专业人员订阅和参考。

本刊为双月刊, 大 16 开, 80 页, 国内外公开发行。国内统一刊号 CN42-1138/S, 邮发代号 38-32, 国际标准刊号 ISSN1000-6907。

本刊每期定价 10 元, 全年 6 期共 60 元。读者可采用两种方式订阅: ①可在当地邮局订阅; ②直接汇款到杂志社订阅。

通讯地址: 湖北省荆州市江汉北路 41 号

邮政编码: 434000

电 话: (0716) 8129526

传 真: (0716) 8130465

E-mail: dsyy@chinajournal.net.cn