

文章编号: 1674 - 5566(2014)01 - 0022 - 09

## 温州光唇鱼线粒体基因组结构及系统发育分析

贾永义, 蒋文枰, 顾志敏

(浙江省淡水水产研究所 农业部淡水渔业健康养殖重点实验室, 浙江 湖州 313000)

**摘要:** 采用已公布的鱼类线粒体基因组全序列, 设计 8 对引物扩增、测定并注释温州光唇鱼 (*Acrossocheilus wenchowensis*) 线粒体基因组 (GenBank 登录号: KC\_495074)。序列全长 16 591 bp, 包括 13 个蛋白质基因、22 个 tRNA 基因、2 个 rRNA 基因和 1 个非编码区, 各基因的位置及组成与已公布的鲤科鱼类一致; 37 个基因中, 1 个蛋白质编码基因 (*ND6*) 和 8 个 tRNA 基因 (tRNA<sup>Gln</sup>、tRNA<sup>Ala</sup>、tRNA<sup>Asn</sup>、tRNA<sup>Cys</sup>、tRNA<sup>Tyr</sup>、tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>、tRNA<sup>Glu</sup> 和 tRNA<sup>Pro</sup>) 由 L 链编码, 其余的均由 H 链编码。A、T、G、C 碱基组成分别为 30.92%、24.86%、16.41%、27.81%; 除 tRNA<sup>Ser(AGN)</sup> 外, 其它 21 个 tRNA 的二级结构均具有典型的三叶草结构; 13 个蛋白编码基因中, 除 *CO I* 起始密码子为 GTG 外, 其余均以 ATG 为起始密码子, 而 *CO II*、*ND4* 和 *Cyt b* 基因的终止密码子为不完整的 T, 其它 10 个基因均具有完整的终止密码子。利用鲤科共 17 属 18 种线粒体基因组 13 个蛋白质基因的氨基酸序列, 从线粒体基因组水平探讨了温州光唇鱼在鲤科鱼类中的系统进化地位, 为光唇鱼属乃至鲤科鱼类的系统分类学研究提供基础资料。

**研究亮点:** 野生温州光唇鱼种群日趋衰退, 而光唇鱼属的系统分类仍然比较混乱, 存在一定的误差, 迫切需要从分子生物学角度进行精确鉴定和分类。本研究测定并分析温州光唇鱼线粒体基因组, 能够为今后对光唇鱼属的系统分类、种群遗传多样性分析和种质资源保护提供基础资料。

**关键词:** 温州光唇鱼; 线粒体基因组; 系统发育

**中图分类号:** S 917

**文献标志码:** A

线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA), 作为核外遗传物质, 具有结构简单、进化速度快、基因排列紧凑和严格的母系遗传等特点<sup>[1]</sup>, 为典型的环状双链分子结构, 长度在 14 ~ 18 kb 之间, 编码 37 个基因, 由 13 个蛋白质基因 (*ND1* ~ *ND6*、*ND4L*、*CO I* ~ *CO III*、*ATP6*、*ATP8* 和 *Cyt b*)、22 个 tRNA 以及 2 个 rRNA 以及一个控制区 (D-loop 区) 组成<sup>[2-3]</sup>。脊椎动物 mtDNA 的结构和序列较为保守, 在过去的十几年中, 已经被广泛应用于分子系统发育、群体遗传、分类地位<sup>[4-7]</sup> 以及基因组进化<sup>[8]</sup> 等的研究中。

温州光唇鱼 (*Acrossocheilus wenchowensis*) 属于鲤形目 (Cypriniformes)、鲤科 (Cyprinidae)、鲃亚科 (Barbinae), 分布于整个瓯江水系、飞云江及鳌江水系、泰顺东江<sup>[9-10]</sup>, 是一类在山间溪流和

江河中上游等急流环境中栖息的小型淡水鱼类, 肉质鲜美, 营养价值高, 为浙江重要的小型经济鱼类, 具有十分广阔的开发前景。但由于近年来环境污染、生境破坏等原因, 温州光唇鱼野生种群日趋衰退。目前已被确定描述的光唇鱼种和亚种共有 21 个, 主要通过形态学性状如鳍条结构、口唇结构和体色差异等来进行物种鉴定。然而由于存在一定的雌雄两性差异、种内个体间的差异以及不同的地理种群间的变异等原因, 致使光唇鱼属的分类存在一定的误差。因此, 迫切需要从分子生物学角度进行精确鉴定和分类, 然而光唇鱼属相关的研究工作主要集中在传统的生长<sup>[11]</sup>、组织学<sup>[12]</sup>、形态学<sup>[13]</sup> 和分类学<sup>[14]</sup>, 分子生物学方面的研究工作还未开展, 从而影响了光唇鱼属系统分类学问题的解决。

收稿日期: 2013-07-31 修回日期: 2013-10-23

基金项目: 浙江省公益技术研究农业项目 (2011C2208); 浙江省农业新品种选育重大科技专项 (2012C12907 - 7)

作者简介: 贾永义 (1979—), 男, 助理研究员, 硕士, 研究方向为水产种质资源与遗传育种。E-mail: yongyi\_jia@163.com

通信作者: 顾志敏, E-mail: guzhimin2006@163.com

目前尚无温州光唇鱼 mtDNA 的研究报道。本文首次扩增、测定温州光唇鱼 mtDNA,在对序列进行拼接、注释的基础上,对其序列结构进行预测和分析,以期为今后对光唇鱼属乃至鲤科鱼类的系统分类、种质资源保护和种群遗传多样性分析提供基础资料。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样本采集、基因组 DNA 提取

温州光唇鱼样品采自浙江新昌县巧云水库上游,性别鉴定为雌性。取新鲜肝脏组织约 50 ~ 100 mg,用组织细胞基因组提取试剂盒(北京吉百特生物技术有限责任公司)提取和纯化基因组 DNA。总 DNA 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, -20 °C 保存。物种鉴定参考伍献文<sup>[9]</sup>和浙江动物志编辑委员会<sup>[10]</sup>。

### 1.2 PCR 扩增及测序

根据已公布的鱼类 mtDNA 设计引物,运用 Primer Premier 5.0 设计 8 对引物(表 1),分段扩增 mtDNA。

LA-PCR 反应采用 50  $\mu$ L 体系,包括 DNA 模板 100 ng,正反向引物各 2  $\mu$ L,10  $\times$  LA PCR Buffer Mixture 5  $\mu$ L,dNTP mixture 8  $\mu$ L,LA Taq DNA 聚合酶(TaKaRa)5 U,灭菌水补足至 50  $\mu$ L。扩增程序为:95 °C 预变性 5 min,35 个循环(95 °C 变性 40 s,57 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 5 min,最后 72 °C 延伸 10 min),4 °C 保存。

常规 PCR 反应体系为 25  $\mu$ L,包括:模板 DNA 约为 50 ng,dNTP 4  $\mu$ L,buffer mixture 2.5  $\mu$ L,正反向引物各 1  $\mu$ L,LA Taq DNA 聚合酶(TaKaRa) 2.5 U,灭菌水补足至 25  $\mu$ L。扩增条件为:98 °C 预变性 10 s,94 °C 变性 1 min,48 °C 复

性 1 min,72 °C 延伸 2 min,35 个循环,最后 72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。

PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测后送宝生物工程(大连)有限公司测序,测序方法为直接测序和引物步行法。

### 1.3 序列的拼接、分析

首先,利用拼接软件 Phred 处理原始测序峰图文件,保证每个碱基的质量值在 20 以上<sup>[15-16]</sup>,然后通过 GenBank 数据库在线工具 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 检索<sup>[17]</sup>,确定所得序列与 GenBank 中所收录近缘物种的相应区段有较高同源性,最后利用分析软件 ContigExpress 和 Lasergene version 7.0(DNASTAR) 软件包将测序得到片段拼接成一个完整的序列,并统计序列的全长、AT 含量和碱基组成等信息;采用 tRNA scan-SE 1.21 (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) 在线工具预测 tRNA 的二级结构,并采用人工辅助校正<sup>[18]</sup>;蛋白质编码基因、rRNA 基因和控制区(D-loop) 确切的起始和终止位置则利用 BLAST 分析各基因序列的同源性,并参考近缘物种的 mtDNA 注释确定。全基因组序列经 Sequin 7.9 注释后提交至 GenBank 数据库。

### 1.4 系统进化树的构建

从 GenBank 数据库下载了 17 属 18 种鲤科鱼类的蛋白质编码基因的线粒体氨基酸序列,外加本研究的温州光唇鱼,以裸吻鱼科(Psilorhynchidae)的裸吻鱼(*Psilorhynchus sucatio*) 作为外群,运用 MEGA 4.0 软件,采用邻近法(NJ 法)构建系统进化树,模型选用 Kimura's 2-Parameter,1 000 次重复抽样检验,构建 18 种鲤科鱼类的系统进化树,确定温州光唇鱼在鲤科中的系统进化关系。

表 1 温州光唇鱼线粒体基因组 PCR 扩增的引物

Tab. 1 PCR primers for *A. wenchowensis* mitochondrial genome amplification

上游引物	引物序列(5'-3')	下游引物	引物序列(5'-3')
xlt1f	CTTTAACTGAACTTACACATGCAAG	xlt1r	GCTCCATAGGGTCTTCTCGTCT
xlt2f	CACAAGCCTCGCCTGTTTAC	xlt2r	TTAACCAACATATTTGGGGTATG
xlt3f	GAGATCAAAACTCTTACTGCTTCC	xlt3r	ACAGAGGCTCTCGCTGGCC
xlt4f	CGGCCATGCTTTCGTTATGATTTTC	xlt4r	TATTCATAGCTTCAGTATCATTTGGTG
xlt5f	CACAACCTAGGATTCGAAGACGC	xlt5r	GGAAGTCAGCAGCCACCTAGTTC
xlt6f	GCACCTTCCAAGGACACCACAC	xlt6r	GGTGCTGGTAGGTCGACTAGTG
xlt7f	CCACCGTTGTAATTCAACTACAAGAAC	xlt7r	CGGCCTCCGGATTACAAGAC
xlt8f	CGCATCCGTTCTATACTTCGCAC	xlt8r	CCGCGGTGGCTGGCAGCAG

## 2 结果

### 2.1 基因组结构特征

温州光唇鱼 mtDNA (GenBank 登录号: KC\_495074) 全长 16 591 bp, 包括 37 个基因 (13 个蛋白质基因、22 个 tRNA 基因、2 个 rRNA 基因) 和 1 个控制区 (D-loop 区), 其基因序列大小以及在基因组中的排列顺序与硬骨鱼类 mtDNA 基本一致 (图 1 和表 2); 各基因排列紧密, 间隔序列共计 11 处 72 bp, 长度为 1~33 bp 不等; 基因重叠区 8 处共 25 bp, 重叠碱基数在 1~7 bp 之间; L 链仅编码 tRNA<sup>Gln</sup>、tRNA<sup>Ala</sup>、tRNA<sup>Asn</sup>、tRNA<sup>Cys</sup>、tRNA<sup>Tyr</sup>、tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>、tRNA<sup>Glu</sup>、tRNA<sup>Pro</sup> 和 ND6 基因, 其余基因均由 H 链编码。

基因组的 A、T、G、C 的碱基组成分别为 30.92%、24.86%、16.41%、27.81%, (A + T) 55.78% > (G + C) 44.22%, 表现出适度的 AT 偏好性, 这与脊椎动物偏好于 A 和 T 碱基是一致的<sup>[19]</sup>。

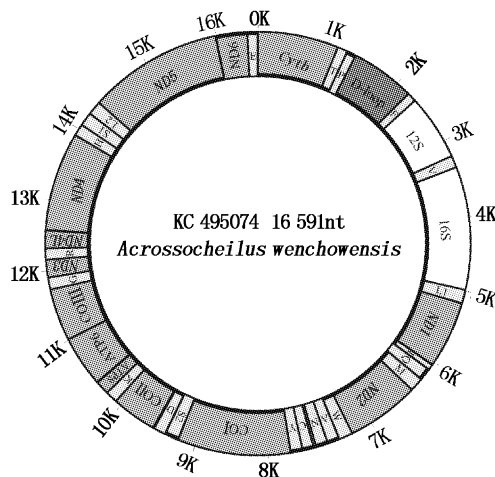


图 1 温州光唇鱼 mtDNA 的结构简图

Fig. 1 Organization of the mitochondrial genome of *A. wenchowensis*

CO I ~ CO III. 细胞色素氧化酶亚基; *Cyt b*. 细胞色素 *b* 编码基因; *ATP6* 和 *ATP8*. ATP 合成酶亚基; *ND1* ~ *ND6*. NADH 脱氢酶亚基; 12S 和 16S. 12S rRNA 和 16S rRNA; tRNA 用氨基酸代码表示。位于外圈和内圈黑线的基因分别表示由 L 或 H 链编码。

### 2.2 蛋白质基因

温州光唇鱼 mtDNA 具有 13 个蛋白质编码基因, 其包括 7 个 NADH 脱氢酶亚基 (NADH dehydrogenase subunit)、3 个细胞色素 *c* 氧化酶亚

基 (Cytochrome *c* oxidase subunit)、2 个 ATP 合成酶亚基 (ATP synthase subunit) 和 1 个细胞色素 *b* (Cytochrome *b*) 基因。总长为 11 415 bp, 占全基因组的 68.80%, 其大小和位置与硬骨鱼类基本一致。13 个蛋白质基因中, 存在 3 个重叠区域, 其中, *ATP8/ATP6* 和 *ND4L/ND4* 之间均有 7 bp 的共用碱基, 而 *ND5/ND6* 则有 4 bp 的碱基重叠。除 *CO I* 以 GTG 作为起始密码子外, 其余 12 个蛋白质编码基因都以 ATG 作为起始密码子。同其它鱼类一样, 温州光唇鱼均以 TAG 或 TAA 作为终止密码子, 未发现特殊终止密码子, 其中, *Cytb*、*CO II* 和 *ND4* 的终止密码子为不完整的 T (表 2)。*ND6* 基因是唯一位于 L 链上的蛋白质编码基因, 其余 12 个均在 H 链上编码。

温州光唇鱼所有蛋白质编码基因共编码 3 807 个氨基酸。其中, 亮氨酸 (Leu) 是最常用的氨基酸, 占氨基酸总数的 16.5%; 其次是丙氨酸 (Ala), 占总数的 8.9%; 而半胱氨酸 (Cys) 为使用最少的氨基酸, 仅有 0.7%。CUA (亮氨酸) 为使用率最高的密码子, 占总数的 6.4%; AUC (异亮氨酸) 是第二常用的密码子, 占总数的 4.1%; AGA、AGG 则未使用 (表 3)。高频率的 AT 偏好性作为 mtDNA 的一个普遍特征, 导致了相应氨基酸呈现了一定的 AT 偏好性。

### 2.3 转运 RNA (tRNA) 和核糖体 RNA (rRNA)

温州光唇鱼共有 22 个 tRNA (图 2), 长度在 67~76 bp 之间, 除 tRNA<sup>Ser(AGN)</sup> 外, 其他 21 个 tRNA 的二级结构均具有典型的三叶草结构; tRNA<sup>Gln</sup>、tRNA<sup>Ala</sup>、tRNA<sup>Asn</sup>、tRNA<sup>Cys</sup>、tRNA<sup>Tyr</sup>、tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>、tRNA<sup>Glu</sup> 和 tRNA<sup>Pro</sup> 位于 L 链, 其余位于 H 链, 共转运 20 种氨基酸。

温州光唇鱼 12S rRNA 位于 tRNA<sup>Phe</sup> 和 tRNA<sup>Val</sup> 之间, 长度为 956 bp; 16S rRNA 位于 tRNA<sup>Val</sup> 和 tRNA<sup>Leu</sup> (UUR) 之间, 长度为 1 679 bp, 它们均具有较高的保守性, 与鲤科其他已知物种在 mtDNA 中位置相同, 长度基本一致。

### 2.4 控制区 (D-loop 区)

温州光唇鱼 mtDNA 的 D-loop 区长度为 887 bp, 位于 tRNA<sup>Pro</sup> 和 tRNA<sup>Phe</sup> 基因之间, 与其它动物类似, A + T 含量 (65.64%) 高于 G + C 含量 (34.36%), 且高于全序列的 A + T 含量 (55.78%)。D-loop 区作为 DNA 复制和转录的相关序列, 它的结构与其它脊椎动物 mtDNA 类

似,包含终止序列区(ETAS)、中央保守区(CD) 及保守序列区(CSB)3个区段<sup>[20]</sup>。

表2 温州光唇鱼 mtDNA 的组成

Tab.2 Organization of the *A. wenchowensis* mitochondrial genome

序号	基因名称	缩写	位置	大小/bp	密码子	
					起始	终止
1	Cytochrome b	<i>Cyt b</i>	1 ~ 1141	1141	ATG	T -
2	tRNA <sup>Thr</sup>	T	1142 ~ 1213	72		
3	tRNA <sup>Pro</sup>	P	1213 ~ 1282	70		
4	Control region	CR	1283 ~ 2219	937		
5	tRNA <sup>Phe</sup>	F	2220 ~ 2288	69		
6	12S ribosomal RNA	12S	2289 ~ 3244	956		
7	tRNA <sup>Val</sup>	V	3245 ~ 3316	72		
8	16S ribosomal RNA	16S	3317 ~ 4995	1679		
9	tRNA <sup>Leu(UUR)</sup>	L-UUR	4996 ~ 5071	76		
10	NADH dehydrogenase subunit 1	<i>ND1</i>	5073 ~ 6047	975	ATG	TAA
11	tRNA <sup>Ile</sup>	I	6052 ~ 6123	72		
12	tRNA <sup>Gln</sup>	Q	6121 ~ 6191	71		
13	tRNA <sup>Met</sup>	M	6194 ~ 6262	67		
14	NADH dehydrogenase subunit 2	<i>ND2</i>	6263 ~ 7309	1047	ATG	TAG
15	tRNA <sup>Trp</sup>	W	7308 ~ 7378	71		
16	tRNA <sup>Ala</sup>	A	7381 ~ 7449	69		
17	tRNA <sup>Asn</sup>	N	7451 ~ 7523	73		
18	tRNA <sup>Cys</sup>	C	7557 ~ 7623	67		
19	tRNA <sup>Tyr</sup>	Y	7623 ~ 7693	71		
20	Cytochrome c oxidase subunit I	<i>CO I</i>	7695 ~ 9245	1551	GTG	TAA
21	tRNA <sup>Ser(UCN)</sup>	S-UCN	9247 ~ 9317	71		
22	tRNA <sup>Asp</sup>	D	9321 ~ 9392	72		
23	Cytochrome c oxidase subunit II	<i>CO II</i>	9407 ~ 10097	691	ATG	T -
24	tRNA <sup>ALys</sup>	K	10098 ~ 10173	76		
25	ATP synthase F0 subunit 8	<i>ATP8</i>	10175 ~ 10339	165	ATG	TAG
26	ATP synthase F0 subunit 6	<i>ATP6</i>	10333 ~ 11016	684	ATG	TAA
27	Cytochrome c oxidase subunit III	<i>CO III</i>	11016 ~ 11801	786	ATG	TAA
28	tRNA <sup>Gly</sup>	G	11801 ~ 11872	72		
29	NADH dehydrogenase subunit 3	<i>ND3</i>	11873 ~ 12223	351	ATG	TAG
30	tRNA <sup>Arg</sup>	R	12223 ~ 12291	69		
31	NADH dehydrogenase subunit 4L	<i>ND4L</i>	12292 ~ 12588	297	ATG	TAA
32	NADH dehydrogenase subunit 4	<i>ND4</i>	12582 ~ 13962	1381	ATG	T -
33	tRNA <sup>His</sup>	H	13963 ~ 14031	69		
34	tRNA <sup>Ser(AGU)</sup>	S-AGY	14032 ~ 14100	69		
35	tRNA <sup>Leu(CUN)</sup>	L-CUN	14102 ~ 14174	73		
36	NADH dehydrogenase subunit 5	<i>ND5</i>	14175 ~ 15998	1824	ATG	TAA
37	NADH dehydrogenase subunit 6	<i>ND6</i>	15995 ~ 16516	522	ATG	TAA
38	tRNA <sup>Glu</sup>	E	16517 ~ 16585	69		

## 2.5 部分鲤科鱼类系统进化分析

图3是基于鲤科鱼类17属18个种的13个蛋白质编码基因的氨基酸序列采用NJ法构建的系统发育树。分析表明:该树分为两大支,上支由翘嘴鲌、团头鲂、黄尾鲴聚为一小支,鲢属的鲢、鳙聚为一小支,这两小支再与青鱼和草鱼一起聚

为一支,然后分别依次与马口鱼、丁鲃、花鲢与麦穗鱼聚成的小支以及高体鲫聚为一个支;而下支则由鲫、鲤先聚为一小支后与巨须裂腹鱼和岩原鲤聚为一支,最后再与温州光唇鱼和小口白甲鱼聚类的一小支聚为另一个支,而裸吻鱼则单独为一支,作为外群位于系统树的基部。

表 3 温州光唇鱼 13 个蛋白质编码基因氨基酸和密码子使用情况

Tab. 3 Amino acid and codon usage in 13 protein-coding genes of *A. wenchowensis*

氨基酸	密码子	频率/%	氨基酸	密码子	频率/%	氨基酸	密码子	频率/%
Ala(A)	GCA	126	Cys(C)	UGC	20	Glu(E)	GAA	88
	GCC	144		UGU	7		GAG	17
	GCG	16		CAA	27		CAC	105
	GCU	52	CAG	97	CAU	80		
	CGA	338	Gln(Q)	6	His(H)	25		
	CGC	45	GGA	103	AUC	105		
	CGG	14	GCC	112	AUU	156		
Arg(R)	CGU	7	GGG	48	Ile(I)	297		
	74	GGU	56	CCA		112		
	AAC	83	Gly(G)	25		CCC	69	
Asn(N)	AAU	40	ACA	241	CCG	14		
	123	ACC	148	CCU	17			
	GAC	51	ACG	114	Pro(P)	212		
Asp(D)	GAU	21	ACU	37	UUC	124		
	72	Thr(T)	311	UUU	100			
	AAA	72	AUA	118	Phe(F)	224		
Lys(K)	AAG	6	AUG	48	GUA	97		
	78	Met(M)	166	GUC	34			
	UGA	105	UAC	71	GUG	35		
Trp(W)	UGG	15	UAU	42G	UU	58		
	120	Tyr(Y)	113	Val(V)	224			
	AGC	40	CUA	245	AGA	0		
	AGU	14	CUC	106	AGG	0		
	UCA	87	CUG	60	UAA	10		
	UCC	46	CUU	105	UAG	3		
	UCG	7	UUA	101	Ter(.)	13		
UCU	38	UUG	12					
Ser(S)	232	Leu(L)	629					

### 3 讨论

#### 3.1 线粒体基因组全序列分析

鲤科鱼类 mtDNA 在进化上具有高度的保守性,温州光唇鱼 mtDNA 的基因排列和长度与现已公布的鲤科鱼类基本一致,但在基因组的全长存在一定的差异,其主要表现为控制区的长度差异,而控制区是 mtDNA 中变异最大、进化速度最快的区域,因此近年来渐渐成为系统发生学的研究热点<sup>[19,21]</sup>。温州光唇鱼 mtDNA 的编码基因由重链(H)和轻链(L)编码,其中 L 链仅编码 tRNA<sup>Gln</sup>、tRNA<sup>Ala</sup>、tRNA<sup>Asn</sup>、tRNA<sup>Cys</sup>、tRNA<sup>Tyr</sup>、tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>、tRNA<sup>Glu</sup>、tRNA<sup>Pro</sup>和 ND6 基因,其余基因均由 H 链编码,这与吕国庆和李思发<sup>[22]</sup>的研究结果一致。

温州光唇鱼 mtDNA 的蛋白质编码基因中共有 3 个重叠区域,ATP8/ATP6 和 ND4L/ND4 之间均有 7 bp 的碱基重叠,而 ND5/ND6 则有 4 bp 的共用碱基。其中 ATP8/ATP6 和 ND4L/ND4 之间

的碱基重叠与鲤完全一致<sup>[23]</sup>,且 ND4L/ND4 之间 7 bp 的碱基重叠在所有脊椎动物中都是恒定的<sup>[24]</sup>。Cytb、CO II 和 ND4 的终止密码子均为不完整的 T,但是,在转录加工过程中 mRNA 会加上 PolyA 尾巴,从而形成完整终止密码子 UAA<sup>[25]</sup>。

温州光唇鱼 mtDNA 除 tRNA<sup>Ser(AGN)</sup>外,其他 21 个 tRNA 的二级结构均具有典型的三叶草结构,而研究发现脊椎动物 tRNA<sup>Ser(AGN)</sup>结构不能形成完整的三叶草结构,缺失 DHU 臂<sup>[26-27]</sup>;22 个 tRNA 中,大部分 tRNA 存在碱基错配,主要以 G-U 为主,其可通过 RNA 编辑校正,而不会引起氨基酸转运上的障碍,这种错配在低等的软体动物到高等的哺乳动物中的多数物种中都存在,该碱基错配形式很可能是 mtDNA 中的一种正常的配对形式。另外,温州光唇鱼 mtDNA tRNA<sup>Asn</sup>和 tRNA<sup>Cys</sup>之间的“WANCY (Trp-Ala-Asn-OL-Cys-Tyr)” tRNA 基因簇区中存在一段 33 bp “CTTTTCCC GCCCCTAGCCCAGCAAGCCGGAA”的茎环结构,这段茎环结构通常被认为是 L 链复

制起点(origin of light strand replication, OL) [28]。

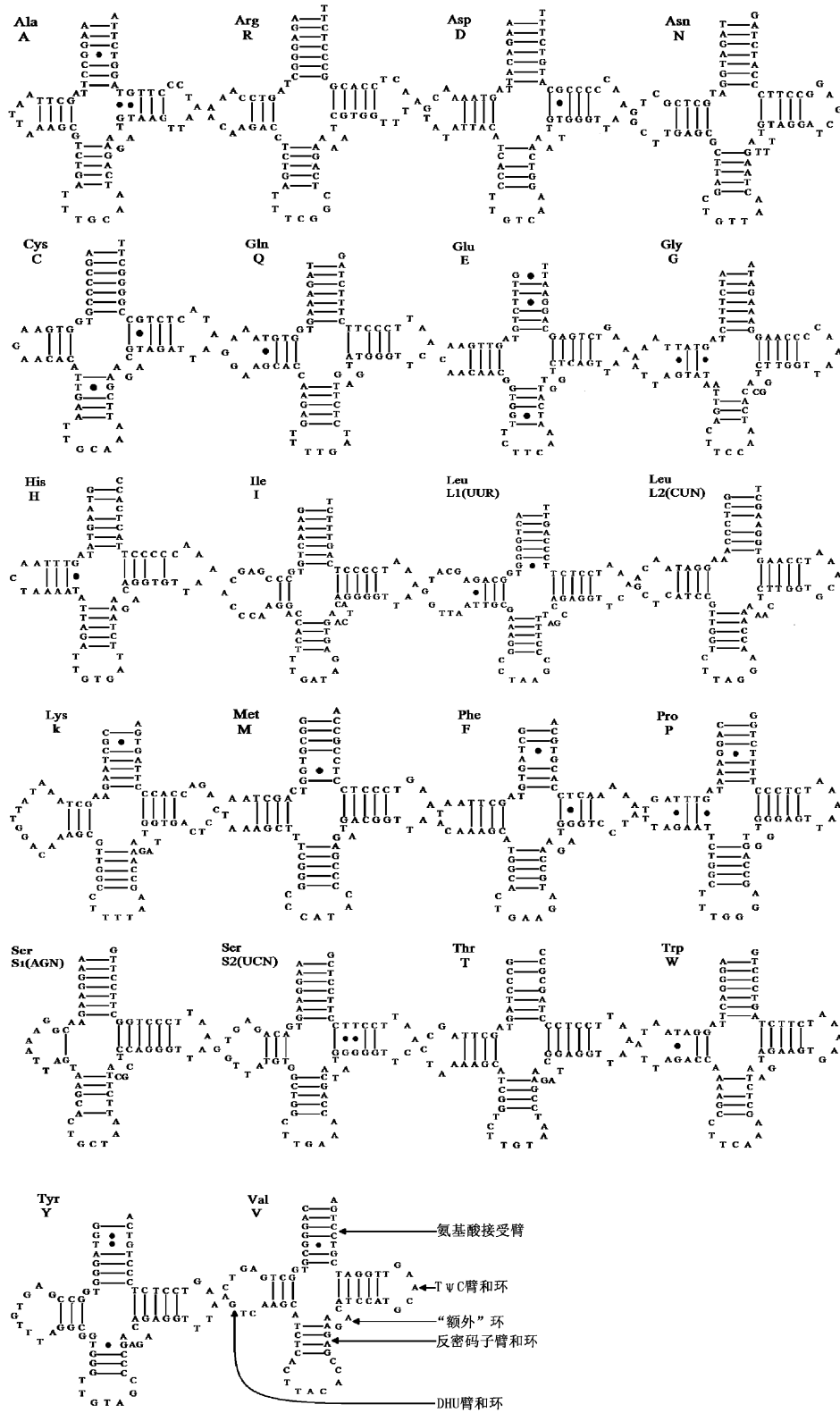


图 2 温州光唇鱼 22 个 tRNA 的二级结构

Fig. 2 Potential secondary structure of the 22 inferred tRNAs of *A. wenchowensis* mitochondrial genome

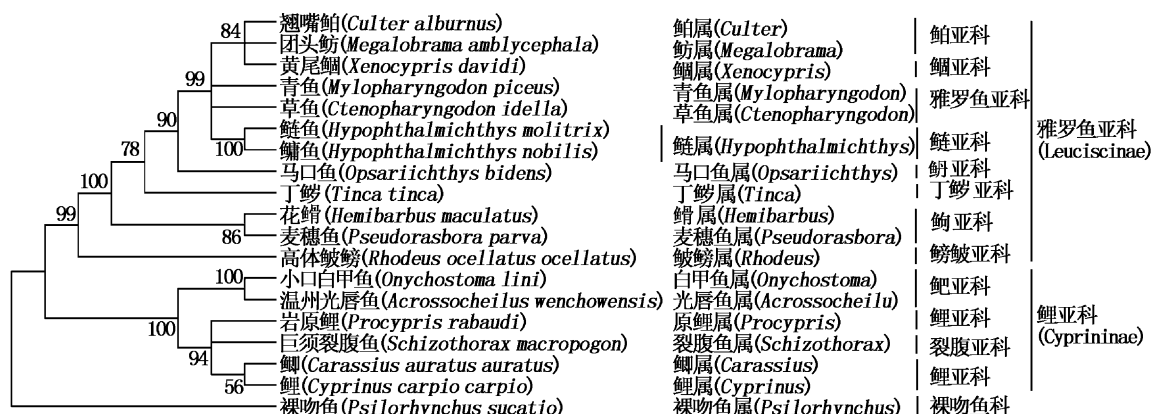


图 3 基于 13 个蛋白质编码基因氨基酸序列构建的鲤科系统发育树

Fig. 3 Phylogenetic relationship of *Cyprinidae* based on 13 mitochondrial protein-coding genes

温州光唇鱼 (KC\_495074); 鲤 (JN\_105355); 草鱼 (NC\_010288); 翘嘴鲌 (NC\_013616); 鲤 (NC\_001606); 花鲢 (NC\_018534); 鲢 (NC\_010156); 鳊 (NC\_010194); 团头鲂 (NC\_010341); 青鱼 (NC\_011141); 小口白甲鱼 (NC\_018043); 马口鱼 (NC\_008744); 麦穗鱼 (NC\_015614); 高体鳊鲂 (NC\_011211); 巨须裂腹鱼 (NC\_020339); 丁鲃 (NC\_008648); 黄尾鲮 (NC\_013072); 岩原鲤 (NC\_011192); 裸吻鱼 (NC\_015532)。

### 3.2 部分鲤科鱼类系统进化分析

自从 CUVIER 于 1817 年建立鲤科以来,众多鱼类学家围绕着鲤科鱼类的系统学开展了一系列的研究工作。最初的鲤科鱼类系统学研究通常是根据不同的形态学性状对鲤科进行亚科的划分,这些系统学研究通常是通过寻找形态学性状的异同来达到区分不同亚科的目的,因而忽略了这些亚科之间的相互关系。陈湘舜等<sup>[29]</sup>在比较骨骼特征的基础上将鲤科鱼类分为雅罗鱼系 (series Leuciscini) 和鲃系 (series Barbini),前者包括 鲃 亚 科 (Danioninae)、雅 罗 鱼 亚 科 (Leuciscinae)、鲌 亚 科 (Cultrinae)、鲮 亚 科 (Xenocyprinae)、鲃 亚 科 (Gobioninae) 和 鳊 鲂 亚 科 (Acheilognathinae),后者则由 丁 鲃 亚 科 (Tincinae)、鲃 亚 科 (Barbinae)、鲤 亚 科 (Cyprininae) 和 野 鲮 亚 科 (Labeoninae) 组成。在此工作的基础上,CAVENDER 和 COBURN<sup>[30]</sup>对陈湘舜等的工作进行了修正,将鲤科划分为雅罗鱼亚科和鲤亚科两个亚科,前者包括 鲃 群 (Phoxinins)、雅 罗 鱼 群 (Leuciscins)、鲌 群 (Cultrins)、鲮 群 (Xenocyprins)、鳊 鲂 群 (Acheilognathins)、鲃 群 (Gobionins)、波 鱼 群 (Rasborins) 和 丁 鲃 群 (Tincins),后者包括了 鲃 群 (Barbins)、鲤 群 (Cyprinins) 和 野 鲮 群 (Labeonins)<sup>[31-32]</sup>。HOWES<sup>[33]</sup>从形态学上认为鲃系中的分类单元属于一个鲤亚科;ARAI,陈湘舜,CAVENDER 和 COBURN,陈宜瑜则认为鲃系

包含 3 个甚至 4 个亚科,即野鲮亚科、鲃亚科、裂腹鱼亚科和鲤亚科<sup>[31]</sup>。

本研究的系统进化分析结果显示,温州光唇鱼与小口白甲鱼的亲缘关系最近,它们同属于鲃亚科,其与裂腹亚科及鲤亚科亲缘关系较近,聚为一个单系群;而鲌亚科、鲮亚科、雅罗鱼亚科、鲢亚科、鲃亚科、鲃亚科以及鳊鲂亚科等则聚为另一个单系群。这两个单系群与 CAVENDER 和 COBURN<sup>[30]</sup>将鲤科划分为鲤亚科和雅罗鱼亚科两个亚科的结果一致,同时,系统进化树结果显示,鲃亚科和裂腹鱼亚科同属于鲃系即鲤亚科。

另外,丁鲃在鲤科中的分类学位置一直是有争议的问题。无论是在形态学研究还是分子生物学的研究中,丁鲃属 (*Tinca*) 在鲤科中的相对位置一直都没有能够很好地得到解决。丁鲃 (*Tinca tinca*) 通常被认为属于雅罗鱼亚科,或者被单独置于丁鲃亚科<sup>[31]</sup>。陈湘舜等认为丁鲃是鲃系中的原始类群,HOWES 则认为丁鲃的系统位置是不确定的,而 CAVENDER 和 COBURN 认为它是雅罗鱼类亚科中最基部的类群;王绪祯<sup>[31]</sup>则认为应该将丁鲃置于一个单独的丁鲃亚科 (Tincinae),而该亚科属于雅罗鱼系,而本研究的鲤科鱼类系统进化树结果显示丁鲃处于雅罗鱼系中,进一步支持了王绪祯等的结果。

本文对温州光唇鱼 mtDNA 全序列的组成和结构等进行预测和分析,以期为今后对光唇鱼属乃至鲤科鱼类的系统发育、种群遗传多样性分析

和种质资源保护提供基础资料。但由于光唇鱼属 mtDNA 数据的缺乏,本属的其他物种尚未测序,因此,本研究并未涉及光唇鱼属的系统分类,随着光唇鱼属各物种 mtDNA 数据的进一步丰富和完善,进而辅助形态学和分类学,为光唇鱼属系统分类提供更多的分子生物学证据。

#### 参考文献:

- [1] CUROLE J P, KOCHER T D. Mitogenomics: digging deeper with complete mitochondrial genomes [J]. Trends in Ecology & Evolution, 1999, 14(10): 394-398.
- [2] CHOMYN A, MARIOTTINI P, CLEETER W J, et al. Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory-chain NADH dehydrogenase [J]. Nature, 1985, 314: 592-597.
- [3] WOLSTENHOLME D R. Animal mitochondrial DNA: structure and evolution [J]. International Review of Cytology, 1992, 141: 173-216.
- [4] BOORE J L, BROWN W M. Big trees from little genomes: mitochondrial gene order as a phylogenetic tool [J]. Current Opinion in Genetics & Development, 1998, 8: 668-674.
- [5] BOORE J L. Animal mitochondrial genomes [J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(8): 1767-1780.
- [6] HELFENBEIN K G, FOURCADE H M, VANJANI R G, et al. The mitochondrial genome of *Paraspadella gotoi* is highly reduced and reveals that chaetognaths are a sister group to protostomes [J]. Proceedings of the national academy of sciences of USA, 2004, 101(29): 10639-10643.
- [7] DELLAPORTA S L, XU A, SAGASSER S, et al. Mitochondrial genome of *Trichoplax adhaerens* supports placozoa as the basal lower metazoan phylum [J]. Proceedings of the national academy of sciences of USA, 2006, 103(23): 8751-8756.
- [8] GRAY M W, BURGER G, LANG B F. Mitochondrial evolution [J]. Science, 1999, 283: 1476-1481.
- [9] 伍献文,曹文宣,易伯鲁,等. 中国鲤科鱼类志[M]. 上海:上海人民出版社,1977:229-598.
- [10] 董聿茂. 浙江动物志(淡水鱼类)[M]. 浙江:浙江科学技术出版社,1991:98-106.
- [11] 张玉明,程顺,姜建湖,等. 养殖光唇鱼生长的初步研究[J]. 上海海洋大学学报,2012,21(4): 542-548.
- [12] 练青平,姚子亮,王雨辰,等. 瓯江光唇鱼的卵巢和卵母细胞发育研究[J]. 上海海洋大学学报,2011,20(3): 374-381.
- [13] 伍锦姑,周志明,刘晨叶,等. 温州光唇鱼形态学研究[J]. 科教文汇,2012(6):63-66.
- [14] 袁乐洋. 中国光唇鱼属鱼类的分类整理[D]. 南昌:南昌大学,2005:1-85.
- [15] EWING B, GREEN P. Basecalling of automated sequencer traces using phred II. Error probabilities [J]. Genome Research, 1998, 8: 186-194.
- [16] EWING B, HILLIER L, WENDL M C, et al. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment [J]. Genome Research, 1998, 8: 175-185.
- [17] ALTSCHUL S F, MADDEN T L, SCHAFFER A A, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [18] LOWE T M, EDDY S R. tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence [J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(5): 955-964.
- [19] BROWN W M. The mitochondrial genome of animals [M]//MACINTYRE R J. Molecular evolution genetics. New York: Plenum Press, 1985: 95-130.
- [20] CLAYTON D A. Replication of animal mitochondrial DNA [J]. Cell, 1982, 28(4): 693-705.
- [21] HARRISON R G. Animal mitochondrial DNA as a genetic marker in population and evolutionary biology [J]. Trends in Ecology & Evolution, 1989, 4(1): 6-11.
- [22] 吕国庆,李思发. 鱼类线粒体 DNA 多态研究和应用进展[J]. 中国水产科学,1998,5(3): 94-103.
- [23] CHANG Y S, HUANG F L, LO T B. The complete nucleotide sequence and gene organization of carp (*Cyprinus carpio*) mitochondrial genome [J]. Journal of Molecular Evolution, 1994, 38: 138-155.
- [24] LIU Y, CUI Z. The complete mitochondrial genome sequence of the cutlassfish *Trichiurus japonicus* (Perciformes: Trichiuridae): genome characterization and phylogenetic considerations [J]. Marine Genomics, 2009, 2(2): 133-142.
- [25] ANDERSON S, BANKIER A T, BARRELL B G, et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome [J]. Nature, 1981, 290: 457-465.
- [26] LEE W J, KOCHER T D. Complete sequence of a sea lamprey (*Petromyzon marinus*) mitochondrial genome: early establishment of the vertebrate genome organization [J]. Genetics, 1995, 139:873-887.
- [27] NOACK K, ZARDOYA R, MEYER A. The complete mitochondrial DNA sequence of the bichir (*Polypterus ornatipinnis*), a basal rayfinned fish: ancient establishment of the consensus vertebrate gene order [J]. Genetics, 1996, 144: 1165-1180.
- [28] KUMAZAWA Y, NISHIDA M. Complete mitochondrial DNA sequences of the green turtle and blue-tailed mole skink: statistical evidence for archosaurian affinity of turtles [J]. Molecular Biology and Evolution, 1999, 16: 784-792.
- [29] 陈湘舜,乐佩琦,林人端. 鲤科的科下分类及其宗系发生关系[J]. 动物分类学报,1984,9(4): 424-440.
- [30] CAVENDER T, COBURN M. Phylogenetic relationships of North American Cyprinidae. In: Mayden R, ed. Systematics Historical Ecology, and North American Freshwater Fishes



- [M]. Stanford: Stanford University Press, 1992:293-327.
- [31] 王绪祯. 东亚鲤科鱼类的分子系统发育研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院, 2005.
- [32] WANG X, LI J, HE S. Molecular evidence for the monophyly of East Asian groups of Cyprinidae (Teleostei: *Cypriniformes*) derived from the nuclear recombination activating gene 2 sequences [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2007, 42: 157-170.
- [33] HOWES C J. Systematics and biogeography: an overview [M]//WINFIELD I J, NELSON J S. *Cyprinid fishes: systematics, biology and exploitation*. London: Chapman and Hall, 1991: 1-33.

## Mitochondrial genome structure of *Acrossocheilus wenchowensis* and phylogenetic analysis

JIA Yong-yi, JIANG Wen-ping, GU Zhi-min

(Key Laboratory of Healthy Freshwater Aquaculture, Ministry of Agriculture, Zhejiang Institute of Freshwater Fisheries, Huzhou 313000, Zhejiang, China)

**Abstract:** The complete mitochondrial genome of *Acrossocheilus wenchowensis* was obtained by PCR based on 8 primers, which were designed on the basis of published fish mitochondrial genome (GenBank accession number: KC\_495074). The complete mitochondrial genome was 16 591 bp in length, including 13 protein-coding genes, 22 transfer RNA genes, 2 ribosomal RNA genes, and a non-coding control region. The organization and location of genes in the mitochondrial genome of *A. wenchowensis* were consistent with *Cyprinidae* fishes published in GenBank. Of 37 genes, 1 protein-coding gene (*ND6*) and 8 tRNA genes (tRNA<sup>Gln</sup>, tRNA<sup>Ala</sup>, tRNA<sup>Asn</sup>, tRNA<sup>Cys</sup>, tRNA<sup>Tyr</sup>, tRNA<sup>Ser(UCN)</sup>, tRNA<sup>Glu</sup> and tRNA<sup>Pro</sup>) were encoded on the L strand, the remainders on the H strand. The nucleotide composition was 30.93% (A), 24.86% (T), 16.41% (G) and 27.81% (C). Most tRNA genes could form typical secondary structures except tRNA<sup>Ser(AGN)</sup>. The *CO I* gene used GTG as an initiation codon, with the remaining 12 using ATG of total 13 protein genes, 10 genes had complete stop codons, and *CO II*, *ND4* and *Cytb* had an incomplete stop codon T. The phylogenetic analysis of *A. wenchowensis* on *Cyprinidae* fishes was made from the level of mitochondrial genome based on amino acids sequence of all protein-coding genes in 18 species of 17 genera, and the complete mitochondrial genome of *A. wenchowensis* will help to provide basic data for the classification of *Acrossocheilus* and *Cyprinidae* fishes.

**Key words:** *Acrossocheilus wenchowensis*; mitochondrial genome; phylogenetics