

文章编号:1000-0615(2009)02-0196-05

濒危鱼类稀有白甲鱼清水江种群 mtDNA D-loop 序列多态性

彭 珊, 代应贵

(贵州大学动物科学学院, 贵州大学特种水产研究所, 贵州 贵阳 550025)

摘要:采用 PCR、克隆结合 DNA 测序技术对分布于贵州清水江的 30 尾稀有白甲鱼个体 mtDNA D-loop 3'端共计 478 bp 的碱基序列进行了测定分析。该序列共发现了 25 个多态位点, 约占其核苷酸总数的 5.23%。其中 23 个为转换位点(A-G, C-T), 2 个为转换与颠换同时存在的位点。30 尾个体分属 18 种单倍型。稀有白甲鱼 mtDNA 核苷酸多样性(π)为 0.010 7, 平均核苷酸差异数(K)为 5.092。单倍型多样性(H)为 0.940, 单倍型间平均遗传距离(P)为 0.014。用单倍型间遗传距离构建的 NJ 系统树由 2 个支系组成。稀有白甲鱼清水江种群 mtDNA D-loop 序列存在着丰富的多态性, 表明该种群具有丰富的遗传多样性。

关键词:稀有白甲鱼; mtDNA; D-loop; 多态性; 遗传多样性

中图分类号:Q 959.4

文献标识码:A

稀有白甲鱼 (*Onychostoma rara*) 属鲤形目 (Cypriniformes) 鲤科 (Cyprinidae) 鲃亚科 (Barbinae) 白甲鱼属 (*Onychostoma*), 分布于我国长江中游沅江水系和西江水系^[1], 为当地的重要野生经济鱼类。近年来, 稀有白甲鱼资源日趋枯竭, 现已被列为濒危鱼类^[2]。

mtDNA D-loop 又称控制区, 位于 tRNA-Pro 和 tRNA-Phe 基因之间, 长度在 1 kb 左右, 是线粒体基因组序列和长度变异最大的区域, 其进化速度是 mtDNA 其他区段的 2~5 倍。D-loop 因具有较高的突变积累而形成多态性, 是进行种内、种群或个体间遗传多样性研究的理想材料, 并在系统发育及遗传多样性研究方面得到了广泛应用。基于分子遗传学的 D-loop 分子标记能够有效地检测到传统形态学所无法辨别的种群水平的分化^[3]。

目前, 有关稀有白甲鱼 mtDNA 控制区 (D-loop) 序列多态性的研究尚未见报道。本文采用 PCR、克隆结合 DNA 测序技术检测稀有白甲鱼清水江种群 mtDNA D-loop 序列多态性, 进行稀有白甲鱼遗传多样性的研究, 以期为其群体遗传多

样性现状的评估和资源保护与利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

稀有白甲鱼实验样品于 2007 年 10 月采自长江水系沅江上游清水江。随机采集了共计 30 尾活鱼个体进行解剖, 各自取肌肉 3~5 g 于无水乙醇中浸泡保存。带回实验室后存放于 -20 °C 冰箱, 供实验备用。

1.2 实验试剂

引物购自上海博彩生物科技有限公司, 分别为 L16521: 5'-tcaccctggctcccaagccag-3'、H427: 5'-tgcataaaagaatgccgcatg-3'。DNA 纯化试剂盒和小剂量抽提质粒试剂盒均购自 BBI 公司, pUCm-T 载体购自上海生工, EcoR I 和 Pst I 内切酶购自大连宝生物, DH5 α 由本室保存。其它试剂均为分析纯。

1.3 方法

总 DNA 的提取 用月桂酸肌氨酸钠/蛋白酶 K 裂解, 常规平衡酚-氯仿抽提法提取基因

收稿日期:2008-04-30 修回日期:2008-10-18

资助项目:国家自然科学基金项目(30760189);贵州省科学技术基金项目[黔科合 J 字(2007)2062];贵州省省长基金项目[黔省专合字(2005)347]

通讯作者:代应贵, E-mail: daiygui@163.com

组 DNA。

PCR 扩增 利用引物 L16521 和 H427^[4] 对 mtDNA D-loop 区约 500 bp 碱基进行扩增。PCR 扩增反应体系为 50 mL, 含有 10 × PCR buffer、dNTPs 200 μmol、引物 10 pmol、*Taq* 酶 2 U、模板约 50 ng。PCR 扩增条件为 95 °C 预变性 5 min; 40 个循环包括: 94 °C 变性 40 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 72 °C 10 min, 10 °C 保存。

PCR 产物纯化与目的片段的克隆测序 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 用 DNA 纯化试剂盒纯化目的片段。将目的片段与 pUCm-T 载体连接, 转化 DH5α, 并进行蓝白斑筛选。挑选白色菌落于含有 Amp 的液体培养基中扩大培养, 用小剂量抽提试剂盒提取质粒 DNA, 并用内切酶 *EcoR* I 和 *Pst* I 对质粒进行双酶切鉴定。将目的片段克隆培养后进行测序。DNA 测序由上海博彩生物科技有限公司完成。

序列分析 采用 Clustal X(1.83) 软件对所测的稀有白甲鱼 mtDNA D-loop 序列进行比较分析。用 MEGA 3.1 软件中的 Kimura 双参数法计算单倍型之间的遗传距离, 并构建系统树。采用 DNASP 3.14 软件计算遗传多样性参数。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增和质粒双酶切鉴定

稀有白甲鱼 mtDNA D-loop PCR 扩增产物的电泳检测结果表明, 扩增得到的目的 DNA 片段长度约 500 bp, 形成的电泳条带单一, 未发现非特异性条带, 空白对照组未出现扩增产物, 实验结果重复性好, 可以排除外源 DNA 污染及核 DNA 拷贝的可能性。

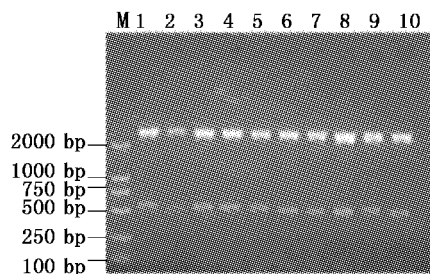


图1 质粒 *EcoR* I / *Pst* I 双酶切产物

M: DL2000 Marker; 1 ~ 10: 质粒酶切产物

Fig. 1 The *EcoR* I / *Pst* I double enzyme-digest products of plasmid

M: DL2000 Marker; 1 ~ 10: double enzyme-digest products of plasmid

重组质粒经 *Pst* I 和 *EcoR* I 双酶切产物凝胶电泳结果(图 1)显示, 质粒经双酶切后得到一条 500 bp 左右的片段, 与预计结果一致。表明此质粒载体中连入的外源片段即为目的片段, 即该克隆为目的克隆。

2.2 稀有白甲鱼 mtDNA D-loop 序列多态性及核苷酸变异频率

实验扩增并测定了共计 30 尾稀有白甲鱼个体中 mtDNA D-loop 区 3' 端的 HVS I 的 478 bp (除去引物及部分尾部序列) 的碱基序列。该扩增序列碱基含量分别为 A 34.9% (34.6% ~ 35.12%), T 31.2% (30.5% ~ 31.6%), C 20.5% (20.1% ~ 21.1%), G 13.4% (13.2% ~ 13.8%)。AT 含量 (66.1%) 高于 GC 含量 (33.9%)。可见, 稀有白甲鱼 mtDNA D-loop 中碱基 A 的含量最高, 碱基 G 的含量最低, 与脊椎动物 mtDNA 碱基组成一致^[5]。该扩增序列共检测到 25 个变异位点, 约占核苷酸总数的 5.23%。其中 23 个为转换位点 (A-G、C-T), 2 个为转换与颠换同时存在的位点 (位点 307、414) (图 2)。30 尾稀有白甲鱼个体分属 18 种单倍型 (表 1)。

```
[
    111112 2223333333 44444]
[
    4799347862 3690001344 01146]
[
    8612440689 1875792556 94725]
#Sinp14 TTCTTTATTC GTTCCAGGCT ATATG
#Sinp15 .....T .....
#Sinp13 ..... .A...
#Sinp12 ..... .C.T...A..
#Sinp11 ..... .CCT.....
#Sinp9 ..TC..... .CCTA.... .GC.
#Sinp10 ..TC..... .C.TT...A.. .C.C.
#Sinp7 .CTC.C.... .CCTT.... .CA
#Sinp8 ..TC.C.... .CCTT.... .CA
#Sinp6 .CTC.C.... .CCTT.... .A.C.
#Sinp5 .CTC.C.... .CCTT....
#Sinp1 ..TC...C.. .CCTT....
#Sinp2 ..TC..... .CCTT....
#Sinp3 ..TC..G... .CCTT.... GA...
#Sinp4 ..TC..G... .CCTT....
#Sinp17 ...C....C. .CCT.GA.TC ...C.
#Sinp18 C..C..... .CCT.GA.TC
#Sinp16 ...CC..... ACCT....T. ....
```

图2 稀有白甲鱼 mtDNA D-loop 序列变异位点
Fig. 2 The variable sites of mtDNA D-loop in the 30 individuals of *Onychostoma rara*

2.3 稀有白甲鱼 mtDNA D-loop 遗传多样性及 NJ 系统树

表 2 表明, 稀有白甲鱼 mtDNA 单倍型多样性 (H) 为 0.940, 核苷酸多样性 (π) 为 0.010 7, 平均核苷酸差异数 (K) 为 5.092。

表 1 稀有白甲鱼 mtDNA 单倍型

Tab. 1 mtDNA haplotypes of *Onychostoma rara*

单倍型 haplotypes	个体编号 no. of individuals
Sinp1	16
Sinp2	2,4,5,7,15,28
Sinp3	10
Sinp4	9,20,22,31
Sinp5	8,32,33
Sinp6	19
Sinp7	21
Sinp8	29
Sinp9	23
Sinp10	13,30
Sinp11	1
Sinp12	27
Sinp13	12
Sinp14	11,25
Sinp15	6
Sinp16	18
Sinp17	14
Sinp18	17

表 2 稀有白甲鱼 mtDNA 多样性

Tab. 2 mtDNA diversity of *Onychostoma rara*

mtDNA 多样性 mtDNA diversity	数值 value
多态性位点数 (polymorphism sites)	25
单倍型数 (number of haplotypes)	18
单倍型多样性 (haplotype diversity, H)	0.940
核苷酸多样性 (nucleotide diversity, π)	0.0107
平均核苷酸差异数 (average number of nucleotide differences, K)	5.092

稀有白甲鱼 mtDNA 单倍型间最大遗传距离为 0.024、最小为 0.002, 平均遗传距离 (P) 为 0.014。以长臀鲃 (*Mystacoleucus marginatus*) 的同源序列 (GeneBank 登录号: AF498825) 为外群, 用单倍型间遗传距离构建的稀有白甲鱼清水江种群 NJ 系统树由 2 个支系组成 (图 3)。其中一个支系包含 10 种单倍型, 代表 21 个个体。另一支系包含 8 种单倍型, 代表 9 个个体。

3 讨论

3.1 稀有白甲鱼 mtDNA D-loop 克隆测序的必要性 实验中, 所用引物的扩增片段为约 500 bp 的碱基序列, 是始自 D-loop 区 3' 端的 HVSI (hypervariable segment I sequences), 并与预计的扩增片段长度一致。可见, 该引物不仅可扩增长

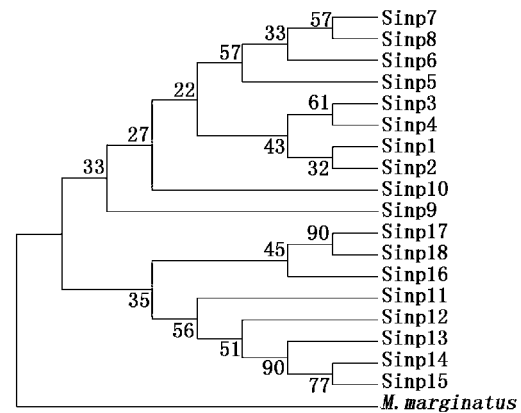


图 3 稀有白甲鱼 mtDNA 单倍型 NJ 分子系统树

树枝处的数字为 Bootstrap 值, 重复次数为 1000 次, 字母代码表示不同的单倍型

Fig. 3 The NJ phylogenetic tree of mtDNA haplotypes of *Onychostoma rara*

The numbers above each branch indicate the statistical support obtained from 1000 bootstrap replicates. Sinps 1 - 18 represent haplotypes

臀鲃 mtDNA D-loop 区序列^[4], 还可以用于稀有白甲鱼 mtDNA D-loop 序列的扩增。由于 PCR 产物只有 500 bp 左右, 直接用 PCR 产物进行测序, 一方面, 容易出现双峰现象影响测序的准确性。另一方面, 由于测序开始时信号较弱, 如利用 PCR 产物直接测序则使可测定的有效序列长度缩短。因此, 本实验未采用大多数人所采用的直接测序的方法^[5-10], 而是经过克隆后进行测序, 以确保所测目的片段序列的准确性和完整性。

对克隆产物进行鉴定时, 有许多不同的鉴定方法, 如: 菌落 PCR^[11]、质粒 PCR^[12]、质粒酶切^[13] 或几种鉴定方法结合使用^[14] 等。在本实验中, 通过重组质粒上的 *Pst* I 和 *Eco*R I 酶切位点将目的片段切出并进行鉴定, 克服了 PCR 鉴定时出现的假阳性现象, 而且操作简单, 无需再进行 PCR 检验。

3.2 稀有白甲鱼遗传多样性

采用 mtDNA 技术来研究物种的多样性时, 通常用两个指标来衡量一个群体 mtDNA 的变异程度^[15]。一是单倍型间的平均遗传距离 (P)。对于大多数哺乳动物的 P 值都在 0.01 以上, 被认为变异较大^[16]。本实验所研究的稀有白甲鱼单倍型间的平均遗传距离为 0.014, 说明稀有白甲鱼 mtDNA 变异较大, 遗传多样性较高。另一个指标是核苷酸多样性 (π)。核苷酸多样性 (π) 是

指群体内任意两个个体 mtDNA 序列每个位点的平均核苷酸差异数。 π 值越小,群体间的多态程度越低。由于 π 值考虑了各种 mtDNA 单倍型在群体中所占的比例,因而在衡量一个群体的 mtDNA 多态程度时,比单纯的平均遗传距离(P)要准确, π 值较高则说明群体的遗传多样性较高。本研究中,稀有白甲鱼 mtDNA 核苷酸多样性为 0.010 7,比同分布于高原地区的云南倒刺鲃(*Spinibarbus denticulatus yunnanensis*)(0.001 35)^[17]、青海湖裸鲤(*Gymnocypris przewalskii przewalskii*)(0.004 3)^[18]高,同时也高于分布于长江中下游的鳊(*Aristichthys nobilis*)(0.008)、草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)(0.002)^[19]。在检测的 30 尾稀有白甲鱼个体中,发现了 25 个变异位点和 18 种单倍型,单倍型多样性(H)高达 0.940。由此表明,目前清水江稀有白甲鱼种群 mtDNA D-loop 序列存在着丰富的多样性。这从一个侧面说明了濒危鱼类稀有白甲鱼现存种群丰富的遗传多样性。

3.3 稀有白甲鱼遗传多样性与资源保护

稀有白甲鱼为名优野生经济鱼类,分布区域较为狭窄。近年来,由于栖息地破坏、水域污染、生境退化和过度捕捞,稀有白甲鱼野生资源已濒临枯竭,现已被列为濒危鱼类。到目前为止,稀有白甲鱼尚未被驯养为人工养殖品种。因此,大力开展稀有白甲鱼资源的保护和恢复显得刻不容缓。

一个物种的遗传多样性高低与其适应能力、生存能力和进化潜力密切相关。物种的遗传多样性越丰富,其适应能力、生存能力和进化潜力就越大,或者说遗传多样性为物种的适应能力、生存能力和进化潜力提供了潜在的遗传基础和储备。反之,遗传多样性的降低可导致其适应能力、生存能力降低,物种退化甚至威胁物种生存^[20]。清水江稀有白甲鱼种群丰富的遗传多样性,从遗传多样性角度揭示了保护和恢复稀有白甲鱼这一濒危物种具有较好的前景。

mtDNA 的母性遗传和种内多态性为追踪种内母系演化提供了良机,因此可以利用 mtDNA 的种内多态性研究母系演化^[21]。由本研究中稀有白甲鱼 18 种单倍型构建的 NJ 系统树可知,检测的 30 尾稀有白甲鱼个体可分为 2 个支系。由此,可以推测这 30 尾个体来自 2 个母系或不同繁

殖群体。这表明了清水江稀有白甲鱼种群组成、来源和分化的多样性。可见,保护和恢复清水江稀有白甲鱼种群对于保护这一濒危物种具有极其重要的意义。

感谢中国水产科学研究院淡水渔业研究中心生物技术室杨弘课题组全体人员在实验期间给予的帮助。

参考文献:

- [1] 单向红,林人端,乐佩琦,等.白甲鱼属[M]//乐佩琦.中国动物志,硬骨鱼纲,鲤形目(下卷).北京:科学出版社,2000:126-147.
- [2] 汪松,解焱.中国物种红色名录(第一卷):红色名录[M].北京:高等教育出版社,2004:160.
- [3] 汪泰初,刘朝良,肖林珍.线粒体基因组(mtDNA)的研究进展[J].安徽农业科学,2006,34(10):2068-2071.
- [4] Kong Q P, Yao Y G, Huang S Y. Mitochondrial DNA control region and cytochrome *b* sequence variation in the genus *Mystacoleucus* Ünther (Pisces: Cyprinidae:Barbinae) from China[J]. Biochemical Genetics,2003,41(9):305-313.
- [5] Broughton R E, Roe B A. The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA [J]. Genome Res,2001,11(11):1958-1967.
- [6] 方耀林,张燕,杨焱清,等.大鲵遗传多样性分析[J].淡水渔业,2006,6(36):8-11.
- [7] 王伟伟,赵金良,李思发,等.我国斑鳊六个群体 mtDNA *Cyt b* 序列的遗传变异[J].动物学研究,2006,27(6):589-593.
- [8] 郑冰溶,张亚平,肖春杰,等.洱海鲤属鱼类同域分化形成的分子遗传学证据[J].遗传学报,2004,31(9):976-982.
- [9] 赵金良,李思发,蔡完其,等.长江水系不同水体鳊 mtDNA 控制区序列的遗传分析[J].湖泊科学,2007,19(1):92-97.
- [10] 丁言伟,彭作刚,张训蒲,等.黄颡鱼属两种鱼类的线粒体 ND4 基因序列变异性分析[J].水生生物学报,2006,30(4):413-419.
- [11] 毛伟华.菌落 PCR 产物直接测序方法的建立及在水稻基因测序中的应用[J].中国水稻科学,2005,19(5):463-466.
- [12] 周慧,李迪强,张于光,等.藏羚羊 mtDNA D-loop 区遗传多样性研究[J].遗传,2006,28(3):

- 299-305.
- [13] 李瑞国,安晓荣,苟克勉,等. 提高 PCR 产物 T-A 克隆效率的研究[J]. 农业生物技术学报,2003,11(2):158-162.
- [14] 邵爱华,朱江,陈葵,等. 暗纹东方鲀线粒体 CO II 及两侧 tRNA 基因的克隆和序列分析[J]. 动物学杂志,2005,40(6):1-8.
- [15] Neigel J E, Avise J C. Application of random walk model to geographic distributions of animal mitochondrial DNA variation [J]. Genetics, 1993, 135(4):1209-1220.
- [16] Lan H, Shi L M. The origin and genetic differentiation of native breeds of pigs in south west China: An approach from mitochondrial DNA polymorphism [J]. Biochemical Genetics, 1993, 31: 51-60.
- [17] 郑冰蓉,张亚平,肖衡,等. 云南倒刺鲃 mtDNA D-loop 区序列的遗传多样性研究[J]. 水利渔业, 2002,22(3):15-16.
- [18] 赵凯,李军祥,张亚平,等. 青海湖裸鲤 mtDNA 遗传多样性的初步研究[J]. 遗传,2001,23(5): 445-448.
- [19] 李思发,吕国庆,贝纳切兹 L. 长江中下游鲢鳙青草四大家鱼 mtDNA 多样性分析[J]. 动物学报, 1998,44(1):82-93.
- [20] 季维智,宿兵. 遗传多样性研究的原理与方法 [M]. 杭州:浙江科学技术出版社,1999.
- [21] 王静波,胡长龙,徐宏发. mtDNA 多态性在动物保护生物学中的应用[J]. 生物多样性,2001,9(2): 181-187.

Sequence polymorphism of mtDNA D-loop in the population of the endangered species *Onychostoma rara* from the Qingshui River

PENG Shan, DAI Ying-gui

(College of Animal Sciences, Institute of Special Aquaculture, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: The species *Onychostoma rara*, belonging to Cyprinidae, Cypriniformes, is endemic to China and distributed only in the Yuanjiang River and the Xijiang River systems. The species has been listed as the endangered one now. To evaluate the present state of genetic diversity of *Onychostoma rara*, the sequence polymorphism of mtDNA D-loop of the species is studied for the first time on the basis of determination of the 478 bp sequences from 3' end of mtDNA D-loop in the 30 individuals of the species collected from the Qingshui River in Guizhou in October, 2007, by the methods of PCR, clone and DNA sequencing. A total of 25 variable sites (about 5.23% of the total nucleotides in the sequence), including 23 transitions and 2 transitions with transversion, are detected in mtDNA D-loop of the species. The 30 individuals belong to 18 haplotypes respectively according to the determined sequences. The nucleotide diversity (π) of the 30 individuals is 0.0107, and the average number of nucleotide differences (K) of them is 5.092. The haplotypic diversity (H) is 0.940, and the average genetic distance (P) between the haplotypes of the species is 0.014. The NJ phylogenetic tree of the 18 haplotypes comprises 2 branches. The population of *Onychostoma rara* in the Qingshui River includes abundant polymorphism in mtDNA D-loop sequence and high genetic diversity. The protection of population of *Onychostoma rara* from the Qingshui River is very necessary for the conservation and recovery of the species.

Key words: *Onychostoma rara*; mtDNA; D-loop; polymorphism; genetic diversity