

文章编号:1000-0615(2009)02-0201-07

两种黄盖鲈线粒体 DNA 部分片段比较分析

张 岩^{1,2}, 肖永双¹, 高天翔¹, 于 函³

(1. 中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003;

2. 中国水产科学研究院黄海水产研究所, 山东 青岛 266071;

3. 辽宁师范大学生命科学学院, 辽宁 大连 116029)

摘要:比较分析了钝吻黄盖鲈和尖吻黄盖鲈线粒体基因组 *COI*、*Cyt b* 基因以及 D-loop 片段总长度为 1 373 bp 的核苷酸序列, 两种间共检测到 107 处核苷酸替换, 蛋白质编码基因上的核苷酸替代主要是第三密码子位点上的同义替换。核苷酸组成分析结果表明: 3 个目的片段的鸟嘌呤(G)含量普遍较低, 在两个蛋白编码基因第三密码子位点上表现得尤为明显。两种黄盖鲈在线粒体基因组不同片段上存在明显的遗传分化, 核苷酸替代速率最快的是 D-loop, *COI* 和 *Cyt b* 核苷酸替代速率基本一致。建议在进行黄盖鲈属鱼类分子系统发育研究时, 应该针对不同研究目的选择合适的分子标记。基于 *Cyt b* 基因片段序列的分析结果表明: 钝吻黄盖鲈和尖吻黄盖鲈两种的分歧时间约为 200 万年, 两种间的分化事件发生在更新世(Pleistocene)。

关键词:钝吻黄盖鲈; 尖吻黄盖鲈; 线粒体 DNA; 核苷酸组成; 分歧时间

中图分类号:Q 579.1; S 917

文献标识码:A

钝吻黄盖鲈(*Pleuronectes yokohama*)和尖吻黄盖鲈(*P. herzensteini*)隶属于鲈形目(Pleuronectiformes)、鲈科(Pleuronectidae)、黄盖鲈属(*Pleuronectes*)^[1], 为北温带浅海底层鱼类。钝吻黄盖鲈是我国海洋渔业重要的经济鱼种, 产量在黄渤海鲈类中仅次于高眼鲈(*Protopsetta herzensteini*)^[1-2], 主要分布在北太平洋西部近海, 东海北部到黄渤海, 北达朝鲜半岛、鞑靼海峡及北海道南部^[1]。尖吻黄盖鲈主要分布在浙江省南部至辽宁等海区, 北达朝鲜半岛、日本及俄罗斯库页岛、千岛等^[1], 在我国鲜见。国内学者关于这两种黄盖鲈的研究主要集中在生物学、生态学等方面的研究^[1, 3-4], 尚未见遗传学研究报告。

分子遗传学结果为理解海洋鱼类的群体遗传结构和进化关系提供了有力的证据^[5]。动物线粒体 DNA(mtDNA)具有单一母性遗传、几乎没有重组、进化速率快等特点, 已被广泛地应用于动物种群遗传学和分子系统发育研究^[6-8]。本研究测定了钝吻黄盖鲈和尖吻黄盖鲈线粒体基因组

COI、*Cyt b* 基因和 D-loop 部分序列, 分析比较了两种黄盖鲈在线粒体基因组不同片段上的遗传分化程度, 探讨了两种间的亲缘关系和分化年代。同时比较了线粒体基因组不同片段上核苷酸替代速率的差异, 为鲈形目鱼类分子系统发育及其种群遗传学研究提供基础材料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

7 尾钝吻黄盖鲈样品于 2006 年 3 月采自蓬莱近海; 7 尾尖吻黄盖鲈样品于 2006 年 10 月采自日本函馆近海。取肌肉样品冷冻或 95% 乙醇固定, 保存备用。

1.2 实验方法

基因组 DNA 提取 取两种黄盖鲈样品肌肉组织各约 100 mg, 采用标准的酚-氯仿方法^[9]提取基因组 DNA, 将乙醇沉淀后的基因组 DNA 溶解于 100 μ L TE 溶液, 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

基因组片段的 PCR 扩增、纯化 用于扩增

收稿日期:2008-08-08 修回日期:2008-09-28

资助项目:国家“八六三”高技术研究发展计划(2006AA09Z418);国家重点基础研究发展计划(2005CB422306);农业部海洋渔业资源可持续利用重点实验室开放课题(实开 2005-07)

通讯作者:高天翔, E-mail: gaozhang@ouc.edu.cn

线粒体 DNA 的 *COI*、*Cyt b* 基因以及 D-loop 片段的引物分别为, *COI*: L5956-*COI* (5'-CACAAAGA CATTGGCACCT-3') 和 H6558-*COI* (5'-CCTCC TGCAGGGTCAAAG AA-3'), *Cyt b*: L14734-Glu (5'-AACCACCGTTGTTATTCAACT-3') 和 H15149-*Cyt b* (5'-CTCAGAATGACATTTGTCCTCA-3'); D-loop: DL-S (5'-TCAAAGCTTACAGTCTT GTA -3') 和 DL-R (5'-TGGTGGTTGCTCCCGCT TATG-3')^[10-11]。PCR 反应体系总体积为 50 μL , 其中: 10 \times PCR 缓冲液 (200 mmol/L Tris-HCl, pH 8.4; 200 mmol/L KCl; 100 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 15 mmol/L MgCl_2) 5 μL , dNTP 200 $\mu\text{mol/L}$, 引物各 0.2 $\mu\text{mol/L}$, *Taq* 酶 1.25 U (大连宝生物公司), 模板 DNA 20 ng, 加 Milli-Q H_2O 至 50 μL 。PCR 在 Biometra 热循环仪上进行, 反应条件为: 94 $^\circ\text{C}$ 预变性 3 min, 94 $^\circ\text{C}$ 变性 1 min, 50 $^\circ\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; 72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。以上反应均设阴性对照以排除 DNA 污染的情况。取 2 μL PCR 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 ($U = 5 \text{ V/cm}$)。

目的片段的序列测定 用 UNIQ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒 (上海华舜) 进行目的片段的回收纯化。用 ABI 公司 3700 型全自动 DNA 序

列分析仪进行双向测序, 测序反应采用与 PCR 反应一致的引物。

序列分析 用 DNASTar 软件 (DNASTAR, Inc) 对所得序列进行编辑和排序比对。用 PAUP*^[12] 和 Modeltest 2.0^[13] 得到 3 个目的片段核苷酸最佳替换模型。基于核苷酸最适模型, 用 MEGA 2.0^[14] 软件将蛋白质编码基因核苷酸序列的密码子转化为氨基酸, 分析线粒体基因组不同片段的核苷酸组成并计算种间遗传距离, 钝吻黄盖鲈和尖吻黄盖鲈间的 DNA 多态用软件 ARLEQUIN version 2.000^[15] 进行分析。

2 结果与分析

2.1 核苷酸组成分析

钝吻黄盖鲈和尖吻黄盖鲈的样品经 PCR 扩增得到相对应的 3 个目的片段, 经过序列比对分析得到同源片段序列长度分别为 *COI* (620 bp) (图 1)、*Cyt b* (353 bp) 和 D-loop (400 bp) (表 1)。钝吻黄盖鲈在 *COI* 片段上检测到了 7 个多态位点, 在 D-loop 片段上检测到了 15 个多态位点; 尖吻黄盖鲈在 *COI* 片段上检测到了 8 个多态位点, 在 D-loop 片段上检测到了 62 个多态位点, 在 *Cyt b* 片段上两种均未检测到种内多态。

表 1 基因片段序列多态及核苷酸替代模型参数

Tab. 1 Sequence variability and nucleotide substitution model for each data partition

基因 gene	片段长度 (bp) aligned length	插入\缺失位点 gapped sites	信息简约位点 parsimony informative sites	多态位点 variable sites	核苷酸替代模型 best model	不变位点比例 (%) invariable sites	gamma 值
<i>COI</i>	620	0	19	27	TrN	0	equal rates
<i>Cyt b</i>	353	0	15	15	HKY	0	equal rates
D-loop	400	2	50	62	HKY + G	0.66	0.94

核苷酸组成分析结果表明: 钝吻黄盖鲈和尖吻黄盖鲈在这 3 个目的片段上的鸟嘌呤 (G) 含量均比较低 (<19%), 其中最低的为钝吻黄盖鲈的 D-loop 片段 (15.6%), G 含量在 *COI* 和 *Cyt b* 这两个蛋白质编码基因的第三密码子位点上的含量更低 (<12%), 其中以尖吻黄盖鲈 *Cyt b* 基因片段第三密码子位点上的 G 含量最低 (6.0%)。钝吻黄盖鲈和尖吻黄盖鲈 D-loop 片段中 G + C 的含量分别为 35.8% 和 37.1% (图 2)。

2.2 钝吻黄盖鲈和尖吻黄盖鲈的遗传分化

钝吻黄盖鲈和尖吻黄盖鲈两种间在这 3 个目的片段的核苷酸序列和相对应的蛋白质编码基因

的氨基酸序列上存在不同程度的遗传分化。在 620 bp 的 *COI* 基因片段上, 两种间检测到 27 个多态位点, 共定义了 5 种单倍型, 27 个核苷酸替代 (nucleotide substitution) 中出现 4 个颠换 (transversion)、23 个转换 (transition), 转换颠换比 (Ts/Tv) 为 6.75, 两种间的遗传距离为 0.024。在 353 bp 的 *Cyt b* 基因片段上, 检测到 15 个多态位点, 定义了 2 种单倍型, 15 个核苷酸替代包含了 3 个颠换和 12 个转换, 转换颠换比 (Ts/Tv) 为 4, 种间遗传距离为 0.04。在 D-loop 的 400 bp 的核苷酸序列上, 共检测到了 62 个多态位点, 2 处核苷酸插入/缺失, 定义了 14 种单倍型, 65 个

序列分化趋势来看, D-loop(0.13) > Cyt *b*(0.04) > COI(0.024)。

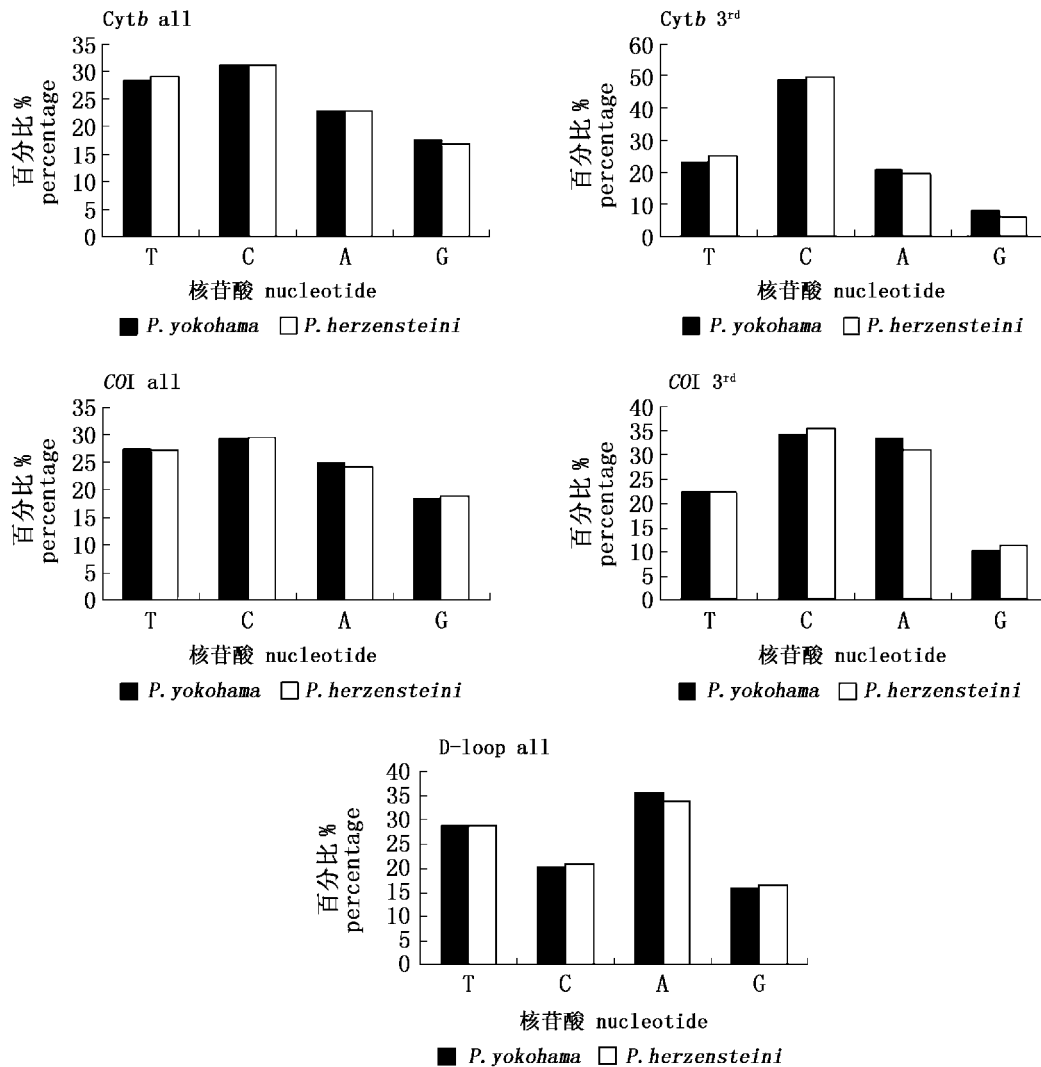


图2 钝吻黄盖鲈和尖吻黄盖鲈3个片段核苷酸组成

all, 整个片段; 3rd, 蛋白质编码基因第三密码子位点

Fig. 2 Nucleotide compositions of three partial fragments of *P. yokohama* and *P. herzensteini*

all means the partial fragment, 3rd means the third codon of the gene

根据核苷酸替代速率公式 $R = K/2T$, K 代表每个位点的核苷酸替代数, T 代表两基因的分歧时间, 在分歧时间一定的条件下, 核苷酸替代速率与 K 成正比。钝吻黄盖鲈和尖吻黄盖鲈在 D-loop 片段的替代速率最快 ($K = 0.16$), 在 COI 和 Cyt *b* 两基因片段上的替代速率趋向一致 ($K = 0.043$), 两种黄盖鲈间的核苷酸替代速率与蛋白质编码基因的氨基酸序列分化趋势一致。不同基因间核苷酸替代速率的差异不是由于基因本身的差异引起的, 而可能是由于不同进化世系间的差

异引起的^[16], 这与钝吻黄盖鲈和尖吻黄盖鲈相似的进化过程是一致的^[1]。

分子钟假说认为: 某一特定的大分子在所有的世系 (lineage) 中, 核苷酸替代速率在时间上是稳定的。脊椎动物的基因序列可作为分子钟推测物种间的分歧时间^[17-18]。将这一核苷酸分歧速率应用于钝吻黄盖鲈和尖吻黄盖鲈 Cyt *b* 基因片段上 (2%/百万年), 钝吻黄盖鲈和尖吻黄盖鲈的分歧时间约为 200 万年。两种间的分化事件发生在更新世 (Pleistocene)。

P.herz1	WHLVLFQAW	AGMUGTGLSL	LIRAELSQPG	ALLGDDQIYN	UIUTAHAFUM	IFFMUMPIMI	GGFGNW	[66]
P.herz2	[66]
P.herz3	[66]
P.yoho1	[66]
P.yoho2	[66]
P.herz1	LIPLMIGAPD	MAFPRMNMS	FWLLPPSFL	LLASSGUEAG	AGTGWTUYP	LAGNLAHAGA	SUDLTI	[132]
P.herz2	[132]
P.herz3	[132]
P.yoho1	[132]
P.yoho2	[132]
P.herz1	FSLHLAGISS	ILGAINFIT	IINMKPTAUT	MVQIPLFUWA	ULITAUULLL	SLPULAAGIT	MMLTDR	[198]
P.herz2L....	[198]
P.herz3L....	[198]
P.yoho1L....	[198]
P.yoho2L....	[198]
P.herz1	NLNTTFFD							[206]
P.herz2							[206]
P.herz3							[206]
P.yoho1							[206]
P.yoho2							[206]

图 3 钝吻黄盖鲈和尖吻黄盖鲈 COI 基因的氨基酸序列比对

Fig.3 Amino acid sequences alignment of COI gene for *P. yokohama* and *P. herzensteini*

3 讨论

4 种核苷酸在线粒体基因组中分布不均一是动物线粒体基因组的共性^[8]。本研究中所用 COI、Cyt *b* 基因以及 D-loop 片段核苷酸组成中的 G 含量普遍比较低 (<19%)。COI 和 Cyt *b* 这两个蛋白质编码基因第三密码子位点的核苷酸组成结果显示,鸟嘌呤含量在第三密码子位点上更低 (<12%)。Meyer^[19]认为,蛋白质编码基因密码子第三位点上核苷酸的突变受到自然选择压力小,所以密码子第三位点能够清晰的表明线粒体基因组核苷酸组成的不均一性。本研究中 COI 和 Cyt *b* 基因片段第三密码子核苷酸组成结果与此一致,同时 D-loop 片段中 G 含量也出现偏低现象,在其他鱼类中,COI 和 Cyt *b* 基因片段核苷酸组成分析的结果也显示 G 含量普遍较低,这一点在密码子第三位上尤为明显^[16, 20],与本研究的结果一致。

Meyer^[19]认为,密码子第三位点上的突变很少导致氨基酸替代,并且比导致氨基酸替代的突变积累的快。最常见的突变是密码子第三位点上的转换,其次是密码子第三位点上的颠换和第一密码子位点上的无义转换。COI 和 Cyt *b* 基因片段的研究结果与此一致,在其他鱼类如圆斑星鲈 (*Verasper variegates*)、条斑星鲈 (*V. moseri*)^[16] 和斑马鱼 (*Danio rerio*)^[20] 等也获得了类似结果。钝吻黄盖鲈和尖吻黄盖鲈在长度为 973 bp 的两个蛋白质编码基因片段中共检测到了 42 个多态位点,其中 7 处为颠换,35 处为转换。密码子在第一

三位点上的转换为 32 处,颠换 6 处;密码子在第一一位点上的转换为 3 处,颠换为 1 处;在受到功能限制最强的第二密码子位点上未检测到核苷酸突变。Sbisà^[21]认为 D-loop 区缺乏编码选择压力而比其他线粒体基因的进化速率更快,在钝吻黄盖鲈和尖吻黄盖鲈 D-loop 片段中检测到了丰富的遗传多态,共检测到了 62 个多态位点,65 处核苷酸替换,定义了 14 个单倍型,与 Sbisà 的结果一致。在氨基酸水平上,两种蛋白质编码基因核苷酸序列上的遗传变异比氨基酸序列上的遗传变异高得多,虽然钝吻黄盖鲈和尖吻黄盖鲈在 Cyt *b* 基因片段的核苷酸序列遗传距离达到 0.04,但是在氨基酸序列上两种间没有检测到遗传分化,表明这两种间的亲缘关系很近。

钝吻黄盖鲈和尖吻黄盖鲈在核苷酸序列和氨基酸序列上均存在不同程度的遗传分化。两种间在 D-loop 片段上的遗传距离最大(0.13),其次为 Cyt *b* 基因片段(0.04),在 COI 基因片段上的遗传距离最小(0.024)。本研究结果显示,核苷酸替代速率最快的是 D-loop,根据核苷酸替代公式和氨基酸序列遗传变异程度表明:COI 与 Cyt *b* 核苷酸替代速率基本一致。D-loop 具有较快的核苷酸替代速率,适合于种内种群或个体间的遗传分化研究,且得到了广泛的应用,在黄尾金枪鱼 (*Thunnus albacares*) 和鲣 (*Katsuwonus pelamis*)^[22]、短颌鲚 (*Coilia brachygnathus*) 和湖鲚 (*C. nasus taihuensis*)^[23] 等鱼类中均有报道^[24]。COI 和 Cyt *b* 基因比较保守,适合于种以上水平系统进化分

析^[25-26]。

物种的形成过程主要发生在上新世和更新世^[27]。目前很多研究者将 2%/百万年的核苷酸分析速率应用于 Cyt *b* 基因片段来推算硬骨鱼的分化时间^[27]。基于这一标准,我们推算钝吻黄盖鲈和尖吻黄盖鲈的分歧时间约为 200 万年。两种间的分化事件发生在更新世 (Pleistocene), 其种内遗传分化尚有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 李思忠,王惠民. 中国动物志·硬骨鱼纲·鲈形目[M]. 北京:科学出版社,1995:241-246.
- [2] 宋宗诚,林占德,陈四清,等. 钝吻黄盖鲈的工厂化人工育苗[J]. 渔业现代化,2003, 2: 19-20.
- [3] Dou S Z. Food utilization of adult flatfishes cooccurring in the Bohai Sea of China[J]. Neth J Sea Res, 1995, 34(1-3): 183-193.
- [4] Dou S Z. Life history cycles of flatfishes in the Bohai sea, China [J]. Neth J Sea Res, 1995, 34(1-3): 195-210.
- [5] Ferraris J D, Palumbi S R. Molecular zoology: Advance, Strategies, and Protocols [C]. New York: Wiley-Liss, 1996:580.
- [6] 肖武汉, 张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与分化[J]. 水生生物学报, 2000, 24(4): 384-391.
- [7] Avise J C. Phylogeography [M]. London: Harvard University Press, 2000:1-36.
- [8] Brown W M. Evolution of Genes and Proteins [M]. Sunderland: Sinauer, 1983:62-88.
- [9] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, et al. Molecular Cloning: A laboratory manual[M]. New York: Cold spring harbor laboratory press, 1996: 464-468.
- [10] Inoue J G, Miya M, Tsukamoto K, et al. A mitogenomic perspective on the basal teleostean phylogeny: resolving higher-level relationships with longer DNA sequences [J]. Mol Phylogenet Evol, 2001, 20: 275-285.
- [11] Liu J X, Gao T X, Zhuang Z M, et al. Later Pleistocene divergence and subsequent population expansion of two closely related fish species, Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) and Australian anchovy (*Engraulis australis*) [J]. Mol Phylogenet Evol, 2006, 40: 712-723.
- [12] Swofford D L. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods), version 4 [M]. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 2002.
- [13] Posada D, Crandall K A. Modeltest: testing the model of DNA substitution [J]. Bioinformatics, 1998, 14: 817-818.
- [14] Kumar S, Tamura K, Jakobsen I B, et al. MEGA2: Molecular evolutionary genetics analysis software [J]. Bioinformatics, 2001, 17: 1244-1245.
- [15] Schneider S, Roessli D, Excoffier L. ARLEQUIN version 2.000: A software for population genetic data analysis[M]. Geneva: University of Geneva, 2000.
- [16] 高天翔,陈四清,刘进贤,等. 圆斑星鲈与条斑星鲈线粒体 DNA 部分片段的序列比较研究 [J]. 高技术通讯, 2004, 14: 329-334.
- [17] Bermingham E, McCafferty S S, Martin A P. Molecular systematics of fishes [M]. San Diego: Academic Press, 1997:113-128.
- [18] Bowen B W, Bass A L, Rocha L A, et al. Phylogeography of the trumpetfishes (*Aulostomus*): ring species complex on a global scale [J]. Evolution, 2001, 55(5): 1029-1039.
- [19] Meyer A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes[M]. Amsterdam: Elsevier Press, 1993:1-36.
- [20] 项方,邹记兴,邓凤娇,等. 用细胞色素 *b* 部分序列研究斑马鱼的分子分类与系统发育 [J]. 动物学杂志, 2004, 39(5): 13-18.
- [21] Sbisà E, Tanzariello F, Reyes A, et al. Mammalian mitochondrial D-loop region structure analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications [J]. Gene, 1997, 205: 125-140.
- [22] Ely B, Vinas J, Bremer J R A, et al. Consequences of the historical demography on the global population structure of two highly migratory cosmopolitan marine fishes: the yellow fin tuna (*Thunnus albacares*) and the skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) [J]. Evol Biol, 2005, 5(19): 1-9.
- [23] 唐文乔, 胡雪莲, 杨金权. 从线粒体控制区全序列变异看短颌鲷和湖鲷的物种有效性 [J]. 生物多样性, 2007, 15(3): 224-231.
- [24] Xia Y Z, Sheng Y, Chen Y Y. DNA sequences variation in the mitochondrial control region of lenok (*Brachymystax lenok*) populations in China [J]. Biodiv Sci, 2006, 14: 48-54.
- [25] Pereira A L, Johnson K P, Clayton D H, et al.

- Mitochondrial and nuclear DNA sequences support a cretaceous origin of columbiformes and a dispersal-driven radiation in the paleogene [J]. *Syst Biol*, 2007, 56(4): 656–672.
- [26] Chen Y, Xiao H, Fu J Z, *et al.* A molecular phylogeny of eurytomid wasps inferred from DNA sequence data of 28S, 18S, 16S, and *COI* genes [J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2004, 31: 300–307.
- [27] Hewitt G M. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation [J]. *Biol J Soc*, 1996, 58(3): 247–276.

Comparative analysis of mtDNA gene sequences between two species of *Pleuronectes*

ZHANG Yan^{1,2}, XIAO Yong-shuang¹, GAO Tian-xiang¹, YU Han³

(1. *The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China;*

2. *Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China;*

3. *College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China)*

Abstract: *Pleuronectes yokohama* and *P. herzensteini*, belonged to the family Pleuronectidae, are commercially important fisheries resources in Northwest Pacific Ocean. To date, no researches were carried out in the differentiation between the two species. Partial nucleotide sequences of mitochondrial DNA *COI*, *Cyt b* genes and D-loop were sequenced and analyzed for *P. yokohama* and *P. herzensteini* in the present day. 107 nucleotide substitutions were checked between the two species in the total 1 373 bp sequences analyzed, and most of them were synonymous transitions at the third codon positions in the two protein-coding genes. Nucleotide composition analysis indicated a strong bias against guanine (G) in the three fragments, especially in the third codon positions of *COI* and *Cyt b* gene. There was obvious difference on the degree of genetic divergence between the two species in the three mtDNA segments. The substitution rate for D-loop was the highest and the rates for *COI* and *Cyt b* were generally similar. It is suggested that gene markers used in future research should be selected carefully according to the different situations. The estimated divergence time between the two *Pleuronectes* species based on *Cyt b* gene was about 2 million years, which indicated a Pleistocene divergence for the two species.

Key words: *Pleuronectes yokohama*; *Pleuronectes herzensteini*; mtDNA; nucleotide composition; divergence time