

文章编号:1007-2985(2010)06-0080-06

鲟形目线粒体 16S rRNA 的部分序列 变异及系统发生*

王 荻,李绍戊,曲秋芝,孙大江,卢彤岩

(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所,黑龙江 哈尔滨 150070)

摘 要:采用通用引物对3种鲟形目(Acipenseriformes)鱼类,中华鲟(*Acipenser sinensis*)、俄罗斯鲟(*Acipenser guldensstaedtii*)和匙吻鲟(*Polyodon spathula*)的16S rRNA基因部分片段进行扩增,并与NCBI数据库中获得另外6种鲟形目鱼类相应的16S rRNA序列部分进行比较,探讨鲟形目2个科5个属共9个种之间的遗传变异和亲缘关系.数据合并后用于分析的序列共514 bp,变异位点29个,含简约信息位点16个,单一信息位点13个.以多鳍鱼目(Polypteriformes)多鳍鱼属*Polypterus ornatipinnis*为外群,采用部分16S rRNA序列基于Kimura双参数模型构建其系统发育关系,结果表明:MP法和NJ法得到系统树基本相同,其科、亚科和属的分化上基本与传统形态学分类相吻合,另外,欧鲤与鲟属鱼类的分化也并不明显.值得注意的是,鲟亚科6个种所划分出的3个分支恰恰分别归属于3个地理区域,欧鲤、闪光鲟和俄罗斯鲟主要集中于黑海和里海流域等地区;中华鲟和达氏鲟分布在西北太平洋,中国长江流域以及朝鲜;而高首鲟则分布于东太平洋.

关键词:鲟形目;线粒体DNA;16S rRNA;系统树

中图分类号:Q75

文献标志码:B

鲟形目(Acipenseriformes)鱼类是硬骨鱼纲(Osteichthyes),辐鳍亚纲(Actinopterygii),软骨硬鳞总目(Chondrostei)鱼类中非常重要的一个组成类群.其标本最早出现在距今大约2亿年前的化石当中,因而被认为是最古老的硬骨鱼类之一.现存的鲟形目鱼类共包括26个种和亚种,分别隶属于鲟科和白鲟科,其中鲟科2个亚科4属,包括鲟亚科鲟属18种,鳇属2种;铲鲟亚科铲鲟属3种,拟铲鲟属3种.匙吻白鲟科2属,即白鲟属和匙吻鲟属各1种.引起我们注意的是,在如此漫长的进化历程当中,它们在形态学上仅发生了很微小的变化,其进化速度相对缓慢,是名副其实的“活化石”^[1-2].也正因如此,关于鲟形目鱼类分类地位及进化关系的探讨对于研究脊椎动物的起源和进化具有非常重要的理论意义.其种属间的遗传差异及系统发生一直是研究热点.

与核DNA相比,线粒体DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)具有分子量小、结构简单、进化速度快、母性遗传等特点,是研究动物起源进化及群体遗传分化的理想对象^[3-7].迄今为止,国内外很多学者应用mtDNA对鲟形目鱼类不同种之间的进行了研究^[8-11],取得了一定结果,但是仍需更多的数据及理论支持,以便进行深入探讨.

本研究采用通用引物扩增了具有一定地理隔离的3种鲟形目鱼类:鲟属的俄罗斯鲟(*Acipenser guldensstaedtii*),中华鲟(*Acipenser sinensis*)以及匙吻鲟属的匙吻鲟(*Polyodon spathula*)——的16S rRNA部分序列,并结合GenBank上已发布的另外6种鲟形目鱼类相应的mtDNA序列部分,从16S rRNA的角度探讨这9个种之间的遗传变异关系及系统发生.

* 收稿日期:2010-06-16

基金项目:农业公益性行业专项基金资助项目(200803013);黑水研基本科研业务费资助项目(201003)

作者简介:王 荻(1980-),辽宁省人,硕士,中国水产科学研究院黑龙江水产研究所助理研究员,主要从事鱼类病害研究

通讯作者:卢彤岩(1967-),黑龙江人,研究员,博士,主要从事鱼类病害研究;E-mail:lutongyan@hotmail.com.

1 材料和方法

1.1 样品采集与基因组 DNA 的提取

采新鲜的鱼尾鳍样品,每 0.1 g 加 0.2 mL 裂解液(0.5%十二烷基肌胺酸钠,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 蛋白酶 k, 0.2 mol/L EDTA(pH 值 8.0)),50 $^{\circ}\text{C}$ 消化 3~4 h,等体积酚、氯仿、异戊醇混合液(25:24:1)抽提 2 次,等体积氯仿抽提 1 次,2 倍无水乙醇沉淀,70%乙醇洗涤,自然干燥后 100 μL 的 0.1 \times TE 溶解后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2 线粒体 16S rRNA 基因部分序列的扩增

选取用于扩增 16S rRNA 的通用引物(L2510:5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3'; H3080:5'-CCGGTCTGAACTCAGATCACGT-3')^[12],对 3 种鲟形目鱼类 DNA 标本进行扩增。PCR 反应体系为 50 μL ,其中包括:10 \times buffer 5 μL ;Mg²⁺(25 mmol/L)2.5 μL ;dNTPs(各 2 mmol/L)2 μL ;上下游引物(10 $\mu\text{mol}/\text{L}$)各 2 μL ;模板 DNA 2 μL ;Taq DNA 聚合酶(Promega)2U。加 dd H₂O 补足至 50 μL 。

扩增反应均在 PE 9700 型 PCR 仪(PE 公司)上完成,具体扩增程序如下:94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s,48 $^{\circ}\text{C}$ 复性 60 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s,共 35 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。2.0%琼脂糖凝胶电泳观察扩增结果,PCR 产物由生物公司(上海生工生物工程技术有限公司)纯化后测序。

1.3 数据收集和处理

将实验所得序列信息,与在 NCBI 上搜索到 6 种鲟科鱼类的 mtDNA 全序列共 7 条(其中白鲟有 2 条,GenBank 登录号分别为 AY571339,AP004353),进行人工校对(共 9 种,见表 1)后,用 Clustal W2 软件进行序列的对位排列,截取比对后相同长度的序列,用 MEGA 4.0 软件^[13]计算种之间碱基替代(转换+颠换)和颠换的百分率,根据 Kimura 双参数模型计算遗传距离(D)。并以同为古鲟类(Palaeopterygii)且亲缘关系与鲟形目非常接近的多鳍鱼目鱼类多鳍鱼属的 *Polypterus ornatipinnis* 为外群,采用 MEGA 4.0 软件中的 MP 法和基于 Kimura 双参数模型的 NJ 法重建了 9 种鲟形目鱼类系统发生树,Bootstrap(重复数=1 000)检验分子系统树各分支的置信度。

表 1 本研究所探讨的 9 种鲟形目鱼类的分类地位和 GenBank 序列号

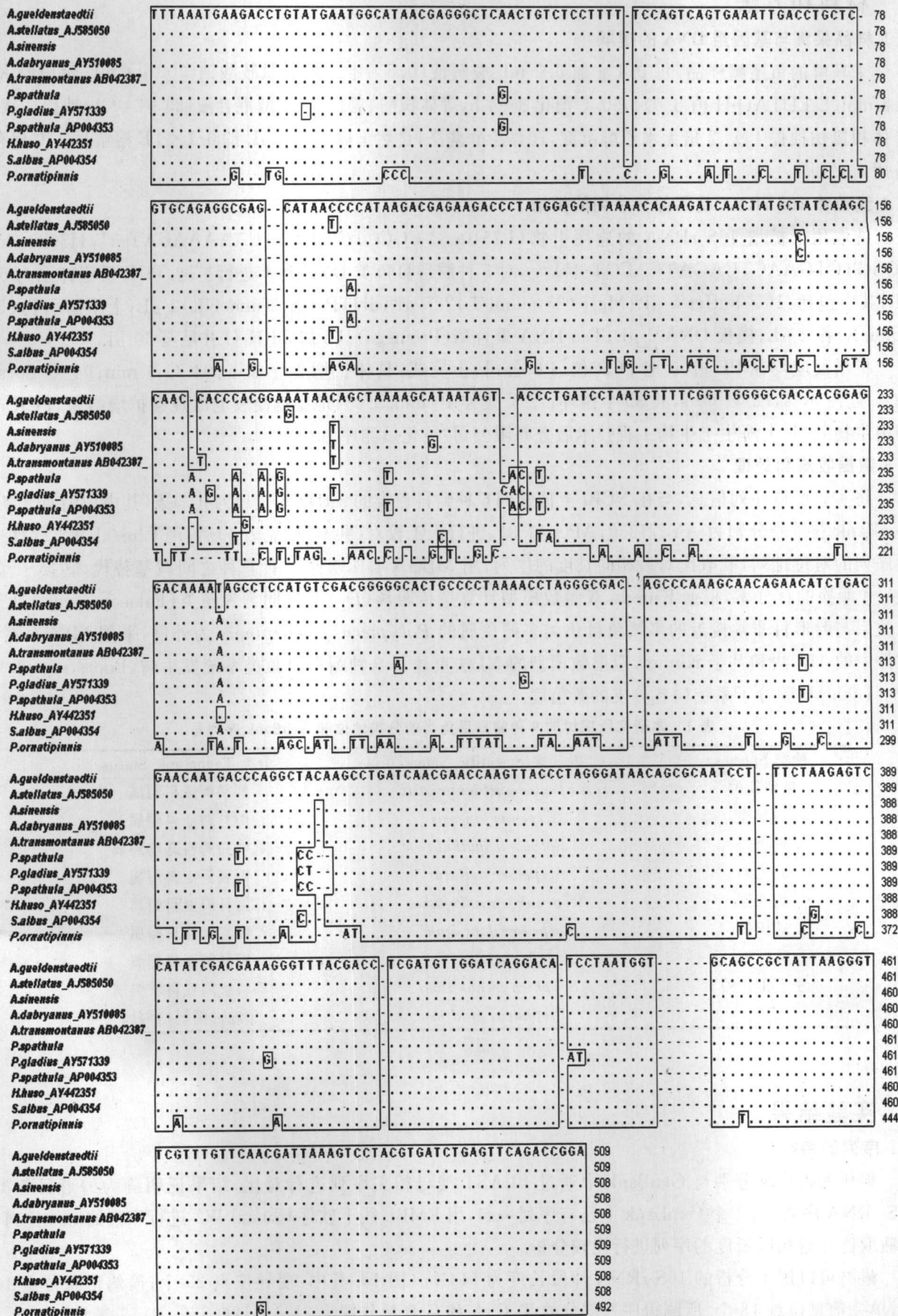
种类 Species	拉丁名 Scientific Name	分类 Taxonomic Status
俄罗斯鲟	<i>Acipenser gueldenstaedtii</i>	鲟科鲟亚科鲟属
中华鲟	<i>Acipenser sinensis</i>	鲟科鲟亚科鲟属
匙吻鲟	<i>Polyodon spathula</i>	匙吻白鲟科匙吻鲟属
闪光鲟	<i>Acipenser stellatus</i>	鲟科鲟亚科鲟属
高首鲟	<i>Acipenser transmontanus</i>	鲟科鲟亚科鲟属
达氏鲟	<i>Acipenser dabryanus</i>	鲟科鲟亚科鲟属
欧洲鳇	<i>Huso huso</i>	鲟科鲟亚科鳇属
密苏里铲鲟	<i>Scaphirhynchus albus</i>	鲟科铲鲟亚科铲鲟属
白鲟	<i>Psephurus gladius</i>	匙吻白鲟科白鲟属

2 实验结果

2.1 序列的特征

将所测得序列分别与 GenBank 中通过 BLAST 搜寻相关序列进行对比,结果证明确为鲟形目鱼类 16S rRNA 序列,与 7 个 GenBank 上已有序列一起,用 EMBL 线上软件 Clustal W2 进行序列的对位排列,并截取比对后相同长度的序列进行比较分析。

最终可以用于分析的 16S rRNA 片段长度为 514 bp(图 1)。其中:变异位点 29 个;简约信息位点 16 个;单一信息位点 13 个。所测得序列部分的 T、C、A 和 G 含量分别为 21.1%、24.8%、31.5% 和 22.6%,转换/颠换值为 2.2,其中所得序列的 A+T 含量(52.6%)略高于 C+G 含量(47.4%)。



“·”表示此位点与俄罗斯鲟(最上排)核苷酸相同;“-”被引进序列中以改进排序
 图 1 Polypterus ornatipinnis 及 9 种鲟形目鱼类线粒体 16S rRNA 片段的核苷酸序列

2.2 遗传距离及系统发生树的构建

采用 MEGA 4.0 软件,根据 Kimura 双参数模型计算 9 个种之间以及它们与外群 *Polypterus ornatipinnis* 之间的遗传距离,见表 2.

表 2 基于 Kimura-2 模型计算的遗传距离

	ELSX	SGX	ZHX	DSX	GSX	OH	MSLCX	CWX	BX	<i>P. ornatipinnis</i>
ELSX										
SGX	0.004 12									
ZHX	0.004 11	0.008 25								
DSX	0.006 18	0.010 33	0.002 05							
GSX	0.004 11	0.008 25	0.004 12	0.006 19						
OH	0.002 05	0.002 05	0.006 18	0.008 25	0.006 18					
MSLCX	0.010 32	0.014 51	0.010 33	0.012 43	0.010 33	0.012 41				
CWX	0.019 74	0.023 99	0.019 76	0.021 89	0.019 76	0.021 86	0.021 86			
BX	0.018 70	0.022 95	0.018 73	0.020 85	0.018 73	0.020 82	0.020 82	0.024 02		
<i>P. ornatipinnis</i>	0.246 78	0.246 18	0.240 97	0.244 03	0.240 97	0.246 78	0.244 36	0.249 00	0.262 05	

注 ELSX-俄罗斯鲟;SGX-闪光鲟;ZHX-中华鲟;DSX-达氏鲟;GSX-高首鲟;OH-欧鲤;MSLCX-密苏里铲鲟;CWX-匙吻鲟;BX-白鲟.

由表 2 可知:*Polypterus ornatipinnis* 和这 9 个种的遗传距离约为 0.240 97~0.262 05. 而鲟亚科 6 个种间的遗传距离较低在 0.002 05~0.010 33 之间;其中达氏鲟和闪光鲟遗传距离最大,欧洲鲤同闪光鲟和俄罗斯鲟的的遗传距离最小. 匙吻白鲟科 2 个种间的遗传距离达到了 0.024 02,是所有 9 个种间最大的. 铲鲟亚科的密苏里铲鲟与匙吻白鲟科 2 个种的遗传距离分别为 0.021 86 和 0.020 82,大于其与鲟科 6 个种的遗传距离(0.010 33~0.014 51).

本研究同时采用 MEGA 软件中基于 Kimura 双参数模型的 MP 法和 NJ 法构建鲟形目 9 个种的系统树,分别于图 2 和图 3 所示.

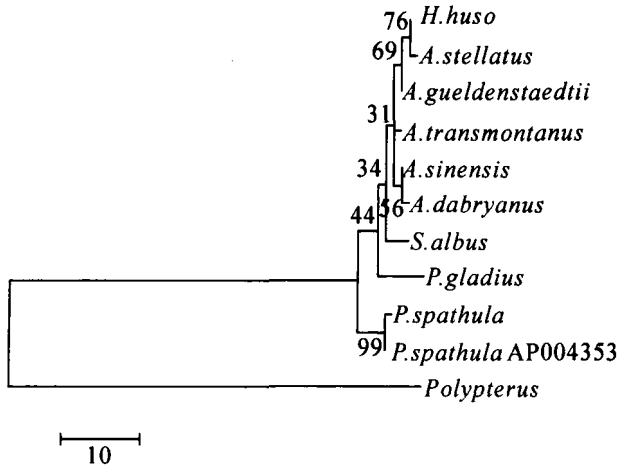


图 2 基于部分 16S rRNA 序列构建的 MP 树

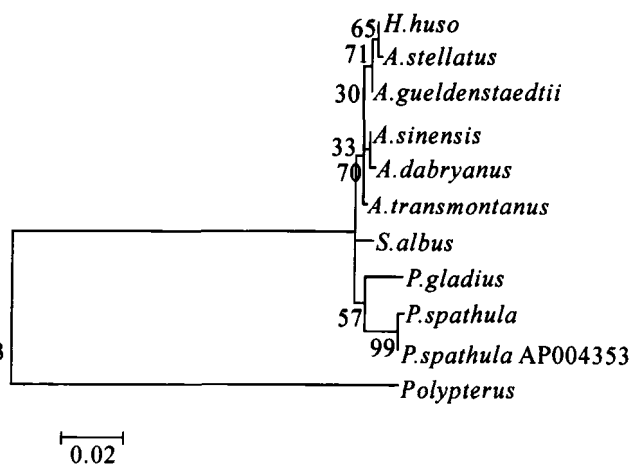


图 3 基于部分 16S rRNA 序列构建的 NJ 树

通过对这 2 种系统树拓扑结构的比较分析,发现 2 种方法所获得的进化树聚类结果基本相同:外群 *Polypterus ornatipinnis* 与鲟科鱼类分化较早,差异较大,单独聚为一支;而后依次分化出匙吻鲟属的匙吻鲟、白鲟属的白鲟、铲鲟属的密苏里铲鲟以及鲟亚科的 6 个种. 6 个种又分出 3 支. 欧洲鲤、闪光鲟和俄罗斯鲟为一支;中华鲟和达氏鲟为一支;高首鲟为一支. 而基于 Kimura 双参数模型的 NJ 树的结果与 MP 树略有不同,主要表现在匙吻白鲟科,铲鲟亚科以及鲟亚科为 3 个并列的分支.

3 讨论

鲟科鱼类是一群古老的软骨硬鳞鱼,生存适应范围广,进化历史悠久,是研究脊椎动物进化过程的重

要试验材料^[14]. 长久以来, 其种属间的遗传差异及系统发生一直是研究热点, 其中开展较多的是细胞遗传学和 mtDNA 的研究^[8-11, 15].

Birstein 等曾根据鲟形目鱼类的 DNA 含量和染色体核型研究的成果, 提出现存鲟鱼类主要为四、八、十六倍体三种不同的类型并构建了鲟形目鱼类染色体倍性进化的示意图^[9, 16]. 本研究中所涉及的 9 个种均属于四倍体或八倍体, 结合到聚类图(见图 4)上可以明显的看出该区域 mtDNA 的分化与倍性之间的关系, 最先分化出的匙吻鲟和白鲟以及密苏里铲鲟均为四倍体, 而鲟亚科的 6 个种中, 除欧洲鳇、闪光鲟为四倍体, 其余 4 个种全部为八倍体.

迄今为止, 国内外学者对鲟形目鱼类 mtDNA 的研究涉及很多基因和区域. Birstein 等使用 mtDNA 12S、16S rRNA 及 cyt b 基因部分序列分析了所有现存鲟科鱼^[9], 张四明等析了 mtDNA ND4L-ND4 基因序列^[10], 陈金平等也曾根据 GenBank 中的 D-loop 区序列分析鲟形目鱼类系统演化^[14]. 本研究采用部分 16S rRNA 序列基于 Kimura 双参数模型的 NJ 法和 MP 法构建所得到的系统树基因相同, 其科、亚科、属的分化上基本与传统形态学分类相吻合. 鳇属不能作为一个单独的分类系统已经在 mtDNA 研究中被多次证明^[9-11], 本研究中欧鳇与鲟属鱼类的分化也并不明显.

值得注意的是, 鲟亚科 6 个种所划分出的 3 个分支与其分布地理区域相一致, 欧鳇、闪光鲟和俄罗斯鲟主要集中于黑海和里海流域等地区; 中华鲟和达氏鲟分布在西北太平洋, 中国长江流域以及朝鲜; 而高首鲟则分布于东太平洋. 实验结果表明: 本研究所取得的 9 中鲟形目鱼类系统发生与前期报道的研究结果类似, 主要的分歧在于 Birstein 等的通过 12S、16S rRNA 及 cyt b 基因部分序列得到的系统发生图中中华鲟和达氏鲟并不在一个分支上^[9], 而本研究通过另一区域 16S rRNA 序列(部分重合)得到的结果则显示中华鲟和达氏鲟的遗传距离非常小, 与张四明等以及汪登强等的研究结果相同, 而张四明等曾由此提出达氏鲟是中华鲟的陆封种类的观点^[10-11].

致谢 张颖助理研究员在本研究采样及完成过程中给予了大力支持, 谨以致谢.

参考文献:

- [1] GARDINER B G. Sturgeons as Living Fossils [M]//ELDREDGE N, STANLEY S M. Living Fossils. New York: Springer Verlag Press, 1984.
- [2] KRIEGER J, FUERST P A. Evidence for a Slowed Rate of Molecular Evolution in the Order Acipenseriformes [J]. Molecular Biology and Evolution, 2002, 19: 891 - 897.
- [3] PALUMBI S R, BENZIE J. Large Mitochondrial DNA Differences Between Morphologically Similar Penaeid shrimp [J]. Molecular Marine Biology, 1991, 1: 27 - 34.
- [4] WARD R O, ELLIOTT N G, GREWE P M, et al. Allozyme and Mitochondrial DNA Variation in Yellowfin Tuna (*Thunnus Albacares*) from the Pacific Ocean [J]. Marine Biology, 1994, 118: 531 - 539.
- [5] FOIGHIL D O, HILBISH T J, SHOWMAN R M. Mitochondrial Gene Variation in Mercenaria Clam Sibling Species Reveals a Relict Secondary Contact zone in the Western Gulf of Mexico [J]. Marine Biology, 1996, 126: 675 - 683.
- [6] FRANCE S C, KOCHER T D. Geographic and Bathymetric Patterns of Mitochondrial 16S rDNA Sequence Divergence Among Deep-Sea Amphipods, *Eurythenes gryllus* [J]. Marine Biology, 1996, 126: 633 - 643.
- [7] ROSEL P E, BLOCK B A. Mitochondrial Control Region Variability and Global Population Structure in the Swordfish, *Xiphias Gladius* [J]. Marine Biology, 1996, 125: 11 - 22.
- [8] BROWN J R, BECKENBACH K, BECKENBACH A T. Length Variation Heteroplamy and Sequence Divergence in the Mitochondrial DNA of Four Species of Sturgeon (*Acipenser*) [J]. Genetics, 1996, 142: 525 - 535.
- [9] BIRSTEIN V J, DESALLE R. Molecular phylogeny of Acipenserinae [J]. Molecular phylogenetics evolution, 1998, 9:

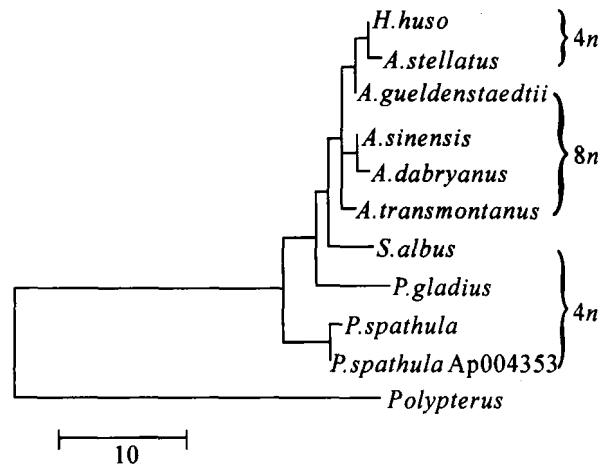


图 4 基于部分 16S rRNA 序列构建的鲟形目 9 个种的 MP 树及其倍性

141 - 155.

- [10] 张四明,张亚平,郑向忠,等. 12种鲟形目鱼类 mtDNA ND4L-ND4 基因的序列的变异及其分子系统学 [J]. 中国科学: C 辑, 1999, 29(6): 607 - 614.
- [11] 汪登强,危起伟,王朝明,等. 13种鲟形目鱼类线粒体 DNA 的 PCR-RFLP 分析 [J]. 中国水产科学, 2005, 12(4): 383 - 389.
- [12] HILLIS D M, MORITZ C, BABLE B. Molecular Systematics Edition [M]. 2nd ed. Sunderland, Sinauer, 1996.
- [13] TAMURA K, DUDLEY J, NEI M, et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0 [J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24: 1 596 - 1 599.
- [14] 陈金平,孙大江,张树义,等. 鲟鱼类系统进化的研究现状 [J]. 四川动物, 2004, 23(4): 374 - 379.
- [15] BLACKLIDGE K H, BIDWELL C A. Three Ploidy Levels Indicated by Genome Quantification in Acipenseriformes of North America [J]. The Journal of Heredity, 1993, 84: 427 - 430.
- [16] BIRSTEIN V J, POLETAEV A I, GONCHAROV B F. DNA Content in Eurasian Sturgeon Species Determined by Flow Cytometry [J]. Cytometry, 1993, 14: 377 - 383.

Partial Sequence Variability of 16S rRNA in 9 Species of Acipenseriformes and Its Application in Phylogenetic Analysis

WANG Di, LI Shao-wu, QU Qiu-zhi, SUN Da-jiang, LU Tong-yan

(Heilongjiang River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China)

Abstract: Partial nucleotide sequences of 16S rRNA were amplified using PCR techniques from three species (*Acipenser sinensis*, *Acipenser gueldenstaedtii*, *Polyodon spathula*) of Acipenseriformes. With sequences from other six species in NCBI database, the genetic variability and phylogenetic relationship were tested among 9 species from 2 families and 5 genera of Acipenseriformes. 29 nucleotide variable positions including 16 parsimony informative positions and 13 singleton positions were detected in analyzed 514 bp length sequence which were defined among the species. Taken *Polypterus ornatipinnis* as out-group, similar phylogenetic trees were constructed by MP and NJ method among these 9 species of Acipenseriformes. The results showed that the differentiation of family, subfamily and genus was consistent with traditional morphological classification. Additionally, there was no significant difference between *Huso huso* and sturgeon. It is worth noting that 3 branches from 6 species in sturgeon subfamily belonged to 3 geographical regions. Among them, *Huso huso*, *Acipenser stellatus* and *Acipenser gueldenstaedtii* were mainly distributed in the Black sea and the Caspian sea basin, *Acipenser sinensis* and *Acipenser dabryanus* in the northwest Pacific, China yangtze river and Korea, while *Acipenser transmontanus* in the eastern Pacific.

Key words: Acipenseriformes; mitochondrial DNA; 16S rRNA; phylogenetic tree

(责任编辑 易必武)