

3 种中国鲤 mtDNA D-Loop 序列的多态性与系统进化研究

梁宏伟^{1,2}, 邹桂伟^{1,2}, 罗相忠^{1,2}, 王长忠³, 呼光富³, 李 忠^{1,2}

(1 中国水产科学研究院 长江水产研究所 农业部淡水生物多样性保护与利用重点开放实验室, 湖北 荆州 434000;

2 中国水产科学研究院 淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081; 3 华中农业大学 水产学院, 湖北 武汉 430070)

【摘 要】 【目的】探讨长江野生鲤、荷包红鲤和兴国红鲤 3 种中国鲤的遗传变异、亲缘关系及系统进化。【方法】对 3 种鲤的 D-Loop 序列进行扩增并测序, 分析其遗传多样性, 并与 GenBank 中获取的另外 5 种鲤鱼的 D-Loop 序列一起构建进化树。【结果】3 种鲤的碱基组成中 A+T 含量均高于 C+G 含量; T 碱基含量最高, 平均为 33.5%; C 碱基最低, 平均为 13.7%。在检测的 3 种鲤上共发现 37 个突变位点, 其中有 2 个插入, 28 个转换, 7 个颠换, 碱基的替换有明显偏倚。单倍型多样性指数最高的是长江野生鲤(0.984 ± 0.019), 最低的是荷包红鲤(0.113 ± 0.072); 核苷酸多样性指数以长江野生鲤最高, 为 0.006 23, 荷包红鲤最低, 为 0.000 12。长江野生鲤的遗传多样性较兴国红鲤和荷包红鲤丰富, 荷包红鲤的遗传多样性最低。聚类分析表明, 8 种鲤属鱼聚为 2 大支, 德国鲤单独为一类, 其余 7 种聚为一类。【结论】荷包红鲤和兴国红鲤虽都原产于江西省, 但 2 种鲤最初是独立从野生鲤中通过体色变异分化而来的。

【关键词】 长江野生鲤; 荷包红鲤; 兴国红鲤; mtDNA D-Loop

【中图分类号】 S932.4

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)03-0055-05

Diversity and phylogenetic analysis of the D-Loop of three Chinese carps

LIANG Hong-wei^{1,2}, ZOU gui-wei^{1,2}, LUO Xiang-zhong^{1,2},
WANG Chang-zhong³, HU Guang-fu³, LI Zhong^{1,2}

(1 Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Key Laboratory of Freshwater Biodiversity Conservation and Utilization, Gertificated by Ministry of Agriculture, Jingzhou, Hubei 434000, China; 2 Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi, Jiangsu 214081, China;

3 College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan, hubei 430070, China)

Abstract: 【Objective】 The genetic variability, genetic relationship and phylogenetics of Yangtze river wild carp, Red purse carp and Singguo red carp were studied. 【Method】 The mtDNA D-loop sequences of the three chinese carps were obtained by PCR and sequencing. The cladogram was constructed by mtDNA D-loop sequences of the three sequenced carps and five carps from the GenBank. 【Result】 The contents of nucleotide in three carps were similar to that in vertebrate. The sum content of A+T was higher than that of C+G. The content of nucleotide T was highest in four nucleotides in three carps, and the average content was 33.5%; nucleotide C was lowest and the average content was 13.7%. There were 2 insert loci, 28 transition loci and 7 transversion loci in 37 mutational loci which were found in the three carps and transition

* [收稿日期] 2008-04-30

[基金项目] 国家科技基础条件平台专项(2006DKA30470-002); 中国水产科学研究院水产种质资源与养殖技术重点开放实验室开放课题(2006A005)

[作者简介] 梁宏伟(1978—), 男, 山西原平人, 助理研究员, 在读博士, 主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail: lianghw@yfi. ac. cn

[通信作者] 邹桂伟(1963—), 男, 安徽庐江人, 研究员, 主要从事鱼类遗传育种研究。E-mail: zougw@yfi. ac. cn

was the major mutational type. The haplotype diversity of Yangtze river wild carp was highest (0.984) in three carps, but that of the red purse carp was the lowest (0.113). The Nucleotide diversity of Yangtze river wild carp was highest (0.006 23) and that of the red purse carp was the lowest (0.000 12). The result showed the genetic diversity of Yangtze river wild carp was more abundant than that of the other two carps and the red purse carp was the leanest. 8 carps were clustered into 2 groups based on the UPGMA. The first group only included Germany common carp, the second group included the rest. 【Conclusion】 The red purse carp and Singguo red carp which were originated in the Jiangxi province were independently separated from the common carp by the body colour mation.

Key words: Yangtze river wild carp; red purse carp; singguo red carp; mtDNA D-Loop

鲤鱼(*Cyprinus carpio*)是目前世界上养殖范围最广、历史最悠久的淡水鱼类,广泛分布于亚洲和欧洲大陆,在长期的养殖和驯化过程中,形成了许多亚种和品系^[1-2]。荷包红鲤和兴国红鲤是我国经过人工驯养后形成的 2 个地方品种。荷包红鲤和兴国红鲤原产于江西省,是我国重要的鲤科鱼类养殖品种,具有生长快、繁殖力强、食性广和适应性强、经济价值高等优点,同时均是良好的育种材料,作为杂交亲本具有杂交亲和力强、杂交优势明显等特点。冯开茂等^[3]对荷包红鲤雌核体系杂交代的性状进行研究发现,其杂交后代生长速度明显加快,杂交优势明显;将一硅等^[4]用方正银鲫为母本、兴国红鲤为父本,通过人工诱导雌核发育,成功培育出具有优良经济性状的异育银鲫;广东省西江大学利用彭泽鲫为母本、兴国红鲤为父本进行杂交,其杂交一代(丰产鲫)具有生长速度快、雌性率高等特点^[5]。

线粒体 DNA(Mitochondrial DNA, mtDNA)是核外遗传物质,具有结构简单、分子量小、进化速度快、遵循母系遗传等特点,已成为群体遗传、系统进化、物种起源、基因流动研究的重要遗传标记^[6-7]。mtDNA D-环(D-loop)是线粒体基因组的非编码区,

属于遗传高变区,进化速度快,多态性丰富,已成为 mtDNA 研究的热点之一。目前对荷包红鲤和兴国红鲤的研究,主要集中在杂交优势的利用方面,也有少量对中国几种红鲤起源的相关研究,但关于长江野生鲤与这 2 种红鲤以及一些国外鲤属鱼类亲缘关系、起源进化等方面的系统研究还较少。本研究对中国长江野生鲤、荷包红鲤和兴国红鲤的 89 个个体的 mtDNA 控制区进行测序,分析其遗传多样性,并与 GenBank 中其他 5 种鲤科鱼类的 D-Loop 序列一起构建进化树,以期分析鲤的起源进化、新品种的选育及开发利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 鲤鱼样品 长江野生鲤采自湖北省,荷包红鲤和兴国红鲤采自江西省,样本数量、采样地点见表 1。剪取试验鱼的尾鳍条放入装有无水乙醇的离心管内,带回实验室,−20 ℃保存备用。

1.1.2 主要试剂 蛋白酶 K、*Taq* DNA 聚合酶(TaKaRa)、dNTPs(TaKaRa)、琼脂糖等,均购自武汉天源生物技术有限公司。

表 1 供试 3 种鲤鱼的采样信息

Table 1 Sampling information of the three carps

种群 Population	代码 Code	数量 No.	采样地点 Site
野生鲤 Yangtze wild common carp	YWC	23	长江湖北省监利县江段 Yangtze river of Jianli in Hubei province
荷包红鲤 Red purse carp	RPC	35	江西省荷包红鲤原种场 Red purse carp growing field of Jiangxi province
兴国红鲤 Singguo red carp	SRC	31	江西省兴国红鲤良种场 Breeding farm of Singguo red carp of Jiangxi province

1.2 鲤鱼基因组 DNA 的提取

用苯酚-氯仿抽提法从鲤鱼尾鳍条提取基因组 DNA,并用 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 鲤鱼 mtDNA D-loop 区段的 PCR 扩增与测序

根据 D-Loop 两端的 tRNA 和 tRNA 序列设计 1 对引物(由上海生工生物科技有限公司合成),序

列为:

D-Loop pro: 5'-TCC CAA AGC TAG GAT TCT AAA CTA AAC-3';

D-Loop pre: 5'-TTC ATC TTA ACA TCT TCA GTG TTA TGC-3'。

以提取的 DNA 为模板,利用合成的引物进行

PCR 扩增(美国 MJ 公司的 PTC-200PCR 仪),反应体系总体积为 50 μ L,其中含 10 $\times$ Buffer 5.0 μ L, 10 mmol/L dNTPs 0.5 μ L,5 U/ μ L *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μ L,10 μ mol/L 的上、下游引物各 1.5 μ L, DNA 模板 0.5 μ L,灭菌 ddH₂O 40.5 μ L。PCR 扩增程序为:94.0 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94.0 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 56.0 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72.0 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 30 s,34 个循环;最后 72.0 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物用 10 g/L 的琼脂糖凝胶电泳检测。将检测有良好扩增条带的 PCR 产物送北京利嘉泰成科技有限公司进行纯化和测序,采用 Axygen 公司的 PCR 产物纯化回收试剂盒进行回收纯化,在 3730XL 测序仪(Japan)上采用 Sanger 双脱氧链终止法进行双向测序,以确保序列的准确性。

1.4 数据分析

用 clustalX 软件对测序结果进行同源序列比对,用 DnaSP 4.0 软件计算变异位点、单倍型数,单倍型间核苷酸差异数、单倍型多样性指数以及核苷

酸多样性指数。用 MEGA3.1 软件统计碱基组成,并构建系统进化树。

2 结果与分析

2.1 鲤鱼 DNA 的提取和 mtDNA D-loop 的扩增

鲤鱼基因组 DNA 电泳结果(图 1)显示,条带清晰,无明显降解,可以满足 PCR 扩增的要求。从图 2 可以看出,通过 PCR 扩增出的特异产物位于1 000 bp 处,为鲤鱼 mtDNA 基因组中 D-loop 的目的片段。

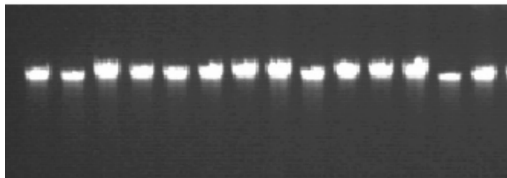


图 1 长江野生鲤的 DNA 电泳结果
Fig.1 Electrophoresis result of Yangtze river wild common carp DNA

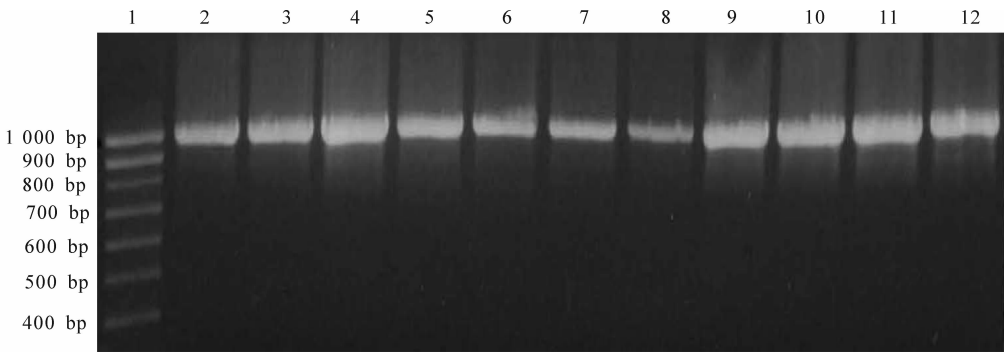


图 2 3 种鲤 mtDNA D-loop 区段的扩增结果
1. DNA Marker;2~4. 兴国红鲤 PCR 扩增产物;5~8. 荷包红鲤 PCR 扩增产物;9~12. 长江野生鲤 PCR 扩增产物

Fig.2 Amplified product of mtDNA D-loop region of the three carps

1. DNA Marker;2~4. PCR amplification product of Singguo red carp;5~8. PCR amplification product of red purse carp; 9~12. PCR amplification product of Yangtze river wild common carp

2.2 3 种鲤鱼 mtDNA D-Loop 的碱基含量与核苷酸多态性

对 3 种鲤鱼的序列进行比对,得到长度为 827 bp 的序列,将其用于遗传多样性分析。在长江野生鲤的碱基组成中,A 为 32.9%,T 为 33.4%,C 为 13.8%,G 为 19.9%;荷包红鲤中,A 为 32.7%,T 为 33.4%,C 为 13.7%,G 为 20.2%;兴国红鲤中,A 为 32.9%,T 为 33.7%,C 为 13.6%,G 为 19.9%;3 种鲤鱼 A+T 含量均高于 C+G 含量。在检测的 3 种鲤鱼上共发现 37 个突变位点,其中有 2 个插入,28 个转换,7 个颠换,表明碱基的替换有明

显偏倚。

2.3 3 种鲤鱼种群的遗传多样性

由表 2 可以看出,从 3 种鲤鱼中共检测到单倍型 27 个,其中长江野生鲤的单倍型最多,在检测的 23 个个体中共有 20 个单倍型;从荷包红鲤中检测到的单倍型最少,共有 3 个。3 种鲤鱼中单倍型多样性指数最高的是长江野生鲤(0.984 $\pm$ 0.019),最低的是荷包红鲤(0.113 $\pm$ 0.072);核苷酸多样性指数也以长江野生鲤最高(0.006 23),荷包红鲤最低(0.000 12),表明长江野生鲤的遗传多样性较兴国红鲤和荷包红鲤丰富。就单倍型频率而言,长江野

生鲤以单倍型 1 最高(13.0%),其次是单倍型 8 (8.7%),其余 18 个单倍型分别仅检测到 1 个个体;荷包红鲤以单倍型 1 最高(94.3%);兴国红鲤 4 种

单倍型中有 2 种频率均较高,其中单倍型 1 最高 (53.1%),其次为单倍型 3(37.5%),其余 2 种单倍型分别仅出现了 1 次。

表 2 3 种中国鲤鱼 mtDNA D-Loop 序列的多态性分析

遗传参数 Genetics parameter	单倍型数 Haplotype number	单倍型多样性指数 Haplotype diversity	核苷酸多样性指数 Nucleotide diversity
长江野生鲤 Yangtze river wild carp	20	0.984±0.019	0.006 23±0.000 69
荷包红鲤 Red purse carp	3	0.113±0.072	0.000 12±0.000 08
兴国红鲤 Singguo red carp	4	0.569±0.048	0.005 62±0.000 56

2.4 基于 UPGMA 的鲤鱼系统进化树

将本试验所获得的长江野生鲤(YWC)、荷包红鲤(RPC)、兴国红鲤(SRC)mtDNA D-Loop 序列及从 GenBank 中获取的元江鲤(YJC,GenBank 登录号:AY347302)、青田鲤(QTC,GenBank 登录号:AY347297)、日本锦鲤(JKC,GenBank 登录号:AY347299)、鲤(德国,GC,GenBank 登录号:

AY345338)、鲤(俄罗斯,RC,GenBank 登录号:AY345336)5 种鱼的序列一起构建系统进化树(图 3)。由图 3 可以看出,8 种鲤属鱼聚为 2 大支,德国鲤单独为一类,其余 7 种聚为一类。在这一大类中,荷包红鲤、元江鲤、长江野生鲤又聚为一类,青田鲤、俄罗斯鲤、日本锦鲤和兴国红鲤聚为另一类。

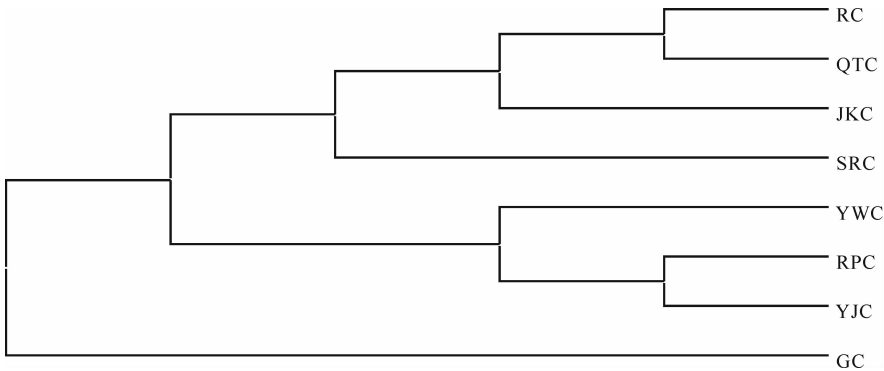


图 3 基于 UPGMA 构建的 8 种鲤属鱼类进化树

RC. 鲤(俄罗斯);QTC. 青田鲤;JKC. 日本锦鲤;SRC. 兴国红鲤;YWC. 长江野生鲤;RPC. 荷包红鲤;YJC. 元江鲤;GC. 鲤(德国)

Fig. 3 Phylogenetic tree of eight carps based on D-Loop sequences

RC. Common carp (Russian);QTC. Qingtian carp;JKC. Japan koi carp;SRC. Singguo red carp;YWC. Yangtze wild carp;RPC. Red purse carp;YJC. Yuanjiang carp;GC. Common carp (German)

3 讨论

本研究结果表明,3 种鲤鱼 A+T 含量均高于 C+G 含量,与刘焕章^[8]在鱼类控制区的研究结果一致,也与脊椎动物 mtDNA 碱基组成相似^[9-10]。3 种鲤鱼中 T 碱基含量最高,平均为 33.5%;C 碱基最低,平均为 13.7%,该结果与张学义等^[11]在金鱼和鲫上的研究结果相一致,也与郑冰蓉等^[12]对鲤属鱼类线粒体 DNA 控制区的研究结果一致。在检测的 3 种鲤鱼上共发现 37 个突变位点,其中有 2 个插入,28 个转换,7 个颠换,表明碱基的替换有明显偏倚,这与动物线粒体 DNA 碱基的变异特点相一致。

由于地理隔离、生存适应、人工或自然选择等因

素的作用,鲤已经形成数目众多的地理种群或品种(系)。在解放前,由于不注意荷包红鲤品种的选育和提纯复壮,致使品种退化,甚至于灭绝。在 1958 年,江西省婺源县政府组织科研人员从野外采集到 17 尾荷包红鲤模样的原种作为亲本扩大群体,1960 年又成立了荷包红鲤研究所,经 10 年(1969~1979 年)连续 6 代人工繁殖与系统选育,最终获得体色、体型和生长等遗传性状都比较稳定的后代,经济性状显著提高,1980 年通过技术鉴定,使荷包红鲤成为我国培育成功的第一个鲤鱼品种^[13]。兴国红鲤的系统选育始于 1958 年,通过 12 年 6 代的定向选育达到预定目标,1985 年通过技术鉴定,成为一个鲤鱼品种。mtDNA 是母性遗传,初始群体大小对

后代的遗传多样性影响很大。兴国红鲤和荷包红鲤均为人工育成品种,是从有限的原始群体中经过多代选育而成的,有效群体相对较小,因此遗传基础相对较窄,故选育期间不乏遗传瓶颈的发生^[14]。本研究中,长江野生鲤的遗传多样性最高,其次为兴国红鲤,荷包红鲤最低,这与兴国红鲤和荷包红鲤的选育有极大关系,兴国红鲤组建的选育群体较荷包红鲤大,荷包红鲤最初的选育群体的数量仅为17尾,使其遗传多样性较低。

鲤是世界上养殖最广泛的品种,主要分布在亚洲、欧洲,就其起源存在2种不同的观点:一些学者认为欧洲家养鲤起源于亚洲普通鲤,是在古希腊和古罗马时期从亚洲进入欧洲的;另有学者认为,德国家养普通鲤是在17~18世纪从本地普通鲤中而来的。在本研究的8种鲤属鱼类中,德国鲤单独聚为一类,而其他7种聚为一类,因此本研究结果支持德国鲤起源于本地的观点,但仍需要进一步的研究结果来证实。另外从本研究结果来看,尽管荷包红鲤和兴国红鲤的最初起源均在江西省,但从聚类结果可知,这2种鲤并没有直接聚为一类,而是在分别与其他鲤鱼聚在一起后才聚为一类,这说明这2种鲤最初独立从野生鲤中通过体色变异分化而来,该结果与王成辉等的研究结果一致^[15]。日本锦鲤的原始品种为红色鲤鱼(*Cyprinus carpio*),也就是普通鲤鱼的体色变异系,其起源于我国广西龙州锦鲤、江西兴国红鲤、浙江杭州金鲤,传入日本后经日本人民的长期人工选育,现已有100多个品种。在本研究中,日本锦鲤与我国的鲤进行聚类时,首先与浙江的青田鲤聚为一类,然后与兴国红鲤聚在一起,表明日本锦鲤与青田鲤和兴国红鲤的亲缘关系较近,说明其至少有我国浙江和江西鲤鱼的血统。从兴国红鲤和青田鲤聚在一起也可以看出,兴国红鲤和青田鲤的亲缘关系更近一些,这可能与江西与浙江相邻,因此兴国红鲤与青田鲤之间有一定的基因交流有关。

从本研究结果来看,长江野生鲤的遗传多样性最为丰富,而荷包红鲤的遗传多样性较贫乏;兴国红鲤和荷包红鲤分别独立地从普通鲤通过体色变异分化而来;日本锦鲤起源于我国红鲤,与兴国红鲤和青田鲤亲缘关系较近,但具体起源于哪几种红鲤,有待进一步研究。

[参考文献]

[1] Jian F Z, Qing J W, Yu Z Y, et al. Genetic divergence between *Cyprinus carpio carpio* and *Cyprinus carpio haematopterus* as

assessed by mitochondrial DNA analysis on origin of European domestic carp, with emphasis [J]. *Genetica*, 2003, 119: 93-97.

- [2] 孙玉华,刘思阳,Tea,等.长江野生鲤鱼与萨瓦河鲤鱼群体结构比较[J]. *水利渔业*, 2007, 27(5): 78-79.
Sun Y H, Liu S Y, Tea, et al. The population genetic structure comparison of Yangtze river common carp and Sava river common carp [J]. *Reservoir Fisheries*, 2007, 27(5): 78-79. (in Chinese)
- [3] 冯开茂,邓廷先,顾舟.荷包红鲤雌核体系杂交代性状研究报告[J]. *重庆水产*, 1993, 1(2): 59-65.
Feng K M, Deng T X, Gu Z. The research paper of the cross-breed traits of the gynogenetic red purse carp [J]. *Chongqing Aquat*, 1993, 1(2): 59-65. (in Chinese)
- [4] 将一硅,梁绍昌,陈本德,等.异源精子在银鲫核发育子代中的生物学效应[J]. *水生生物学报*, 1983, 8(1): 1-13.
Jiang Y G, Liang S C, Chen B D, et al. Biological effect of heterologous sperm on gynogenetic of offspring in *carassius auratus gibelio* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1983, 8(1): 1-13. (in Chinese)
- [5] 陈学年,郭玉娟.彭泽鲫与兴国红鲤杂交优势的研究与利用[J]. *淡水渔业*, 2000, 30(9): 14-16.
Chen X N, Guo Y J. The heterosis research and use of Pengze crucian carp and Singguo red carp [J]. *Freshwater Fisheries*, 2000, 30(9): 14-16. (in Chinese)
- [6] 郑冰蓉,张亚平,咎瑞光.洱海四种鲤鱼线粒体DNA遗传相似性的初步研究[J]. *遗传*, 2001, 23(6): 544-546.
Zheng B R, Zhang Y P, Zan R G. A primary detection of close genetic similarity of 4 *Cyprinus* species in Erhai lake [J]. *Hereditas*, 2001, 23(6): 544-546. (in Chinese)
- [7] 朱世华,杨迎春,沈锡权,等.从细胞色素b基因序列探讨笛鲷属的分子系统发生关系[J]. *动物学报*, 2006, 52(3): 514-521.
Zhu S H, Yang Y C, Shen X Q, et al. Phylogenetic relationship of *Lutianus* inferred from mitochondrial cytochrome b sequences [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2006, 52(3): 514-521. (in Chinese)
- [8] 刘焕章.鱼类线粒体DNA控制区的结构与进化:以鳊鲂鱼类为例[J]. *自然科学进展*, 2002, 12(3): 266-270.
Liu H Z. Structure and evolution of mitochondrial DNA control region in fish: take rhodeus ocellatus as an example [J]. *Progress in Nature Science*, 2002, 12(3): 266-270. (in Chinese)
- [9] Broughton R E, Milam H E, Roe B A. The complete sequence of the zebrafish (*Danio rerio*) mitochondrial genome and evolutionary patterns in vertebrate mitochondrial DNA [J]. *Genome Research*, 2001: 1958-1967.
- [10] Inoue J G, Miya M, Tsukamoto K, et al. Basal actinopterygian relationships: a mitogenomic perspective on the phylogeny of the "ancient fish" [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2003, 26: 110-120.

(下转第65页)