

研究报告

Research Report

罗非鱼选育群体 Cytb 与 D-loop 序列变异信息对比分析

颀晓勇^{1*} 李思发²

1 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东省渔业生态环境重点实验室, 广州, 510300; 2 上海海洋大学, 上海, 201306

* 通讯作者, xiexiaoyongsh@sina.com

摘要 对罗非鱼选育群体 mtDNA Cytb 和 D-loop 序列遗传变异开展对比研究, 根据 2 种方法得到的多态位点比率平均为 0.776 74; 单倍型多样性比率平均为 0.919 45; 核苷酸多样性指数比率平均为 0.769 77; 平均核苷酸差异数比率均值为 0.936 19; Cytb 序列碱基转换率平均 0.042 67; Cytb 碱基颠换率平均 0.004 10; D-loop 序列碱基转换率平均 0.037 25; D-loop 碱基颠换率平均 0.022 84。该结果对比揭示了 Cytb 和 D-loop 序列分析中的差异, 为类似研究提供参考。

关键词 罗非鱼, Cytb, D-loop, 序列变异, 对比分析

Comparison of Base Sequence Diversity of Cytb and D-loop Gene of Nile tilapia

Xie Xiaoyong^{1*} Li Sifa²

1 Key Lab. of Fishery Ecology and Environment, Guangdong Province; South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou, 510300; 2 Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306

* Corresponding author, xiexiaoyongsh@sina.com

DOI: 10.13417/j.gab.033.000982

Abstract Base sequence diversity of mtDNA Cytb and D-loop gene of Nile tilapia were compared. The ratio of polymorphic sites from Cytb to D-loop averaged 0.776 74, the average ratio of haplotype diversity 0.919 45, the ratio of nucleotide diversity averaged 0.769 77, meanwhile it of nucleotide differences number averaged 0.936 19. The average percentage of base conversion of Cytb and D-loop gene of Nile tilapia were 0.042 67 and 0.037 25, whereas the average percentage of base transversion of Cytb and D-loop gene were 0.004 10 and 0.022 84, respectively. These results revealed the differences between base sequence diversity of Cytb and D-loop gene.

Keywords Nile tilapia, Cytb, D-loop, Sequence diversity, Comparison

从分子水平上研究群体的遗传结构特征, 不仅可以了解群体遗传分化水平, 同时也有利于遗传育种和优良群体遗传保护。线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 与核 DNA 相比, 碱基排列与堆叠方式相对简单, 反映母系遗传特征, 传代过程中变异速度较快, 核苷酸发生转换或者颠换的频率较高等, mtDNA 的这些独特之处使其成为鱼类群体遗传学研究中被众多研究人员广泛应用的重要标记方法(Oleinik et al., 2007; Teletchea, 2009)。mtDNA 基因组内不同区域的碱基替换呈现出不同规律和特征, 适合应用于不

同目标和层次群体遗传研究。在 mtDNA 上, 控制区 (D-loop) 是整个 mtDNA 上序列和长度变异最大的区域(Lee and Kocher, 1995), 也是整个 mtDNA 基因组中进化最快的区域, 通常适用于种内群体间遗传差异检测和 分析, 也有用于种间遗传差异分析的研究报道(郭新红等, 2004; 颀晓勇等, 2011)。细胞色素 Cytb 基因是蛋白编码基因, 其进化速度与 mtDNA 其它区域相比较处于中间水平, 适合种群间遗传差异的检测, 是在 DNA 分子水平上分析生物种间和种内遗传变异的良好方法(Teletchea, 2009)。然而, 有关 Cytb 和

基金项目: 本研究由国家“十五”攻关项目(2001BA505B0513)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(中国水产科学研究院南海水产研究所)资助项目(2007TS04)共同资助

D-loop 序列遗传变异信息研究结果之间区别和联系的研究报道相对较少,特别是对于两种技术所得到的遗传变异数据之间关系所知无几。

吉富罗非鱼由上海水产大学引进中国之后,经历十余年时间的遗传改良,成为生产性状优良的养殖新品系(颜晓勇等, 2011),对选育群体从分子水平上进行深入的遗传分析具有重要的意义。本研究开展了新吉富罗非鱼选育群体 mtDNA Cytb 和 D-loop 基因序列变异信息的对比分析,旨在探索 2 种 mtDNA 标记分析结果之间关系,目的是为了针对不同研究材料,选择不同的分析方法,以及扩大研究结果之间横向比较在分析技术上提供借鉴和参考,同时使得相关研究分析更加全面、研究结论更加客观。

1 结果与分析

1.1 基于 Cytb 与 D-loop 序列分析的群体内遗传多态性比率

本研究基于 Cytb 与 D-loop 序列分析得到的群体内遗传多样性比率结果如表 1 所示。根据 2 种方法得到的多态位点比率范围为 0.679 05~0.804 92, 平均 0.776 74; 单倍型多样性比率处于 0.864 12~1.076 12 之间, 平均 0.919 45; 核苷酸多样性指数比率处于 0.713 77~0.884 49 之间, 平均 0.769 77; 平均核苷酸差异数比率处于 0.899 54~1.082 12 之间, 均值为 0.936 19。

1.2 Cytb 与 D-loop 序列中碱基转换率和颠换率

本研究 Cytb 与 D-loop 序列中碱基转换率和颠换率对比如表 2 所示。Cytb 序列碱基转换率处于 0.031 95~0.059 21 之间, 平均 0.042 67; Cytb 碱基颠换率处于 0.002 82~0.005 48 之间, 平均 0.004 10。D-loop 序列碱基转换率处于 0.027 72~0.047 67 之间, 平均 0.037 25; D-loop 碱基颠换率处于 0.015 52~0.027 72 之间, 平均 0.022 84。

表 1 尼罗罗非鱼 5 个选育群体 Cytb/D-loop 序列多态性比率

Table 1 Ratio of nucleotide sequence diversity from Cytb to D-loop gene in 5 populations of Nile tilapia

参数	F ₀	F ₆	F ₇	F ₈	F ₉	平均
Parameter						Average
多态位点比率	0.738 19	0.799 41	0.862 11	0.679 05	0.804 92	0.776 74
Ratio of polymorphic sites						
单倍型多样性比率	1.000 00	0.864 12	0.857 00	0.800 00	1.076 12	0.919 45
Ratio of haplotype diversity						
核苷酸多样性指数比率	0.884 49	0.713 77	0.760 87	0.730 82	0.758 92	0.769 77
Ratio of nucleotide diversity						
平均核苷酸差异数比率	1.082 12	0.862 44	0.924 89	0.899 54	0.911 94	0.936 19
Ratio of nucleotide difference number						

表 2 尼罗罗非鱼 5 个选育群体 Cytb 与 D-loop 序列中碱基转换率和颠换率

Table 2 Percentage of base transition and transversion of Cytb and D-loop gene of Nile tilapia

世代	转换率		颠换率	
	Ratio of base transition		Ratio of base transversion	
Generition	Cytb	D-loop	Cytb	D-loop
F ₀	0.043 23	0.038 80	0.004 70	0.024 39
F ₆	0.045 11	0.041 02	0.003 76	0.027 72
F ₇	0.059 21	0.047 67	0.005 48	0.027 72
F ₈	0.033 83	0.031 04	0.003 76	0.018 85
F ₉	0.031 95	0.027 72	0.002 82	0.015 52
平均	0.042 67	0.037 25	0.004 10	0.022 84
Average				

2 讨论

在遗传方式方面, mtDNA 以非孟德尔遗传方式控制和影响线粒体功能, 与核基因不相一致。同时, 鱼类 mtDNA 的碱基突变率高于核内 DNA, mtDNA 损伤缺少有效的修复机制, 特别需要指出的是有些 mtDNA 突变还存在累加效应, 对 mtDNA 多态现象的量化分析表明两个无关个体之间 mtDNA 碱基平均相差 3% (郭新红等, 2004)。因此, 对群体进行严谨的遗传变异特征分析时, 有必要选择合适的 mtDNA 区域进行分析。有大量采用 Cytb、D-loop 或其它 mtDNA 基因区域进行分析的研究报道 (Gerlach and Musolf, 2000; 陈善元和肖衡, 2003; 于旭蓉等, 2011)。mtDNA 不同区域的进化速率不同, 采用 mtDNA 不同区域分析得到的序列遗传变异特征必然有所差异。但是目前对于 mtDNA 不同区域遗传得到的序列变异特征进行比较和量化分析的研究报道较少, 当前分子标记相关研究多数停留于单种标记分析而缺乏不同种类标记之间横向分析, 较大程度上限制了研究结果的参考价值, 因而这方面仍有大量工作有待深入研究。

mtDNA 序列碱基变异可以分为两种类型, 转换(transition)是发生同种类碱基置换, 即由嘌呤或者嘧啶发生同种类但不同碱基之间的置换; 颠换(transversion)是发生不同种类碱基之间的置换, 嘌呤置换嘧啶或嘧啶置换嘌呤, 即发生嘌呤和嘧啶碱基之间的置换。本研究 Cytb 转换率平均 0.042 67, Cytb 颠换率平均 0.004 10; D-loop 转换率平均 0.037 25, D-loop 颠换率平均 0.022 84。可以得到 Cytb 区域转换 / 颠换比值约为 10.41, D-loop 区域转换 / 颠换比值约为 1.66, 转换率均大于颠换率, 该结论与与其他的与研究结果相一致 (Gerlach and Musolf, 2000; 赵亮等, 2010; 杨慧荣等, 2012)。碱基置换在不同基因区域具有不同生物学功能, 发生于编码多肽的基因区域(比如 Cytb), 则可能改变密码子信息从而使得后续转录、翻译等相应改变, 生物体中可能出现一种新的氨基酸结构取代相应位置原有的某一种氨基酸; 碱基置换也可能使蛋白编码基因中提前出现终止密码, 多肽链合成提前中断。这些碱基置换的结果都使得蛋白编码基因不能正确地形成原有的蛋白质, 从而完全或者部分地失去某种生物学活性(贾若欣等, 2011, 畜牧与兽医, 43(9): 100-104)。本研究不同基因区域碱基转换率 Cytb/D-loop 约为 1.15, 不同基因区域碱基颠换率 Cytb/D-loop 约为 0.18, 推测该结果与 Cytb 编码蛋白, 而 D-loop 与 mtDNA 转录和复制过程中的调控作用有关。

DNA 双链中的不同区域具有不同突变频率, 以及承受不同的进化压力, 因而具有不同的进化速率, 本研究也证实了这一结论。D-loop 区域的变异速率约为 mtDNA 完整分子的 5~10 倍(郑冰蓉等, 2002)。本研究尼罗罗非鱼 5 个选育群体 Cytb/D-loop 序列多态性比率结果表明, 多态位点比率和核苷酸多样性指数 Cytb 仅仅是 D-loop 区域的 0.776 74 和 0.769 77, Cytb/D-loop 单倍型多样度和平均核苷酸差异数比率略高, 分别为 0.919 45 和 0.936 19, 这一结果与控制区是 mtDNA 中不编码多肽链的核苷酸片段, 无修复系统, 不受选择压力的影响, 因而积累了更多的变异(李鹏飞等, 2011), 而细胞色素 b 基因编码蛋白因而进化相对较慢有关。总体来说, 本研究对 Cytb 和 D-loop 区域序列变异信息的对比分析, 有助于为其它类似研究扩大横向比较范围和更深入地理解单种 Cytb 或 D-loop 标记分析方法的研究结果提供参考。

3 材料与方法

3.1 实验材料

上海水产大学 1994 年从菲律宾引进的 5 000 尾

尼罗罗非鱼(基础群体, F_0), 从 1996 年起开展选育, 每年产生一代。本实验的材料是从 F_0 、 F_6 ~ F_9 共 5 代尼罗罗非鱼选育群体中随机采样各 20 尾, 剪取尾鳍, 分别编号后以 95%乙醇保存备用。

3.2 基因组 DNA 提取和 PCR 扩增

参照常规的酚-氯仿抽提程序进行, 并通过琼脂糖凝胶电泳初步检测所提取 DNA 质量。控制区引物序列参考 Agnès 等(1997), 碱基序列为 DL1: 5'-ACCCCTGGCTCCCAAAGC-3' 和 DH2: 5'-ATCTTAGCATCTTCAGTG-3'。细胞色素 b 基因引物参考彭作刚等(2005), 碱基序列为 L14724: 5'-GACTTGAAA AACCACCGTTG-3' 和 H15915: 5'-CTCTCTCCGGA TTACAAGAC-3'。PCR 扩增反应体系为 50 μ L, 包含 10 \times Buffer 5 μ L, dNTP 10 mmol, 上游引物和下游引物各 2 μ L (10 pmol/ μ L), 模板 DNA 200 ng, Taq DNA 聚合酶 2.5 U。PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性设定 4 min; 94 $^{\circ}$ C 高温变性设定 30 s, 模板与引物适温条件下退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 引物聚合与延伸 1 min, 每次扩增程序包含 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。其中, 控制区退火温度 50 $^{\circ}$ C, 细胞色素 b 基因退火温度 56 $^{\circ}$ C。

3.3 DNA 测序

扩增产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 选择扩增效果良好的 PCR 产物进行纯化, 由上海 sangon 公司用 ABI 377 DNA 自动测序仪进行双向序列测定。

3.4 数据处理与分析

用 BLAST 软件(Altschul et al., 1997)搜索 GenBank 中尼罗罗非鱼的控制区和细胞色素 b 基因序列, 与实验测定的尼罗罗非鱼相应序列结果进行比较; 用 Bioedit 软件(Hall, 1999)编辑基因测序结果, 以 CLUSTL W 软件(Thompson et al., 1994)重排序列和比较同源性, 并辅以人工核对校正。用 DNASP 软件(Rozas et al., 2003)统计分析。按 Cytb/D-loop 分别计算由 Cytb 和 D-loop 2 种方法所得到的多态位点比率、单倍型多样性比率、核苷酸多样性指数比率和平均核苷酸差异数比率。按转换与颠换数占相应序列碱基总数比率计算转换率与颠换率。

作者贡献

顾晓勇是本研究的执行人, 完成实验设计、数据分析、论文写作与修改, 也是资助项目之一的负责人; 李思发是另一资助项目的构思者和负责人。

致谢

感谢上海海洋大学为本研究提供罗非鱼种质材料。

参考文献

- Agnès J.F., Adèpo-Gourène B., Abban E.K., and Fermon Y., 1997, Genetic differentiation among natural populations of the *Nile tilapia Oreochromis niloticus* (Teleostei Cichlidae), *Heredity*, 79: 88-96
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., and Lipman D.J., 1997, Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs, *Nucl. Acids. Res.*, 25(17): 3389-3402
- Chen S.Y., and Xiao H., 2003, Molecular markers and inference methods in molecular phylogenetics of fishes, *Yunnan Daxue Xuebao (Ziran Kexue Ban) (Journal of Yunnan University (Natural Sciences))*, 25(S): 146-152 (陈善元, 肖衡, 2003, 鱼类分子系统发育研究中的分子标记与推断方法, 云南大学学报(自然科学版), 25(增刊): 146-152)
- Gerlach G., and Musolf K.F., 2000, Fragmentation of landscape as a cause for genetic subdivision in bank voles, *Conservation Biology*, 14(4): 1066-1074
- Guo X.H., Liu S.J., Liu Q., and Liu Y., 2004, New progress on mitochondrial DNA in fish, *Yichuan Xuebao (Acta Genetica Sinica)*, 31(9): 983-1000 (郭新红, 刘少军, 刘巧, 刘筠, 2004, 鱼类线粒体 DNA 研究新进展, 遗传学报, 31(9): 983-1000)
- Hall T.A., 1999, BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98
- Lee W.J., and Kocher T.D., 1995, Complete sequence of a sea Lamprey (*Petromyza marinus*) mitochondrial genome: Early establishment of the vertebrate genome organization, *Genetics*, 139(2): 873-887
- Li P.F., He Z.T., Xu K.D., Zhu W.B., Xue L.J., and Zhang H.L., 2011, Genetic diversity of *Pampus cinereus* in the east China sea revealed by mtDNA D-loop sequence, *Zhejiang Haiyang Xueyuan Xuebao (Journal of Zhejiang Ocean University)*, 30(1): 14-17 (李鹏飞, 贺舟挺, 徐开达, 朱文斌, 薛利建, 张洪亮, 2011, 东海野生灰鲳 mtDNA D-loop 序列遗传变异分析, 浙江海洋学院学报(自然科学版), 30(1): 14-17)
- Oleinik A.G., Skurikhina L.A., and Brykov V.A., 2007, Divergence of *Salvelinus* species from northeast Asia based on mitochondrial DNA, *Ecology of freshwater Fish*, 16(1): 87-98
- Peng Z.G., Zhang Y.G., He S.P., and Chen Y.Y., 2005, Phylogeny of Chinese catfishes inferred from mitochondrial cytochrome b sequences, *Yichuan Xuebao (Acta Genetica Sinica)*, 32(2): 145-154 (彭作刚, 张耀光, 何舜平, 陈宜瑜, 2005, 从细胞色素 b 基因序列变异分析中国鲴形目鱼类的系统发育, 遗传学报, 32(2): 145-154)
- Rozas J., Sánchez-DelBarrio J.C., Messeguer X., and Rozas R., 2003, DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods, *Bioinformatics*, 19(18): 2496-2497
- Teletchea F., 2009, Molecular identification methods of fish species: Reassessment and possible applications, *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 19(3): 265-293
- Thompson J.D., Higgins D.G., and Gibson T.J., 1994, CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucl. Acids. Res.*, 22(22): 4673-4680
- Xie X.Y., Li S.F., and Cai W.Q., 2011, Analysis of genetic diversity of tilapia during selection processing based on D-loop sequence, *Shanghai Haiyang Daxue Xuebao (Journal of Shanghai Ocean University)*, 20(3): 336-341 (颜晓勇, 李思发, 蔡完其, 2011, 基于 D-loop 序列的罗非鱼选育群体遗传变异分析, 上海海洋大学学报, 20(3): 336-341)
- Yang H.R., Zhao H.H., Mong Z.N., Liu L., and Lin Q.Z., 2012, Comparison of mitochondrial D-loop and cytb sequences of *Squaliobarbus curriculus*, *Zhongshan Daxue Xuebao (Ziran Kexue Ban) (Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni)*, 51(5): 100-106, 136 (杨慧荣, 赵会宏, 蒙子宁, 刘丽, 林权卓, 2012, 赤眼鲮线粒体 D-loop 和 Cytb 基因序列的对比分析, 中山大学学报(自然科学版), 51(5): 100-106, 136)
- Yu X.R., Qiu X.M., Liu X.Y., and Xu L., 2011, Application of research on marine animals population genetic structure using mitochondrial DNA polymorphism, *Shengwu Jishu Tongbao (Biotechnology Bulletin)*, 10: 49-54 (于旭蓉, 仇雪梅, 柳晓瑜, 徐丽, 2011, 线粒体 DNA 多态性在海洋动物群体遗传结构研究中的应用, 生物技术通报, 10: 49-54)
- Zhao L., Xie B.G., Liu Z.J., Xu M.Q., and Li M., 2010, Molecular structure and DNA substitution rate of the mitochondrial control region and cytochrome b in Taihu Salangid, *Neosalanx taihuensis*, *Dongwuxue Zazhi (Chinese Journal of Zoology)*, 45(2): 27-38 (赵亮, 谢本贵, 刘志瑾, 许木启, 李明, 2010, 太湖新银鱼线粒体 D-loop 和 Cytb 片段序列结构与进化速率比较, 动物学杂志, 45(2): 27-38)
- Zheng B.R., Zhang Y.P., Xiao H., Lan J.H., and Zan R.G., 2002, The sequence variation feature of mt DNA D-loop region of *Cyprinus*, *Shuichan Xuebao (Journal of fisheries of China)*, 26(4): 289-294 (郑冰蓉, 张亚平, 肖衡, 蓝家湖, 咎瑞光, 2002, 鲤属鱼类 mtDNA 控制区(D-环区)序列的变异性分析, 水产学报, 26(4): 289-294)