

星斑川鲷、大菱鲆及其杂交后代的线粒体 DNA 序列比较分析

肖永双^{1,2}, 肖志忠¹, 刘清华¹, 滕照军³, 徐世宏¹, 马道远¹, 李 军¹

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院海洋研究所(南通) 海洋科学与技术研究与
发展中心, 江苏 南通 226000; 3. 日照市水产集团总公司, 山东 日照 276805)

摘要: 为了揭示星斑川鲷(*Platichthys stellatus*)♀×大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)♂杂交后代的种质遗传属性, 作者采用线粒体(mt)DNA COI 基因片段和控制区(D-loop)序列对星斑川鲷、大菱鲆及两种间的杂交后代(星斑川鲷♀×大菱鲆♂)遗传特性进行研究。研究结果显示, 基于 mtDNA COI 和 D-loop 序列结果显示星斑川鲷和大菱鲆的种间遗传距离分别为 22.9%和 41.2%, 相似的研究结果显示星斑川鲷♀×大菱鲆♂杂交后代与大菱鲆的遗传距离分别为 22.9%和 41.2%, 遗传差异极其显著。而基于 mtDNA D-loop 序列结果显示星斑川鲷♀×大菱鲆♂杂交后代与星斑川鲷的遗传距离仅为 0.4%, 并且在 mtDNA COI 基因片段上两者序列完全一致, 杂交后代在线粒体 DNA 上呈现明显的偏母遗传。

关键词: 星斑川鲷(*Platichthys stellatus*); 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*); 杂交; 线粒体 DNA

中图分类号: Q347 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2014)06-0005-05

doi: 10.11759/hyxx20130903001

星斑川鲷(*Platichthys stellatus*)隶属于鲷形目(Pleuronectiformes)、鲷科(Pleuronectidae)、川鲷属(*Platichthys*), 主要分布于北太平洋的亚洲和美洲沿岸, 具有肉质鲜美, 内脏团小, 出肉率高等特点, 为近年来开发的养殖新品种^[1]。大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)隶属于鲆科(Bothidae)、菱鲆属(*Scophthalmus*), 主要分布于大西洋东北部沿岸, 黑海、波罗的海和地中海, 具有生长速度、宜驯化、病害较少且便于密养等特点, 成为目前工厂化养殖的理想品种^[2]。上述两种鲆鲷鱼是目前极具养殖和商业开发价值的鱼种。杂交育种技术是改良生物遗传性状的一个重要手段, 远缘杂交是杂交育种技术中快速获得优良新品种常用的有效方法之一, 远缘杂交可以明显地促进种间基因的交流, 动摇遗传的保守型, 引入异种有利基因, 扩大和丰富杂交种的基因库, 因而能够创造出新变异类型^[3]。近年来, 在海水鱼类进行远缘杂交育种的研究工作已经展开, 在鲷形目鱼类种间杂交育种工作也有相关报道。

线粒体 DNA(mtDNA)因其具有严格遵守母系遗传、几乎不发生重组、进化速度快等特征, 已被广泛应用于物种系统关系分析、群体遗传、杂交渐渗、物种鉴定等研究领域^[4]。mtDNA COI 基因片段具有长度适宜、进化速率快、富含系统发育遗传信息等特点, 被作为物种识别的 DNA 条形码广泛应用于探讨物种分类和系统进化关系^[5-6]。Sbisà^[7]等认为线粒体控制区缺

乏编码选择压力而比其他线粒体基因的进化速率更快, 更适合于研究低水平遗传分化, 国内外学者利用 mtDNA 控制区序列作为分子标记对海洋鱼类种群遗传变异展开了广泛的深入研究^[8, 9]。由于线粒体 DNA 具有母性遗传特性, 在亲子代遗传关系研究中, 可以通过线粒体 DNA 序列变异评估亲子代间的遗传分化程度, 从而确定并验证杂交子代偏母遗传特性。目前, 有关星斑川鲷♀×大菱鲆♂杂交的研究工作在国内外尚未见报道。本研究对星斑川鲷、大菱鲆及其杂交子代(星斑川鲷♀×大菱鲆♂)线粒体 DNA 的 COI 基因片段和 D-loop 片段的遗传特性展开了初步研究, 以期对星斑川鲷♀×大菱鲆♂的杂交育种工作提供参考数据。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

2013 年 3 月在日照市海洋水产资源增殖站育苗

收稿日期: 2013-09-03; 修回日期: 2013-10-18

基金项目: 鲆鲷类现代产业技术体系建设项目(Nycytx-50-03); 山东省科技发展计划 (2011GGF01035; 2011GHY11516); 山东省自主创新成果转化重大专项(2012ZHZX1C0802); 青岛市科技发展计划项目 (12-4-1-51-hy; 12-1-4-8-(6)-jch); 江苏省自然科学基金青年基金资助项目 (BK2012222)

作者简介: 肖永双(1982-), 男, 山东青岛人, 博士研究生, 主要从事水产种质资源学研究, 电话: 0532-82898717, E-mail: dahaishuang1982@163.com; 李军, 通信作者, E-mail: junli@qdio.ac.cn

场, 采用人工培育 3 龄星斑川鲈雌性亲鱼(平均体质量均为 1750 g)和 3 龄大菱鲆雄性亲鱼(平均体质量 2400 g), 进行同步促熟培养; 采用人工干法授精杂交, 获得杂交受精卵并进行孵化培养。2013 年 7 月采集平均体长为 23mm 的杂交苗种肌肉及星斑川鲈和大菱鲆背鳍样本, 分析所用星斑川鲈和大菱鲆成体包含人工杂交所用全部亲本, 在 95%酒精中固定以备基因组 DNA 提取(表 1)。在系统发育研究中采用牙鲆(*Paralichthys olivaceus*, AB028664)作为外群进行了系统发育构建。

1.2 基因组 DNA 提取和 PCR 扩增

取星斑川鲈、大菱鲆及其杂交后代样本肌肉组织 100 mg, 采用标准的酚-氯仿方法提取基因组 DNA, 将提取的基因组 DNA 溶解于 100 μ L 双蒸水,

4 $^{\circ}$ C 保存备用。用于扩增 mtDNA COI 的引物分别为: COI-S5'-GATCCAATCCTCTACCAACACC-3'和 COI-R5'-AGCAGCAACGATGGCAAAGACG-3'; mtDN-AD-loop 的引物分别为: DL-S 5'-CCCACCACTAACTCCCAAAGC-3'和 DL-R 5'-TTCACCGAGTGAAACCCCCAC-3'^[10]。PCR 反应体系总体积为 50 L, 其中: 10 \times PCR 缓冲液 5 L, dNTPs 4 L (2.5 mmol/L), 引物各 2 L, *Taq* 酶 2U, 模板 DNA 2 L, 加双蒸水至 50 L。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 然后 35 个循环包括: 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 49 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min; 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 2 L PCR 扩增产物进行 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测(U = 5V/cm)。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。

表 1 样品采集信息

Tab.1 Information of samples

物种名称	采样地点	采样时间(年-月)	样品数(个)	COI 长度(bp)	D-loop 长度(bp)
星斑川鲈	山东日照	2013-07	40	626	446
大菱鲆	山东日照	2013-07	39	626	442
星斑川鲈 \times 大菱鲆 δ	山东日照	2013-07	30	626	446

1.3 数据分析

运用 Dnastar 软件包(DNASTAR, Inc., Madison, USA)进行序列比对并辅以人工矫正。运用 MEGA4.0 计算序列的碱基组成、多态性、序列间的转换颠换比率^[11]。并选择 Kimura 2-parameter 公式计算遗传距离。采用 MEGA4.0 软件, 基于 K-2P 模型构建构建星斑川鲈、大菱鲆及其杂交子代线粒体 COI 基因片段和 D-loop 片段邻近关系树。

2 结果

2.1 mtDNA COI 序列分析结果

本研究所测定样品序列与 GenBank 中注册的星斑川鲈和大菱鲆的 mtDNA COI 基因序列进行比对, 确定所测序列为目的片段, 所得目的片段长度皆为 626bp。星斑川鲈不同, 样本碱基组成呈现一致性, 平均为 A: 24.6%; T: 30.7%; G: 18.2%; C: 26.5%。大菱鲆的碱基组成与星斑川鲈碱基组成略有不同, 平均为 A: 23.6%; T: 33.1%; G: 18.7%; C: 24.6%。星斑川鲈(δ)与大菱鲆(δ)杂交后代碱基组成与星斑川鲈碱基组成呈现一致性, 平均为 A: 24.6%; T: 30.7%; G: 18.2%; C: 26.5%, 其与大菱鲆碱基组成存在差异。单

倍型分析结果显示, 在 626bp 长的片段上, 星斑川鲈(40 个)、大菱鲆(39 个)及其杂交子代(30 个)样本各共享一个单倍型, 其中星斑川鲈和星斑川鲈 \times 大菱鲆 δ 杂交后代各自所共享的单倍型为同一单倍型。

遗传分化结果显示, 基于 mtDNA COI 序列获得的星斑川鲈与大菱鲆种间遗传距离为 22.9%, 属于典型的科属水平的大分类阶元分化。星斑川鲈(δ)与大菱鲆(δ)杂交后代与大菱鲆的遗传分化显著, 遗传距离达 22.9%, 而与星斑川鲈差异为种内遗传分化水平(表 2)。基于邻近关系构建的系统发育结果显示, 星斑川鲈 \times 大菱鲆 δ 杂交后代与星斑川鲈聚为一支形成单系群, 大菱鲆样本单独聚为一支(图 1)。

表 2 基于 mtDNA COI 基因片段和 D-loop 序列的样品间遗传距离

Tab.2 Genetic distance calculated using Kimura 2-parameter model for mtDNA COI and D-loop sequences of samples

物种名称	星斑川鲈	大菱鲆	星斑川鲈 \times 大菱鲆 δ
星斑川鲈	0.000	0.412**	0.004**
大菱鲆	0.229*	0.000	0.412**
星斑川鲈 \times 大菱鲆 δ	0.000*	0.229*	0.000

注: * COI 结果; ** D-loop 结果

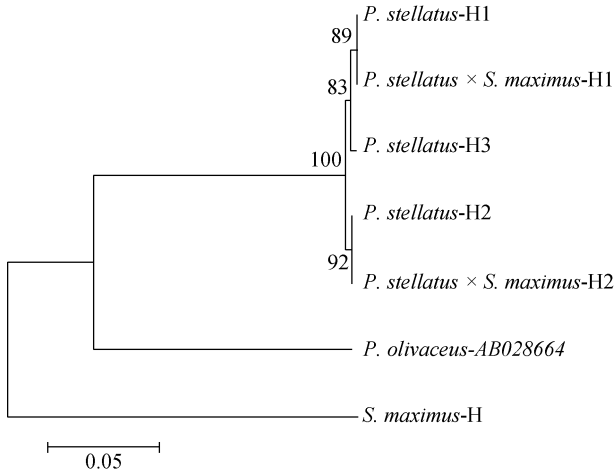


图 1 样品线粒体控制区序列邻近关系系统发育树

Fig.1 Neighbor-joining (NJ) phylogeny estimated using mtDNA D-loop sequence

2.2 mtDNA D-loop 序列分析结果

通过对星斑川鲷、大菱鲆及其杂交子代序列比对分析, 在 449bp 长的 mtDNA D-loop 片段上检测到 148 个多态位点, 其中转换位点 67 个, 颠换位点 72 个, 另外还检测到了 10 个碱基插入/缺失位点。在星斑川鲷 mtDNA D-loop 片段上共检测到了 4 个多态位点, 定义了 3 个单倍型, 其碱基组成为 A: 33.1%; T: 28.7%; G: 15.8%; C: 22.4%。大菱鲆 40 个样本共享一个单倍型, 其碱基组成为 A: 33.3%; T: 27.6%; G: 16.1%; C: 23.1%。在星斑川鲷(♀)与大菱鲆(♂)杂交后代 mtDNA D-loop 片段上共检测到了 3 个多态位点, 定义了 2 个单倍型, 其碱基组成为 A: 33.1%; T: 28.7%; G: 15.8%; C: 22.4%, 与星斑川鲷碱基组成呈现一致性。

遗传分化结果显示, 基于 mtDNA D-loop 序列获得的星斑川鲷与大菱鲆种间遗传距离为 41.2%, 星斑川鲷(♀)与大菱鲆(♂)杂交后代与大菱鲆的遗传分化显著, 遗传距离达 41.2%, 而与星斑川鲷差异仅为 0.4%, 为种内遗传分化水平。星斑川鲷样本间的遗传距离平均为 0.3%, 星斑川鲷(♀)与大菱鲆(♂)杂交后代样本间的遗传距离平均为 0.4%。基于邻近关系构建的 mtDNA D-loop 系统发育结果与基于 mtDNA COI 序列获得的系统发育结果一致, 星斑川鲷♀×大菱鲆♂杂交后代与星斑川鲷聚为一支形成单系群, 大菱鲆样本单独聚为一支。

3 讨论与结论

目前, 关于海水杂交鱼类 mtDNA 遗传特征的研究

已有报道, 徐晖^[12]等采用 mtDNA 16S rRNA 序列片段作为分子标记研究了褐牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)和大西洋牙鲈(*P. dentatus*)及其杂交后代(褐牙鲈♀×大西洋牙鲈♂)的遗传特性, 发现杂交后代与褐牙鲈为同一单倍型, 遵循母性遗传特性。周翰林^[13]等采用 mtDNA COI 基因片段研究了斜带石斑鱼(*Epinephelus coioides*)和鞍带石斑鱼(*E. lanceolatus*)及其杂交后代青龙斑(斜带石斑鱼♀×鞍带石斑鱼♂)遗传特性, 同时也研究了棕点石斑鱼(*E. fuscoguttatus*)和鞍带石斑鱼(*E. lanceolatus*)及其杂交后代虎龙斑(棕点石斑鱼♀×鞍带石斑鱼♂)遗传特性, 结果表明, 两种杂交后代在 mtDNA COI 基因片段上严格遵循母性遗传规律。随着近年来研究发现, 线粒体 DNA 在有些哺乳动物^[14]、鸟类^[15]、昆虫^[16]、贝类^[17]等物种中发现了不同程度的父性遗传现象。在多倍体鱼类杂交研究中, 郭新红^[18]通过 mtDNA 全序列测序发现三倍体湘云鲫(日本白鲫 *Carassium auratus cuvieri*♀×异源四倍体鲫鲤♂)mtDNA 存在父性遗传现象。因此, 在开展鱼种间杂交工作中有必要对杂交种的 mtDNA 遗传特性进行研究, 确定杂交后代 mtDNA 的遗传偏向性。

本研究采用 mtDNA COI 基因片段和 D-loop 序列作为分子标记对星斑川鲷、大菱鲆及其杂交后代(星斑川鲷♀×大菱鲆♂)的 mtDNA 遗传特性进行了研究。研究结果显示, 基于 mtDNA COI 和 D-loop 序列分析结果显示星斑川鲷和大菱鲆的遗传距离分别为 22.9%和 41.2%, 种间遗传差异显著。基于上述 mtDNA 两个分子标记获得的星斑川鲷♀×大菱鲆♂杂交后代与大菱鲆的遗传距离分别为 22.9%和 41.2%, 杂交后代与父本的遗传差异极其显著。基于 mtDNA D-loop 序列结果显示星斑川鲷♀×大菱鲆♂杂交后代与星斑川鲷的遗传距离仅为 0.4%, 并且在 mtDNA COI 基因片段上两者序列完全一致, 杂交后代与母本的遗传差异极其相似。碱基组成分析结果显示, 星斑川鲷和大菱鲆在 mtDNA 两个分子标记上碱基组成存在一定的差异, 星斑川鲷与星斑川鲷♀×大菱鲆♂杂交后代的碱基组成呈现一致性。基于 mtDNA COI 和 D-loop 分子标记的系统发育结果也显示星斑川鲷与星斑川鲷♀×大菱鲆♂杂交后代聚为一支形成一个单系群, 大菱鲆独立聚为一支。综上, 星斑川鲷♀×大菱鲆♂杂交后代在线粒体 DNA 上呈现明显的偏母遗传, 未在星斑川鲷♀×大菱鲆♂杂交后代中检测到父性遗传。

参考文献:

- [1] 王波, 王宗灵, 孙丕喜, 等. 星斑川鲷的养殖条件及发展前景[J]. 渔业现代化, 2006, 5: 16-18.
- [2] 雷霖霖. 大菱鲆养殖技术[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2003: 8.
- [3] 楼允东. 鱼类育种学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 1999: 38-61.
- [4] Meyer A. Evolution of Mitochondrial DNA in Fishes [M]. Amsterdam, Elsevier: Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, 1993: 1-38.
- [5] Hebert P D N, Ratnasingham S, de Ward J R. Barcoding animal life: cytochrome oxidase subunit 1 divergences among closely related species [J]. Proc R Soc B Biol Sci, 2003, 270(S1): 96-99.
- [6] Vences M, Thomas M, Bonett R M, et al. Deciphering amphibian diversity through DNA barcoding: chances and challenges [J]. Philos Trans R Soc B Biol Sci, 2005, 360(1462): 1859-1868.
- [7] 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.
- [8] Wilson A, Cann R, Carr S. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics [J]. Biol J Linn Soc, 1985, 26: 375-400.
- [9] 张方, 米志勇. 动物线粒体 DNA 的分子学研究进展 [J]. 生物工程进展, 1998, 18(3): 25-31
- [10] Han Z Q, Gao T X, Yanagimoto T, et al. Genetic population structure of *Nibea albiflora* in Yellow Sea and East China Sea [J]. Fish Sci, 2008, 74: 544-552.
- [11] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MEGA4: molecular evolutionary genetics analysis (MEGA) software version 4.0[J]. Mol Biol Evol, 2007, 24(8): 1596-1599.
- [12] 徐晖, 肖志忠, 孔晓瑜, 等. 褐牙鲆(♀)、夏鲆(♂)及其杂交子一代线粒体 16S rDNA 序列遗传特性的初步研究[J]. 热带海洋学报, 2007, 26(5): 60-63.
- [13] 周翰林, 杨森, 高川, 等. 两种杂交石斑鱼子一代及其亲本的线粒体 COI 基因遗传变异分析[J]. 热带海洋学报, 2012, 3(1): 1-10.
- [14] Zhao X, Li N, Guo W, et al. Further evidence for paternal inheritance of mitochondrial DNA in the sheep (*Ovis aries*) [J]. Heredity, 2004, 93(4): 399-403.
- [15] Kvist L, Martens J, Nazarenko A, et al. Paternal leakage of mitochondrial DNA in the great tit (*Parus major*) [J]. Mol Biol Evol, 2003, 20(2): 243-247.
- [16] Meusel M S, Moritz R F A. Transfer of paternal mitochondrial DNA during fertilization of honeybee (*Apis mellifera* L.) eggs [J]. Curr Genet, 1993, 24(6): 539-543.
- [17] Dalziel A C, Stewart D T. Tissue-specific expression of male-transmitted mitochondrial DNA and its implications for rates of molecular evolution in *Mytilus* mussels (Bivalvia: Mytilidae) [J]. Genome, 2002, 45(2): 348 - 355.
- [18] 郭新红. 不同倍性鱼类 mtDNA 及三倍体湘云鲫 Sox 基因研究 [D]. 长沙: 湖南师范大学, 2004.

Comparative analysis of genetic variability of mtDNA sequence in *Platichthys stellatus*, *Scophthalmus maximus* and their hybrids

XIAO Yong-shuang^{1, 2}, XIAO Zhi-zhong¹, LIU Qing-hua¹, TENG Zhao-jun³, XU Shi-hong¹, MA Dao-yuan¹, LI Jun¹

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Nantong Branch, Institute of Oceanology Chinese Academy of Sciences, Marine Science and Technology Research and Development Center, Nantong 226000, China; 3. Rizhao Fisheries Group General Corporation, Rizhao 276805, China)

Received: Sept., 3, 2013

Key words: *Platichthys stellatus*; *Scophthalmus maximus*; hybrids; mtDNA

Abstract: Partial COI gene fragments and D-loop sequences of mitochondrial DNA were used to estimate genetic variability in *Platichthys stellatus*, *Scophthalmus maximus* and their hybrids (*P. stellatus*♀ × *S. maximus*♂). Based on the analyses of the mtDNA COI gene and D-loop fragments, the genetic distances (*D*) between *P. stellatus* and *S. maximus* were 22.9% and 41.2% respectively. Similar result was obtained between the hybrids (*P. stellatus*♀ × *S. maximus*♂) and *S. maximus*, which showed significant differentiation between hybrids and male parent. A very low differentiation (*D* = 0.4%) was observed between the hybrid and female parent based on the mtDNA D-loop sequences, and no genetic differentiation was found between them based on the mtDNA COI gene sequences. According to the above results, the hybrids (*P. stellatus*♀ × *S. maximus*♂) showed strict maternal inheritance in mtDNA genome.

(本文编辑: 谭雪静)