

鲈科鱼类线粒体 DNA 控制区结构及系统发育关系

朱世华^{1,2}, 郑文娟^{1,2}, 邹记兴^{3,*}, 杨迎春^{1,2}, 沈锡权²

(1. 宁波大学 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 浙江 宁波 315211; 2. 宁波大学 生命科学与生物工程学院生物系, 浙江 宁波 315211; 3. 华南农业大学 动物科学学院, 广东 广州 510642)

摘要: 采用PCR技术获得了9种鲈科鱼类的线粒体DNA控制区全序列, 并结合从GenBank中下载的3种鲈科鱼类的相应序列采用Clustal W排序后, 对控制区结构进行分析, 识别了其终止序列区、中央保守区和保守序列区3个区域, 指出了终止相关序列的主体是TACAT与其反向互补序列ATGTA以及一系列保守序列(CSB-F、CSB-E、CSB-D和CSB-1、CSB-2、CSB-3), 并给出了它们的一般形式, 同时在康氏似鲈控制区的5'和3'两端发现重复序列。以尖吻鲈作为外类群, 应用邻接法构建的分子系统树表明: 鲈科鱼类分为鲈亚科、鲷亚科、鲳鲈亚科和鲈鲷亚科4个亚科, 各自形成单系群; 鲈亚科与鲷亚科形成姐妹群, 鲳鲈亚科再与他们聚在一起, 鲈鲷亚科处于鲈科鱼类的基部, 与前面3个亚科聚在一起。

关键词: 鲈科; 线粒体 DNA; 控制区; 系统发育

中图分类号: Q959.483; Q349 **文献标识码:** A **文章编号:** 0254-5853-(2007)06-0606-09

Mitochondrial DNA Control Region Structure and Molecular Phylogenetic Relationship of Carangidae

ZHU Shi-hua^{1,2}, ZHENG Wen-juan^{1,2}, ZOU Ji-xing^{3,*}, YANG Ying-chun^{1,2}, SHEN Xi-quan²

(1. Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology (Ningbo University), Ministry of Education, Ningbo 315211, Zhejiang, China;

2. Department of Biology, Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, Zhejiang, China;

3. College of Animal Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642; Guangdong, China)

Abstract: Complete sequences of the mitochondrial DNA control region from nine species of Carangidae were amplified by Polymerase Chain Reaction (PCR), and were aligned by Clustal W with three other species of Carangidae from GenBank. According to the alignment, three domains, the termination associated sequence domain (TAS), the central conserved domain (CD) and the conserved sequence block domain (CSB), were identified in the mtDNA control region of Carangidae. A termination associated sequence (TACAT) and its reverse complementary sequence (ATGTA) were found in the TAS domain. Three conserved blocks (CSB-F, CSB-E, CSB-D) in the CD domain and three conserved sequence blocks (CSB-1, CSB-2, CSB-3) in the CSB domain were also identified. Repeat sequences were found in the 5' and 3' ends of the control region in *Scomberoides commersonianus*. With *Lates calcarifer* as the outgroup, the molecular phylogenetic relationship of Carangidae was analyzed using the neighbor-joining (NJ) method in PAUP 4.0b 10. The results showed that Carangidae could be divided into four subfamilies: Caranginae, Seriolinae, Trachinotinae and Chorineminae. Each of these subfamilies formed a monophyly. Caranginae and Seriolinae formed a sister group, and Trachinotini was sister to the clade of Caranginae and Seriolinae. Chorineminae, which located in the base of the tree and was sister to the other three subfamilies.

Key words: Carangidae; Mitochondrial DNA; Control region; Phylogeny

鱼类线粒体DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 作为分子标记已成为分子系统学研究中的热点 (Miya et al, 2003; Xiang et al, 2004; Zhu et al, 2006)。在线粒体DNA中, 控制区 (control region,

CR) 即D-loop区为非编码区, 包含与DNA复制和转录相关的序列 (Zhang et al, 2003), 但不编码蛋白质, 因此该区域受进化压力较小, 积累了较多的突变, 如碱基替换、插入、缺失, 以及众多的串联重

收稿日期: 2007-09-12; 接受日期: 2007-11-08

基金项目: 国家自然科学基金 (30771652); 宁波大学科研基金 (2005824); 华南农业大学校长基金 (4300-K06141)

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: zoujixing@scau.edu.cn

第一作者简介: 朱世华, 男, 浙江鄞州人, 博士, 教授, 主要从事遗传学研究。E-mail: zhushihua@nbu.edu.cn

复序列等 (Tang et al, 2005), 是整个 mtDNA 序列和长度变异最大的区域。大多数鱼类的 D-loop 基因只有一个, 但也有例外, Lee et al (2001) 在研究溪鱧的线粒体基因组结构中发现其有两个 D-loop 基因。控制区的结构虽较复杂, 但在已研究的生物中都有类似的结构, 可将其分为 3 个区段, 终止序列区 (termination associated sequence, TAS)、中央保守区 (central conserved domain, CD) 和保守序列区 (conserved sequence block, CSB)。目前在一些鱼类中也识别了这 3 个区段各自的保守序列, 如小鲤 (Broughton & Dowling, 1994)、草鱼 (Zhang et al, 1999)、鲮科 (Zhang et al, 2003)、沙鳅亚科 (Tang et al, 2005) 等, Liu (2002) 参考一些已发表的研究结果, 给出鱼类线粒体 DNA 控制区保守序列的普遍形式和不同区域划分标志的参考。由于控制区不同区段的进化速度不同, 故可适用于不同级别的系统发育分析研究, 是探讨近缘种间和种内遗传变异的良好指标 (Li & Zhang, 2004; Tao et al, 2005)。

鲮科 (Carangidae) 鱼类属鲈形目 (Perciformes), 是世界上重要的经济鱼类, 广泛分布在印度洋、太平洋和大西洋这三大洋, 尤其是热带或亚热带海域。目前全世界鲮科鱼类被分成 4 个亚科 32 个属约 140 种 (Nelson, 1994), 中国分布有 21 属 58 种 (Meng et al, 1995), 而 Huang (1994) 认为有 74 种。目前国内外对鲮科的分子系统关系的研究报道相对较少, Reed et al (2001, 2002) 通过 Cyt *b* 基因对鲮科鱼类的分子系统发生进行了研究, Cardenas et al (2005) 利用 D-loop 和 cyt *b* 基因作为分子标记对鲮

科的竹筴鱼属的 5 个地理种群的起源、分化及生物地理学进行研究, 而对于鲮科线粒体 DNA 的控制区结构的研究未见报道。

本研究测定了分布于我国的 9 种鲮科鱼类控制区全序列, 并结合从 GenBank 中下载的 3 种鲮科鱼类的相应序列, 以期对鲮科鱼类控制区结构进行研究, 并分析鲮科鱼类的系统发育关系。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料来源见表 1, 本研究涵盖了我国鲮科鱼类的 8 属 9 种, 同时从 GenBank 下载了 3 种鲮科鱼类的控制区的相应序列, 总共形成 10 属 12 种进行结构分析, 并以同为鲈形目的尖吻鲈 *Lates calcarifer* 作为外类群进行分子系统分析。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取和 PCR 扩增 基因组 DNA 从保存于 95% 乙醇的肌肉样品中提取, 采用苯酚/氯仿抽提法 (Zhu et al, 2006)。用于 PCR 扩增的引物为 DLF1 (5' -AGAGCGCCGGTCTT GTAA-AC-3') 和 DLR1 (5' -GTGCCTGATACCAGCT-CC TT-3')。PCR 反应的模板 DNA 浓度约为 100 ng, 反应体系总体积为 50 μ L, 其中 10 \times Ex Taq Buffer 5 μ L, dNTPs 2 μ L (各 2.5 mmol/L), 引物各 1 μ L (20 μ mol/L), Ex Taq 酶 0.3 μ L (5U/ μ L)。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。每次反应设立不含 DNA 模板的空白对照, 扩增产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

PCR 产物电泳凝胶回收, 用凝胶纯化试剂盒 (上

表 1 鲮科鱼类材料和数据来源
Tab. 1 The origins of tissue samples of Carangidae fishes and DNA data

亚科 Subfamilies	属 Genera	种 Species	GenBank 登录号 GenBank accession number
鲮亚科 Caranginae	丝鲮属 <i>Alectis</i>	长吻丝鲮 <i>A. indica</i> , Rüppell	EU131013*
	副叶鲮属 <i>Alepes</i>	及达副叶鲮 <i>A. djedaba</i> , Forsskål	EU131018*
		丽叶鲮 <i>A. kleinii</i> , Bloch	EU131014*
		黑尻鲮 <i>C. melampygus</i> , Cuvier	AP004445
	鲮属 <i>Caranx</i>	甲若鲮 <i>C. armatus</i> , Rüppell	AP004444
	若鲮属 <i>Carangoides</i>	长吻若鲮 <i>C. chrysophrys</i> , Cuvier	EU131016*
	圆鲮属 <i>Decapterus</i>	蓝圆鲮 <i>D. mariuadi</i> , Temminck and Schlegel	EU131015*
	细鲮属 <i>Selaroides</i>	金带细鲮 <i>S. leptolepis</i> , Cuvier	EU131019*
	竹筴鱼属 <i>Trachurus</i>	竹筴鱼 <i>T. japonicus</i> , Temminck and Schlegel	AP003091
	鲷亚科 Seriolinae	条鲷属 <i>Zonichthys</i>	黑纹条鲷 <i>Z. nigrofasciata</i> , Rüppell
鲳鲷亚科 Trachinotinae	鲳鲷属 <i>Trachinotus</i>	狮鼻鲳鲷 <i>T. blochii</i> , Lacepède	EU131012*
鲭鲷亚科 Chorineminae	鲭鲷属 <i>Scomberoides</i>	康氏似鲭 <i>S. commersonianus</i> Lacepède	EU131017*
尖吻鲈科 Latidae	尖吻鲈属 <i>Lates</i>	尖吻鲈 <i>L. calcarifer</i> , Bloch	DQ010541

*为本实验材料 (The sequences were sequenced in this study)。

海申能)纯化,与pUCm-T载体(上海生工)连接,转化感受态细胞DH5 α ,筛选阳性克隆子,提取克隆质粒,用M13引物在自动测序仪(Applied Biosystems 3730,上海英俊)正反双向测序,以保证所测序列的准确性。

1.2.2 数据处理及分析 测序后的序列,与GenBank下载的序列一起用Clustal W排序,对比GenBank中甲若鲮和竹筴鱼线粒体DNA全序列,分别以tRNA^{Pro}的终点和tRNA^{Phe}的起点查找控制区的起点和终点,同时对比已报道的草鱼(Zhang et al, 1999)、鲮科(Zhang et al, 2003)、沙鳅亚科(Tang et al, 2005)、鲮鱼类(Liu, 2002)、鳊(Zhao et al, 2006)的线粒体DNA控制区序列,找到鲮科鱼类的CSB-F和CSB-1,并以CSB-F和CSB-1的起点分别作为终止序列区、中央保守区和保守序列区的分界线。利用MEGA version 3.0软件分析序列的碱基组成。系统分析与分子进化分析使用软件包PAUP Version 4.0b10(Swofford, 2002)。邻接法分析(NJ)使用Kimura 2-parameter,系统树分支的置信度采用重复抽样分析(Bootstrap analysis)的方法,重复抽样的次数为1000次(Kumar et al, 2004)。

2 结果与分析

2.1 鲮科鱼类线粒体DNA控制区全序列特征

控制区经PCR扩增、回收、克隆、测序,本实验的9种鲮科鱼类线粒体DNA控制区全序列得到的序列长度变化较大,在839~1275 bp之间。与GenBank下载的3种鲮科鱼类控制区全序列一起读入Clustal W中排序,生成供分析的序列矩阵。就12种鲮科鱼类生成的序列矩阵来看,其中发现很多碱基的插入和缺失。T、C、A和G碱基平均含量分别31.4%、21.8%、32.8%、14.0%,显示G碱基相对缺乏,其中A+T的含量(64.2%)高于G+C含量(35.8%)(表2),这个现象与其他鱼类的控制区的碱基含量相似。比较终止序列区、中央保守区和保守序列区这3个区段的T、C、A和G碱基平均含量,T的平均含量在3个区段的变化不是很大,C的平均含量是终止序列区<中央保守区<保守序列区,而A的平均含量在终止序列区(40.0%)和保守序列区(32.4%)显著高于中央保守区(27.1%),中央保守区中G的含量(19.8%)明显高于终止序列区(9.6%)和保守序列区(10.7%),这种碱基组成现象与脊椎动物的控制区各区段的碱基组成相似(Sbisa et al, 1997),这也与各个区段的保守程

度不同有关(Saccone et al, 1991)。

2.2 终止序列区(termination associated sequence, TAS)

终止序列区是控制区变异最大的区域,包含与控制区DNA复制终止相关的序列。鲮科的终止序列区长度约在271~454 bp。在此区段都识别了两个终止相关序列(TAS-1、TAS-2)其中包括核心序列ACAT以及反向互补序列TGTA,可形成稳定的发夹结构。康氏似鲮的终止序列区长度在所研究的鲮科鱼类中最长,为454 bp,这主要是因为康氏似鲮的这个区段出现了(7 \times 57 bp)不间断重复序列(ACAAATACATATATGTACTATCACCATTACCTTATATTA ACCATTAAATCTAATGGA)以及一段不完全的重复序列(图1)。同时我们用RNA Structure Version 4.3(Mathews et al, 2004)对其重复序列单元的二级结构进行分析,发现其能形成茎环结构(图2)。在以往的研究中,有很多生物在终止序列区段也发现有串联重复序列,其中在鱼类中就有不少的例子,如小鲤(Broughton & Dowling, 1994)、鲮属(Faber & Stepien, 1998)、鲮形目(Zhang et al, 2000)、河鲈、粘鲈(Nesbo et al, 1998)、野鲮(Sell & Spirkovski, 2004)、亚洲龙鱼(Yue et al, 2006)、鲮属(Tang et al, 2007),重复片段一般介于几十bp到300 bp之间。重复片段中大多有TACAT以及反向互补序列ATGTA的核心序列,并能形成发夹结构,但有些重复片段中没有这二个核心序列(Faber & Stepien, 1998)。

2.3 中央保守区(central conserved domain, CD)

中央保守区是控制区最为保守的区域(Saccone et al, 1991),几乎在所有的种类中都十分保守。Southern et al (1988)在哺乳动物海豚mtDNA控制区识别了中央保守区的保守序列B、C、D、E、F。Lee et al(1995)对众多鱼类的序列进行比较时,只能识别CSB-D的存在,但Liu(2002)则认为Lee et al(1995)对鱼类中央保守区范围的界定是错误的。而我们在对部分鲮科鱼类与其他鱼类相应中央保守区序列进行比对分析时,识别了CSB-F、E、D。鲮科鱼类中,CSB-F序列的关键形式为:ATGTAGTAAGAACCTACCA,但存在变异,如:康氏似鲮的CSB-F序列为:ATGGGCATAAACGAGAGACCACCA,与其他鲮科鱼类就有较大的差异。紧跟CSB-F后面的是CSB-E,CSB-E的关键序列为:AGGGACAAC-ATTGTGGGGGT,含有GTGGG-box(Lee et al,

表 2 鲈科鱼类控制区序列碱基组成及长度
 Tab. 2 Nucleotide compositions and length of the mitochondrial DNA control region in Carangidae fishes

	终止序列区 Termination associated sequence					中央保守区 Central conserved domain				
	T	C	A	G	长度 Length	T	C	A	G	长度 Length
<i>Alectis indica</i>	26.6	21.4	41.7	10.3	290	33.7	21.8	24.3	20.2	362
<i>Alepes djedaba</i>	30.7	15.9	43.8	9.7	290	31.7	21.6	26.6	20.2	357
<i>Alepes kleinii</i>	29.6	21.8	40.8	7.8	294	31.3	20.7	26.5	21.5	358
<i>Caranx melampygus</i>	33.8	18.3	36.7	11.3	311	32.6	21.1	29.1	17.1	374
<i>Carangoides armatus</i>	32.4	19.9	38.9	8.8	296	34.2	19.4	25.6	20.8	360
<i>Carangoides chrysophrys</i>	32.3	21.5	37.7	8.4	297	33.3	21.1	27.8	17.8	360
<i>Decapterus maruadsi</i>	31.9	14.7	42.3	11.1	279	31.0	20.7	26.8	21.5	358
<i>Selaroides leptolepis</i>	32.3	18.9	40.0	8.8	285	33.2	23.5	25.4	17.9	358
<i>Trachurus japonicus</i>	32.8	19.1	37.2	10.9	293	31.7	20.6	25.8	21.9	360
<i>Zonichthys nigrofasciata</i>	32.1	18.8	38.7	10.3	271	31.4	20.6	27.4	20.6	369
<i>Trachinotus blochii</i>	30.4	15.2	39.2	15.2	283	31.4	22.0	27.5	19.0	363
<i>Scomberoides commersonianus</i>	33.7	19.2	42.1	5.1	454	28.9	20.4	31.6	19.1	367
Average.	31.6	18.8	40.0	9.6		32.0	21.1	27.1	19.8	

	保守序列区 Conserved sequence block					整个控制区 Whole control region				
	T	C	A	G	长度 Length	T	C	A	G	长度 Length
<i>Alectis.indica</i>	30.8	26.4	31.3	11.5	208	30.6	22.8	31.9	14.8	860
<i>Alepes djedaba</i>	30.5	26.2	30.5	12.9	210	31.0	20.8	33.4	14.8	857
<i>Alepes kleinii</i>	31.1	25.8	30.1	12.9	209	30.7	22.3	32.3	14.8	861
<i>Caranx melampygus</i>	32.2	26.9	31.7	9.1	208	32.9	21.5	32.4	13.2	893
<i>Carangoides armatus</i>	30.1	27.3	32.1	10.5	209	32.6	21.5	31.7	14.2	865
<i>Carangoides chrysophrys</i>	29.3	27.9	31.7	11.1	208	32.0	22.9	32.1	12.9	865
<i>Decapterus maruadsi</i>	28.4	27.5	29.4	14.7	204	30.7	20.3	32.6	16.4	841
<i>Selaroides leptolepis</i>	26.9	27.9	32.4	12.8	219	31.3	23.1	32.0	13.6	862
<i>Trachurus.japonicus</i>	30.1	26.3	31.1	12.4	209	31.7	21.5	31.0	15.9	862
<i>Zonichthys nigrofasciata</i>	33.3	23.2	31.9	11.6	207	32.1	20.6	32.2	15.1	839
<i>Trachinotus blochii</i>	28.6	29.5	33.2	8.6	220	30.4	21.7	32.8	15.1	866
<i>Scomberoides commersonianus</i>	30.2	26.7	37.2	5.9	454	31.1	22.2	37.3	9.4	1275
Average.	30.1	26.8	32.4	10.7		31.4	21.8	32.8	14.0	

1995)。鲈科鱼类的CSB-D序列与已研究过的其他鱼类的相应序列相似 (Lee et al, 1995; Chen et al, 1998; Zhao et al, 2006), 其关键序列为: TATTC-TGGC ATTTGGTTCCTA, 在CSB-D后面发现了一些保守片段以及T、C、A和G分别以3~6个串联形式存在, 但本研究中还没有找到CSB-C和CSB-B。

2.4 保守序列区 (conserved sequence block, CSB)

哺乳动物的保守序列区中一般都存在保守序列CSB1, 相似性较高的CSB2和CSB3不一定存在 (Saccone et al, 1991; Sbisal et al, 1997)。鱼类保守序列区中CSB-1的存在不具有普遍性 (Lee et al, 1995; Chen et al, 1998)。

在识别鲈科鱼类保守序列区时, 虽然没有找到以往研究中所描述的CSB-1特征基序 (GACATA),

但与其他鲈形目鱼类对比时发现了类似CSB-1的特征基序 (GAGCATA), 并通过鲈科鱼类控制区序列的比对分析, 甄别出了鲈科鱼类的CSB-1的关键序列: CATAT TAGGATATCAAGAGCATAA, 与其他鲈形目鱼类的CSB-1序列很相似 (Nesbo et al, 1998)。相对而言, 鲈科鱼类的CSB2和CSB3比较保守: CSB2的序列为GTAAAACCCCCCTACCC CCC, 含有以TA间隔的两段6个串联的C; CSB3的序列为TCCTGAAAACCCCCCGGAAA CAGGAAA, 同时还发现在控制区的3'端除了黑纹条鲷和康氏似鲈外, 其他鲈科鱼类都有一段很保守序列: TATTATAATATTTACAT。康氏似鲈在保守序列区的长度也是最长的, 因为它在CSB3后面50nt处比一般鲈科鱼类多出了250bp左右, 在多出的

250 bp 序列中富含 A 和 T, 其中有多次的 ATATTA 和 TATAAT 的间隔重复 (图 1)。

2.5 系统发育分析

基于线粒体控制区的全序列, 以尖吻鲈为外类群对鲽科进行系统发育分析。应用 NJ 法构建了分子系统发育关系树(图 3), 枝长表示分歧度, 枝上的数值是 1000 次重复抽样检验的置信度值。从图中可以看出, 所研究的鲽科鱼类形成四个分支, 各自都形成单系群, 从上到下依次: 鲽亚科 (I)、鰽亚科 (II)、鲳鲽亚科 (III)、鲱鲽亚科 (IV)。鲽亚科与鰽亚科形成姐妹群 (BP=48), 鲳鲽亚科再与他们聚在一起 (BP=44), 鲱鲽亚科处于鲽科类群的基部, 与前面 3 个亚科聚在一起 (BP=76), 虽然置信度不是很高, 但是与我们用 *Cyt b* 和 16S rRNA 研究的结果相一致 (未发表资料)。

3 讨论

3.1 鲽科鱼类控制区结构

除了康氏似鲽在控制区的 5' 和 3' 两端存在的重复序列以外, 其他所研究的鲽科鱼类没有出现重复序列, 控制区结构与别的脊椎动物相似。通过对比其他鱼类的控制区结构, 发现了鲽科鱼类控制区的终止相关序列 (TAS-1、TAS-2)、中央保守区关键序列 (CSB-F、CSB-E、CSB-D) 以及保守序列区关键序列 (CSB-1、CSB-2、CSB-3)。

终止序列区 (TAS) 被认为是 H-链复制的终点, 很多生物在这一区域有重复序列出现, 重复序列单元的碱基组成、长度以及重复次数的不同, 而造成不同种类间线粒体 DNA 控制区的差异。大部分鲽科鱼类控制区有两个终止相关序列 (TAS-1、TAS-2), 包括核心序列 ACAT 以及反向互补序列 TGTA, 可形成稳定的发夹结构, 但没有发现重复序列。而康氏似鲽的终止序列区出现了不间断重复

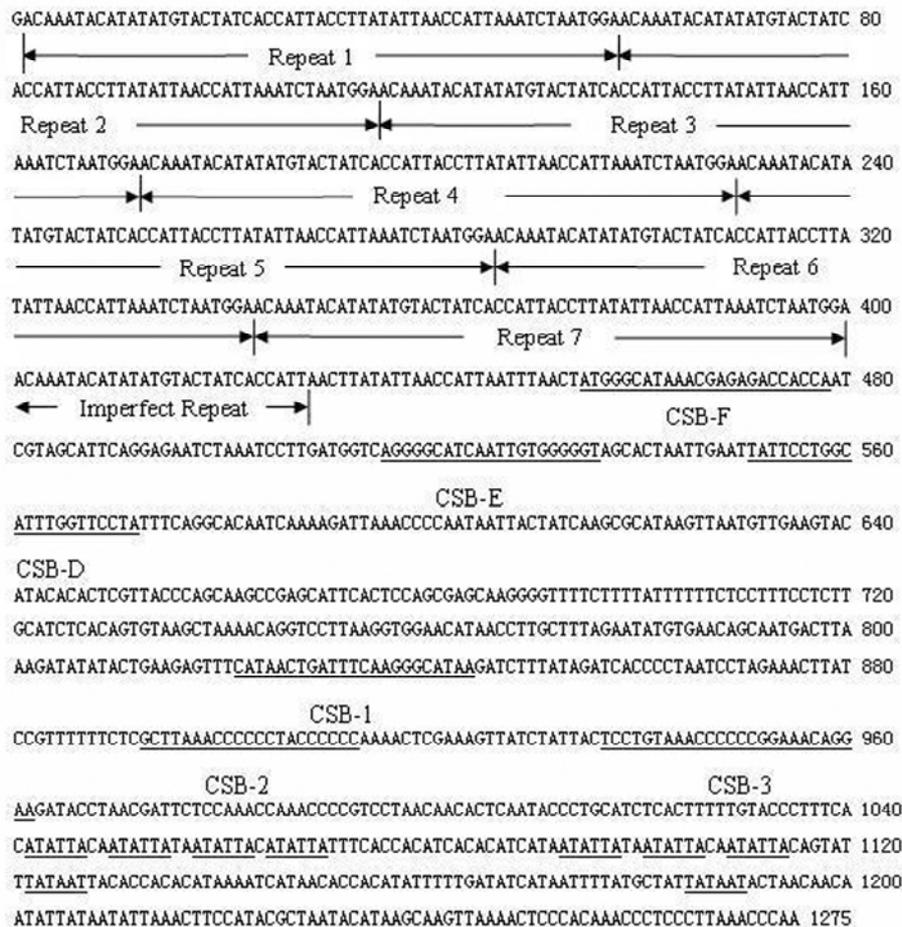


图 1 康氏似鲽控制区序列

Fig. 1 Control region sequences of *Scomberoides commersonianus*

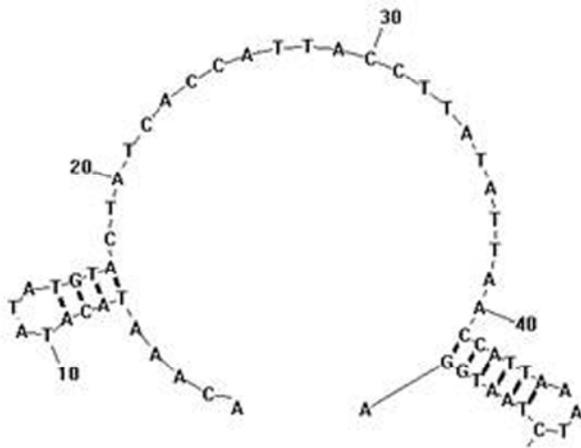


图 2 康氏似鲈的重复序列单元的二级结构

Fig. 2 Secondary structure of repeat sequence unit of *Scomberoides commersonianus*

序列, 其中包括TACAT以及反向互补序列ATGTA (图1), 用RNA structure Version 4.3(Mathews et al, 2004) 对其重复序列单元的二级结构进行分析后, 发现能形成稳定的茎环结构(图2)。另外, 绵羊(Zardoya et al, 1995)、鲟鱼(Buroker et al, 1990)的线粒体控制区也有多个重复序列包含终止序列区(TAS)的核心序列, 但在人的线粒体控制区里只有一个。Madsen et al (1993)发现牛的线粒体的控制区存在7个相似的TAS核心序列, 但只有一个是与48-kDa蛋白真正结合而起到终止H-链复制的作用, 其他的则不行使功能。Sbisa et al(1997)在哺乳动物线粒体控制区中识别到终止序列ETAS1和ETAS2, 并认为ETAS1是识别终止信号的终止子, 而ETAS2则是辅助识别终止信号的因子。所以对存在多个重复TAS核心序列的生物究竟有几个核心序列能起到H-链复制终点的作用, 至今还不十分清楚。

鲈科鱼类线粒体控制区的中央保守区关键序列CSB-F、E、D, 与其他鱼类中央保守区的关键序列也相似, 其CSB-E关键序列中含有Lee et al (1995)所描述的GTGGG-box; 特别是CSB-D, 不仅在鲈科鱼类中是最保守的, 而且和其他鲈形目鱼类的相应序列相比也比较保守。综合目前的研究结果, 初步认为CSB-D可能与H-链的复制(Faber & Stepien, 1998)和D-环产生的开始(Clayton, 1982)有关, 还可能与线粒体的代谢有一定联系(Lee et al, 1995)。但中央保守区的具体功能目前还不清楚。

保守序列区可能是整个控制区最关键的部分,

因为研究者认为它包含了H-链复制的起始区(H-strand replication origin, OH)、H-链启动子(promoters for the transcription of H-strand, HSP)和L-链启动子(promoters for the transcription of L-strand, LSP)以及3个短的保守区(CSB1、CSB2和CSB3)(Saccone et al, 1991)。有的学者认为保守序列区的CSB-1在哺乳动物的控制区中广泛存在, 而且与H-链复制引物的产生有关(Sbisa et al, 1997), 并由此推断: 凡脊椎动物都存在CSB1, 而后来的研究否定了这一推论: 虾虎鱼(Chen et al, 1998)、肺鱼和虹鳟(Zhang et al, 1999)等缺少这段序列。本文研究的鲈科鱼类尽管没有与哺乳动物完全相同的CSB1序列, 但通过与其他鲈形目鱼类对比分析, 发现了类似CSB1特征基序(GAGCATA), 还发现其CSB2和CSB3比CSB1保守。而CSB2和CSB3这两个保守序列在哺乳动物的控制区中却不一定存在, 所以, 有的学者认为CSB2和CSB3这两个保守序列不包含H-链复制与转录相关蛋白的结合位点, 而与控制区复制结构的包装有关(Sbisa et al, 1997); 也有学者认为CSB2是mtDNA行使正常功能的必要元件(Broughton & Dowling, 1997)。总之, 不同种类间各个保守区(CSB1、CSB2和CSB3)的结构可能与其所行使的特定功能相关。

3.2 康氏似鲈重复序列的产生

在康氏似鲈控制区5'端的终止区出现了不间断重复序列以及在3'端保守序列区出现了间隔重复序列。产生重复序列的机制有四种解释: 即分子间和分子内的重组、滑动错配(Mundy et al, 1996)、非正常延长(Buroker et al, 1990)或转座。而脊椎动物线粒体DNA一般不发生重组(Faber & Stepien, 1998), 转座机制虽然产生重复序列, 但是它的机理则适合在重复序列之间有插入序列, 而5'端的终止区出现了不间断重复序列不支持这种模式; 非正常延长和滑动错配机制都是在控制区基因复制时链的滑动而产生碱基的错配(Wilkinson & Chapman, 1991)。康氏似鲈5'端的终止区出现的不间断重复序列能折叠成稳定的茎环结构, 正因为这种茎环结构, 才使复制的滑动链退火, 而后滑动链又退回到茎环结构产生前的位置再重新延伸, 再次延伸使形成茎环结构的序列得到了再次复制, 但是关于这段序列重复的次数由什么决定, 还有待研究。在鲈形目美洲黄盖鲈、美洲拟鲈(Lee et al, 1995)和鲤形目小鲤(Broughton & Dowling, 1997)

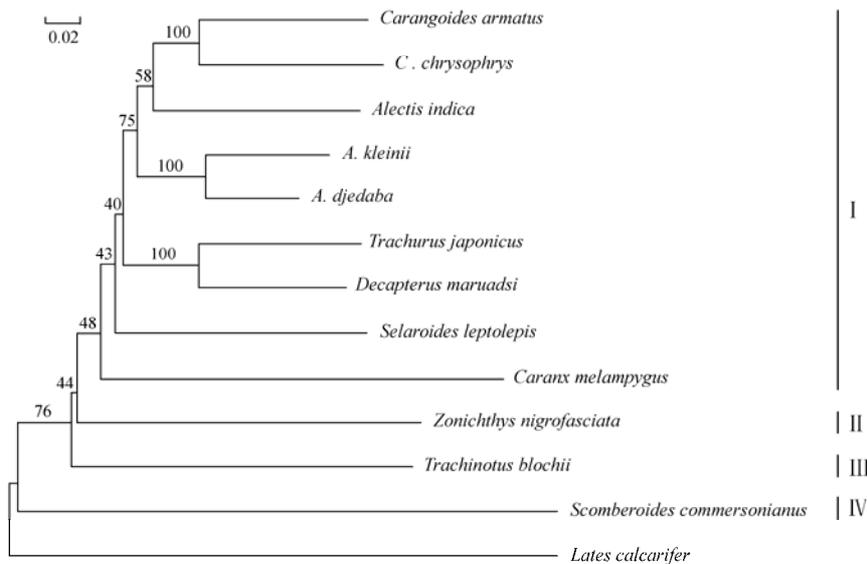


图 3 基于鲹科鱼类控制区全序列通过邻接法构建的分子系统树

Fig. 3 Molecular phylogenetic tree on complete control region sequences of Carangidae fishes constructed by Neighbour-Joining method of PAUP Version 4.0b10 with Bootstrap Test (1000 replications)

的控制区中也发现在CSB-3和tRNA^{Phe}之间有插入的重复序列；在亚洲龙鱼的CSB3后面有一段TA微卫星序列，但这些重复序列与康氏似鲹的控制区的3'端的重复序列都不相似。Fumagalli et al (1996)认为在控制区的5'端的重复序列一般比较保守，而在3'端这种保守性就不是很明显。Broughton & Dowling (1997)认为控制区5'端的重复序列更加原始，正是5'端的重复序列的产生而加速了3'端方向的重复序列的产生，并认为两端重复序列所产生的机制是相似的，有学者把这种现象称为“边缘效应”。但康氏似鲹控制区两端重复序列的功能以及鲹亚科其他鱼类是否存在和康氏似鲹类似的重复序列以及不同康氏似鲹个体间重复序列的长度、次数以及位置是否出现变异还需进一步研究。

3.3 鲹科鱼类系统发育分析

早期基于形态水平对鲹科下的4个亚科关系一直存在争议 (Cheng & Zheng, 1987; Institute of Zoology et al, 1962; Smith-Vaniz, 1984; Gushiken, 1988)。本文通过控制区序列应用NJ法构建了鲹科鱼类分子系统发育关系树，图3表明：所研究的鲹科鱼类形成4个分支：鲹亚科 (I)、鲷亚科 (II)、鲳鲹亚科 (III)、鲹亚科 (IV)，而且各个亚科

都形成了各自的单系类群。鲹亚科与鲷亚科形成姐妹群，鲳鲹亚科再与他们聚在一起，鲹亚科处于鲹科类群的基部，与前面三个亚科聚在一起，这与我们用cyt b和16S rRNA对鲹科鱼类系统发育分析的结果 (未发表资料)和Reed et al (2002)利用最大简约法 (MP)、最大似然法 (ML)以及Bayesian方法构建的部分鱼类基于Cyt b全序列分子系统树的研究结果相一致的，而与基于形态 (Gushiken, 1988)与同工酶 (Kijima et al, 1986)变异所构建的鲳鲹亚科与鲹亚科先行相聚的系统关系不同。从cyt b和16S rRNA基因序列的碱基差异来看，鲹亚科的康氏似鲹都与其他鲹科相差很大，控制区的进化速度被认为是线粒体基因中是最快的，其差异应更大。本文的结果印证了这点：康氏似鲹控制区的结构和其他鲹科鱼类相比也很特殊，在康氏似鲹控制区的5'和3'两端都出现了重复序列，正是这些重复序列才产生了快速的变异，使康氏似鲹与其他鲹科鱼类线粒体DNA控制区产生较大差异。在基于控制区序列所构建的分子系统树上，康氏似鲹所在的鲹亚科处于树的基部，最早分离出来，可能是鲹科鱼类最原始的亚科。

参考文献:

- Broughton RE, Dowling TE. 1994. Length variation in mitochondrial DNA of the minnow *Cyprinella spiloptera*[J]. *Genetics*, **138**(1): 179-190.
- Broughton RE, Dowling TE. 1997. Evolutionary dynamics of tandem repeats in the mitochondrial DNA control Region of the minnow *Cyprinella spiloptera*[J]. *Mol Biol Evol*, **14**(12): 1187-1196.
- Buroker NE, Brown JR, Gilbert TA, O'Hara PJ, Beckenbach AT, Thomase WK, Smith MJ. 1990. Length heteroplasmy of sturgeon mitochondrial DNA: An illegitimate elongation model[J]. *Genetics*, **144**: 157-163.
- Cardenas L, Hernandez CE, Poulin E, Magoulas A, Kornfield I, Ojeda FP. 2005. Origin, diversification, and historical biogeography of the genus *Trachurus* (Perciformes: Carangidae) [J]. *Mol Phylogenetics Evol*, **35**: 49-507.
- Chen IS, Hsu CH, Hui CF, Shao KT, Miller PJ, Fang LS. 1998. Sequence length and variation in the mitochondrial control region of two freshwater gobiid fishes belonging to *Rhinogobius* (Teleostei: Gobioidaei) [J]. *Journal of Fish Biology*, **53**: 179-191.
- Cheng QT, Zheng BS. 1987. Systematic Synopsis of Chinese Fishes[M]. Beijing: Science Press. [成庆泰, 郑葆珊. 1987. 中国鱼类系统检索. 北京: 科学出版社.]
- Clayton DA. 1982. Replication of animal mitochondrial DNA[J]. *Cell*, **28**: 693-705.
- Faber JE, Stepien CA. 1998. Tandemly Repeated sequences in the mitochondrial DNA control region and phylogeography of the pike-perches *Stizostedion*[J]. *Mol Phylogenetic Evol*, **10**(3): 310-322.
- Fumagalli L, Taberlet P, Favre L, Hausser J. 1996. Origin and evolution of homologous repeated sequences in the mitochondrial DNA control region of shrews [J]. *Mol Biol Evol*, **13**(1): 31-46.
- Gushiken S. 1988. Phylogenetic relationships of the Perciformes genera of the family Carangidae[J]. *Jpn J Ichthyol*, **34**: 443-461.
- Huang ZG. 1994. Marine Species and Their Distributions in China's Seas[M]. Beijing: China Ocean Press. [黄宗国. 1994. 中国海洋生物种类与分布. 北京: 海洋出版社.]
- Institute of Zoology, Chinese Academy of Science Oceanology, Chinese Academy of Science, Shanghai Fisheries University. 1962. Fish Fauna of the South China Sea [M]. Beijing: Science Press. [中国科学院动物研究所, 中国科学院海洋研究所, 上海水产学院主编. 1962. 南海鱼类志. 北京: 科学出版社.]
- Kijima A, Taniguchi N, Ochiai A. 1986. Genetic relationships in the family Carangidae[A]. In: Uyeno T, Arai R, Taniuchi T, Matsuura K. Indo-Pacific Fish Biology: Proceedings of the Second International Conference on Indo-Pacific Fishes[C]. Tokyo: Ichthyological Society of Japan, 840-848.
- Kumar S, Tamura K, Nei M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment[J]. *Briefings in Bioinformatics*, **5**: 150-163.
- Lee JS, Miya M, Lee YS, Kim CG, Park EH, Aoki Y, Nishida M. 2001. The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of the self-fertilizing fish *Rivulus marmoratus* (Cyprinodontiformes, Rivulidae) and the first description of duplication of a control region in fish[J]. *Gene*, **280**(1-2): 1-7.
- Lee WJ, Conroy J, Howell WH, Kocher TD. 1995. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions [J]. *J Mol Evol*, **41**(1): 54-66.
- Li QQ, Zhang YP. 2004. A molecular phylogeny of *Macaca* based on mitochondrial control region sequences[J]. *Zool Res*, **25**(5): 385-390. [李青青, 张亚平. 2004. 基于线粒体控制区序列的猕猴属系统发育研究. *动物学研究*, **25**(5): 385-390.]
- Liu HZ. 2002. Structure and evolution of mitochondrial DNA control region in fish: Take *Rhodeus ocellatus* as an example[J]. *Progress in Natural Science*, **12**(3): 266-270. [刘焕章. 2002. 鱼类线粒体DNA控制区的结构与进化: 以鲮鱼类为例. *自然科学进展*, **12**(3): 266-270.]
- Madsen CS, Ghivizzani SC, Hauswirth WW. 1993. Protein binding to a single termination-associated sequence in the mitochondrial DNA D-Loop region[J]. *Mol Cell Biol*, **13**: 2162-2171.
- Mathews DH, Disney MD, Childs JL, Schroeder SJ, Zuker M, Turner DH. 2004. Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, **101**: 7287-7292.
- Meng QW, Su JX, Miao XZ. 1995. Fish Taxonomy [M]. Beijing: China Agriculture Press. [孟庆闻, 苏锦祥, 缪学祖. 1995. 鱼类分类学. 北京: 中国农业出版社.]
- Miya M, Takeshima H, Endo H, Ishiguro NB, Inoue JG, Mukai T, Satoh TP, Yamaguchi M, Kawaguchi A, Mabuchi K, Shirai SM, Nishida M. 2003. Major patterns of higher teleostean phylogenies: A new perspective based on 100 complete mitochondrial DNA sequences[J]. *Mol Phylogenetic Evol*, **26**: 121-138.
- Mundy NI, Winchell CS, Woodruff DS. 1996. Tandem repeats and heteroplasmy in the mitochondrial DNA control region of the loggerhead shrike (*Lanius ludovicianus*) [J]. *Heredity*, **87**: 21-26.
- Nelson JS. 1994. Fishes of the World. Third edition[M]. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- Nesbo CL, Arab MO, Jakobsen KS. 1998. Heteroplasmy, length and sequence variation in the mtDNA control regions of three percid fish species (*Perca fluviatilis*, *Acerina cernua*, *Stizostedion lucioperca*) [J]. *Genetics*, **148**: 1907-1919.
- Reed DL, deGravelle MJ, Carpenter KE. 2001. Molecular systematics of *Selene* (Perciformes: Carangidae) based on cytochrome b sequences[J]. *Mol Phylogenetics Evol*, **21**: 468-475.
- Reed DL, Carpenter KE, deGravelle MJ. 2002. Molecular systematics of the Jacks (Perciformes: Carangidae) based on mitochondrial cytochrome b sequences using parsimony, likelihood, and Bayesian approaches[J]. *Mol Phylogenetics Evol*, **23**: 513-524.
- Saccone C, Pesole G, Sbisà E, 1991. The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: Structure-function model and evolutionary pattern[J]. *J Mol Evol*, **33**: 83-91.
- Sbisà E, Tanzariello F, Reyes A, Pesole G, Saccone C. 1997. Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: Identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications[J]. *Gene*, **205**: 125-140.
- Sell J, Spirkovski Z. 2004. Mitochondrial DNA differentiation between two forms of trout *Salmo letnica*, endemic to the Balkan Lake Ohrid, reflects their reproductive isolation[J]. *Molecular Ecology*, **13**: 3633-3644.
- Smith-Vaniz WF. 1984. Carangidae: relationships[A]. In: Moser HG, Richards WJ, Cohen DM, Fahay MP, Kendall AW, Richardson SL. Ontogeny and Systematics of Fishes[M]. Am Soc Ichthyol Herpetol: Spec Publ, **1**: 522-533.
- Southern SO, Southern PJ, Dizon AE. 1988. Molecular characterization of a cloned dolphin mitochondrial genome[J]. *J Mol Evol*, **28**(1-2): 32-40.
- Swofford DL. 2002. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods), Version 4.0b 10[M]. Sunderland: Sinauer

- Associates.
- Tang QY, Liu HZ, Yang XP, Xiong BX. 2005. Studies on the structure of the mitochondrial DNA control region and Phylogenetic Relationships of the subfamily Botiinae[J]. *Acta Hydrobiological Sinica*, **29** (6): 645-653. [唐琼英, 刘焕章, 杨秀平, 熊邦喜. 2005. 沙鳅亚科鱼类线粒体DNA控制区结构分析及系统发育关系的研究. 水生生物学报, **29** (6): 645-653.]
- Tang WQ, Hu XL, Yang JQ. 2007. Species validities of *Coilia brachygnathus* and *C. nasus taihuensis* based on sequence variations of complete mtDNA control region [J]. *Biodiversity Science*, **15** (3): 224-231. [唐文乔, 胡雪莲, 杨金权. 2007. 从线粒体控制区全序列变异看短颌鲚和湖鲚的物种有效性. 生物多样性, **15** (3): 224-231.]
- Tao FY, Wang XM, Zheng HX, Fang SG. 2005. Genetic structure and geographic subdivision of four populations of the Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) [J]. *Zool Res*, **26** (2): 162-167. [陶峰勇, 王小明, 郑合勋, 方盛国. 2005. 中国大鲵四种群的遗传结构和地理分化. 动物学研究, **26** (2): 162-167.]
- Wilkinson GS, Chapman AM. 1991. Length and sequence variation in evening bat D-loop mtDNA[J]. *Genetics*, **128**: 607-617.
- Xiang F, Zou JX, Deng FJ, Liu SY, Sui Y. 2004. The molecular taxonomy and phylogeny of zebrafish (*Danio rerio*) based on the Cyt-*b* partial sequences [J]. *Chinese Journal of Zoology*, **39**(5): 13-18. [项方, 邹记兴, 邓凤姣, 刘思阳, 隋阳. 2004. 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. 动物学杂志, **39**(5): 13-18.]
- Yue GH, Liew WC, Orban L. 2006. The complete mitochondrial genome of a basal teleost, the Asian arowana (*Scleropages formosus*, Osteoglossidae) [J]. *BMC Genomics*, **7**:242.
- Zardoya R, Villalta M, Lopez-Porez MJ, Garrido-Pertierra A, Montoya J, Bautista JM. 1995. Nucleotide sequence of the sheep mitochondrial DNA D-loop and its flanking tRNA genes[J]. *Curr Genet*, **28**: 94-96.
- Zhao JL, Wang WW, Li SF, Cai WQ. 2006. Structure of the mitochondrial DNA control region of the siniperce fish and their phylogenetic relationship [J]. *Acta Genetica Sinica*, **33** (9): 793-799. [赵金良, 王伟伟, 李思发, 蔡完其. 2006. 鲮类鱼类的线粒体 DNA 控制区结构及其系统发育分析. 遗传学报, **33**(9): 793-799.]
- Zhang F, Mi ZY, Mao ZR, Wu NH. 1999. Cloning and structure analysis of the mitochondrial control region and its flanking tRNA genes from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **15**(3): 417-422. [张方, 米志勇, 毛钟荣, 吴乃虎. 1999. 草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)线粒体DNA控制区及其两侧tRNA基因的克隆与结构分析. 中国生物化学与分子生物学报, **15** (3): 417-422.]
- Zhang SM, Wu QJ, Zhang YP. 2000. Tandem repeats of Chinese sturgeon (*Acipenser sinensis*) and related species and its significance in evolution[J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **16** (4): 458-461. [张四明, 吴清江, 张亚平. 2000. 中华鲟(*Acipenser sinensis*)及相关种类的mtDNA控制区串联重复序列及其进化意义. 中国生物化学与分子生物学报, **16** (4): 458-461.]
- Zhang Y, Zhang E, He SP. 2003. Studies on the structure of the control region of the Bagridae in China and its phylogenetic significance [J]. *Acta Hydrobiological Sinica*, **27**(5): 463-467. [张燕, 张鄂, 何舜平. 2003. 中国鲿科鱼类线粒体DNA控制区结构及其系统发育分析. 水生生物学报, **27**(5): 463-467.]
- Zhu SH, Yang YC, Shen XQ, Zou JX, Zheng WJ, Yu HW, Huang B. 2006. Phylogenetic relationships of *Lutjanus* inferred from mitochondrial cytochrome *b* sequences [J]. *Acta Zoologica Sinica*, **52**(3): 514-521. [朱世华, 杨迎春, 沈锡权, 邹记兴, 郑文娟, 余红卫, 黄勃. 2006. 从细胞色素*b*基因序列探讨笛鯛属的分子系统发生关系. 动物学报, **52**(3): 514-521.]

新书信息

由中国科学院昆明动物研究所潘清华、王应祥教授等编著的《中国哺乳动物彩色图鉴》2007年11月已由中国林业出版社出版。该图鉴是识别中国哺乳动物的一本科学著作。图鉴共列出中国645种哺乳动物中的346种(主要为大中型哺乳类,其中包括中国特有种、国家重点保护种、珍稀濒危种和科、属的代表种)。每种哺乳动物除依照动物实物或标本彩绘的外形图外,尚对每一物种的中名、别名、拉丁学名、英名、系统地位、形态特征、地理分布、部分种的分类注释、栖息环境、习性、资源现状和保护等级等作了扼要介绍并附有彩色头骨特征图和分布图。文前附有哺乳动物外形、头骨和牙齿100多个特征的科学术语和基本测量方法;为使读者对我国哺乳动物的物种丰富度有个比较全面的了解,文后附有按最新资料修订的、迄止于2007年6月所记录的中国哺乳动物物种(645种)的中名、学名、分布和特有分布(附录-I)以及中国国家重点保护野生动物名录、CITES附录中哺乳动物(153种另2亚种)的种名修订和补充和保护等级(附录-II)。该图鉴是一本图文并茂、雅俗共赏的科学专著,可供科研、教学、野生动物保护、农、林、牧、副、渔、卫生防疫、公安、海关、外贸、动物检疫和旅游等部门和动物爱好者参考。

图鉴为880mm×1230mm, 1/16开本,硬壳全精装。售价:270元/本(含邮寄费)

征订联系:严丽,中国林业出版社(北京西城区刘海胡同7号,邮编:100009)

网址:www.cfph.com.cn, E-mail:fwlp@163.com, 电话:010-66176317