

# 赤眼鳟线粒体 D-loop 和 Cyt *b* 基因序列的对比分析\*

杨慧荣<sup>1</sup>, 赵会宏<sup>1</sup>, 蒙子宁<sup>2</sup>, 刘丽<sup>1</sup>, 林权卓<sup>1</sup>

(1. 华南农业大学动物科学学院, 广东 广州 510642;

2. 中山大学水生经济动物研究所暨广东省水生经济动物良种繁育重点实验室, 广东 广州 510275)

**摘要:** 研究了长江和珠江野生赤眼鳟 *Squaliobarbus curriculus* 共 4 个群体 24 个个体的线粒体控制区 (D-loop) 和细胞色素 *b* (Cyt *b*) 基因序列, 通过 PCR 扩增与测序, 分别获得了长度为 598 bp 和 752 bp 的 D-loop 和 Cyt *b* 基因片段。分析表明, D-loop 序列共定义了 18 个单倍型, 存在 34 个简约信息位点, 67 个多态性位点, 发生转换 40 次, 颠换 15 次, 插入/缺失 14 次。A、T、C、G 平均含量分别为 33.7%、35.1%、17.5%、13.7%。Cyt *b* 序列共定义了 18 个单倍型, 存在 68 个简约信息位点, 72 个多态性位点, 发生转换 60 次, 颠换 15 次, 无插入/缺失位点。A、T、C、G 平均含量分别为 29.3%、26.4%、29.8%、14.5%。Cyt *b* 除简约信息位点百分比大于 D-loop 外, 多态位点百分比和单突变位点百分比均小于 D-loop, 说明 D-loop 具有较快的进化速率。D-loop 序列的单倍型多样性 (*H*)、平均核苷酸差异数 (*K*)、核苷酸多样性 ( $\pi$ ) 分别 0.963 8、16.543 5 和 0.028 4, Cyt *b* 的 *H*、*K* 和  $\pi$  分别为 0.971 0、31.855 1 和 0.042 6, 显示赤眼鳟具有较高的遗传多样性水平, 且遗传变异主要存在于群体间。分析群体间的遗传距离和  $F_{ST}$  值, D-loop 和 Cyt *b* 都一致表明: 长江和珠江水系间存在明显的遗传分化, 系统树和分子变异等级分析 (AMOVA) 也支持这一观点。同一水系群体间的遗传差异较小, Cyt *b* 则更小; 不同水系群体间的遗传差异较大, Cyt *b* 则更大。故, Cyt *b* 呈现出“小则越小, 大则越大”的态势。分析其原因, 可能与 D-loop 和 Cyt *b* 进化速率密切相关。

**关键词:** 赤眼鳟; 线粒体; D-loop; Cyt *b*; 遗传变异; 对比分析

中图分类号: Q349; Q953 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579 (2012) 05-0100-08

## Comparison of Mitochondrial D-loop and Cyt *b* Sequences of *Squaliobarbus curriculus*

YANG Huirong<sup>1</sup>, ZHAO Huihong<sup>1</sup>, MONG Zining<sup>2</sup>, LIU Li<sup>1</sup>, LIN Quanzhuo<sup>1</sup>

(1. Animal Science College, South China Agricultural University, Guangzhou 510640, China;

2. Institute of Aquatic Economic Animal and Key Lab of Guangdong Province for Improved Variety Reproduction of Aquatic Economic Animals, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

**Abstract:** Sequences of mitochondrial D-loop and Cyt *b* gene of 24 individuals of *Squaliobarbus curriculus* which were sampled from four populations in Yangtze River and Pearl River were determined. Using PCR amplification and sequencing, 598bp of D-loop partial sequences and 752 bp of Cyt *b* partial sequences were obtained. In D-loop sequences, a total of 67 polymorphic sites defined 18 distinct haplotypes. And 34 parsim-info, 40 transition, 15 transversion and 14 insert/lacuna loci were found. The average content of A, T, C and G was 33.7%, 35.1%, 17.5% and 13.7%, respectively. In Cyt *b*

\* 收稿日期: 2012-03-12

**基金项目:** 国家种质资源平台资助项目 (2005DKA30470-010-2); 农业部渔业生态环境重点开放实验室开放基金资助项目 (24-9); 广东省科技计划资助项目 (2007B020708012); 广东省海洋渔业科技推广专项资助项目 (A201001H01); 广东省水利厅科技创新资助项目 (GOSL2011008); 水产养殖专业镇共性技术创新平台资助项目 (2010A080408012)。

**作者简介:** 杨慧荣 (1977 年生), 女, 讲师; E-mail: hry@scau.edu.cn

sequences, 72 polymorphic sites and 18 haplotypes were defined, and 68 parsim-info, 60 transition, 15 transversion and no insert/lacuna loci were found. The average content of A, T, C and G was 29.3%, 26.4%, 29.8% and 14.5%, respectively. The mean haplotype diversity ( $H$ ), the average number of nucleotide difference ( $K$ ) and nucleotide diversity ( $\pi$ ) for D-loop sequences were 0.9638, 16.543 5 and 0.0284, respectively. Accordingly, the values for Cyt *b* were 0.971 0, 31.855 1 and 0.042 6, respectively. The results suggested that both D-loop and Cyt *b* genes showed high genetic diversity in *S. curriculus*, among which the majority existed within populations. Based on population pairwise genetic distances and  $F_{ST}$ , there were obvious genetic differences between Yangtze River and Pearl River for *S. curriculus*. Molecular phylogenetic tree and analysis of molecular variance (AMOVA) also supported this result. The interpopulation genetic distances of Cyt *b* in the same water system were less than D-loop; while those in the different water system were more than D-loop. So for Cyt *b*, the more interpopulation genetic diversity was, the smaller genetic distances and  $F_{ST}$  were; the less interpopulation genetic diversity was, the larger genetic distances and  $F_{ST}$  were, which might be closely related to difference of evolutionary rate between D-loop and Cyt *b* gene.

**Key words:** *Squaliobarbus curriculus*; mitochondrial; D-loop; Cyt *b*; genetic diversity; comparison analysis

赤眼鳟 *Squaliobarbus curriculus* 属鲤科 Cyprinidae, 雅罗鱼亚科 Leuciscinae, 赤眼鳟属 *Squaliobarbus*, 俗称红眼棒、野草鱼、参鱼, 是广布中国主要水系的野生经济鱼类<sup>[1]</sup>。赤眼鳟因其肉质细嫩, 味道鲜美, 具有抗病力强, 食性杂, 生长较快等特点, 成为我国重要的经济鱼类之一。目前, 有关赤眼鳟的研究主要集中于资源状况、基础生物学、养殖和人工繁殖方面<sup>[2-3]</sup>, 而关于其群体遗传学与基因多样性研究则鲜有报道, 仅 2008 年杨太有等<sup>[4-6]</sup>用 RAPD 和 ISSR 技术对丹江口水库、青龙湖和宿鸭湖 3 地理群体进行了遗传多样性分析。

线粒体 DNA (Mitochondrial DNA, mtDNA) 具有母性遗传、进化速度快、核苷酸替代率高等特点, 已成为鱼类进化生物学和群体遗传学研究的重要遗传标记<sup>[7-8]</sup>。mtDNA 基因组内不同的区域进化速度存在差异, 适合不同水平的进化研究。在 mtDNA 上, 位于 tRNAPro 和 tRNAPhe 基因之间的 D 控制区 (D-loop) 是整个 mtDNA 上序列和长度变异最大的区域<sup>[9]</sup>, 也线粒体基因中进化最快的部分, 适用于种群水平差异的检测, 也可用于种间分析<sup>[7-10]</sup>。而 Cyt *b* 基因是线粒体 DNA 上的蛋白质编码基因, 其进化速度适中, 适合种群水平差异的检测, 是探讨种间和种内遗传分化程度的良好标记<sup>[11-13]</sup>。本研究开展了珠江水系和长江水系不同水域赤眼鳟 mtDNA D-loop 和 Cyt *b* 基因序列的对比分析, 旨在研究这两种遗传标记对赤眼鳟遗传多样性状况和群体遗传结构的差异, 探讨 mtDNA D-loop 和 Cyt *b* 基因对于群体遗传多样性分析的优缺

点, 进而为针对不同研究材料、不同研究目的, 选择不同的分析方法提供技术上的指导, 使得结论更客观真实。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

赤眼鳟样品于 2005 年 6 月分别采自长江水系的宜昌和武汉江段 (编号为 YC 群体、WH 群体), 珠江水系梧州和新丰江段 (编号为 WZ 群体、XF 群体)。YC 群体取自宜昌巴东县的官渡口, 属于长江上游干流巫峡的起点; WH 群体取自武汉市境内江段, 属于长江中游水域; WZ 群体和 XF 群体分布代表了珠江水系的西江和东江流域。共计 24 个个体, 均为野生群体。活体运回实验室后取背部肌肉并置于超低温冰箱, 取样后的赤眼鳟用福尔马林固定保存。

### 1.2 方法

基因组 DNA 的提取参考《分子克隆实验指南》<sup>[14]</sup>的方法略加改进。PCR 反应在 Biometra PCR 仪上进行。D-loop 和 Cyt *b* 引物由 Invitrogen 生物技术有限公司合成, D-loop 引物序列如下: DL1: 5'-ACCCCTGGCTCCCAAAGC-3', DH2: 5'-ATCTTAG-CATCTTCAGTG-3'<sup>[15]</sup>。Cyt *b* 引物序列如下: L14724: 5'-GACTTGAAAAACCACCGTTG-3'; H15915: 5'-CTCCGATCTCCGGATTACAAGAC-3'<sup>[12]</sup>。反应总体积 50  $\mu\text{L}$ , 其中 10  $\times$  Taq Buffer 5  $\mu\text{L}$ , Taq Polymerase 0.5  $\mu\text{L}$  (5 U  $\cdot \mu\text{L}^{-1}$ ), dNTPs (2.5 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$ ) 4  $\mu\text{L}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  (25 mmol  $\cdot \text{L}^{-1}$ ) 2.5  $\mu\text{L}$ , 引物 1 和 2

(10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 各 2  $\mu\text{L}$ , 模板 DNA 50 ng, 无离子超纯水 35.5  $\mu\text{L}$ 。扩增条件为: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 2 min, 再进行 35 个循环, 每一循环包括: 94  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 58  $^{\circ}\text{C}$  45 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min; 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。每次 PCR 反应均设不含模板 DNA 的空白对照。扩增产物经  $w = 1.5\%$  TBE 琼脂糖凝胶电泳分离, EB 染色, 紫外灯光下检测、拍照。

### 1.3 测序与数据分析

产物纯化和序列测定由上海基康公司 (Gene core Co.) 完成, 通过双向测序获得赤眼鳟 D-loop 和 Cyt *b* 序列, 经 SeqManII (DNASTAR Inc) 软件拼接并赋予人工校对后, 用 CLUSTAL-X 程序对所获得的序列进行比对<sup>[16]</sup>, 采用软件 DAMBE 统计单倍型并作图, 检测转换、颠换是否达饱和。群体的遗传多样性指标单倍型多样性 (Haplotype diversity,  $H$ ) 和核苷酸多样性 (Nucleotide diversity,  $\pi$ ) 由 ARLEQUIN<sup>[17]</sup> 统计软件计算获得, 群体间的分化指数 ( $F$ -statistics,  $F_{ST}$ )<sup>[18]</sup> 的计算在 ARLEQUIN 中完成, 群体间的基因流<sup>[19]</sup> 由公式  $N_m = [(1/F_{ST}) - 1] / 2$  计算得出, 群体遗传变异的分子方差分析 (AMOVA)<sup>[20]</sup> 在 ARLEQUIN 中完成。采用 MEGA4.1 软件<sup>[21]</sup> 统计 DNA 序列的碱基组成, 转换/颠换、插入/缺失位点数, 单突变位点, 简约信息位点和平均转换/颠换率; 利用 Kimura 双参数模型计算个体间、群体内和群体间的遗传变异率; 用 NJ 法进行聚类分析, 构建聚类关系树。

## 2 结果

### 2.1 D-loop 和 Cyt *b* 基因序列信息

由软件 DAMBE 统计可知: 在 24 个 598 bp 的 D-loop 基因序列中共检测出 18 个单倍型。由 MEGA4.1 软件对 D-loop 基因序列进行分析, 检测到 18 个单突变位点, 34 个简约信息位点数; 在 67 个突变位点中: 转换位点 40 个, 颠换位点 15 个 (其中有 2 个位点即发生了转换, 又发生了颠换), 插入/缺失位点 14 个, 转换明显高于颠换, 平均的转换发生频率是颠换的 3.192。24 个个体 D-loop 基因片段中, T、C、A、G 碱基的平均含量分别为 35.1%, 17.5%, 33.7%, 13.7%, 其中, A + T 的含量 (68.8%) 明显高于 C + G 的含量 (31.2%)。同样, 在 24 个 752 bp 的 Cyt *b* 基因序列中共检测出 18 个单倍型, 检测到 4 个单突变位点, 68 个简约信息位点数; 在 72 个突变位点中: 转换位点 60 个, 颠换位点 15 个 (其中有 3 个位点即发生了转换, 又发生了颠换), 无插入/缺失位点, 转换明显高于颠换, 平均的转换发生频率是颠换的 4.636。T、C、A、G 碱基平均含量分别为 26.4%, 29.8%, 29.3%, 14.5%, 其中, A + T 的含量 (55.7%) 略高于 C + G 的含量 (44.3%)。对比分析可知: Cyt *b* 除简约信息位点百分比大于 D-loop 外, 多态位点百分比和单突变位点百分比均小于 D-loop (表 1)。

表 1 赤眼鳟线粒体 D-loop 及 Cyt *b* 碱基组成及变异分析

Table 1 Composition and variability of the analyzed mtDNA of *S. curriculus*

| 基因序列         | 单倍型 | 比对碱基位点数 | 多态位点数及百分比  | 简约信息位点数及百分比 | 单突变位点数及百分比 | 转换、颠换数及比值 $T_s/T_v$ | A + T | C + G |
|--------------|-----|---------|------------|-------------|------------|---------------------|-------|-------|
| D-loop       | 18  | 598     | 67(11.20%) | 34(5.69%)   | 18(3.01%)  | 40/15(3.192)        | 66.8% | 31.2% |
| Cyt <i>b</i> | 18  | 747     | 72(9.63%)  | 68(9.10%)   | 4(0.54%)   | 60/15(4.636)        | 55.7% | 44.3% |

### 2.2 D-loop 和 Cyt *b* 基因序列的遗传变异分析

用软件 MEGA4.1 统计出两水系 4 个不同水域赤眼鳟各个体间的转换/颠换数及遗传变异率。D-loop 序列中, 各个体间的转换位点为 0 ~ 24, 颠换位点为 0 ~ 8, 均为转换大于颠换。两大水系 4 个不同群体个体间的遗传变异率在 0 ~ 5.93% 之间, 赤眼鳟不同个体与青鱼的遗传变异率在 19.09% ~ 20.43% 之间。4 个不同群体赤眼鳟 (WZ、XF、WH 和 YC) 群体内的遗传距离分别是 0.012 0、0.016 2、0.009 9 和 0.004 8, 群体间的遗传距离值为 0.007 0 ~ 0.049 1, 总平均遗传距离为 0.029

3 (不含外群)。Cyt *b* 序列中, 各个体间的转换位点为 0 ~ 51, 颠换位点为 0 ~ 13, 均为转换大于颠换。两大水系 4 个不同群体个体间的遗传变异率在 0 ~ 8.78% 之间, 而赤眼鳟不同个体与青鱼的遗传变异率在 11.61% ~ 12.48% 之间。4 个不同群体赤眼鳟 (WZ、XF、WH 和 YC) 群体内的遗传距离分别是 0.010 9、0.007 3、0.003 8 和 0.005 2, 群体间的遗传距离值为 0.004 3 ~ 0.082 7, 总平均遗传距离为 0.045 5 (不含外群) (表 2)。

4 个群体的 D-loop 和 Cyt *b* 序列的单倍型多样性 ( $H$ )、平均核苷酸差异数 ( $K \pm SD$ )、核苷酸多

样性 ( $\pi$ ) 见表 3。4 个群体间的  $F_{ST}$  及  $N_m$  值见表 4。从表 4 可以看出：武汉群体与新丰群体及梧州群体的遗传差异显著，宜昌群体与新丰群体及梧州群体的遗传差异显著，而同一水系内的不同群体差异不显著。把 4 个群体作为一个组进行群体间的分子变异等级分析 (AMOVA) (表 4)，结果表明：不管 D-loop，还是 Cyt b，群体间都存在显著性遗传差异 ( $F_{ST} = 0.68977$  或  $0.87194$ ,  $P = 0.0000 < 0.05$ )。

表 2 两大水系 4 个不同水域赤眼鳟 D-loop 和 Cyt b 基因序列群体内 (对角线上)、群体间 (对角线下) 以及总平均 (最后一行) 遗传距离<sup>1)</sup>

Table 2 The intrapopulation (on triangle), interpopulation (lower triangle) and overall mean (the last line) genetic distances of *S. curriculus* from four different water areas in Yangtze River and Pearl River based on D-loop and Cyt b gene

| 遗传距离    | 梧州 (WZ)                   | 新丰 (XF)            | 武汉 (WH)            | 宜昌 (YC)            |
|---------|---------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 梧州 (WZ) | 0.012 0<br>0.010 9        |                    |                    |                    |
| 新丰 (XF) | 0.013 0<br>0.009 3        | 0.016 2<br>0.007 3 |                    |                    |
| 武汉 (WH) | 0.049 1<br>0.082 7        | 0.047 3<br>0.080 1 | 0.009 9<br>0.003 8 |                    |
| 宜昌 (YC) | 0.046 3<br>0.081 8        | 0.044 4<br>0.079 4 | 0.007 0<br>0.004 3 | 0.004 8<br>0.005 2 |
| 总平均遗传距离 | 0.029 3<br>0.0455 (均不含外群) |                    |                    |                    |

1) 上面的代表 D-loop，下面的代表 Cyt b

表 3 4 个赤眼鳟群体相关遗传多样性指标<sup>1)</sup>  
Table 3 Indexes of genetic diversity in the four populations of *S. curriculus*

| 群体      | 样品数 $n$ | 单倍型多样性 $H$                               | 平均核苷酸差异数 $K \pm SD$                             | 核苷酸多样性 $\pi$                                 |
|---------|---------|--|---|--|
| 梧州 (WZ) | 6       | 0.933 30 ± 0.121 7<br>1.000 00 ± 0.096 2 | 6.933 33 ± 3.800 585<br>8.066 67 ± 4.369 338    | 0.011 87 ± 0.007 515<br>0.010 80 ± 0.006 754 |
| 新丰 (XF) | 6       | 0.933 30 ± 0.121 7<br>0.933 30 ± 0.121 7 | 9.266 67 ± 4.971 027<br>5.400 00 ± 3.029 851    | 0.015 87 ± 0.009 829<br>0.007 23 ± 0.004 683 |
| 武汉 (WH) | 6       | 0.933 30 ± 0.121 7<br>0.933 30 ± 0.121 7 | 5.666 67 ± 3.164 034<br>2.800 00 ± 1.714 643    | 0.009 70 ± 0.006 256<br>0.003 75 ± 0.002 650 |
| 宜昌 (YC) | 6       | 0.933 30 ± 0.121 7<br>0.933 30 ± 0.121 7 | 2.800 00 ± 1.714 643<br>3.866 67 ± 2.256 349    | 0.004 79 ± 0.003 384<br>0.005 18 ± 0.003 488 |
| 总计      | 24      | 0.963 80 ± 0.0253<br>0.971 00 ± 0.0208   | 16.543 48 ± 7.634 385<br>31.855 07 ± 14.404 958 | 0.028 38 ± 0.014 598<br>0.042 64 ± 0.021 497 |

1) 上面的代表 D-loop，下面的代表 Cyt b

表 4 群体间的  $F_{ST}$  (对角线下方) 和  $N_m$  (对角线上方)<sup>1)</sup>

Table 4 Population pairwise  $F_{ST}$  (below diagonal) and  $N_m$  (above diagonal) values

| 群体      | 梧州 (WZ)                   | 新丰 (XF)   | 武汉 (WH)                   | 宜昌 (YC)   |
|---------|---------------------------|-----------|---------------------------|-----------|
| 梧州 (WZ) | —                         | 21.334 06 | 0.143 037                 | 0.111 247 |
| 新丰 (XF) | 0.022 90 <sup>n.s.</sup>  | —         | 0.189 227                 | 0.154 664 |
| 武汉 (WH) | -0.087 66 <sup>n.s.</sup> | 0.725 45* | —                         | -11.733 4 |
| 宜昌 (YC) | 0.777 56*                 | 0.931 08* | 0.044 51 <sup>n.s.</sup>  | —         |
|         | 0.911 32*                 | 0.763 75* | -0.053 23 <sup>n.s.</sup> | -9.893 2  |

1) 上面代表 D-loop，下面代表 Cyt b，\* 表示差异显著，n. s. 表示差异不显著

表 5 群体间的遗传变异的分子变异等级分析 (AMOVA)<sup>1)</sup>

Table 5 Analysis of molecular variance (AMOVA)

| 组别  | 自由度 | 平方和                | 方差组分                      | 变异百分率/%          | F-统计量                | P 值                    |
|-----|-----|--------------------|---------------------------|------------------|----------------------|------------------------|
| 组别  | 3   | 134.498<br>316.000 | 6.951 09Va<br>17.136 11Va | 68.98%<br>87.19% | 0.689 77<br>0.871 94 | 0.000 00*<br>0.000 00* |
| 群体内 | 20  | 62.526<br>50.333   | 3.126 28Vb<br>2.516 67Vb  | 31.02%<br>12.81% |                      |                        |
| 总体  | 23  | 197.024<br>366.333 | 10.077 37<br>19.652 78    |                  |                      |                        |

1) 上面的代表 D-loop，下面的代表 Cyt b，\* 表示差异显著

### 2.3 分子系统树

以青鱼 *Mylopharyngodon piceus* D-loop 和 Cyt b 基因序列为外群，用 MEGA4.1 中的“NJ”法构建分子系统树，其拓扑结构见图 1。用 Bootstrap 1000 给出各支的置信度，最高为 100，最低为 17。两大水系 4 个不同水域赤眼鳟 24 个个体的系统树明显分为两支：珠江 12 个个体聚为一支，长江 12 个个体聚为另一支，且都有较高的置信度，各大水系内的不同水域个体却混杂在一起。

## 3 讨论

### 3.1 D-loop 和 Cyt b 对赤眼鳟遗传多样性的分析

单倍型多样性 ( $H$ )、平均核苷酸差异数 ( $K \pm SD$ ) 和核苷酸多样性 ( $\pi$ ) 是反映物种遗传变异水平的 3 个重要参数，赤眼鳟 D-loop 和 Cyt b 的  $H$ 、 $K$  和  $\pi$  值分别为 0.963 8、16.543 48、0.028 38 和 0.971 0、31.855 07、0.042 6，与相同技术

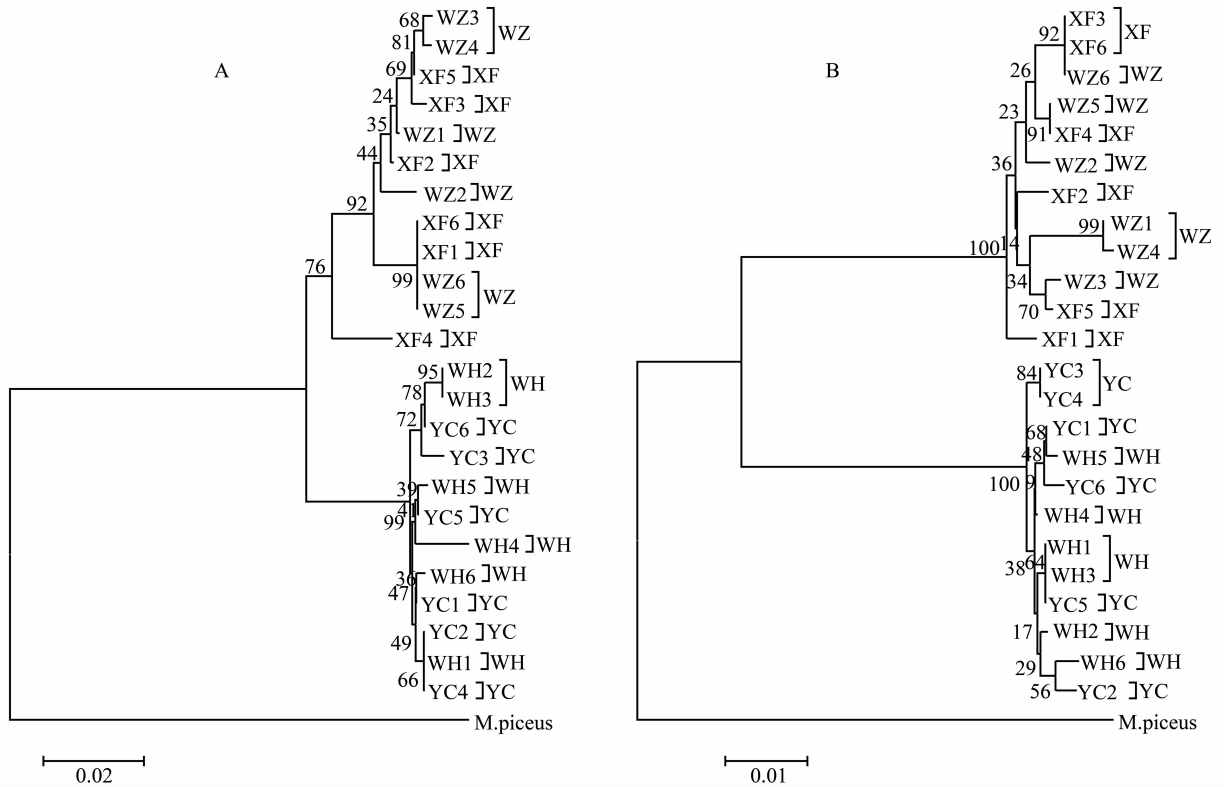


图 1 两大水系 4 个不同水域赤眼鳟 D-loop (A) 和 Cyt *b* (B) 基因序列的 NJ 分子系统树  
(数值表示 1 000 次重复抽样的百分比)

Fig. 1 The molecular phylogenetic tree of *S. curriculus* from four water areas in Yangtze River and Pearl River by NJ method (numbers indicated bootstrap values of 1 000 replicates) based on D-loop (A) and Cyt *b* (B)

对光唇裂腹鱼<sup>[22-25]</sup>的研究结果相比(表 5), 本研究中赤眼鳟各遗传多样性参数值较高。另外, 根据碱基组成的基本信息, 赤眼鳟具有较高的单倍型检出率(数)、多态位点百分比(数)以及简约信息位点百分比(数)<sup>[22-26]</sup>。所以, 无论是 D-loop, 还是 Cyt *b*, 两者都很相似地得出赤眼鳟总体较高遗传多样性的研究结果。由于物种特定的遗传结构、分类地位、生态习性及淡、海水鱼类在基因交流方面的不同, 可能导致它们彼此之间在遗传分化水平上存在差异, 但上述比较, 在一定程度上能够间接反映出赤眼鳟的遗传多样性状况。

一般来说, 物种遗传多样性的高低与其适应能力、生存能力和进化潜力密切相关, 遗传变异是有机体适应环境变化的必要条件<sup>[27-28]</sup>。虽然赤眼鳟具有较高的遗传多样性水平, 但由表 2、4 可以看出, D-loop 和 Cyt *b* 很一致的表明: 长江和珠江水系间存在明显的遗传变异, 可同一水系内群体间的遗传变异和遗传多样性并不十分丰富。分子变异分析(AMOVA)结果也显示: 4 个群体总的遗传分化指数为 0.689 77 和 0.871 94 ( $P < 0.001$ ), 其中 68.98%、87.19% 遗传变异存在于群体间, 群体内

的遗传变异率对总的遗传变异贡献较小。所以, 在同一水系内部, 赤眼鳟的遗传多样性状况并不十分乐观, 加强对现有资源的科学管理和保护、恢复有效种群大小、丰富遗传多样性是保护赤眼鳟自然资源的有效举措。

### 3.2 D-loop 和 Cyt *b* 基因的变异位点比较

在所研究的不同水域赤眼鳟个体 D-loop 序列中检测出了 67 个突变位点, 多态位点的比例高达 11.2%, 再一次验证了 D-loop 序列的高进化速率。其中插入/缺失位点 14 个, 在检测的 Cyt *b* 中就没有发现插入/缺失位点, 在其他的研究中也证实了该观点<sup>[29, 30]</sup>, 这主要是由于 Cyt *b* 用于编码蛋白质, 如有插入/缺失的发生很容易被淘汰; 而 D-loop 片段为非编码基因, 主要与线粒体基因的调控有关, 不受蛋白功能上的需要和三联体密码的限制, 所以插入/缺失突变后比较容易被保留。在 D-loop 和 Cyt *b* 的变异位点中, 转换和颠换比值分别为 3.192 和 4.636, 通过软件 DAMBE 分析所得的转换、颠换对遗传距离图可知: D-loop 和 Cyt *b* 的转换和颠换数没有达到平台效应, 即没有达到饱和状态, 说明供统计分析的数据准确可靠, 序列中的碱

表 6 不同物种相关遗传多样性指标比较<sup>1)</sup>  
Table 6 Indexes comparison of genetic diversity for different species

| Gene   | Species                                  | $H_N/S_N$ | $H$      | $K \pm SD$ | $\pi$    |
|--------|--|-----------|----------|------------|----------|
| D-loop | 赤眼鳟 <i>Squaliobarbus curriculus</i>      | 18/24     | 0.963 8  | 16.543 48  | 0.028 38 |
|        | 香鱼 <i>Plecoglossus altivelis</i>         | 5/31      | 0.8107 5 | 1.703 23   | 0.001 99 |
|        | 光唇裂腹鱼 <i>Schizothorax lissolabiatu</i> s | 10/40     | 0.733    | 1.301      | 0.002 7  |
|        | 银鲴 <i>Pampus argenteus</i>               | 11/24     | 0.89     | 2.57       | 0.007    |
| Cyt b  | 赤眼鳟 <i>S. curriculus</i>                 | 18/24     | 0.971 0  | 31.855 07  | 0.042 64 |
|        | 香鱼 <i>P. altivelis</i>                   | 2/31      | 0.32300  | 0.322 58   | 0.000 28 |
|        | 条石鲷 <i>Oplegnathus fasciatus</i>         | 11/30     | 0.770    | 4.025      | 0.003 54 |
|        | 斜带石斑鱼 <i>Epinephelus coioides</i>        | 3/36      | 0.118 8  | 1.621 21   | 0.003 82 |

1)  $S_N$  - 样品数,  $H_N$  - 单倍型数,  $H$  - 单倍型多样性, ( $K \pm SD$ ) - 平均核苷酸差异数, SD - 标准偏差,  $\pi$  - 核苷酸多态性

基替代均具有系统发育意义<sup>[31]</sup>, 可以用来作为赤眼鳟种内的遗传分析。统计每个个体两两之间的转换和颠换数, 每条序列的转换均大于颠换, Gerlach 等<sup>[32]</sup>的研究成果也证实了该观点, 其原因仍不清楚, 需要进一步研究。在 D-loop 和 Cyt b 基因碱基组成中, A + T 含量均高于 C + G 含量, 且 D-loop 基因中 A + T 含量要高出 Cyt b 近 11.1%, 这与其他的研究结果相一致<sup>[33, 34]</sup>。

### 3.3 D-loop 和 Cyt b 基因的进化比较

线粒体基因组的特性使它已成为进化生物学和群体遗传学研究中重要的分子标记。目前, 研究最多的是 Cyt b、12S rRNA、16S rRNA、CO I 基因和 D-loop 区<sup>[22-26, 30, 34-35]</sup>。本研究中, 尽管 D-loop 和 Cyt b 很一致的表明长江和珠江水系赤眼鳟存在明显的遗传分化, 但同一水系内群体间的遗传变异并不丰富, 且 D-loop 和 Cyt b 基因之间也存在差异。由群体间的遗传距离值和  $F_{ST}$  值 (表 2 和表 4) 可以看出, 对于同一水系群体间 (如 WZ-XF, YC-WH) 的遗传差异较小, Cyt b 则更小, 对于不同水系群体间 (如 WZ-YC 和 WH, XF-YC 和 WH) 的遗传差异较大, Cyt b 则更大, 呈现出“小则越小, 大则越大”的态势。分析其原因, 可能与 D-loop 和 Cyt b 进化速率密切相关。

有研究表明, 线粒体不同基因的进化速率存在差异<sup>[37]</sup>。D-loop 区由于不编码蛋白, 受到的选择压力最小, 所以进化速度最快<sup>[23, 36]</sup>。Cyt b 基因由于编码线粒体细胞色素 b 蛋白, 其进化速度适中, 适合研究种内到种间甚至科间的系统发育关系, 近年来广泛地应用于爬行类、鱼类等的系统发育、种类鉴别等的研究<sup>[38-40]</sup>。蒙子宁等<sup>[26]</sup>认为, 石斑鱼线粒体细胞色素 b 基因序列在种内变异极小、变异位点数和平均核苷酸差异数等均非常低; 但该基因序列在石斑鱼种间却存在较大的核苷酸差异, UP-

GMA 系统树更是以 100% 的置信度将斜带石斑鱼和赤点石斑鱼区分开。由此可见, Cyt b 基因具有保守和变异的双重特性、保守性决定了该基因不适合做石斑鱼的种内遗传变异分析; 但其变异性使得该基因适合于种以上水平的种类鉴定。李娜等<sup>[23]</sup>的研究中, 将中国香鱼与日本香鱼的 Cyt b 基因比对应, 仅发现 2 个变异位点, 说明 Cyt b 基因在香鱼种内的变异很小, 所以作者认为其不适合作为种内遗传分析的标记。而在 D-loop 区发现 17 个变异位点, 说明香鱼与其他脊椎动物一样线粒体 D-loop 区的进化速度较快。

据此分析, 是否可以推测: Cyt b 在遗传变异显著 (或遗传分化明显) 的群体中变异较大, 更适合种间或以上阶元系统进化分析, 而 D-loop 在遗传差异不显著的群体中变异相对较大, 适合同种不同地理居群的多样性分析?

由于各种遗传分析方法都有优缺点, 因此在实践中, 需根据研究材料、目的不同, 选择不同的分析方法, 且最好是几种方法同时运用, 将结果相互印证, 以便使得到的结论更客观, 更真实。

### 参考文献:

[1] 杨干荣, 黄宏金. 雅罗鱼亚科[M] // 伍献文. 中国鲤科鱼类志. 上海: 上海科学技术出版社, 1982: 52 - 53.  
[2] 李桂峰, 康裕财, 孙际佳, 等. 酵母多糖对赤眼鳟非特异性免疫技能的影响[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2003, 42(4): 55 - 58.  
[3] 何学福, 阳清发. 嘉陵江西河赤眼鳟的生长研究[J]. 西南师范大学学报: 自然科学版, 1997, 22(6): 680 - 685.  
[4] 杨太有, 关建义, 陈宏喜, 等. 丹江口水库赤眼鳟 (*Squaliobarbus curriculus*) 遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 分析[J]. 海洋与湖沼, 2008, 39(2): 157 - 161.

- [5] 杨太有, 关建议, 陈宏喜. 三个地理群体赤眼鳟遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 水生生物学报, 2008, 32(4): 529-533.
- [6] 杨太有, 关建议, 陈宏喜, 等. 三个地理群体赤眼鳟遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 四川动物, 2008, 27(5): 783-784.
- [7] 郭新红, 刘少军, 刘巧, 等. 鱼类线粒体 DNA 研究新进展[J]. 遗传学报, 2004, 31(9): 983-990.
- [8] 肖武汉, 张亚平. 鱼类线粒体 DNA 的遗传与进化[J]. 水生生物学报, 2000, 24(4): 384-391.
- [9] LEE W J, KOCHER T D. Complete sequence of a sea Lamprey (*Petromyza marinus*) mitochondrial genome: Early establishment of the vertebrate genome organization [J]. *Genetics*, 1996, 139: 873-887.
- [10] 葛陇利, 赫崇波, 高祥刚, 等. 利用 mtDNA 控制区序列分析斑点叉尾鲷的遗传多样性[J]. 水产科学, 2007, 26(10): 547-550.
- [11] MOMMSEN H. Biochemistry and molecular biology of fishes [M]. London: Elsevier Science Publishers, 1993: 1-38.
- [12] XIAO Wuhan, ZHANG Yaping, LIU Huanzhang. Molecular systematics of Xenocyprinae (Telestei: Cyprinidae): taxonomy, biogeography, and coevolution of a special group restricted in east Asia[J]. *Mol Phylogenet Evol*, 2001, 18: 163-173.
- [13] 韩虎峰, 代应贵. 珠江水系光唇裂腹鱼可渡河种群 mtDNA D-loop 序列多态性分析[J]. 中国水产科学, 2010, 17(1): 143-149.
- [14] SAMBROOK J, RUSSELL D. 分子克隆实验指南 [M]. 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1996: 464-469.
- [15] 唐琼英, 刘焕章, 杨秀平, 等. 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[J]. 水生生物学报, 2005, 29(6): 645-653.
- [16] THOMPSON J D, GIBSON T J, PLEWNIAC F, et al. The Clustal\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequences alignment aided by quality analysis tools[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(24): 4876-4882.
- [17] SCHNEIDER S, ROESSLI D, EXCOFFIER L. ARLEQUIN, version2000: a software for population genetics data analysis [M]. Geneva: University of Geneva, 2000.
- [18] WRIGHT S. The interpretation of population structure by  $F_2$  statistics with special regard to systems of mating [J]. *Evolution*, 1965, 19: 395-420.
- [19] NEI M. Evolution of human races at the gene level[M] // BONNE T B, COHEN T, GOODMAN R M, et al. *Human Genetics, Part A: The unfolding genome*. New York: Alan R Liss, 1982: 167-181.
- [20] EXCOFFIER L, SMOUSE P E, QUATTRO J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA heliotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data [J]. *Genetics*, 1992, 131: 479-497.
- [21] KUMAR S, TAMURA K, JAKOBSEN I B, et al. MEGA2.0: molecular evolutionary genetics analysis software [M]. Tempe: Arizona State University, 2001.
- [22] 韩虎峰, 代应贵. 珠江水系光唇裂腹鱼可渡河种群 mtDNA D-loop 序列多态性分析[J]. 中国水产科学, 2010, 17(1): 143-149.
- [23] 李娜, 陈少波, 谢起浪, 等. 闽浙地区香鱼线粒体 Cyt b 基因和 D-loop 区序列多态性分析[J]. 遗传, 2008, 30(7): 919-925.
- [24] 彭士明, 施兆鸿, 陈超, 等. 根据 mtDNA D-loop 序列分析东海银鲳群体遗传多样性[J]. 海洋科学, 2010, 34(2): 28-32.
- [25] 孙鹏, 尹飞, 彭士明, 等. 条石鲷线粒体 CO I 和 Cyt b 序列的遗传变异分析[J]. 水产学报, 2011, 35(5): 327-333.
- [26] 蒙子宁, 杨丽萍, 吴丰, 等. 斜带石斑鱼、赤点石斑鱼 RAPD 和线粒体 Cyt b 基因序列变异分析[J]. 中山大学学报:自然科学版, 2007, 46(1): 75-80.
- [27] CONRAD M. Adaptability: The significance of variability from molecular to ecosystem [M]. New York: Plenum Press, 1983.
- [28] FERAL J P. How useful are the genetic markers in attempts to understand and manage marine biodiversity [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2002, 268: 121-145.
- [29] 唐琼英, 杨秀平, 刘焕章. 刺鲃基于线粒体细胞色素 b 基因的地理学过程[J]. 水生生物学报, 2003, 27(4): 352-356.
- [30] BILLINGTON N, HEBERT P D N. Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions [J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1991, 48(suppl. 1): 80-94.
- [31] KOCHER T D, WILSON A C. Sequence evolution of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees: Control region and a protein-coding region [M] // OSAWA S, HONJO T. *Evolution of life: Fossils, molecules and culture*. Tokyo: Springer-Verlag, 1991: 391-413.
- [32] GERLACH G, MUSOLF K F. Fragmentation of landscape as a cause for genetic subdivision in bank voles [J]. *Conservation Biology*, 2000, 14: 1066-1074.
- [33] TANG Qiongying, LIU Huanzhang, MAYDEN R, et al. Comparison of evolutionary rates in the mitochondrial DNA cytochrome b gene and control region and their implications for phylogeny of the Cobitoidea (Teleostei: Cypriniformes) [J]. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2006, 39: 347-357.

如果可以准确的测量得到固体样品的内耗以及加入液体后强迫振动的相位差,即可计算出待测液体的黏度:

$$\eta = \frac{(\tan \delta(K_1 - I\omega^2) + K_1 \tan \varphi)^2}{2S^2 r^4 \omega^3 \rho (1 + \tan \delta)^2} \quad (10)$$

上述的方法可以实现对液体黏度的绝对测量,而实现绝对测量则需要实现固体内耗以及相位差准确值的测量。我们利用上述仪器对 18 °C 下水的黏度进行了测量。若在测量中不考虑延时的影响,则测量得到的固体内耗和加入液体后的相位差均偏大,这时计算得到的水黏度为 1.041 mPa · s,与文献报道中 18 °C 下水的黏度 1.056 mPa · s 相差约 2%。若考虑系统在测量频率下的延时,对测量得到的固体内耗和加入液体后的相位差进行修正后,计算得到的水的黏度为 1.059 mPa · s,与文献报道中的值非常接近。这说明在利用这类方法进行相位差测量时,通过修正延时引起的系统误差,可以有效地提高测量的准确度。

## 4 结 论

本文通过分析倒扭摆内耗仪在强迫振动模式下的测量原理,指出扭摆型内耗仪强迫振动法测量误差主要来源于系统延时——包括机械波传播延时和电路延时。本文提出了测量系统延时的方法,利用测量得到的系统延时分别对强迫振动模式下固体内耗和液体黏度的测量结果进行了修正,很大程度上消除了内耗测量值的系统误差,同时使液体黏度的绝对测量误差由 3% 减少到 1% 以内。这些结果表明,通过修正系统延时误差可以有效的提高力学谱

仪在强迫振动模式下的测量精度,为实现高精度的固体内耗 - 频率谱、流体黏弹性 - 频率谱的测量提供了重要的帮助。

## 参考文献:

- [1] NOWICK A S, BERRY B S. Anelastic relaxation in crystalline solids[M]. Academic Press, 1972.
  - [2] 葛庭燧. 扭摆内耗仪的发明和内耗研究的开拓与发展[J]. 力学进展,1994(3): 336 - 352.
  - [3] 李永华,王芳,郑洁,等. Ni\_(49.8)Ti\_(50.2)合金马氏体逆相变的瞬态内耗与频率间关系的定量分析[J]. 金属热处理,2008(2): 85 - 88.
  - [4] 刘军民. MnCu 合金热弹性马氏体相变过程中的非线性内耗行为[J]. 物理学报,1997(12):1.
  - [5] 吴青云,宫晨利,廖军. Cu-Al-Ni-Mn-Ti 合金相变弛豫特性的研究[J]. 合肥工业大学学报:自然科学版,2008(1): 93 - 95.
  - [6] 阎琦,史文,李麟,等. 内耗法研究退火温度对含钒 BH 钢中固溶 C 原子浓度的影响[J]. 上海金属,2011(5): 10 - 14.
  - [7] 张进修,陈岚,孟荟,等. BaTiO<sub>3</sub> 陶瓷中氧缺位引起的弛豫内耗峰[J]. 中山大学学报:自然科学版,2004,43(6):181 - 182.
  - [8] 刘文峰,李益,欧阳红群,等. Na<sub>x</sub>Co<sub>2</sub>O<sub>4</sub> 陶瓷的力学弛豫和阻抗弛豫研究[J]. 中山大学学报:自然科学版,2009,48(3):33 - 36.
  - [9] FRANCO S. 基于运算放大器和模拟集成电路的电路设计[M]. 刘树棠,朱茂林,荣玫,译. 西安:西安交通大学出版社,2009.
  - [10] JUNG W. Op amp applications handbook[M]. Amsterdam:Elsevier/Newnes,2006.
- 
- (上接第 106 页)
- [34] 孙希福,高天翔,窦存银,等. 江豚线粒体 Cyt b 和 D-loop 片段序列分析及其分子系统学研究[J]. 南方水产,2009,5(5): 24 - 31.
  - [35] 梁华芳,徐晓鹏,黄志坚,等. 中国沿海龙虾属 8 种龙虾 COI 基因序列的分子系统学研究[J]. 中山大学学报:自然科学版,2011,50(6): 94 - 98.
  - [36] 黄志坚,徐晓鹏,唐晶晶,等. 淡水鱼类线粒体 DNA D-loop 基因的引物设计和应用[J]. 中山大学学报:自然科学版,2009,48(4): 84 - 88.
  - [37] MEYER A. Evolution of mitochondria DNA in fishes [M] // MOMMSEN T P, HOCHACHKA P W. Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Vol. 2. New York: Elsevier, 1993: 1 - 38.
  - [38] 周继亮,张亚平,黄美华,等. 蝮亚科蛇线粒体细胞色素 b 基因序列分析及其系统发育[J]. 动物学报,2001,47(4): 361 - 366.
  - [39] FARIAS I P, ORTI G, SAMPAIO I, et al. The cytochrome b gene as a phylogenetic marker: the limits of resolution for analyzing relationships among cichlid fishes [J]. J Mol Evol, 2001, 53(2): 89 - 103
  - [40] 项方,邹记兴,邓凤姣,等. 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[J]. 动物学杂志,2004,39(5): 13 - 18.